



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

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1. Le changement global

Bien que le système « Terre » soit en continuelle évolution, les activités humaines développées depuis la révolution industrielle ont provoqué une accélération de la vitesse à laquelle notre environnement est modifié. En effet, le « trou » dans la couche d'ozone, le réchauffement climatique, les pollutions à large échelle et, de manière générale, la dégradation des habitats, concourent à affecter le fonctionnement de la planète sur le long terme. Ces modifications de grande envergure participent à ce que les scientifiques nomment « **le changement global** » (« *Global Change* »). Une prise de conscience de ce phénomène a abouti à un consensus international (mais pas encore unanime) sur l'importance d'augmenter nos connaissances scientifiques dans ces différents domaines et de lier le plus efficacement possible les découvertes scientifiques aux décisions politiques.

Souvent, le changement global est associé au réchauffement climatique provoqué en grande partie par l'émission dans l'atmosphère de gaz dits « à effet de serre ». Toutefois, les pressions exercées par l'homme sur l'environnement peuvent être si importantes aujourd'hui, que le changement global ne concerne pas uniquement ce réchauffement. Ainsi, Meybeck (2004) a énuméré les activités humaines qui contribuent à modifier les écosystèmes aquatiques continentaux. A côté des actions directes comme la régulation des débits, la construction de barrages, ou encore la consommation abusive d'eau pouvant induire un assèchement de certaines rivières, d'autres changements sont occasionnés de manière indirecte. C'est le cas notamment d'un déséquilibre de la sédimentation, de contaminations par des composés chimiques, de l'acidification, de l'eutrophisation, d'un déséquilibre thermique, de contaminations radioactives ou microbiennes, ou encore de l'introduction de nouvelles espèces. Ces perturbations ont atteint une dimension planétaire et rares sont maintenant les endroits du monde qui restent complètement épargnés (Bargagli, 2000; Sanchez-Hernandez, 2000).

Dans ce travail, nous allons nous focaliser sur l'étude d'une des ces perturbations environnementales : la **pollution chimique**. Généralement, le grand public prend conscience des ravages que peuvent occasionner des xénobiotiques lorsque se produit un événement spectaculaire, largement relaté dans la presse, et concernant de graves pollutions aiguës. Les marées

noires, comme celle résultant du naufrage de l'« Erika » le long des côtes bretonnes le 12 décembre 1999, en sont certainement les exemples les plus marquants (Le Hir et Hily, 2002). Ces événements ont des impacts non négligeables sur les écosystèmes, qui méritent toute l'attention des scientifiques. Hélas, ils ne sont pas les seuls. On assiste en effet ces dernières décennies à un phénomène moins médiatique, mais qui peut se révéler tout aussi dangereux pour la pérennité des écosystèmes, j'ai nommé la **pollution chronique diffuse**. Ce type de pollution concerne des concentrations ou des quantités de xénobiotiques plus faibles que celles qui entrent en jeu lors des pollutions aiguës. Cependant, la présence de ces substances dans l'environnement est continuellement entretenue, ce qui aboutit au fait que la faune et la flore soient au contact de polluants pendant une durée qui peut être très longue. **Comprendre les impacts de telles pollutions sur la faune et la flore, mais aussi sur l'homme, est un enjeu important pour ce nouveau siècle.**

C'est dans ce contexte que le travail présenté ici a été réalisé. **L'objectif général étant de comprendre de manière intégrative certaines réponses biologiques d'un organisme aquatique utilisé comme modèle (le crabe chinois), suite à différents types d'exposition (aiguë ou chronique) à un polluant métallique (le cadmium).**

1.2. Le stress : définitions et notions apparentées

Le **stress** est un des maux souvent associés à nos sociétés modernes, découlant de nos modes de vie actifs, d'horaires parfois surchargés, ou encore de pressions très fortes exercées dans la vie professionnelle. Il résulte souvent de causes psycho-émotionnelles telles que: décès, divorce, échec, situation financière difficile, frustration,... La notion de stress est tellement largement ressentie dans la population que l'on ne compte plus les séminaires consacrés à la gestion du stress au travail, ou encore les méthodes de relaxation permettant d'éliminer les tensions internes. Terme fourre-tout par excellence, le stress a toutefois des fondements biologiques réels et est largement étudié tant à des niveaux psychologiques et émotionnels qu'à des niveaux physiologiques et même cellulaires.

Etymologiquement, le terme « stress » provient du latin « *stringere* »: mettre en tension. Il peut être décrit de la manière suivante :

- le terme « stress » définit autant la situation subie par l'organisme, que l'état dans lequel se trouve ce dernier ;
- les situations entraînant un stress sont dues à des **agents stressants** (« *stressors* »). Les agents psycho-émotionnels sont loin d'être les seuls à provoquer cet état réactionnel. Le stress peut également être provoqué par des agents physiques et chimiques. Iwama et al. (2004) ont défini trois catégories d'agents stressants pour des poissons. Ils distinguent les stress environnementaux, physiques et biologiques. Parmi les premiers, la présence de substances polluantes tels que des métaux ou des pesticides sont source de stress. Toutefois, des changements importants des paramètres qualitatifs de l'eau comme le pH, la salinité, l'oxygène dissous, la température, etc., peuvent également engendrer un état de stress. Les agents physiques regroupent par exemple les manipulations de l'animal, le confinement, le transport ou la poursuite (pêche sous-marine par exemple). Enfin, les agents dits biologiques concernent les différents agents pathogènes ou encore une possible hiérarchisation sociale au sein de la population ;

- les agents stressants peuvent être perçus comme agréables ou non ;
- ces agents induisent une « agression » ou une « tension » sur un organisme. Celle-ci provient d'une situation nouvelle (dans le sens d'inhabituelle), de quelque origine que ce soit ;
- l' « agression » provoque une réaction ou une réponse de la part de l'organisme, au niveau biologique et/ou psychologique, pouvant mener à une adaptation ;
- l'organisme soumis à un stress peut tomber dans un état pathologique.

Bref, il s'agit de l'état dans lequel se trouve un organisme soumis à une situation nouvelle/inhabituelle pendant laquelle un agent stressant d'origine psychologique, physique, chimique ou biologique provoque chez lui une réponse biologique et/ou psychologique pouvant mener à une adaptation vis-à-vis de cette nouvelle situation. On pourrait donc apparenter un état de stress à une **lutte menée par un organisme afin de s'adapter à une nouvelle condition environnementale**.

Les biologistes s'accordent à dire qu'un stress est un facteur environnemental potentiellement défavorable pour un organisme vivant. Si les limites de tolérance et les capacités d'adaptation sont dépassées, il en résulte des dommages irréversibles et même la mort. Si on prend l'exemple d'une plante¹, les scientifiques ont défini quatre phases caractérisant la réponse au stress (Lichtenthaler, 1998). Si un ou plusieurs paramètres environnementaux sont modifiés, la plante peut entrer dans la première phase de la réponse au stress appelée **phase d'alarme**, pendant laquelle elle répond avec une diminution d'une ou de plusieurs fonctions physiologiques, tels que la photosynthèse, le transport de métabolites ou encore la capture d'ions. En conséquence, la plante dévie de ses valeurs physiologiques normales, c'est-à-dire de son homéostasie. Elle perd alors de sa vitalité. Si l'espèce ne possède pas ou peu de mécanismes de tolérance, des dommages aigus peuvent apparaître rapidement. Cependant, au cours de cette phase d'alarme, la plupart des végétaux activent des mécanismes de résistance au stress telles qu'une modification des flux métaboliques, une activation de

¹ les mêmes phases peuvent bien entendu être retrouvées chez un animal.

processus de réparation, ou encore des adaptations morphologiques et métaboliques à long terme. Pendant cette deuxième phase appelée **étape de résistance**, la plante établit un nouvel équilibre physiologique qui augmente sa résistance jusqu'à un maximum. Si le stress perdure ou augmente en intensité, la plante peut alors rentrer dans une **phase d'épuisement** pendant laquelle les mécanismes de résistance mis en place sont dépassés. Cependant, si l'agent stressant est diminué ou supprimé avant que des processus de dégénérescence irréversibles soient déclenchés, la plante peut entrer dans une **phase de régénération** et trouver un nouvel équilibre physiologique (Fig 1.).

Ainsi, un organisme soumis à une modification de son

STRESS SYNDROME RESPONSES OF PLANTS

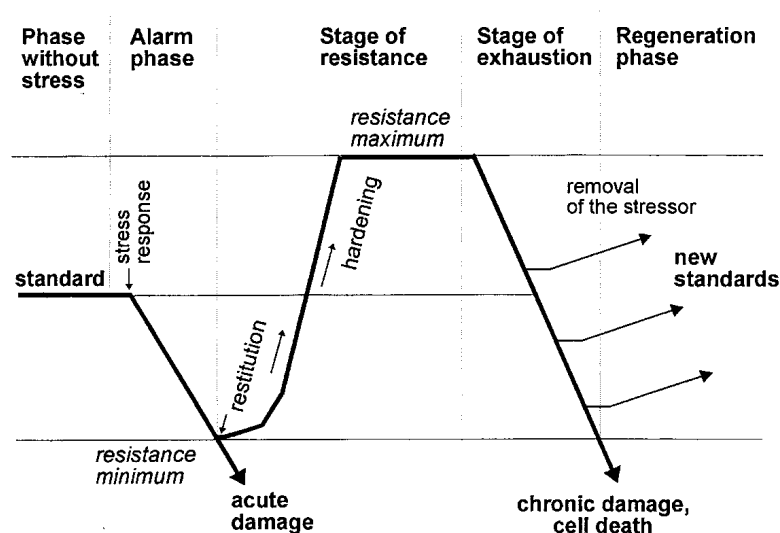


Fig. 1. Succession des réponses induites chez un végétal suite à une exposition à un agent stressant (d'après Lichtenthaler, 1998). Voir le texte pour plus de précisions.

environnement va d'abord avoir une réaction immédiate, pendant laquelle des ajustements physiologiques vitaux vont être mis en place afin de maintenir l'homéostasie de l'organisme. Après un temps d'exposition plus important, il va être capable d'activer des mécanismes augmentant sa

tolérance au facteur environnemental modifié. C'est ce que l'on nomme **l'acclimatation**.

1.2.1. *Acclimatation et adaptation*

Sous certaines conditions, les organismes sont capables de développer des mécanismes permettant d'augmenter leur résistance vis-à-vis d'un agent stressant. L'acclimatation se réfère à « **des changements compensatoires mis en place dans un organisme soumis à une déviation persistante d'un seul facteur environnemental** » (Prosser, 1991).

La langue française ne fait pas de distinction entre les réponses d'un organisme soumis à la variation d'un seul paramètre ou au contraire soumis à des modifications d'un ensemble de paramètres environnementaux. Par contre, la langue anglaise utilise le terme d' « *acclimation* » lorsqu'un paramètre est isolé (c'est typiquement le cas en condition de laboratoire lorsqu'on isole les effets d'un seul paramètre environnemental), et utilise le terme d' « *acclimatization* » lorsque plusieurs paramètres sont modifiés (c'est par exemple le cas lors de changements de saisons pendant lesquels les organismes doivent faire face à des changements globaux de leur environnement).

Par opposition, l'adaptation a une signification différente qu'il ne faut pas confondre. Bock (2003) la définit comme étant « **tout caractère d'un organisme qui augmente statistiquement son *fitness*¹ par rapport à d'autres individus d'une population** ». En fait, un organisme adapté est un organisme possédant des caractéristiques dans son génome lui permettant de mieux survivre et de mieux se reproduire dans un environnement donné. **Là où l'acclimatation ne concerne « que » des changements phénotypiques afin de répondre à de nouvelles contraintes environnementales, l'adaptation nécessite des modifications du génotype.**

¹ Le *fitness* traduit la probabilité relative qu'un génotype donné de survivre et de se reproduire.

1.2.2. Différents niveaux de réponse au stress : réponses physiologiques et cellulaires

Les organismes répondent à un stress en modifiant différents paramètres biologiques afin de survivre dans leur nouvel environnement. On distingue classiquement deux niveaux de réponse au stress: **la réponse physiologique et la réponse cellulaire** (Iwama et al., 2004). Ces réponses peuvent être **spécifiques à un agent stressant**, ou à un groupe d'agents stressants, ou au contraire être non spécifiques et communément observées en réaction à différents types de stress. Ces dernières, incluant plusieurs niveaux d'organisation, se regroupent sous le vocable de « **réponse intégrée au stress** ».

La réponse physiologique intégrée fait intervenir le système neuro-endocrinien et a fait l'objet d'un grand nombre d'études qui sortent du cadre de ce travail (Chrousos et Gold, 1992). Signalons simplement qu'elle implique la synthèse de différentes hormones comme des catécholamines (adrénaline et noradrénaline) et des glucocorticoïdes (cortisol). Celles-ci préparent l'organisme à répondre de manière non spécifique, soit immédiatement face à une situation d'urgence, soit dans le long terme.

La réponse physiologique au stress a été largement étudiée chez les poissons (Wendelaar Bonga, 1997). Elle a été catégorisée en réponses primaire, secondaire et tertiaire. La réponse primaire correspond à l'activation des centres nerveux responsables de la stimulation du système neuroendocrinien cité plus haut, et ainsi au largage de catécholamines et de glucocorticoïdes dans le sang. La réponse secondaire comprend les changements provoqués par ces hormones aux niveaux des différents organes et tissus de l'animal (ex: augmentation de la fréquence cardiaque, etc.). Enfin, la réponse tertiaire concerne l'organisme entier et la population: inhibition de la croissance et de la reproduction, de la locomotion, etc.

Chez les invertébrés, la réponse physiologique intégrée au stress est quelque peu différente et beaucoup moins bien connue. Ainsi, chez les crustacés décapodes, c'est une hormone appelée **hormone hyperglycémiant de crustacé (cHH)**, synthétisée par la glande antennaire, qui induit une augmentation de la glycémie de l'hémolymphes en réponse à une exposition à différents types de stress (Chang et al., 1998 ; Lorenzon et al., 2004). Elle joue en quelque sorte un rôle comparable au cortisol chez les vertébrés.

Cependant, la réponse au stress ne concerne pas uniquement les processus neuroendocriniens et physiologiques décrits ci-dessus. L'étude du stress peut en effet descendre d'un niveau et concerner la physiologie cellulaire. Plusieurs études abordent la réponse cellulaire au stress, soit chez métazoaires, soit chez des unicellulaires. **La réponse cellulaire au stress (RCS)** peut être déclenchée dans tous les types cellulaires. Elle est définie comme « **une protection des macromolécules pendant la phase initiale d'exposition à n'importe quelle condition environnementale qui perturbe l'homéostasie cellulaire** » (Kültz, 2003). Divers agents stressants, incluant un milieu hyper-osmotique, une augmentation de la température, une exposition à des métaux lourds ou à des radiations ionisantes, ou encore des conditions oxydantes, peuvent provoquer des dommages aux protéines, à l'ADN et à d'autres macromolécules essentielles tels que les lipides membranaires. La RCS représente une réaction de défense des cellules, leur permettant de contrebalancer les effets provoqués par des agents stressants sur les macromolécules (Kültz, 2005). Tout comme la réponse physiologique étudiée plus haut, elle peut être en partie commune à plusieurs agents stressants partageant des effets délétères semblables.

Lors d'une RCS, plusieurs protéines sont sur-exprimées. Fonctionnellement, on peut les classer en plusieurs catégories : les protéines qui contrôlent le cycle cellulaire et peuvent l'interrompre en cas de stress ; celles qui ont une fonction de chaperone et qui stabilisent d'autres protéines ; celles qui réparent et stabilisent l'ADN ; celles qui dégradent et évacuent les protéines endommagées ; celles qui régulent le potentiel redox ; celles qui participent à la synthèse des protéines. D'autres protéines intervenant dans le métabolisme énergétique et dans le métabolisme lipidique peuvent également faire partie de la RCS (Kültz, 2005).

On se rend bien compte que la RCS est un mécanisme très complexe permettant d'assurer la survie des cellules pendant une situation de stress environnemental. De nombreuses études sont à ce jour encore nécessaires afin d'identifier tous les éléments de cette réponse. Cependant, plusieurs protéines sont connues pour faire systématiquement partie de la RCS, quel que soit l'organisme étudié. Il s'agit notamment de la protéine de stress HSP70.

1.2.3. Les protéines de stress

En 1974, Tissières et al. (1974) mirent en évidence dans les glandes salivaires du diptère *Drosophila melanogaster* soumis à un stress thermique, l'induction de la synthèse de protéines jusqu'alors inconnues. Ces protéines furent logiquement appelées « *Heat Shock Proteins* (HSPs) » ou protéines de choc thermique. Une décennie plus tard, les HSPs furent reconnues comme étant capables de se lier à d'autres protéines afin de stabiliser leur structure tridimensionnelle, les protégeant contre une possible dénaturation. A ce titre, elles appartiennent à la super-famille des chaperones moléculaires (pour revue, voir Fink, 1999). Aujourd'hui, nous savons que les HSPs ne sont pas uniquement induites par une hausse de la température. La plupart des agents stressants, pour peu qu'ils soient suffisamment importants, induisent l'expression de HSPs. C'est notamment le cas pour des températures extrêmes (également très froides), une déficience énergétique, un environnement en ions et en osmolytes modifié, ou encore une exposition à divers xénobiotiques. Un aspect commun à ces agents stressants est qu'ils sont tous susceptibles d'induire la dénaturation de protéines (Feder et Hofmann, 1999). De ce fait, les HSPs sont également appelées de manière plus générale « **protéines de stress** ».

Les HSPs reconnaissent et se fixent également sur des protéines qui se trouvent sous une forme non-fonctionnelle parce qu'elles ne sont pas encore totalement synthétisées, repliées, assemblées, ou localisées dans le

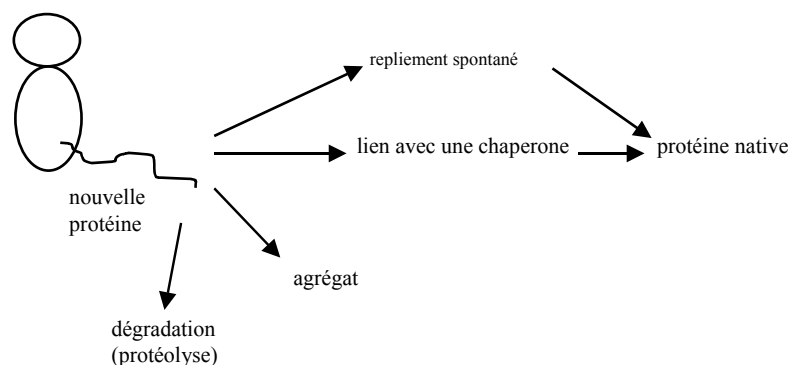


Fig. 2. Différentes possibilités s'offrent à une protéine nouvellement synthétisée, qu'elle soit toujours associée aux ribosomes ou déjà libre. Il est probable qu'en l'absence de chaperone moléculaire, l'agrégation ou toute autre voie menant à un mauvais repliement serait la voie principale empruntée par un grand nombre de protéines (d'après Fink, 1999).

compartiment cellulaire final (Fig. 2.). Il est donc aisé de comprendre que les HSPs sont importantes pour le bon fonctionnement des cellules, même en l'absence de toute perturbation environnementale. On peut affirmer qu'elles jouent un rôle fondamental dans l'homéostasie protéique et remplissent de nombreuses fonctions dans le maintien de l'intégrité de la cellule et la prévention contre tout dysfonctionnement intracellulaire (Ait-Aissa et al., 2000).

Les principales fonctions connues des HSPs en l'absence de perturbation environnementale sont de:

- maintenir les protéines dans la conformation tridimensionnelle adéquate ;
- permettre aux protéines de se localiser dans le compartiment cellulaire cible ;
- minimiser l'agrégation de protéines partiellement déployées ;
- marquer les protéines partiellement déployées ou agrégées afin qu'elles soient dégradées et expulsées de la cellule (Feder et Hofmann, 1999).

Les HSPs sont des protéines très conservées que l'on a retrouvées chez toutes les espèces étudiées à ce jour (Feder et Hofmann, 1999). Seule l'hydre *Hydra oligactis* ne semble pas exprimer de HSP suite à un stress (Bosch et al., 1988). Cependant, cet hydrozoaire possède un gène codant une HSP70 qui est transcrit puisque l'on retrouve des ARN messagers. Dans ce cas, il semblerait que la stabilité de l'ARNm soit trop faible pour aboutir à la protéine fonctionnelle (Gellner et al., 1992). Un arbre phylogénétique de la famille des HSP70 a été établi par Rensing et Maier (Rensing and Maier, 1994) sur base d'alignements de séquences peptidiques. Cette analyse révèle que 75% des séquences sont très conservées à travers les différents phyla.

Il existe différentes familles de HSPs se différenciant par leur poids moléculaire et leur structure primaire, par leur distribution intracellulaire, par leur degré d'inductibilité et leur cinétique d'induction/élimination, et par leur spécificité tissulaire (Dietz et Somero, 1993; Feder et Hofmann, 1999). Quatre grandes familles sont généralement citées alors que plusieurs autres familles sont moins bien connues. Le tableau 1 reprend la terminologie courante de ces 4 principales familles de HSPs décrites chez les procaryotes et les eucaryotes : HSP90, HSP70, HSP60 ou chaperonines, et sHSP (*small HSP*) de faible poids moléculaire (proche de 27 kDa).

D'autres familles sont appelées HSP110, HSP100, HSP40, et HSP10 (ou ubiquitine).

Tableau 1. Terminologie des 4 principales familles de HSPs en fonction de leur localisation cellulaire chez différents organismes (d'après Sanders, 1993).

Organismes	HSP90	HSP70	HSP60	sHSP
Procarvates	Htp G	DnaK	GroEL	p16.6
Levure				
cytosol	hsp83, hsc83	SSA1-4		hsp26
R.E.		KAR2		
mitochondries		SSC1	hsp60 (p64)	
Drosophile				
cytosol	hsp83	hsp68, 70		hsp27, 26
R.E.		hsc70, 72		hsp23, 22
mitochondries			hsp60	hsp26, 27
Mammifères				
cytosol	hsp90 (83, 87)	hsp70 (hsp72) hsc70 (hsp73)		hsp27, 25
R.E.	grp94 (ERp99)	BiP (grp78)		
mitochondries		m hsp70 (grp75)	hsp60 (cpn60)	

sHSP: small HSP; R.E.: réticulum endoplasmique. Entre parenthèses figurent certains noms alternatifs.

Parmi ces différentes familles, la HSP70 est de loin la plus étudiée. Elle est également la plus abondante et la mieux conservée (Sanders, 1993). Des organismes aussi divergents que l'humain et les mollusques partagent des domaines antigéniques et de fixation de l'ATP similaires (Margulis et al., 1989). Une forme de HSP70 inductible, absente sous condition physiologique normale, est largement induite en réponse à un stress. Une autre forme dite constitutive, aussi appelée HSC70, est faiblement induite mais est exprimée dans toutes les cellules en l'absence de perturbation environnementale. La HSC70 se lie sur les chaînes peptidiques en formation et facilite de la sorte le repliement correct de la protéine. De plus, elle maintient certaines protéines dans une forme dénaturée intermédiaire afin de les acheminer vers des organites cibles.

Il a été montré que l'hydrolyse de l'ATP était nécessaire afin de dissocier la HSC70 de la protéine visée pendant le processus de repliement. Ainsi, toutes les protéines de la famille des HSP70 décrites actuellement possèdent un domaine de liaison à l'ATP du côté N-terminal. Du côté C-

terminal se trouve un domaine de fixation aux protéines (Gething et Sambrook, 1992 ; Parsell et Lindquist, 1993). Les 2 domaines sont nécessaires afin de permettre un repliement correct des protéines visées (Fink, 1999).

Lorsque la cellule subit un stress non létal, la synthèse de la HSP70 peut être initiée. Une fois synthétisée, elle se lie aux complexes protéiques afin de les protéger d'une dénaturation et d'une agrégation qui seraient particulièrement dommageables pour la cellule (Lindquist, 1986).

Les différents agents stressants induisant la synthèse de HSP70 sont nombreux et il est impossible ici de tous les citer. Le stress thermique est le meilleur inducteur, traduisant l'action hautement dénaturante de la chaleur. On sait également qu'en réponse à une élévation légère de la température, la synthèse de HSPs peut conférer une tolérance accrue vis-à-vis d'un choc thermique plus important (Lindquist, 1986; Sanders et al., 1991; Coleman et al., 1995; Nakano et Iwama, 2002). D'autres agents stressants induisent aussi la synthèse de HSPs. Une condition hyper-osmotique peut se révéler être un bon inducteur. C'est notamment le cas chez la bactérie *Escherichia coli*, pour laquelle une induction de la DnaK de 2,8 fois a été rapportée après 5 min d'exposition à une telle condition (Meury et Kohiyama, 1991). De même, des conditions hyper-osmotiques induisent la synthèse de HSP70 dans les cellules rénales de souris (Rauchman et al., 1997), et dans les cellules des lamelles branchiales du saumon (Smith et al., 1999). Cependant, de tels effets ne sont pas toujours aussi évidents. Ainsi, Kültz (1996) n'a pas pu mettre en évidence ce type d'induction dans les cellules branchiales du poisson euryhalin *Gillichthys mirabilis*, alors qu'un stress thermique avait provoqué la synthèse de HSP70.

Une exposition à des substances toxiques, tels que des métaux, induit souvent la synthèse de HSP70. Cela a été montré, entre autres, chez la limace pour le Cd, le Zn et le Pb (Kohler et al., 1996), chez la moule pour le Cd seul (Bradley et al., 1998), ou pour le Cd et le Cu combinés (Radlowska et Pempkowiak, 2002). D'autres xénobiotiques peuvent également induire la synthèse de HSP70 comme les HAPs (hydrocarbures aromatiques polycycliques) et les PCBs (polychloro-biphényles) dans les huîtres (Cruz-Rodriguez et al., 2000; Cruz-Rodriguez et Chu, 2002) ou l'heptachlor dans les larves de homards (Snyder et Mulder, 2001).

Comme les HSPs semblent être induites par une large gamme d'agents polluants, leur utilisation en tant que biomarqueur d'exposition à des polluants a été proposée depuis plusieurs années (Pyza et al., 1997; Krasko et al., 1997; Scofield et al., 1999; Köhler et al., 2001). Ainsi, Sanders (1993) pense que pour évaluer correctement le stress

environnemental subi par un organisme, les HSPs devraient répondre aux critères suivants :

- leur synthèse devrait être induite par une large variété d'agents stressants ;
- leur quantité devrait augmenter si le stress perdure ;
- la relation entre l'accumulation de HSPs, l'exposition au contaminant et le niveau de stress de l'organisme, devrait être connue.

Toutefois, l'utilisation de HSPs en tant que biomarqueurs est loin d'être devenue routinière. Sanders (1993) met en garde sur plusieurs aspects essentiels :

- comme les HSPs sont induites par une large gamme de stress, le risque est grand d'obtenir de faux positifs, notamment en manipulant les organismes ;
- la présence de HSCs peut masquer une induction ;
- certaines hormones stéroïdiennes peuvent induire la synthèse de HSPs, celle-ci étant également dépendante du stade de développement de l'organisme ;
- des fluctuations naturelles de la température peuvent induire la synthèse de HSPs ;
- la nourriture disponible peut aussi influencer leur synthèse.

Ajoutons à cela que la cinétique d'expression doit également être connue.

Plusieurs études ont déjà montré les limites de l'utilisation des HSPs comme biomarqueurs. Par exemple, Vedel et Depledge (1995) n'ont pas trouvé de corrélation entre les quantités de HSP70 et les concentrations en cuivre retrouvées chez le crabe vert *Carcinus maenas*. Toujours sur la même espèce, Pedersen et al. (1997) n'ont pas retrouvé de lien entre les concentrations en HSP70 et l'état de pollution des sites où ont été prélevés les organismes. De même, Werner et Hinton (2000) suggèrent que la salinité est plus importante que les concentrations tissulaires en Cd afin d'expliquer les variations de concentrations en HSP70 chez le mollusque bivalve *Potamocorbula amurensis*.

1.3. Acclimatation et adaptation suite à un stress provoqué par un xénobiotique

Les xénobiotiques que l'on retrouve dans notre environnement peuvent être responsables d'effets néfastes occasionnés à l'homme et aux autres organismes vivants. Cela est bien visible et très spectaculaire lorsqu'une pollution accidentelle et de forte intensité frappe une zone sensible et occasionne de graves dommages à la faune et à la flore. Toutefois, la plupart des xénobiotiques relâchés par les activités humaines se retrouvent dans les écosystèmes en concentrations relativement faibles mais sont en continuel contact avec les organismes : on parle alors d'exposition chronique. Ce type d'exposition peut provoquer des effets néfastes aux individus ainsi qu'aux populations et communautés. Cependant, il se peut également que ce contact avec une substance toxique induise une série de processus comportementaux, morphologiques, physiologiques, biochimiques ou moléculaires qui concourent à garder les mécanismes d'homéostasie de l'espèce touchée dans les limites autorisées pour sa propre survie.

1.3.1. Acclimatation induite en laboratoire

Les perturbations environnementales sont généralement caractérisées par un choc initial occasionné aux organismes (d'une durée souvent inférieure à 2 jours pour une exposition sub-létale) pendant lequel des altérations se développent rapidement. Ensuite peut lui succéder une phase de recouvrement plus longue pendant laquelle les dommages diminuent graduellement, alors que l'agent stressant est toujours présent. Pendant cette phase, l'organisme met en place les mécanismes nécessaires afin de trouver un nouvel état d'équilibre compatible avec sa survie. C'est ce que l'on appelle l'acclimatation (McDonald et Wood, 1993). Comme exemple montrant un tel phénomène à un niveau physiologique, nous pouvons citer le cas de branchies de truites arc-en-ciel, *Onchorhynchus mykiss*, exposées à du cuivre $55 \mu\text{g l}^{-1}$ (Fig. 3.). Dans un premier temps, la cinétique de transport du Na^+ (flux maximum, $J_{\text{max}}^{\text{Na}^+}$, et affinité, K_m) est rapidement perturbée (diminution du $J_{\text{max}}^{\text{Na}^+}$ de plus de 50% et augmentation du K_m de 100%) pour, ensuite, graduellement recouvrer des valeurs plus proches de

l'état initial, alors même que le cuivre est toujours en contact avec cet organe (Laurén et McDonald, 1987).

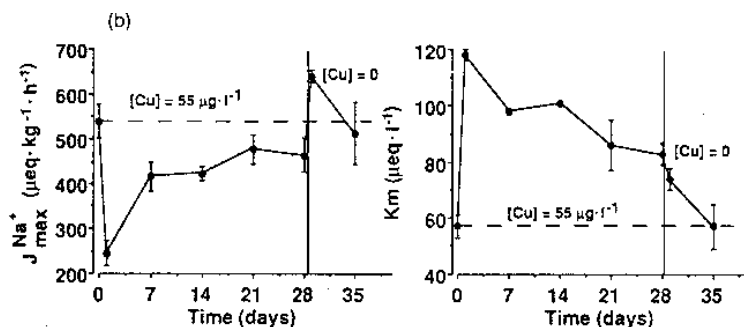


Fig. 3. Evolution au cours du temps de la cinétique du transport de Na^+ (flux maximum $J_{max}^{Na^+}$, et K_m) à travers les branchies de truites arc-en-ciel juvéniles *Oncorhynchus mykiss* (d'après Laurén et McDonald, 1987).

Cependant, dans la littérature toxicologique, **l'acclimatation à un xénobiotique** est souvent définie selon des critères plus restrictifs : « **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** » (McDonald et Wood, 1993). Les critères permettant d'identifier cette tolérance accrue sont multiples. Ils englobent notamment des paramètres physiologiques (par exemple l'osmolalité sanguine, la consommation d'oxygène,...) qui sont alors moins fortement perturbés en présence d'une forte concentration d'une substance toxique chez l'organisme acclimaté par rapport à l'organisme non acclimaté. Ils englobent également des paramètres évaluant la toxicité aiguë, comme des mesures de TL50 ou de CL50, ceux-ci augmentant pour des individus acclimatés. Dans la suite de ce travail, c'est cette définition restrictive que nous allons adopter.

Les exemples d'acclimatation à un xénobiotique mis en évidence sur des organismes contaminés en laboratoire ne manquent pas dans la littérature scientifique, et notamment concernant des métaux. Différents auteurs ont en effet observé, à la fois sur des invertébrés et sur des

vertébrés, qu'une exposition chronique préalable pouvait protéger des organismes contre une exposition aiguë au même métal.

Les poissons salmonidés furent largement étudiés dans la perspective de mettre en évidence ce phénomène d'acclimatation. Dès la fin des années 1970s, on disposait de preuves qu'un pré-traitement avec de faibles concentrations en Cd sur des oeufs de *Oncorhynchus mykiss* (anciennement *Salmo gairdneri*), pouvait conférer aux alevins une meilleure résistance à des concentrations plus élevées (Beattie et Pascoe, 1978). Pascoe et Beattie (1979) ont ensuite montré que le temps de survie en présence de concentrations élevées en Cd (0,1 et 1 mg l⁻¹) augmentait pour des alevins préalablement exposés pendant 7 jours à 10 µg Cd l⁻¹. Ils en ont conclu qu'un pré-traitement des alevins avec du Cd leur conférait une protection lorsqu'ils étaient ultérieurement exposés à de plus fortes concentrations de ce métal. Toujours concernant le Cd, Hollis et al. (1999) ont montré chez la même espèce, une augmentation d'un facteur 11 de la CL50 (96h d'exposition) après une acclimatation de 30 jours à 3 µg Cd l⁻¹, et d'un facteur 13 après une acclimatation de 30 jours à 10 µg Cd l⁻¹. Le même phénomène a été observé concernant le cuivre après un contact de 3 semaines (Dixon et Sprague, 1981) ou 30 jours (Taylor et al. 2000). Alsop et al. (1999) ont quant à eux montré chez la même espèce, une acclimatation au Zn après une exposition chronique de 30 jours à des concentrations comprises entre 50 et 450 µg Zn l⁻¹. Les truites présentaient sous ces conditions des CL50 entre 2,2 et 3,9 fois plus élevées que pour des poissons non préalablement exposés.

Les poissons salmonidés ne sont bien sûr pas les seuls à avoir été étudiés dans la perspective de mettre en évidence ce phénomène d'acclimatation. Par exemple, un pré-traitement croissant au Cd et au Zn mené sur des embryons de crapauds *Bufo arenarum* pendant 4 jours, augmente leur résistance à un stress léthal de 1 mg Cd l⁻¹ au cinquième jour (Herkovits et Perez-Coll, 1995). Plusieurs exemples concernent également les invertébrés. *Daphnia magna* fut notamment étudiée par Bodar et al. (1990) et par Stuhlbacher et al. (1992). Ces auteurs montrent qu'un stress chronique au Cd ou au Zn augmente la tolérance de ces crustacés vis-à-vis de ces mêmes métaux. Stuhlbacher et Maltby (1992) confortent ces observations sur un autre crustacé : *Gammarus pulex*. De même, une exposition au Zn à 0,5 mg l⁻¹ pendant 14 jours, est suffisante pour augmenter la résistance de la crevette *Palaemonetes pugio* vis-à-vis d'une concentration de 35 mg Zn l⁻¹ (Klerks, 1999).

Il apparaît donc que ce phénomène d'acclimatation semble être largement répandu suite à un contact modéré avec des polluants

métalliques tels que le Cd, le Zn, le Cu ou l'Al. Des études montrant ce phénomène d'acclimatation avec d'autres substances toxiques sont plus rares, mais existent néanmoins. Ainsi, *Palaemonetes pugio* développe une acclimatation vis-à-vis d'un HAP, le naphthalène, après une exposition à 0,5 mg l⁻¹ pendant 14 jours (Klerks, 1999). De même, une exposition chronique à un autre HAP, le fluoranthène, induit une acclimatation chez des vairons (Diamond et al., 1995). Cependant, toujours d'après cette étude, l'acclimatation ne semble pas concerner d'autres xénobiotiques tel que le phénanthrène, un autre HAP. De la même manière, l'acclimatation n'a pas pu être démontrée pour des truites exposées à du Pb (Tang et Garside, 1987), ou encore pour des canards *Anas platyrhynchos* exposés pendant 21 semaines à du Se via la nourriture (Heinz, 1993). Il semble donc que tous les xénobiotiques n'ont pas la capacité d'induire une acclimatation. Il apparaît même que certaines substances pourraient avoir l'effet inverse, c'est-à-dire de sensibiliser les organismes pendant une exposition chronique. Ainsi, Steadman et al. (1991) ont observé que des truites *O. mykiss* exposées pendant 21 jours à un produit pétrolier (N°2 fuel oil) contenant de fortes concentrations en HAPs, devenaient plus sensibles à une exposition aiguë.

Enfin, signalons un autre fait intéressant montré par Klerks (1999). Le crustacé *P. pugio* pré-exposé conjointement au zinc et au naphthalène, ne présente pas de résistance accrue lorsqu'on le soumet à des concentrations plus élevées de ces deux polluants, alors que pris individuellement aux mêmes concentrations, ils induisent une acclimatation. Klerks a également relevé ce phénomène pour une mixture complexe comprenant du baryum, du nickel, du zinc, du dibenzothiophène, du naphthalène et du phénanthrène. Une explication possible serait qu'un des xénobiotiques pourrait inhiber les mécanismes de détoxification d'un autre contaminant. Par exemple, certains HAPs pourraient déstabiliser les lysosomes, pouvant eux-mêmes être impliqués dans la détoxification des métaux. Une deuxième possibilité pourrait être que le coût énergétique requis pour détoxifier un des xénobiotiques entrerait en compétition avec le coût énergétique nécessaire à une autre substance. Enfin, le manque apparent d'acclimatation à une mixture complexe pourrait être le reflet statistique qu'une réponse positive vis-à-vis d'un xénobiotique serait cachée par une réponse négative vis-à-vis d'au moins une autre substance toxique. En effet, certains xénobiotiques induisent une acclimatation alors que d'autres pas. De plus, l'acclimatation n'est effective pour un polluant que dans une gamme plus ou moins étroite de concentrations. Une combinaison de plusieurs contaminants à des concentrations variées

présente donc une faible probabilité de montrer une réponse d'acclimatation.

1.3.2. Acclimatation et adaptation observées sur des populations naturelles

Ce phénomène d'acclimatation observé en laboratoire laisse présager que des populations naturelles soumises à des expositions chroniques à certains polluants, pourraient également présenter une résistance accrue aux xénobiotiques incriminés. Afin de vérifier cette hypothèse, plusieurs études ont comparé le niveau de tolérance à une substance toxique, entre deux ou plusieurs populations d'une même espèce, mais prélevées dans des environnements différents, avec des charges en polluants variées (pour revue, voir Klerks et Weis, 1987). La première étude de ce genre a été publiée en 1971 par Bryan et Hummerstone (1971). Ils montraient que des vers polychètes *Nereis diversicolor* provenant de sédiments avec de fortes concentrations en métaux, avaient un TL50 au cuivre dissous dans de l'eau de mer (concentration maximale de 0,7 mg l⁻¹) largement augmenté par rapport à des animaux provenant de sites non pollués (de 41 à 247 h). Les crabes *Uca triangularis* et *U. annulipes* prélevés dans des zones côtières de l'Inde, fortement polluées par des métaux, présentent des sensibilités (mesurées en terme de CL50) au Hg, Cu, Cd et Zn, plus faibles en comparaison à des organismes provenant de zones moins polluées (Devi, 1987). De même, des isopodes *Porcellio scaber* provenant de trois sites différents, un site témoin non pollué et deux sites proches de mines de zinc, présentent des degrés de résistance au Cd différents (Donker et Bogert, 1991). Des résultats comparables ont été obtenus sur un oligochète, *Limnodrilus hoffmeisteri*. Une population vivant dans des sédiments pollués par des métaux est plus résistante à une combinaison de Cd, Ni et Co, qu'une population contrôle (Klerks et Levinton, 1989).

On distingue traditionnellement deux raisons pouvant expliquer une résistance accrue de la part de ces organismes :

- les individus peuvent avoir acquis une tolérance via une acclimatation physiologique pendant l'exposition chronique sub-létale, telle que définie au chapitre précédent. Cela ne confère pas automatiquement la même tolérance aux descendants qui doivent à leur tour être exposés à ce xénobiotique pour acquérir la même tolérance ;

- les populations peuvent avoir développé une résistance sur base génétique, conférant une adaptation systématique des descendants, même si ceux-ci ne sont plus exposés au polluant. L'adaptation est alors définie comme le processus pendant lequel les membres d'une population deviennent plus aptes à travers les générations à survivre et à se reproduire dans un environnement contaminé.

L'existence d'une acclimatation ou d'une adaptation pour des populations vivant depuis longtemps au contact de polluants, dépend de l'espèce et du polluant lui-même, si bien qu'il n'est pas toujours facile de conclure sur la prédominance de l'un ou l'autre phénomène.

Ainsi, Muyssen et al. (2002) ont montré que des populations naturelles de *Daphnia magna* prélevées sur des sites contaminés par du Zn avaient une tolérance accrue à ce métal en comparaison avec une population élevée en laboratoire. Toutefois, une seconde génération obtenue à partir d'organismes prélevés sur ces mêmes sites mais ensuite gardés en laboratoire sans contact avec le métal, avait perdu cette tolérance. Les auteurs ont alors conclu que la tolérance au Zn observée sur ces daphnies n'avait pas de base génétique et était donc due à une acclimatation physiologique.

Des collemboles *Orchesella cincta* provenant du sol de zones fortement contaminées par des métaux ont développé une tolérance au Cd. Cette fois, cette résistance est toujours observée pour les descendants de première génération élevés sans contaminant. Ceci pousse à croire que cette résistance possède des bases génétiques et se transmet de génération en génération (Sterenborg et Roelofs, 2003).

L'existence de populations résistantes vivant dans des zones polluées doit mettre en garde contre des conclusions erronées qui pourraient être tirées de tests biologiques afin d'évaluer la toxicité d'effluents ou autres xénobiotiques. Ainsi, si des animaux provenant d'une zone polluée sont utilisés pour des *bioassays*, les résultats du test ne seront pas représentatifs de l'espèce entière dans le cas où ces individus présentent une résistance accrue. Si la résistance est due à une acclimatation, alors le fait de travailler sur des descendants éliminera ce facteur. Par contre, si la population utilisée est génétiquement adaptée au polluant testé, les résultats provenant de descendants seront également biaisés. Ainsi, l'utilisation des *bioassays*

nécessite de prendre en considération l'exposition passée au polluant incriminé de l'organisme testé (Klerks et Weis, 1987).

1.3.3. Mécanismes conférant une résistance accrue à des xénobiotiques

Ces observations d'acclimatation et d'adaptation pour des organismes soumis à des expositions sub-létales en xénobiotiques, nous laissent un peu sur notre faim. En effet, la question importante est maintenant de découvrir quels sont les mécanismes impliqués dans ces phénomènes. Pour une meilleure compréhension du texte, nous n'allons pas, dans ce chapitre, systématiquement différencier les phénomènes d'acclimatation et d'adaptation. Nous parlerons simplement des mécanismes impliqués dans une résistance accrue à des xénobiotiques.

Plusieurs niveaux peuvent être impliqués (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 détoxication et/ou le stockage du polluant ;
- les mécanismes compensatoires (protection et/ou réparation des structures/fonctions touchées).

Même si tous les mécanismes sont encore loin d'être connus, plusieurs d'entre eux ont déjà pu être identifiés. Le plus évident est l'existence d'une **corrélation entre une tolérance acquise pour certains métaux et une concentration accrue en métallothionéines (MTs) dans les tissus**. Les propriétés de séquestration de ces protéines (discutées au chapitre 1.4) permettent à l'organisme de stocker des quantités importantes de métaux qui ne sont alors plus toxiques. Par exemple, une relation fut établie chez la daphnie et le gammarus entre l'accumulation de MTs et l'acclimatation (Stuhlbacher et Maltby, 1992; Stuhlbacher et al., 1992). L'implication de ces protéines dans la résistance aux métaux a aussi été montrée au niveau de l'expression de leur ARN messager (Sternborg et Roelofs, 2003). Ainsi, Des collemboles *O. cincta* provenant de sols contaminés et soumis à une exposition au Cd en laboratoire possèdent une

plus grande quantité d'ARNm de MTs en comparaison à des individus provenant d'une population contrôle.

D'autres expériences ont été menées sur des poissons moustiques *Heterandria formosa* (Xie et Klerks, 2003). Des individus survivant à un stress aigu au cadmium (6 mg l^{-1}) ont été sélectionnés pendant 6 générations. Les auteurs ont remarqué dès la deuxième génération, que toutes les lignées avaient une résistance accrue par rapport à d'autres n'ayant subi aucune sélection préalable. De plus, la résistance continuait de croître jusqu'à la sixième génération au moins. Dans ce cas, le caractère génétique d'une résistance accrue au Cd suite à une sélection exercée par celui-ci, ainsi que la rapidité de la réponse de sélection, ont été démontrés. Cette même étude a révélé que des poissons soumis, après sélection par le Cd, à des concentrations en Cu de $0,13 \text{ mg l}^{-1}$, avaient également développé une résistance accrue vis-à-vis de ce métal. Les auteurs ont alors postulé que le Cd et le Cu partageaient un mécanisme de détoxification commun, tel que l'induction de MTs. Une étude ultérieure démontra de fait que ces mêmes poissons sélectionnés par le Cd, avaient des niveaux de MTs, aussi bien basaux qu'induits par une nouvelle exposition au Cd, significativement supérieurs à leur contrôle (Xie et Klerks, 2004b).

Une plus grande induction de MTs a également été rapportée chez des oligochètes *Limnodrilus hoffmeisteri* résistants aux Cd, Ni, Co, et exposés en laboratoire à ces métaux (Klerks et Bartholomew, 1991). Cette étude met toutefois en évidence un autre mécanisme de détoxification et de séquestration. Les auteurs observent grâce à la microscopie électronique que du Cd peut être stocké dans des granules riches en soufre se trouvant dans des lysosomes. De même, Lauverjat et al. (1989) ont également mis en évidence que les lysosomes pouvaient stocker du Cd dans les parties antérieures et postérieures de l'intestin de *Drosophila melanogaster* résistantes au Cd.

Ainsi, les mécanismes de séquestration (MTs et lysosomes) semblent être responsables, en partie du moins, d'une résistance vis-à-vis de métaux comme le Cd. Il semblerait que certains organismes plus résistants n'accumuleraient pas les métaux en quantité plus faible, mais auraient la capacité d'en supporter davantage grâce à ces mécanismes de détoxification (Donker et Bogert, 1991). **Pour ces organismes, le facteur critique déterminant la toxicité ne serait donc pas la concentration totale en métal dans les tissus, mais plutôt la quantité non piégée.** Ainsi, Dixon et Sprague (1981) ont mesuré des concentrations en Cu bien supérieures chez des truites acclimatées et ensuite soumises à un stress aigu que chez des

individus non acclimatés et également soumis à un stress aigu, alors que ces derniers étaient bien plus sensibles.

D'autres auteurs ont toutefois mis en évidence une diminution de la prise de Cd par des daphnies acclimatées à ce métal (Stuhlbacher et al., 1992). Il est également possible qu'un pré-traitement au Cd induise un changement de perméabilité membranaire à ce métal, conduisant à une diminution de son entrée dans les cellules. Ce phénomène a été observé sur des cellules rénales provenant de rats préalablement traités avec du CdCl_2 *in vivo* (Jin et Nordberg, 1986). En outre, une augmentation de la rétention du Cd dans l'épithélium de l'intestin moyen de collembolles provenant de sites contaminés par les métaux a été mise en évidence, de même qu'une excrétion accrue de ce métal lors de chaque mue (Posthuma et Van Straalen, 1993). Il paraît donc évident que chaque espèce est susceptible d'induire des mécanismes de résistance différents.

Peu de mécanismes compensatoires induisant une tolérance à des xénobiotiques sont connus. La tâche est évidemment ardue puisqu'il existe potentiellement autant de mécanismes compensatoires qu'il n'y a de mécanismes d'action des polluants. Comme ces derniers ne sont pas encore complètement compris, nous ne pouvons pas connaître les mécanismes compensatoires en totalité. Comme exemple, nous pouvons tout de même citer une augmentation de l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase observée sur des branchies de truites exposées pendant 65 jours à du cuivre $75 \mu\text{g l}^{-1}$ (McGeer et al., 2000). Ce résultat fut interprété comme étant une réponse à une perte de sodium sanguin, compensée par une prise accrue de cet élément à partir du milieu environnant.

Au niveau cellulaire, comme la plupart des agents stressants, et notamment des xénobiotiques, provoquent une série de dommages constants tels qu'un stress oxydant et des dommages aux macromolécules (voir chapitre 1.2.2), il est probable que des mécanismes cellulaires permettant de réduire ces effets puissent être activés pendant la phase d'acclimatation. Toutefois, ces mécanismes restent encore à découvrir.

1.3.4. Coût d'une résistance à des xénobiotiques

Dans une revue, Calow (1991) suppose que **le coût d'une acclimatation doit être élevé car tous les mécanismes de résistance sont susceptibles d'augmenter la demande énergétique**. Il admet toutefois qu'il n'y a pas de preuve irréfutable. Ainsi, Hollis et al. (1999) est de l'avis contraire car ce phénomène d'acclimatation n'a pas d'effet sur le taux de croissance, la performance de nage, la consommation d'O₂ et les concentrations ioniques chez des truites acclimatées pendant 30 jours au Cd. Par contre, chez le ver oligochète terrestre *Eisenia fetida* ayant acquis une résistance au Cd pendant une longue pré-exposition menée sur 10 générations, le taux de reproduction (mesuré en terme de nombre de cocons produits) est supérieur à celui mesuré dans une population contrôle

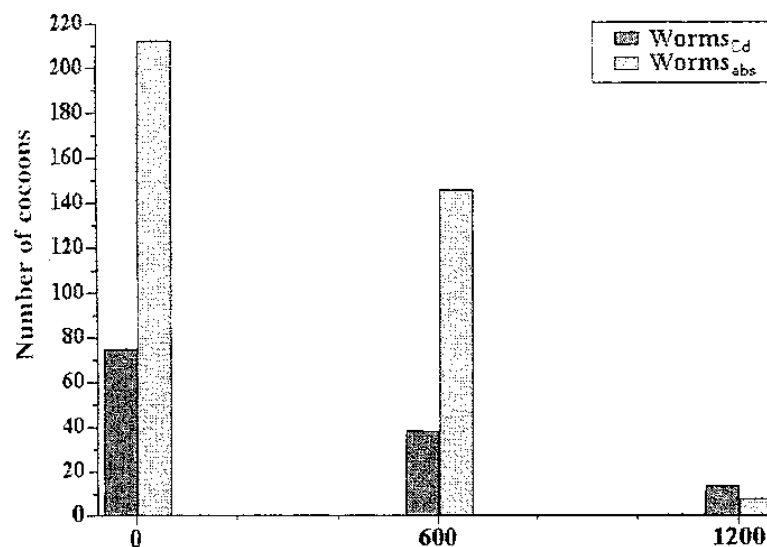


Fig. 4. Nombre de cocons produits par l'oligochète *Eisenia fetida* pendant 35 jours dans du substrat contenant 0-600-1200 µg g⁻¹ de poids sec de Cd. La population Worm_{Cd} a préalablement été exposée pendant 3 ans et 10 générations à du Cd dans leur nourriture. La population Worm_{abs} n'a pas été nourrie avec de la nourriture enrichie en Cd (d'après Reinecke et al., 1999).

lorsqu'ils sont tous deux soumis à une forte concentration en Cd dans le substrat ($1200 \mu\text{g g}^{-1}$) (Fig. 4.) (Reinecke et al., 1999). Par contre, lorsque ces deux populations sont soumises à une plus faible concentration en Cd ($600 \mu\text{g g}^{-1}$), ou lorsqu'ils sont élevés dans du substrat ne contenant pas de Cd, le taux de reproduction des organismes résistants est inférieur à celui des organismes contrôles. Ces auteurs suggèrent ainsi que pendant 10 générations, les vers ont acquis une résistance au Cd, mais que cette dernière s'est développée au détriment d'autres fonctions comme la reproduction.

Des changements dans la biologie de la reproduction d'organismes résistants ont également été observés chez *Daphnia magna*. Des clones provenant de sites contaminés par du Zn semblent avoir changé de stratégie reproductive. En effet, Muyssen et al. (2002) observent que ces organismes produisent une plus grande quantité de nouveaux-nés mais de plus petite taille et avec moins de réserves énergétiques.

Des études écotoxicologiques sur des poissons moustiques *Heterandria formosa* vont dans ce sens. Des individus résistants au Cd mais soumis cette fois à un stress thermique (augmentation de la température de 25 à 38°C) sont moins résistants à ce choc que des individus non adaptés au Cd. Xie et Klerks (2003) postulent alors qu'une augmentation de la détoxification du Cd pourrait impliquer une moindre disponibilité des ressources (énergétiques) afin de faire face à d'autres agents stressants, comme un choc thermique. Ces mêmes auteurs vont plus loin dans une autre étude (Xie et Klerks, 2004a) puisqu'ils déterminent qu'en l'absence de Cd, des poissons adaptés à ce métal présentent en moyenne une baisse de leur fécondité, un temps plus long avant d'avoir leur première portée, une espérance de vie des femelles diminuée, et une taille inférieure des jeunes à la naissance.

Le débat concernant le coût réel de la résistance reste donc ouvert. Toutefois, plusieurs données s'accordent avec **la théorie de l'allocation des ressources selon laquelle une population résistante à un polluant (ou tout autre stress), en maintenant cette résistance, possède moins de ressources à allouer à d'autres fonctions biologiques comme la reproduction. Cela pourrait avoir des conséquences importantes en terme de « fitness » et être à terme dommageable pour ces populations.**

1.4. Les Méthallothionéines

Etant donnés leurs rôles importants dans la détoxification des métaux et dans l'acclimatation d'organismes chroniquement exposés à ces xénobiotiques, nous ne pouvions réaliser ce travail sans consacrer un chapitre aux méthallothionéines (MTs). Les MTs furent découvertes en 1957 par Margoshes et Vallee (1957) dans le cortex rénal du cheval. Elles furent identifiées comme des protéines capturant le Cd, et responsables de son accumulation dans le tissu rénal. Cette découverte a ouvert une voie de recherche extrêmement féconde si bien qu'il sort du cadre de ce travail de passer en revue tous les domaines d'étude concernant les MTs. Nous allons nous focaliser sur les grandes caractéristiques de ces protéines, et sur leurs propriétés importantes pour un domaine comme l'écotoxicologie aquatique. Comme revues sur les méthallothionéines, on peut consulter : Riordan et Vallee, 1991; Roesijadi, 1992; Klaassen et al., 1999; *MT homepage* de l'Université de Zurich - <http://www.unizh.ch/~mtpage/MT.html>.

Les MTs sont ubiquistes. Elles se retrouvent à travers tout le règne animal, mais aussi dans les plantes supérieures, dans des microorganismes eucaryotes et dans des procaryotes¹. Chez les animaux, ces protéines sont surtout abondantes dans des organes comme le foie, le rein, le pancréas et l'intestin. Il existe toutefois une grande variation de leur concentration en fonction des tissus et des espèces concernés. Au niveau cellulaire, bien qu'elles soient essentiellement localisées dans le cytoplasme, elles peuvent également se retrouver dans les lysosomes et, pendant le développement, dans le noyau.

Les MTs sont définies en fonction de leurs principales particularités. Elles sont avant tout caractérisées par un contenu élevé en soufre et en métaux (d'où leur nom) qui peuvent ensemble contribuer à plus de 20% de leur masse. Les formes que l'on retrouve chez les mammifères ont un poids moléculaire de 6000-7000 Da et contiennent 60 à 68 acides aminés. Parmi eux, 20 résidus cystéines (Cys) permettent la capture de 7 atomes d'ions

¹ pour plus de détails, visiter le site :

<http://www.expasy.org/cgi-bin/lists?metallo.txt>

métalliques divalents (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ag^{2+} ,...). De plus, les acides aminés aromatiques sont généralement totalement absents. Les Cys s'organisent en structure tridimensionnelle sous la forme de *clusters* capables d'emprisonner les métaux. Deux *clusters* sont formés dans chaque molécule de MT et portent les noms de domaines alpha et bêta. Le premier peut capturer 3 atomes métalliques divalents et le second 4 (Fig. 5.).

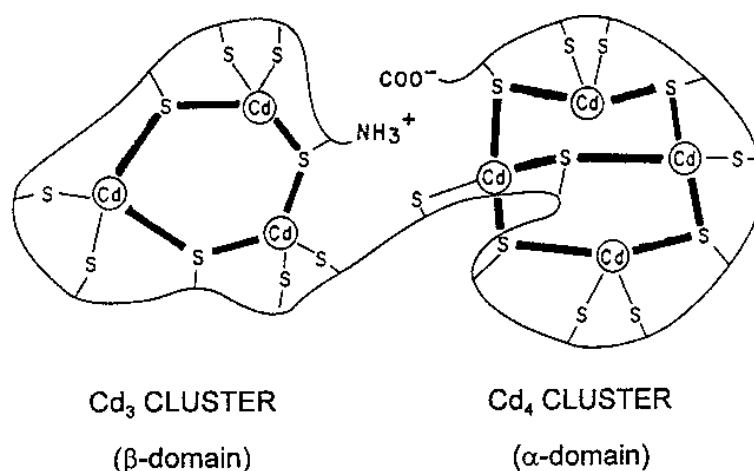


Fig.5. Domaines des MTs de mammifères. Respectivement 4 et 3 atomes de Cd sont liés à des cystéines dans les domaines α- et β- (d'après Klaassen et al., 1999).

Un système de nomenclature fut adopté en 1985 dans lequel les MTs étaient réparties en 3 classes (Fowler et al., 1987). Par convention, la classe I correspondait aux MTs dont les Cys gardaient les mêmes positions que dans les MTs de mammifères. Les MTs appartenant à la classe II ne possédaient pas cette caractéristique. Enfin, la classe III comprenait des polypeptides atypiques contenant une répétition d'unités gamma-glutamylcysteinyl.

Cette classification se révèle maintenant être inadéquate vu le nombre de plus en plus élevé de séquences connues qui indique de grandes variabilités dans la composition en acides aminés, ou dans le nombre et la position des Cys. En conséquence, un nouveau système de nomenclature fut adopté en 1999, basé cette fois sur les similarités de séquences et les relations phylogénétiques. Cette classification subdivise la superfamille des

MTs en familles, sous-familles, sous-groupes et isoformes (Binz et Kägi, 1999 ; <http://www.unizh.ch/~mtpage/classif.html>). Ainsi, une famille de MTs comprend des protéines dont les structures primaires peuvent être alignées, et pour lesquelles un lien évolutif existe. Par exemple, la famille 1 comprend toutes les MTs des vertébrés. La famille 2, celles des mollusques, la 3 des crustacés,...

Les membres de la famille 1 sont reconnus par une séquence en acides aminés spécifique : K-x(1,2)-C-C-P-x(2)-C. Comme nous l'avons déjà mentionné, ils possèdent entre 60 et 68 acides aminés dont 19 Cys totalement conservées. Les deux domaines comprennent respectivement 9 et 11 Cys capturant respectivement 3 et 4 ions métalliques divalents. Les MTs de la famille 3 sont celles qui nous intéressent plus particulièrement puisqu'elles sont présentes chez les crustacés. Ses membres sont reconnus par la séquence : P-[GD]-P-C-C-x(3,4)-C-x-C située du côté N-terminal. Ils ont de 58 à 60 acides aminés dont 18 Cys totalement conservées. Il existe 2 domaines contenant chacun 9 Cys pouvant capturer 3 ions métalliques divalents. Trois sous-familles ont été définies : c1 (ou *crustacean MT-1*), c2 (ou *crustacean MT-2*), et c (comprenant les autres MTs de crustacés).

Parmi les MTs de la famille 3, une séquence provenant du crabe chinois *Eriocheir sinensis* est accessible depuis 2001 dans la base de donnée TrEMBL avec le numéro d'accès Q95U92¹. Cette protéine comporte 58 acides aminés alignés selon la séquence (en souligné est indiquée la séquence commune aux MTs de la famille 3) :

MPDPCCNDKCECKEGKCEAGCKCTSCRCPPCEKCSSGCKCG
SKEDCCCKTCSKPCSCCP

Son poids moléculaire théorique est de 6130 Da et son point isoélectrique théorique de 7,78.

Plusieurs fonctions associées aux MTs sont connues, alors que d'autres restent certainement encore à découvrir. Les plus évidentes concernent leur implication dans l'homéostasie des métaux essentiels et dans la détoxification des métaux essentiels ou non. Les métaux essentiels tels que le Zn et le Cu sont séquestrés par des MTs (à des niveaux basaux) et libérés pour des réactions biochimiques en fonction de la demande, alors que les métaux non-essentiels sont séquestrés de manière définitive. Par

¹ <http://us.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?Q95U92>

exemple, les MTs réguleraient l'homéostasie du Zn, métal identifié comme un composant catalytique de nombreuses enzymes, et comme jouant un rôle important dans la structure de protéines et de facteurs de transcription. Les MTs détermineraient son absorption et le libéreraient au profit de métallo-enzymes ou de facteurs de transcription pendant le développement ou la synthèse protéique (Klaassen et al., 1999).

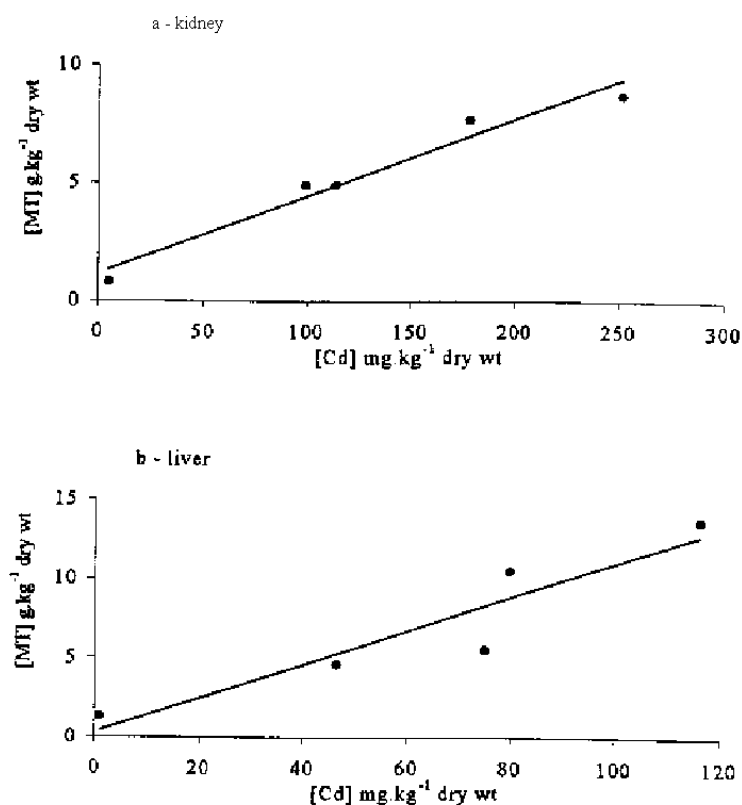


Fig.6 Corrélations entre l'accumulation en Cd et les concentrations en MTs dans les reins (a-kidney) et le foie (b-liver) de carpes *Cyprinus carpio* exposées à du Cd (d'après De Conto et al., 1998).

Lorsque ces métaux essentiels sont en trop forte quantité, ou lorsque l'animal est confronté à des métaux sans fonction biologique connue, ceux-ci peuvent induire une certaine toxicité. C'est pour contrer cette toxicité qu'une telle exposition induit généralement la synthèse de MTs, qui ont alors un rôle de détoxification en séquestrant ces métaux (Roesijadi, 1996). De nombreuses études montrent, à différents niveaux, une induction des

MTs chez des organismes aquatiques exposés en laboratoire à du Cd (Bebianno et al., 1993 ; Schlenk et Brouwer, 1993 ; Brouwer et al., 1995 ; De Conto et al., 1998; Leung et Furness, 1999). Ainsi, De Conto et al. (1998) montrent qu'il existe une corrélation significative entre l'accumulation de Cd dans le foie et les reins de carpes *Cyprinus carpio* exposées à des concentrations en Cd dans l'eau de $440 \mu\text{g l}^{-1}$ pendant 115 jours, et la concentration en MTs dans ces mêmes organes (Fig. 6.).

Cette faculté à séquestrer des métaux toxiques n'est peut-être pas responsable de la grande conservation des MTs à travers l'évolution. Ainsi, Vasak et Hasler (2000) suggèrent que la détoxification de métaux comme le Cd, tout en étant une propriété des MTs, ne serait pas leur première fonction. D'autres fonctions ont en effet été rapportées, comme un effet anti-apoptotique et un effet anti-oxydant. Ou encore, une isoforme dénommée MT-4 a été retrouvée dans le cerveau de mammifères et identifiée comme ayant une fonction inhibitrice de la croissance neuronale. De plus, cette isoforme est absente chez des patients atteints par la maladie d'Alzheimer (Vasak et Hasler, 2000), ce qui augmente l'intérêt porté par le monde médical aux MTs. Tout ceci laisse encore augurer de longues années de recherche avant d'avoir complètement percé les secrets de cette « super »-famille de protéines.

1.5. Le cadmium

Le cadmium est un métal de transition appartenant au groupe IIb. Ses principales caractéristiques physico-chimiques sont résumées ci-dessous :

Nombre atomique :	48
Masse atomique relative :	112,411 g mole ⁻¹
Masse volumique :	8,7 g cm ³ à 20°C
Rayon ionique (+2) :	0,097 nm
Configuration électronique :	[Kr] 4d ¹⁰ 5s ²

A l'état naturel, le cadmium existe principalement au degré d'oxydation +2. Remarquons dès à présent que les ions Cd²⁺ et Ca²⁺ se ressemblent fortement. Leurs rayons ioniques sont proches (0,097 nm pour le Cd²⁺ contre 0,100 nm pour le Ca²⁺), ils possèdent la même charge, et ont le même nombre d'électrons de valence (2). La conséquence en est que certains effets du Cd sur les organismes sont provoqués en interférant avec certaines fonctions physiologiques du calcium. Il a également été montré que le Cd pouvait utiliser certaines voies de passage empruntées par le Ca afin de traverser les membranes biologiques, comme des canaux calcium, des échangeurs Ca²⁺/Na⁺, ou encore des Ca-ATPases (Wright, 1977a; Pärt et al., 1985; Verbost et al., 1989; Bjerregaard et Depledge, 1994).

Les principaux composés du cadmium sont le CdCl₂, CdF₂, CdBr₂, CdI₂, CdH₂, CdO, CdS, CdSe, CdTe, Cd₃N₂. Son minerai, très rare, est un sulfure CdS, mais on le rencontre dans presque tous les minerais de zinc si bien qu'on l'exploite industriellement comme un sous-produit de la métallurgie du zinc. Le cadmium est également présent dans des minerais de plomb et de cuivre, ainsi que dans des phosphates naturels.

Le cadmium est largement utilisé par l'homme. On le trouve entre autres dans les écrans de télévision, dans les barres de contrôle des réacteurs nucléaires ou encore dans des colorants (émail, glaçure,...). Il entre dans la composition de nombreux alliages à bas point de fusion (soudures, brasures,...) et sert à la fabrication de certaines batteries d'accumulateurs. D'autres utilisations importantes concernent les revêtements anticorrosion ou encore la fabrication de pigments de couleurs (jaune et rouge).

Les émissions de Cd dans l'environnement proviennent de 2 sources majeures : naturelle et anthropique (OCDE, 1994; Nriagu et Pacyna, 1988). Ces émissions se retrouvent dans les 3 principaux compartiments que sont l'air, l'eau et le sol, mais d'importants transferts peuvent avoir lieu entre eux. La principale source naturelle de Cd est l'érosion de roches contenant des quantités relativement élevées de ce métal. La deuxième source naturelle est due à l'activité volcanique. Enfin, les feux de forêt en émettent dans l'air plusieurs tonnes annuellement. Concernant les émissions d'origine anthropique, peu de chiffres sont disponibles vu la grande incertitude pesant sur certaines sources. La production annuelle mondiale de produits manufacturés contenant du Cd est estimée entre 15000 et 17000 tonnes. Toutefois, une faible partie de ce Cd semble aboutir dans les écosystèmes (OCDE, 1994). L'origine la plus importante du Cd retrouvé dans l'environnement provient d'autres activités humaines, et peut donc être qualifiée de source indirecte. Parmi celles-ci, citons la combustion des combustibles fossiles, l'incinération des déchets ménagers, l'utilisation d'engrais phosphatés, la production d'acier, et la production de métaux non-ferreux. D'après l'*International Cadmium Association*¹, l'utilisation de produits manufacturés contenant du Cd ne serait responsable que d'un maximum de 3% du Cd émis dans l'environnement, alors que l'ensemble des sources anthropiques interviendrait pour plus de 90%.

Un des compartiments de l'environnement qui concerne ce travail, et où se retrouve le Cd est l'eau. Ce métal existe dans les systèmes aquatiques sous la forme d'ions dissous ou complexés, ou encore liés à de la matière particulaire. La distribution du Cd entre les différents composés se trouvant dans l'eau est appelée **spéciation**. Celle-ci dépend essentiellement de la salinité mais aussi du pH, du potentiel oxydant, et des ligands potentiels (tableau 2). En eau douce, le Cd existe très peu sous la forme de chlorure, et pour un pH inférieur à 8,0, l'espèce dominante est l'ion Cd^{2+} . Par contre, plus la salinité augmente et plus il se lie avec le Cl^- . Ainsi, dans de l'eau de mer à 35,5 ‰, pH 8,2, moins de 1% du Cd est présent sous sa forme ionique alors que plus de 98% est présent sous forme de chlorure. Cette spéciation du Cd en fonction de la salinité est importante car il est généralement admis que seule la forme ionique Cd^{2+} peut être accumulée par les organismes (Sunda et al., 1978; Gutknecht, 1983). **Ce phénomène explique, du moins en partie, pourquoi le Cd est plus toxique et**

¹ <http://www.cadmium.org/>

s'accumule davantage chez des organismes acclimatés à de l'eau douce que chez des organismes acclimatés à de l'eau de mer (Wright, 1977b; Frank et Robertson, 1979; Hall et Anderson, 1995).

Les concentrations en Cd dissous retrouvées dans les eaux naturelles sont généralement relativement faibles. Dans une revue, Jensen et Bro-Rasmussen (1992) estiment que **les concentrations dans les eaux douces européennes sont la plupart du temps comprises entre 10 et 500 ng l⁻¹**, alors que l'eau de mer en contient encore moins : entre 0,5 et 10 ng l⁻¹. Toutefois, cette dernière peut être enrichie en métaux juste à la sortie des estuaires. Par exemple, les eaux du golfe de Californie contiennent au maximum 39 ng l⁻¹ de Cd dissous alors que l'océan Pacifique adjacent n'en contient que 0,34 ng l⁻¹ (Delgadillo-Hinojosa et al., 2001).

Tableau 2. Distribution calculée des différentes espèces de cadmium dans l'eau (exprimé en %).
D'après Jensen et Bro-Rasmussen (1992).

pH	6,0	9,0	7,9	7,9	8,2
Salinité (‰)	0	0	2,0	5,9	35,5
Cd ²⁺	96,0	47,0	17,7	6,9	0,9
CdOH ⁺	/	4,0	0,1	0,4	/
CdCO ₃	/	47,0	0,3	1,1	/
CdCl ⁺	/	/	45,7	48,5	31,7
CdCl ₂	1	1	4,7	13,7	44,7
CdCl ₃	/	/	/	0,6	10,0
CdCl ₄ ⁻	/	/	/	/	0,7
CdSO ₄	1	1	3,1	2,3	0,6

En Belgique, les concentrations mensuelles moyennes en Cd dissous dans les eaux de la Meuse étaient comprises entre 100 et 220 ng l⁻¹ entre 1985 et 1996. Elles étaient comprises entre 180 et 920 ng l⁻¹ dans les eaux de l'Escaut pour la même période (statbel¹). Une valeur médiane de 800 ng l⁻¹ a été rapportée pour les eaux de surface en Belgique entre 1978 et 1982 (OCDE, 1994). Pour la période 1986-87, 4% des mesures dépassaient 5 µg l⁻¹ (Jensen et Bro-Rasmussen, 1992). Des concentrations plus élevées en Cd ont récemment été relevées dans les eaux de surface de la rivière *Molse Nete* en Flandres (près de Mol) puisque l'on y a retrouvé des valeurs maximales de 30 µg Cd l⁻¹ (Knapen et al., 2004).

¹ http://statbel.fgov.be/figures/d142_fr.asp

Ces valeurs ne doivent pas occulter le fait que des sites très pollués, souvent proches d'industries, peuvent contenir des concentrations en Cd bien supérieures à ce que nous venons de mentionner. Vazquez et al. (1999) rapportent ainsi des concentrations en Cd dissous dans l'eau de la région du lagon de Terminos (golfe du Mexique) comprises entre 1 et 591 $\mu\text{g l}^{-1}$ pour l'eau douce, et entre 2 et 93 $\mu\text{g l}^{-1}$ pour l'eau salée du lagon. Philp (1999) mesure, toujours dans le golfe du Mexique mais cette fois dans l'eau saumâtre des baies et estuaires du nord de la Floride, des concentrations pouvant atteindre 430 $\mu\text{g l}^{-1}$. Topalian et al. (1999) trouvent des concentrations très élevées dans la *Reconquista River* (Argentine) puisque des pics à 700, 790 et même 1700 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$ sont mentionnés.

Remarquons enfin que la plupart des pays industrialisés fixent la concentration maximale autorisée en Cd dans les eaux de boisson à 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ (OCDE, 1994).

Une fois dans l'environnement, le cadmium peut pénétrer dans les organismes via différentes voies de passage. Chez l'homme, la majeure partie du Cd est ingérée par la nourriture alors que l'absorption à partir d'eau de boisson semble relativement faible (IPCS, 1992). Dans l'organisme humain, le Cd va préférentiellement s'accumuler dans le foie et dans le cortex rénal (Jarup et al., 1998), où il peut être lié à des métallothionéines. Il peut alors occasionner des dysfonctions rénales. Un célèbre cas d'intoxication aiguë au Cd a concerné le Japon dans les années 1950. A cette époque, certaines activités minières larguaient une très grande quantité de ce métal dans les eaux de la rivière Jinzu. Celle-ci servant en grande partie comme eau d'irrigation des rizières, comme eau de boisson, et pour la pêche, les japonais accumulèrent de grandes quantités de Cd en peu de temps. Ces personnes souffrirent de ce que les japonais ont appelé la maladie de itaï-itaï, dont les symptômes étaient de fortes douleurs dans les os avec la fragilisation de ceux-ci et de graves dommages aux reins.

Le cadmium pénètre à l'intérieur des organismes aquatiques soit via la nourriture, soit à travers les surfaces en contact avec l'eau environnante comme les branchies. Parmi ces organismes, ce sont les mollusques qui semblent accumuler les plus fortes concentrations en Cd, ce qui serait en partie dû à un taux élevé de filtration de l'eau (Jensen et Bro-Rasmussen, 1992). Chez le crustacé décapode *C. maenas*, la voie d'entrée directe à travers le tégument et les branchies semble prédominer sur l'ingestion par la nourriture (Jennings et Rainbow, 1979). Par contre, la nourriture semble

être une source importante de Cd chez le crabe *Chionoecetes opilio* (Rouleau et al., 2001).

1.5.1. Effets du cadmium sur l'osmorégulation des organismes aquatiques

L'osmorégulation est une fonction physiologique essentielle à la survie des organismes. Elle permet de maintenir la pression osmotique du liquide circulant dans des limites compatibles avec la survie de l'espèce. Les xénobiotiques sont susceptibles d'interférer avec ces mécanismes d'osmorégulation, notamment chez les organismes aquatiques dont certains organes impliqués dans cette fonction sont en contact direct avec le milieu externe (ex : les branchies), et donc avec des polluants.

Ainsi, des mesures de l'osmolarité (ou de l'osmolalité) et des concentrations ioniques sanguines sur des animaux contaminés en laboratoire par différents xénobiotiques, montrent souvent des fluctuations significatives. Thurberg et al. (1973) ont été les premiers à signaler de tels effets. Chez les crustacés décapodes *Carcinus maenas* et *Cancer irroratus* exposés à du cuivre, ils observèrent que l'osmolarité sanguine était diminuée par rapport à celle de crabes contrôles. Par contre, le Cd avait un effet inverse au Cu sur *C. maenas* puisque l'osmolarité était augmentée en présence du métal et que l'animal devenait donc davantage hyper-osmotique. Des résultats similaires mais peu marqués ont été observés par Bjerregaard et Vislie (1985) toujours sur *C. maenas*. Le Cd, à une concentration de 10 mg l⁻¹, induit une faible augmentation de l'osmolarité et des concentrations en ions Na⁺, Cl⁻ et K⁺. Le Cd a également le même effet sur le crabe euryhalin *C. granulata* (acclimaté à des salinités de 12 et 30 ‰) puisqu'en stress aigu (96h à 6,3 mg l⁻¹) et en stress chronique (2 semaines à 5 mg l⁻¹), Rodriguez et al. (2001) observent une augmentation de la concentration en ions Na⁺ et Ca²⁺ dans l'hémolymph. Cependant, les effets du Cd ne vont pas toujours dans le même sens. Chez *C. granulata* acclimaté cette fois à une salinité de 2,5 ‰, le Cd 1,25 mg l⁻¹ (96h) induit une diminution des concentrations plasmatiques en Na⁺ mais pas en Cl⁻ (Vitale et al., 1999). De même, Mc Geer et al. (2000) montrent que les ions Na⁺ et Ca²⁺ sont moins nombreux dans les carcasses de truites soumises à un stress chronique au Cd (65 et 100 jours à 3 µg l⁻¹).

Ces effets du Cd sur l'osmorégulation et l'ionorégulation, s'ils sont démontrés, ne sont que partiellement expliqués. En effet, plusieurs mécanismes d'action peuvent entraîner une modification de l'osmolarité

sanguine. Ainsi, le polluant peut interagir avec les mécanismes qui réduisent les flux passifs d'ions et d'eau (mécanismes limitants). Il peut aussi interagir avec les mécanismes qui pompent activement des ions à partir du milieu extérieur lorsque l'animal vit en milieu hypotonique (mécanismes compensatoires).

Parmi les mécanismes compensatoires, deux enzymes sont particulièrement bien connues pour participer activement à l'osmorégulation. Ce sont la Na^+/K^+ -ATPase (NKA) et l'anhydrase carbonique (AC). De nombreuses études ont déjà montré un effet d'inhibition de certains polluants sur la NKA. Les effets les plus marqués ont été relatés *in vitro* sur des fractions microsomales de branchies incubées avec un polluant. Le Cd a été largement étudié et montre une capacité importante à inhiber la NKA. Tucker et Matte (1980) ont, les premiers, montré sur des branchies de *C. irroratus* que du Cd 10 mg l^{-1} diminuait de 37 % l'activité de cette enzyme. Par contre, aucun effet n'a été observé avec 1 mg l^{-1} . Postel et al. (1998) ont également montré une inhibition significative sur des branchies postérieures de *C. maenas*. Cette inhibition était irréversible et le K_i était de $9.1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ($\sim 10 \text{ mg l}^{-1}$). Des résultats comparables, soit une CI_{50} de $21,6 \text{ mg l}^{-1}$, ont été obtenus chez le crabe *C. granulata* (Rodriguez Moreno et al., 1998). Chez les vertébrés, l'anguille a été largement étudiée. Il a été montré chez ce poisson que le Cd inhibait l'activité de la NKA de microsomes branchiaux avec une CI_{50} de 146 nM (Lemaire-Gony et Mayer-Gostan, 1994) ou de 138 nM (Lionetto et al., 2000). La NKA de l'intestin semble moins sensible puisqu'une CI_{50} de 286 nM a été calculée pour cette espèce. Parmi d'autres vertébrés étudiés, Lai et al. (1980) ont montré que le Cd inhibait l'activité de la NKA du cerveau de rat *in vitro* avec une CI_{50} de $5,4 \mu\text{M}$.

Lorsqu'on observe les effets du Cd *in vivo*, les choses se compliquent puisqu'il n'y a pas cette fois d'inhibition systématique de l'activité de la NKA. Pratrapp et Wendelaar Bonga (1993) ont observé une légère diminution de l'activité de la NKA dans des cellules à chlorure de Tilapia après une contamination au Cd. Les auteurs ont conclu en une diminution de la capacité d'échange ionique malgré une augmentation du nombre de cellules à chlorure. Dhavale et al. (1988) ont également montré une inhibition de l'activité de la NKA dans les branchies du crabe *Scylla serrata* acclimaté à de l'eau salée 30 ‰ (24 mg Cd l^{-1} pendant 4 jours, ou $0,3$ à $1,5 \text{ mg Cd l}^{-1}$ pendant de 10 à 30 jours). Par contre, chez la truite, Mc Geer et al. (2000) n'ont pas observé de modification de l'activité de cette enzyme suite à une exposition chronique pendant 65 et 100 jours à $3 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ alors que ces conditions induisaient une perte significative de Na^+

sanguin. De même, sur le crabe *C. granulata*, alors que le Cd inhibait l'activité de la NKA *in vitro*, aucun effet n'a pu être mis en évidence *in vivo* (Rodriguez Moreno et al., 1998). Ainsi, même si le Cd peut induire une inhibition significative de l'activité de la NKA *in vitro*, les effets *in vivo* sont moins évidents. Ce métal a certainement un accès moins aisé à l'enzyme (localisée sur la membrane baso-latérale des branchies) sur un organisme entier, ce qui pourrait en partie expliquer cette divergence. Rien actuellement ne permet donc de conclure que l'impact du Cd sur l'osmorégulation se ferait via une inhibition de l'activité de cette enzyme.

L'AC est également sensible au Cd. Ainsi, Skaggs et Henry (2002) ont montré que le Cd (ainsi que l'Ag, le Cu et le Zn) inhibait l'activité de l'AC *in vitro* sur des branchies des crabes *C. sapidus* et *C. maenas*. Lionetto et al. (2000) ont également montré une inhibition de l'activité de l'AC sur les branchies et l'intestin d'anguilles. Vitale et al (1999) ont montré une inhibition de l'activité de cette enzyme par le Cd sur des branchies postérieures du crabe *C. granulata* et ce aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, l'effet *in vivo* étant cependant plus important. Ces auteurs concluent que l'inhibition de l'activité de cette enzyme pourrait expliquer le fait qu'une contamination par le Cd diminue les concentrations plasmatiques en Na^+ .

De possibles effets de xénobiotiques sur les mécanismes limitants ont été nettement moins étudiés. A notre connaissance, seuls Rasmussen et al. (1995) ont rapporté une diminution très rapide de la perméabilité apparente à l'eau chez *C. maenas* suite à une exposition au Cd. Ils ignorent toutefois s'il s'agit d'un effet direct ou plutôt d'une réponse compensatoire pour contrecarrer une perte d'eau.

1.6. Le modèle biologique : le crabe chinois *Eriocheir sinensis*

1.6.1. Caractéristiques générales¹

Le crabe chinois *Eriocheir sinensis* (Milne-Edwards, 1854) se reconnaît aisément par la présence de touffes de « poils » entourant deux pinces de couleur blanche chez les adultes et les grands juvéniles (Fig. 7.). Sa classification se résume comme suit :

Phylum :	arthropodes
Sous-phylum :	crustacés
Classe :	malacostracés
Sous-classe :	eumalacostracés
Super-ordre :	eucarides
Ordre :	décapodes
Infra-ordre :	brachyours
Super-famille :	grapsidoidés
Famille :	grapsidés
Genre :	<i>Eriocheir</i>
Espèce :	<i>Eriocheir sinensis</i>

¹Pour plus d'informations concernant cette espèce, se référer aux sites suivants :

<http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=38&fr=1&sts=:>

<http://bss.sfsu.edu/geog/bholzman/courses/Fall02%20projects/mitten.html> ;

<http://www.nhm.ac.uk/zoology/crab/>

Le crabe chinois tolère la variation d'une large gamme de facteurs abiotiques comme la température et la salinité (Anger, 1991). Ainsi, bien que son aire de répartition ne comprenne que des zones au climat tempéré, il peut supporter de grandes variations de la température ambiante. De même, sa grande tolérance vis-à-vis de la salinité ambiante en a fait un modèle d'étude pour comprendre les mécanismes d'osmorégulation chez les crustacés décapodes (voir chapitre 1.6.2).



Fig. 7. Le crabe chinois *Eriocheir sinensis* (Photo de Lee Mecum, California Department of Fish and Game).

Le crabe chinois est ce que l'on appelle une **espèce invasive** (Herborg et al., 2003). Il est originaire d'extrême Orient, où il se retrouve dans les rivières et les estuaires de zones tempérées de Chine et de Corée, le long de la Mer Jaune. Même s'il peut se retrouver loin des côtes, il préfère vivre dans les rivières pas trop éloignées de la mer. Cette espèce s'est avérée être parfaitement adaptée pour survivre et se reproduire en Europe. Ainsi, un premier spécimen fut identifié en Allemagne en 1912. Par la suite, son aire de répartition n'a cessé de croître, si bien que l'on en retrouve actuellement en Finlande, Suède, Russie, Pologne (Normant et al., 2000), Allemagne, Tchéquie, Belgique (Maes et al., 1998), Grande-Bretagne (Clark et al., 1998), France, ainsi qu'aux Pays-Bas. L'Europe du Nord et Centrale n'est pas la seule concernée puisque sa présence a également été confirmée au Portugal dans la région de Lisbonne (Cabral et

Costa, 1999). Il est maintenant tellement bien implanté dans certains pays européens que des pêcheurs et aquaculteurs allemands prétendent en exporter eux-mêmes en Chine (communication personnelle) ! Depuis 1965, *E. sinensis* a aussi « conquis l'Amérique », au grand damne des américains. On en retrouve actuellement dans la rivière Détroit, dans la région des grands lacs, en Californie dans la région de San Francisco, ainsi qu'occasionnellement à Hawaii (Veldhuizen et Stanish, 1999). Les américains prennent cette invasion très au sérieux si bien qu'ils ont mis sur pied un comité de contrôle du crabe chinois chargé d'élaborer un plan de gestion afin de lutter contre « l'agresseur »¹. Il faut dire que la baie de San Francisco a été particulièrement touchée par cette espèce qui n'a cessé d'étendre son territoire depuis son arrivée au début des années 1990.

Le cycle de vie du crabe chinois, relativement complexe, comprend 2 migrations (Fig. 8.). Les adultes vivent en eau douce, dans les cours d'eau dont la salinité est inférieure à 5 ‰. Après plusieurs mues, ils atteignent leur maturité sexuelle entre l'âge de 1 et 5 ans, en fonction des conditions environnementales (Veldhuizen et Stanish, 1999). Tous les animaux mesurant plus de 55 mm de large sont matures, bien que de plus petits individus peuvent également être aptes à se reproduire. Fin de l'été, les

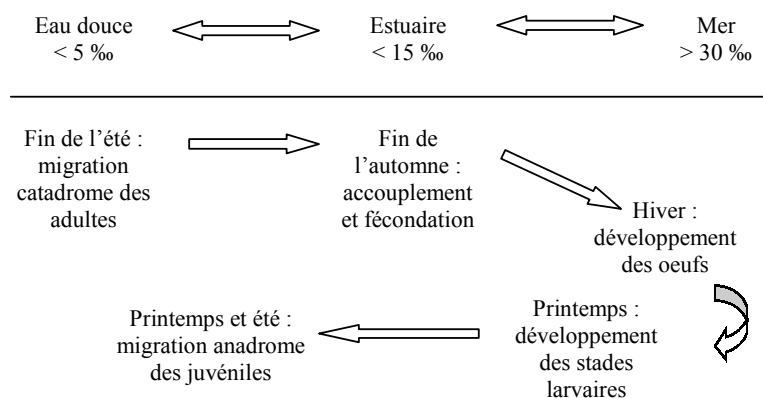


Fig. 8. Cycle de vie du crabe chinois *Eriocheir sinensis* (d'après Rainbow et al., 2003).

¹ <http://www.anstaskforce.gov/Chinese-mitten-crab-plan2-02.pdf>

crabes effectuent une mue de puberté et entreprennent une migration catadrome (Panning, 1938). Une fois arrivés dans un estuaire à la fin de l'automne, les accouplements ont lieu et les oeufs sont fécondés. Les femelles passent alors l'hiver en eau plus profonde (entre 10 et 15 m dans l'estuaire de l'Elbe) alors que les oeufs se développent sous leur abdomen. Des larves Protozoés éclosent ensuite dès la fin de l'hiver et pendant le printemps à des salinités comprises entre 10 et 25 ‰ (Anger, 1991). Elles se transforment en Zoés I qui est un stade lui aussi très euryhalin. Ces larves sont planctoniques et sont progressivement entraînées par les courants vers le large où règnent des salinités supérieures à 30 ‰. Les stades Zoés ultérieurs (de II à V et parfois VI) sont graduellement moins tolérants à de faibles salinités pour ne plus supporter finalement que de l'eau de mer. Au printemps et jusqu'au début de l'été, les larves Zoés se métamorphosent en larves Mégaloques. Celles-ci se retrouvent davantage sur le fond et sont à nouveau euryhalines. Elles commencent alors à remonter vers les estuaires où elles vont se métamorphoser en juvéniles. Ceux-ci vont finalement migrer et ainsi remonter le long des cours d'eau. En Europe, cette dernière migration débute déjà en mars et se poursuit jusqu'en juillet. Les adultes meurent généralement après la reproduction bien que certains aient déjà été retrouvés en train de remonter les cours d'eau avec les juvéniles. Nous ne savons toutefois pas si ces individus peuvent survivre jusqu'à une seconde saison de reproduction. Ainsi, bien que les juvéniles et les adultes vivent en eau douce, le crabe chinois est clairement une espèce d'origine marine qui nécessite obligatoirement de l'eau salée afin de s'y reproduire (Anger, 1991).

1.6.2. Le crabe chinois comme modèle pour étudier l'osmorégulation

La capacité du crabe chinois à pouvoir vivre en eau douce et en eau de mer, en fait depuis de nombreuses années un modèle d'étude privilégié afin de comprendre les mécanismes d'osmorégulation chez les crustacés décapodes (pour revues, voir Péqueux, 1994; Péqueux, 1995). Les mécanismes de régulations ioniques sont évidemment très différents que l'animal se trouve en milieu marin, dans lequel il est osmoconforme ou légèrement hypo-osmorégulateur, ou qu'il se trouve en milieu dulcicole, dans lequel il est hyper-osmorégulateur. Roast et al. (2002) ont ainsi déterminé expérimentalement la courbe d'osmorégulation de crabes chinois capturés dans la Tamise en Grande-Bretagne (Fig. 9.). Grâce à celle-ci, ils ont pu déterminer un point isosmotique équivalent à une salinité de 32,7 ‰. A cette salinité, son hémolymphe a une osmolalité égale à 945 mOsm kg⁻¹.

Au-delà, elle est hypotonique par rapport au milieu environnant. En-dessous, ses mécanismes hyper-osmorégulateurs maintiennent l'hémolymphe hypertonique par rapport à l'eau environnante.

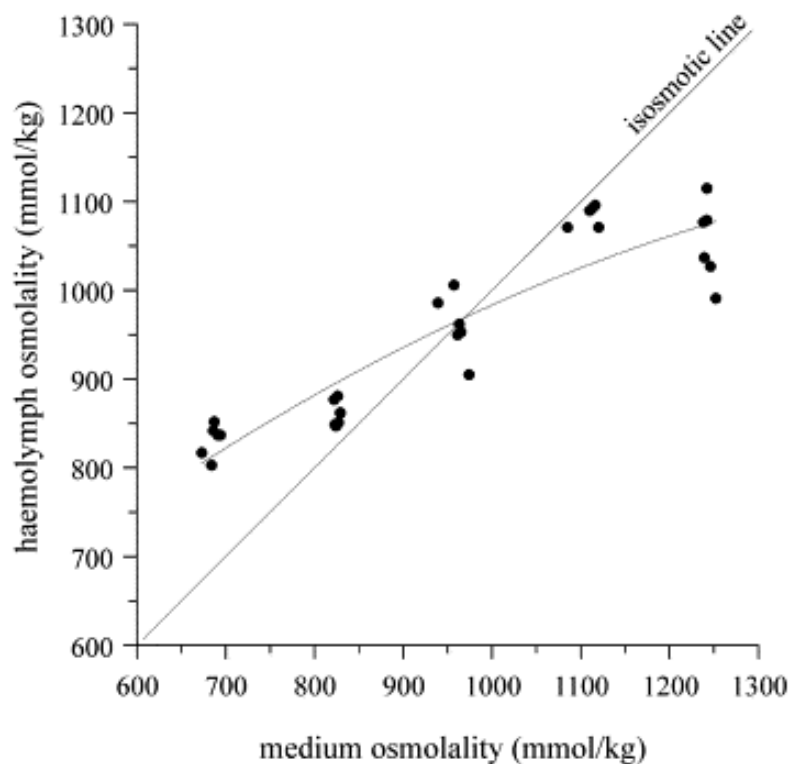


Fig. 9. Courbe d'osmorégulation du crabe chinois *Eriocheir sinensis* (d'après Roast et al., 2002).

Les mécanismes permettant de survivre dans des milieux dilués sont de deux types. Ils peuvent limiter les flux dissipatifs d'eau et d'ions à travers les surfaces d'échange en contact avec le milieu extérieur (branchies, carapace, tube digestif, glande antennaire), c'est ce que l'on appelle les **mécanismes limitants**. Ainsi, des organismes vivant en eau douce ont généralement une perméabilité tégumentaire à l'eau et aux ions bien inférieure à des organismes vivant en eau salée (Kirschner, 1991). Par

exemple, Rainbow et Black (2001) ont montré que la perméabilité apparente à l'eau (AWP) de 3 décapodes dépendait de leur milieu de vie habituel (pour une revue sur l'AWP chez les crustacés, voir Rasmussen et Andersen, 1996). *Necora puber*, un crustacé marin, présente une AWP élevée en comparaison avec *Carcinus maenas*, vivant lui en milieu intertidal ou estuarien. *Eriocheir sinensis* a, en comparaison, une AWP encore plus faible. Ces auteurs notent également que si *C. maenas* diminue son AWP lorsqu'il est acclimaté à de l'eau diluée, *E. sinensis* garde toujours la même AWP quel que soit son milieu d'acclimatation. Ils concluent que le crabe chinois possède intrinsèquement une AWP basse qui lui est suffisante pour survivre en eau douce.

Les organismes, pour vivre en milieu dilué, doivent aussi compenser les pertes/gains d'ions/d'eau grâce à des mécanismes actifs allant à l'encontre des gradients électro-chimiques. C'est ce que l'on appelle les **mécanismes compensatoires** (pour revue, voir Ahearn et al., 1999). Chez les crustacés décapodes, la branchie est le principal organe permettant de rétablir l'équilibre ionique du milieu interne. A ce titre, elle fait l'objet de nombreuses études. Il est néanmoins rapidement ressorti que, pour des décapodes hyper-osmorégulateurs, une distinction doit être faite entre les branchies dites « antérieures » et les branchies dites « postérieures ». En effet, ces deux types de branchies ont des caractéristiques tout à fait différentes aussi bien au niveau morphologique que physiologique. Ainsi, parmi les 8 paires de phyllobranchies que compte *Eriocheir sinensis* (Taylor et Taylor, 1992), les 5 paires les plus antérieures sont considérées comme « respiratoires » sans aucune fonction connue dans le transport actif d'ions Na^+ et Cl^- , alors que les 3 paires les plus postérieures sont considérées comme « osmorégulatrices », et responsables du transport actif de ces 2 ions (Gilles et al., 1988). Le détail de leur fonctionnement est examiné ci-dessous:

Branchies antérieures (Fig. 10.)

Des expériences utilisant des branchies isolées et ensuite perfusées dans un milieu imitant le milieu interne de l'animal, ont permis de comprendre les passages d'ions qui y prenaient place. Il en découle qu'en l'absence de gradient transépithélial en NaCl , les branchies antérieures sont perméables au Na^+ . Celui-ci entre de manière passive à l'intérieur de la cellule épithéliale, créant une différence de potentiel (ddp) négative à l'extérieur de la membrane plasmique apicale. Le Na^+ peut alors entrer dans l'hémolymphe via les enzymes Na^+/K^+ -ATPases (NKA). Toutefois, le Na^+

diffuse également via des espaces paracellulaires, annulant le mouvement précédent. Il en résulte qu'il n'y a pas de flux net de Na^+ à travers ce type de branchie, la sortie compensant l'entrée (Péqueux et Gilles, 1988). Par opposition, aucun flux de Cl^- n'a jamais pu être mis en évidence à travers la membrane apicale (Gocha et al., 1987). Le K^+ quant à lui sort passivement par la membrane baso-latérale pour se trouver dans l'hémolymphe, créant une ddp positive à l'extérieur de la face baso-latérale.

En résumé, deux flux égaux de Na^+ , entrant et sortant, sont observés. Par contre, cet épithélium se révèle être imperméable au Cl^- . Il en résulte une ddp négative à la face externe (apicale) et positive à la face interne (baso-latérale).

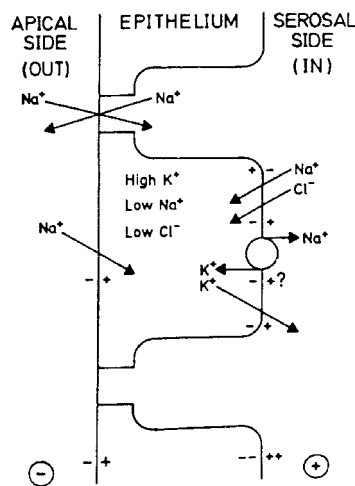


Fig.10. Modèle fonctionnel d'une branchie antérieure de crabe chinois *Eriocheir sinensis* adapté à l'eau douce. Les deux faces baignent dans le même milieu (d'après Péqueux et Gilles, 1988).

Branchies postérieures (Fig. 11.)

Les caractéristiques suivantes ont pu être mises en évidence grâce aux perfusions :

- le Cl^- entre dans la cellule épithéliale par simple diffusion à travers la membrane apicale et crée une ddp positive à l'extérieur. Il entre également par échange $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ et par un cotransport $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$,

- le passage du Cl^- vers l'hémolymph s'effectue à la face baso-latérale par des canaux chlorure, suivant un potentiel de diffusion généré par un gradient électro-chimique en K^+ , indépendamment de la NKA (Onken et Graszynski, 1989),
- le Na^+ rentre dans les cellules épithéliales par la face apicale via un échange H^+/Na^+ et par le cotransport $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2 \text{Cl}^-$ (Péqueux et Gilles, 1981),
- le Na^+ pénètre ensuite dans l'hémolymph via les NKA situées dans les membranes baso-latérales,
- une enzyme, l'anhydrase carbonique, située dans le cytoplasme des cellules épithéliales, permet la régénération d'ions H^+ et de HCO_3^- , nécessaires au transport du Na^+ et du Cl^- à travers la membrane apicale.

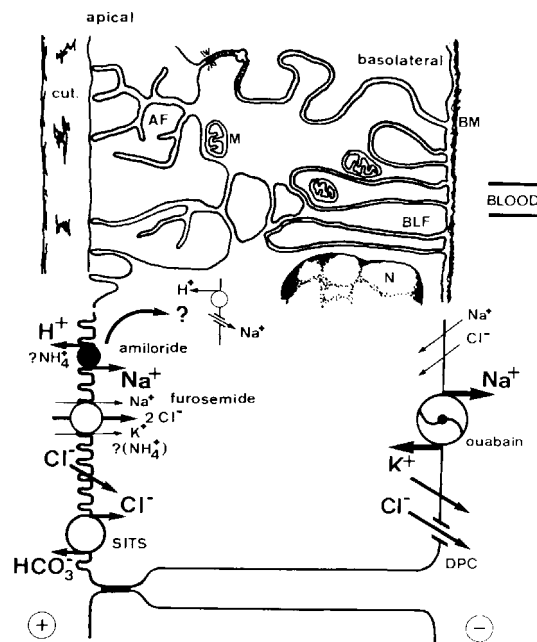


Fig.11. Modèle fonctionnel d'une branchie postérieure du crabe chinois *Eriocheir sinensis* adapté à l'eau douce. Les deux faces baignent dans le même milieu (d'après Péqueux, 1995).

Cet épithélium permet donc l'entrée du Na^+ et du Cl^- du milieu extérieur vers l'hémolymphe. Seul le Cl^- est capable de passer par simple diffusion à travers la face apicale, alors que dans les branchies antérieures, seul le Na^+ en est apte. Une ddp est générée, mais contrairement à la branchie antérieure, elle est négative à l'extérieur de la face baso-latérale et positive à l'extérieur de la face apicale.

Structure générale des branchies

Les crabes brachyours possèdent des phyllobranchies, c'est-à-dire des branchies constituées par des lamelles plaquées les unes contre les autres (pour plus de détails, voir Taylor et Taylor, 1992).

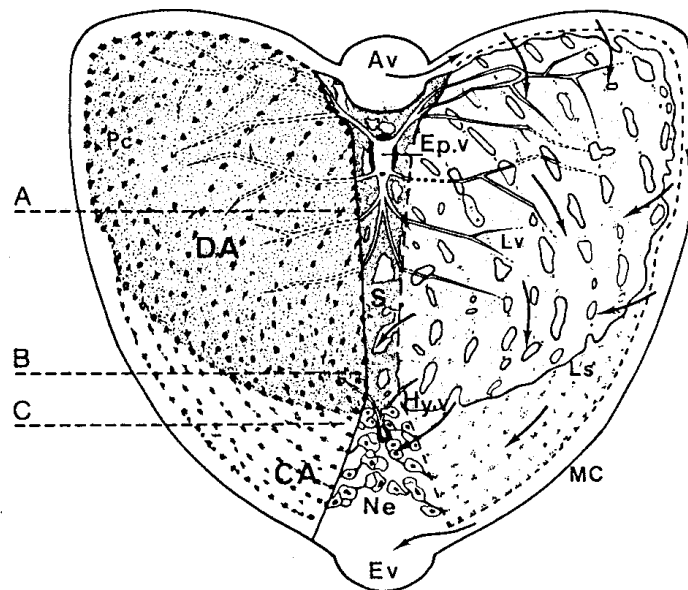


Fig.12. Diagramme d'une coupe transversale dans une branchie du crabe chinois *Eriocheir sinensis*. Av, vaisseau afférent ; Ca, zone claire ; Da, zone sombre ; Ep.V, artère épibranhiale ; Ev., vaisseau efférent ; Hy.V, artère hypobranhiale ; Ls, septum lamellaire ; Lv, vaisseaux lamellaires ; Mc, canal marginal ; Ne, néphrocytes ; Pc, cellules piliers ; s, rachis (d'après Barra et al., 1983)

En coupe transversale (Fig. 12.), on peut voir que les lamelles gauches et droites sont maintenues solidaires entre elles et avec leurs voisines par le rachis. Celui-ci s'étend verticalement entre les deux vaisseaux, afférent du côté dorsal, et efférent du côté ventral. Le premier amène l'hémolymphe pauvre en oxygène, et le second la reprend après que les échanges respiratoires et ioniques aient eu lieu. A l'intérieur du rachis se trouvent les deux artères qui nourrissent la branchie, l'artère épibranchiale et l'artère hypobranchiale.

Les lamelles sont formées d'une couche de cellules épithéliales de chaque côté qui créent un espace intercellulaire où circule l'hémolymphe. Cet épithélium branchial est, de plus, recouvert d'une cuticule. Celle-ci joue un rôle extrêmement important quant à la perméabilité ionique de l'épithélium branchial en modifiant ses propriétés de perméabilité lorsque la composition ionique externe change (Lignon, 1987; Péqueux et Lignon, 1988).

Les cellules épithéliales ne sont pas seules présentes dans l'épithélium branchial. On y retrouve aussi des cellules piliers. Deux de ces cellules, se situant aux faces opposées, peuvent se rejoindre et former des jonctions en dents de scie de type desmosome. Des microtubules s'étalant

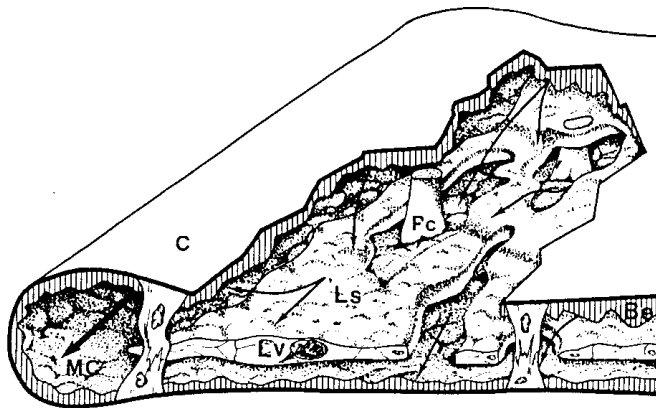


Fig.13. Diagramme d'une lamelle branchiale coupée dans la zone sombre (coupe A dans la Fig. 18.). Be, épithélium branchial ; c, cuticule ; Ls, septum lamellaire ; Lv, vaisseaux lamellaires ; Mc, canal marginal ; Pc, cellules piliers (d'après Barra et al., 1983).

entre les desmosomes et la face apicale les rendent plus denses aux électrons si on les observe en microscopie électronique. Ces piliers ont un rôle de soutien des lamelles, qu'ils renforcent afin de lutter contre la pression hydrostatique. Ils ont également pour fonction de canaliser le flux d'hémolymphe afin qu'il se répande efficacement à travers les lamelles.

Macroscopiquement, la lamelle est formée de deux zones distinctes, l'une est foncée et située du côté dorsal, alors que l'autre est plus claire et est située du côté ventral. Cet assombrissement est dû à la présence d'un septum lamellaire intercalé entre les deux couches de cellules épithéliales (Fig. 13.). Celui-ci est extrêmement poreux, ce qui implique que les deux compartiments ne soient pas isolés. Il est constitué de cellules dont il a été démontré qu'elles contenaient des réserves de glycogène, contrairement aux cellules épithéliales (Welcomme et Devos, 1991). Il contient également des ramifications des deux artères nourricières, les vaisseaux lamellaires, et est soutenu par des cellules piliers.

La partie externe d'une lamelle est bordée par un canal plus large : le canal marginal. Ce dernier fait une liaison entre les vaisseaux afférents et efférents et fait office de chemin de passage de l'hémolymphe d'un vaisseau à l'autre. En effet, contrairement à l'intérieur de la lamelle, rien ne ralentit le flux du liquide dans le canal marginal puisqu'il n'y a ni cellules piliers, ni septum lamellaire, et que le diamètre est plus grand. Le flux d'hémolymphe peut donc se résumer comme suit : elle arrive par le vaisseau afférent, va préférentiellement dans le canal marginal, continue par ce canal jusqu'au vaisseau efférent ou s'infiltre à l'intérieur des lamelles avant d'aboutir également au vaisseau efférent.

Ultrastructure des branchies antérieures (Fig. 14.)

Barra et al. (1983), ont étudié l'ultrastructure des branchies antérieures et postérieures du crabe chinois grâce à la microscopie électronique, et l'ont mise en relation avec la physiologie de ces organes.

Dans la branchie antérieure, l'épaisseur de l'épithélium varie entre 2 et 4 μm . Il est couvert d'une cuticule épaisse de $\pm 1 \mu\text{m}$. Les cellules épithéliales présentent des replis de la membrane plasmique apicale mais en faible quantité. Par contre, la membrane baso-latérale ne présente pas ou peu de replis. Des mitochondries sont également présentes du côté apical.

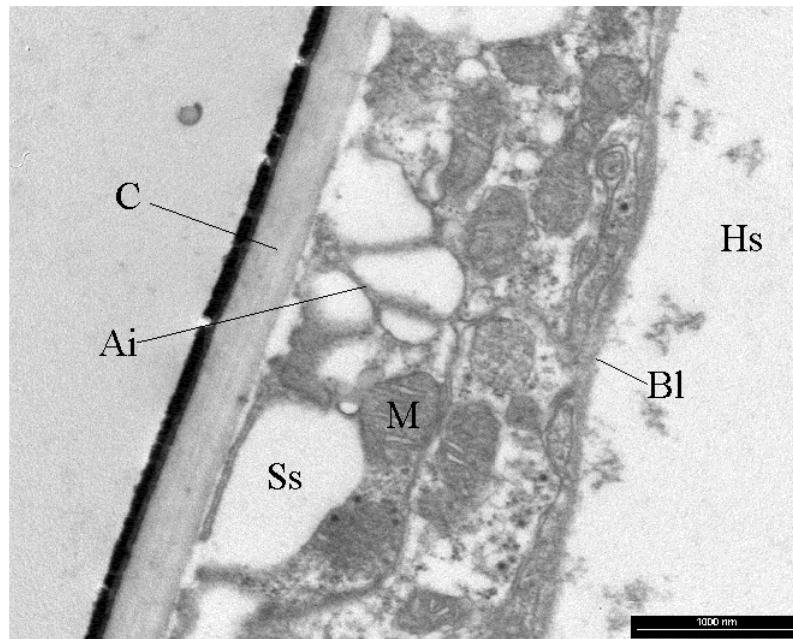


Fig. 14. Coupe transversale dans l'épithélium d'une branchie antérieure du crabe chinois *Eriocheir sinensis*. Ai, replis apicaux ; Bl, lame basale ; C, cuticule ; Hs, espace de l'hémolymphe ; M, mitochondrie ; Ss, espace sous-cuticulaire. Grossissement 15 000 X.

Ultrastructure des branchies postérieures (Fig. 15.)

L'épithélium est très différent de celui des branchies antérieures. Il est plus épais, jusqu'à 10 μm , et la cuticule le recouvrant est plus fine (0,3 μm). Les cellules possèdent un grand nombre de replis à la face apicale faisant apparaître des vésicules extracellulaires appelées espaces sous-cuticulaires. Des mitochondries y sont associées. La face baso-latérale présente également beaucoup de replis finement associés à de nombreuses mitochondries.

Ces différences morphologiques entre branchies antérieures et postérieures ont été mises en relation avec le fait que les premières ne sont pas impliquées dans le transport actif d'ions alors que les secondes pompent activement du NaCl à partir du milieu environnant. L'épithélium épais recouvrant les branchies postérieures possède d'ailleurs une

ultrastructure caractéristique des épithélia transporteurs d'ions, avec une surface de contact augmentée par de nombreux replis et des mitochondries associées à ces replis et permettant une fourniture d'énergie importante.

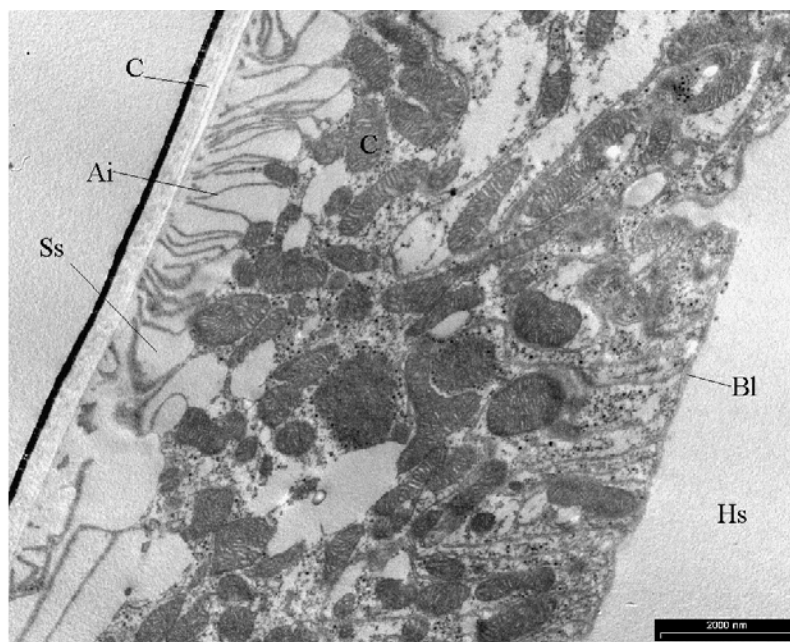


Fig. 15. Coupe transversale dans l'épithélium d'une branchie postérieure du crabe chinois *Eriocheir sinensis*. Ai, replis apicaux ; Bl, lame basale ; C, cuticule ; Hs, espace de l'hémolymphe ; M, mitochondrie ; Ss, espace sous-cuticulaire. Grossissement 6 200 X.

1.6.3. Le crabe chinois comme modèle pour comprendre les effets de xénobiotiques sur l'osmorégulation

Ses facultés d'euryhalinité ajoutées à la bonne connaissance que l'on a de ses mécanismes d'osmorégulation, font du crabe chinois un modèle expérimental de premier choix afin d'étudier les effets de xénobiotiques sur l'osmorégulation des crustacés décapodes. Les mécanismes hyper-osmorégulateurs représentent des cibles potentiellement importantes pour des xénobiotiques, pouvant entraîner de graves difficultés de survie en eau douce. Pourtant, la première étude portant sur des interactions entre un polluant et l'osmorégulation du crabe chinois date seulement de 1996. A

cette occasion, Péqueux et al. (1996) ont montré que les processus d'osmorégulation pouvaient être parmi les principales cibles affectées par le Hg. Les perméabilités branchiales aux Na^+ et Cl^- ainsi que les transports actifs de ces mêmes ions étaient affectés par ce métal. Une altération de la NKA et des canaux chlorure localisés sur la membrane baso-latérale de l'épithélium des branchies postérieures en serait, au moins en partie, responsable.

Dans le même ordre d'idées, l'atrazine, un herbicide essentiellement utilisé dans les champs de maïs, affecte la ddp des branchies postérieures lorsqu'elle est en contact avec la membrane baso-latérale, ce qui laisse également supposer une altération des mécanismes de transport ionique se trouvant sur cette membrane (Silvestre et al., 2002).

1.7. La protéomique pour étudier la réponse cellulaire au stress provoqué par un xénobiotique

Depuis quelques années, la biologie est entrée dans une ère nouvelle. Hautement médiatisé, le projet de séquençage du génome humain en est la manifestation la plus connue. La possibilité de connaître et d'utiliser les séquences génomiques, a propulsé notre science dans ce que les anglosaxons nomment la « *systems biology* » (que l'on pourrait traduire par « biologie intégrative »). Un nombre croissant de laboratoires aspirent maintenant à construire une nouvelle compréhension, complète et profonde, des systèmes vivants, en laissant de côté un certain réductionnisme génétique et en étudiant la corrélation étroite et dynamique entre un maximum de composants (Keller, 2004).

Le premier chromosome d'un organisme eucaryote à avoir été entièrement séquençé est le chromosome III de la levure (315 kb - 315 000 paires de bases). La séquence complète fut obtenue en 1991 grâce au travail mené par un consortium de 35 laboratoires européens. En 1995, le génome de la bactérie *Haemophilus influenzae* a été séquençé. Il devint de la sorte le premier génome complet séquençé. A ce jour (décembre 2004)¹, la communauté scientifique peut se vanter d'avoir à son actif le séquençage de 180 génomes. C'est par exemple le cas pour divers organismes eucaryotes comme la levure *Saccharomyces cerevisiae*, le vers nématode *Caenorhabditis elegans* ou encore le diptère *Drosophila melanogaster*. Le dernier génome d'eucaryote à avoir été séquençé est celui d'un petit poisson bien connu des aquariophiles, le poisson ballon *Tetraodon nigroviridis* (Jaillon et al., 2004). Ce dernier possède la caractéristique d'avoir le plus petit génome de vertébré connu (350 Mb – 350 000 000 de paires de bases). Signalons enfin qu'un premier « brouillon » du génome humain fut publié en 2001 par deux équipes indépendantes, *Celera Genomics* (Maryland, USA) d'une part, et l'*International Human Genome Project* d'autre part (McPherson et al., 2001 ; Venter et al., 2001). Une

¹ Pour obtenir une liste complète des génomes séquençés, voir le site :

http://www.genomenetwork.org/resources/sequenced_genomes/genome_guide_p1.shtml .

version complète et précise à 99,99% du génome humain est aujourd'hui librement accessible. Par comparaison à celui de *T. nigroviridis*, le génome humain compte approximativement 3 000 Mb.

Cependant, le fait de connaître des séquences génomiques complètes n'est pas suffisant. La connaissance de la succession des bases A, T, G, C, n'apporte que peu d'éléments permettant d'améliorer notre compréhension du vivant. Il est nécessaire de donner un sens au génome séquencé, en l'annotant, c'est-à-dire en repérant les différents gènes et les différentes parties d'un gène. Cette annotation nécessite le concours d'un puissant outil informatique et utilise des stratégies telles que la comparaison avec d'autres génomes connus, ou encore la comparaison avec le produit de la transcription des gènes, les ARN messagers. Cette étape d'annotation est encore en cours pour *Homo sapiens*. Actuellement, les estimations les plus précises stipulent la présence chez cette espèce de plus ou moins 25 000 gènes, alors que les premières estimations parlaient de 100 000¹.



Fig. 16. La chenille et le papillon possèdent le même génome mais sont pourtant très différents.

¹ Pour plus de détail sur le séquençage de génomes, visiter le site http://www.genoscope.cns.fr/externe/Francais/corps_francais.html .

Au terme d'un laborieux travail, la séquence en nucléotides d'un génome et l'annotation complète de celui-ci sont disponibles. Cependant, il faut se rendre compte que la connaissance du génome n'est en fait qu'une étape intermédiaire, un support sur lequel s'appuyer. Il reste encore à donner « vie » à ce génome, c'est-à-dire à comprendre sa dynamique.

Pour bien comprendre de quoi il s'agit, prenons l'exemple de la Fig. 16. La chenille va se transformer en papillon. Ces deux organismes possèdent le même génome dans chacune de leurs cellules. Ils sont pourtant très différents. Ils illustrent le profil d'expression d'un génome à des moments différents. Ainsi, pour un même génome se trouvant dans toutes les cellules somatiques d'un même organisme, ce ne sont pas les mêmes gènes qui s'expriment dans les mêmes proportions. L'activation et la répression de ceux-ci dépend du type cellulaire, du stade de développement, et des conditions environnantes. Ces dernières regroupent aussi des conditions environnementales telles que la température extérieure ou encore l'exposition à des xénobiotiques. **L'étude de l'expression des différents gènes formant un génome, dans un tissu donné, à un moment donné, et sous une condition donnée, s'appelle la génomique fonctionnelle.** Elle est à présent l'une des branches les plus actives de la biologie moléculaire.

Classiquement, les études ayant pour but de comprendre le niveau d'expression des gènes sous différentes conditions, sont réductionnistes. C'est-à-dire qu'elles se focalisent sur un petit nombre de gènes, suspectés intervenir dans le processus biologique étudié. Cependant, des techniques permettant non plus de se focaliser sur quelques gènes, mais plutôt d'étudier simultanément le niveau d'expression de plusieurs milliers de gènes, soit le profil d'expression, se développent de plus en plus. C'est par cette approche, dite « **sans a priori** », que la notion de globalité prend tout son sens en biologie moléculaire et permet d'utiliser de manière optimale les informations contenues dans les séquences génomiques. En conséquence, elles permettent aussi de mettre en évidence des processus cellulaires jusqu'alors inconnus et/ou insoupçonnés.

Les études de génomique fonctionnelle peuvent être menées à différents niveaux (Fig. 17.), les niveaux transcriptomique et protéomique étant les plus courants. Le premier fait référence au transcrit, c'est-à-dire à l'ARN messager synthétisé dans une cellule suite à la transcription des gènes. Le second fait référence au produit final responsable du phénotype, la protéine. Celle-ci est formée à partir de l'ARNm par le processus de la traduction.

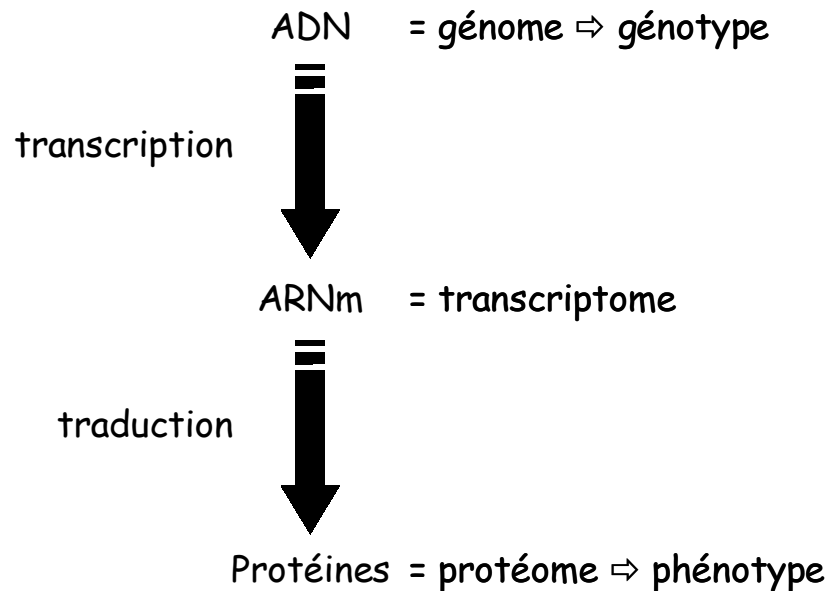


Fig. 17. Schéma des principales étapes de la synthèse des protéines.

Au niveau **transcriptomique**, plusieurs techniques se développent actuellement et commencent à être utilisées dans un domaine comme l'écotoxicologie. Il s'agit notamment de l'utilisation de puces à ADN (*gene array*) (Larkin et al., 2002; Walsh et al., 2003), de la *Differential Display RT-PCR* (DD RT-PCR) (Larkin et al., 2003), ou encore de l'analyse différentielle des transcriptomes par construction de banques soustractives par « *Suppressive PCR Subtractive Hybridization* » (SSH) (Shin et al., 2003)¹. Des techniques telles que le SAGE (« *Serial Analysis of Gene Expression* »), ou le SuperSAGE (Matsumura et al., 2003) commencent

¹ Pour une analyse critique de ces méthodes en écotoxicologie, voir Larkin et al., 2003.

également à être utilisées en écologie et seront certainement bientôt employées en écotoxicologie (Thomas et Klaper, 2004).

1.7.1. La protéomique

Le terme « protéome » fut utilisé pour la première fois en 1995 afin de décrire le complément d'un génome au niveau des protéines (Wasinger et al., 1995). Un an plus tard, Wilkins et al. (1996) définissaient la protéomique comme étant « l'analyse dans son entièreté, du complément exprimé par un génome au niveau des protéines ». Pandey et Mann (2000) ont ensuite complété cette définition : « aujourd'hui, la protéomique couvre la plus grande partie de l'analyse fonctionnelle des produits des gènes, c'est-à-dire de la génomique fonctionnelle ». **L'approche protéomique est globale 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.** A ce titre, elle traduit la dynamique existant au sein des cellules et s'inscrit donc bien dans le domaine de la génomique fonctionnelle (Blackstock et Weir, 1999).

Ainsi, plusieurs notions ressortent de ces définitions. D'abord, la protéomique est associée à la génomique et qualifiée de « complément d'un génome au niveau des protéines ». Bien que des techniques de séparation de protéines couramment utilisées, comme les gels d'électrophorèse en 2 dimensions (2-DE), soient connues depuis longtemps (O'Farrell, 1975), ce n'est qu'avec le développement de projets de séquençage de génomes que la protéomique a émergé. On allait pouvoir étudier les produits finaux de l'expression des gènes, et ce à grande échelle. Cependant, la protéomique n'aurait pas pu sortir de l'ornière sans quelques avancées techniques prépondérantes. Ainsi, la disponibilité commerciale de gradients de pH immobilisés (*Immobilized pH Gradient, IPG*) a considérablement augmenté la résolution et la reproductibilité des gels 2D, permettant la comparaison des résultats obtenus dans différents laboratoires (Görg et al., 2000). Le développement d'outils informatiques a également été crucial afin d'analyser et de comparer des centaines de spots de protéines entre plusieurs gels. Enfin, l'identification de protéines à grande échelle fut rendue possible par le développement de la spectrométrie de masse et par l'impressionnante augmentation du nombre de séquences présentes dans les bases de données informatiques, en libre accès sur internet.

Bien que la protéomique se présente comme un complément exhaustif à la génomique, il est toutefois impossible actuellement d'obtenir une vision d'ensemble tout à fait complète des protéines exprimées dans un tissu déterminé. Par exemple, Cordwell et al. (2000) montrent qu'un maximum de 75% des produits d'un génome peut être visualisé par des gels 2D. De plus, ce résultat n'est accessible qu'en multipliant le nombre de gels pour un même échantillon, ce qui multiplie de la même façon la lourdeur du travail sous-jacent. Plusieurs raisons expliquent pourquoi toutes les protéines exprimées ne peuvent pas être visualisées. Premièrement, les protéines basiques ainsi que les protéines hydrophobes sont difficiles à mettre en solution et à séparer. Deuxièmement, les protéines présentes en faible quantité dans un extrait cellulaire sont souvent invisibles sur un gel, soit parce qu'elles sont en dessous de la limite de détection de la technique de coloration employée, soit parce qu'elles sont cachées par des protéines plus abondantes. L'augmentation du nombre de gels pour une même condition permet d'augmenter leur résolution et ainsi de réduire le risque que plusieurs protéines se confondent au niveau d'un même spot. C'est ce que l'on appelle l'approche sub-protéomique. Celle-ci concerne soit l'utilisation de gammes de pH plus étroites pour la première dimension, soit un pré-fractionnement de l'échantillon selon un gradient de solubilité des protéines, ou en isolant certains organites cellulaires sélectionnés (Cordwell et al., 2000).

Face à ces inconvénients inhérents aux gels 2D est née ce que les spécialistes appellent « la protéomique hors gel ». Il s'agit de séparer les protéines par d'autres techniques avant de les identifier grâce à la spectrométrie de masse. La majorité de ces techniques font appel à des méthodes de type chromatographique et incluent la chromatographie liquide, l'électrophorèse capillaire, la chromatographie électrocinétique capillaire, ou encore une combinaison de ces mécanismes (pour revue, voir Cooper et al., 2004 ; Graham et al., 2005). Ces techniques rencontrent surtout l'objectif d'augmenter la fraction du protéome qu'il est possible d'analyser par rapport à l'électrophorèse 2D classique. Elles sont plus rapides, plus sensibles et à plus large spectre. Ces techniques sont essentiellement de type *bottom-up* (*shotgun*), c'est-à-dire que les protéines doivent être digérées par une enzyme avant que les peptides résultants puissent être séparés (par opposition aux méthodes dites *top-down* qui séparent les protéines avant digestion). Elles ont par conséquent le désavantage de ne pas garder les protéines intactes et permettent de la sorte une moins bonne analyse des modifications post-traductionnelles. De plus, les techniques *bottom-up* ne sont généralement pas quantitatives, ce qui confine la comparaison de protéomes au niveau qualitatif uniquement.

Cependant, une méthodologie de type ICAT (*isotope-coded affinity tags*), couplée à une chromatographie multidimensionnelle, permet de palier à ce dernier inconvénient et semble promise à un bel avenir afin d'étudier les protéines de faible abondance. L'ICAT consiste à marquer deux échantillons différents (correspondant par exemple à un contrôle et un traité) à l'aide d'une molécule se fixant sur les résidus cystéines. Ce réactif est marqué soit par un isotope léger (hydrogène, ^1H), soit par un isotope lourd (deutérium, ^2H) d'un même élément, et est destiné à l'une ou à l'autre condition expérimentale. Après le marquage, les deux échantillons sont combinés, ensuite digérés par la trypsine, avant que les peptides ne soient séparés dans des colonnes de chromatographie (souvent de types affinité avidine-biotine et échangeuse de cations). Les peptides sont ensuite analysés par LC-MS/MS (Gygi et al., 2002 ; Yan et al., 2004). Le spectre résultant représente les peptides associés par paires, l'un correspondant au contrôle et l'autre à l'échantillon traité, et sont éloignés d'une masse égale à la différence de masse entre les deux réactifs ICAT marqués d'isotopes différents. La hauteur des pics pour chaque peptide étant proportionnelle à leur abondance, il est alors possible de déterminer l'abondance relative de chaque protéine dans un échantillon par rapport à un autre. Les développements technologiques actuels permettent de perfectionner de plus en plus ces techniques « hors gel » si bien qu'elles apparaissent comme de sérieux concurrents aux gels 2D. Cependant, leur coût élevé associé à une quantité d'information qui en ressort souvent très importante, en font plutôt des approches complémentaires. Il est sage de sélectionner l'une ou l'autre de ces techniques en fonction de l'étude à mener et des moyens disponibles (Graham et al., 2005).

Par rapport à l'approche transcriptomique, la protéomique présente une série d'avantages. Premièrement, la protéine est le principal élément fonctionnel de la cellule. Elle participe grandement aux processus physiologiques cellulaires, par exemple en tant qu'enzyme. Afin d'interpréter correctement les modifications de l'expression génique, il est donc primordial d'avoir une vue précise des modifications occasionnées au niveau se trouvant le plus en aval, celui de l'expression des protéines. Deuxièmement, avant d'obtenir une protéine fonctionnelle à partir d'un gène, il existe une série d'étapes. A chacune de ces étapes peut exister un mécanisme de régulation, pouvant occasionner une divergence importante entre le niveau de transcription du gène et le niveau d'expression de la protéine correspondante. En conséquence, la quantité du transcrit n'est pas toujours proportionnelle à la quantité de la protéine correspondante. Par exemple, Gygi et al. (1999) ont montré que la corrélation entre les quantités

d'ARNm et de protéines chez la levure était insuffisante pour pouvoir prédire l'expression d'une protéine à partir de la quantité d'ARNm.

En outre, le principe selon lequel « un gène = une protéine » est une simplification de la réalité. En effet, la diversité protéomique d'un organisme eucaryote se manifeste par le nombre de gènes présents, mais également par les épissages alternatifs et les polyadénylations au niveau de l'ARNm, par la diversité des systèmes de régulation de la transcription, par les interactions inter-protéiques, et par les modifications post-traductionnelles (par exemple, les glycosylations et phosphorylations). Par conséquent, un gène peut aboutir à la synthèse de plusieurs protéines différentes. Potentiellement, un génome donné peut aboutir à un nombre quasi infini de protéomes différents.

Signalons également qu'il ne faut pas perdre d'esprit que la quantité d'une protéine présente dans une cellule ne dépend pas uniquement du taux auquel elle est produite. Les principaux facteurs influençant son niveau d'expression sont :

- 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.

Il est donc nécessaire, afin d'obtenir la vision la plus réaliste et la plus fonctionnelle du profil d'expression génique, d'étudier un système à la fois au niveau transcriptomique et au niveau protéomique.

Blackstock et Weir (1999) distinguent deux grandes voies d'application de la protéomique. Premièrement, la détermination de la localisation sub-cellulaire de protéines ainsi que les interactions protéine-protéine, sont étudiées après purification de certains organites ou de complexes protéiques. Cette stratégie est appelée « cartographie cellulaire protéomique », ou encore « **protéomique structurale** ». Deuxièmement, la « **cartographie – ou profil - d'expression des protéines** » (« *Protein-expression mapping – profiling* ») permet d'étudier de manière semi-quantitative les changements globaux de l'expression des protéines dans un

tissu ou un type cellulaire. Elle utilise classiquement les gels 2D afin de séparer les protéines, et un système poussé d'analyse d'image. Cette méthode possède l'avantage de pouvoir déterminer l'abondance relative de plusieurs centaines de protéines et de détecter les modifications post-traductionnelles telles que les glycosylations et les phosphorylations. La spectrométrie de masse permet ensuite d'identifier les protéines d'intérêt. Cette stratégie a ouvert la voie à l'analyse comparative de protéomes (Fig. 18.) provenant par exemple de tissus ou de cellules soumis à des conditions environnementales différentes. C'est cette dernière approche que nous avons suivie dans ce travail.

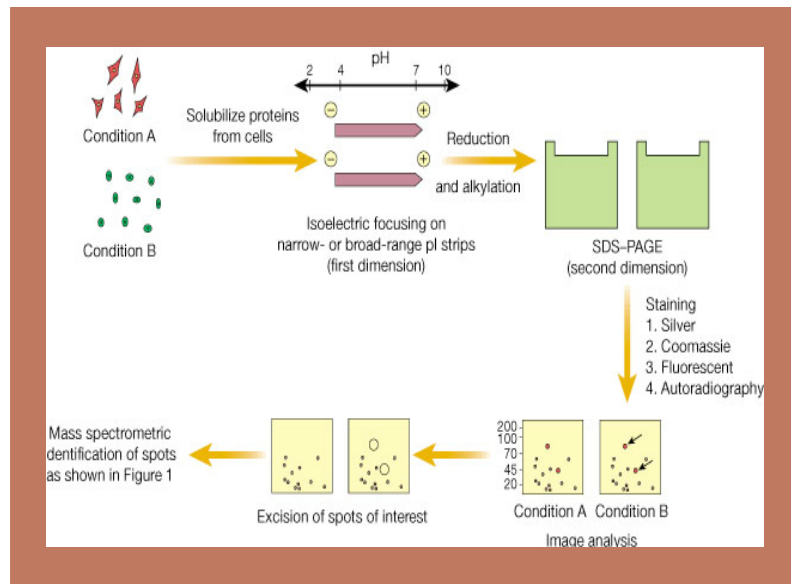


Fig. 18. Différentes étapes d'une étude de protéomique comparative (d'après Pandey et Mann, 2000).

1.7.2. Méthodologie utilisée dans ce travail pour l'analyse protéomique : les gels 2D couplés à la spectrométrie de masse¹

Afin de bien comprendre la portée de ce travail, il est nécessaire de faire un petit rappel technique concernant l'analyse protéomique classique, telle qu'elle fut utilisée ici. Cette analyse nécessite 3 étapes principales: une séparation des protéines, une analyse de leur niveau d'expression, et enfin une identification.

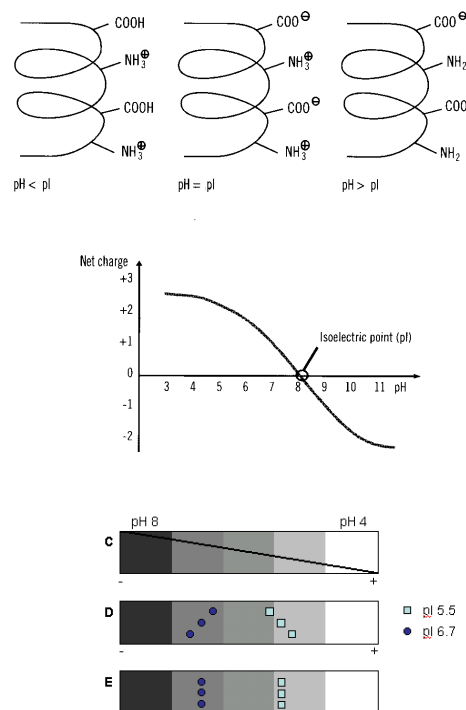


Fig. 26. Focalisation isoélectrique à travers un gradient de pH immobilisé. Les protéines sont chargées positivement lorsqu'elles se trouvent à un pH inférieur à leur point isoélectrique (pI) et négativement lorsqu'elles se trouvent à un pH supérieur à leur pI . Elles s'immobilisent lorsqu'elles se trouvent à un $pH=pI$.

Une solution résultant de l'homogénéisation d'un tissu dans un tampon adéquat, réhydrate une bandelette contenant un gradient immobilisé de pH, d'une étendue pouvant être choisie en fonction des besoins (soit une étendue large permettant de garder un maximum de protéines, mais avec

¹ plusieurs revues existent concernant les techniques utilisées pour l'analyse protéomique : Garin et al., 2001; Graves et Haystead, 2002; Zhu et al., 2003.

une faible résolution – par ex. pH 3-10 –; soit une étendue étroite permettant de se focaliser sur une plus petite fraction des protéines – par ex. pH 4-7). Un courant électrique appliqué sur ces bandelettes fait migrer les protéines en fonction de leur point isoélectrique (pI). En effet, à un pH supérieur à leur pI , les protéines sont chargées négativement et vont migrer vers la borne positive qui se trouve du côté acide (et inversement pour les protéines se situant à un pH inférieur à leur pI). Lorsque les protéines arrivent à un pH qui est égal à leur pI , leurs charges positives et négatives s'annulent, si bien qu'elles arrêtent leur migration. Après cette première dimension, aussi appelée Focalisation isoélectrique (*IEF*), on obtient sur une bandelette, une première séparation des protéines en fonction de leur pI (Fig. 19.)

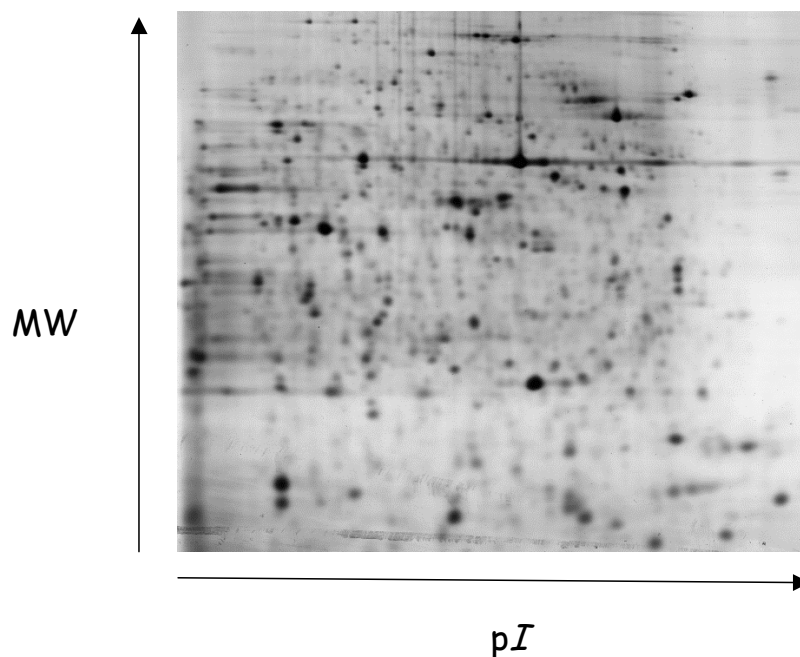


Fig. 20. Gel d'électrophorèse en 2 dimensions. Les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire (MW) et de leur point isoélectrique (pI).

Après avoir équilibré les bandelettes dans un tampon contenant du SDS, du glycérol, du DTT, de l'iodoacétamide et de l'urée, la deuxième

étape consiste à faire migrer les protéines dans un gel de polyacrylamide. Celles-ci vont migrer grâce à l'application d'un courant électrique à travers le réseau de polyacrylamide, et ce d'autant plus facilement que leur masse est faible. Les plus petites vont ainsi se retrouver plus rapidement en bas du gel. Nous aurons donc obtenu une deuxième séparation des protéines, cette fois en fonction de leur poids moléculaire (Fig. 20.).

Une fois que les différents spots de protéines sont révélés, soit au bleu de Coomassie, au nitrate d'argent, ou encore avec des marqueurs fluorescents ou de la [^{35}S]méthionine, les gels sont scannés grâce à un densitomètre. Ce dernier analyse chaque spot de protéine et lui assigne une valeur proportionnelle à sa densité optique calculée sur la surface totale de chaque spot (et appelé volume). Un logiciel informatique se charge alors de superposer différents gels afin de faire coïncider les spots entre eux (*matching*). Cette étape rend possible la comparaison de l'expression des spots de protéines entre différentes conditions, et permet ainsi de procéder à des études de protéomique comparative.

La troisième étape, l'identification des protéines d'intérêt, fait aujourd'hui appel aux techniques de spectrométrie de masse. En résumé, les spots de protéines sont découpés des gels et digérés par une enzyme telle que la trypsine (celle-ci va couper les liaisons peptidiques après une lysine ou une arginine). La solution polypeptidique ainsi obtenue est soit introduite directement dans le spectromètre de masse, soit préalablement passée sur une colonne de chromatographie en phase liquide (*LC*). Les peptides sont ensuite séparés dans le spectromètre en fonction du rapport entre leur masse et leur charge (M/Z). A ce stade, l'identification de la protéine fait l'objet d'un choix entre deux stratégies. La première consiste à obtenir ce que l'on appelle des **cartes de masses peptidiques** (*Peptide Mass Fingerprint*) grâce à un spectromètre de type MALDI-TOF (Fig. 21.). En résumé, les peptides sont séparés dans le spectromètre et aboutissent séparément sur un détecteur. On obtient ainsi un spectre dont chaque pic correspond à un peptide. Comme on sait que la trypsine coupe toujours un polypeptide après les mêmes acides aminés, cela permet de comparer l'ensemble des masses obtenues sur le spectre expérimental avec les masses théoriques des peptides que l'on aurait obtenues en digérant une protéine dont la séquence est connue. Il est évident que cette étape s'effectue grâce à l'aide de techniques informatiques et que la carte peptidique obtenue est rapidement comparée avec toutes les protéines connues dont les séquences sont présentes dans une base de donnée. Cette technique est très utile et relativement rapide lorsqu'il s'agit de rechercher des protéines d'un organisme dont les séquences sont connues, et notamment lorsque le génome est complètement séquencé. Dans ce cas, des recherches dans des

bases de données génomiques spécialisées (par exemple dans le génome de la levure), ou dans des bases de données publiques comme GenBank¹ ou SWISS-PROT/TrEMBL², permettent d'identifier la protéine. Par contre, elle est inutile lorsqu'on travaille sur une espèce peu caractérisée au niveau moléculaire.

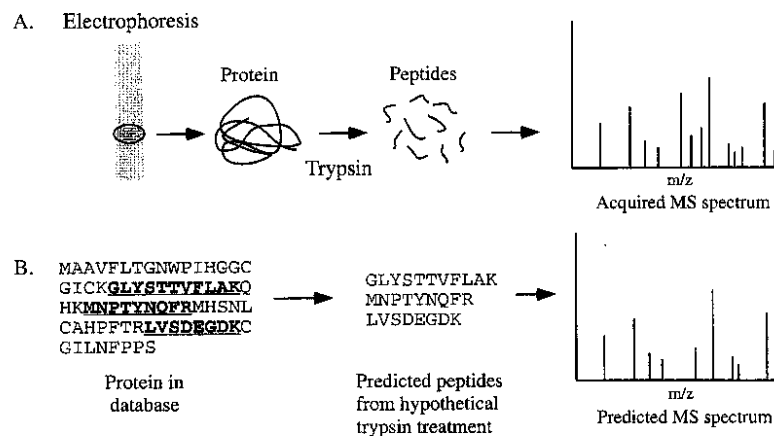


Fig. 21. Identification de protéines grâce aux cartes de masses peptidiques. Les spectres obtenus grâce à un spectromètre de masse de type MALDI-TOF (A) sont comparés avec des spectres théoriques (B) (d'après Graves et Haystead, 2002).

Dans le cas où il existe très peu de séquences connues de l'espèce étudiée (ou d'une espèce phylogénétiquement proche), une stratégie utilisant un spectromètre de type ESI Q-TOF MS/MS est alors envisageable (Fig. 22.). Elle consiste en une première sélection d'un des peptides envoyés dans le spectromètre. Celui-ci est ensuite bombardé par un gaz inerte et coupé en plusieurs fragments. Certains de ces fragments sont coupés exactement à la liaison peptidique. Sur le spectre obtenu, l'écart de masse entre deux fragments coupés au niveau d'une liaison peptidique, permet de connaître avec précision la masse de l'acide aminé qui a été

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

² <http://www.expasy.ch/>

enlevé. Cela permet d'identifier cet acide aminé. De fil en aiguille, on peut de la sorte obtenir une séquence en acides aminés de l'ordre d'une bonne dizaine. Cette séquence est suffisante pour être encodée dans les bases de données et être confrontée à toutes les séquences connues. Si la protéine recherchée a déjà été séquencée pour l'espèce étudiée, alors on retrouvera exactement la bonne séquence. Toutefois, pour des espèces possédant très peu de séquences connues, cette technique permet également une identification. Les logiciels vont alors travailler par homologie et par recherche de similarité entre la séquence obtenue expérimentalement et toutes les séquences de la base de données provenant d'autres espèces. Si l'on possède des séquences en acides aminés suffisamment longues, et si la protéine est suffisamment conservée à travers les espèces, il y a alors une grande chance de pouvoir l'identifier. C'est cette dernière méthodologie que nous avons employé dans ce travail.

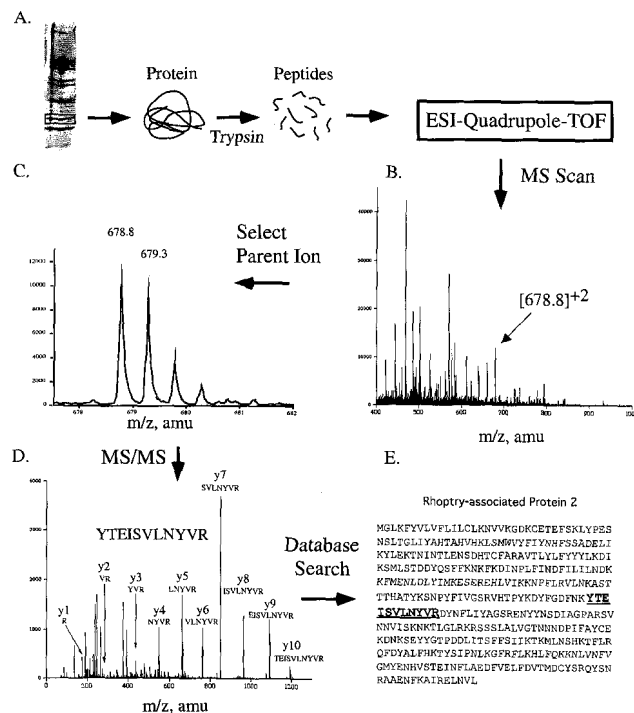


Fig. 22. Identification de protéines par ESI Q-TOF MS/MS. (A) Une protéine est isolée à partir d'un gel d'électrophorèse, et ensuite digérée avec de la trypsine. Les peptides résultants sont ionisés par l'électrospray et analysés par un spectromètre de masse de type quadrupole-TOF. (B) Un ion "parent" est sélectionné (ici 678.8) pour la fragmentation. (C) un élargissement de l'ion sélectionné montre la multiplicité des pics provoquée par la présence d'isotopes ¹³C. Une différence de masse entre les pics de 0.5 Da indique que le peptide est doublement chargé. (D) Spectre MS/MS de l'ion "parent" montrant les ions produits suite à la fragmentation. Les écarts de masse entre des ions y successifs correspondent à un acide aminé. (E) Identification de la protéine par comparaison de séquences avec les bases de données (d'après Graves et Haystead, 2002).

1.7.3. L'analyse protéomique en écotoxicologie aquatique

Au terme de ce bref aperçu de l'analyse protéomique, il est aisé de comprendre que ses principaux acquis concernent le domaine biomédical. Elle permet notamment l'identification de biomarqueurs pour certaines maladies, la mise en évidence des interactions entre protéines dans les processus pathologiques, ou encore la découverte de nouveaux médicaments (Walgren et Thompson, 2004; Hanash, 2003). L'utilisation d'espèces modèles, pour lesquelles un grand nombre de séquences peptidiques et nucléotidiques sont accessibles, permet à l'analyse protéomique d'atteindre un haut rendement d'identification de protéines. Par contre, les études se rapportant à des organismes peu caractérisés au niveau moléculaire sont plus rares. Ce chapitre a pour objectif de synthétiser les études écotoxicologiques utilisant l'approche protéomique (telle que nous l'avons définie dans cette section) sur des organismes avec peu de séquences connues, mais qui sont plus pertinents au niveau écologique (tableau 3.). **L'objectif général de ce type d'étude est de mettre en évidence des profils d'expression de protéines induits suite à l'exposition à un xénobiotique donné.** Il permet ainsi de caractériser au niveau protéomique, les modifications occasionnées par ce polluant. De telles études peuvent être placées sous le vocable de « **toxicoprotéomique** ».

La première étude utilisant l'approche protéomique sur un organisme aquatique fut publiée en 1996. Elle utilisait comme modèle des cellules épithéliales d'un poisson Gobiidae, le *Gillichthys mirabilis*, après que celui-ci ait subi un stress osmotique ou thermique. Les auteurs ont mis en évidence plusieurs spots de protéines présentant une variation de leur expression en fonction de l'agent stressant (Kültz et Somero, 1996). Ce n'est que 4 ans plus tard que la première étude toxicoprotéomique sur un organisme aquatique fut publiée. Shepard et al. (2000) ont mis en évidence des « **Signatures d'Expression Protéique** » (SEP) sur des moules *Mytilus edulis* exposées pendant 7 jours à du Cu, des PCBs, ou encore à une faible salinité. Ils montrèrent l'existence de profils d'expression protéique différents suivant les conditions environnementales. Dans le même ordre d'idées, une autre étude montra que deux perturbateurs endocriniens (le 17 β -oestradiol et le 4-nonylphénol) induisaient, sur des embryons de poissons zèbres *Danio rerio*, des SEPs qui leur étaient spécifiques (Shrader et al., 2003).

La réponse à un xénobiotique au niveau protéomique semble également dépendre de la concentration utilisée. Ainsi, Shepard et Bradley (2000) ont montré qu'une exposition à des concentrations croissantes en Cu pendant 24 h, induisait des SEPs dans les branchies de moules, qui étaient spécifiques à la concentration utilisée. Dans ce même article, les auteurs ont également comparé les SEPs obtenues avec un biomarqueur d'exposition classique, la stabilité lysosomale. Ils ont remarqué que des modifications du profil d'expression protéique étaient observables à une concentration en Cu à laquelle la stabilité lysosomale n'était pas affectée. Ils ont conclu en une plus grande sensibilité des SEPs. Une étude comparable sur des huîtres a également montré l'induction de SEPs spécifiques en fonction de concentrations croissantes en Zn (Meiller et Bradley, 2002).

Quelques conclusions préliminaires peuvent être tirées de ces premières études. D'abord, il ressort clairement que l'exposition d'un organisme aquatique à un xénobiotique peut induire une modification de l'expression des protéines. Nous ne pouvons pas savoir à ce stade à quel niveau l'expression est régulée. En effet, rien ne prouve que le gène correspondant est davantage transcrit. Il se peut également qu'il y ait une augmentation/diminution de la dégradation de la protéine. Afin de compléter ces données, des études visant le transcriptome sont nécessaires. Ces premières études ont également montré que différents polluants tels qu'un métal et un PCB, ou encore différents perturbateurs endocriniens, pouvaient induire différentes SEPs. Cette observation ouvre la voie à l'utilisation de l'approche protéomique afin de comprendre les mécanismes d'action propres à différents polluants. La concentration du xénobiotique est également importante puisqu'une SEP spécifique est induite en comparaison à d'autres concentrations du même xénobiotique. Enfin, la réponse cellulaire au niveau protéomique d'un organisme aquatique exposé à un xénobiotique, semble être sensible. A ce titre, le suivi de SEPs sur des organismes prélevés dans l'environnement pourrait être envisagé en tant que biomarqueur précoce reflétant l'exposition passée ou présente à un xénobiotique.

Un autre article publié en 2002 (Bradley et al., 2002) montre que des SEPs obtenues en laboratoire sur des truites *O. mykiss* exposées à 3 perturbateurs endocriniens (nonylphénol, diazinon et propetamphos) se retrouvent en partie sur des animaux exposés à des eaux usées comprenant une mixture de ces substances. Cela démontre la possibilité d'utiliser les SEPs sur des animaux prélevés dans leur environnement naturel et soumis à des polluants.

D'autres techniques que celle décrite dans ce travail ont également été utilisées afin d'étudier les modifications au niveau protéomique induites par un xénobiotique sur un organisme aquatique. Ainsi, l'analyse SELDI (*Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation*) est une alternative aux gels 2D puisque les protéines ne sont plus séparées sur un gel mais interagissent avec une matrice sélectionnée pour ses caractéristiques d'affinité avec les protéines. La spectrométrie de masse permet ensuite de comparer l'abondance de plusieurs centaines de protéines entre plusieurs conditions (Merchant et Weinberger, 2000). Cette technique est donc tout à fait envisageable afin de déterminer des SEPs pouvant être utilisées en tant que biomarqueurs. De la sorte, Hogstrand et al. (2002) ont mis en évidence plusieurs protéines différemment régulées sur des truites exposées à du Zn.

Toutefois, ces études n'ont pas permis l'identification de la moindre protéine et se sont « contentées » de fournir des SEPs. Cela traduit la difficulté d'obtenir des identifications sur des organismes non-modèles. A notre connaissance, les seules publications utilisant l'approche protéomique complète, y compris la spectrométrie de masse pour l'identification des protéines, sur des organismes aquatiques, n'appartiennent pas au domaine de l'écotoxicologie. Ainsi, López et al. (2001) ont réussi à identifier 3 protéines, la HSP70, la myosine et l'actine, comme étant différemment exprimées sur des moules prélevées dans l'environnement naturel par rapport à d'autres individus élevés en captivité. Martin et al. (2003) ont pu quant à eux identifier 17 protéines dont l'expression était modifiée dans le foie de truites nourries avec différents types d'aliments. Ils ont toutefois pu bénéficier d'une base de donnée de séquences nucléotidiques EST (*Expressed Sequence Tags*) (Lisacek et al., 2001) pour les salmonidés, de 108 000 entrées (en janvier 2003), rendant de la sorte les identifications plus faciles. Enfin, López et al. (2002) ont identifié 15 protéines différemment exprimées chez 2 espèces de moules (*M. edulis* et *M. galloprovincialis*).

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.

Tableau 3. Etudes utilisant l'analyse protéomique en écologie aquatique sur des organismes non-modèles (voir le texte pour plus de détails).

année	auteurs	tissus	conditions expérimentales	résultats
1996	Kultz et Somero	cellules épithéliales de branchies d'un <i>Gobiidae</i>	acclimations (2 mois) thermiques et osmotiques	5 spots dépendant de la T°; 9 spots dépendant de l'osmolarité
2000	Shepard et al.	moules entières	Cu, PCBs, faible salinité (7 jours)	les 3 stress produisent 3 différentes SEPs
2000	Shepard et Bradley	branchies de moules	concentrations croissantes en Cu (24h)	différentes SEPs en fonction de la concentration 13 spots spécifiques à plusieurs concentrations plus sensible que la stabilité lysosomale
2001	López et al.	pieds de moules	moules sauvages et en culture	45 spots différents identification par MS de HSP70, myosine, actine
2002	Meiller et Bradley	branchies d'huîtres	concentrations croissantes en Zn (48h)	différentes SEPs en fonction de la concentration 7 spots spécifiques à plusieurs concentrations
2002	Bradley et al.	truites (?)	3 perturbateurs endocriniens (21 jours) et eaux usées	une partie des SEPs obtenues en labo se retrouvent en eaux usées
2002	Hogstrand et al.	branchies de truites	effet du Zn (6 jours)	22 protéines différentes par SELDI
2002	López et al.	pieds de moules	comparaisons entre <i>M. edulis</i> et <i>M. galloprovincialis</i>	15 protéines dont l'expression est différente ont été identifiées
2003	Martin et al.	foies de truites	différents types d'aliments	17 protéines dont l'expression est modifiée ont été identifiées
2003	Shrader et al.	embryons de poissons zèbres	effets de 2 perturbateurs endocriniens (17bêta-oestradiol et 4-nonylphénol)	différentes SEPs en fonction du xénobiotique

2. OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les activités humaines sont responsables du déversement d'un grand nombre de xénobiotiques dans l'environnement. Même si les scientifiques se sont penchés depuis de nombreuses années sur les effets que ces substances pouvaient avoir sur l'état de santé des organismes vivants (y compris l'homme), nous sommes loin de pouvoir évaluer toutes les conséquences qu'un contact avec un ou plusieurs xénobiotiques pourrait avoir sur la survie des espèces et sur la pérennité des écosystèmes. C'est notamment le cas lorsque des populations (ou communautés) sont en contact prolongé avec des quantités relativement faibles de polluants (exposition chronique diffuse).

Notre travail s'inscrit dans cette problématique. **Son objectif général est d'étudier de manière intégrative, les réponses au stress induites par différents types d'exposition (aiguë ou chronique) à un xénobiotique métallique, le cadmium, chez un crustacé décapode euryhalin pris comme modèle, le crabe chinois *Eriocheir sinensis*.**

Le cadmium est un métal non-essentiel, très toxique, et largement répandu dans l'environnement aquatique (voir chapitre 1.5). Même si beaucoup d'études ont déjà traité de ce métal, un travail non négligeable reste encore à faire concernant la compréhension des mécanismes sous-jacents aux effets occasionnés par une exposition chronique. De plus, comme le Cd est un sous-produit de différentes activités humaines et se retrouve également de manière naturelle dans l'environnement, les organismes seront encore en contact avec ce métal pendant de longues années. Affiner notre compréhension des modes d'action du Cd et des modes de défense des organismes restera certainement longtemps d'actualité.

Le choix du crabe chinois comme modèle expérimental peut paraître atypique mais se justifie amplement. Premièrement, nous voulions travailler sur un organisme pris dans son entièreté et non sur un modèle cellulaire. Même si ces derniers offrent l'avantage de simplifier les réponses biologiques observables et d'obtenir un plus grand nombre de données suite, par exemple, à une analyse de type protéomique, le niveau d'intégration organismique reflète davantage la réalité des préoccupations écotoxicologiques. Les réponses observées résultent alors de régulations diverses provenant de plusieurs niveaux d'intégration. Deuxièmement, pour des raisons comparables de pertinence écologique, nous voulions nous focaliser sur un organisme que l'on retrouve effectivement dans nos rivières, qui est en plus au cœur des préoccupations des gestionnaires en sa qualité d'espèce invasive, plutôt que sur un modèle de laboratoire tel que le rat. Troisièmement, nous avons décidé de nous concentrer prioritairement

sur une fonction essentielle à la survie de tout organisme aquatique : l'osmorégulation. En effet, cette fonction semble être une des principales cibles du Cd sans toutefois que l'on puisse en expliquer complètement les raisons (voir chapitre 1.5.1). Le crabe chinois est un modèle expérimental largement utilisé pour la compréhension des mécanismes d'osmorégulation (voir chapitre 1.6.2). L'adulte peut en effet aussi bien vivre en eau douce qu'en eau salée. De plus, les branchies sont largement impliquées dans l'osmorégulation puisqu'elles interviennent afin de compenser les pertes ioniques en eau douce. Cependant, seules les trois paires de branchies postérieures sont dites « osmorégulatrices », alors que les branchies antérieures sont qualifiées de « respiratoires ». En utilisant les branchies en tant que modèles expérimentaux, nous pouvons ainsi comparer les effets du Cd sur un organe impliqué dans le transport actif d'ions et sur un organe qui ne l'est pas. Pour toutes ces raisons, le crabe chinois se révèle être un modèle expérimental de premier choix afin de mener à bien notre objectif général.

Nous avons défini des conditions expérimentales à la fois les plus réalistes possibles en comparaison avec les conditions naturelles, et à la fois réalisables d'un point de vue pratique, en connaissant les impératifs de maintenance que nécessite une exposition chronique de crabes chinois. En effet, ces organismes ne peuvent à ce jour être maintenus plus de 4 ou 5 mois dans nos laboratoires, ce qui rend impossible des expositions plus longues. Ainsi, comme conditions d'exposition dite « aiguë », nous avons choisi des gammes de temps variant de 1 à 7 jours, étant bien conscients que ce choix est arbitraire. En effet, en fonction de l'espèce étudiée (et de son espérance de vie), le terme aigu pourra traduire une exposition de plusieurs jours ou seulement de plusieurs heures. La même remarque peut être avancée pour les expositions dites « chroniques ». Pour fixer ces dernières, nous sommes partis d'une des conditions aiguës ($500 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ pendant 3 jours) pour laquelle nous avons réduit de 10 fois la concentration en Cd, mais augmenté de 10 fois la durée d'exposition. Cela nous amenait à une exposition à $50 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ pendant 30 jours. Les termes « aigu » et « chronique » employés tout au long de ce travail se réfèrent donc à ces conditions, et sont à comprendre en les comparant l'un par rapport à l'autre.

Au vu des concentrations en Cd généralement retrouvées dans les eaux douces naturelles (voir chapitre 1.5), celles utilisées dans ce travail peuvent paraître élevées. Cependant, elles se justifient de deux façons. Premièrement, comme cité plus haut, maintenir des crabes chinois en captivité sur une longue période est difficile. Cela aurait augmenté le risque de résultats biaisés (trop de morts, animaux en mauvaise santé,...). Ainsi, pendant les expositions dites chroniques, aucune observation traduisant un mauvais état de santé des crabes n'a pu être réalisée. Nous avons par

conséquent préféré réduire le temps d'exposition par rapport à ce qui peut être rencontré en condition naturelle, mais augmenter la concentration utilisée. Il est cependant évident que les réponses observées sous cette condition ne sont pas forcément les mêmes que si nous avions, par exemple, tenté de maintenir des animaux 10 fois plus longtemps (300 jours) avec une concentration 10 fois plus faible ($5 \mu\text{g Cd l}^{-1}$). Il faut rester tout à fait conscient de cette limite. Deuxièmement, il ne faut pas oublier que des concentrations de $50 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ ne sont pas tout à fait irréalistes. Même si elles dépassent largement ce qui est rencontré dans nos rivières, elles sont du même ordre de grandeur que ce qui peut être rencontré dans des cours d'eau très fortement pollués. Nous pouvons donc assimiler nos conditions expérimentales dites « chroniques » comme reflétant une situation plausible mais concernant un niveau de pollution très élevé.

Nous pouvons à présent subdiviser ce travail en plusieurs **objectifs spécifiques**. Le premier (voir chapitre 3) est en quelque sorte un objectif préliminaire. **Il s'agit d'aborder le passage du Cd à travers l'épithélium branchial**. Avant d'aller plus loin dans l'étude des mécanismes d'action du métal, il nous est en effet apparu prioritaire d'obtenir des données quant au passage du Cd à travers les branchies. Il semble en effet que la branchie soit le principal chemin d'entrée du Cd dissous dans l'eau, chez les crustacés décapodes. Cette étude préliminaire apportera d'importantes informations lorsqu'il s'agira d'interpréter les différents résultats obtenus sur les deux types de branchies.

Le deuxième objectif spécifique (voir chapitre 4) est **d'étudier les effets du Cd sur l'osmorégulation du crabe chinois acclimaté à l'eau douce ou à l'eau de mer**. Des expositions aiguës (pendant maximum 7 jours) seront comparées à des expositions chroniques (pendant 30 jours). Cet objectif sera abordé à différents niveaux :

- au niveau **physiologique** organismique, c'est-à-dire à un niveau d'intégration élevé. L'objectif est de suivre les concentrations ioniques et l'osmolalité de l'hémolymphe.
- Au niveau **morphologique**. Il s'agit ici d'observer d'éventuelles modifications morphologiques et ultrastructurales des branchies.
- Au niveau **biochimique**. Différentes activités enzymatiques (Na^+/K^+ -ATPase, cytochrome c oxydase) seront mesurées dans les branchies.

Un troisième objectif spécifique est abordé dans le même chapitre : **savoir si une exposition chronique préalable peut induire une résistance accrue à une exposition aiguë qui serait autrement délétère. En d'autres termes, le crabe chinois peut-il s'acclimater au Cd pendant une exposition chronique ?**

L'objectif spécifique numéro quatre, qui en découle, est de **mettre en évidence les réponses biologiques qui prennent place pendant une exposition chronique au Cd et qui pourraient permettre une meilleure résistance.**

Afin de répondre à l'objectif spécifique numéro 4, le chapitre 5 analyse l'accumulation du Cd dans les différents tissus du crabe chinois et tente de répondre à la question de savoir si une exposition chronique peut modifier l'accumulation du métal dans certains organes. C'est dans ce chapitre que nous examinerons également un éventuel rôle joué par les métallothionéines dans la séquestration du Cd.

Toujours dans le même but, le chapitre 6 tente de savoir si les protéines de stress HSP70 sont induites dans les branchies du crabe chinois suite à une exposition au Cd, ce qui pourrait indiquer la mise en place d'un mécanisme de défense protégeant les protéines contre une dénaturation.

Enfin, et c'est peut-être dans ce dernier chapitre (7) que réside la plus grande originalité de notre travail, nous utilisons l'analyse protéomique sans *a priori* afin de mettre en évidence une éventuelle modification de l'expression des protéines dans les branchies du crabe chinois suite à une exposition aiguë ou chronique au Cd. Le principal objectif est ici d'identifier des protéines sur- ou sous-exprimées suite à une exposition chronique. Ces résultats pourront refléter des modifications profondes de la physiologie branchiale au niveau de ce que nous avons appelé la génomique fonctionnelle (voir chapitre 1.7). Un sous-objectif est de démontrer l'intérêt et l'applicabilité d'une telle approche à un organisme non-modèle (au niveau moléculaire) mais cependant pertinent au niveau écologique.

3. PASSAGE DU CD À TRAVERS

LES BRANCHIES

3.1. Résumé

Avant d'aborder l'important chapitre consacré aux effets du Cd sur l'osmorégulation du crabe chinois, il nous est apparu important de mener une étude préalable afin d'évaluer le passage du Cd à travers les deux types de branchies. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique de perfusion de branchies comme illustrée au chapitre 10.2. Seul le flux entrant de Cd a été étudié ainsi que son accumulation dans les branchies à la fin des perfusions. D'éventuels flux sortants n'ont pas été examinés.

Après avoir sacrifié des crabes préalablement acclimatés à de l'eau douce (2 mOsm kg^{-1}) ou de l'eau salée (815 mOsm kg^{-1}), les branchies antérieures et postérieures ont été isolées et perfusées à l'aide d'une solution reflétant la composition ionique du milieu interne de l'animal. Du Cd a été ajouté sous forme de CdCl_2 dans le milieu dans lequel baignaient les branchies et correspondant au milieu externe (OUT). La concentration finale de Cd dans le milieu OUT était de $4,8 \mu\text{M}$, soit $540 \mu\text{g Cd l}^{-1}$. Le flux de Cd entrant (*influx*) dans le milieu interne du crabe (IN – correspondant à l'hémolymph), a été évalué grâce à l'isotope ^{109}Cd ajouté dans le milieu OUT. La radioactivité retrouvée dans le milieu IN a été mesurée toutes les 20 min pendant 3 h grâce à un compteur à scintillation de type bêta. De la même manière, l'accumulation de Cd dans les branchies a été évaluée grâce à la radioactivité présente dans les organes après 3 h de perfusion.

Le premier résultat important est le suivant : aucun flux entrant de Cd à travers les branchies postérieures n'a été observé, quel que soit le milieu d'acclimatation des crabes et quelle que soit la composition des milieux IN et OUT. Pour des crabes acclimatés à de l'eau douce, le flux entrant était inférieur à la limite de détection calculée comme étant égale à $0,07 \text{ nmol}$ ($7,9 \text{ ng}$) Cd g^{-1} de poids frais (p.f.). Par contre, un flux entrant compris entre $0,15$ et $6,82 \text{ nmol}$ ($16,9$ et 767 ng) Cd g^{-1} p.f. a été mesuré à travers les branchies antérieures. Pour ce type de branchies, et pour des animaux acclimatés à de l'eau douce, un niveau basal de flux entrant équivalent à $0,17 \pm 0,10 \text{ nmol}$ ($19,1 \text{ ng}$) Cd g^{-1} p.f. a augmenté d'un facteur 40 lorsque les milieux IN et OUT ont été préparés sans ajout de calcium. Par contre, en remplaçant le Na^+ IN par du chlorure de choline (dans un milieu sans Ca), le flux entrant de Cd a chuté de 46 X. Lorsque des branchies antérieures provenant d'animaux acclimatés à de l'eau salée ont été perfusées, le flux entrant de Cd a diminué d'un facteur 21 en

comparaison à des branchies provenant d'organismes acclimatés à de l'eau douce.

D'autre part, après 3 h de perfusion, les deux types de branchies ont accumulé du Cd. Dans les branchies antérieures, les concentrations en Cd étaient comprises entre 3,8 et 68 nmol (427 et 7643 ng) Cd g⁻¹ p.f., alors qu'elles étaient comprises entre 2,1 et 39 nmol (236 et 4384 ng) Cd g⁻¹ p.f. dans les branchies postérieures. Cette accumulation représente un pourcentage compris entre 61,3 et 100% du total du Cd ayant pénétré dans les branchies (Cd accumulé dans les branchies + Cd entré dans le compartiment interne).

Ces résultats montrent que le Cd passe plus facilement à travers l'épithélium de type « respiratoire » localisé dans les branchies antérieures, qu'à travers l'épithélium de type « osmorégulateur » localisé dans les branchies postérieures. Ce flux entrant emploie probablement certaines voies de passage communes avec le Ca, comme des canaux Ca²⁺, des échangeurs Ca²⁺/Na⁺, ou des Ca²⁺ATPases. Toutefois, la caractérisation précise de ces transporteurs de Ca reste à faire dans les branchies du crabe chinois. La dépendance du flux entrant de Cd vis-à-vis du Na⁺ va dans le sens d'une entrée du Cd via l'échangeur Ca²⁺/Na⁺. D'autre part, nous avons montré que la majeure partie du Cd pris par les branchies s'accumulait à l'intérieur de celles-ci, antérieures comme postérieures. Des études ultérieures devraient tenter de comprendre comment le Cd est séquestré dans ces tissus. Nous suggérons toutefois que la cuticule, moins perméable aux cations dans les branchies postérieures, puisse séquestrer en partie le Cd et l'empêcher ainsi de pénétrer dans l'hémolymph.

3.2. Publication 1 : Uptake of cadmium through isolated perfused gills of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*.

F. Silvestre, G. Trausch, A. Péqueux, P. Devos.

Comparative Biochemistry and Physiology Part A 137 (2004) 189-196.

Abstract

Using the perfusion method, we compared cadmium accumulation and influx across the gills of the euryhaline Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*, exposed to 4.8 μM cadmium in the incubation medium (OUT). Cadmium influx was not observed across posterior gills while it ranged from 0.15 to 6.82 nmoles Cd g⁻¹ gill w.w. h⁻¹ across anterior ones. For these respiratory gills, a strong increase (40 times) was observed when calcium was removed in both incubation and perfusion media while the lack of sodium in the perfusion medium resulted in a 46 times decrease. For crabs acclimated 15 days to artificial seawater, cadmium influx across anterior gills showed a 21 times decrease when compared with freshwater acclimated ones. On the other hand, after 3 hours of perfusion, we detected cadmium accumulation in both types of gills, ranging from 3.8 to 68 nmoles Cd g⁻¹ gill w.w. in anterior gills and from 2.1 to 39 nmoles Cd g⁻¹ gill w.w. in posterior ones. Such accumulations represent between 61.3 and 100 % of the total uptake of cadmium through the gills. From these results, we suggest that cadmium can penetrate more easily into the hemolymph space through the "respiratory" type epithelium present in the anterior gills but absent in the posterior ones. This metal uptake is likely to occur at least in part through the same pathways as calcium. On the contrary, cadmium seems to be sequestered inside the posterior gills, perhaps in the cuticle of the salt-transporting type epithelium.

Keywords: cadmium; *Eriocheir sinensis*; gill perfusion; metal uptake; metal accumulation; calcium regulation; osmoregulation; cuticle; gill epithelium ultrastructure.

Introduction

As a major pollutant, cadmium can penetrate into organisms and create adverse effects (Thurberg et al., 1973; Bjerregaard and Vislie, 1985; Zyadah and Abdel-Baky, 2000). Although some studies have focused on its uptake and accumulation in aquatic organisms (Rainbow, 1995; Rainbow, 1997b), we are still far from having a complete understanding of the exact mechanisms involved in this process. In crustaceans, cadmium uptake from water occurs mainly through the gill epithelium (Jennings and Rainbow, 1979; Rainbow, 1997a). If the most obvious parameter controlling cadmium uptake is its own concentration in water, there is also a well documented role of salinity: the uptake, accumulation and toxicity of cadmium increase when the salinity of the water decreases (Wright, 1977b; Frank and Robertson, 1979; Hall and Anderson, 1995). This effect can be at least partially explained by cadmium speciation: in dilute water, the free metal ion, the bioavailable form, is the most common one due to a decrease of chloride ion concentration (Sunda et al., 1978; Gutknecht, 1983). In addition, it has been shown for a long time that accumulation and uptake of cadmium depends on the water calcium concentration. Usually, the more calcium is present in the external medium, the less cadmium accumulates (Wright, 1977a; Pärt et al., 1985). Ca^{2+} and Cd^{2+} have equal charges, similar ionic radii (Cd^{2+} : 0.96 Å, Ca^{2+} : 0.99 Å) and similar number of electrons in the outer shell. So, it has been suggested that cadmium is transported through membranes via, at least in part, the same uptake mechanisms as calcium such as Ca^{2+} channels, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers or Ca^{2+} ATPases (Pärt et al., 1985; Verbost et al., 1989; Bjerregaard and Depledge, 1994).

Physiological process, as for instance osmoregulation, modulate also metals uptake (Rainbow and Kwan, 1995; Rainbow, 1997a; Roast et al., 2001). Wildgust and Jones (1998) demonstrated that cadmium toxicity was lower near the isosmotic point in the extremely efficient hyper-hypo-osmoregulator *Neomysis integer*. Authors concluded that reduced ionic exchange decreased metal uptake and toxicity. In the same order of idea, Rainbow et al. (1993) showed that the amphipoda *Orchestia gammarellus* accumulates more cadmium when its surrounding salinity decreases down to 25 ‰ and curiously accumulates less when salinity is further decreased to 15 ‰. This effect appears as contradictory when considering the speciation of cadmium alone, but is explainable when considering osmoregulatory processes affecting the metal uptake.

Gills perfusion is a well-adapted technique to study the uptake of cadmium from the surrounding medium and to better understand their characteristics. It has successfully been used with *Carcinus sp.* by several

authors (Lucu and Obersnel, 1996; Pedersen and Bjerregaard, 1995; 2000). The purpose of the present study was to compare cadmium influx across perfused anterior and posterior gills of the strong euryhaline Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, and to investigate its accumulation in gills during perfusion. This species exhibits strong osmoregulatory capabilities with posterior gills actively involved in ions uptake and anterior ones considered as only respiratory with only passive movements of Na^+ (Péqueux and Gilles, 1981; Gilles et al., 1988). These physiological characteristics make the Chinese crab gills an efficient comparative model to better understand metal uptake characteristics.

Materials and methods

Experimental animals

Chinese mitten crabs, *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards 1854) (Crustacea, Decapoda) were caught in freshwater lakes near Emden (Germany) in spring and autumn 2001, and kept in circulating freshwater (FW) (2 mOsm/kg; 64 mg Ca^{2+} /l) tanks at 15°C for at least 1 week. Some of them were acclimated to artificial seawater (SW) (815 mOsm/kg, Instant Ocean[®] synthetic sea salt, Aquarium Systems Inc., Mentor, USA) for 15 days before experiments.

Perfusion procedure

Anterior and posterior gills were perfused following procedures described by Péqueux and Gilles (1981). Gills were cut free of their insertion after the crab had been killed and the carapace removed. A polyethylene tube was inserted in the afferent vessel and gills were perfused with crab Ringer solution (CRS) for 5 seconds to prevent clotting. CRS composition was (mM): NaCl, 240; KCl, 5; MgCl_2 , 5; CaCl_2 , 12.5; H_3BO_3 , 8.8.; pH: 7.6. Thereafter, a second tube was inserted in the efferent vessel and both were fastened to the gill by means of a small Plexiglas clamp. The preparation was then immersed in a perfusion chamber filled with 25 ml of the incubation solution (OUT) and perfused with the perfusion solution (IN) at an efferent outflow rate averaging 0.64 ± 0.17 ml/min. The perfusion chamber level was monitored during all the time of the perfusion and gills with leaks were automatically discarded. Anterior

and posterior gills from FW acclimated crabs were perfused with CRS IN and OUT or with CRS without added calcium IN and OUT (Ca-free CRS). Some anterior gills from FW acclimated crabs were perfused with Ca-free CRS OUT and with Ca-free CRS without added sodium IN (Ca and Na-free CRS). In this latter solution, sodium chloride was replaced by choline chloride ($C_5H_{14}NO \cdot Cl$, 240mM). The transepithelial electrical potential (TEP) difference was measured by means of two $Ag^+/AgCl$ electrodes (Metrohm, Switzerland) during at least 30 minutes until stabilization.

Influx experiments

After stabilization of the TEP difference, the incubation solution was replaced by the same CRS plus $CdCl_2$ (Sigma-Aldrich, ST. Quentin Fallavier, France) and $^{109}Cd^{2+}$ (0.25 $\mu Ci/ml$) (NEN Life Science Products, Boston, USA) at a total concentration of 4.8 μM . Perfusate samples (0.5 ml) were collected every 20 min during 3 hours. Radioactivity was then measured using a β scintillation counter (LS 6000IC, Beckman) after addition of 4 ml of AqualumaTM. Cadmium influxes are expressed as nmoles Cd^{2+} entered per gram gill wet weight per hour (nmoles $Cd\ g^{-1}\ gill\ w.w.\ h^{-1}$). A mean influx rate was calculated for each gill between the second and the third hour of perfusion. For each perfusion, we calculated a detection limit (DL) in relation to the background radioactivity, with the formula : $DL = \text{mean of 10 blanks} + 2 \times SD \text{ of the blanks}$. If the influx value was lower than the DL, we used $DL/2$ to calculate the means. At the end of the perfusion experiment, gills were rinsed three times for 30 s with CRS containing $CdCl_2$ 4.8 μM but without $^{109}Cd^{2+}$, and radioactivity was measured. Cadmium concentrations are expressed in nmoles per gram gill wet weight (nmoles $g^{-1}\ gill\ w.w.$). Data are expressed as means $\pm$ S.D. of n different gills coming from at least three different crabs for each condition. Unpaired *t*-test was used to compare the mean values. Statistical significance was taken when $p < 0.05$.

We calculated the percentage of total cadmium uptake by the gill during 3 hours of perfusion that was transferred into the internal circulatory system using these formulas :

Total Cd uptake = Cd reaching the internal medium + Cd accumulated inside the gill tissue

Percentage of total Cd uptake that reach the internal medium = $\frac{\{(Cd\ in\ the\ internal\ medium)\}}{\{(Cd\ accumulated\ in\ the\ gill + Cd\ in\ the\ internal\ medium)\}} \times 100$

Results

Cadmium influx across anterior gills exposed to 4.8 μM cadmium in crab Ringer solution, averages 0.17 ± 0.10 nmoles Cd g^{-1} gill w.w. h^{-1} . By comparison, it always remains below the detection limit across posterior gills exposed to the same conditions (Table 1). When we compare cadmium influx across anterior gills perfused with CRS containing calcium IN and

Table 1.

E. sinensis. Average cadmium influx (nmoles Cd g^{-1} gill w.w. h^{-1}) across perfused anterior and posterior gills of freshwater acclimated crabs. CRS containing cadmium 4.8 μM OUT.

Anterior gills (n=5)	Posterior gills (n=5)
0.17 ± 0.10	< 0.07

Mean $\pm$ S.D. of n experiments

OUT on the one hand, and without added calcium IN and OUT on the other hand, it strongly increases in the latter condition and averages 6.8 ± 3.3 nmoles Cd g^{-1} gill w.w. h^{-1} (Fig. 1). In posterior gills, even without added calcium, we never detect any cadmium influx (DL of 0.11 nmoles Cd g^{-1} gill w.w. h^{-1}) (results not shown). We can also note on Fig. 2. that, in the absence of sodium in the perfusion medium, the cadmium influx is 46 times

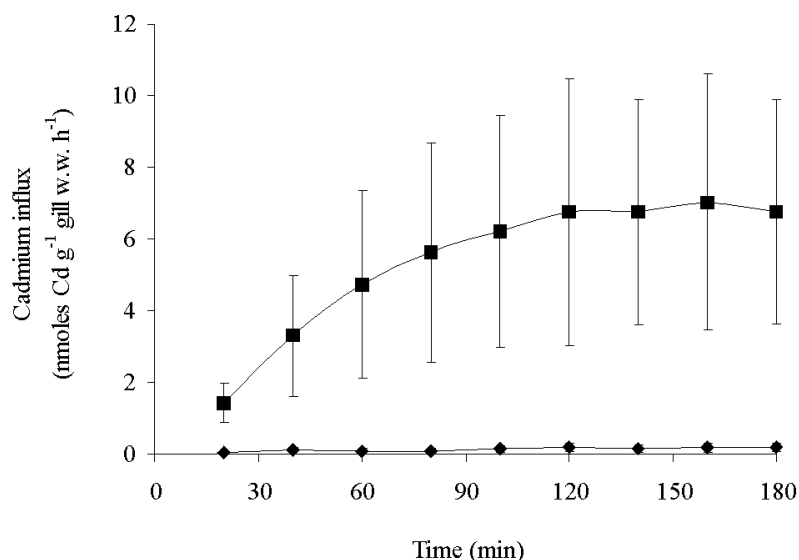


Fig. 1. *E. sinensis*. Time dependant cadmium influx across perfused anterior gills of freshwater acclimated crabs. Crab ringer solution with $\blacklozenge$ (n=5) and without $\blacksquare$ (n=7) added Ca^{2+} . Mean $\pm$ S.D.

decreased (0.15 ± 0.12 nmoles Cd g⁻¹ gill w.w. h⁻¹). In addition, cadmium influx is neither detected (DL of 0.06 nmoles Cd g⁻¹ gill w.w. h⁻¹) across posterior gills of crabs acclimated for 2 weeks in artificial seawater (results not shown). At variance, the mean cadmium influx across anterior gills of seawater acclimated crabs is 21 times lower than the one observed across anterior gills of freshwater acclimated crabs. The influx then averages 0.32 ± 0.18 nmoles Cd g⁻¹ gill w.w. h⁻¹ (Fig. 2).

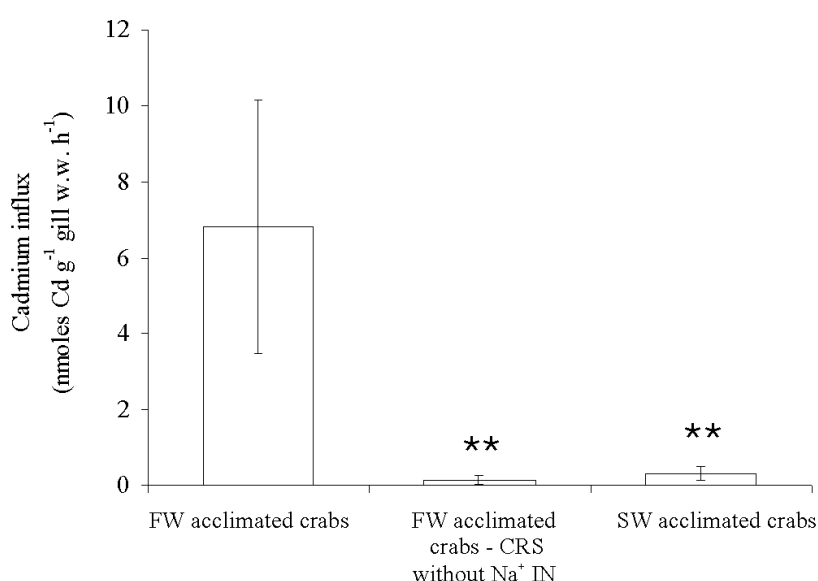


Fig. 2. *E. sinensis*. Cadmium influx across anterior gills perfused without added Ca²⁺. FW acclimated crabs (n=7) ; FW acclimated crabs CRS without Na⁺ IN (n=4) ; SW acclimated crabs (n=6). Mean $\pm$ S.D. ** p<0.01.

Concentrations of cadmium accumulated inside the gills exposed to 4.8 μ M total cadmium for three hours are presented in Table 2. Anterior gills accumulated cadmium from 3.8 to 68 nmoles Cd g⁻¹ gill w.w., with the highest value for SW acclimated crabs. Posterior gills accumulates cadmium too with concentrations between 2.1 and 39 nmoles Cd g⁻¹ gill w.w. Fig. 3 shows the percentage of total cadmium accumulated inside the gill on the one hand and reaching the hemolymph space on the other hand. We note that 91.7 % accumulates inside the anterior gills after perfusions with CRS IN and OUT. This value decreases to 61.3 % when gills are perfused without added calcium and increases up to 99.2 % for Ca and Na-

free perfusions and for artificial seawater acclimated crabs. In posterior gills, 100% of cadmium uptake is accumulated inside the gills.

Table 2.
E. sinensis. Concentration of cadmium accumulated inside anterior and posterior gills after 3 hours of perfusion in CRS containing cadmium 4.8 μM OUT.

	Accumulation (nmoles Cd g ⁻¹ gill w.w.)	
	Anterior gills	Posterior gills
CRS - FW acclimated	3.8 $\pm$ 1.5 (n=5)	2.1 $\pm$ 1.3 (n=5)
Ca-free CRS - FW acclimated	26 $\pm$ 33 (n=7)	15 $\pm$ 8 (n=5)
Ca and Na-free CRS - FW acclimated	40 $\pm$ 34 (n=4)	N.D.
Ca-free CRS - SW acclimated	68 $\pm$ 34 (n=6)	39 $\pm$ 20 (n=6)

Mean S.D. of n experiments

N.D.: Not determined

Discussion and conclusions

In this study, a flux of cadmium from the surrounding medium into the hemolymph space of *Eriocheir sinensis* has been clearly established through anterior gills only. As a matter of fact, in our experimental conditions, there is no influx at all detected across posterior ones. The cadmium influx averaged 0.17 nmoles Cd g⁻¹ gill w.w. h⁻¹ across anterior gills of freshwater acclimated crabs, incubated with crab Ringer solution and 4.8 μM cadmium. At variance with our results, Lucu and Obersnel (1996) measured an influx of 0.012 nmol Cd g⁻¹ gill w.w. h⁻¹ across perfused posterior gills of *Carcinus mediterraneus* acclimated to 18‰ seawater and exposed to 0.2-0.4 μM total cadmium. Pedersen and Bjerregaard (1995; 2000) also recorded an influx across posterior gills of the Shore crab *Carcinus maenas*, perfused with cadmium at total concentrations between 5 and 9 μM . Data between 0.5 and 2.0 nmoles Cd g⁻¹ gill w.w. h⁻¹ were reported for 15‰ artificial seawater acclimated crabs. The absence of any cadmium influx across posterior gills of *E. sinensis* while cadmium can pass through posterior gills of *C. maenas* could be parallel with their respective ultrastructures. In the latter species, posterior gills are not entirely adapted to pump ions from the surrounding water when in dilute environment. In fact, only 30% of its epithelium is of the salt-transporting type, thick, with apical plasma membrane infoldings, enlarged subcuticular compartments and close association of mitochondria with basolateral membrane infoldings (Compère et al., 1989). On the

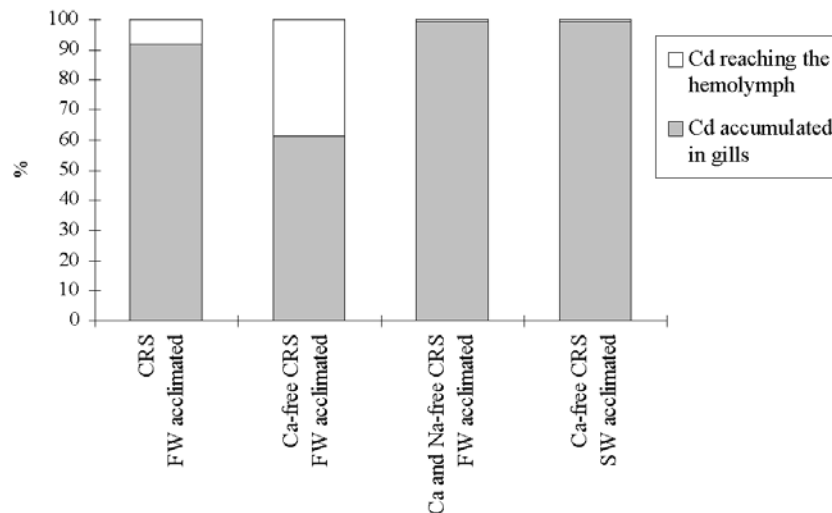


Fig. 3. *E. sinensis*. Percentage of total cadmium accumulated inside anterior gills after 3 hours of perfusion with cadmium $4.82 \mu\text{M}$ OUT in CRS. Gills from FW acclimated crabs were perfused in CRS with added Ca^{2+} ($n=5$), without added Ca^{2+} ($n=7$), without added Ca^{2+} and Na^+ ($n=4$); gills from SW acclimated crabs were perfused in CRS without added Ca^{2+} ($n=6$).

contrary, the entire posterior gill of *E. sinensis* is lined by a salt-transporting type epithelium (Barra et al., 1983). In consequence, we suggest that cadmium can penetrate more easily into the hemolymph space of decapod crustaceans through the "respiratory" type epithelium, present in the posterior gills of *C. maenas* but absent in the posterior gills of *E. sinensis*.

One of the characteristics of cadmium uptake is its largely discussed interaction with calcium. Uptake as well as accumulation and toxicity of cadmium depends on calcium concentration in the environment (Wright, 1977a; Pärt et al., 1985). A classical explanation is that both ions use the same uptake pathways through the epithelium because of comparable ionic radii (Pärt et al., 1985; Verbost et al., 1989; Bjerregaard and Depledge, 1994). Our results suggest that this competition occurs in the "respiratory" type epithelium of *E. sinensis*. We showed that there was an increase of cadmium influx across anterior gills when there was no added calcium in the CRS. It means that cadmium would enter into anterior gills and next into the hemolymph at least in part through one of the calcium transport system such as Ca^{2+} channels, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers or Ca^{2+} ATPases. We do not know exactly what mechanisms are involved in

calcium regulation in *E. sinensis* but a study on *C. maenas*, showing that $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers and Ca^{2+} ATPases are located on the basolateral membrane of the gills (Flik et al., 1994), suggests that the same mechanisms could exist in the Chinese crab. Moreover, the implication of the $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ exchanger on the basolateral membrane of anterior gills can be approached from our experiment where sodium was replaced by choline in the perfusion solution. Its replacement had a direct impact on cadmium influx since a decrease of 46 times was observed. Our results show that cadmium uptake is sodium-dependant and could confirm a possible implication of the $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ exchanger. Nevertheless, we must keep in mind that other physiological modifications, such as a change in the transepithelial potential difference, caused by the lack of sodium, could also affect cadmium uptake.

Moreover, we have shown that for crabs acclimated to different salinities, the cadmium influx through anterior gills is modified. This influx was much lower for artificial seawater acclimated crabs than for freshwater acclimated ones. Taking into consideration the experimental conditions here applied, the reason cannot be a speciation effect of cadmium. It is well known that the free metal ion is the bioavailable and toxic form and that this form is necessarily increased at low salinity due to decreased concentration of chloride ions (Sunda et al., 1978; Gutknecht, 1983). In our experiment, gills of freshwater and artificial seawater acclimated crabs were perfused with the same CRS IN and OUT. As external conditions were the same, identical Cd^{2+} concentrations were present. The reduction in cadmium influx observed in our experiments must therefore be due to physiological modifications of anterior gills induced in artificial seawater. Osmoregulation mechanisms has already been suspected to possibly interfere with cadmium uptake and accumulation in other crustaceans (Rainbow, 1995; Rainbow and Kwan, 1995; Wildgust and Jones, 1998; Roast et al., 2001). In *E. sinensis*, Roast et al. (2002) used radiolabelled ^{109}Cd to detect cadmium in the hemolymph after contamination of whole crabs at different salinities. They also concluded that physiological state of the organism affects cadmium uptake. The exact mechanisms involved are not yet elucidated, but we can reject a modification of the apparent water permeability (AWP), often considered as a possible physiological parameter that could interfere with metal uptake (see the review by Rasmussen and Andersen, 1996). A recent study shows that *E. sinensis* does not change its AWP when acclimated to different salinities (Rainbow and Black, 2001). Another possible explanation of the salinity effect on cadmium uptake observed here in the Chinese crab would be that organisms acclimated to low salinity would have calcium transport systems

with higher efficiencies, as already demonstrated in other decapod species (Neufeld and Cameron, 1993). This would be in concordance with our previous results suggesting that cadmium would follow calcium pathways across anterior gills.

The proportion of total cadmium accumulated inside the anterior gills relative to the cadmium entering into the hemolymph space is high and comprised between 61.3% and 99.2% after 3 hours of perfusion. So, most of the cadmium accumulates inside the gills and, in our experimental conditions, can not reach the hemolymph space. Andres et al. (2002) have found similar results when studying methyl mercury and inorganic mercury accumulation in gills and intestine of the blue crab *Callinectes sapidus*. In this species, less than 10% of the total accumulated metal reaches the hemolymph space. An even lower proportion of inorganic mercury (1.2%) reaches the hemolymph in *C. maenas* after 2 hours of perfusion (Laporte et al., 2002). In the Chinese crab, even if we cannot detect any influx across posterior gills, cadmium however accumulates at a level just a little lower than in anterior ones. It means that there is an uptake through posterior gills but that cadmium must be sequestered inside, preventing its influx into the hemolymph space. From perfusions experiments, it is not possible to determine if cadmium is definitively sequestered. It is likely that some posterior gills structure or physiological characteristics, slow down influx at a level that is undetectable during 3 hours. We cannot reject the possibility of a higher proportion of cadmium reaching the hemolymph space for longer exposition time. Such considerations could only be approached with contaminations on whole crabs during several days.

Because of its direct contact with the surrounding medium, cuticle is the most likely site of cadmium accumulation and it could slow down cadmium uptake in posterior gills. We know that cuticle modifies the epithelium permeability when the external ionic composition changes (Lignon, 1987; Péqueux and Lignon, 1988). Usually, in euryhaline species, cuticle has a strong selectivity for cations while there is no selectivity in osmoconform species. Interestingly, posterior gills cuticle of *E. sinensis* present a lower selectivity to Na^+ than anterior ones (Lignon, 1987). Therefore, we can assume that the different cadmium uptake patterns observed in our study between anterior and posterior gills could at least in part be explained by different selectivity of the cuticle to cations. If the cuticle is actually a barrier for cadmium uptake through the salt-transporting epithelium, it is well possible that it is also the place where the metal accumulates and it would explain the high cadmium accumulation observed inside the posterior gills.

In conclusion, the results of the present study clearly establish that, like in other crustaceans, cadmium can reach the internal medium of the strong euryhaline crab *Eriocheir sinensis* via the gills. However, it's the first time that a difference in cadmium uptake by two functionally different kinds of gills is reported. Even if the metal can accumulate inside both gills, we never measured any cadmium influx across posterior ones, the only ones actively involved in osmoregulation. Such different cadmium uptake, related to different epithelia physiology and ultrastructure, still needs to be investigated. Nevertheless, it is likely that a sequestration in posterior gills could be a consequence of the salt-transporting type epithelium cuticle selectivity for cations.

REPRINTED FROM : Comparative Biochemistry and Physiology - Part A, 137, Silvestre et al, " Uptake of cadmium through isolated perfused gills of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*.", 189-196, Copyright (2004), with permission from Elsevier.

3.3. Notes complémentaires

3.3.1. Influence de la ddp sur le flux entrant de Cd

Les résultats présentés dans la publication 1 montrent une dépendance du flux entrant de Cd à travers les branchies antérieures vis-à-vis du calcium, du sodium et de la salinité à laquelle les crabes ont été acclimatés. L'hypothèse selon laquelle le Cd emprunterait probablement certaines voies d'entrée communes avec le calcium, comme par exemple les échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, a été avancée. Nous avons voulu compléter ces données en rapportant les différences de potentiel (ddp) mesurées pendant au minimum 30 min (jusqu'à ce qu'elles soient stabilisées), juste avant d'ajouter le ^{109}Cd dans le milieu OUT. Pour ce faire, nous avons utilisé deux électrodes Ag^+/AgCl (Metrohm). Ces valeurs nous informent sur le

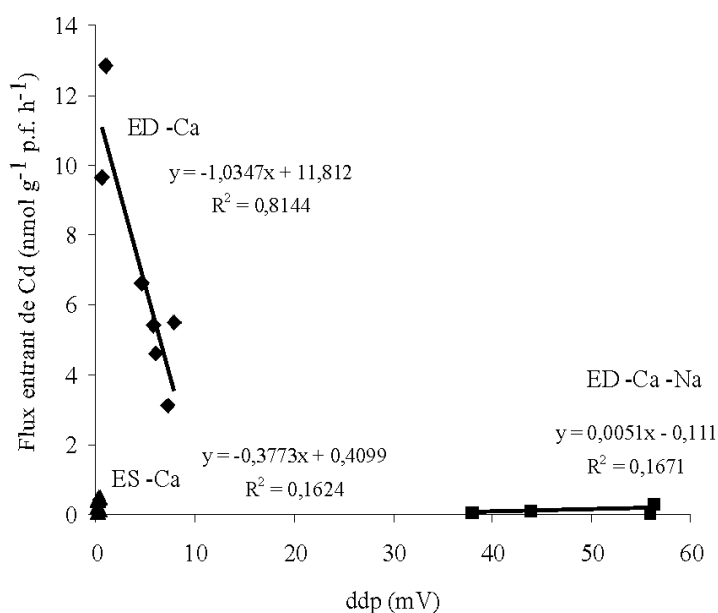


Fig. 1. *E. sinensis*. Corrélations entre le flux entrant de Cd et la ddp de branchies antérieures perfusées. Crabes acclimatés à l'eau douce : sans calcium, ED -Ca (n=7); sans calcium et sodium, ED -Ca -Na (n=4). Crabes acclimatés à l'eau salée : sans calcium, ES -Ca (n=5).

gradient électrique à travers lequel le Cd^{2+} migre.

Il ressort des figures 1 et 2 que la ddp pourrait moduler le flux entrant de Cd à travers les branchies antérieures. On observe en effet une corrélation négative entre ce flux et la ddp pour les branchies provenant de crabes acclimatés à l'eau douce et perfusées sans calcium (ED -Ca). Le fait de retirer le Na^+ du milieu IN (ED -Ca -Na) modifie fortement la ddp puisqu'elle devient largement positive, diminuant ainsi le gradient électro-chimique du Cd^{2+} . Pour ces branchies, une très nette diminution du flux entrant de Cd est rapportée. Ce résultat suggère que le Na^+ puisse avoir un effet indirect sur le flux entrant de Cd en modifiant la ddp et donc son gradient électro-chimique. Nous ne pouvons toutefois exclure l'existence conjointe d'un effet direct sur l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

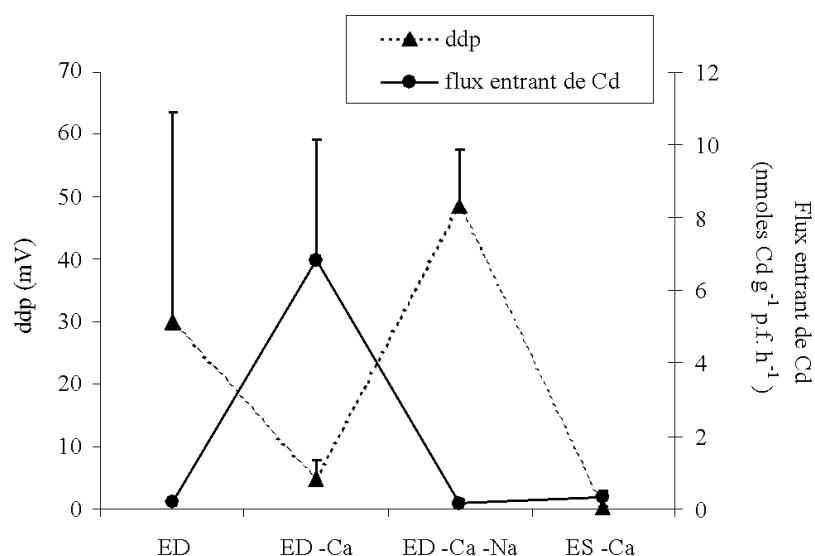


Fig. 2. *E. sinensis*. Flux entrant de Cd et ddp mesurés sur des branchies antérieures perfusées. Crabes acclimatés à l'eau douce : ED (n=5); ED -Ca (n=7); ED -Ca Na (n=4). Crabes acclimatés à l'eau salée : ES -Ca (n=5). Moyennes $\pm$ E.T.

Par contre, nous voyons que la ddp est proche de 0 pour des branchies antérieures de crabes acclimatés à de l'eau salée (ES -Ca), ce qui augmente le gradient électro-chimique du Cd^{2+} par rapport à des branchies provenant d'animaux acclimatés à de l'eau douce (ED -Ca). Si la différence de flux entrant de Cd entre les branchies de crabes ES -Ca et celles de crabes ED -Ca était le résultat d'une modification de la ddp, alors nous

aurions dû observer une augmentation du flux entrant de Cd lorsque la ddp était moins positive (ES -Ca). Au contraire, ce résultat conforte l'idée qu'une acclimatation à de l'eau salée modifie les voies de passage du Cd dans les branchies antérieures, réduisant ainsi l'entrée du métal. Ce résultat apporte une explication supplémentaire au fait que le Cd soit moins toxique en milieu marin qu'en milieu dulcicole. Elle s'ajoute au fait que pour une même concentration totale en Cd, l'ion Cd^{2+} , seul capable de pénétrer à travers l'épithélium branchial, est nettement moins présent en eau de mer car il est lié au Cl^- (voir chapitre 1.5). A un effet physico-chimique, se superpose un effet physiologique expliquant la moindre toxicité du Cd en eau salée.

3.3.2. Effets de certains inhibiteurs sur le flux entrant de Cd

Afin d'aller un peu plus loin dans la compréhension des voies de passage du Cd à travers l'épithélium branchial, quelques expériences ont été effectuées, consistant à perfuser des branchies antérieures avec des inhibiteurs spécifiques de certains transporteurs pouvant être impliqué dans le passage du Ca.

Les inhibiteurs utilisés sont :

- Le lanthane La^{3+} ajouté aux milieux IN ou OUT sous forme de LaCl_3 pour atteindre une concentration finale de 40 μM . Le La^{3+} est un inhibiteur potentiel des canaux Ca^{2+} , des échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et des Ca^{2+} ATPases.
- L'hydrochlorure de chlorpromazine (2-chloro-10-[3-diméthylaminopropyl] phénothiazine) (CHPRA) ajouté au milieu IN pour atteindre une concentration finale de 100 μM . La CHPRA est un inhibiteur spécifique potentiel des Ca^{2+} ATPases.
- Le N° 7943 (2-[2-[4-(4-nitrobenzyloxy)phényl]éthyl] isothiourée méthanesulphonate) (Watano et al., 1996) ajouté dans le milieu IN pour atteindre une concentration finale de 1 μM . Il a été préalablement dissous dans du DMSO (2 mM de 7943 dans 10 ml de DMSO). Un contrôle pour cette expérience a été réalisé en ajoutant du DMSO au milieu IN pour atteindre une concentration finale de 0,5%. Le N° 7943 est un inhibiteur spécifique potentiel des échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Ces inhibiteurs ont été introduits en remplaçant après une heure de perfusion, soit le milieu OUT, soit le milieu IN, par les mêmes solutions

contenant cette fois l'inhibiteur. Ces expériences ont été réalisées uniquement sur des branchies antérieures de crabes acclimatés à de l'eau douce et perfusées avec du Ringer sans calcium, comme décrit dans la publication 1. Une moyenne des flux entrants de Cd a été calculée pour chaque branchie entre 2 et 3 h de perfusion. Une ANOVA à un critère a été testée entre toutes les conditions afin de déterminer si un des inhibiteurs modifiait le flux entrant de Cd. Les résultats sont illustrés à la figure 3 (moyenne $\pm$ E.T.).

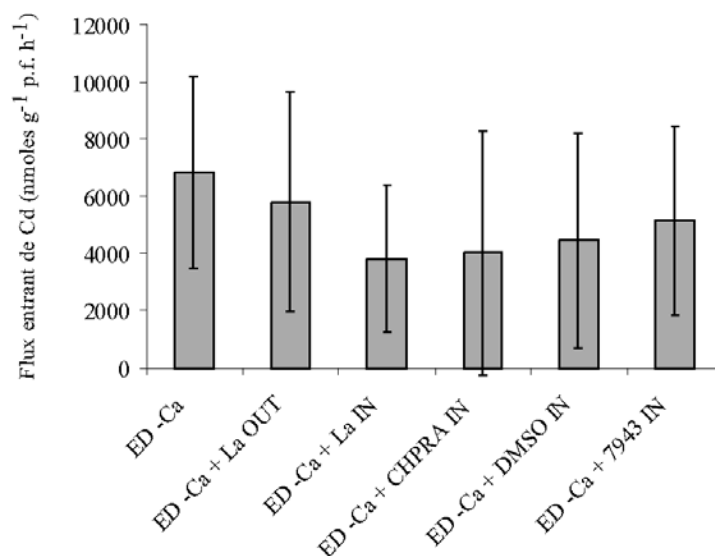


Fig. 3. *E. sinensis*. Effets d'inhibiteurs potentiels sur le flux entrant de Cd à travers des branchies antérieures de crabes acclimatés à de l'eau douce et perfusées sans calcium. ED Ca (n=7) ; ED Ca + La OUT (n=7) ; ED Ca + La IN (n=5) ; ED Ca + CHPRA IN (n=8) ; ED Ca + DMSO IN (n=5) ; ED Ca + 7943 IN (n=5). Moyennes $\pm$ E.T. La, lanthane ; CHPRA, chlorpromazine ; DMSO, diméthylsulfoxyde.

Aucun effet significatif n'a pu être mis en évidence suite à l'application d'un des inhibiteurs ($p=0,68$). Toutefois, ces données souffrent d'une variabilité importante. Ainsi, une tendance à une diminution du flux entrant de Cd a été observée lorsque du La^{3+} fut appliqué du côté IN et lorsque de la CHPRA fut appliquée du côté IN. Ceci pourrait laisser présager un rôle joué par une Ca^{2+} ATPase localisée sur la membrane baso-latérale. Des études ultérieures sont toutefois nécessaires en vue d'obtenir des informations plus précises sur les voies de passage du Cd à travers l'épithélium branchial.

4. EFFETS DU CD SUR

L'OSMORÉGULATION.

ACCLIMATATION PENDANT UNE

EXPOSITION CHRONIQUE

4.1. Résumé

Le premier objectif de ce chapitre est d'étudier les effets engendrés par une exposition à du Cd présent dans l'eau, sur les capacités d'hyperosmorégulation du crabe chinois et sur l'intégrité de ses branchies. En effet, comme mentionné au chapitre 1.6.2, cette espèce est capable de vivre en eau douce dans laquelle elle maintient l'osmolalité de l'hémolymphe à des valeurs supérieures à l'osmolalité de l'eau environnante. Ceci est possible grâce à la prise active d'ions à travers les branchies postérieures. Pour mener à bien ce premier objectif, nous avons soumis des crabes chinois mâles acclimatés à de l'eau courante (2 mOsm kg^{-1} ; $64 \text{ mg Ca}^{2+} \text{ l}^{-1}$), à différentes expositions dites « aiguës », soit $0,5 \text{ mg Cd l}^{-1}$ pendant 1, 2, 3, ou 7 jours. A la fin de chaque exposition, les organismes ont été sacrifiés, l'hémolymphe ainsi que les branchies antérieures et postérieures ont été prélevés. L'osmolalité ainsi que les concentrations en Na^+ et Cl^- de l'hémolymphe ont été évaluées. Après homogénéisation, l'activité des enzymes Na^+/K^+ -ATPase (NKA) et cytochrome c oxydase ont été mesurées sur les deux types de branchies. Enfin, certaines branchies ont été fixées et ensuite observées en coupes transversales soit à l'aide d'un microscope optique, soit à l'aide d'un microscope électronique à transmission.

Après une exposition de 1 ou 2 jours, aucun des paramètres mesurés dans l'hémolymphe n'a été perturbé par rapport aux organismes témoins ($558 \pm 30 \text{ mOsm kg}^{-1}$; $282 \pm 12 \text{ mM Na}^+$; $274 \pm 26 \text{ mM Cl}^-$). Par contre, après 3 jours, l'osmolalité ($381 \pm 66 \text{ mOsm kg}^{-1}$), la concentration en Na^+ ($179 \pm 45 \text{ mM}$), et la concentration en Cl^- ($209 \pm 52 \text{ mM}$), ont toutes trois significativement diminué. Après 7 jours, les analyses n'ont pu être menées à terme étant donné que 80% des animaux étaient morts.

Les branchies antérieures sont très affectées par une exposition aiguë de 3 jours. Sous cette condition, les observations microscopiques ont révélé que leur ultrastructure était largement détériorée. L'espace pour l'hémolymphe était réduit alors que les cellules épithéliales présentaient des compartiments sous-cuticulaires restreints, un cytoplasme diffus, des mitochondries endommagées, etc. L'activité de la NKA était réduite de 42% par rapport aux témoins, et celle de la cytochrome c oxydase de 53%. Par contre, aucune modification morphologique ou enzymatique n'a pu être mise en évidence dans les branchies postérieures provenant de ces mêmes crabes.

Il apparaît donc qu'une exposition aiguë à du Cd peut interférer avec la capacité d'hyper-osmorégulation du crabe chinois. Ce dernier n'arrive plus à maintenir l'osmolalité de son hémolymphe à un niveau comparable aux crabes témoins. En conséquence, on observe une diminution du gradient d'osmolalité existant entre l'eau environnante et le milieu interne de l'animal. Si l'on en recherche les causes, il est intéressant de constater qu'une éventuelle interaction du Cd avec les branchies postérieures, et notamment avec la NKA, est à exclure. Ces branchies semblent en effet épargnées par le Cd. Par contre, les branchies antérieures sont très affectées, à la fois aux niveaux morphologiques et enzymatiques. En conséquence, nous avançons comme hypothèse que les branchies antérieures perdraient leurs propriétés de perméabilité et laisseraient passer plus librement l'eau et/ou les ions.

Le deuxième objectif de ce chapitre est de déterminer si une exposition chronique (30 jours) au Cd induit une acclimatation du crabe chinois dans le sens qu'il deviendrait plus résistant à une exposition qui serait autrement délétère. Pour ce faire, des crabes ont été soumis à différentes expositions dites « chroniques » à 0, 10 ou 50 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$. A la fin de l'exposition, la moitié des organismes encore en vie ont été sacrifiés, et l'hémolymphe ainsi que les branchies ont été prélevées. Ces animaux ont été annotés respectivement C0, C10, et C50. Les autres ont été soumis à une exposition aiguë délétère, soit 0,5 mg Cd l^{-1} pendant 3 jours. Ces organismes ont été respectivement nommés CA0, CA10, et CA50 (Fig. 1.).

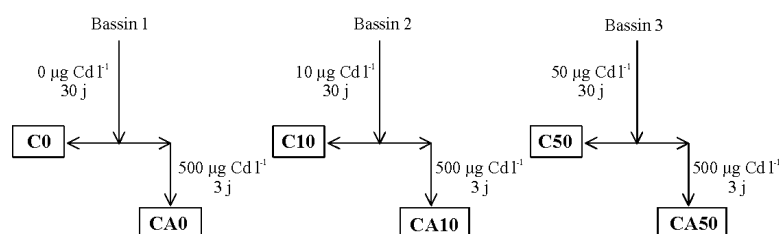


Fig. 1. Schéma du protocole expérimental d'exposition des crabes chinois au Cd.

Une exposition chronique seule n'a abouti à aucun effet significatif sur la capacité d'hyper-osmorégulation du crabe chinois. Ainsi, ni l'osmolalité, ni les concentrations en Na^+ et en Cl^- de l'hémolymphe n'ont été modifiées pour les crabes C10 et C50 par rapport aux C0. L'activité de la NKA n'était altérée dans aucun type de branchies. Seule l'activité de la cytochrome c oxydase présentait une diminution de 29% dans les branchies antérieures de crabes C50 par rapport à C0.

Des crabes soumis à une exposition préalable de $10 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ avant une exposition aiguë (CA10), ont présenté une diminution significative de l'osmolalité et de la concentration en Na^+ de l'hémolymph par rapport à des animaux non exposés (C0), tout comme ce fut le cas pour des animaux directement soumis à une exposition aiguë (CA0). Par contre, des crabes ayant subi une exposition préalable au Cd à une concentration de $50 \mu\text{g l}^{-1}$ avant une exposition aiguë (CA50), ont maintenu leur capacité d'hyper-osmorégulation intacte. De plus, alors que les activités enzymatiques étaient restées inchangées dans les branchies postérieures, l'activité de la NKA n'a pas été modifiée dans les branchies antérieures pour les crabes CA50 par rapport aux animaux C0. Cependant, dans ces branchies, l'activité de la cytochrome c oxydase a encore été diminuée. Enfin, la morphologie des branchies antérieures a été moins affectée pour des crabes CA50 que pour des crabes CA0, bien que certains dommages aient encore été observés.

En conclusion, il apparaît qu'une exposition du crabe chinois au Cd, à une concentration de $50 \mu\text{g l}^{-1}$ pendant 30 jours, induit un processus d'acclimatation touchant les mécanismes d'hyper-osmorégulation. Par contre, une exposition préalable à $10 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ ne semble pas induire de résistance accrue au métal. Ceci suggère qu'il existerait une fenêtre d'acclimatation en dessous de laquelle des mécanismes de défense ne seraient pas mis en place de manière suffisante pour induire une résistance accrue, et au delà de laquelle ils seraient insuffisants pour contrer les effets délétères du Cd. De plus, certains mécanismes de résistance semblent prendre place dans les branchies antérieures puisque les effets observés pendant une exposition aiguë au Cd sont moins marqués après une acclimatation.

4.2. Publication 2 : Hyper-osmoregulatory capacity of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) exposed to cadmium. Acclimation during chronic exposure.

F. Silvestre, G. Trausch, P. Devos

Comparative Biochemistry and Physiology Part C - accepté, sous presse.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of waterborne cadmium on hyper-osmoregulatory capacity of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* acclimated to freshwater. For this purpose, crabs were submitted to acute (0.5 mg Cd L^{-1} for 1, 2 or 3 days), chronic (10 or $50 \text{ } \mu\text{g Cd L}^{-1}$ for 30 days) or chronic, immediately followed by acute, exposure. While no effect was observed after 1 or 2 days, hemolymph osmolality, Na^+ and Cl^- concentrations were significantly reduced after 3 days of acute exposure. Under this latter condition, the respiratory anterior gill ultrastructure, Na^+/K^+ -ATPase and cytochrome c oxidase activities were significantly impaired. In contrast, the osmoregulatory posterior gill was unaffected for all treatments. 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. In contrast to acute exposure, chronic exposure did not induce any observable effect. However, crabs submitted to a known deleterious acute condition (0.5 mg Cd L^{-1} for 3 days) directly after chronic exposure to $50 \text{ } \mu\text{g Cd L}^{-1}$ for 30 days, showed normal hyper-osmoregulatory capacity with no change in gill Na^+/K^+ -ATPase activity, and only little disturbance of anterior gill ultrastructure. These results demonstrate that a chronic cadmium exposure can induce acclimation mechanisms related to osmoregulation in this euryhaline decapod crustacean.

Keywords: cadmium; *Eriocheir sinensis*; osmoregulation; acclimation; hemolymph osmolality; Na^+ ; Cl^- ; Na^+/K^+ -ATPase; cytochrome c oxidase; chronic stress; gill ultrastructure.

Introduction

Cadmium is a non-essential heavy metal widespread in the environment. From natural water, it penetrates into aquatic organisms and exerts adverse effects (Zyadah and Abdel-Baky, 2000). Some authors found that cadmium affects osmolality and/or internal ionic concentrations in different aquatic species such as the shore crab *Carcinus maenas* (Thurberg et al., 1973; Bjerregaard and Vislie, 1985), the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Vitale et al., 1999; Rodriguez et al., 2001) or the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (McGeer et al., 2000). The gill, which is largely involved in iono-regulation, is probably an important target. Nevertheless, mechanisms by which cadmium interferes with this organ are not well understood. A possible mode of action concerns the direct effect on enzymes involved in active ionic transport and located in gill epithelial cells (e.g. Na^+/K^+ -ATPase and carbonic anhydrase). However, an impairment of gill permeability to ions can also explain the osmoregulatory capacity decline.

Aquatic organisms seldom encounter acute metal contamination. Usually, they face relatively low concentration over a long duration. Chronic and acute stress present different ecological challenges. Organisms are likely to endure specific molecular, biochemical, physiological or morphological responses under each of these conditions. In this sense, a chronic stress is known to possibly induce acclimation process, defined as increased tolerance of an elevated, usually lethal, concentration of a toxicant arising from chronic exposure to a sublethal concentration of that toxicant (McDonald and Wood, 1993). Acclimation was pointed out for cadmium in several aquatic organisms such as fishes (Hollis et al., 1999; Chowdhury et al., 2004), daphnia (Bodar et al., 1990; Stuhlbacher et al., 1992) or the amphipod *Gammarus pulex* (Stuhlbacher and Maltby, 1992). However, additional studies are necessary to understand this biological phenomenon.

The powerful osmoregulator Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, has been used for a long time in eco-physiological studies (Péqueux, 1995). Gills are largely responsible for its ionoregulatory capacity. However, the three most posterior located pairs of gills and the anterior ones are clearly distinguished by their ultrastructure and physiology (Barra et al., 1983). While posterior gills actively pump ions from the surrounding water, anterior gills are considered as largely respiratory with passive movements of Na^+ only (Péqueux and Gilles, 1981; Gilles et al., 1988). For a few years, some authors have been interested in the interactions between pollutants and osmoregulation in this species (Roast et al., 2002). To this end, two

different toxicants, mercury and atrazine, revealed significant effects either on hemolymph ionic composition or directly on gill epithelium physiology (Péqueux et al., 1996; Silvestre et al., 2002).

The aim of the present study was to investigate the effects of acute and chronic cadmium exposure on hemolymph osmolality, Na^+ and Cl^- concentrations, on gill Na^+/K^+ -ATPase and cytochrome c oxidase activities and on gill ultrastructure, in the Chinese crab acclimated to freshwater. Moreover, we tested the hypothesis that this animal acclimates when exposed to chronic cadmium.

Materials and methods

Chemicals

Cadmium chloride (CdCl_2), phosphoenolpyruvate (PEP), reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), pyruvate kinase/lactate dehydrogenase (PK/LDH), adenosine triphosphate (ATP), glutaraldehyde, osmium tetroxide (OsO_4), propylene oxide, Triton X-100 and cytochrome c were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) ; imidazole was purchased from Merck (Germany) ; Tris-(hydroxymethylamino-methane) (Tris) was purchased from Fluka (Switzerland) ; ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) and ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) were purchased from Janssen Chimica (Belgium). All chemicals were of analytical grade.

Animals collection and maintenance

Chinese mitten crabs, *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards, 1854) (*Crustacea*, *Decapoda*) were caught in freshwater lakes near Emden (Germany) in autumn 2000 and 2001. They were kept in tap water (14.6 ± 0.4 °C ; pH 8.2 ± 0.2 ; 2 mOsm kg^{-1} ; $64 \text{ mg Ca}^{2+} \text{ L}^{-1}$) tanks for at least one week before experiments. Water was changed and animals were fed every other day. They were not fed one week before being sacrificed.

Cadmium exposure

Acute

Intermolt males (126 ± 41 g; 63 ± 5 mm width) were distributed over five tanks. A first group was used as controls. Other animals faced cadmium added as CdCl_2 to obtain a final concentration of 0.5 mg Cd L^{-1} . Contamination time was respectively 1, 2, 3 and 7 days. Crabs that died during the experiment were immediately discarded. Only the 7 d group showed a high mortality value reaching 80% (10, 0, 20, 20% for controls, 1, 2, and 3 days, respectively). Final number of replicates for each treatment was 9, 5, 4 and 4 for controls, 1, 2 and 3 days of exposure, respectively. The experiment was repeated for 3 days exposure only (mortality values of 20 and 0%; $n=4$ and $n=5$ for controls and 3 days, respectively).

Chronic

Other intermolt males (100 ± 29 g; 59 ± 10 mm width) were exposed to cadmium for 30 days. A first group was maintained in cadmium-free tap water (C0). A second group was exposed to $10 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ (C10), and a third group to $50 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ (C50). Afterwards, half of the crabs in each tank were sacrificed, while the other half were challenged with a subsequent acute cadmium contamination (CA0, CA10, CA50, respectively) i.e. 3 days with 0.5 mg Cd L^{-1} . Mortality was similar for controls and for crabs exposed to Cd after 30 days (26, 35, 23% for C0, C10 and C50, respectively) indicating no significant mortality induced by the metal. After a subsequent 3 days acute exposure, mortality was 15, 0 and 0% for CA0, CA10 and CA50, respectively. Final number of replicates was 5 (C0), 5 (C10), 7 (C50), 5 (CA0), 5 (CA10) and 6 (CA50).

Hemolymph analysis

At the end of exposure, 2 mL of hemolymph was drawn from each crab with a syringe by puncturing the membrane at the base of the third walking leg. Hemolymph was centrifuged at $12\,000 \times g$ for 15 min at 4°C . Plasma osmolality was analysed with a freezing-point depression osmometer (Fiske, Model 110), Na^+ concentration with a flame

spectrophotometer (Van Hopplynus, Model IL243 LED) and Cl^- concentration with a chloride titrator (Radiometer, Model CMT10).

Enzymatic assays

Gills were cut free of their insertion after the crab had been killed and the carapace removed. The three most posterior and the three anterior gills were separately blotted on filter paper and directly immersed in liquid nitrogen. They were stored in -80°C until homogenisation. Gills were weighed and then homogenised on ice in a glass tissue homogeniser (Kontes, USA), using a glass pestle at 2 800 rpm, twice for 30 s each time, in 15 vol of cold imidazole buffer containing: imidazole (50 mM), saccharose (250 mM), EDTA (1 mM) (pH 7.4). Total protein was measured according to the method of Lowry (1951).

Ouabain-sensitive Na^+/K^+ -ATPase was assayed following the method of Nørby (1988). A volume of 0.4 mL of a mixture containing NaCl (500 mM) and KCl (125 mM) was combined with 1 mL of a solution of Tris-HCl (50 mM), MgCl_2 (10 mM), EGTA (0.5 mM) (pH 7.4) with or without ouabain (10 mM). Subsequently, 0.1 mL phosphoenolpyruvate (30 mM), 0.1 mL NADH (3 mM), 0.01 mL PK/LDH (926/1300 U. mL^{-1}), and 0.2 mL ATP (50 mM) were added. Afterwards, the solution was incubated 10 min at room temperature. Then, we added 0.01 mL of the homogenate and the volume was brought to 2.0 mL with H_2O . The absorbance was read for 5 min at 340 nm. The Na^+/K^+ -ATPase activity was estimated as the difference between the activities measured with and without ouabain in the incubation medium. One unit (U) of enzyme activity corresponds to the hydrolysis of 1 μmol of ATP min^{-1} .

Cytochrome c oxidase activity was measured in 0.1 mL of the homogenate diluted 10-fold for anterior gills and 40-fold for posterior gills with a solution containing: Triton X-100 (0.04% w/v), EDTA (1 mM) and phosphate buffer (1 mM) (pH 7.4). The solution was incubated 2 min at room temperature and the reaction was initiated with the addition of 3 mL of a reagent mixture containing: cytochrome c (17 μM) 90% reduced with $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, EDTA (1 mM) and phosphate buffer (30 mM; pH 7.4). The oxidation of the reduced cytochrome by the cytochrome oxidase is estimated by the decreased rate of absorbance at 550 nm. One unit (U) of enzyme activity refers to the amount required to oxidise 90% of reduced cytochrome c per min.

Microscopy

Anterior gills from the fifth pair and posterior gills from the sixth pair were excised from crabs exposed 3 days to 0.5 mg Cd L⁻¹ and from controls for acute experiment. Other gills were excised from crabs C0 and CA50 for the chronic experiment. Gills were cut to thin lamellae and fixed for 150 min at 4°C in a solution of 2.5% glutaraldehyde buffered at pH 7.6. The final osmolality of the fixative was 572.5 mOsm kg⁻¹. Pieces were rinsed 3 x 10 min in crab Ringer solution (CRS): NaCl (240 mM), KCl (5 mM), MgCl₂ (5 mM), CaCl₂ (12.5 mM), H₃BO₃ (10 mM, pH 7.6). They were then post-fixed with OsO₄ 1% (pH 7.6) for 1h at 4°C in the dark and rinsed 3 x 10 min with CRS. Samples were dehydrated in graded ethanol baths and propylene oxide and then embedded in Epon 812. Semi-thin sections (0.2 µm) were prepared with an Ultramicrotome (LKB-Bromma) and stained with toluidine blue for light microscopic observations. Thin sections (70 nm) were cut with a diamond knife, contrasted with uranyl acetate and lead citrate and then observed with a Tecnai transmission electron microscope (Philips) at 60 kV accelerating voltage.

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± S.D. Statistical significance was tested by one-way analysis of variance (ANOVA) and LSD test for post hoc comparison. Normality and homogeneity of variances were examined by Shapiro-Wilks' W and Levene's tests, respectively. At least one of these conditions was not satisfied for osmolality, Na⁺ and Cl⁻ concentrations after acute exposure, for cytochrome c oxidase activity in anterior gills after acute exposure and for Na⁺/K⁺-ATPase in anterior and posterior gills after chronic exposure. For these conditions, we proceeded to use non parametric Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks followed by Mann-Whitney U test. Significance level was defined as p<0.05.

Results

Acute exposure

In the first experiment, we examined the effects of acute waterborne cadmium on osmoregulation in the euryhaline Chinese crab after exposure

to 0.5 mg Cd L⁻¹ for 1, 2, 3 or 7 days in freshwater. It appears that the hyper-osmoregulatory capacity is not disturbed after 1 or 2 days of metal exposure (Fig. 1. A). Under these conditions, hemolymph osmolality, Na⁺ and Cl⁻ concentrations are at the same levels as in controls. In contrast, after 3 days of Cd exposure, hemolymph osmolality is significantly reduced from 554 ± 35 to 374 ± 92 mOsm kg⁻¹ (p<0.01). A significant decrease is also observed for Na⁺ and Cl⁻ hemolymph concentrations. The repetition of this experiment for 3 days exposure shows the same results (546 ± 48 mOsm kg⁻¹ for controls and 387 ± 49 mOsm kg⁻¹ for 3 days Cd exposure; results not shown).

Moreover, enzymes activities levels reveal that anterior gills are affected after 3 days of cadmium exposure. In these gills, Na⁺/K⁺-ATPase activity reaches 42% of decrease (Fig. 1. B), while cytochrome c oxidase activity reaches a diminution of 53% (Fig. 1. C) compared to unexposed crabs. No significant reduction is observed after 1 or 2 days. In contrast, posterior gills show similar Na⁺/K⁺-ATPase and cytochrome c oxidase activities at any exposure time (Fig. 1. B,C).

Cross sections of anterior gills from crabs exposed to 0.5 mg Cd L⁻¹ for 3 days reveal that lamellae are disrupted and that little cellular organisation is still discernible. We observe using light microscopy that lamellae are narrow and irregular, with wavy cuticle and epithelium (Fig. 2.1. and 2.2.). They have a mean width of 19 µm (min 13µm – max 27µm) compared to 33 µm (min 26µm – max 39µm) for controls. This lamellae thickness decrease, added to the fact that the lamellar septum has a comparable mean width in exposed and controls (12 and 11 µm respectively), lead to a reduction in circulating hemolymph volume. Electron microscopy of epithelial cells reveals that the cytoplasm is more diffuse than controls (Fig. 3.3. and 3.4.) and contains large vacuoles (not shown). Moreover, subcuticular compartments are dramatically reduced (Fig. 3.3. and 3.4.). Mitochondria seem highly affected. Many of them are swollen and present a more rounded profile while others have an irregular shape. We observe variations in the densities of their matrix with the region of light matrix occupying a greater portion (Fig. 3.3. and 3.4.). The basal membranes are discontinuous and are often withdrawn from the basal lamina (Fig. 3.5. and 3.6.). Microtubules inside pilaster cells seem disorganised, less numerous and shorter (Fig. 3.7. and 3.8.).

On the opposite, posterior gill epithelium is not impaired (Fig. 2.3., 2.4., 3.1. and 3.2.). It shows the normal characteristics of a salt-transporting epithelium i.e. thick, with apical plasma membrane infoldings, enlarged

subcuticular compartments and close association of mitochondria with basolateral membrane infoldings (Compère et al., 1989).

Chronic exposure and acclimation

During chronic exposure, crabs were challenged with cadmium at 10 (C10) or 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (C50) for 30 days. Under these conditions, neither osmolality, nor Na^+ and Cl^- hemolymph concentrations are modified compared to controls C0 (Fig. 4. A.). Na^+/K^+ -ATPase activity is not significantly reduced with 50 $\mu\text{g Cd L}^{-1}$ either in the anterior or posterior gills (Fig. 4. B.). Nevertheless cytochrome c oxidase activity is significantly decreased by 29% in anterior gills, but not in posterior gills.

In order to test whether acclimation occurs during chronic exposure, we submitted some crabs to 10 $\mu\text{g Cd L}^{-1}$ or 50 $\mu\text{g Cd L}^{-1}$ for 30 days directly followed by exposure at the deleterious condition of 0.5 mg Cd L^{-1} for 3 days (CA10 and CA50, respectively). Animals under condition CA10 have their hemolymph osmolality and Na^+ concentration unmodified compared to crabs submitted to an acute cadmium exposure only (CA0) (Fig. 4. A.). In addition, CA0 and CA10 crabs show a significant reduction in hemolymph osmolality and Na^+ concentration compared to unexposed animals (C0), confirming the deleterious effects of acute Cd on hyperosmoregulatory mechanisms, as shown in the first experiment (section 3.1.). In contrast, we can not report the same impact on osmoregulation for crabs under the condition CA50 instead of CA10, since they maintain their hemolymph osmolality and Na^+ concentration significantly higher than CA0, at levels comparable to C0. No difference is reported for Cl^- concentration ($p=0.18$).

Enzymes activities are presented in Fig. 4. B. and C for C0, CA0, C50 and CA50, respectively. Na^+/K^+ -ATPase activity in anterior gills is significantly higher for CA50 compared to CA0. Under the former condition, this enzyme activity reaches a level comparable to unexposed crabs C0. In contrast, no difference can be pointed out for cytochrome c oxidase activity in anterior gills between CA50 and CA0. No change is observed for enzymes activities in posterior gills under any exposure condition.

Microscopic observation of CA50 anterior gills reveals that the lamellae are regular with straight cuticle and epithelium (Fig. 5.1.). Their thickness is comparable for CA50 and for unexposed C0. They present respectively a mean width of 29 μm (min 19 μm – max 39 μm) and of 33

µm (min 26µm – max 39µm). Nevertheless, the mean lamellar septum width is high for CA50 (19 µm). In consequence, the lamellar septum cells are located near the epithelial cells so that we can observe both basal lamina close to each other. Electron microscopy indicates that basal membranes are continuous and close to the basal lamina (Fig. 5.3.). Epithelial cells contain a diffuse cytoplasm, large vacuoles and a reduced subcuticular compartment (Fig. 5.2.). Mitochondria are highly affected and show variations in the density of their matrix. Finally, pilaster cells do not seem affected and microtubules are numerous (not shown).

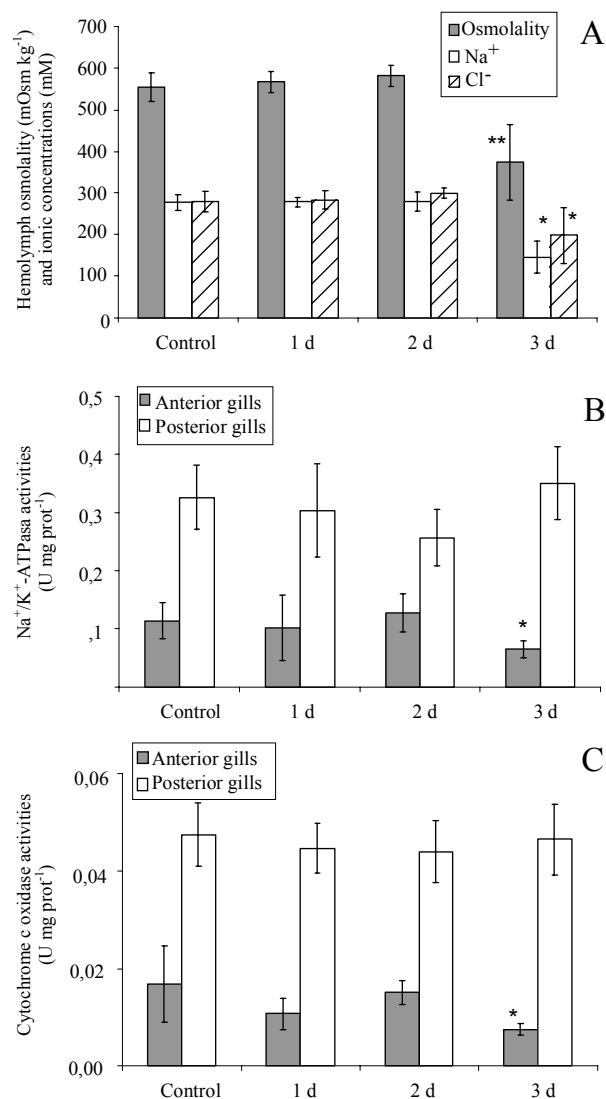


Fig. 1. *Eriocheir sinensis*. Effects of acute cadmium exposure (0.5 mg L⁻¹) on hemolymph osmolality (mOsm kg⁻¹), Na⁺ and Cl⁻ concentrations (mM) (A), and on gills Na⁺/K⁺-ATPase (B) and cytochrome c oxidase (C) activities. n = 9 (controls); 5 (1 day); 4 (2 days); 4 (3 days). * p<0.05 ; ** p<0.01 when compared to controls.

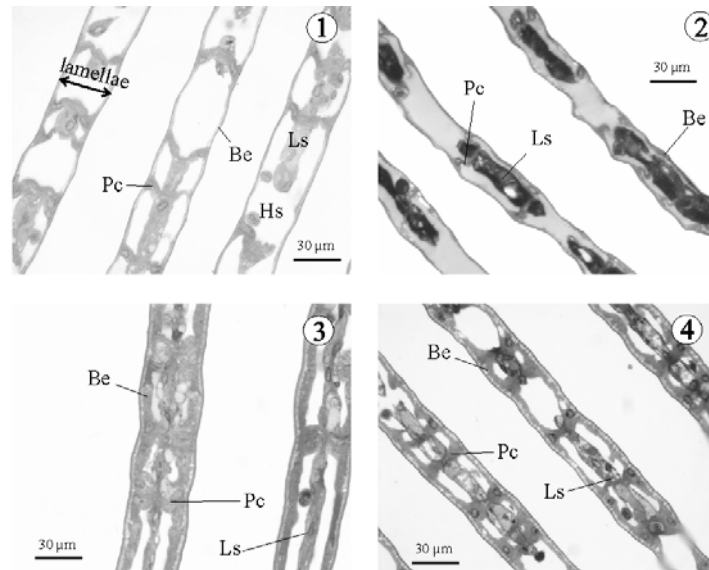


Fig. 2. *Eriocheir sinensis*. Light micrographs of anterior and posterior gills lamellae cross sections after acute cadmium exposure (0.5 mg L^{-1} for 3 days). 1: anterior gills - controls ; 2: anterior gills - cadmium ; 3: posterior gills - controls ; 4: posterior gills - cadmium. Be: branchial epithelium ; Hs: hemolymph space ; Ls: lamellar septum ; Pc: pilaster cell.

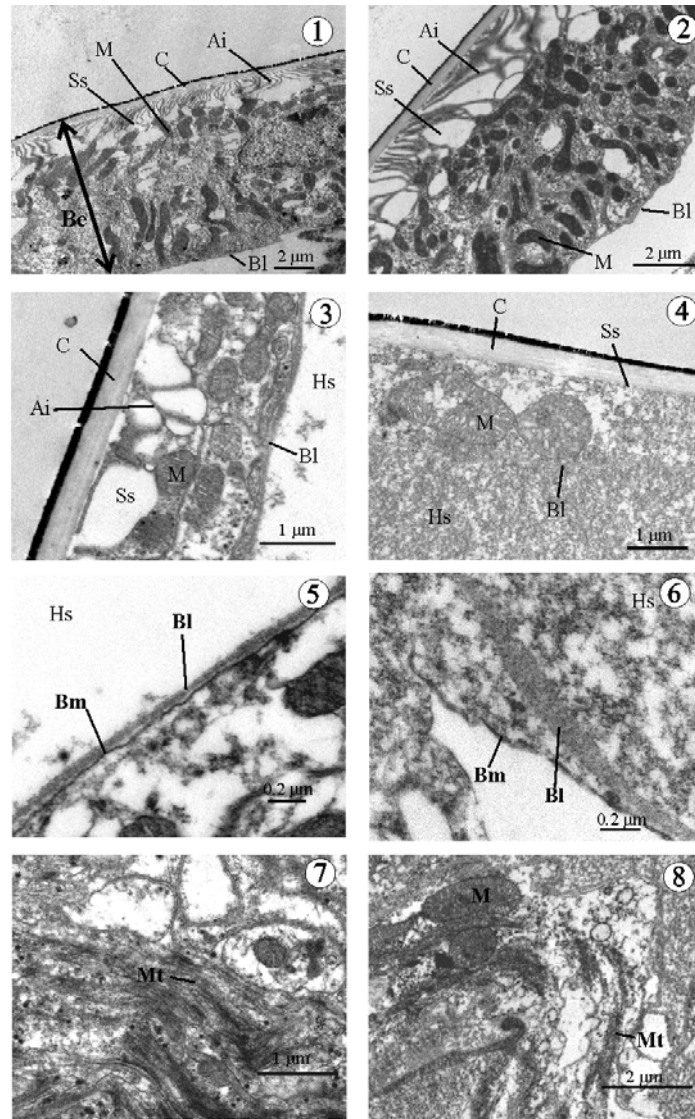


Fig. 3. *Eriocheir sinensis*. Electron micrographs of anterior and posterior gills lamellae cross sections after acute cadmium exposure (0.5 mg L^{-1} for 3 days). 1: posterior gills - controls ; 2: posterior gills cadmium ; 3, 5, 7: anterior gills controls ; 4, 6, 8: anterior gills - cadmium. Ai: apical infoldings; Be: branchial epithelium; Bl: basal lamina; Bm: basolateral membrane; C: cuticle; Hs: hemolymph space; M: mitochondria; Mt: microtubules; Ss: sub-cuticular space.

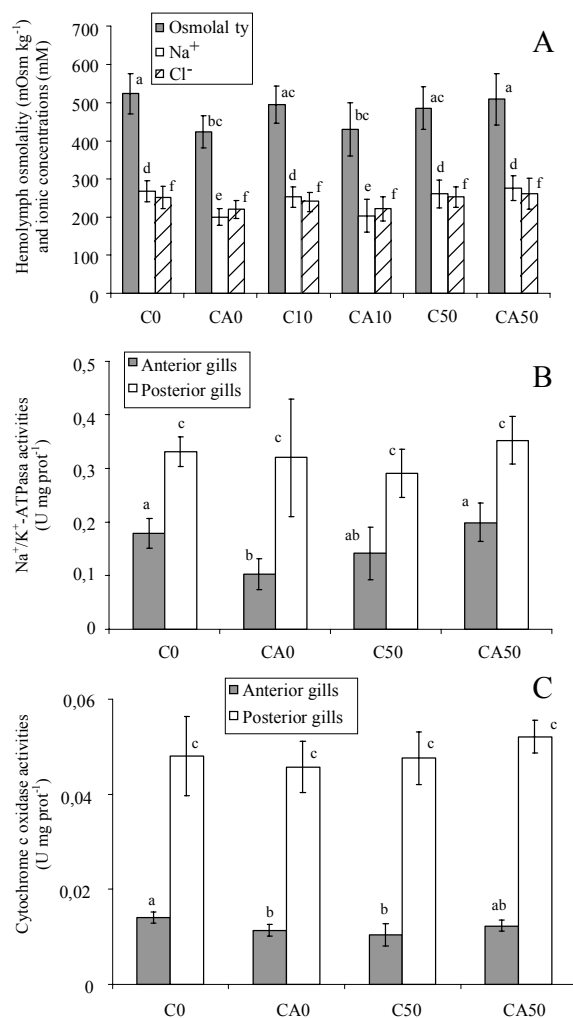


Fig. 4. *Eriocheir sinensis*. Effects of chronic and chronic followed by acute cadmium exposure on hemolymph osmolality (mOsm kg⁻¹), Na⁺ and Cl⁻ concentrations (mM) (A), and on gills Na⁺/K⁺-ATPase (B) and cytochrome c oxidase (C) activities. C0: controls (n=5); CA0: 0 µg Cd L⁻¹ 30 days and then 0.5 mg Cd L⁻¹ 3 days (n=5); C10: 10 µg Cd L⁻¹ 30 days (n=5); CA10: 10 µg Cd L⁻¹ 30 days and then 0.5 mg Cd L⁻¹ 3 days (n=5); C50: 50 µg Cd L⁻¹ 30 days (n=7); CA50: 50 µg Cd L⁻¹ 30 days and then 0.5 mg Cd L⁻¹ 3 days (n=6). Common letters shared by two conditions indicate no significant differences at p<0.05.

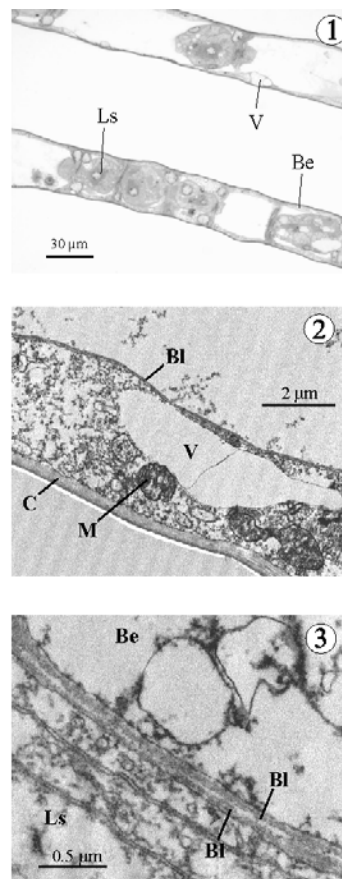


Fig. 5. *Eriocheir sinensis*. Light (1) and electron (2-3) micrographs of anterior gills lamellae cross sections. Crabs exposed to cadmium at $50 \mu\text{g L}^{-1}$ for 30 days and then at 0.5 mg L^{-1} for 3 days (CA50). To be compared with fig. 2 and 3. Be: branchial epithelium; Bl: basal lamina; C: cuticle; Ls: lamellar septum; M: mitochondria; V: vacuole.

Discussion

Acute Cd exposure induces hyper-osmoregulatory capacity impairment

Eriocheir sinensis is a powerful osmoregulator. Sexually mature individuals live in freshwater, but migrate downstream in estuaries to reproduce (Anger, 1991). This crab is a hyper-osmoregulator in freshwater and its isosmotic point is around 33‰ (Roast et al., 2002). In the present study, we show that *E. sinensis* has its hyper-osmoregulatory capacity impaired when exposed 3 days to cadmium at 0.5 mg L⁻¹. Under this condition, its hemolymph osmolality decreases from 554 to 374 mOsm kg⁻¹ while its hemolymph Na⁺ (from 277 to 146 mM) and Cl⁻ (from 280 to 198 mM) concentrations are highly reduced. Previous studies already found that waterborne cadmium disturbs hemolymph osmolality and/or ionic composition in decapod crustaceans. It comes out that different species respond specifically and that experimental conditions are critical. The shore crab *Carcinus maenas* acclimated to salinities from 14 to 32‰ becomes more hyperosmotic than controls after cadmium exposure (Thurberg et al., 1973; Bjerregaard and Vislie, 1985) and a similar effect is observed in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* acclimated to 12 and 30‰ (Rodriguez et al., 2001). At the opposite, this latter species acclimated to a lower salinity (i.e. 2.5‰) shows a reduction of its internal Na⁺ concentration (Vitale et al., 1999).

Anterior gill is a main target to Cd

Our results indicate that the anterior gill is an important target to cadmium. Indeed, this kind of gill has lost its structural integrity after an acute exposure for 3 days. Under this condition, the gill lamellae seem collapsed, are delimited by wavy cuticle and epithelium, have a very irregular shape, and are thinner. Therefore, the space for circulating hemolymph is decreased. The reason for this collapse is not clear, but evidence showing that cadmium may dislocate microtubules of pilaster cells could explain this induced fragility. These cells are normally connected to those extended from the opposite surface of the lamella so that they form pillars joining both cuticular leaflets (Compère et al., 1989). For this reason they normally play an important function in lamellae support and they determine preferential directions of hemolymph flow.

Furthermore, anterior gill epithelial cells are disorganised by cadmium. The cytoplasm is diffuse, contains large vacuoles and subcuticular compartment is reduced compared to unexposed organisms. In many places, the basal membrane is withdrawn from the basal lamina. The metal alters mitochondria, as already shown in other species (Bubel, 1976; Papathanassiou and King, 1983). The observed cytochrome c oxidase (located in the inner membrane of mitochondria) activity impairment is probably a consequence of this high organelle sensitivity to cadmium.

Na^+/K^+ -ATPase activity is also decreased in anterior gills from *E. sinensis* exposed to acute Cd for 3 days. This enzyme is located in the basolateral membrane of gill epithelial cells. In posterior gills, it establishes the driving force for reabsorption of ions from a dilute environment, maintaining the hyper-osmoregulatory capacity of the crabs (Péqueux and Gilles, 1981; Gilles et al., 1988). *In vitro* inhibition of Na^+/K^+ -ATPase by cadmium is well established in different biological systems (Tucker and Matte, 1980; Lemaire-Gony and Mayer-Gostan, 1994; Postel et al., 1998; Lionetto et al., 2000). However, *in vivo* impacts still need some clarifications and depend upon the species (Dhavale et al., 1988; Rodriguez Moreno et al., 1998). In the present study, we find *in vivo* reduction of its activity in anterior but not in posterior gills. Consequently, this enzyme still operates in gills that actively take up ions from the surrounding water. Accordingly, inhibition of this enzyme activity by Cd is unlikely to explain a hemolymph osmolality drop in our experimental model.

While anterior gill respiratory epithelium has lost its structural integrity and has enzymes activities reduced, posterior gill osmoregulatory epithelium seems unaffected, indicating a lower sensitivity to cadmium. These results can be closely related to high metal influx measured through perfused anterior gills by Silvestre et al. (2004), while no influx was detected through posterior gills. The authors postulated that different cuticle selectivity for cations between both types of epithelia could explain different cadmium uptake. In this way, the cuticle could prevent the entry of cadmium inside the posterior gills and avoid deleterious effects.

In consequence, biochemical and physiological data, supported by the high degree of structural alterations observed in anterior gills, suggest that the respiratory epithelium of the Chinese crab may have lost its permeability properties to ions and water. Under such conditions, we suggest that an increase of the dissipative flows of ions and water, rather than direct effects on compensatory mechanisms, would explain the observed hyper-osmoregulatory capacity impairment.

Chronic Cd exposure can induce acclimation

Many ecotoxicological studies deal with unrealistic concentration of pollutant. However, in order to evaluate the environmental risk, it is of great interest to study the effects of toxicants as close as possible to realistic environmental conditions. Keeping this in mind, we exposed Chinese crabs to 10 or 50 $\mu\text{g Cd L}^{-1}$ for 30 days. Results show that under such chronic exposure, Cd does not perturb crab hyper-osmoregulatory capacity. However, animals consecutively exposed to chronic (50 $\mu\text{g Cd L}^{-1}$) and acute Cd (0.5 mg L^{-1} for 3 days) maintain their hemolymph osmolality and ionic concentrations at higher levels than crabs submitted to acute exposure only. We assume that during such chronic exposure, *E. sinensis* acquires acclimation mechanisms related to osmoregulation that induce increased resistance to Cd.

In contrast, a preliminary chronic exposure to 10 $\mu\text{g Cd L}^{-1}$ does not modify the response to acute Cd. Therefore, metal exposure needs to exceed a threshold to induce acclimation process. This idea was already put forward by McDonald and Wood (1993) for acclimation of fishes to metals. For fishes, metal level must exceed the threshold to generate branchial damage, a threshold which is higher than that needed to cause a detectable physiological disturbance. The cellular damage then initiates a repair process, which includes the expression of tolerance mechanisms. The existence of a threshold for acclimation implies that the pollution level of the environment has to exceed a minimal value to induce tolerance mechanisms. In the case of cadmium, most European rivers have water concentrations comprised between 10 and 500 ng Cd L^{-1} (Jensen et al., 1992). However, it is possible to encounter concentrations comparable or higher than the ones used in the present study in highly polluted water (Topalián et al., 1999; Vazquez et al., 1999). Accordingly, for the Chinese crab, acclimation to Cd is likely to occur in highly polluted environment only.

Na^+/K^+ -ATPase activity in posterior gills remains unchanged in all treatments. Therefore, hypothetical counterbalance of ionic loss by increasing compensatory active ions uptake through posterior gills has to be rejected. In contrast, for crabs defined as acclimated (CA50), anterior gills Na^+/K^+ -ATPase activity is comparable to the one measured in unexposed animals. Moreover, ultrastructure of these gills is only slightly damaged. In consequence, we propose that anterior gill permeability properties are preserved so that no increased dissipative flows of water and ions occur, maintaining the normal hyper-osmoregulatory capacity of the crab. It is thus likely that some acclimation mechanisms take place directly inside anterior gills. However, the whole gill structure is not protected or repaired.

The most sensitive structures, such as mitochondria, are still affected, which likely results in cytochrome c oxidase activity decrease.

The sequestration of cadmium by metallothioneins once the metal has entered the gill is a possible mechanism explaining acclimation. In fact, several authors found a correlation between acquired tolerance to metals and this cysteine-rich protein content in several species (Stuhlbacher et al., 1992; Stuhlbacher and Maltby, 1992; Sterenborg and Roelofs, 2003). Nevertheless, the activation of other mechanisms that would directly protect sensitive structures and enzymes against the toxicant can not be rejected. In this way, Vido et al. (2001) found in yeast that an induction of antioxidants such as glutathione and thioredoxin is essential for cellular defence against cadmium. Similar studies in the Chinese crab will undoubtedly bring us additional explanations for acclimation.

Conclusion

To our knowledge, this study is the first to report metal acclimation in relation with osmoregulation in decapod crustaceans. We suggest that during a chronic Cd exposure, sequestration, recovery, and/or protection mechanisms can take place and preserve organisms against an otherwise deleterious exposure. Moreover, we show that anterior gill is highly sensitive to Cd. We assume that the impairment of its structure can induce increased dissipative flows of ions and water in non acclimated crabs exposed to acute Cd. It is thus likely that acclimation mechanisms occur inside this kind of gill, reducing the effects of Cd on crab hyper-osmoregulatory capacity. Further studies will investigate some possible acclimation mechanisms such as the metal sequestration by metallothioneins or the synthesis of antioxidants.

Aknowledgements

We are very grateful to Marie-Claire Forget, Martine Albert, Chantale Devignon and Marie-France Six for their technical assistance, and to Virginie Gillardin for correcting the manuscript.

REPRINTED FROM : Comparative Biochemistry and Physiology - Part C, In press, Silvestre et al, "Hyper-osmoregulatory capacity of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) exposed to cadmium. Acclimation during chronic exposure." Copyright (2005), with the permission from Elsevier.

4.3. Notes complémentaires

4.3.1. Effets du Cd sur des crabes chinois acclimatés à de l'eau salée

La publication 2 montre que le Cd peut perturber les capacités hyper-osmorégulatrices du crabe chinois. Nous aimerions maintenant savoir si des crabes acclimatés à de l'eau salée, dans laquelle ils sont osmoconformes ou légèrement hypo-osmorégulateurs, ont leurs équilibres osmotique et ionique affectés par le Cd.

Pour ce faire, des crabes chinois ont été acclimatés à de l'eau salée pendant 11 jours. Ils ont été nourris et l'eau a été complètement renouvelée tous les deux jours. Cette eau a été préparée en dissolvant du sel marin synthétique Instant Ocean™ Aquarium Systems Inc. (Mentor, USA), dans de l'eau courante. Les caractéristiques de l'eau étaient : 801 mOsm kg⁻¹ ; 330 mM Na⁺ ; 428 mM Cl⁻ ; 15°C. Les crabes sélectionnés étaient tous des mâles (64 ± 22 g ; 51 ± 6 mm de largeur). Une seule exposition au Cd a été testée, soit celle qui avait montré des résultats significatifs en eau douce : 0,5 mg Cd l⁻¹ pendant 3 jours. L'osmolalité et les concentrations ioniques en Na⁺ et Cl⁻ de l'hémolymphe ainsi que les activités enzymatiques de la NKA et de la cytochrome c oxydase dans les deux types de branchies ont été mesurées comme décrit dans la publication 2. Un test t de Student a été utilisé entre la population témoin (n=6) et la population exposée au Cd (n=6) afin de comparer les moyennes. La normalité ainsi que l'homogénéité des variances ont été respectivement testées grâce aux tests de Shapiro-Wilks' W et Levene. Si l'une de ces deux conditions n'était pas respectée, le test non-paramétrique U de Mann-Whithney était utilisé. Le niveau de signification statistique a été fixé à 5%.

La figure 1 montre que l'osmolalité moyenne des organismes témoins est de 672 ± 42 mOsm kg⁻¹ ; la concentration en Na⁺ est de 296 ± 21 mM ; la concentration en Cl⁻ est de 351 ± 26 mM. Sous cette condition expérimentale, le crabe chinois est donc hypo-osmotique par rapport à l'eau salée environnante. Il ressort très clairement que ni l'osmolalité, ni les concentrations ioniques n'ont été modifiées suite à une exposition au Cd.

Par contre, si l'on examine les activités enzymatiques, on peut observer que l'activité de la NKA est significativement supérieure dans les branchies antérieures (0,088 ± 0,012 contre 0,055 ± 0,015 U mg⁻¹ prot.) et

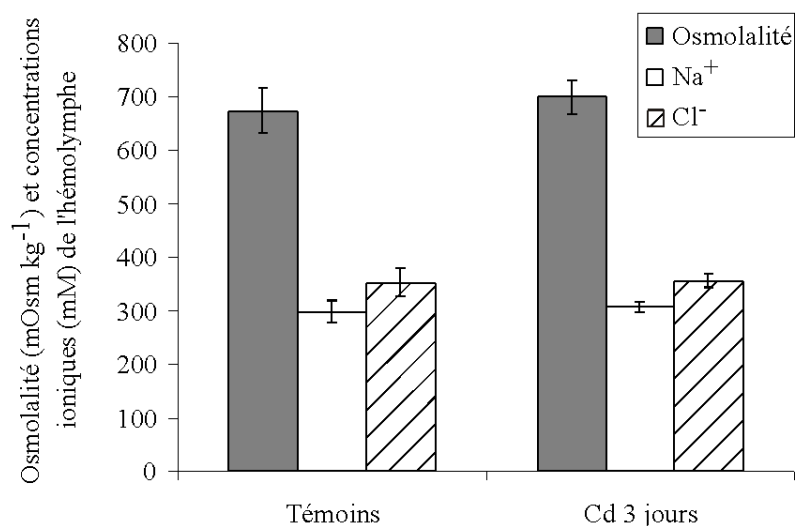


Fig. 1. *E. sinensis*. Effets d'une exposition au Cd 0,5 mg l⁻¹ pendant 3 jours sur l'osmolalité et les concentrations en Na⁺ et Cl⁻ de l'hémolymph de crabes acclimatés à de l'eau salée (témoins, n=6; Cd 3 jours, n=6). Moyennes ± E.T.

postérieures ($0,228 \pm 0,042$ contre $0,141 \pm 0,063$ U mg⁻¹ prot.) de crabes exposés au Cd par rapport à celles d'animaux témoins (Fig. 2.). Aucune différence n'a par contre pu être observée concernant l'activité de la cytochrome c oxydase (Fig. 3.).

Ainsi, de manière prévisible, une exposition au Cd semblable à celle qui avait provoqué une chute de l'osmolalité de l'hémolymph pour des crabes acclimatés à de l'eau douce, n'a plus d'effet sur les mêmes paramètres pour des organismes acclimatés à de l'eau salée. Plusieurs explications peuvent être avancées. Premièrement, la forme biodisponible du Cd, l'ion Cd²⁺, est présente en plus forte quantité en eau douce qu'en eau salée dans laquelle il est majoritairement lié au Cl⁻. Deuxièmement, l'acclimatation du crabe chinois à de l'eau salée pourrait modifier certains mécanismes de prise d'ions situés dans les branchies ce qui pourrait se traduire par une diminution de l'entrée de Cd dans cet organe (voir chapitre 3). Enfin, le gradient d'osmolalité entre l'hémolymph et l'eau environnante est moindre pour les animaux acclimatés à de l'eau salée qu'à de l'eau douce. En conséquence, même si le Cd avait les mêmes effets sur la perméabilité de l'épithélium des branchies antérieures, les répercussions

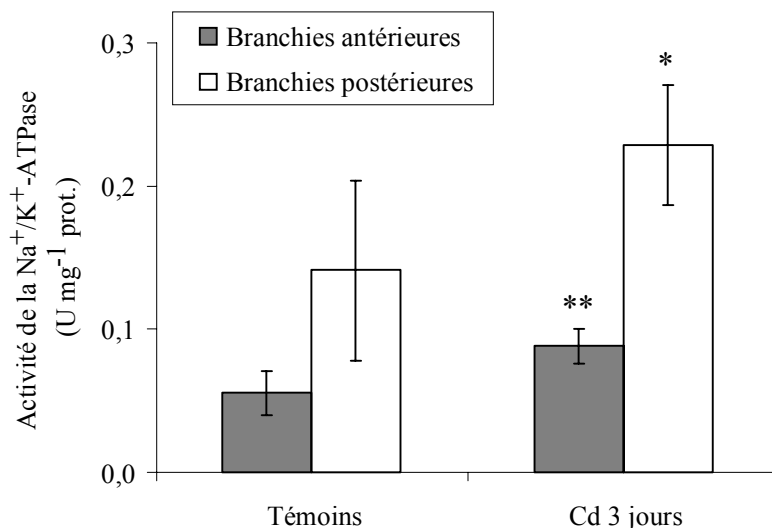


Fig. 2. *E. sinensis*. Effets d'une exposition au Cd 0,5 mg l⁻¹ pendant 3 jours sur l'activité de la Na⁺/K⁺-ATPase des branchies antérieures et postérieures de crabes acclimatés à de l'eau salée (témoins, n=6; Cd 3 jours, n=6). Moyennes ± E.T. * p<0,05 ; ** p<0,01.

sur l'osmolalité de l'hémolymphe seraient moins importantes pour les organismes acclimatés à de l'eau salée.

Cependant, le Cd semble tout de même interférer avec la physiologie branchiale chez des crabes acclimatés à de l'eau salée puisqu'une augmentation de l'activité de la NKA s'observe. Plus surprenant encore est le fait que cette augmentation soit aussi bien observée dans des branchies postérieures que dans des antérieures. Avec les données dont nous disposons, nous ne pouvons pas fournir d'explication suffisamment étayée à ce phénomène. Toutefois, le fait que l'on observe une augmentation plutôt qu'une inhibition, ajouté au fait que les branchies postérieures seraient concernées, nous permet d'envisager que cette augmentation d'activité enzymatique serait une réponse indirecte des branchies plutôt qu'un effet direct du Cd sur l'enzyme.

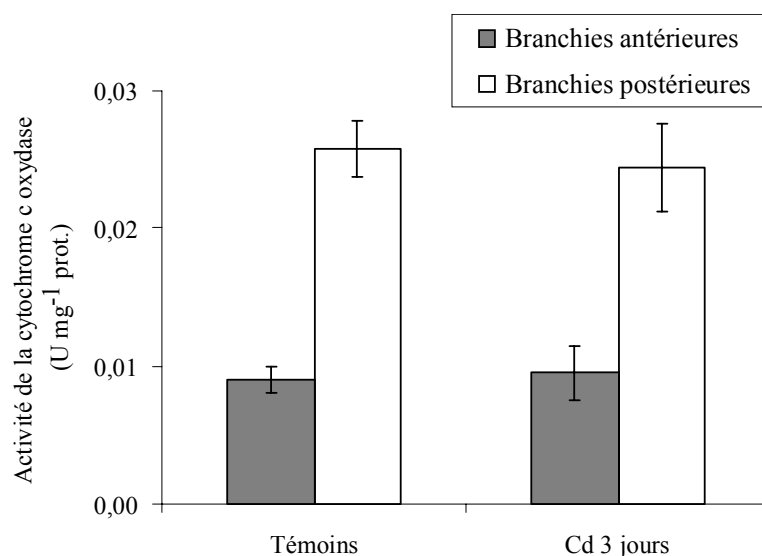


Fig. 3. *E. sinensis*. Effets d'une exposition au Cd 0,5 mg l⁻¹ pendant 3 jours sur l'activité de la cytochrome c oxydase des branchies antérieures et postérieures de crabes acclimatés à de l'eau salée (témoins, n=6; Cd 3 jours, n=6). Moyennes ± E.T.

4.3.2. Autres résultats

Le tableau 1 reprend quelques résultats complémentaires non publiés concernant les effets d'une exposition aiguë au Cd sur des crabes acclimatés à de l'eau douce ou à de l'eau salée. Les organismes utilisés sont les mêmes que ceux décrits aux points 4.2 et 4.3.1. La concentration en K⁺ dans l'hémolymphe a été mesurée selon le protocole décrit au point 4.2 grâce à un spectrophotomètre à flamme (Van Hopplynus, modèle IL243 LED). Les rapports Na⁺/Cl⁻ ont été calculés grâce aux valeurs reprises dans les points 4.2 et 4.3.1. L'activité des ATPases Mg²⁺ dépendantes (exprimée en U mg⁻¹ prot.) a été mesurée selon le même protocole que celui employé pour mesurer l'activité de la NKA et décrit au point 4.2. Elle est obtenue en utilisant de l'ouabaïne (inhibiteur spécifique de la NKA) dans la solution d'incubation. Enfin, les concentrations en protéines totales dans les homogénats de branchies sont également rapportées. Un test ANOVA à un critère a été utilisé afin de comparer les moyennes entre les crabes ED ayant subi différentes expositions au Cd alors qu'un test t de Student a été utilisé entre la population témoin et la population exposée au Cd pour les crabes ES. Pour les crabes ED, si une différence significative était

rapportée par l'analyse de la variance, nous avons utilisé le test LSD pour une comparaison 2 à 2. La normalité ainsi que l'homogénéité des variances ont été respectivement testées grâce aux tests de Shapiro-Wilks' W et Levene. Si l'une de ces deux conditions n'était pas respectée, nous avons utilisé les tests non-paramétriques de Kruskal Wallis sur les rangs suivi du test U de Mann-Whithney (ED) ou directement le test U de Mann-

Tableau 1. *E. sinensis*. Concentrations en K^+ et rapport Na^+/Cl^- dans l'hémolymph ; activités des ATPases Mg^{2+} dépendantes et concentration des protéines totales dans des homogénats de branchies antérieures et postérieures. Crabes exposés à du Cd $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ pendant 1, 2, ou 3 jours. Crabes acclimatés à de l'eau douce (ED) ou à de l'eau salée (ES). Le nombre de réplicats est indiqué entre parenthèses.

	K^+ (mM)	Na^+/Cl^-	Activité ATPases Mg^{2+} - dépendantes ($U \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$)		Protéines totales ($\text{mg g}^{-1} \text{ p.f.}$)	
			Branchies antérieures	Branchies postérieures	Branchies antérieures	Branchies postérieures
Témoin ED (9)	$6,3 \pm 1,1^a$	$0,99 \pm 0,05^a$	$0,090 \pm 0,020^a$	$0,242 \pm 0,055$	83 ± 8	98 ± 9^a
Cd 1 j (5)	$6,1 \pm 0,4^a$	$0,98 \pm 0,05^a$	$0,108 \pm 0,058^a$	$0,270 \pm 0,052$	75 ± 17	81 ± 9^b
Cd 2 j (4)	$6,6 \pm 0,2^a$	$0,93 \pm 0,06^a$	$0,074 \pm 0,012^a$	$0,199 \pm 0,014$	77 ± 7	102 ± 11^a
Cd 3 j (4)	$4,1 \pm 0,8^b$	$0,76 \pm 0,08^b$	$0,050 \pm 0,007^b$	$0,278 \pm 0,027$	76 ± 12	91 ± 12^{ab}
Témoin ES (6)	$6,8 \pm 1,3$	$0,84 \pm 0,02$	$0,087 \pm 0,020$	$0,204 \pm 0,035$	98 ± 15	98 ± 12
Cd 3 j (6)	$6,7 \pm 0,8$	$0,87 \pm 0,02$	$0,078 \pm 0,015$	$0,197 \pm 0,030$	89 ± 11	99 ± 11

Les groupes partageant la même lettre ne sont pas significativement différents. S'il n'y a pas de lettre, le test ANOVA n'est pas significatif.

Whithney (ES). Le niveau de signification statistique est fixé à 5%.

On observe que les concentrations en K^+ suivent les mêmes tendances que le Na^+ et le Cl^- puisqu'une diminution a été remarquée pour des crabes acclimatés à l'eau douce uniquement après 3 jours d'exposition à du Cd $0,5 \text{ mg l}^{-1}$.

Le rapport Na^+/Cl^- est proche de l'unité sauf pour les animaux exposés pendant 3 jours pour lesquels il est de 0,76. Ce résultat indique que c'est principalement l'équilibre sodique qui est touché suite à une exposition au Cd.

Alors que l'activité des ATPases dépendants du Mg^{2+} est stable dans les branchies postérieures, une diminution s'observe dans les branchies antérieures d'organismes acclimatés à l'eau douce et exposés au Cd pendant 3 jours. Ce résultat laisse supposer que le Cd n'exerce pas une

inhibition spécifique sur la NKA mais agit aussi sur d'autres enzymes. Toutefois la prudence s'impose et des études complémentaires sont nécessaires puisque ce résultat n'a pas été retrouvé lors de la seconde expérience (voir tableau 2).

Enfin, les concentrations en protéines totales mesurées dans les homogénats de branchies antérieures ne sont pas affectées par le Cd, alors qu'une faible diminution est rapportée dans les branchies postérieures après une exposition de 1 jour.

Concernant les crabes acclimatés à l'eau salée, aucune différence n'a pu être observée entre la population témoin et la population exposée au Cd, et ce quel que soit le paramètre étudié.

Tableau 2. *E. sinensis*. Concentrations en K^+ et rapport Na^+/Cl^- dans l'hémolymph ; activités des ATPases Mg^{2+} dépendantes et concentrations en protéines totales dans des homogénats de branchies antérieures et postérieures. Crabes exposés à du Cd : C0, témoins ; CA0, Cd $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ 3 jours ; C10, Cd $10 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ 30 jours ; CA10, Cd $10 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ 30 jours et ensuite Cd $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ 3 jours ; C50, Cd $50 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ 30 jours ; CA50, Cd $50 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ 30 jours et ensuite Cd $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ 3 jours. Le nombre de réplicats est indiqué entre parenthèses.

	K^+ (mM)	Na^+/Cl^-	Activité ATPases Mg^{2+} - dépendantes (U mg^{-1} prot.)		Protéines totales (mg g^{-1} p.f.)	
			Branchies antérieures	Branchies postérieures	Branchies antérieures	Branchies postérieures
C0 (5)	$6,03 \pm 1,3^a$	$1,06 \pm 0,06^a$	$0,096 \pm 0,009$	$0,293 \pm 0,024$	112 ± 13	120 ± 9
CA0 (5)	$4,4 \pm 0,9^{bc}$	$0,91 \pm 0,02^b$	$0,094 \pm 0,017$	$0,296 \pm 0,021$	100 ± 7	127 ± 16
C10 (5)	$5,0 \pm 0,6^{ac}$	$1,05 \pm 0,01^a$	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
CA10 (5)	$3,8 \pm 0,9^b$	$0,91 \pm 0,08^b$	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
C50 (7)	$5,2 \pm 1,1^{ac}$	$1,03 \pm 0,07^a$	$0,111 \pm 0,031$	$0,271 \pm 0,060$	94 ± 15	116 ± 11
CA50 (6)	$4,8 \pm 0,5^{bc}$	$1,07 \pm 0,08^a$	$0,125 \pm 0,019$	$0,294 \pm 0,063$	95 ± 7	121 ± 10

Les groupes partageant la même lettre ne sont pas significativement différents. S'il n'y a pas de lettre, le test ANOVA n'est pas significatif. N.D., non déterminé.

Le tableau 2 regroupe les même analyses pour des animaux acclimatés à l'eau douce et exposés à du Cd de manière chronique, ou successivement de manière chronique puis aiguë, tel que défini au point 4.2. Un test ANOVA à un critère a été utilisé afin de comparer les moyennes. Si une différence significative est rapportée par l'analyse de la variance, le test LSD est utilisé pour une comparaison 2 à 2. La normalité

ainsi que l'homogénéité des variances ont été respectivement testées grâce aux tests de Shapiro-Wilks' W et Levene. Si l'une de ces deux conditions n'est pas respectée, on utilise les tests non-paramétriques de Kruskal Wallis sur les rangs suivi du test U de Mann-Whithney. Le niveau de signification statistique est fixé à 5%.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de processus d'acclimatation touchant la concentration en K^+ dans l'hémolymph après une exposition de 30 jours dans du Cd $50\mu g\ l^{-1}$. Celle-ci n'est en effet pas significativement différente pour CA50 par rapport à CA10 et à CA0.

Par contre, le rapport Na^+/Cl^- est supérieur pour le groupe CA50 par rapport aux groupes CA10 et CA0. Ce rapport arrive pour CA50 au même niveau que pour C0. Une exposition chronique seule ne modifie par ce rapport.

L'activité des ATPases Mg^{2+} dépendantes ainsi que les concentrations totales en protéines dans les homogénats ne sont modifiées dans aucune condition, que ce soit dans les branchies antérieures ou postérieures. Contrairement à ce que nous avons observé dans le tableau 1, une exposition aiguë de 3 jours semble cette fois sans effet sur l'activité des ATPases Mg^{2+} dépendantes, ce qui voudrait dire que la NKA est plus sensible au Cd que ces enzymes.

Ces quelques résultats complémentaires montrent que les concentrations en K^+ de l'hémolymph sont, tout comme les concentrations en Na^+ et Cl^- , diminuées suite à une exposition aiguë au Cd pendant 3 jours. Ce résultats va dans le sens d'une perte des propriétés de perméabilité à l'eau et/ou aux ions, et confirme que le Cd induit une dilution de l'hémolymph. Nous montrons également que l'équilibre du Na^+ semble plus affecté (ou plus rapidement affecté) que celui du Cl^- . Cela suggère qu'une entrée d'eau n'est pas seule responsable de la diminution de l'osmolalité de l'hémolymph, mais que des ions sortent également plus facilement. Dans ce sens, le Cd induirait une augmentation de la perméabilité sélective des branchies antérieures vis-à-vis du Na^+ .

Enfin, terminons ce chapitre en mentionnant quelques observations morphologiques réalisées visuellement lors du prélèvement des branchies. Suite à une exposition aiguë au Cd ($0,5\ mg\ l^{-1}$ pendant 3 jours), les branchies antérieures provenant de crabes acclimatés à de l'eau douce étaient toutes devenues blanchâtres et semblaient turgescentes (Fig. 4.). Elles semblaient également plus fragiles. Des observations comparables ont également été réalisées chez des organismes préalablement acclimatés au Cd, mais de manière moins systématique et moins marquée. Ces observations confortent les analyses microscopiques montrant

d'importantes altérations ultrastructurales des branchies antérieures. S'il se confirme que ces branchies deviennent turgescents, cela soutiendrait l'hypothèse d'une perte de perméabilité de ce type de branchies suite à une exposition au Cd. Notons que, de manière prévisible, aucune altération de ce type n'a été observée sur les branchies postérieures.

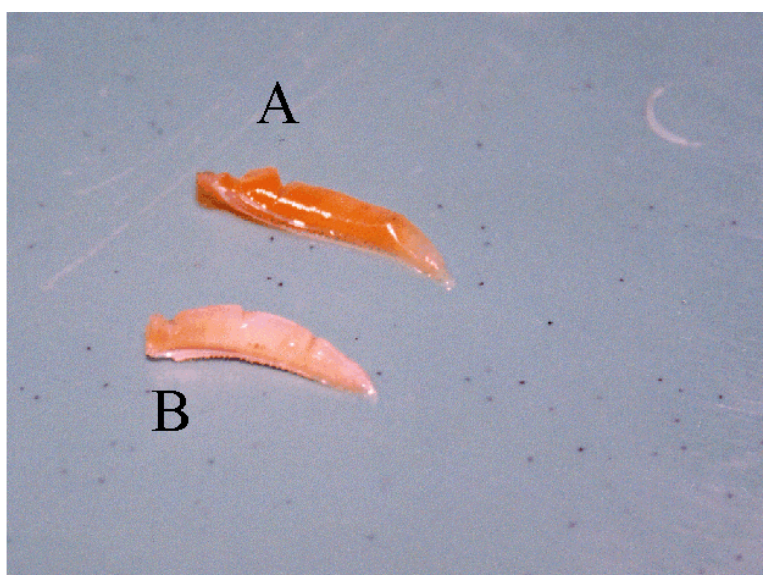


Fig. 4. *E. sinensis*. Branchies antérieures de crabes témoins (A), et de crabes exposés à 0,5 mg Cd l⁻¹ pendant 3 jours (B).

**5. ACCUMULATION DU Cd DANS LES
TISSUS. RÔLE JOUÉ PAR LES
MÉTALLOTHIONÉINES DANS
L'ACCLIMATATION**

5.1. Résumé

Après avoir évalué le flux entrant de Cd à travers les branchies antérieures et postérieures, après avoir identifié une condition expérimentale induisant des effets délétères sur l'hyper-osmorégulation du crabe chinois, et après avoir montré qu'une exposition chronique précédant une exposition aiguë pouvait induire un processus d'acclimatation, il était indiqué de mesurer les niveaux d'accumulation du Cd dans différents organes et tissus de crabes chinois soumis aux mêmes conditions expérimentales que celles décrites au point 4.1. De plus, les métallothionéines étant souvent rendues responsables d'une résistance accrue aux métaux (voir chapitre 1.4), on a cherché à voir si elles pouvaient expliquer l'acclimatation observée chez le crabe chinois exposé pendant 30 jours à du Cd $50 \mu\text{g l}^{-1}$.

La moitié des crabes chinois exposés pendant 30 jours à 0, 10 et $50 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ a été sacrifiée (respectivement nommés C0, C10, C50) alors que l'autre moitié a été soumise à une exposition aiguë ($0,5 \text{ mg Cd l}^{-1}$ pendant 3 jours) (respectivement nommés CA0, CA10, CA50). L'hémolymph a été prélevée ainsi que des morceaux de carapace, des muscles des pattes, l'hépatopancréas, les branchies antérieures gauches et les branchies postérieures gauches. Après déshydratation et digestion dans de l'acide nitrique, la concentration en Cd a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption atomique. Les branchies antérieures et postérieures droites ainsi qu'une partie de l'hépatopancréas ont été homogénéisés afin d'évaluer la teneur en protéines de type métallothionéines (MTLPs) grâce à la technique de saturation à l'argent.

Les résultats montrent que les différents organes et tissus n'accumulent pas les mêmes quantités de Cd. Les branchies antérieures en renferment les plus fortes concentrations (moyenne maximale de $188 \mu\text{g Cd g}^{-1} \text{ p.f.}$), suivies par l'hépatopancréas (moyenne maximale de $63 \mu\text{g Cd g}^{-1} \text{ p.f.}$), les branchies postérieures (moyenne maximale de $45 \mu\text{g Cd g}^{-1} \text{ p.f.}$), la carapace (moyenne maximale de $4,42 \mu\text{g Cd g}^{-1} \text{ p.f.}$), l'hémolymph (moyenne maximale de $2,49 \mu\text{g Cd ml}^{-1}$) et les muscles (moyenne maximale de $0,35 \mu\text{g Cd g}^{-1} \text{ p.f.}$).

Dans les branchies antérieures, une saturation en Cd semble être atteinte sous les conditions CA0, CA10, C50, et CA50. Seules les conditions C0 et C10 correspondent à des concentrations plus faibles. De

plus, la teneur en MTLPs augmente de la manière la plus importante après une exposition aiguë sans exposition chronique préalable ($135 \mu\text{g g}^{-1}$ p.f. contre $42 \mu\text{g g}^{-1}$ p.f. pour C0). Sous cette condition, une corrélation significative apparaît entre la concentration en Cd et la teneur en MTLPs, alors qu'une telle corrélation n'a pas pu être montrée après une exposition aiguë pour des organismes préalablement acclimatés. Cependant, le potentiel théorique de séquestration du Cd par les MTLPs (calculé sur base qu'une molécule de MTLP peut séquestrer au maximum 6 atomes de Cd) est largement dépassé quelle que soit l'exposition.

Par contre, la concentration maximale en Cd dans l'hépatopancréas a été observée pour des organismes ayant subi une exposition aiguë après une exposition chronique de $50 \mu\text{g Cd l}^{-1}$. De plus, la teneur en MTLPs est supérieure pour les animaux acclimatés pendant 30 jours à $50 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ ($580 \mu\text{g g}^{-1}$ p.f. pour C50 et $573 \mu\text{g g}^{-1}$ p.f. pour CA50) en comparaison aux autres conditions ($352 \mu\text{g g}^{-1}$ p.f. pour C0). Sous toutes les conditions, les MTLPs sont théoriquement capables de séquestrer la totalité du Cd accumulé, même si la saturation théorique a été atteinte pour CA50.

En conclusion, cette étude a révélé que pendant une acclimatation à $50 \mu\text{g Cd l}^{-1}$, le crabe chinois acquiert la capacité d'accumuler davantage de Cd dans l'hépatopancréas où il peut être séquestré par des MTLPs. Au contraire, la synthèse de MTLPs semble être une réponse rapide à une exposition aiguë dans les branchies antérieures. Toutefois, elle n'est pas suffisante pour permettre la séquestration de la totalité du Cd accumulé. En conséquence, d'autres mécanismes de séquestration/détoxication du Cd doivent être mis en place pendant une acclimatation, ce qui permettrait aux branchies antérieures de résister à des concentrations élevées en Cd.

5.2. Publication 3 : Tissue-specific cadmium accumulation and metallothionein-like protein levels during acclimation process in the Chinese crab *Eriocheir sinensis*.

F. Silvestre, C. Duchêne, G. Trausch, P. Devos.

Comparative Biochemistry and Physiology Part C – accepté, sous presse.

Abstract

Aquatic organisms chronically exposed to cadmium can increase their resistance to a subsequent elevated exposure. In order to investigate mechanisms involved in acclimation process in the Chinese crab *Eriocheir sinensis*, we compared Cd level as well as metallothionein-like protein (MTLP) content in different tissues after direct acute exposure (i.e. 500 $\mu\text{g Cd L}^{-1}$ for 3 days), and after acute following chronic (i.e. 10 or 50 $\mu\text{g Cd L}^{-1}$ for 30 days) exposure. Cadmium accumulation occurred in the following order: anterior gill > hepatopancreas > posterior gill > carapace > hemolymph > muscle. As high concentrations as 188 $\mu\text{g Cd g}^{-1}$ w.w. were reported in anterior gills and seem to reach a saturation level. In these gills, the highest MTLP induction was observed after a direct acute exposure, for which a correlation with Cd content occurred. However, the Cd-binding potential by MTLPs was exceeded for any exposure condition. In hepatopancreas, the highest Cd level was reported for crabs acclimated during 30 days to 50 $\mu\text{g Cd L}^{-1}$ before challenging with an acute exposure. Moreover, we showed that MTLPs were induced during the acclimation process. In this organ, MTLPs are theoretically sufficient to bind all Cd. These results suggest that during a chronic exposure to 50 $\mu\text{g Cd L}^{-1}$, Chinese crabs acquire the capacity to hold more cadmium in hepatopancreas where it can be sequestered by MTLPs. On the contrary, MTLP induction seem to be a rapid response to acute exposure in anterior gill, but is not sufficient to sequester all Cd. Other sequestration and/or detoxification mechanisms must take place in anterior gill to cope with high Cd levels.

Keywords: acclimation; cadmium; *Eriocheir sinensis*; gills; hepatopancreas; metal accumulation; metallothionein-like proteins.

Introduction

Cadmium (Cd) is a highly toxic pollutant found in rivers, estuaries and near-shore waters. Most European rivers have water Cd concentration comprised between 10 and 500 ng Cd L⁻¹ (Jensen et al., 1992). However, it is possible to encounter higher concentrations in polluted environment (Topalián et al., 1999; Vazquez et al., 1999). Aquatic organisms that encounter waterborne Cd over a long duration can induce acclimation process. It is defined as increased tolerance of an elevated, usually lethal, concentration of a toxicant arising from chronic exposure to a sublethal concentration of that toxicant (McDonald and Wood, 1993). Increased tolerance to Cd following a pre-treatment has been shown for different aquatic 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 (Silvestre et al., in press), we found increased resistance to Cd related to hyper-osmoregulatory capacity, for euryhaline Chinese mitten crabs submitted to a chronic exposure (i.e. 50 µg Cd L⁻¹ for 30 days), subsequently followed by an acute exposure (i.e. 500 µg Cd L⁻¹ for 3 days). These crabs maintained the hemolymph osmolality (i.e. 508 mOsm kg⁻¹) and ionic concentrations (i.e. 276 mM Na⁺) at significantly higher levels than animals submitted to 500 µg Cd L⁻¹ for 3 days without any pre-treatment (i.e. 423 mOsm kg⁻¹ and 201 mM Na⁺). On the other hand, hyper-osmoregulatory capacity of crabs chronically exposed to 10 instead of 50 µg Cd L⁻¹ was decreased after a subsequent acute exposure (i.e. 430 mOsm kg⁻¹ and 203 mM Na⁺), suggesting that Cd exposure needs to exceed a threshold to induce acclimation process.

Gills are largely responsible for the ionoregulatory capacity of the Chinese crab. However, the three most posterior located pairs of gills and the anterior ones are clearly distinguished by their ultrastructure and physiology (Barra et al., 1983). While posterior gills actively pump ions from the surrounding water, anterior gills are considered as largely respiratory with passive movements of Na⁺ only (Péqueux and Gilles, 1981; Gilles et al., 1988). We previously found that anterior gills were more sensitive and more permeable to Cd than posterior gills (Silvestre et al., 2004; in press). 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 proposed that an increase of the dissipative flows of ions and water through anterior gills would contribute to the observed hyperosmoregulatory capacity impairment. Most of these alterations were prevented when the acute exposure follows a chronic exposure to 50 $\mu\text{g Cd L}^{-1}$ for 30 days.

Several defence mechanisms at physiological, biochemical and molecular levels are known to be initiated during acclimation process to overcome metal toxicity. In eukaryotes, cell sequestration of the metal by cysteine-rich peptides such as glutathione, phytochelatins and metallothioneins have been described (Singhal et al., 1987; Klaassen et al., 1999; Cobbett, 2000). Metallothioneins are low molecular weight proteins (6130 Da in *E. sinensis*; <http://us.expasy.ch/cgi-bin/niceprot.pl?Q95U92>), that bind metals in polymetallic-thiolate clusters (Romero-Isart and Vasák, 2002). They appear to be involved in the homeostatic equilibrium of essential metals such as zinc and copper, but they are also believed to play an important role in metal detoxification (Roesijadi, 1992). However, a complete understanding of these defence mechanisms and their relevance in acclimation process is far from complete.

The aim of this work was to determine, in *E. sinensis*, whether tissue-specific cadmium accumulation is modified during acclimation process and whether metallothionein-like proteins (MTLPs) induction can explain the observed increased resistance to this metal.

Materials and methods

Animals

Chinese mitten crabs, *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards, 1854) (*Crustacea, Decapoda*) were caught in freshwater lakes near Emden (Germany) in autumn 2002. They were kept in static aerated 60-L tanks filled with tap water ($14.4 \pm 0.3^\circ\text{C}$; pH 8.2 ± 0.3 ; $7.8 \pm 1.0 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$; 2 mOsm kg^{-1} ; $64 \text{ mg Ca}^{2+} \text{ L}^{-1}$; $\text{Cd}^{2+} < 1 \mu\text{g L}^{-1}$) for at least one week before experiments (density was 15 crabs in 60 L water). Throughout all experiments we applied a light regime of 10h of light and 14h of darkness. Water was completely changed and animals were fed every other day with surimi stick. Uneaten food was removed at the end of the day.

Experimental setup

We first performed a “so-called” chronic (30 days) Cd experiment on intermolt males (86 ± 33 g; 55 ± 6 mm width). One group was exposed to a nominal concentration of $10 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ (C10) (actual measured values comprised between 4 and $18 \mu\text{g Cd L}^{-1}$, mean 11) while another group was exposed to $50 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ (C50) (actual measured values comprised between 22 and $66 \mu\text{g Cd L}^{-1}$, mean 47). Cadmium was added as CdCl_2 (Sigma-Aldrich, USA). A third group was used as control (C0) (actual measured value $< 1 \mu\text{g Cd L}^{-1}$). At the end of the exposure, half of the organisms in each group was sacrificed and tissues removed for Cd and MTLTP analysis. The remaining organisms were challenged with a subsequent acute (3 days) Cd exposure at $500 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ (actual measured values comprised between 430 and $570 \mu\text{g Cd L}^{-1}$, mean 500). These sub-samples are called CA10, CA50 and CA0 respectively. Mortality was similar for controls and for crabs exposed to Cd after 30 days (26, 35, 23% for C0, C10 and C50, respectively) indicating no increased mortality induced by Cd exposure. After a subsequent 3 days acute exposure, mortality was 15, 0 and 0% for CA0, CA10 and CA50, respectively. Final number of replicates was 9 (C0), 8 (C10), 10 (C50), 11 (CA0), 7 (CA10) and 11 (CA50).

The three posterior gills and the three anterior ones from each side were cut free of their insertion and separately blotted on a filter paper. Small pieces of the carapace, the leg muscles and the hepatopancreas were removed, whereas hemolymph was drawn from each crab with a syringe by puncturing the membrane at the base of the third walking leg.

Cadmium analysis

Gills from the left side, pieces of hepatopancreas, carapace and muscles were dried for 24 h at 120°C . All samples including hemolymph were then subjected to nitric acid digestion (95% pro analysis, Sigma-Aldrich, USA) for 24 h at 80°C . Cadmium levels were determined by atomic absorption spectrophotometry (PU9200X Philips, The Netherlands) at a wavelength of 228.8 nm. Metal concentration is expressed as $\mu\text{g Cd g}^{-1}$ wet weight for gill, hepatopancreas, carapace and muscle, and as $\mu\text{g Cd mL}^{-1}$ for hemolymph. A detection limit (DL) was defined as the concentration that produces absorption equivalent to twice the magnitude of the background fluctuation (Winefordner and Long, 1983). It is determined for each tissue according to the following formula:

$$\text{DL} = \text{mean of 10 blanks} + (2 \times \text{S.D.})$$

where S.D. is the standard deviation of the 10 blanks. If a concentration was lower than the DL, we used DL/2 to calculate the means.

MTLP measurement using the silver saturation assay

For MTLP measurement, pieces of hepatopancreas, anterior and posterior gills from the right side were weighed and placed in a homogenising tube with 3 (hepatopancreas) or 5 (gills) volumes of 0.25 M sucrose. The mixtures were homogenised twice for 30 s on ice with a Teflon (hepatopancreas) or glass (gills) pestle. The samples were centrifuged at 18 000 x g for 20 min and aliquots of 400 µl supernatant were analysed for MTLP content by the silver saturation method (Scheuhammer and Cherian, 1991; del Ramo et al., 1995) with small modifications. They were incubated for 5 min with a silver solution (2.5 mg L⁻¹) at room temperature to saturate the binding sites of MTLPs. The addition of 200 µl of sheep red blood cell hemolysate followed by a heat treatment (100°C for 1.5 min) caused the precipitation of excess silver bound to hemoglobin or other proteins except MTLPs which are heat stable. The denatured proteins were removed by centrifugation (1 200 x g for 10 min). The hemolysate addition, heat treatment and centrifugation were repeated three times. Silver levels were then measured in the supernatant by atomic absorption spectrophotometry (PU9200X Philips, The Netherlands) at a wavelength of 328.1 nm. A calibration curve was drawn with increasing concentrations of purified MTs from rabbit liver (M7641, Sigma-Aldrich, USA) in a range of concentrations from 0 to 80 µg mL⁻¹. Data are expressed as µg MTLPs g⁻¹ wet weight. A detection limit was calculated as described above.

We calculated the Cd-binding potential (CBP) for hepatopancreas and anterior gill, which is the ratio of Cd concentration to the theoretical maximum metal bound by MTLPs, using the following equation:

$$CBP = \frac{Cd \text{ concentration } (M)}{MTLP \text{ concentration } (M) \times 6}$$

A ratio of 6 mol Cd/mol MTLP was assumed for crustaceans MTLPs (Roesijadi, 1992). If the CBP exceeds one, all the Cd may not be bound by MTLPs (Hollis et al., 2001).

Statistical analysis

Data are expressed as mean $\pm$ S.D. Statistical significance was tested by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-hoc tests. Normality and homogeneity of variances were examined by Shapiro-Wilks' W and Bartlett tests respectively. When necessary, the data were log-transformed to get homogeneous variances and a normal distribution. If one of these conditions was not satisfied, we performed non parametric Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks followed by Mann-Whitney U test. Spearman rank correlation coefficients (r_s) were calculated between Cd-concentrations and MTLP-levels. Significance level was defined as $p < 0.05$.

Results

Cd accumulation

Average Cd concentrations measured in the Chinese crab are presented in Fig. 1 for hepatopancreas and gills. We observe that the highest Cd levels were found in anterior gills (Fig. 1B) for all treatments. Average metal concentration as high as $188 \pm 89 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w. was reported for CA50 and was not significantly different from CA0, CA10 and C50. Only chronically exposed C10 crabs showed lower Cd level ($27 \pm 20 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w.).

Cd burden in posterior gills (Fig. 1C) was between 3.5 and 16.2-fold lower than in anterior ones. Maximum concentrations were found for CA10 and CA50 (45 ± 20 and $36 \pm 38 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w., respectively).

In hepatopancreas (Fig. 1A) of control animals, Cd concentration reached $0.30 \pm 0.25 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w. The metal levels increased to 7.4 ± 8.4 (C10) and to $27 \pm 16 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w. (C50) after chronic exposure. After an acute exposure, significantly more elevated concentrations were found for animals previously acclimated to $50 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ ($63.0 \pm 29.8 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w.)

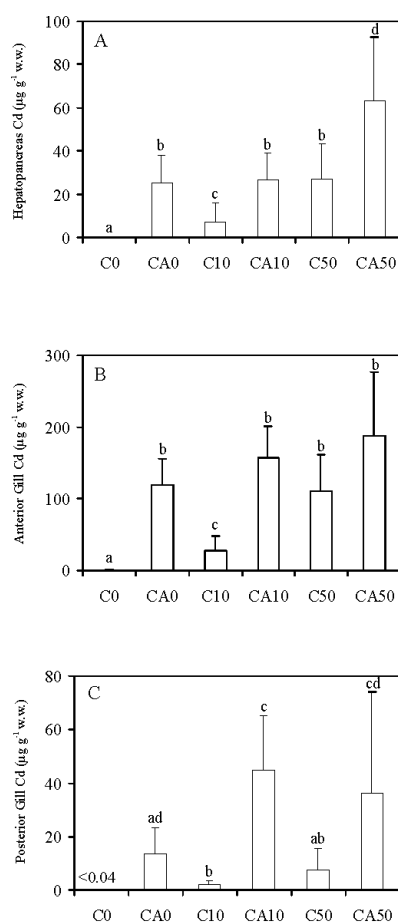


Fig. 1. Cd concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}\text{w.w.}$) in hepatopancreas (A), anterior gill (B) and posterior gill (C) from *Eriocheir sinensis*.

C0: $0 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ 30 days ($n=9$); CA0: $0 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ 30 days and then $500 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ 3 days ($n=11$).

C10: $10 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ 30 days ($n=7$, hepatopancreas; $n=8$, anterior and posterior gills); CA10: $10 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ 30 days and then $500 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ 3 days ($n=7$).

C50: $50 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ 30 days ($n=10$); CA50: $50 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ 30 days and then $500 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ 3 days ($n=11$).

Common letter shared by two conditions represents no significant difference at $p < 0.05$ between both conditions.

than for animals previously acclimated to $10 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ ($26.7 \pm 12.4 \mu\text{g g}^{-1}\text{w.w.}$) or for non acclimated crabs ($24.9 \pm 13.4 \mu\text{g g}^{-1}\text{w.w.}$).

Cd was present at lower levels in the three other studied tissues (Table 1). It was in the order carapace > hemolymph > muscle. For these tissues, significantly higher concentrations were found in animals acutely

exposed (CA0, CA10 and CA50) than in controls (C0) and in animals submitted to a chronic Cd exposure only (C10 and C50).

Table 1. Cd concentrations in muscle, carapace ($\mu\text{g g}^{-1}$ w.w.) and hemolymph ($\mu\text{g mL}^{-1}$) from *Eriocheir sinensis*. N = 9 (C0); 10 (CA0) (except for muscle, 11); 7 (C10) (except for muscle, 6); 7 (CA10); 10 (C50); 11 (CA50). See Fig. 1 legend for abbreviations.

	Muscle	Carapace	Hemolymph
C0	< 0.02	0.03 ± 0.02^a	< 0.02
CA0	0.21 ± 0.12^a	2.29 ± 1.67^b	2.49 ± 2.82^a
C10	< 0.02	0.25 ± 0.10^c	< 0.02
CA10	0.24 ± 0.13^a	4.42 ± 1.84^d	1.85 ± 0.89^a
C50	0.08 ± 0.03^b	0.83 ± 0.25^e	0.11 ± 0.11^b
CA50	0.35 ± 0.15^a	3.84 ± 1.16^d	1.48 ± 1.65^a

Common letter shared by two conditions represents no significant difference at $p < 0.05$ between both conditions

MTLP levels

In hepatopancreas, average MTLP level reached $352 \pm 271 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w. (Fig. 2A) for controls and was not significantly different from levels found in CA0, C10 and CA10. A chronic Cd exposure at $50 \mu\text{g l}^{-1}$ induced a significant raise to $580 \pm 100 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w. (C50), or to $573 \pm 240 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w. when it was followed by an acute exposure (CA50).

MTLPs were detected in anterior gill at an average basal level of $41.9 \pm 18.6 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w. (Fig. 2B). Cd exposure enhanced this MTLP content under all conditions but CA10, with the maximum average level found for CA0 ($135.5 \pm 80.6 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w.).

In posterior gill, MTLP contents were very low for all treatments and only detected for CA10 ($4.3 \pm 1.9 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w.) and CA50 ($9.6 \pm 7.6 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w.) (Fig. 2C).

Correlations between MTLP levels and Cd concentrations in hepatopancreas and anterior gills are shown in Fig. 3. A correlation was significant in hepatopancreas (A) for CA50 (r_s : 0.65; $p < 0.05$) and in

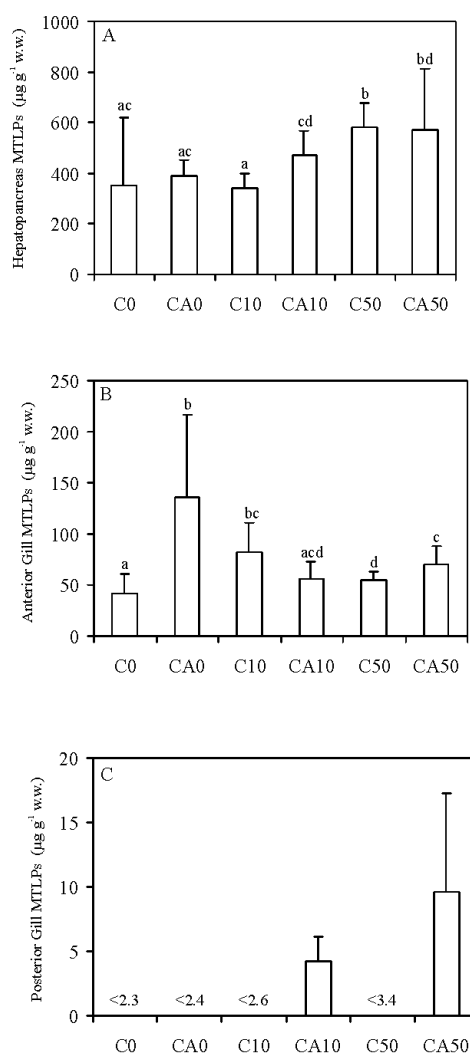


Fig. 2. MTLTP concentrations ($\mu\text{g g}^{-1} \text{w.w.}$) in hepatopancreas (A), anterior gill (B) and posterior gill (C) from *Eriocheir sinensis* exposed to Cd. N=10 (C0); 11 (CA0); 7 (C10) (except for hepatopancreas, n=8); 7 (CA10); 10 (C50); 11 (CA50). See Fig. 1 legend for abbreviations. Common letter shared by two conditions represents no significant difference at $p < 0.05$ between both conditions.

anterior gill (B) for CA0 (r_s : 0.65; $p < 0.05$). No correlation was observed in posterior gill (results not shown).

Cd-binding potentials (CBP) are presented in Fig. 4 for hepatopancreas and anterior gills. In hepatopancreas, it was lower than 1

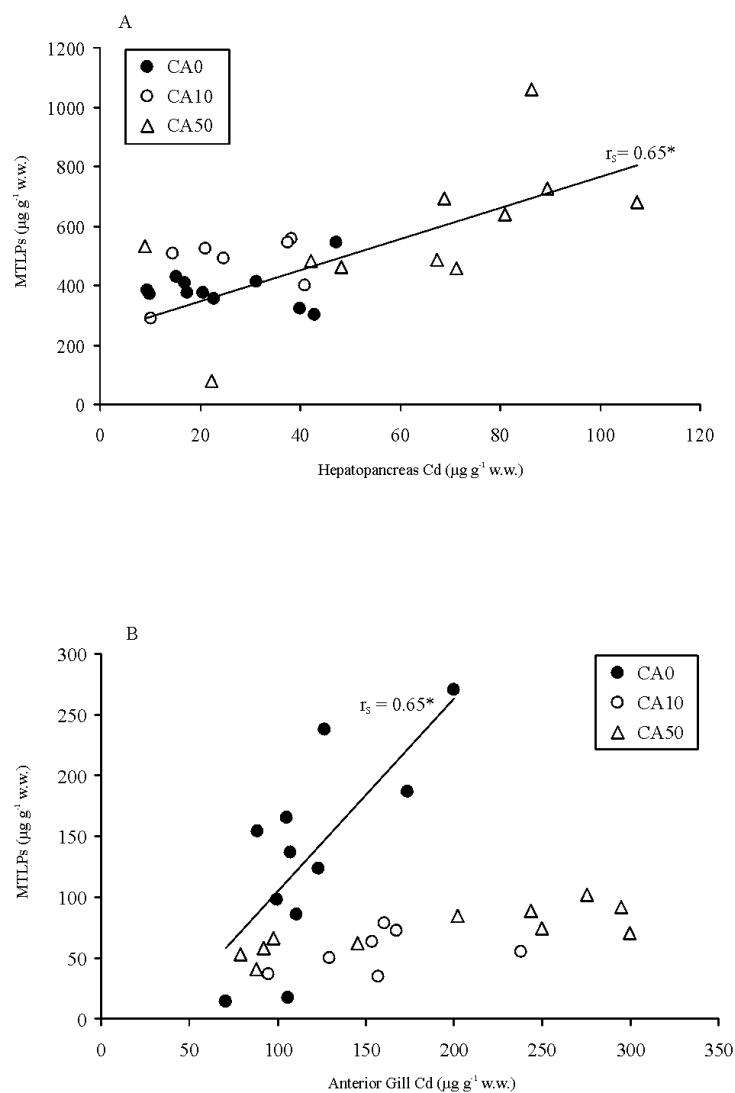


Fig. 3. *Eriocheir sinensis* exposed to Cd. MTLP concentrations in hepatopancreas (A) and anterior gill (B) as a function of tissue Cd concentrations for CA0, CA10 and CA50 (see Fig. 1 legend for abbreviations). Linear regression equations are $y = 5.23x + 243.53$ in hepatopancreas for CA50; $y = 1.59x - 54.30$ in anterior gill for CA0. Spearman rank correlation coefficients (r_s) are given on the graphs. * $p < 0.05$.

under all conditions but CA50 for which it was 1.1. On the contrary, it was much higher than 1 in anterior gill for all conditions but controls, with a maximum of 27.0 (CA10).

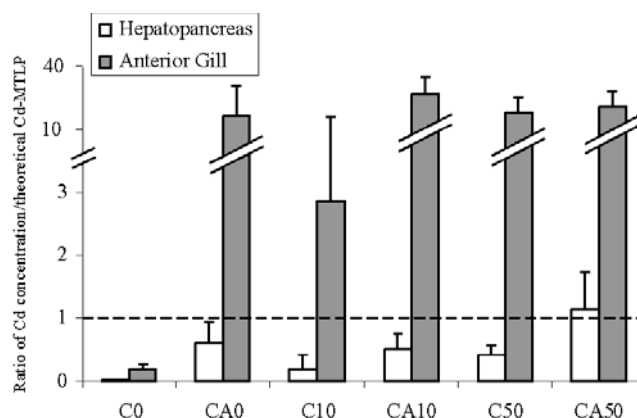


Fig. 4. Average Cd-binding potentials (CBP) of MTLP's for hepatopancreas and anterior gill from *Eriocheir sinensis*. A horizontal dotted line is drawn as a reference line for theoretically complete MTLPs saturation by Cd. See Fig. 1 legend for abbreviations and number of observations.

Discussion

Cadmium is known to induce detrimental effects on aquatic organisms such as respiratory or osmoregulatory impairment (Thurberg et al., 1973; Bjerregaard and Vislie, 1985; Zyadah and Abdel-Baky, 2000). In the euryhaline Chinese crab, we previously reported that an acute cadmium exposure (i.e. $500 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ for 3 days) damaged anterior gill ultrastructure and inhibited enzymatic activities (i.e. Na^+/K^+ -ATPase and cytochrome c oxidase), leading to general hyper-osmoregulatory capacity loss (Silvestre et al., in press). The present study reveals that anterior gill of the Chinese crab accumulates high amount of cadmium. Cd burden seems however to reach a maximum level between 100 and $200 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w., suggesting that all Cd binding sites in anterior gill could be saturated. Crustacean gills act as an important site of Cd uptake from the environment (Jennings and Rainbow, 1979). In the Chinese crab, we previously showed a high Cd influx rate through perfused anterior gill (Silvestre et al., 2004). As a consequence, these gills appear to be a main target to waterborne Cd, and probably play a significant role in metal uptake and transfer to the internal compartments via the hemolymph.

Our results clearly show that MTLPs are not sufficient to protect anterior gills against deleterious effects of Cd. MTLPs are low molecular weight cysteine-rich proteins that can sequester toxic metals. In Chinese crab anterior gills, we observed a 3.2-fold induction of these proteins after a deleterious acute Cd exposure. However, this induction appeared to be insufficient to sequester all the metal inside this organ since the CBP largely exceeded 1. A metal level reaching $119 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w. after 3 days exposure to $500 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ can not be completely sequestered by MTLPs and explains the detrimental effects previously observed in anterior gills under the same condition.

On the other hand, we show that the three most posterior gills accumulate lower amount of Cd than anterior gills, while no morphological or biochemical effect were previously reported (Silvestre et al., in press). This low Cd level can be related to the low MTLP content in this organ (below the DL except for CA10 and CA50), and to the lack of metal influx measured through this kind of gills (Silvestre et al., 2004). The reasons for the observed differences between both gills are not clear but a putative role of the cuticle to prevent the entry of cadmium inside posterior gill has been advanced as a possible explanation. Cuticle is important to determine hemolymph osmolality. It modifies the epithelium permeability when the external composition changes (Lignon, 1987; Péqueux and Lignon, 1988). Usually, in euryhaline species, cuticle has a strong selectivity for cations while there is no selectivity in osmoconform species. Interestingly, the posterior gills cuticle of *E. sinensis* present a lower selectivity to Na^+ than the anterior gills cuticle (Lignon, 1987). We hypothesize that different Cd uptake and burden between anterior and posterior gills could at least in part be explained by different selectivity of the cuticle to cations. Although further studies are necessary to verify this assumption, we propose that less metal can consequently enter inside the posterior gill epithelial cells and thus induces less deleterious effects.

Anterior gills of crabs exposed to Cd at $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (but not at $10 \mu\text{g L}^{-1}$) for 30 days before challenging with an acute exposure (CA50) revealed little morphological or biochemical impairment. Under such condition, Chinese crabs maintained their hyper-osmoregulatory capacity at normal level (Silvestre et al., in press), indicating that acclimation process take place during chronic exposure. The present study revealed that Cd content in anterior gill was similar for CA50 crabs and for animals directly exposed to acute Cd (CA0). In consequence, we propose that mechanisms arose during the acclimation period that protect anterior gill against high Cd burden.

Surprisingly, a putative MTLP induction in anterior gill can not explain an increased resistance to Cd since more MTLPs are observed for CA0 than for CA50. Moreover, a correlation was reported between Cd concentration and MTLP content for CA0 only. Last, the CBP largely exceeded 1 in this organ, no matter the exposure condition. These results suggest that MTLP induction is a rapid response occurring in anterior gills during an acute Cd exposure. During a chronic Cd exposure, other sequestration and/or detoxification mechanisms, such as a possible synthesis of antioxidants (Vido et al., 2001), which would protect epithelial cells against deleterious effects of Cd, must take place to enable anterior gill to cope with high Cd levels.

Hepatopancreas also accumulates high amount of Cd. During 30 days of chronic exposure alone, Cd burden increased from basal level for C0 ($0.3 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w.) to higher levels for C10 ($7.4 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w.) and for C50 ($27.3 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w.). If the average value for C10 was similar to levels reported for other crab species caught in natural habitat (Turoczy et al., 2001), the average value for C50 was more elevated, indicating that crab hepatopancreas could accumulate high quantities of Cd when exposed to very polluted water.

Cd binding to MTLPs likely explains at least in part the capacity of hepatopancreas to accumulate high amount of this metal. Basal average level of this protein for C0 already reached $352 \mu\text{g g}^{-1}$ w.w. Moreover, these proteins can be induced in hepatopancreas for crabs exposed to high Cd concentrations. Indeed we observed significant higher MTLP level for C50 crabs than for C0 and C10. This induction maintained the CBP largely below 1, resulting in a theoretical excess of Cd binding sites.

For crabs submitted to a so-called acute exposure, significant higher Cd burden in hepatopancreas was observed when animals were previously exposed to $50 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ for 30 days. Under this condition, we reported a positive correlation between MTLP level and Cd concentration, indicating a likely binding of Cd to these proteins. Moreover the CBP was near 1. Consequently, hepatopancreas accumulated Cd at the theoretical maximal binding capacity of MTLPs. These results clearly illustrate that MTLPs play an important role in the capacity of hepatopancreas to deal with high quantities of Cd. Nevertheless, we do not know if other metals such as Zn and Cu could be displaced from MTLP binding sites by Cd. Further studies are necessary to evaluate the potential effect of a possible MTLP saturation by Cd on other metals homeostasis.

The MTLP level in hepatopancreas of crabs submitted to $50 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ alone, reached a similar level as for CA50 animals, in spite of lower

average Cd concentration. Consequently, we suggest that during a chronic Cd exposure, hepatopancreas acquires the capacity to accumulate and sequester more metal when submitted to a subsequent acute exposure. We assume that the Chinese crab increases its tolerance to Cd at least in part by improving the hepatopancreas capacity to sequester the metal through the induction of MTLPs, as already suggested for fishes (Knapen et al., 2004).

Muscle, carapace and hemolymph have lower Cd concentration than gills and hepatopancreas. For all these tissues, acute exposure induced more Cd burden than chronic exposure alone. However, if we assume that exoskeleton represents about 40% of the body wet weight of crabs (Wright and Brewer, 1979), carapace accumulates a total quantity of Cd similar to anterior gills (e.g. for CA50, 132 and 113 µg Cd in carapace and anterior gills, respectively, for a total average anterior gills wet weight of 0.6 g and a total average body weight of 86 g). The reason for a high metal quantity found in carapace could be a competition between cadmium and calcium. In fact, it has been shown for a long time that accumulation and uptake of cadmium depends upon water calcium concentration. Usually, the more calcium is present in the external medium, the less cadmium accumulates (Wright, 1977). The reason is that Ca^{2+} and Cd^{2+} have equal charges, similar ionic radii (Cd^{2+} : 0.96 Å, Ca^{2+} : 0.99 Å) and similar number of electrons in the outer shell.

In conclusion, the present study demonstrates that Cd accumulation is especially high in anterior gill and hepatopancreas of *E. sinensis* exposed to waterborne Cd in freshwater. MTLPs present two different induction patterns depending on the organ. In hepatopancreas, they can be induced during an acclimation process, which enables the accumulation of high amount of Cd. However, these proteins are not sufficient to explain how anterior gills sustain high Cd burden. In these gills, MTLPs seem to be induced mainly in response to a direct acute exposure. Other sequestration and/or detoxification mechanisms that occur during the acclimation process have to be investigated in this organ.

Acknowledgements

We are grateful to Marie-Claire Forget, Martine Albert, Pierre Cambier and Edouard Delaive for their technical assistance.

REPRINTED FROM : Comparative Biochemistry and Physiology
- Part C, In press, Silvestre et al, "Tissue-specific cadmium accumulation and metallothionein-like protein levels during acclimation process in the Chinese crab *Eriocheir sinensis*."
Copyright (2005), with the permission from Elsevier.

5.3. Notes complémentaires

5.3.1. CBP et relation entre la concentration en Cd et la teneur en MTLPs dans les branchies postérieures

Dans la publication 3, le potentiel théorique de séquestration du Cd (CBP) ainsi que les relations entre la concentration en Cd et la teneur en MTLPs dans les branchies antérieures et dans l'hépatopancréas, ont été présentés. Par soucis d'exhaustivité, sont présentés ci-dessous les mêmes résultats (provenant des mêmes organismes, voir chapitre 5.2) pour les branchies postérieures.

Tableau 1. *E. sinensis*. Potentiel théorique de séquestration du Cd par les MTLPs (CBP) dans les branchies postérieures. Crabs exposés à du Cd : C0, témoins ; CA0, Cd 0,5 mg l⁻¹ 3 jours ; C10, Cd 10 µg l⁻¹ 30 jours ; CA10, Cd 10 µg l⁻¹ 30 jours et ensuite Cd 0,5 mg l⁻¹ 3 jours ; C50, Cd 50 µg l⁻¹ 30 jours ; CA50, Cd 50 µg l⁻¹ 30 jours et ensuite Cd 0,5 mg l⁻¹ 3 jours. Le nombre de réplicats est indiqué entre parenthèses.

	CBP
C0 (9)	indéterminé
CA0 (11)	> 54
C10 (7)	> 7
CA10 (7)	115 ± 77
C50 (10)	> 25
CA50 (11)	44 ± 32

Du fait que les teneurs en MTLPs sont inférieures à la limite de détection pour les groupes CA0, C10 et C50, nous ne pouvons mentionner qu'une limite inférieure du CBP pour ces 3 conditions. Pour C0, les valeurs sont inférieures à la limite de détection à la fois pour les teneurs en MTLPs et pour la concentration en Cd. Nous observons dans le tableau 1 que le CBP est largement dépassé (comme se fut observé pour les branchies

antérieures) pour les conditions CA10 et CA50. Toutefois, les teneurs en MTLPs sont supérieures par rapport aux autres conditions ce qui laisserait supposer que les branchies postérieures répondent à une exposition au Cd en synthétisant ce type de protéines. Cependant, nous n'avons pas trouvé de corrélation significative entre ces deux variables (Fig. 1.). Comprendre comment le Cd est déttoxiqué dans les branchies postérieures est certainement une perspective à ce travail.

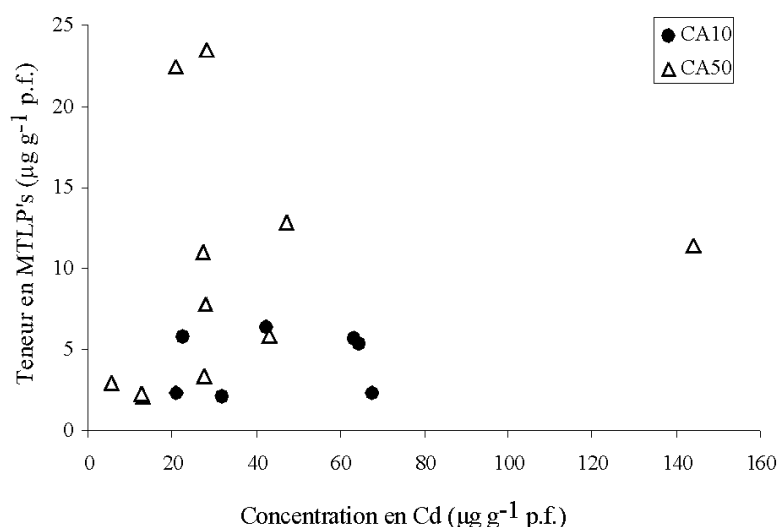


Fig. 1. *E. sinensis*. Concentrations en Cd en fonction des teneurs en MTLPs dans les branchies postérieures de crabes exposés à du Cd 10 µg l⁻¹ pendant 30 jours puis à 500 µg l⁻¹ pendant 3 jours (CA10) ou exposés à du Cd 50 µg l⁻¹ pendant 30 jours puis à 500 µg l⁻¹ pendant 3 jours (CA50).

5.3.2. Pourcentage d'accumulation du Cd dans les différents organes et tissus

Dans la publication 3, nous rapportons des concentrations en Cd mesurées dans les organes du crabe chinois et exprimées en µg Cd g⁻¹ p.f. Ces données, ajoutées aux concentrations en MTLPs, nous renseignent sur la capacité d'accumulation du métal dans chaque organe. Cependant,

comme chaque organe compte pour une part différente dans le poids frais total de l'animal, de telles valeurs ne nous donnent pas d'information sur la répartition globale du Cd. Afin d'avoir une vision générale de cette répartition, nous avons calculé la quantité totale de Cd accumulée dans les organes et tissus étudiés, sur base de leur poids frais relatif. Ces derniers sont repris dans le tableau 2 (Péqueux, communication personnelle).

Tableau 2. Pourcentages moyens des poids frais de différents organes et tissus relatifs au poids frais total de crabes chinois mâles (56 ± 11 g; $n=5$). D'après Péqueux (communication personnelle). Le poids frais de l'hépatopancréas a été estimé d'après Wright et Brewer (1979). L'hémolymphe a été estimée comme représentant la totalité du matériel perdu non pesé. Le reste correspond essentiellement aux systèmes digestif, génital et nerveux.

Carapace	Muscles	Branchies antérieures	Branchies postérieures	Hépatopancréas	Hémolymphe	Reste
49	22	0,75	0,65	3,5	15	9

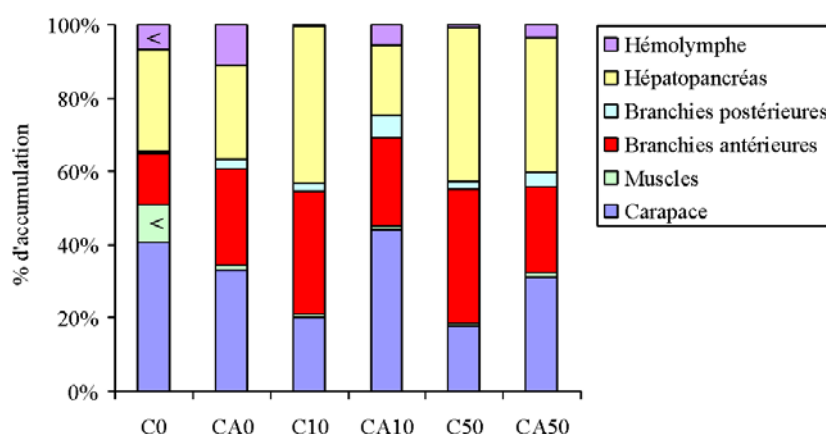


Fig. 2. *E. sinensis*. Répartition du Cd entre différents organes ou tissus par rapport à son accumulation totale. Crabes exposés à du Cd : C0, témoins ; CA0, Cd $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ 3 jours ; C10, Cd $10 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ 30 jours ; CA10, Cd $10 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ 30 jours et ensuite Cd $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ 3 jours ; C50, Cd $50 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ 30 jours ; CA50, Cd $50 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ 30 jours et ensuite Cd $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ 3 jours. <: valeurs inférieures à la limite de détection.

Pour chaque condition expérimentale, la figure 2 montre le pourcentage de Cd accumulé dans chaque organe ou tissu, par rapport à la totalité du Cd accumulé par le crabe (sans tenir compte des organes non étudiés comme les gonades). Nous remarquons que la carapace, l'hépatopancréas et les branchies antérieures accumulent les plus grandes

quantités de Cd. Chez les crabes contrôles (C0), la carapace renferme à elle seule plus de 40% du Cd. En condition d'exposition aiguë seule (CA0), une part non négligeable se retrouve dans l'hémolymph (11%). Par contre, lors d'expositions chroniques seules, la part de l'hémolymph est très faible (< 1%) et la part de la carapace n'est plus que de 20% (C10) et 18% (C50). Sous ces conditions, ce sont les branchies antérieures (33%, C10 ; 37%, C50) et surtout l'hépatopancréas (43%, C10 ; 42%, C50) qui accumulent la plus grande quantité de Cd. Enfin, si on compare la condition CA0 avec la condition CA50 (crabes acclimatés), on remarque que la différence la plus visible est une augmentation de la part du Cd accumulée dans l'hépatopancréas (de 26% à 37%) au détriment de celle accumulée dans l'hémolymph (de 11% à 4%).

Ces observations renforcent l'idée que, pendant une exposition chronique, l'hépatopancréas accumule une plus grande quantité de Cd. Cet organe apparaît donc comme étant un lieu d'accumulation du Cd nécessitant un certain temps d'exposition avant que le métal y soit redirigé. A ce titre, il est probable que l'hémolymph participe au transport du Cd vers l'hépatopancréas. Pour des animaux préalablement acclimatés et subissant une exposition aiguë, nous suggérons que l'hépatopancréas accumule davantage de Cd à partir, en partie du moins, de l'hémolymph.

**6. NIVEAU D'EXPRESSION DE
LA HSP70 DANS LES
BRANCHIES**

6.1. Résumé

Le chapitre précédent a montré qu'une induction de métallothionéines ne pouvait pas expliquer à elle seule la résistance accrue au Cd observée dans les branchies antérieures de crabes chinois acclimatés pendant 30 jours à $50 \mu\text{g Cd l}^{-1}$. Dans le but d'identifier d'autres mécanismes permettant à la branchie antérieure de faire face à une accumulation élevée en Cd, nous avons mesuré les concentrations en protéines de stress HSP70 dans les deux types de branchies de crabes exposés à du Cd. Ces protéines sont des chaperones moléculaires et permettent à d'autres protéines d'être protégées contre une dénaturation ou de retrouver leur structure tridimensionnelle native (voir chapitre 1.2.3).

Des crabes chinois acclimatés à de l'eau douce ont été exposés de manière aiguë à du Cd, soit $500 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ pendant 3 jours (CA0). D'autres animaux ont été exposés de manière chronique, soit $50 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ pendant 30 jours (C50). Enfin, un troisième groupe a été soumis à une exposition chronique directement suivie par une exposition aiguë (CA50). Un groupe de témoins n'a pas subi d'exposition au Cd (C0). Après l'exposition, les organismes ont été sacrifiés et les branchies antérieures et postérieures prélevées. Les teneurs en HSP70 ont été estimées sur des fractions cytosoliques en utilisant un slot-blot et un anticorps primaire anti-HSP70 (Affinity BioReagents MA3-006). Les images obtenues grâce au kit Amersham ECLTM ont été scannées avec un densitomètre (ImageScannerTM). La densité optique de chaque bande a été transformée en concentration de HSP70 (exprimée en $\mu\text{g équiv. HSP70 mg}^{-1} \text{ prot.}$) grâce à un étalon de HSP70 humaine purifiée (StressGen SPP-755).

Il apparaît que la HSP70 est présente de manière constitutive dans les branchies du crabe chinois. Une concentration de $1.11 \pm 0.13 \mu\text{g équiv. HSP70 mg}^{-1} \text{ prot.}$ a été mesurée dans les branchies antérieures de crabes témoins. Cette valeur moyenne est similaire à celle observée dans les branchies postérieures d'organismes témoins ($1.02 \pm 0.22 \mu\text{g équiv. HSP70 mg}^{-1} \text{ prot.}$). Une seule isoforme de HSP70 d'un poids moléculaire approximatif de 71 kDa a été observée. Enfin, nous n'avons pas observé de réaction croisée de l'anticorps primaire avec d'autres protéines.

Une exposition au Cd induit une sur-expression de la HSP70 dans les branchies antérieures. Par contre, aucune induction n'a pu être mise en évidence dans les branchies postérieures. Lors d'une exposition aiguë seule,

les teneurs en HSP70 des branchies antérieures atteignent $1.40 \pm 0.12 \mu\text{g}$ équiv. HSP70 mg^{-1} prot. et sont comparables à ce qui s'observe dans les branchies antérieures d'organismes exposés au Cd de manière chronique ou de manière chronique puis aiguë.

Ces résultats suggèrent que l'induction de HSP70 serait une réponse relativement rapide prenant place dans les branchies antérieures afin de contrer une dénaturation des protéines induite par le Cd. Toutefois, comme ces branchies montrent des altérations biochimiques et morphologiques (voir chapitre 4.2), l'induction observée de HSP70 n'est pas suffisante pour les protéger contre des effets délétères. De plus, une exposition plus longue n'induit pas davantage de HSP70, de même qu'une exposition chronique suivie d'une exposition aiguë. Cela indique que la teneur en HSP70 pourrait avoir atteint une valeur maximale. Cela suggère également que, si une induction de HSP70 concourt à augmenter la résistance au Cd, d'autres mécanismes doivent être mis en place dans les branchies antérieures pendant une exposition chronique permettant à cet organe de faire face à une forte accumulation de Cd.