Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Effet du cadmium sur les structures cytosquelettiques des cellules à chlorure du saumon atlantique (Salmo salar)

Huart, Laurence

Award date:
1994

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 02. May. 2026

301194

FACULTES UNIVERSITAIRES N.-D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTE DES SCIENCES

Effet du cadmium sur les structures cytosquelettiques des cellules à chlorure du saumon atlantique *(Salmo salar)*.

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

LAURENCE HUART

Décembre 1994

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/72.44.20

Effet du cadmium sur les structures cytosquelettiques des cellules à chlorure du saumon atlantique (*Salmo salar*).

HUART Laurence

Résumé

Le cadmium, à des concentrations avoisinant celles rencontrées dans nos rivières polluées, engendre chez les poissons de graves perturbations de la balance calcique au niveau des cellules à chlorure branchiales. Plusieurs arguments nous laissant présager un effet de ce métal sur le cytosquelette, nous avons opté pour une approche morphologique et immunohistochimique. Les marquages de l'actine microfilamentaire en microscopie optique de fluorescence révèlent, chez les saumons exposés à différentes doses de cadmium (10, 30 et 50 µg/l) et pour des durées variables (2, 7 et 14 jours), la présence de spots lumineux très intenses au pôle apical des cellules à chlorure. Le recours à la microscopie électronique et à un marquage à l'or colloïdal atteste que ces spots correspondent à la formation d'agrégats de filaments d'actine situés dans la région du "terminal web". De faibles perturbations du réseau de microtubules semblent se manifester en immunofluorescence, mais l'étude de ces structures, ainsi que celle des filaments intermédiaires, devra être poursuivie. Enfin, des observations réalisées en microscopie électronique à balayage démontrent une augmentation significative de la taille et du nombre de cellules à chlorure lors du traitement au cadmium, sans qu'il y ait cependant modification de la morphologie cellulaire générale.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques
Décembre 1994
Promoteur : P. Devos
Co-promoteur : M. Cornet

Au terme de ce mémoire, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont, de près ou de loin, collaboré à sa réalisation.

J'adresse, plus particulièrement, mes remerciements :

au Professeur P. Devos, promoteur de ce travail, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire,

à Madame Michèle Cornet, sans qui ce travail n'aurait pas pu voir le jour, pour sa grande compétence, son enthousiasme et sa sympathie,

à Monsieur Emmanuel Devos, pour sa collaboration et son éternelle bonne humeur,

à Madame Suzanne Loret, pour sa grande disponibilité, ses encouragements et sa complicité,

à Mesdames Marie-Claire A., Anne D., Isabelle I. pour leur amitié,

à Madame Chantal Devignon pour sa grande compétence dans la réalisation des coupes de microscopie électronique,

à Monsieur Y. Houbion pour son aide technique fort sollicitée,

à Monsieur D. Van Acker pour le remarquable travail de développement photographique,

Merci à toutes les personnes des départements d'Histologie, Microscopie Electronique et de Biochimie Cellulaire que j'ai eu l'occasion de cotoyer pendant ces quelques mois,

Je me tourne vers mes parents et ma famille qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de mes études universitaires,

à M. Nassel, Alexandra, Anne, Cristelle, Christine et Virginie pour leurs encouragements et leur sincère amitié.

Plan du travail

Introduction.

A. Le saumon

1. Généralités 1

2. Cycle de développement.

2.1. De l'eau douce à la mer 2

2.2. La smoltification

2.2.1. Manifestations morphologiques 3

2.2.2. Changements comportementaux. 4

2.2.3. Manifestations hormonales. 4

2.2.4. Manifestations physiologiques. 4

2.3. De la mer à l'eau douce 5

B. Oranisation branchiale chez les téléostéens.

1. Architecture des branchies

1.1. Les arcs branchiaux. 6

1.2. Les épithéliums branchiaux 7

2. Les mouvements ioniques branchiaux 8

C. Les cellules à chlorure

1 Introduction. 10

2. Ultrastructure

2.1. Le système tubulaire. 10

2.2. Le réticulum endoplasmique. 11

2.3. Le système vésiculotubulaire. 11

2.4. Les mitochondries 11

2.5. L'apex cellulaire 12

2.6. Le cytosquelette. 12

a) Les microtubules. 12

b) Les filaments intermédiaires. 13

c) Les microfilaments 13

3. Deux types de cellules à chlorure. 13

3.1. Les larges cellules à chlorure. 13

3.2. Les petites cellules à chlorure. 14

4. Les cellules à chlorure lors de la smoltification 14

4.1. Hypertrophie des larges cellules à chlorure. 15

4.2. Régression des petites cellules à chlorure 15

4.3. Apparition des cellules accessoires 15

5. Les cellules à chlorure et les échanges ioniques 16

5.1. Les ATPases.
5.1.1. La Na+/K+/ATPase. 17
5.1.2. La Ca++/ATPase. 17
5.1.3. Les ATPases dépendantes des anions 18
D. Le cytosquelette
1. Introduction. 19
2. Les microtubules
2.1. Structure et composition. 20
2.2. Polarité 21
2.3. Assemblage
2.3.1. Polymérisation 22
2.3.2. Régulation 22
2.4. Drogues affectant la polymérisation. 24
2.5. Protéines associées. 24
2.6. Aspects fonctionnels 25
3. Les Microfilaments
3.1. Structure et composition. 26
3.2. Polarité 26
3.3. Assemblage
3.3.1. Polymérisation. 27
3.3.2. Régulation 27
3.4. Drogues affectant la polymérisation. 28
3.5. Protéines de "cross-linkage" associées. 29
3.6. Aspects fonctionnels 30
4. Les filaments intermédiaires
4.1. Structure et composition. 31
4.2 Assemblage. 32
4.3. Protéines associées. 32
4.4. Aspects fonctionnels 32
5. Le réseau microtrabéculaire : découverte et polémique 33
6. Relation cytosquelette- membrane plasmique 34
A) Les microfilaments 34
B) Les microtubules. 36
C) Les filaments intermédiaires. 36
7. Différenciations membranaires
7.1. Le desmosome maculaire (macula adhaerens). 36

7.2. Le desmosome diffus (zonula adhaerens). 37
7.3. La tight junction (zonula occludens). 37
7.4. Les microvillosités. 38
8. Cytosquelette et transports ioniques. 38
E. Le cadmium
1. Généralités 41
2. Toxicité chez le poisson. 41
3. Interférences du cadmium avec le transport calcique 42
4. Autres effets du cadmium. 42
5. Impact du cadmium sur l'architecture épithéliale 43
F. But du travail. 45

Matériel & Méthodes

1. Matériel biologique
1.1. Maintenance des poissons 46
1.2. Traitement au cadmium. 46
1.3. Prélèvement des branchies. 47
2. Composition des solutions salines. 47
3. Etude du cytosquelette en microscopie optique
3.1. Coupes à congélation 48
3.2. Coloration topographique. 48
3.3. Colorations immunohisto-cytochimiques
3.3.1. Marquage de l'actine polymérisée par la FITC-Phalloïdine. 48
3.3.2. Marquages indirects de l'actine et de la tubuline. 49
4. Etude du cytosquelette en microscopie électronique à transmission (TEM) 50
4.5.1. Marquage indirect de l'actine par la méthode de l'immunogold. 50
5. Microscopie électronique à balayage (SEM)
5.1. Traitement des échantillons. 52
5.2. Analyses des images. 52
5.3. Analyse statistique. 53

Résultats

1. Microscopie optique. 54
1.1. Morphologie des filaments branchiaux en microscopie optique 54
1.2. Etude du cytosquelette des cellules à chlorure 54
1.2.1. Immunofluorescence indirecte appliquée à la visualisation de l'actine 54
1.2.2. Immunofluorescence directe appliquée à la visualisation des microfilaments. 55
1.2.3. Immunofluorescence indirecte appliquée à la visualisation des microtubules. 56
2. Microscopie électronique.
2.1. Visualisation du cytosquelette en microscopie électronique à transmission. 57
2.2. Observation des surfaces cellulaires en microscopie électronique à balayage. 59
2.2.1. Analyse morphologique. 59
2.2.2. Analyse statistique. 60
A. Analyse de la densité des cellules à chlorure. 60
B. Analyse de la surface apicale des cellules à chlorure. 60

Discussion

Discussion générale 62
Conclusions et perspectives 68

Bibliographie 70
Annexe 88

Introduction



Fig. 1: photographie d'un jeune saumon atlantique (Salmo salar).

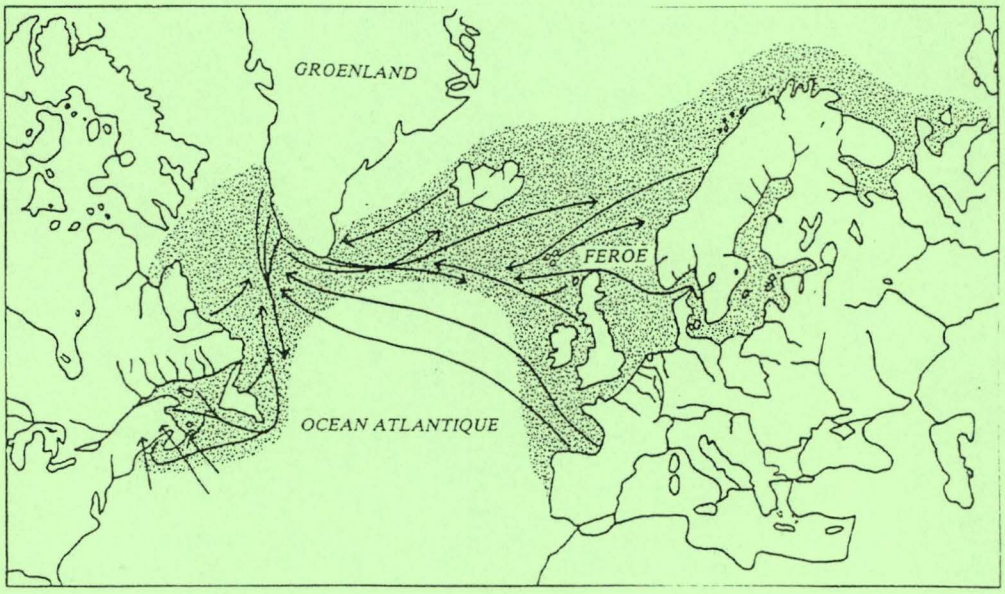


Fig. 2 : aire de distribution et route de migration du saumon atlantique (Philippart, 1988).

A. Le saumon.

1. Généralités.

Poisson de mer se reproduisant en eau douce, le saumon atlantique *Salmo salar* (du latin *salio* signifiant sauteur, voire fig. 1) peuple les deux côtés de l'océan Atlantique des régions tempérées et arctiques (fig. 2). Il appartient à la famille des Salmonidés, regroupant quelques vingt-cinq espèces de poissons téléostéens et caractérisée par une extraordinaire homogénéité morphologique et comportementale.

Jadis foisonnant dans les bassins mosan et rhénan, sa population régressa dès la moitié du siècle dernier. Les multiples formes de pollution, l'édification d'écluses et de barrages entravant la remontée des géniteurs, l'altération des frayères, les prélèvements excessifs de la pêche commerciale, se surajoutant à une forte mortalité naturelle (maladies, parasites, prédation,...) aboutirent à l'extinction de l'espèce. Malgré diverses tentatives de repeuplement, le dernier spécimen de saumon atlantique fut pêché en Meuse en 1942.

Une amélioration sensible de la qualité de l'eau mosane (réduction des métaux lourds et de l'ammoniaque, hausse du taux d'oxygène dissous), consécutive aux efforts d'épuration ainsi qu'à la disparition des vieilles industries très polluantes, fut observée fin des années 70. Ces nouvelles données permirent, dès 1983, la réimplantation naturelle dans le bassin mosan belge de la truite de mer, espèce de Salmonidé migrateur fort proche du saumon atlantique sur le plan biologique. Cet événement inopiné est à l'origine de l'ambitieux projet de réintroduction de Salmo salar en Meuse (Meuse Saumon 2000). Depuis 1988, des oeufs et tacons de provenance écossaise ont été réintroduits dans cinq rivières aux potentialités salmonicoles reconnues (l'Ourthe, l'Aisne, la Basse Amblève, la Semois et le Samson). Le suivi scientifique (marquage, pêche éléctrique) démontre que les jeunes saumons réintroduits recolonisent bien leur milieu naturel. Cependant, nombreux sont les obstacles qui menaçent leur survie à chaque stade du développement. Ainsi, on estime que 7500 oeufs (frai d'une femelle de 5 Kg)

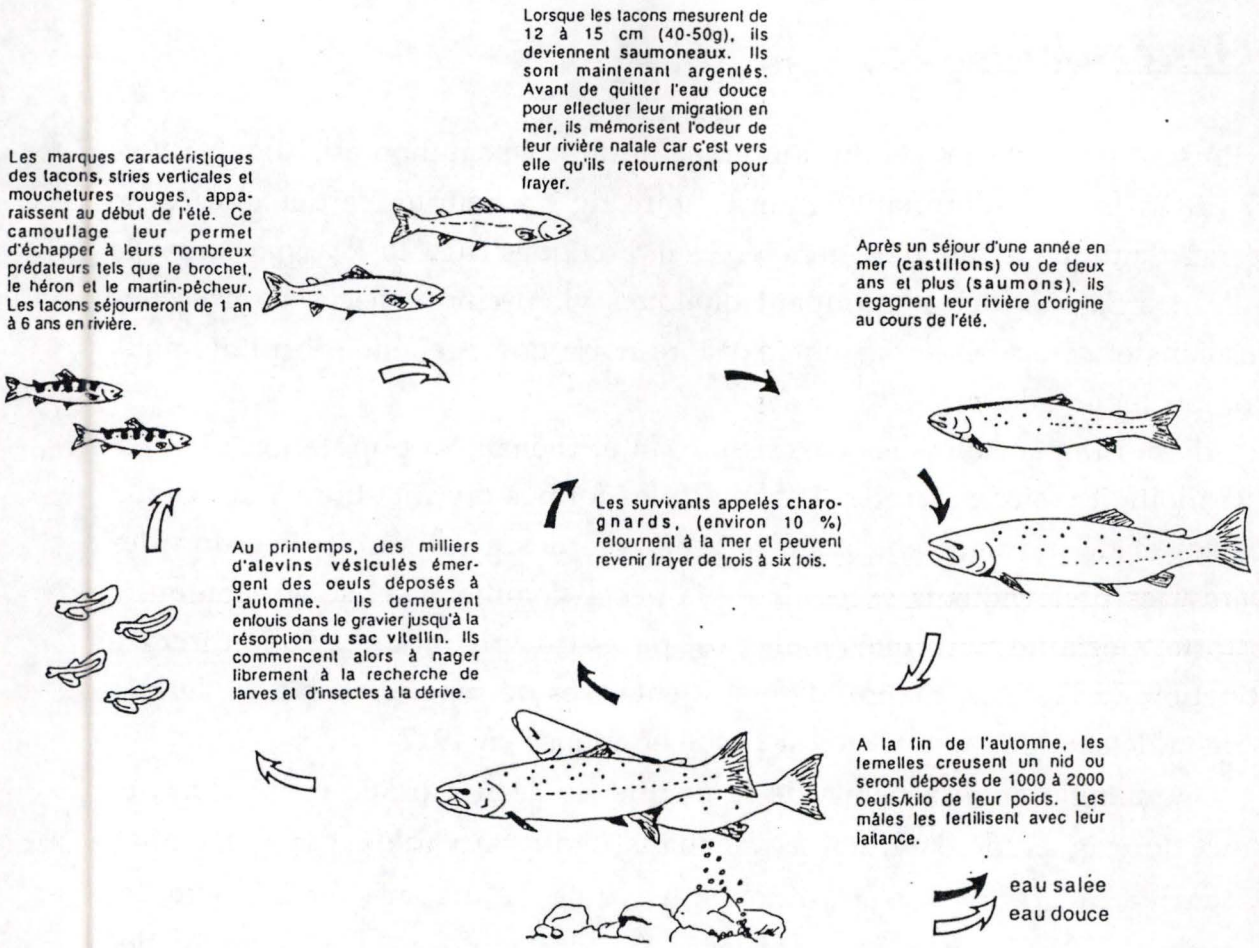


Fig. 3 : cycle de développement du saumon atlantique (Leblanc & Prignon, 1993).

sont nécessaires pour obtenir deux saumons qui reviendront frayer. Parmi les différents obstacles rencontrés, notons, par exemple, que la température de l'eau doit être inférieure à 20°C et la concentration en oxygène dissous supérieure à 5 mg/l tout au long de l'année, et ce, autant pour permettre la dévalaison des saumoneaux que la montaison des adultes. Or, en période d'étiage, une partie de la Meuse liégeoise ne respecte plus ces conditions minimales de survie de l'espèce.

D'autre part, de par sa situation estuarienne stratégique, la Hollande joue un rôle capital dans le projet de réhabilitation. Depuis 1990, plusieurs saumons atlantiques ont été ressencés en Meuse hollandaise mais jusqu'à ce jour, aucune présence de saumon adulte, espérée dès 1993, n'a été relevée en Belgique (Philippart, 1988; Leblanc & Prignon, 1993).

2. Cycle de développement.

Si de nos jours, aucun Salmonidé n'est intégralement marin, les migrateurs actifs tels le saumon atlantique gagnent volontairement, à un moment précis de leur existence, l'océan (fig. 3).

2.1. De l'eau douce à la mer.

Deux à quatre mois après la ponte, survient l'éclosion d'alevins vésiculés qui demeureront encore un bon mois enfouis dans le gravier. Leur sac vitellin résorbé, les alevins occupent alors les zones à courant rapide où l'eau est froide et bien oxygénée.

L'abondance de nourriture, la température de l'eau et divers facteurs physico-chimiques conditionnent la vitesse de croissance (croissance lente en eau douce) et le nombre d'années (variant de une à six) de séjour des parrs (ou tacons) en rivière.

La smoltification caractérise les parrs qui ont atteint une taille de 12 à 15 cm pour un poids de 40 à 50 g. Les smolts (ou saumoneaux) argentés qui en résultent se laissent emporter par le courant jusqu'à l'estuaire, porte préparatoire à l'entrée en mileu marin.

Le séjour en mer, où le régime alimentaire accélère la croissance, durera de quelques mois pour les plus petits saumons appelés castillons ou madeleineaux, à deux-trois ans pour les vrais saumons.

2.2. La smoltification.

Définie par un ensemble de profondes modifications anatomiques, morphologiques, physiologiques et biochimiques, la smoltification, survenant en eau douce, préadapte le jeune saumon à son futur environnement marin. Survenant généralement au printemps chez le tacon âgé d'un an ou davantage, elle conditionne, par les dérèglements physiologiques qu'elle engendre, le comportement migratoire.

Si la smoltification répond à un déclenchement interne impliquant systèmes nerveux et endocrinien, elle est synchronisée grâce aux facteurs abiotiques que sont la température et la photopériode (Boeuf, 1987a). Son maximum se manifeste trois à quatre semaines après l'équinoxe, quand la température atteint le seuil des 15°C (Wedemeyer et al., 1980). Par la suite, la hausse de température estivale l'inhibe et les poissons régressent en parrs s'ils n'ont pas eu l'occasion de migrer.

2.2.1. Manifestations morphologiques

Deux manifestations morphologiques caractérisent la smoltification. La peau, barrière entre l'environnement et le milieu interne, perd son mucus protecteur et individualise ses écailles. L'apparition de pigments de guanine et d'hypoxanthine dans les couches superficielles du derme confère à la robe, en masquant la couche mélanique sous-jacente, une couleur argentée homogène (Folmar & Dickhoff, 1980).

La mobilisation des réserves énergétiques lipidiques, glucidiques et protéiques détermine une silhouette effilée caractéristique. Le coefficient de condition K défini comme :

(Poids en g/(Longueur à la fourche caudale en mm)^3) x 100

reflète assez fidèlement le stade de développement. Sa valeur fluctue entre 1,2-1,4 en février; 0,9-1,0 en avril puis augmente à nouveau en été. Cependant, cet indice K se révèle peu fiable s'il n'est pas combiné aux critères biochimiques et physiologiques (pour revue : Boeuf, 1987b).

2.2.2. Changements comportementaux.

Lors de la smoltification, des changements comportementaux marqués s'observent : l'animal dont l'agressivité décroît délaisse son territoire et adopte une conduite à tendance grégaire. Dans les dernières semaines précédant la migration, le smolt plus réceptif aux facteurs de son environnement développe une sensibilité olfactive favorisant la mémorisation du milieu ("imprinting") (pour revue : Boeuf, 1993).

2.2.3. Manifestations hormonales.

Le sytème endocrinien est un des protagonistes du déclenchement de la smoltification. Quatre types principaux d'hormones sont impliquées dans l'adaptation à l'eau de mer : les hormones thyroïdiennes (TSH, T_3 , T_4), l'hormone de croissance (GH) (Prunet et al., 1994), la prolactine (PRL) (Pisam et al., 1993) et les corticostéroïdes dont le cortisol (Laurent & Perry, 1990). Mentionnons, pour clôre cete liste non exhaustive, que les taux des catécholamines, calcitonine, insuline et hormones sexuelles fluctuent également en cours de smoltification (pour revues : Boeuf, 1993; Takei, 1993).

2.2.4. Manifestations physiologiques.

(pour revue : Hoar, 1988).

L'intestin est la partie du tube digestif qui absorbe l'eau et les électrolytes après le transfert en eau de mer. Ces mouvements entrant d'eau, coïncidant au pic de thyroxine, sont préétablis avant la migration.

Au niveau rénal, on observe chez le saumon atlantique, assez curieusement, une augmentation de l'excrétion urinaire lors de la smoltification. Il s'agit là encore d'une préadaptation en eau douce visant à accroître la perméabilité intestinale à l'eau. Dès l'instant où le poisson entre en contact avec l'environnement hyperosmotique marin, le flux d'urine chute considérablement tandis qu'à l'inverse, l'osmolalité urinaire augmente (Boeuf, 1987b).

La branchie, organe essentiel de la régulation du métabolisme hydrominéral, évolue tant sur le plan morphologique que physiologique. Les cellules à chlorure, siège de transport ionique actif, se métamorphosent et voient augmenter leur activité métabolique (Boeuf, 1987a). Le complexe

enzymatique $Na^+/K^+/ATPase$ des cellules à chlorure, excrétant activement les ions Na^+ et Cl^- en milieu hyperosmotique, représente d'ailleurs un indicateur, fort précieux, de l'acquisition de l'eurhyalinité (*cfr* point 5.1.1).

2.3. De la mer à l'eau douce.

Franchissant habilement barrages et bras de rivière pollués, et ce, malgré un jeûne soutenu, le saumon adulte, guidé par son odorat, remonte vers son cours d'eau natal pour frayer. A la fin de l'automne, la femelle creuse un nid de 10 à 30 cm de profondeur où seront déposés les oeufs (I000 à 2000 oeufs/Kg de poids corporel de la femelle adulte) et la laitance fertilisante du mâle. Soigneusement recouverts de gravier, ceux-ci n'écloront qu'au printemps.

La plupart des géniteurs (90 à 95%) épuisés ne survivent pas; les quelques rescapés, nommés charognards, en majorité des femelles, rejoignent la mer afin d'y retrouver les forces nécessaires à une nouvelle montaison. Quelques rares individus peuvent ainsi frayer jusqu'à six fois.

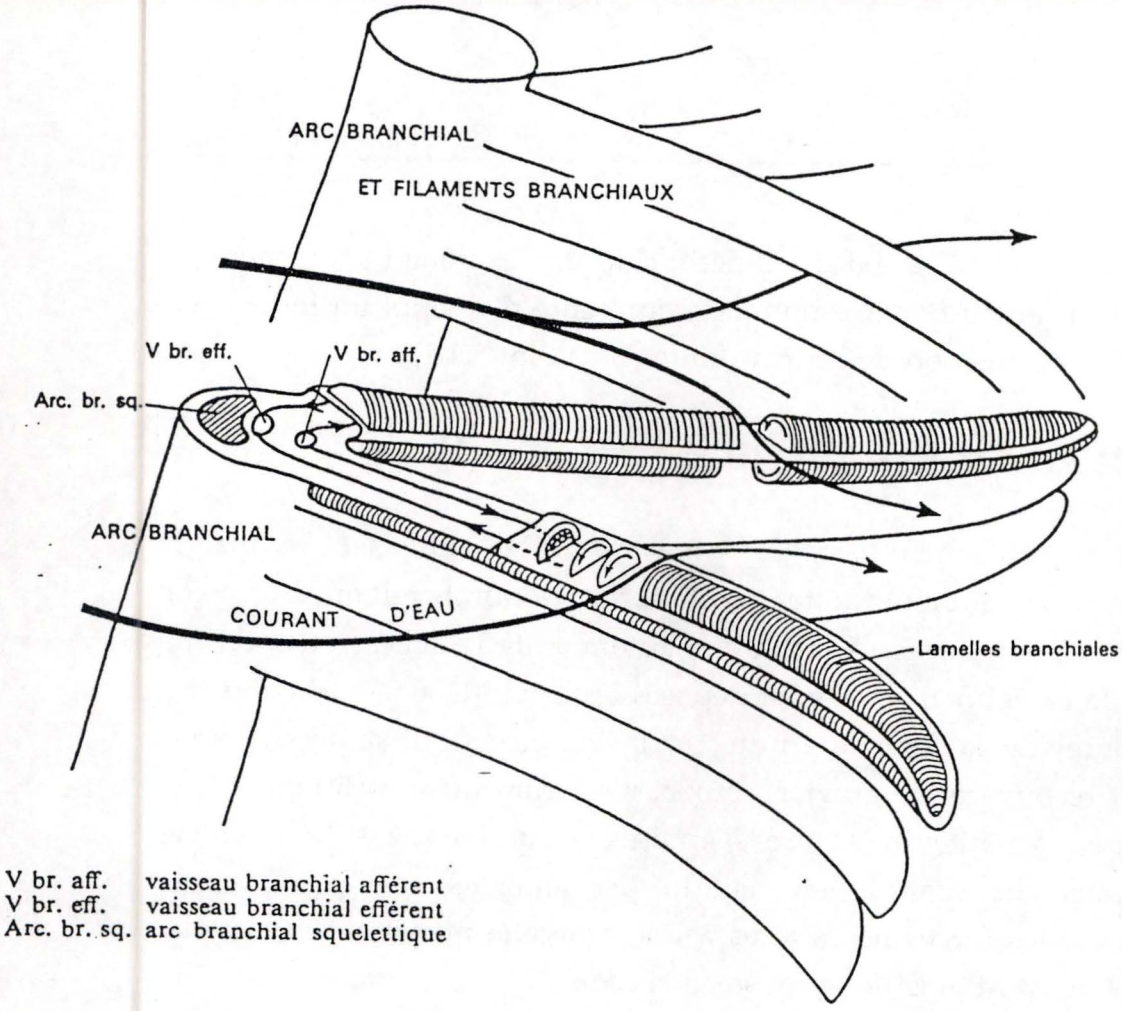


Fig. 4 : fonctionnement de l'appareil branchial chez les poissons téléostéens (d'après Echalier, 1968).

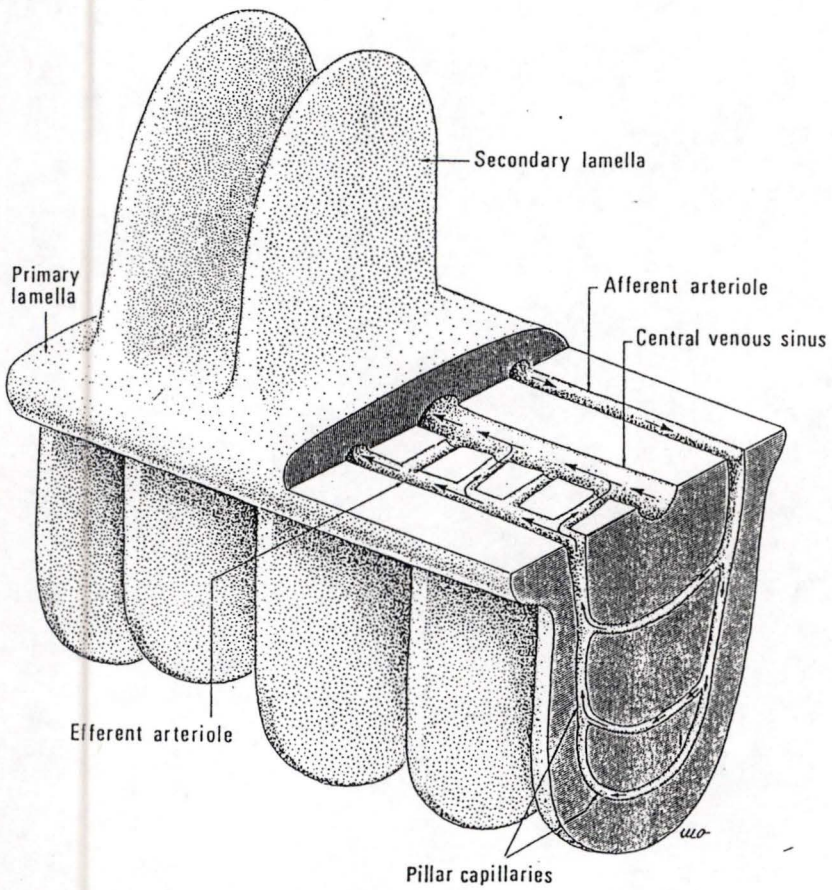


Fig. 5 : représentation schématique de la vascularisation filamentaire branchiale (Pisam et al., 1987).

B. Organisation branchiale chez les Téléostéens.

Organe multi-fonctionnel, la branchie comporte plusieurs épithéliums, à composante cellulaire hétérogène, jouxtant une vascularisation régulée par voie neuro-endocrinienne. Les attributs branchiaux sont, pour l'essentiel, les échanges gazeux respiratoires, l'élimination des déchets métaboliques nitrogénés ainsi que la maintenace des équilibres minéraux et acido-basiques (Laurent & Dunel, 1980). Nous détaillerons, ici, assez brièvement, l'architecture et, en raison de l'implication des cellules à chlorure, les grands principes des échanges ioniques (pour revues : Maetz, 1971; Payan & al, 1984; Boeuf, 1993).

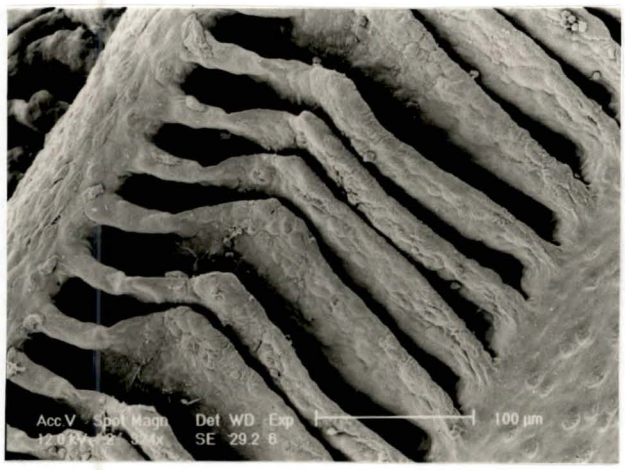
1. Architecture des branchies.

L'organisation branchiale repose sur une subdivision progressive visant à optimaliser le développement des surfaces d'échanges (pour revue : Hugues, 1984).

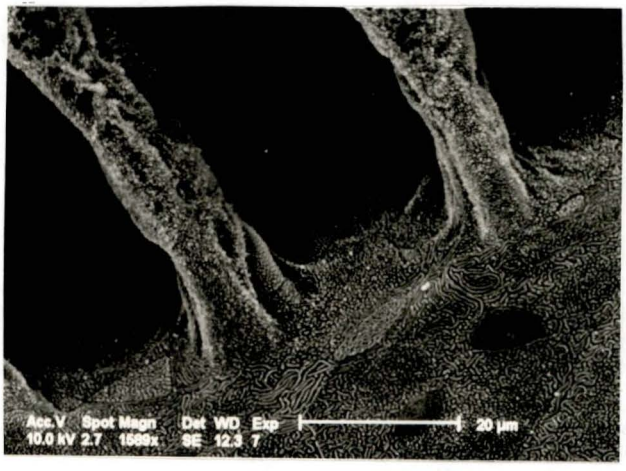
1.1. Les arcs branchiaux.

Chez les téléostéens, ce sont les arcs branchiaux, figurés par quatre paires chez le saumon, qui assurent le soutien des structures. Chaque arc comporte un squelette cartilagineux interne et des septa externes logeant fibres nerveuses et vaisseaux. Des filaments (ou lamelles) primaires, recouverts par un épithélium pluristratifié, se détachent perpendiculairement des septa (fig. 4). On y observe une double composante vasculaire figurée par des artérioles et un sinus veineux central, établissant des anastomoses artério-artérielles et artério-veineuses (*cfr* fig. 5). Les filaments (ou lamelles) secondaires se détachent , à angle droit, des filaments primaires. L'épithélium secondaire qui le borde se caractérise par une finesse qui conditionne ses échanges gazeux; un réseau capillaire polygonal, émanant des artères branchiales primaires, en assure l'irrigation.

6



7



8

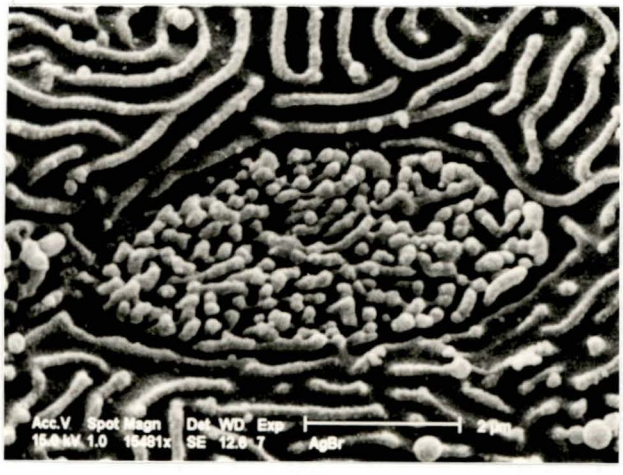


Fig. 6 : micrographie électronique à balayage d'un filament branchial de saumon atlantique.

Fig. 7 : micrographie électronique à balayage détaillant un agrandissement des creux interlamellaires.

Fig. 8 : gros plan sur une cellule à chlorure, bordée de chaque côté par des cellules de revêtement.

1.2. Les épithéliums branchiaux.

Les épithéliums branchiaux présentent une structure répondant à leurs fonctions (fig. 6, 7 et 8).

L'épithélium primaire (fig. 9), arborant cinq types cellulaires différents, couvre toute la surface des filaments primaires mais s'interrompt aux endroits d'implantation des structures secondaires. En relation directe avec le sinus veineux, il réalise également des échanges avec les vaisseaux artério-artériels de la base des lamelles secondaires.



Fig. 9 : micrographie électronique à transmission figurant l'épithélium branchial primaire (gros. 2300x).
CC : cellule à chlorure; **CS** : capillaire sanguin; **M** : cellule muqueuse; **N**: cellule neuroépithéliale; **P** : cellule pavimenteuse; **R** : cellule de remplacement

Des cellules pavimenteuses polygonales ("squamous cell"), de 3 à 10 µm de diamètre et présentant des microvillosités de surface caractéristiques (les "fingerprints"), constituent la couche la plus externe. Les cellules à chlorure (ou ionocytes) sont des structures remarquables de l'épithélium primaire (développement dans la partie C). Elles sont aisément identifiables par leurs nombreuses mitochondries (d'où l'appelation de mitochondria rich-cell) et leur réseau ramifié de tubules.

Citons aussi les cellules muqueuses ("goblet cell") contrôlant les pertes ioniques et les flux d'eau (Laurent & Hebibi, 1989), les cellules neuroépithéliales, impliquées dans le transport par la sécrétion d'amines biogènes, ainsi que des cellules de renouvellement indifférenciées localisées à la base de l'épithélium.

L'épithélium secondaire, également nommé épithélium respiratoire, est constitué de deux couches de cellules dérivant de lignée indifférenciée de l'épithélium primaire, et recouvertes d'un manteau muqueux.

La couche externe ou apicale est constituée de cellules pavimenteuses riches en organites, munies d'un "coat" apical polysaccharidique et d'une membrane plasmique soulignée par un réseau microfilamentaire. Les cellules sont solidarisées per des complexes jonctionnels de type serré et de structures desmosomales intervenant également dans l'imperméabilité épithéliale aux ions et à l'eau. La couche interne de l'épithélium secondaire consiste en une rangée de cellules peu différenciées assurant le remplacement des cellules superficielles ou, parfois, évoluant vers le type ionocytaire. Des espaces intercellulaires de taille variable aménagés entre les deux couches épithéliales drainent les fluides extracellulaires des lamelles vers le sinus veineux central.

2. Les mouvements ioniques branchiaux.

Outre ses implications dans la respiration, les échanges thermiques, la production de mucus et l'excrétion d'ammoniaque, la branchie exerce un rôle de premier plan dans la régulation ionique et osmotique par l'intermédiaire de ses cellules à chlorure.

En eau douce (fig. 10A), tous les échanges ioniques (exceptés ceux du calcium) se produisent à travers l'épithélium secondaire. Les cellules

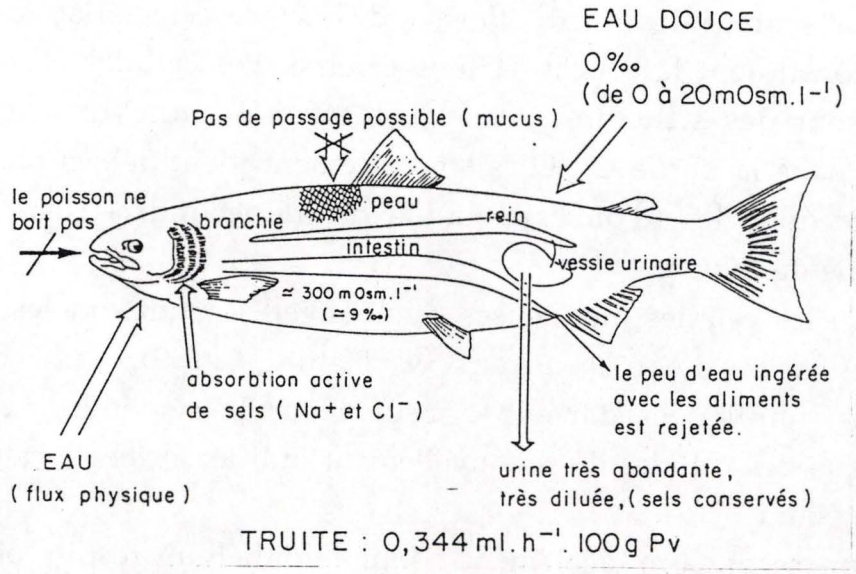


Fig. **10 A** : mécanismes impliqués dans l'osmorégulation de la truite en eau douce.

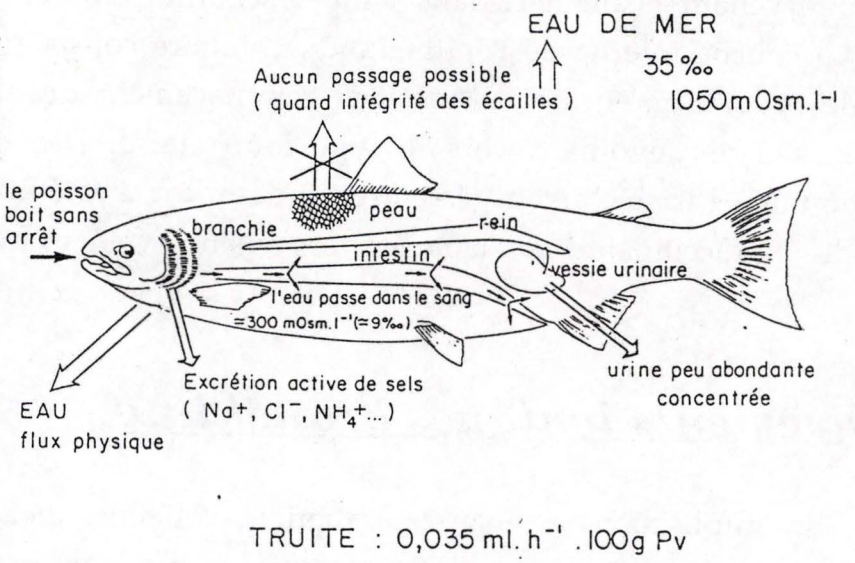


Fig. **10 B** : mécanismes impliqués dans l'osmorégulation de la truite en eau de mer.

respiratoires sont le siège d'échanges couplés entre les ions sodique, potassique et des métabolites secondaires tels l'ammonium, les protons, les carbonates (Towle, 1990). Afin d'éviter les pertes de sels ou de subir une entrée d'eau massive, en raison de l'hyperosmoticité de son milieu interne (290-330 mOsm/litre), le poisson boit peu et excrète une urine diluée. Les pertes sodiques et potassiques sont alors compensées par leur absorption active au niveau branchial. Comme l'animal peut maintenir l'équilibre osmotique interne sans s'alimenter, on estime que la paroi intestinale tient un rôle mineur dans l'osmorégulation en eau douce.

En eau de mer (fig. 10B) où l'osmolarité atteint des valeurs de l'ordre de 1050 mOsmoles/litre, des pertes d'eau le long du gradient de concentration se manifestent au niveau des branchies. Pour les contrebalancer, l'intestin devient le siège d'une absorption active de l'eau associée aux sels. Le rein répond par un accroissement de l'excrétion des ions bivalents absorbés par la paroi intestinale, tandis que la branchie prend en charge l'excrétion des ions monovalents excédentaires.

En période de smoltification, dès l'entrée en milieu hyperosmotique, les mécanismes d'excrétion sodique sont mis en oeuvre. De plus, une redistribution immédiate du flux circulatoire branchial réduit l'irrigation des filaments secondaires au profit de l'épithélium sécrétoire primaire (pour revues : Payan et al., 1984). Une étude portant sur la lamproie *(Geotria australis)* acclimatée à l'eau de mer démontre, en outre, une réorganisation profonde de l'apex des cellules à chlorure. La surface d'échange se développe considérablement et des particules membranaires, à signification osmorégulatrice probable, se regroupent en amas ("clusters") (Bartels et al., 1993).

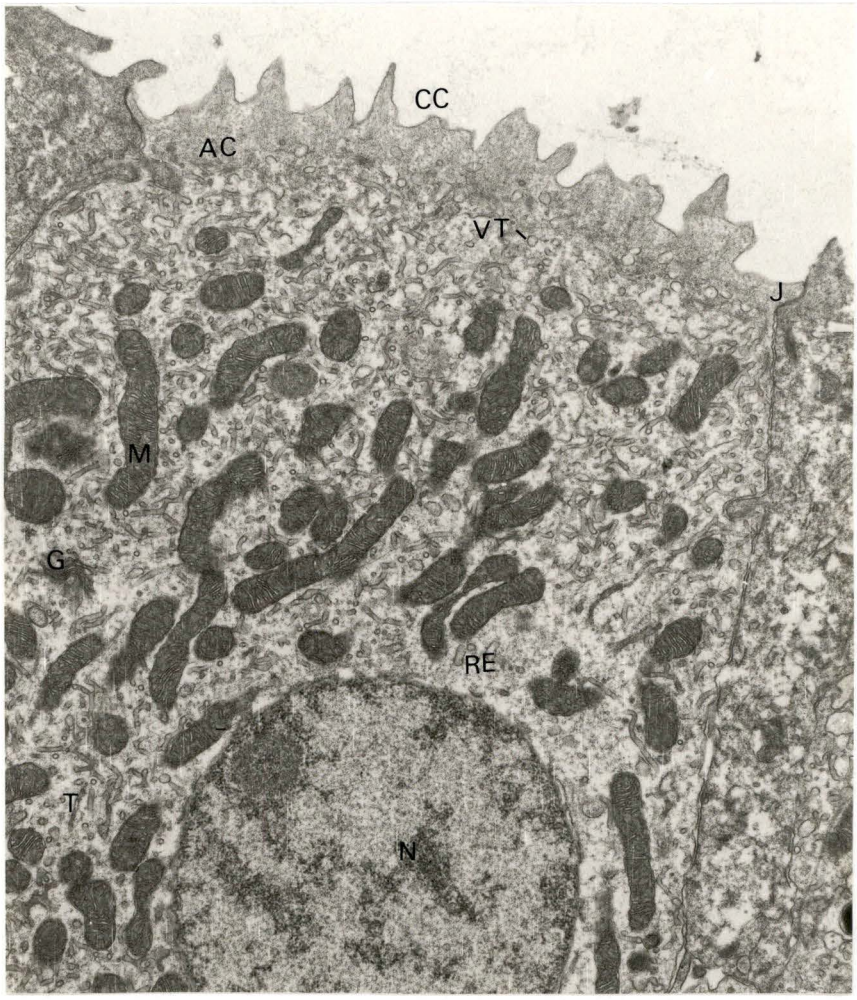


Fig. **11** : micrographie éléctronique à transmission d'une cellule à chlorure β (gross. 12 000x).
AC : apex cellulaire; **CC**: cell coat; **G** : appareil de Golgi; **J** : jonction serrée; **M** : mitochondrie; **N** : noyau; **RE**: réticulum endoplasmique; **T** : système tubulaire; **VT** : système vésiculo-tubulaire

C. Les cellules à chlorure.

1 Introduction.

L'année 1932 marque la découverte, par Keys et Willmer, des cellules à chlorure (également dénommées *mitochondria-rich cells* ou *ionocytes)* dans l'épithélium branchial de l'anguille marine. Décrite comme une large cellule ovoïde (de I5 µm de diamètre) et éosinophile, elle fut bâptisée *"secreting chloride cell"* en raison de son implication reconnue dans l'excrétion d'ions chlorures.

Rebâptisée seize années plus tard *chloride cell,* on lui découvre un contenu riche en mitochondries et matériel osmiophile.

L'augmentation numérique des cellules à chlorure observée lors du transfert en eau de mer, la relation linéaire décrite entre leur densité et le transport de Cl^-, apportèrent les preuves indiscutables de leur implication dans les transports ioniques (Pisam, 1987).

2. Ultrastructure.

Décrivons à présent, brièvement, l'ultrastructure des organites les plus caractéristiques des cellules à chlorure (fig. 11).

2.1. Le système tubulaire.

Constituant un réseau anastomotique de tubules à calibre constant, le système tubulaire s'étend sur l'entièreté du cytoplasme des ionocytes, à l'exception de l'aire golgienne et de la zone sous-membranaire apicale. L'utilisation de marqueurs extra-cellulaires tels le rouge de Rhuténium, les sels de Lanthane ou la peroxydase démontre clairement la continuité entre le système tubulaire et la membrane basolatérale (Pisam, 1981).

Des colorants opacifiant la lumière des tubules mettent en évidence la présence de particules de 25 Å de diamètre disposées par 16 autour de la

circonférence et reproduites avec une périodocité de 80 à 100 Å. La fixation d'ouabaïne tritiée démontre que ces entités, à disposition hélicoïdale, exercent une activité Na^+/K^+/ATPasique. L'ATP est, dans ce cas, dispensé par les nombreuses mitochondries captives du réseau tubulaire.

La salinité du milieu extérieur conditionne la conformation du système tubulaire. Ses mailles sont lâches et irrégulières en eau douce, étroites et constantes en milieu salin bien que le calibre tubulaire n'en soit pas affecté (50 à 60 µm).

2.2. Le réticulum endoplasmique.

Prolongement de la membrane nucléaire, le réticulum endoplasmique s'adapte également aux conditions osmotiques. Ainsi, ses citernes dilatées, interconnectées de manière lâche et couvertes de ribosomes en eau douce, se développent et s'associent au système tubulaire en eau de mer (pour revue, Pisam & Rambourg, 1991).

2.3. Le système vésiculotubulaire.

Aisément localisé par la méthode de postfixation à l'osmium réduit (Karnovsky, 1971), le système vésiculotubulaire se répartit depuis le compartiment trans du Golgi classique, jusqu'à l'apex cellulaire. Des molécules de glucosamine marquées, au sortir du complexe golgien, s'accumulent dans les vésicules et les courts tubules avant d'être relarguées dans la cavité apicale. Le système vésiculotubulaire participe ainsi au transport des glycoprotéines pour le renouvellement du matériel de recouvrement apical (Pisam el al., 1980).

2.4. Les mitochondries.

L'abondance des mitochondries dans les celules à chlorure est telle que les colorants vitaux mitochondriaux fluorescents (DASPMI-DASPEI) (Bereiter-Hahn, 1976) permettent l'identification cellulaire (Karnaky et al., 1984).

Enserrées dans les mailles du réseau tubulaire, les mitochondries alimentent en ATP les complexes enzymatiques impliqués dans les transports ioniques. Elles font défaut dans la région golgienne et dans le pôle apical cellulaire.

2.5. L'apex cellulaire.

Le pôle apical des cellules à chlorure est marqué par la présence d'un abondant "cell coat". Ce dernier, comme l'ont démontré des études histochimiques et autoradiographiques (Pisam et al., 1980) est riche en polysaccharides. Porteur de charges anioniques, ce coat externe modifierait localement la composition ionique de l'environnement cellulaire.

Des cavités, dont la fréquence et la profondeur augmentent en conditions salines, sont décrites à l'apex des cellules à chlorure. Des études cytochimiques ont permis la détection d'une activité Na^+/K^+/ATPasique sur leur face cytoplasmique.

On repère également aisément, dans le pôle apical, de nombreuses vésicules excrétrices de quelques 200 nm de diamètre figurant probablement autant d'invaginations membranaires (Bradley, 1981).

2.6. Le cytosquelette.

a) Les microtubules.

Des études de microscopie électronique réalisées chez le cyprinidé euryhalin Rivulus (King et al., 1989) démontrent la présence de nombreux microtubules au voisinage des vésicules apicales, depuis l'apex cellulaire jusqu'aux endroits d'où ces vésicules semblent bourgeonner du système tubulaire. En conditions de salinité élevée, les cellules à chlorure de ce poisson extériorisent des projections apicales contenant microtubules et filaments intermédiaires.

Chez le mulet, la colchicine, drogue microtubulaire des plus spécifiques, n'apparaît pas exercer d'effet sur la perméabilité branchiale à l'eau; elle altère par contre l'excrétion sodique et les mécanismes dépendants du potassium. La luminocolchicine est un isomère colchique aux propriétés métaboliques identiques, mais ne fixant pas les molécules de tubuline. En sa présence, les flux ioniques sortant n'apparaissent nullement perturbés. L'inhibition colchique s'avère donc être directement liée à la disparition microtubulaire (Maetz & Pic, 1977). Les microtubules qui assurent l'intégrité de la polarité cellulaire faciliteraient, en guidant les vésicules à proximité de la membrane, le déversement de leur contenu en réduisant le transit trans-cytoplasmique.

b) Les filaments intermédiaires.

Outre leur présence à l'apex cellulaire, des filaments de 70 à 100 Å de diamètre, dispersés ou regroupés, emplissent la totalité du volume cytoplasmique. Ce sont, entre autre, les tonofilaments ancrés aux structures desmosomales solidarisant les régions apicales des cellules à chlorure adjacentes (King et al., 1989).

c) Les microfilaments.

Décrivant un réseau apical sous-membranaire d'épaisseur et de densité variables, des microfilaments prédominent au contact des complexes jonctionnels (pour revue : Pisam & Rambourg, 1991). Un traitement par la cytochalasine B atteint, presque exclusivement, l'intégrité des microfilaments cytoplasmiques, laissant intact le treillis sous-membranaire. Chez le mulet, contrairement à l'effet "colchicine", la cytochalasine induit un déséquilibre hydrominéral. L'augmentation des taux de Na^+ et de Cl^- plasmatiques résulte d'une augmentation de perméabilité branchiale à l'eau combinée à une diminution de l'excrétion saline nette. L'entrée sodique et chlorique découle d'une augmentation de perméabilité et d'une baisse de l'activation potassique des flux sortants (Pic & Lahitette, 1981).

3. Deux types de cellules à chlorure.

Des critères précis permettent la distinction de deux types de cellules à chlorure dans l'épithélium branchial des téléostéens. Il s'agit des cellules à chlorure de types α et β. Cependant, chez le saumon, ces cellules α et β ne s'observent pas. Il existe pourtant deux types cellulaires distincts qui se caractérisent par une localisation différente et quelques critères morphologiques particuliers (Pisam & Rambourg, 1991).

3.1. Les larges cellules à chlorure.

Exclusivement situées dans les espaces interlamellaires de l'épithélium primaire, les larges cellules excluent tout contact avec la circulation artérielle.

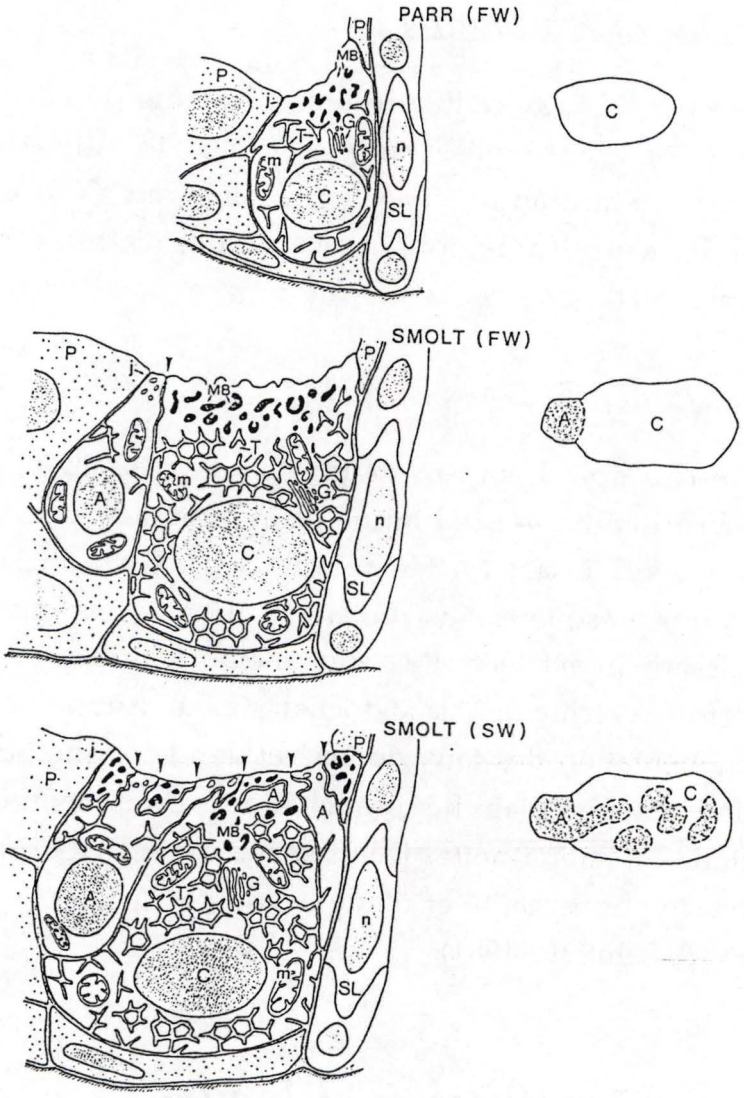


Fig. **12** : représentation schématique des modifications ultrastructurales des cellules à chlorure α et des cellules acccessoires dans l'épithélium branchial du saumon atlantique, durant la smoltification (Pisam et al., 1988).
AC: cellule accessoire; **C**: cellules à chlorure; **G**: golgi; **m**: mitochondrie; **MB**: système vésiculo-tubulaire; **n** : noyau de cellule sanguine; **P**: cellule pavimenteuse; **SL**: vaisseau capillaire; **T**: système tubulaire

Cuboïdales, elles représentent 77 % du pourcentage total des ionocytes. Une cellule basale de remplacement sépare la large cellule de la lame basale et du sinus veineux central sous-jacents. Sa surface apicale, à aspect plus ouvragé que celui des petites cellules, est doté d'épaisses et courtes microvillosités. Les organites des larges cellules à chlorure adoptent une répartition particulière : le réticulum endoplasmique développé sous le noyau basal, les mitochondries allongées le long de la membrane basolatérale, le système tubulaire de calibre irrégulier formant un réseau à texture variable non homogène et l'imposant système vésiculo-tubulaire entre l'appareil golgien et l'apex. Dans l'aire supérieure des larges cellules à chlorure se distinguent de nombreux corps à contenu dense, de tailles et formes diverses. Distincts des éléments vésiculotubulaires, leurs nature et fonction ne sont pas encore élucidées (Pisam et al., 1987 ; 1988).

3.2. Les petites cellules à chlorure.

Les petites cellules à chlorure, représentant 23 % de la population ionocytaire totale chez le parr, sont habituellement situées à une certaine distance des larges cellules à chlorure et sont en contact avec la lame basale par de petites portions de leur membrane basolatérale. Elles manifestent un apex étroit présentant de nombreuses petites vésicules et tubules, ainsi qu'une absence de matériel filamenteux apical. Dotées d'un système tubulaire aussi élaboré que les celui des larges cellules à chlorure, leur pôle apical ne renferme toutefois pas les corps denses caractéristiques de celles-ci (Pisam et al., 1988).

4. Les cellules à chlorure lors de la smoltification.

En conditions naturelles, au printemps de sa seconde année, le saumon atlantique qui se destine à gagner le milieu marin, subit des transformations morphologiques, physiologiques et biochimiques définissant la smoltification. Chez le smolt d'eau douce, les cellules à chlorure de l'épithélium secondaire se réduisent à peau de chagrin pour disparaître totalement en eau de mer. Dans l'épithélium primaire, les modifications cellulaires sont profondes (fig.12).

4.1. Hypertrophie des larges cellules à chlorure.

Au terme de la smoltification, les larges cellules à chlorure sont métamorphosées. On observe une augmentation importante de leur volume et de leur nombre. Elles passent ainsi de 77 % à 95 % de l'effectif total des ionocytes. Elles doublent pratiquement de taille, qui d'une surface de 139 μm^2 chez le parr atteint 238 μm^2 chez le smolt d'eau douce et 223 μm^2 chez le smolt d'eau de mer. Pourvues de nombreuses mitochondries, elles développent particulièrement les systèmes membranaires vésiculotubulaire, réticulinique et tubulaire. Ce dernier s'accroit pour former un réseau serré à mailles régulières plus petites que chez le parr (Pisam et al., 1988). L'activité débordante de la pompe Na^+/K^+/ATPasique s'explique aisément par la prolifération du système tubulaire porteur de l'enzyme et l'approvisionnement en ATP par les nombreuses mitochondries (Pisam et al., 1987).

4.2. Régression des petites cellules à chlorure.

A la fin de la smoltification, les petites cellules à chlorure tendent à régresser en nombre, passant de 23 % à moins de 5 % des ionocytes totaux. Leur taille et leur morphologie ne semblent pas modifiées (Pisam et al., 1988).

4.3. Apparition des cellules accessoires.

Couramment logées dans une indentation de surface des ionocytes voisins, sous la couche des cellules pavimenteuses constituant la surface libre de l'épithélium, les cellules accessoires apparaissent petites (5 à 8 µm) et ovales (Hootman & Philpott, 1980). Par des processus cytoplasmiques latéraux qui s'imbriquent dans le pôle apical des cellules à chlorure, elles entrent en contact avec le milieu externe. La paroi de la cavité apicale est, de la sorte, constituée par une mosaïque d'expansions émanant de ces deux types cellulaires (Hossler, 1980).

Les sels de lanthane (Sardet et al., 1979) et la technique du "freeze etching" démontrent la perméabilité des courts (50 nm) complexes jonctionnels apicaux unissant ionocytes et cellules accessoires adjacentes. On décrit là une éventuelle voie paracellulaire d'excrétion ionique.

A l'opposé, les cellules pavimenteuses sont solidement attachées aux ionocytes par de longues jonctions serrées de 250 nm.

Sur le plan ultrastructural, les cellules accessoires présentent un cytoplasme plus dense aux électrons que les cellules à chlorure. Elles diffèrent par la taille réduite de leurs mitochondries, la présence de volumineux lysosomes secondaires à contenu hétérogène ainsi que par un large labyrinthe tubulaire, prolongement de la membrane basolatérale. Un "cell coat" compact et solidement ancré différencie également la cellule accessoire de ses voisines (Hootman & Philpott, 1980).

Pressenties comme acteurs de l'osmorégulation, les cellules accessoires permettraient l'adaptation du poisson à l'eau de mer (Pisam et al., 1988; 1989). Néanmoins, l'activité Na^+/K^+/ATPasique y est, pour ainsi dire, réduite à sa plus simple expression. Elles exerceraient donc leurs fonctions dans le cadre d'unités impliquant également les cellules à chlorure.

5. Les cellules à chlorure et les échanges ioniques.

Les cellules à chlorure s'interposent entre deux compartiments liquidiens de composition ionique très différente : le milieu externe et le compartiment sanguin interne. La richesse mitochondriale et le développement des surfaces d'échange révèlent leur implication dans les transports actifs d'électrolytes. Prévenant les changements de concentration saline ambiante, les cellules à chlorure subissent, lors de la smoltification, une croissance en taille et en effectif concomittante à l'augmentation de leur activité enzymatique. Cette dernière s'explique davantage par la synthèse, de novo, de nouvelles pompes ioniques que par l'activation d'enzymes préexistantes (Folmar & Dickhoff, 1980).

La membrane plasmique dessinant des cryptes apicales et des anastomoses complexes, figurées par le système tubulaire, représente le siège des échanges ioniques. Nous décrirons, ci-dessous, les principales pompes ioniques, dépendantes de l'ATP, et assurant par voie directe ou indirecte le transport des ions Na^+, K^+, H^+, HCO_3^-, Cl^- et Ca^{++}.

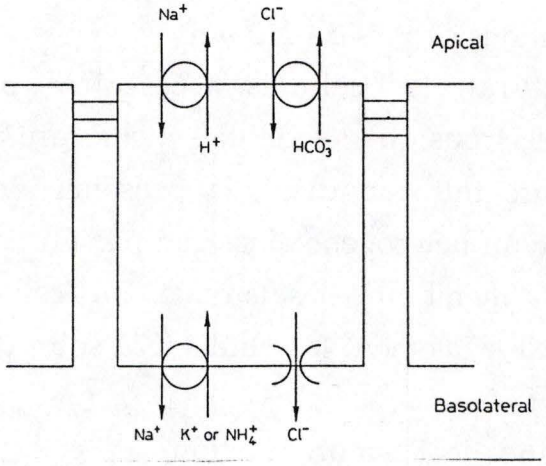


Fig. 13 : échanges des ions Na^+ et Cl^- par les branchies de poisson en eau douce (Towle, 1990).

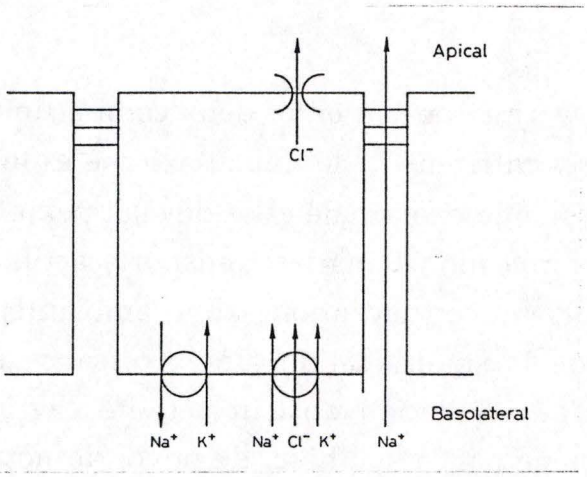


Fig. 14 : échanges des ions Na^+ et Cl^- par les branchies de poisson en eau de mer (Towle, 1990).

5.1. Les ATPases.

Catalysant l'hydrolyse de l'adénosine 5'-triphosphate (ATP), en présence de magnésium et dans un environnement ionique adéquat, les ATPases assurent le transport ionique transmembranaire.

5.1.1. La Na^+/K^+/ATPase.

Sur le plan ultrastructural, la Na^+/K^+/ATPase est un tétramère résultant de l'association de deux chaînes polypeptidiques distinctes (α_2,β_2). La sous-unité α (95000 kD) transmembranaire présente, sur sa face externe, le site de fixation à l'ouabaïne et, sur sa face cytoplasmique, le site de phosphorylation. La sous-unité β (45000), abondammment glycosylée, exerce une fonction encore mal connue. Cette pompe électrogénique assure l'échange de trois ions Na^+ contre deux ions K^+ par un mécanisme de phosphorylation, moyennant l'hydrolyse de l'ATP.

La distribution régulière de la Na^+/K^+/ATPase le long du système tubulaire extensif des cellules à chlorure et, dans une moindre proportion, sur la membrane basolatérale témoigne de l'unidirectionnalité du transport sodique dépendant de l'ATP, du cytosol vers le sang. En milieu marin, la balance des flux de Na^+ penche en faveur de l'excrétion, réalisée par traversée des jonctions intercellulaires lâches, pour atteindre la surface libre de l'épithélium (Philpott, 1980). Pour information, les transports ioniques en eau douce et en eau de mer sont brièvement illustrés dans les fig. 13 et 14.

5.1.2. La Ca^{++}/ATPase.

L'entrée des ions calcium, par le pôle apical des cellules à chlorure, est un phénomène passif, favorisé par le potentiel électrochimique et contrôlé par voie hormonale (Flick & Verbost, 1993). L'extrusion basolatérale requiert, quant à elle, la présence de transporteurs actifs, les Ca^{++}/ATPases (Shephard, 1981). Deux catégories de calcium ATPases ont été identifiées dans la membrane basolatérale; la première exercant une activité phosphatasique est de faible affinité tandis que la seconde, régulée par la calmoduline, présente une haute affinité pour le calcium. Le transport calcique basolatéral serait, pour l'essentiel, assuré par la pompe de haute affinité. Récemment, un échangeur

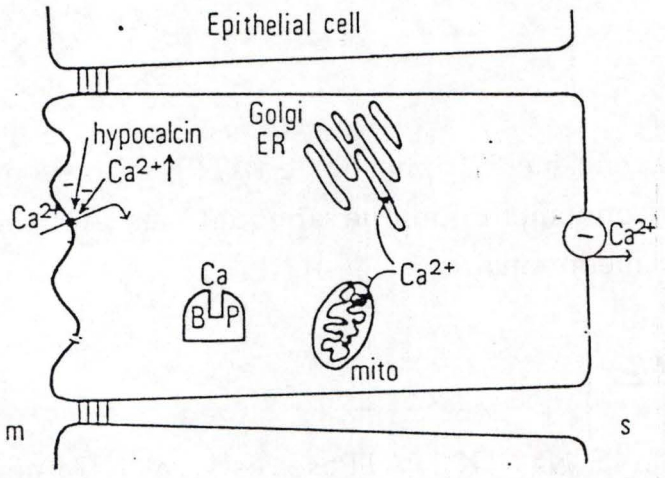


Fig. **15** : mécanismes de transport épithélial du calcium via les cellules à chlorure (Verbost, 1989).

Ca^{++} B P : protéines liant le calcium; **m** : milieu externe; **mito** : mitochondrie; **s** : compartiment sanguin

Ca^{++}/ Na^{+} de faible affinité a été identifié dans la membrane basolatérale du Tilapia (Flick et al., 1993). Ce transporteur, dont l'activité est tributaire des concentrations sodiques, agirait en cas d'urgence quand les taux calciques cytosoliques atteignent des valeurs extrêmes (fig. 15).

5.1.3. Les ATPases dépendantes des anions.

En eau douce, l'absorption des ions chlorures résulte, notamment, d'un transport actif, puisque réalisée contre le potentiel électrochimique. L'échange des ions Cl^{-} et HCO_3^{-} endogènes constitue un moyen de régulation du pH interne (Goss & al, 1992). On postule l'existence d'ATPases anioniques apicales, activées par le magnésium et inhibées par le thiocyanate, dont le fonctionnement serait tributaire de la liaison à la membrane plasmique.

Chez les Téléostéens marins, la Na^{+}/K^{+}/ATPase basolatérale établit un gradient transmembranaire autorisant un cotransport $Na^{+}/K^{+}/2Cl^{-}$. Les ions chlorures acheminés par voie transcellulaire seraient secrétés par des canaux apicaux spécifiques (Towle, 1990).

D. Le cytosquelette.

1. Introduction.

Historiquement, le concept de cytosquelette est à la fois ancien et récent. Les premières hypothèses concernant l'existence de structures fibrillaires dynamiques dans le cytoplasme furent formulées voici plus d'un siècle. Walter Flemming postula, dès 1879, la présence d'une double composante protoplasmique : un réseau fibrillaire et une substance interfibrillaire. Les nombreuses structures réticulaires décrites à la fin du 19ème siècle, furent reléguées pendant près d'un demi-siècle au rang d'artéfacts.

Il fallut attendre l'apparition de la microscopie électronique pour que les constituants cytosquelettiques soient universellement reconnus. Durant ces 20 dernières années, grâce au développement des techniques d'extraction, de réplication, de purification protéique, de polymérisation *in vitro*, d'immunohistochimie et plus récemment du "photobleaching" (où des caméras suivent l'incorporation de protéines couplées à des fluorochromes dans les cellules vivantes), la connaissance du cytosquelette a pris un essor considérable. Néanmoins, notre compréhension des mécanismes régulateurs, de l'implication du cytosquelette dans le métabolisme, les processus physiologiques de la croissance, la différenciation cellulaire, ainsi que l'identité de certains de ses constituants restent, à ce jour, malheureusement fragmentaires.

Véritable armature cellulaire, le cytosquelette se définit, paradoxalement, comme une structure hautement dynamique, présidant notamment aux divers mouvements de la cellule. Par une étroite association aux composants subcellulaires, il collabore au contrôle de leur activité métabolique.

Plusieurs réseaux filamentaires protéiques composent le cytosquelette. Ces filaments sont classés en quatre groupes sur base de leur calibre, de leurs propriétés chimiques et antigéniques :

1. les microtubules
2. les microfilaments d'actine
3. les filaments intermédiaires
4. le réseau microtrabéculaire.

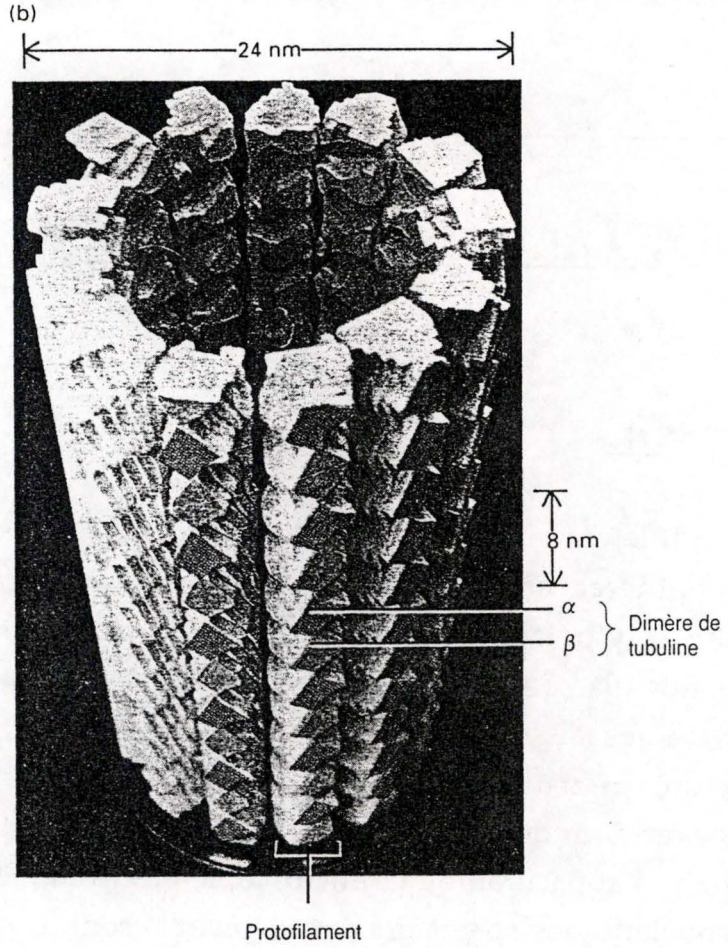


Fig. **16** : modèle d'un microtubule en trois dimensions. Les protomères de tubuline sont alignés en 13 rangées parallèles, les protofilaments; chacun est constitué d'une succession tête contre queue de dimères de tubuline, formés chacun d'une molécule de tubuline α et de tubuline β (d'après Darnell et al., 1990).

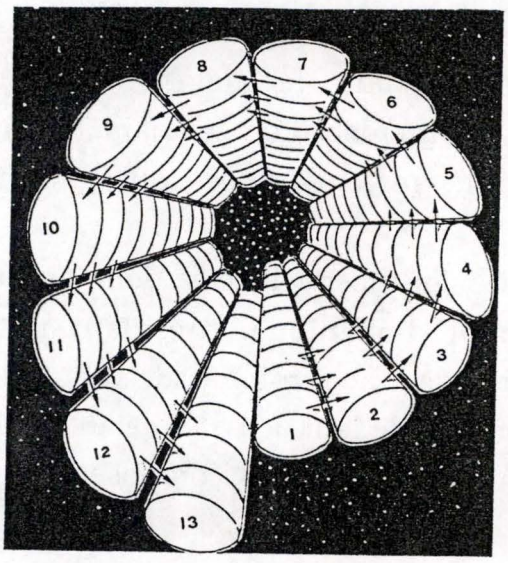


Fig. **17** : représentation schématique de la structure hélicoïdale dessinée par les 13 protofilaments du microtubule (Bershadsky & Vasiliev, 1988).

Formés par polymérisation de protéines dites principales, ces derniers sont égalemnt pourvus de protéines accessoires qui assurent, par le jeu d'interconnections diverses, la solidité et la plasticité de l'édifice (pour revue : Schliwa, 1986).

2. Les microtubules.

2.1. Structure et composition.

Premiers éléments cytosquelettiques découverts et universellement reconnus dans les cellules eucaryotes, les microtubules forment des cylindres creux de 25 à 30 nm de calibre, rayonnant d'un point proche du noyau (centrosome ou centre organisateur) vers la périphérie cellulaire.

On distingue communément deux groupes de microtubules sur base de leur caractère stable ou labile : les premiers composent, entre autres, les centrioles, axonèmes, cils et flagelles; les seconds, les asters, fuseaux achromatiques et rails de transport intracellulaire (Schulze, 1987).

Chaque microtubule résulte de l'association de chaînes linéaires de 5 nm de diamètre parallèles à l'axe central : les protofilaments (fig. 16). Ces unités constitutives sont, dans la majorité des cas, répertoriées au nombre de 13 (avec des variantes : 10 ou 11 protofilaments pour les microtubules incomplets des cils et flagelles, de certains invertébrés de la classe des nématodes, voire 14, 15, 16 dans certains cas) (Eichenlaub-Ritter & Tucker, 1984).

La molécule constitutive des microtubules est un polypeptide de 55 kD dont il existe deux formes, dénommées α et β. La tubuline α, quelque peu plus basique et plus longue, présente 40% d'homologie avec la tubuline β. Au sein du même organisme, voire du même tissu, plusieurs isoformes de tubuline peuvent, en outre, coexister. La tubuline isolée d'extraits solubles présente un poids moléculaire de 110 kD, soit le double de celui d'un monomère de tubuline. En réalité, les tubulines α et β s'associent de manière covalente en hétérodimères globulaires.

Chaque protofilament, résultant de l'alternance de sous-unités $\alpha\beta$, est légèrement décalé par rapport à son voisin selon l'axe du microtubule, de telle sorte que les dimères peuvent être joints par une ligne régulière hélicoïdale (fig. 17). Dès lors, suivant qu'il y a ou non alternance entre les deux catégories

de tubuline le long de cette hélice, on différencie deux types de treillis. Pour des raisons de géométrie, le type A s'observe lorsque le nombre de protofilaments est impair et le type B lorsqu'il est pair; ainsi en est-il des microtubules flagellaires associés en doublets. Cette distinction revêt une importance lorsqu'on sait que les molécules associées (dynéine, MAPs ou autres; *cfr* point 4.4) se fixent distinctement aux microtubules A et B, modulant de la sorte leurs activités (pour revue : Bershadsky & Vasiliev, 1988).

L'hybridation du gène de la tubuline de poulet avec celui de l'algue chlamydomonas suppose que l'évolution a exercé une pression sélective positive sur certains fragments du génome des tubulines. Notamment, le domaine C terminal variable de la tubuline β, riche en acides aminés acides et fixant les protéines associées, est conservé d'une espèce à l'autre. Cette conservation apparaît moins évidente pour les isotypes de tubuline α (Pratt & Cleveland, 1988).

2.2. Polarité.

Les hétérodimères constitutifs des protofilaments ont une orientation bien définie, ce qui confère, par voie de conséquence, une polarité particulière au microtubule. Celui-ci présente dès lors deux extrémités distinctes : une positive (*"plus end"*) et l'autre négative (*"minus end"*). Deux techniques permettent l'étude de la polarité. La première se base sur l'orientation qu'adoptent des molécules asymétriques de dynéine en décorant les microtubules (Haimo et al., 1979). La seconde tire profit de l'aptitude de la tubuline à polymériser en lames incurvées sur des parois microtubulaires préexistantes en conditions définies (concentration élevée en diméthylsulfoxyde (DMSO) et pipérazine-NN'-Bis-(2-éthanesulfonate) (PIPES)) (Heidemann & Mc Intosh, 1980).

La cellule exerce un contrôle strict sur la polarité microtubulaire; dans la majorité des cas, l'extrémité négative se localise au voisinage du centre cellulaire tandis que l'extrémité positive pointe vers la périphérie (Euteneuer & Mc Intosh, 1981). Tant dans le règne végétal qu'animal, depuis les protozoaires jusqu'aux mammifères, les mécanismes régulateurs de la polarité sont remarquablement conservés.

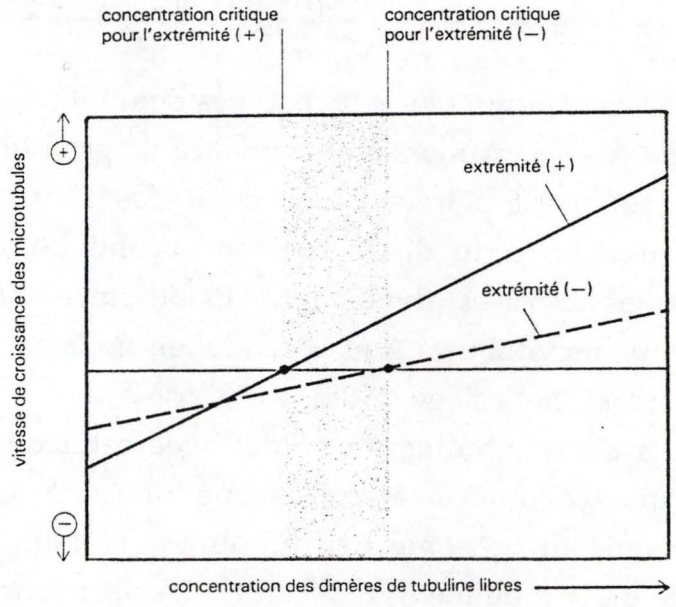


Fig. 18 : graphique représentant la vitesse de croissance microtubulaire en fonction de la concentration en dimères de tubuline libres (Alberts et al., 1983).

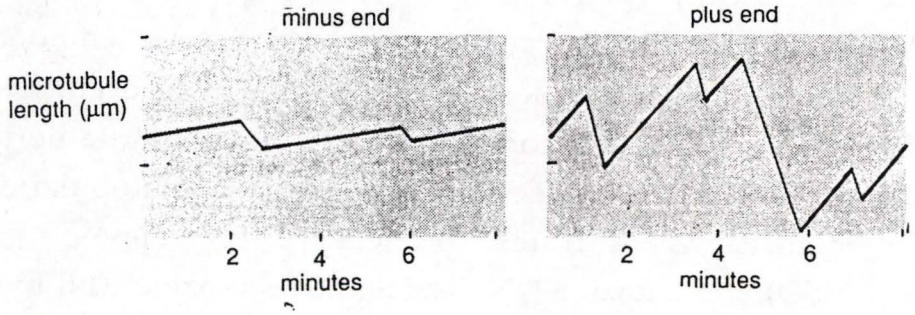


Fig. 19 : fluctuations de la longueur des microtubules en fonction du temps (Bray, 1992).

2.3. Assemblage

2.3.1. Polymérisation

Deux phases se succèdent lors de la polymérisation des microtubules: la *nucléation* et l'*élongation*.

La nucléation consiste en la formation d'un noyau de mini protofilaments associés latéralement. Quand leur nombre atteint la valeur requise, ils s'incurvent pour fermer la paroi d'un cylindre.

L'élongation poursuit la croissance de manière bidirectionnelle suivant le modèle dit de *l'instabilité dynamique*. (Voter & Erickson, 1984; Cassimeris, 1988). Celle-ci résulte du fait qu'une petite fraction des nombreux microtubules en voie de polymérisation disparaît, les monomères ayant servi à leur construction étant alors recyclés (Sammak, 1988). Si *in vitro* une dépolymérisation complète peut ainsi s'observer, dans la cellule, par contre, l'extrémité négative est stabilisée par attachement aux *microtubule organizing centers* . Ceux-ci se différencient en deux groupes suivant qu'ils sont pourvus de microtubules (centrioles, corpuscule basal) ou non (kinétochore). En particulier, le centrosome, constitué d'une paire de centrioles et de matériel amorphe péricentriolaire, dirige la croissance tubulaire (Mitchison & Kirschner, 1984a,b). La nature exacte des structures impliquées est pour l'heure encore inconnue. Néanmoins, une isoforme de tubuline nommée *γ tubuline* pourrait intervenir grâce à une double attache au centrosome et à la sous-unité β (Zheng et al., 1991).

Remarquons que la vitesse d'élongation des microtubules est plus élevée à l'extrémité positive qu'à l'extrémité négative (Farrell, 1987). Ceci s'explique par un *seuil critique* (seuil de concentration en tubuline pour lequel la vitesse de croissance est nulle) supérieur du côté négatif (fig. 18). En réalité, chacune des deux extrémités subit une alternance de phases de croissance suivies de phases de dissociation. Les fluctuations observées du côté positif sont cependant moins fréquentes, quoique pouvant être de plus grande ampleur (fig. 19).

2.3.2. Régulation

Chaque dimère de tubuline est porteur de sites de fixation pour deux molécules de GTP (guanosine triphosphate). De ces doubles sites, seul celui

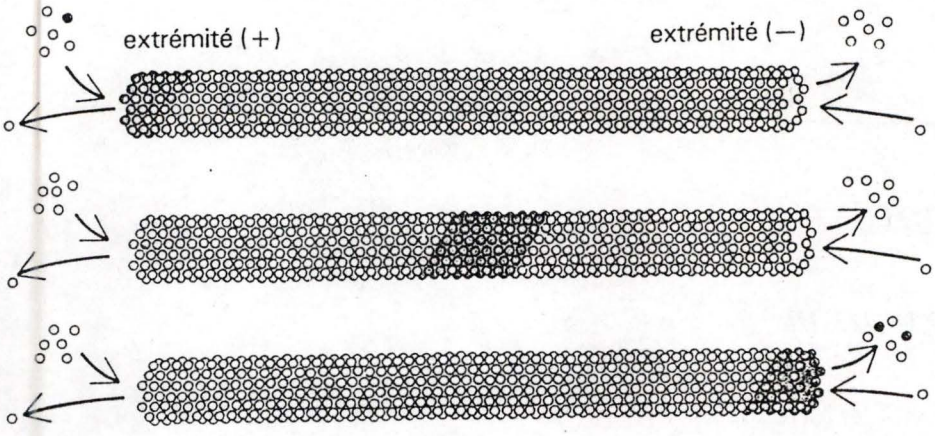


Fig. 20 : schéma illustrant la polarité microtubulaire et le phénomène du "tapis roulant". A l'équilibre, les hétérodimères de tubuline αβ sont, en permanence, fixés et perdus aux deux extrémités. Toutefois, en présence de GTP, une addition nette se produit à l'extrémité positive tandis qu'une perte nette est enregistrée à l'autre extrémité; il s'ensuit une progression des molécules le long de l'axe microtubulaire. Une situation analogue se produit dans le cas des microfilaments d'actine où c'est l'hydrolyse de l'ATP qui génère les mouvements (Darnell et al, 1990).

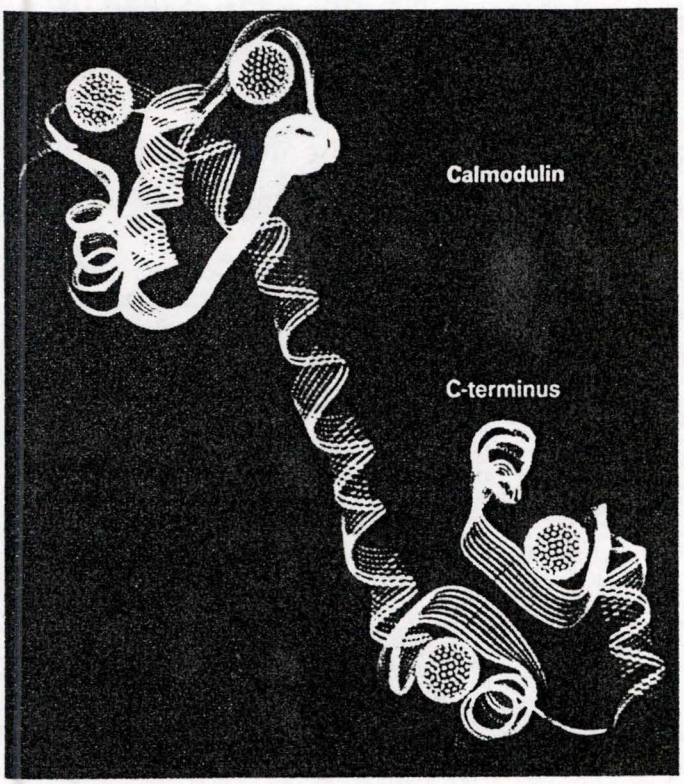


Fig. 21 : modèle de la calmoduline "en ruban" dans lequel chacun des quatre sites de fixation du calcium forme une boucle contenant des résidus aspartate, glutamate et asparagine qui établissent des liaisons ioniques. La fixation du calcium par la calmoduline engendre une importante trans-conformation qui lui permet de s'associer à d'autres protéines et de moduler, ainsi, leurs activités (Darnell et al., 1990).

localisé sur le monomère β (nommé site E) est apte à échanger et hydrolyser son GTP (Carlier et al., 1984). Lors de la polymérisation des microtubules, les changements conformationnels liés à l'incorporation de l'hétérodimère de tubuline s'accompagnent, avec un certain retard, de l'hydrolyse du GTP au site E (Mitchison & Kirschner, 1984b). Le nucléotide est donc un régulateur de la vitesse de polymérisation. Ainsi, lors d'une croissance rapide, il se formera une région terminale où les sous-unités peuvent encore porter du GTP non hydrolysé. Cette coiffe de GTP *(GTP cap)* s'avère, en raison d'une affinité plus forte pour les dimères couplés au GTP plutôt qu'au GDP, cinétiquement favorable à la polymérisation *(growing phase)*, illustrée à la fig. 20. Si la concentration de tubuline auprès de l'extrémité microtubulaire vient à diminuer, l'hydrolyse non affectée fait progressivement apparaître une coiffe de GDP qui est, quant à elle, promotrice de dissociation *(shrinking phase)*.

De plus, les ions calcium et magnésium conditionnent étroitement l'assemblage microtubulaire. Si le magnésium doit atteindre des concentrations de l'ordre du millimolaire pour agir, le calcium quant à lui exerce déjà son effet anti-polymérisant à des concentrations dix fois moindres (Schliwa, 1976). Le calcium n'agit pas isolément; son complice est une protéine cytosolique nommée *calmoduline* (fig. 21). L'efficacité du complexe Ca^{++}/calmoduline ayant été prouvée tant *in vitro* (Marcum et al., 1978) qu'*in vivo* (Keith et al., 1983), l'idée que ce dernier puisse être un moyen de réguler localement l'assemblage s'est précisée. Sa fonction est ambigüe: en séquestrant les ions Ca^{++} à la manière d'un chélateur, le complexe favorise l'assemblage, inhibé d'autre part lorsqu'il s'associe aux protéines *MAPs et Tau* (Lee & Wolf, 1984 a,b).

Enfin, de multiples facteurs, intrinsèques ou non, influencent positivement ou négativement la polymérisation : citons, parmi d'autres, la température, la pression hydrostatique, le pH, la concentration en tubuline, l'ATP, certains ions mono- ou divalents, les inhibiteurs spécifiques type taxol, nocodazole, ...(de Brabander et al., 1982). Remarquons qu'une régulation est aussi réalisée par les modifications post-translationnelles et, qu'un excédent de dimères αβ, en se fixant à l'extrémité N-terminale d'une chaîne de β-tubuline naissante, permet l'autorégulation par dégradation de la matrice du mRNA (Yen et al., 1988).

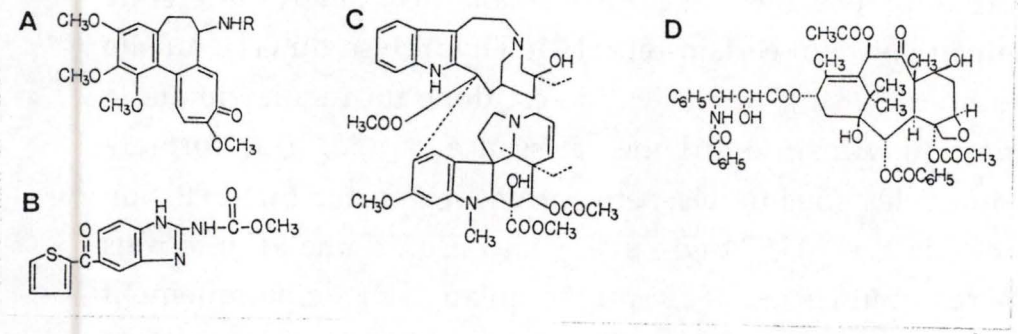
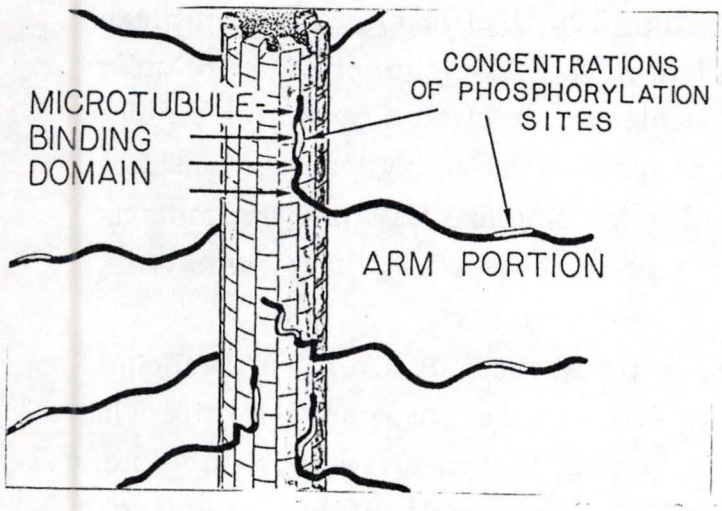


Fig. 22 : structures chimiques de la colchicine (A), du nocodazole (B), de la vinblastine (C) et du taxol (D) (Bershadsky & Vasiliev, 1988).



Fig; 23 : schéma illustrant l'interaction entre les microtubules et la protéine associée MAP-2 (Bershadsky & Vasiliev, 1988).

2.4. Drogues affectant la polymérisation.

Présentant un intérêt tout particulier pour l'étude des microtubules, certaines drogues affectent leur polymérisation et ont, à l'exception du taxol, un effet inhibiteur sur leur assemblage.

La *colchicine* est un alcaloïde hétérocyclique extrait de la colchique des prés, *Colchicum automnale* (fig. 22A). A faible concentration, son action se décompose en deux étapes : primo, elle se fixe aux dimères libres avec une forte affinité; secundo, le complexe ainsi formé est incorporé aux protofilaments (Bergen & Borisy, 1983). Suite aux changements conformationnels, l'incorporation ultérieure de tubuline est diminuée tandis que la dissociation n'est pas affectée. Remarquons que les microtubules cytoplasmiques acquièrent une résistance à la colchicine lorsque le taux d'ATP diminue. Une explication serait que la baisse d'ATP altère la phosphorylation des MAPs.

Le *nocodazole* (benzimidazole synthétique, fig. 22B) et la *podophyllatoxine* (extrait du genévrier) partagent le même site de fixation que la colchicine (Bergen & Borisy, 1983). Leurs effets sont, pour cette raison, fort semblables.

La *vinblastine* (fig. 22C) et la *vincristine*, substances actives extraites de la pervenche *Vinca rosa*, bloquent la polymérisation en provoquant la formation d'agrégats tubuliniques paracristallins (pour revue : Dustin, 1981).

Le *taxol (fig. 22D)*, extrait de l'écorce de l'if, *Taxus brevifolia* , promeut la polymérisation et ce, même en conditions défavorables (absence de MAP, de GTP, basse température,...). Il confère aux microtubules préformés une résistance à la dépolymérisation par le Ca^{++}. Son efficacité est maximale en proportion stoïchiométrique (une molécule de taxol pour un dimère $\alpha\beta$) (Manfredi et al., 1982).

2.5. Protéines associées.

Copurifiées avec les molécules de tubuline, les *MAPs* (microtubule associated proteins) se distinguent en trois catégories sur base de leur poids moléculaire : MAP-1 entre 300 et 350 kD, MAP-2 entre 270 et 285 kD et Tau d'approximativement 60 kD. Les MAP-1 et MAP-2, à la silhouette allongée, présentent chacunes au moins trois variantes (respectivement MAP1A,1B, 1C

et MAP 2A, 2B,2C). Attachés aux parois microtubulaires, elles forment des projections de 80 à 100 nm de long (fig. 23).

Les polypeptides *Tau*, générés par épissage alternatif, renferment deux domaines distincts : l'un est globulaire et muni de 3 sites de liaison à la tubuline, l'autre est effilé et peut interagir avec d'autres molécules. En tant que composants des filaments hélicoïdaux (ou dégénérescences neurofibrillaires) observés dans les maladies dégénératives du système nerveux (dont la maladie d'Alzheimer), ces molécules présentent un intérêt médical tout particulier (Dustin et al., 1992).

Les protéines MAPs et Tau sont régulées soit directement par le complexe calcium/calmoduline, soit par des processus de phosphorylation-déphosphorylation (Verde et al., 1990). Ainsi, la phosphorylation des MAPs par des kinases dépendantes de l'AMP-cyclique ou du complexe Ca^{++}/calmoduline altère la stabilité des microtubules. Outre cette fonction de maintien microtubulaire, les MAPs, également impliquées dans les mouvements des cils, des flagelles et des organites, constituent des cibles potentielles pour les divers signaux de régulation évoqués plus haut (Lee & Wolff, 1984a,b).

2.6. Aspects fonctionnels.

Acteurs de premier plan dans la vie cellulaire, les fonctions des microtubules sont multiples et variées (pour revue : Bershadsky & Vasiliev, 1988). En résumé, nous retiendrons leur implication dans :

- les mouvements intracellulaires (transport axonal, exo et endocytose, déplacement pigmentaire dans les chromatophores, mobilité des rétrovirus, ...) (Mc Niven et al., 1984);
- la mitose durant laquelle s'individualisent, lors de la désintégration de l'enveloppe nucléaire, les microtubules de l'aster, du fuseau achromatique et du kinétochore fixant les centromères chromosomiques;
- la translocation cellulaire générée par les cils à mouvements de fouet et les flagelles décrivant des vagues sinusoïdales;
- l'acquisition et la maintenance de la forme cellulaire.

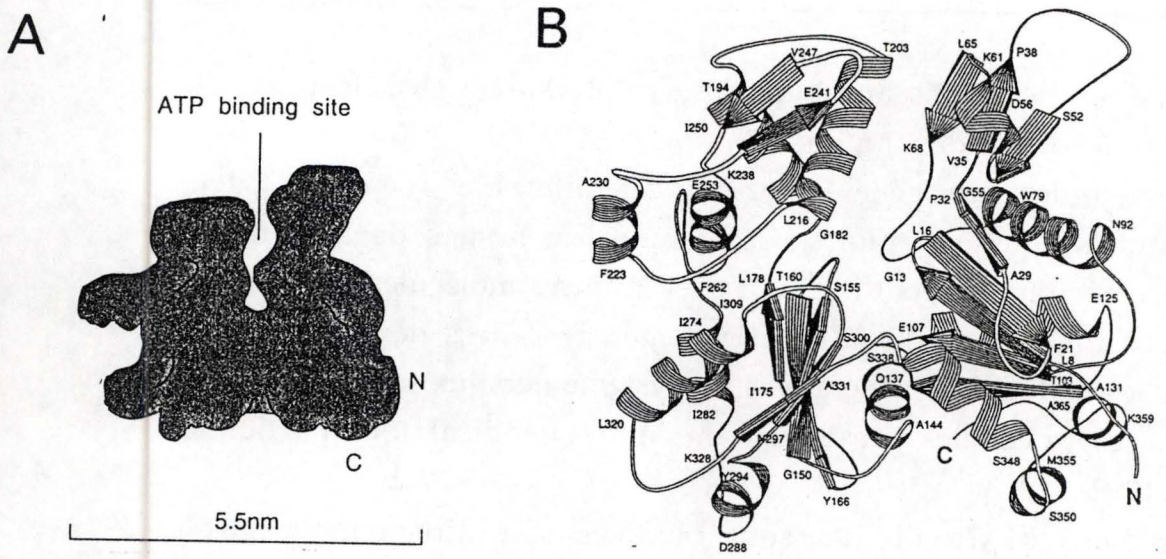


Fig. 24 **A** : illustration des deux domaines globulaires de l'actine (Bray, 1992).
B : représentation de la structure tridimensionnelle de l'actine (Kabsch et al., 1990).

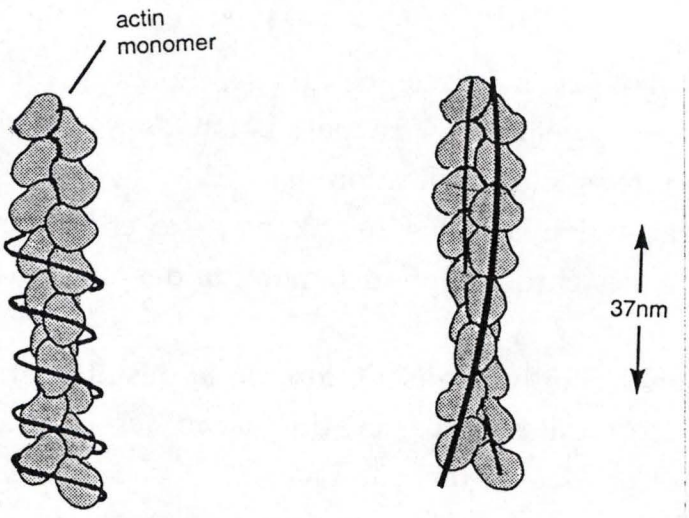


Fig. 25 : représentation des deux modèles expliquant la structure du polymère d'actine (Bray, 1992).

3. Les Microfilaments

3.1. Structure et composition.

Découverts initialement dans le muscle, la présence de microfilaments dans les thrombocytes et les cellules nerveuses fut démontrée à la fin des années 60. Aujourd'hui, les filaments d'actine *(F-actine)* sont identifiés dans toutes les cellules d'eucaryotes.

L'actine monomérique nommée *G-actine*, qui représente 5 à 10% des protéines totales de la cellule (jusqu'à 20% des protéines musculaires), est un polypeptide globulaire de 375 (parfois 374) acides aminés. D'un poids moléculaire de 42 Kd, le monomère d'actine (fig. 24), présente deux domaines globulaires séparés par un sillon logeant deux sites de liaison pour une adénosine bi ou tri-phosphatée et un cation bivalent (Ca^{++}ou Mg^{++}) (Kabsch et al., 1990).

Sur le plan évolutionnel, une similarité entre les séquences actiniques s'observe depuis les organismes les plus primitifs jusqu'aux mammifères. Cette exceptionnelle conservation peut se justifier par les interactions que l'actine établit avec de nombreuses protéines. Tout changement de séquence pourrait compromettre ces fonctions. Toutefois, chez les eucaryotes supérieurs, et parfois au sein d'une même cellule, peuvent coexister plusieurs isoformes de l'actine. Celles-ci sont, en fonction de leur point isoélectrique, groupées en trois classes α, β et γ (pour revue : Bray, 1992).

3.2. Polarité.

La polarité est très similaire à celle décrite chez les microtubules. On y retrouve une extrémité positive à concentration critique inférieure à celle de l'extrémité négative.

Deux modèles explicitent la construction des microfilaments. Le premier propose une structure en hélice gauche de quelques microns de longueur où chacun des monomères d'actine s'associe à deux de ses voisins tandis que le second introduit une double hélice droite à chaînes parallèles (fig. 25).

L'une et l'autre de ces représentations postulent que la F-actine est une molécule polaire à extrémités non équivalentes. Cette unidirectionnalité peut être visualisée par un traitement des filaments avec des molécules de myosine

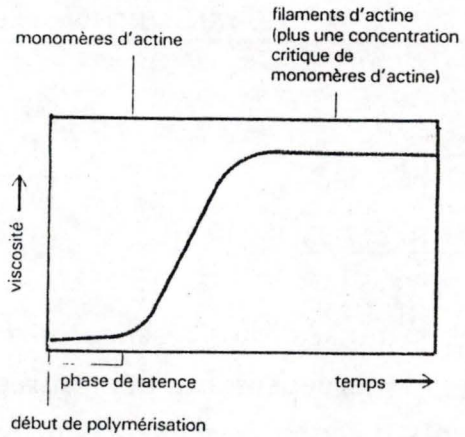


Fig. 26 : cinétique de la polymérisation de l'actine mesurée par l'augmentation de la viscosité (Alberts et al. 1983).

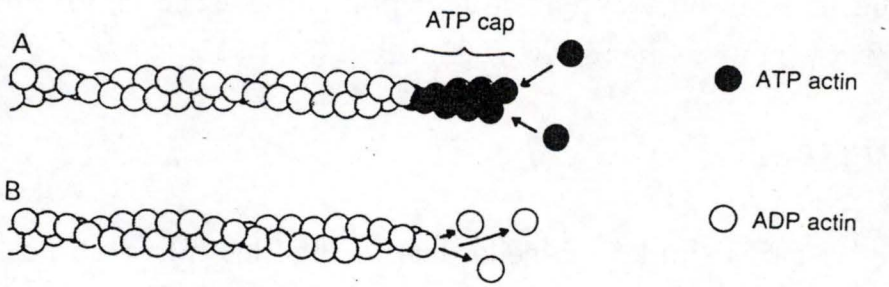


Fig. 27 : modèle de l'instabilité dynamique : lors de la phase de croissance, une coiffe d'ATP est favorable à la polymérisation, par contre, quand ce dernier est hydrolysé, il se produit une dépolymétrisation (B) (Bray, 1992).

qui développent des projections latérales pointant dans une direction (Bremer et al., 1991).

3.3. Assemblage.

3.3.1. Polymérisation.

Des expériences *in vitro* ont démontré que la polymérisation actinique s'accompagne d'une augmentation de viscosité et d'absorbance des ultraviolets à 232 nm. Les sels de K^+, Mg^{++}, Ca^{++} lui sont favorables en modifiant probablement la conformation moléculaire (Mooseker et al., 1986; Valentin-Ranc & Carlier, 1991). La courbe de l'apparition des polymères d'actine en fonction du temps débute par une phase de croissance lente (*lag phase)* et se poursuit par une augmentation de la vitesse, jusqu'à l'obtention d'un plateau (*cfr* fig. 26). Ces données suggèrent une succession de trois étapes :

- une activation des monomères actiniques par des changements conformationnels
- une nucléation par association de quelques monomères (le plus souvent trois)
- une élongation rapide par addition réversible de monomères aux deux extrémités du filament en croissance (Bremer et al., 1991).

Dans cette cinétique, à un moment donné, la concentration des G-actines en voie d'incorporation devient critique. Un équilibre polymérisation-dépolymérisation est atteint et la croissance est alors nulle.

Le *treadmilling* ou tapis roulant désigne le flux stationnaire des sous-unités le long du polymère quand ce dernier est en équilibre avec l'actine monomérique. Il s'observe lorsque la valeur de la concentration en actines-G libres est intermédiaire entre les deux concentrations critiques des extrémités (Korn et al., 1987).

3.3.2. Régulation.

Dans le cas des microfilaments, c'est l'hydrolyse de l'*ATP* qui fournit l'énergie nécessaire au treadmilling (fig. 27). Comme la molécule à haute énergie se fixe plus rapidement qu'elle ne perd son phosphate, une coiffe d'ATP favorable à la croissance se constitue. L'*instabilité dynamique*, ou les fluctuations de longueur liées à l'hydrolyse de nucléotides, apparaît cependant

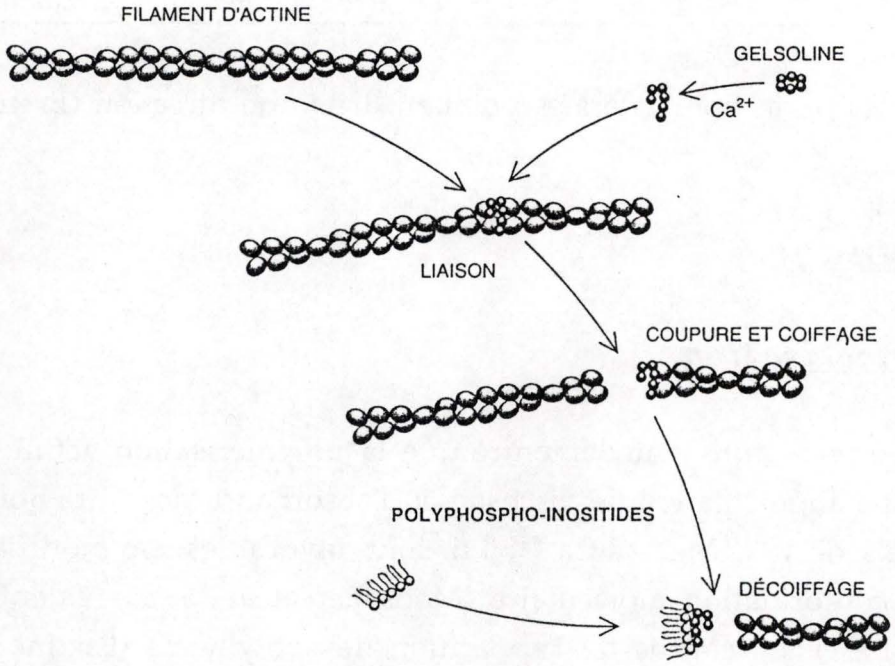


Fig. 28 : En présence des ions calciques, la gelsoline coupe les filaments d'actine et coiffe une des extrémités, bloquant ainsi son élongation. Celle-ci sera restaurée par l'intervention de polyphosphoinositides membranaires qui décrochent la gelsoline de l'actine (Stossel, 1994).

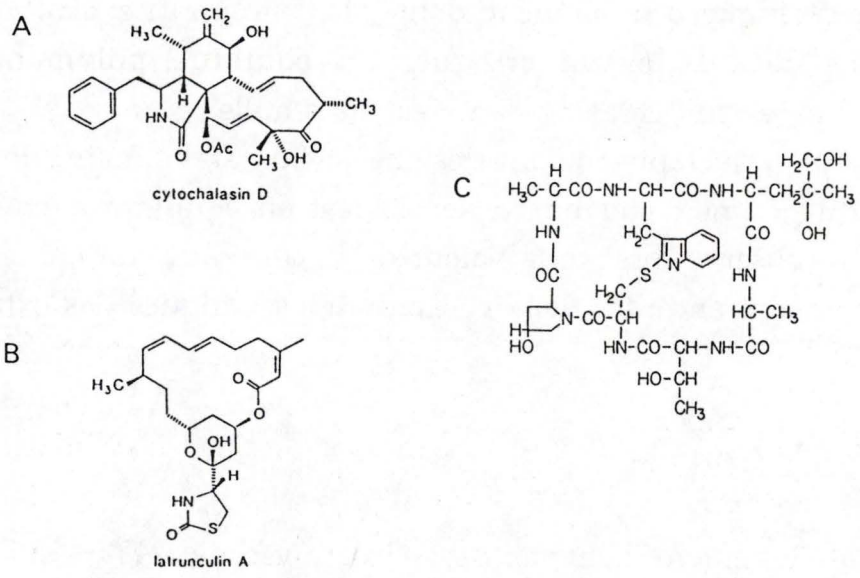


Fig. 29 : structures chimiques de la cytochalasine D (A), de la latrunculine A (B) et de la phalloïdine (C) (Bray, 1992).

plus fondamentale pour les microtubules. Rappelons que ces derniers subissent des variations de longueur bien plus considérables que les microfilaments (pour revue : Carlier et al., 1991).

Par diverses stratégies, des *acting binding proteins (ABPs)* modulent la formation des filaments de F-actine. Ainsi, les profiline et DNAses I pancréatiques séquestrent les monomères d'actine-G, les empêchant ainsi de contribuer à la polymérisation.

D'autre part, les *gelsoline* (Hartwig et al., 1989), *villine* (Friederich et al., 1989), *brevine, β–actinine, actin-depolymerizing factor (ADF)* (Léna et al., 1991; Morgan et al., 1993) ou *acumentine* coiffent l'actine-G en s'y associant. Dès qu'il les incorpore, le microfilament se fragmente ou tout du moins se voit bloquer dans son élongation (fig.28).

Par une association latérale, la famille des *tropomyosines, troponines* et *cofilines* permet une stabilisation des polymères de F-actine (Hawkins et al., 1993).

Enfin, rappelons que diverses molécules interviennent de manière prépondérante dans la régulation des structures actiniques. Citons, notamment, le calcium dont la concentration est un facteur clé de la formation et de l'élongation des polymères d'actine (Stolz & Bereiter-Haln, 1988; Stossel, 1989). Son action peut, par ailleurs, être médiée par la calmoduline (Sobue & Sellers, 1991) ou encore les phospholipides inositols (PIP_2, diacylglycérol, IP_3) (pour revue : Janmey, 1994). Pour clôturer, mentionons que d'autres ions inorganiques comme le magnésium, le potassium et le chlore peuvent également interférer avec la polymérisation actinique (Pardee et al.,1982).

3.4. Drogues affectant la polymérisation.

Les *cytochalasines* forment une famille de composés hétérocycliques métabolites de divers champignons (fig. 29A). Elles exercent leurs effets par reconnaissance de l'extrémité positive des microfilaments. Les cytochalasines, à faible concentration, paralysent la plupart des mouvements cellulaires mais n'altèrent pour ainsi dire ni la mitose, essentiellement dépendante des microtubules, ni la contraction musculaire, où sont impliqués des filaments stables d'actine (Cooper, 1987).

La *phalloïdine*, (fig. 29C) extraite du champignon vénéneux *Amanita phalloïdes* , est le principal représentant du groupe des phallotoxines, heptapeptides bicycliques. Agent stabilisateur de l'actine polymérisée, la

phalloïdine couplée à un dérivé fluorescent permet le marquage des filaments actiniques. Ses effets, à forte concentration, sont cependant identiques à ceux produits par les cytochalasines (Cooper, 1987).

Les *latrunculines* (fig. 29C), extraites de l'éponge rouge de mer *Latrunculia magnifica*, sont d'utilisation plus récente. Formant des complexes avec l'actine monomérique dans un rapport 1:1, elles génèrent la dépolymérisation.

Récemment, des facteurs dépolymérisants tels l'érythro-9-(3-(2-hydroxynonyl))-adénine (EHNA) compétiteurs de l'ATP sont utilisés, tant *in vitro* qu'*in vivo* pour perturber l'organisation actinique (Schliwa et al., 1984).

3.5. Protéines de "cross-linkage" associées.

Les polymères d'actine dessinent deux types de construction: les faisceaux de filaments parallèles et les gels, réseaux tridimensionnels où les filaments se croisent à angle variable. Les protéines de "cross-linkage" présentent au moins deux sites de liason à la F-actine, de telle sorte qu'elles puissent les interconnecter. Elles sont répertoriées en fonction de leur mode d'action.

L'*actin-binding protein (ABP)* et la *filamine*, fort proches sur le plan immunologique, s'associent en longs homodimères. Reliés bout à bout et fixés aux polymères d'actine, leur flexibilité assure la formation et la consolidation des gels tridimensionnels. La *spectrine*, dont les deux variantes α et β s'assemblent en tétramères, les *fodrines* et *myosines* dépendantes du Ca^{++}, ont un mode d'action semblable à celui de l'*ABP*.

De poids moléculaire inférieur aux précédentes, les *fascine* et *fimbrine* ont une conformation globulaire. Elles solidarisent régulièrement les filaments d'actine qui construisent ainsi des "fagots" compacts.

Les associations en dimères non flexibles font de l'*α–actinine* ou de l'*actinogéline* les constructeurs de réseaux lâches où se côtoient les états de gel et de faisceaux organisés (Stossel, 1994).

Signalons pour conclure la remarquable polyvalence de la *villine*. En concentration calcique infime, elle contribue à la formation de structures actiniques organisées; à quelques micromolaires de calcium, elle se définit comme une protéine de coiffe alors qu'elle rompt la F-actine lorsque le calcium est très concentré (Friederich et al.,1989).

3.6. Aspects fonctionnels.

Sous la forme de faisceaux filamenteux longitudinaux, comme observés dans les microvillosités, les stéréocils des cellules accoustiques ou encore les fibres de stress des cellules en culture, l'actine remplit une fonction structurelle. Formant un réseau dense dans tout le cytoplasme, elle se trouve également concentrée en périphérie cellulaire au voisinage de la membrane plasmique. Ce *cortex*, formé par association à des myosines et autres protéines de liaison, s'ancre à la face membranaire interne. Cette couche corticale maintient une tension constante à l'encontre des déformations, tout en permettant des contractions locales générées par des mouvements de glissement (pour revue : Bray &White, 1988).

La cytocinèse se caractérise par une redistribution du complexe actine-myosine dans la région de clivage des cellules en division.

Le couple actine-myosine est aussi impliqué dans la génération des déplacements cellulaires (migration leucocytaire), dans les diverses déformations de surface (endocytose-exocytose), ainsi que dans le contrôle du maintien de la forme des érythrocytes et des cellules nucléées.

Le capping lymphocytaire, observé après traitement par anticorps polyclonaux ou par lectines, semble quant à lui faire intervenir le cortex actinique puisque des études récentes ont démontré que l'utilisation de cytochalasines empêchent ce phénomène (pour revue : Bray & White, 1988).

La transformation gel-sol, résultant du clivage du réseau d'actine par le calcium, s'accompagne d'un phénomène de contraction impliqué, plus que probablement, dans les mouvements cellulaires internes (type courants cytoplasmiques). Ainsi, il a été démontré que l'actine jouait un rôle de premier plan dans les courants rotationnels de l'endoplasme des cellules géantes de l'algue Nitella. Les mouvements radiaires des organites sont, quant à eux, davantage tributaires des rails du réseau microtubulaire. On peut penser dans ce cas, bien que cela reste hypothétique, que l'actine fait office de cable tracteur. Cette hypothèse ne se vérifie pas dans le cas des lysosomes (Collot, 1988).

Pour terminer signalons que la localisation des microfilaments n'est pas exclusivement cytoplasmique : une matrice d'actine nucléaire s'observe, notamment en interphase, sous une forme presque exclusivement oligomérique. Des anticorps bloquant l'actine altèrent spécifiquement les

acides ribonucléiques messagers en laissant intacts les acides ribosomaux. Définie comme un cofacteur de la RNApolymérase II, l'actine s'avère indispensable à l'initiation transcriptionnelle (pour revue : Bouteille et al., 1983).

4. Les filaments intermédiaires.

4.1. Structure et composition.

Ces troisièmes constituants cytosquelettiques doivent leur nom à une taille intermédiaire entre celle des microtubules et des microfilaments, comprise entre 8 et 12 nm ("10 nm-filaments"). Ils constituent un réseau lâche et dynamique irradiant de centres proches du noyau vers la membrane plasmique. Chimiquement très stables, les filaments intermédiaires partagent une même morpholgie, mais diffèrent sur les plans biochimiques et immunologiques. On en distingue 5 classes chez les vertébrés :

I. la *vimentine* (53kD) localisée dans les tissus mésenchymateux, cellules sanguines, cellules osseuses et cartilagineuses.

II. La *desmine* ou *squelettine* (52kD) présente dans les cellules musculaires lisses et striées.

III. Les *filaments gliaux* ou "glial fibrillary acidic protein", *GFAP* (50 kD) constitutifs des cellules astrogliales.

IV. Les *neurofilaments* ou *"neurofilament triplets"* vu la coexistence de trois polypeptides (70, 130 et 180 kD) se trouvant dans les axones et dendrites nerveux.

V. Les *kératines* (entre 40 et 50 kD) des cellules épithéliales représentent le groupe le plus important. Elles se répartissent en deux familles : le type acide de point isoélectrique et de poids moléculaire plus bas que le type neutre-basique. Chaque cellule épithéliale comporte au moins deux et au plus une dizaine de types de kératine distincts (Aebi et al., 1983; Coulombe & Fuchs, 1990).

Pour être tout à fait complet, il faut ajouter la *périphérine* des axones périphériques, l'*α–internexine* apparaissant temporairement lors de la différenciation neuronale et les *lamines* (de type A, B ou C) de l'enveloppe

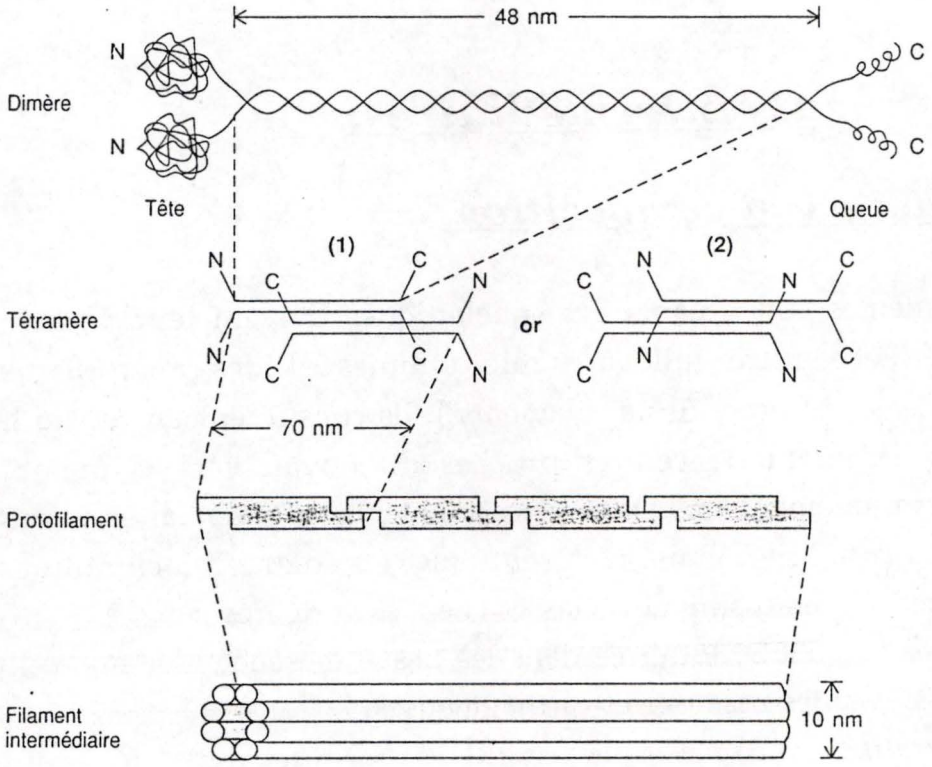


Fig. **30** : les éléments de base des filaments intermédiaires sont des dimères superhélicoïdaux qui s'associent antiparallèlement en tétramères. Huit protofilaments, résultant de l'assemblage de tétramères en file indienne, constituent le filament intermédiaire de 10 nm (Darnell et al., 1990).

nucléaire de toute cellule eucaryote (Steinert et al., 1984; Georgatos & Blobel, 1987).

4.2 Assemblage.

Chaque monomère comporte un domaine central, proche de 40 Kd, subdivisé en sous-domaines hélicoïdaux, séparés par de courtes séquences linéaires. De part et d'autre s'agencent des segments terminaux non hélicoïdaux. Latéralement, les domaines centraux de deux monomères interagissent pour constituer un dimère, en double hélice, consolidé par des interactions entre les extrémités (fig. 30). Les tétramères ou protofilaments résultent de l'association bout à bout de deux homodimères. Au dernier niveau d'organisation, quatre protofibrilles, paires de protofilaments, s'assemblent en filament (Steinert et al., 1985; Steinert & Liem, 1990).

La régulation se fait par l'intervention de kinases qui phosphorylent les domaines des extrémités, modifiant ainsi leurs propriétés d'association ainsi que par des protéases sensibles au calcium et spécifiques à chaque type de filament (Leterrier et al., 1981; Traub & Nelson, 1981).

4.3. Protéines associées.

Assurant la liaison entre filaments intermédiaires, ou associant ces derniers à des structures cellulaires, les protéines associées sont spécifiques des tissus dans lesquels on les rencontre.

Citons pour exemple la *filagrine* des cellules épidermiques qui stabilise les filaments de kératine, les *protéines riches en cystéines* des poils, les *synemine* et *paranemine* associées aux filaments de desmine des cellules musculaires ainsi qu'à certains filaments de vimentine, et enfin la *plectine* liée immunologiquement aux *MAPs* et intervenant probablement dans la liaison des filaments intermédiaires aux microtubules (Foisner et al., 1991).

4.4. Aspects fonctionnels.

Une stabilité, supérieure à celle des autres composants cytosquelettiques, fait jouer aux filaments intermédiaires un rôle plus mécanique que dynamique. La coexistence de plusieurs classes de filaments au sein d'une

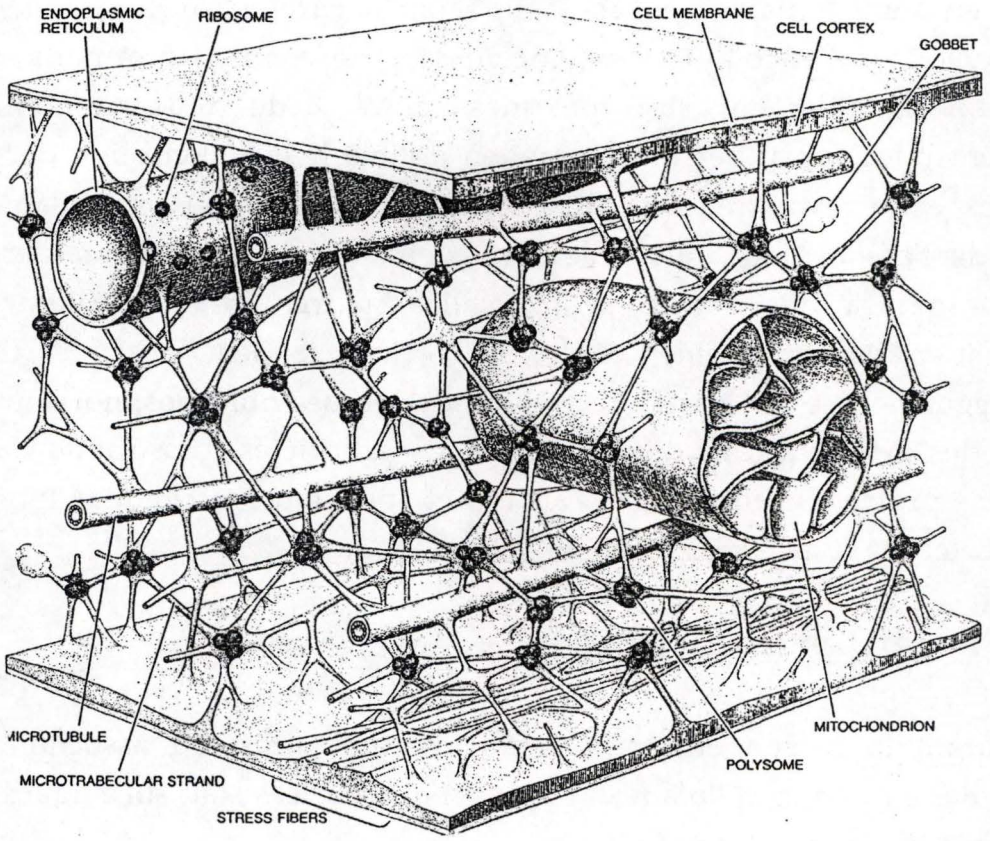


Fig. 31 : modèle du réseau microtrabéculaire (Porter et al., 1981).

même cellule fait penser à une hétérogénéité fonctionnelle (pour revue : Fuchs & Weber, 1994).

Les cytokératines des cellules épithéliales sont ancrées par leurs extrémités aux faces cytoplasmiques des membranes desmosomales. Ces jonctions intercellulaires assurent un lien mécanique entre cellules voisines.

Outre leur implication dans les contacts cellulaires spécialisés, ces filaments exercent leur rôle dans l'acquisition et le maintien de la forme cellulaire, la kératinisation épithéliale, la distribution des organites, le transport d'informations ou encore la localisation du noyau.

L'effondrement des réseaux de filaments intermédiaires lors des traitements par des inhibiteurs de microtubules et microfilaments suggère une étroite association cytosquelettique.

5. *Le réseau microtrabéculaire : découverte et polémique.*

Le microscope électronique à haut voltage permet l'examen de spécimens épais de plusieurs microns. En effet, le potentiel accélérateur des électrons étant 10 fois supérieur à celui généré par un microscope classique, l'énergie cinétique élevée permet une observation en profondeur de la structure tridimensionnelle intracellulaire (Wolosewick & Porter, 1979).

Cette nouvelle technique a permis l'observation d'un grillage de filaments interconnectés dont certains présentaient une forte similitude avec les éléments cytosquelettiques, tandis que d'autres étaient de calibres irréguliers compris entre 3 et 5 nm. Le réseau bâptisé *microtrabéculaire* semble suspendre à ses mailles les organites et le cytosquelette proprement dit. Ce treillis sensible aux conditions d'expérience (Ca^{++}, Mg^{++}, pression osmotique, température, inhibiteurs métaboliques, ...) est défini comme un système dynamique d'amarre et de guidage pour les organelles. Ses propriétés visco-élastiques sont plus proches de celles d'un gel que d'un fluide. Le réseau microtrabéculaire divise le contenu de la cellule en deux phases : ses propres protéines polymérisées et une phase fluide, aqueuse, remplissant les espaces intertrabéculaires (fig. 31).

L'analyse de la composition chimique du réseau microtrabéculaire permit de recenser plus de 400 peptides, dont l'actine est le majoritaire. On

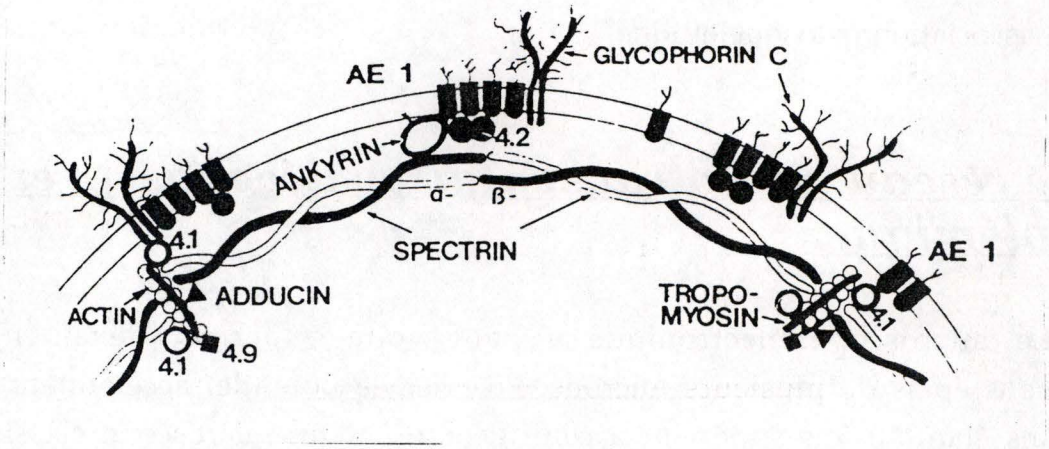


Fig. 32 : organisation des interactions cytosquelette-membrane plasmique dans l'érythrocyte (Drenckhahn et al., 1993).

pense que ce réseau serait constitué d'éléments cytosquelettiques labiles (Schliwa et al., 1981).

Le réseau microtrabéculaire occupe une place de premier plan dans l'activité cellulaire. Il serait notamment impliqué, en association avec d'autres éléments pré-cités, dans le soutien des ribosomes lors de la synthèse protéique, la coordination des activités enzymatiques dans les chaînes métaboliques, l'assemblage des microtubules par étroite association aux "microtubule organizing centers"; en collaboration avec le cytosquelette, il formerait la charpente cellulaire, permettrait la différenciation des expansions de surface, la migration pigmentaire,... (Porter & Tucker, 1981).

Néanmoins, l'existence de ce grillage microtrabéculaire ne fait pas l'unanimité. D'aucuns prétendent qu'il s'agit d'une coagulation protéique formant des dépôts fibreux lors de la fixation.

Cependant des arguments plaident en faveur d'une existence réelle. Ce réseau est identifié en microspcopie dans des échantillons traités par des techniques différentes et d'autre part, il se réorganise lorsque l'environnement ou la forme cellulaire sont modifiés.

Le développement des techniques d'identification spécifique de ces structures conforterait l'hypothèse de leur existence.

6. Relation cytosquelette- membrane plasmique.

L'ensemble des éléments cytosquelettiques interagissent entre eux dans le cadre d'un réseau cytoplasmique complexe par le truchement d'interactions dynamiques. Un enchevêtrement bidimensionnel de quelques 0.5 micron adhère étroitement sous la membrane plasmique. Ce *cortex* concentré en actine renferme également dans ses mailles une large variété de protéines annexes, dont les protéines de liaison (fig. 32).

A) Les microfilaments :

L'actine établit des liens étroits avec la membrane plasmique,et ce, de manière directe ou indirecte. Des protéines intégrales de membrane (que seule une dissolution des lipides peut extraire) sont dotées de propriétés de fixation directe et de nucléation de l'actine; citons pour exemple la *ponticuline* isolée

chez l'amibe Dictyostelium, ainsi que l'*épidermal growth factor receptor (EGFR)* (Hitt & Luna, 1994).

D'autre part, l'association indirecte de l'actine à la membrane plasmique a fait l'objet de nombreux travaux et a été particulièrement étudiée sur les "ghosts" de globules rouges (pour revues : Bennett & Gilligan, 1993; Ursitti & Wade, 1993). Dépourvus d'organites, de microtubules et filaments intermédiaires, l'erythrocyte mammalien doit à son cortex la restauration de sa forme biconcave après déformation. La *spectrine* en est la composante majeure. Elle est figurée par deux longs peptides flexibles α (240 kD) et β (220 kD) en forme de collier de 17 perles (unités répétitives de 106 acides aminés). Les paires anti-parallèles de peptides αβ s'associent en tête-bêche pour construire le tétramère de 200 nm, majoritaire dans le cortex du globule (variantes : hexamères ou octamères). Le tétramère de spectrine renferme plusieurs sites de liaison. Le premier site reconnait l'extrémité négative d'un court filament d'actine de quelques 13 monomères (Karinch et al., 1990). Les autres sites interagissent avec deux molécules de *tropomyosine* stabilisatrices de la F-actine (Derick et al., 1992), les protéines *4.1, 4,9* (*ou dematin*) ainsi que *l'adducine* - qui, en fixant la calmoduline, stimule l'association actine-spectrine.

L'attache de la spectrine à la membrane repose, soit sur des interactions lâches et sans intermédiaire, soit sur l'intervention de protéines telles que l'*ankyrine* ou la *protéine 4.1.* L'*ankyrine* est littéralement prise en sandwich entre la quinzième unité répétitive de la β spectrine et la portion cytoplasmique du transporteur d'anions - protéine de la bande 3 (*band 3 protein*) - solidement ancré par ses interactions hydrophobes dans la bicouche membranaire. La *protéine 4.1,* formée de deux sous-unités pratiquement identiques, relie le complexe actine-spectrine à la face cytoplasmique de la protéine plasmique nommée *glycophorine.* La liaison à la glycophorine glycosylée n'est permise qu'en présence du phospholipide phosphatidyl-inositol-4,5 biphosphate (PIP_2) qui régule de même les "actin-binding proteins" *α-actinine, profiline et gelsoline.*

La *spectrine* érythrocytaire est membre d'une super-famille moléculaire formée de sous-unités structurellement proches, associatives et présentant des sites de liaison à l'actine, l'ankyrine et la protéine 4.1. (Repasky et al., 1982; Dhermy, 1991). Outre la spectrine, cette famille est également, entre autres, celle de la *fodrine-calspectrine ou spectrine non érythrocytaire* , de l'*α–actinine*

et de la *dystrophine* dont l'absence est observée dans la dystrophie de Duchenne.

Des analogues aux protéines des globules rouges, ayant des attributs fonctionnels fort proches, ont été découverts dans la plupart des cellules. Néanmoins, leur répartition au sein des cellules nucléées peut être distincte. Par exemple, les régions de contact intercellulaire sont enrichies en spectrine et en adducine (Kaiser et al., 1989). Les jonctions adhérentes spécialisées font intervenir des protéines membranaires de la famille des *cadherines* dépendantes du calcium. Ces dernières expriment un domaine cytoplasmique associé par l'α-actinine ou la vinculine au cytosquelette.

B) Les microtubules.

L'association des microtubules aux membranes est moins bien cernée. Au niveau des cils et flagelles, on sait que des liens sont tissés, mais leur nature exacte demeure inconnue. On a démontré la reconnaissance de l'ankyrine (*in vivo* et *in vitro*) et de la fodrine (*in vivo*) par les microtubules. Des analogies immunologiques entre certaines MAPs du cerveau de porc et des protéines membranaires d'hématie dont l'ankyrine, la spectrine et la protéine 4.1 ont été prouvées (Hill et al., 1985). Dans les érythrocytes non mammaliens ainsi que dans les plaquettes sanguines, les microtubules forment des bandes marginales associées étroitement au cortex actinique via des protéines de liaison telle l'*erzine* (Arpin et al., 1994).

C) Les filaments intermédiaires.

En ce qui concerne les filaments intermédiaires, il a été démontré que la vimentine interagit avec la spectrine. L'ankyrine semble encore intervenir, dans ce cas, comme médiateur entre l'élément cytosquelettique et la membrane plasmique (Georgatos et al., 1985).

7. Différenciations membranaires.

7.1. Le desmosome maculaire (macula adhaerens).

Dispositif jonctionnel ovalaire ou discoïde, le desmosome maculaire (fig. 33) des cellules épithéliales se caractérise par des épaississements localisés des

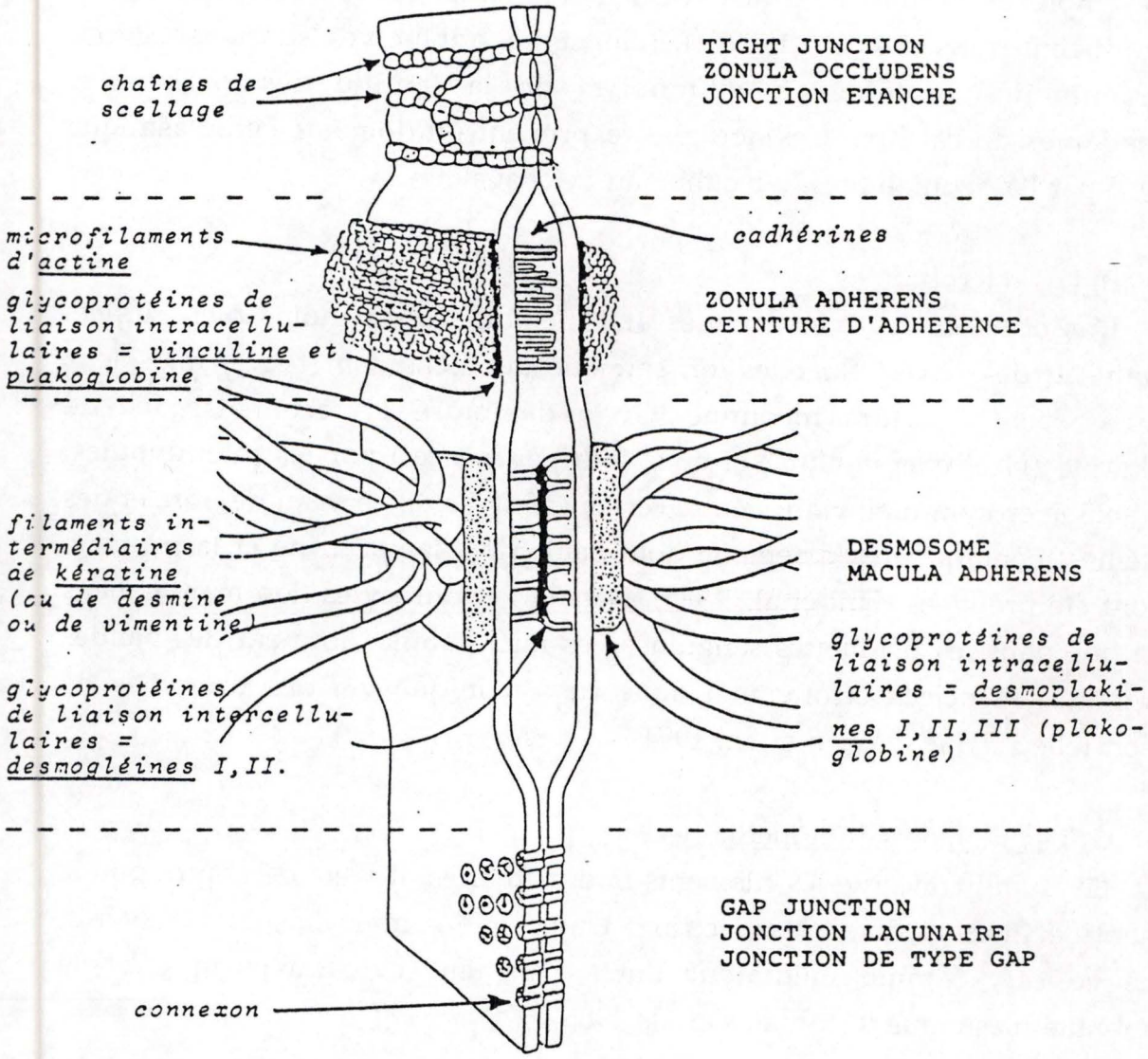


Fig. 33 : représentation tridimensionnelle d'un complexe de jonction comportant des jonctions serrées ("tight junctions"), des jonctions d'ancrage (desmosomes maculaires et diffus) et des jonctions communiquantes ("gap junctions") (extrait du syllabus d'Histologie Générale, vol. I, par R. Leloup).

feuillets membranaires plasmiques internes de deux cellules adjacentes, assurant l'ancrage des cytokératines. Les *desmoplakines* (de types I et II) associées à des polypeptides non glycosylés tels les "band 5 protein", "band 6 protein" et "desmocalmine" (une calmoduline binding protein), constituent les principaux éléments de ces plaques d'attache. L'espace intermembranaire à peine dilaté (20 à 30 nm) est occupé par des protéines transmembranaires glycosylées (*band 3 glycoprotein, desmoglein I, band D triplet,...*) formant une bande membranaire externe épaissie. Ces densifications membranaires symétriques dessinent, avec la ligne médiane, une structure pentalaminaire caractéristique. Par leurs tonofilaments ainsi solidarisés, les desmosomes préviennent les forces de tension et de cisaillement (pour revue : Franke et al., 1987).

7.2. Le desmosome diffus (zonula adhaerens).

Localisé sous les "tights junctions" apicales (voir 4.6.3), le desmosome diffus (fig. 33) forme une ceinture péricellulaire. D'apparence moins dense que son homologue maculaire, il se distingue par la largeur de l'espace intercellulaire et l'association, non plus aux cytokératines, mais à des microfilaments contractiles d'actine et autres "actin-binding proteins" (vinculine, α–actinine, ...) en relation avec les structures du "terminal web" (*cfr* point 5.2.4). Son implication n'est plus seulement passive puisque le desmosome diffus, associé aux microfilaments, permet la transmission de proche en proche des forces cellulaires engendrées de l'intérieur (Meza et al.,1981).

7.3. La tight junction (zonula occludens).

La tight junction (ou jonction serrée, fig. 33) se définit par une série de points de contact étroit entre les feuillets membranaires externes de cellules adjacentes. La technique de "freeze-etching" a permis l'identification de protéines membranaires partagées par deux cellules voisines et disposées en rangées. Cette jonction serrée, en scellant l'espace intercellulaire, circonscrit un nouveau compartiment (Griep et al., 1981). Dans la majorité des épithéliums, on décrit une voie de transport paracellulaire tributaire de l'AMP cyclique, des protéines kinases C ainsi que des concentrations calciques externes. Ainsi, l'intégrité fonctionnelle des jonctions serrées est hautement tributaire des

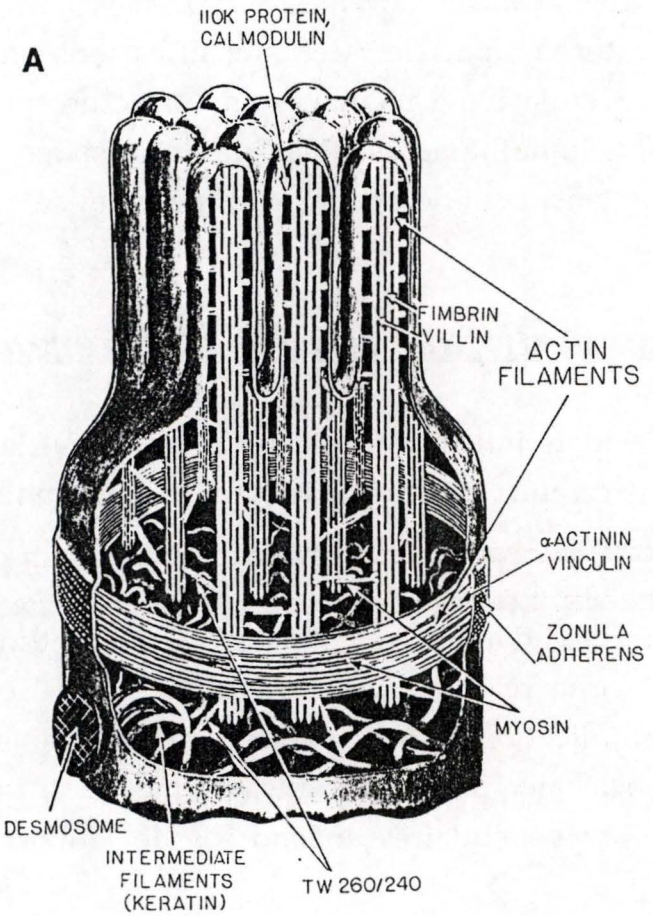


Fig. 34 : schéma représentant l'architecture du cytosquelette de la bordure en brosse des cellules épithéliales intestinales (Bershadsky &Vasiliev, 1988).

polymères de F-actine. Les complexes qui en résultent sont disloqués lorsque les concentrations calciques sont trop faibles. On comprend dès lors que le cadmium, en tant qu'agent compétiteur du calcium, puisse provoquer, ainsi que cela a été démontré dans le cas des cellules de Sertoli, un déséquilibre physiologique par ouverture des tights junctions (Madara et al, 1986).

7.4. Les microvillosités.

Projections cylindriques longues de quelques 100 à 200 Å, les microvillosités accroissent considérablement la surface cellulaire au pôle apical. Particulièrement abondantes dans les épithéliums à fonction absorptive, elles constituent la bordure en brosse des néphrons rénaux et le plateau strié des entérocytes. Chaque axe microvillositaire renferme une trentaine de filaments actiniques solidarisés par deux types de protéines de liaison, la fimbrine globulaire de 68 kD et la villine de 95 kD. Cette dernière fragmente les filaments actiniques lorsque la concentration en calcium s'élève au delà de 5.10^{-6} M. Une coiffe de matériel amorphe ancre, à l'apex villositaire, les extrémités positives du polymère d'actine. A la base, s'identifie,par contre, un réseau filamentaire d'actine et autres spectrine, caldesmone, tropomyosine et myosine II, dépourvu de villine, nommé "terminal web" (fig. 34). Des liaisons régulières médiées par une protéine associée à la calmoduline (myosine 1-like) unissent l'actine à la membrane plasmique (pour revue : Bray, 1992).

8. Cytosquelette et transports ioniques.

Dans les cellules à chlorure, objet de notre étude, la polarité s'avère être primordiale sur le plan fonctionnel. Les membranes basolatérales et apicales s'y distinguent structurellement et fonctionnellement. Le cytosquelette est, à ce titre, impliqué dans l'établissement et le maintien de cette différenciation. Ainsi, la pompe sodique-potassique a une localisation membranaire variable en fonction du type cellulaire.

La plupart des études concernant la polarité cellulaire traitent des épithéliums rénaux impliqués dans la réabsorption des ions et solutés. Plusieurs mécanismes combinés vont intervenir dans ce cas :

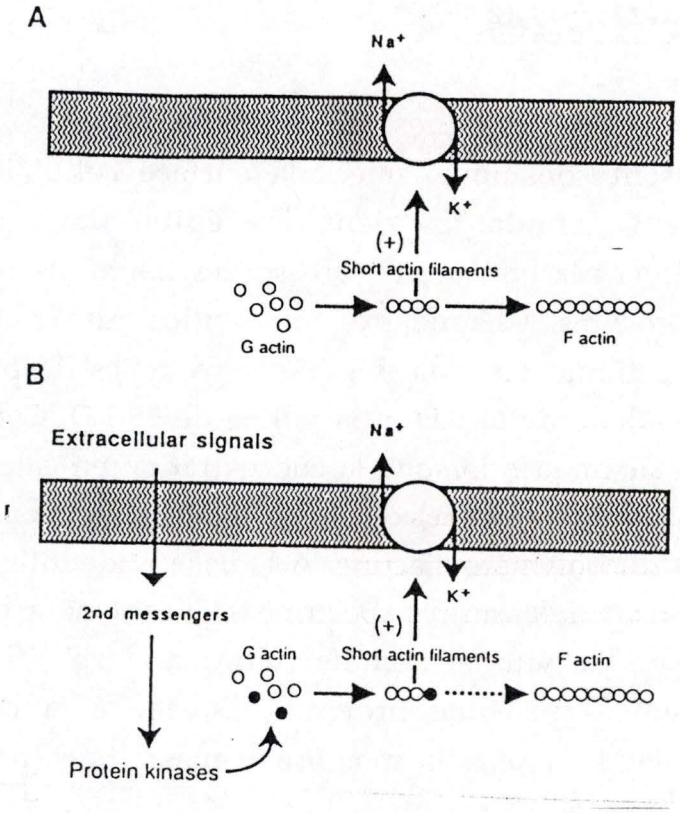


Fig. 35 : implication de l'actine dans la régulation, à court terme, de l'activité $Na^+/K^+/ATPasique$.

A. seule une courte séquence d'actine polymérisée exerce une action stimulante.

B. les signaux extracellulaires, en agissant sur des protéines kinases qui coiffent les monomères d'actine, modulent leur niveau de polymérisation (Bertorello & Katz, 1993).

- La présence de "tights junctions" contrecarre la diffusion latérale des protéines dans le plan membranaire.

- Dès leur sortie du Golgi, les protéines plasmiques sont aiguillées vers une destination précise. Les microtubules des cellules polarisées n'adoptent pas une localisation quelconque; ils s'étendent le long de l'axe principal jusqu'aux centres organisateurs apicaux. Les vésicules de transport transcellulaire seraient, d'ailleurs, dotées de récepteurs pour des protéines motrices afin de permettre le déplacement le long des rails microtubulaires (Hammerton et al., 1991).

- Des liaisons solidarisent les pompes membranaires et autres protéines intégrales au réseau cytosquelettique sous-jacent. Des études immunohistochimiques ont prouvé la colocalisation des *Na^+/K^+/ATPase* rénales, de la *fodrine et* de l'*ankyrine*. La cosédimentation sur gradient de sucrose des transporteurs Na^+/K^+/ATPasiques et de l'ankyrine purifiés, ainsi que leur migration simultanée sur gel d'acrylamide après extraction membranaire, démontrent une attache de forte affinité (Nelson et al., 1989).

- La *protéine 4.1*, exprimée dans plusieurs types de cellules épithéliales, rénales et autres, servirait, au même titre que l'ankyrine, d'intermédiaire entre le cytosquelette et la membrane. La liaison s'effectuerait par le truchement d'interactions électrostatiques impliquant quelques résidus d'acides aminés chargés et serait consolidée par des interactions hydrophobes (Drenckhahn et al., 1993).

D'autre part, l'activité de la pompe sodique rénale est tributaire de sa liaison au réseau d'actine (fig. . Les preuves en sont que la DNAse I, en bloquant la polymérisation actinique, inhibe la Na^+/K^+/ATPase, tandis que les cytochalasines l'activent en promouvant une faible polymérisation actinique. Seuls de courts fragments d'actine-F stimulent la pompe en accroissant son affinité pour le sodium, sans modifier, pour autant, les affinités pour les ions K^+, Mg^{++}) ou ATP. En réponse à divers messagers secondaires, des "actin-binding proteins" ou des protéines kinases (PKC ou PKA) interviennent comme promoteurs de la polymérisation actinique. Il est fort probable que l'actine lie la sous-unité "α" de la Na^+/K^+/ATPase car on y a identifié des régions similaires à des protéines liées à l'actine telles la myosine, la gelsoline et à la villine. Enfin, notons que la F-actine, constituée de quelques monomères, ne recquiert pas la présence des autres fodrine ou ankyrine pour agir; néanmoins, celles-ci modulent son activité (Bertorello & Katz, 1993).

Enfin, signalons que dans le cas des plexus choroïdes, la relation entre l'accumulation des pompes échangeuses des ions Na^+/K^+ et la présence de molécules d'adhésion est, par ailleurs, prouvée (Marrs et al., 1993). Les *cadhérines* de type E dépendantes du calcium et d'autres molécules d'adhésion, agissant via des interactions homotypiques, les CAMs, diminuent les chances de diffusion latérale et l'extraction des pompes, par action de détergents, en devient moins aisée. La mise en place du réseau microtubulaire et de l'appareil golgien est requise préalablement à la disposition sélective des protéines de membrane.

E. Le cadmium.

1. Généralités.

Métal lourd, chimiquement proche du zinc et du mercure, le cadmium se caractérise par une masse atomique de 112,4 et un rayon ionique de 97 pm proche de celui du calcium (99 pm).

Ses utilisations sont très diversifiées; on l'emploie, entre autres, dans la confection des batteries, radios, pacemakers, alarmes, ainsi que dans celle des pesticides et pigments,...

L'augmentation des extractions et du recyclage des métaux non ferreux, l'incinération des déchets, du bois et la combustion des essences fossiles ont contribué à accroître les émissions de cadmium dans l'atmosphère (pour revue: Laws, 1991).

2. Toxicité chez le poisson.

Comme le mercure, l'élément Cd n'est pas indispensable au maintien de la vie. C'est sous sa forme cationique Cd^{++} qu'il se révèle le plus toxique. Ingéré dans la nourriture ou dans l'eau ambiante du poisson, le cadmium est distribué, au départ des branchies ou de l'intestin, par le système circulatoire et se concentre préférentiellement dans le foie et les reins (Thomas et al.,1983). Sa demi-vie extrêment longue (16 à 33 ans) fait du cadmium un poison insidieux. Injecté à forte concentration, le cadmium se trouve captif des métallothionéines riches en groupes sulfydryls; à des valeurs de concentration proches de celles rencontrées dans la nature, le métal est associé à des protéines de poids moléculaire inférieur (Thomas et al., 1983).

L'exposition du poisson au cadmium s'accompagne de déséquilibres ioniques dont les plus remarquables sont l'hypermagnésie et surtout l'hypocalcémie. Les études s'orientèrent donc, tout naturellement, vers les perturbations des transports calciques.

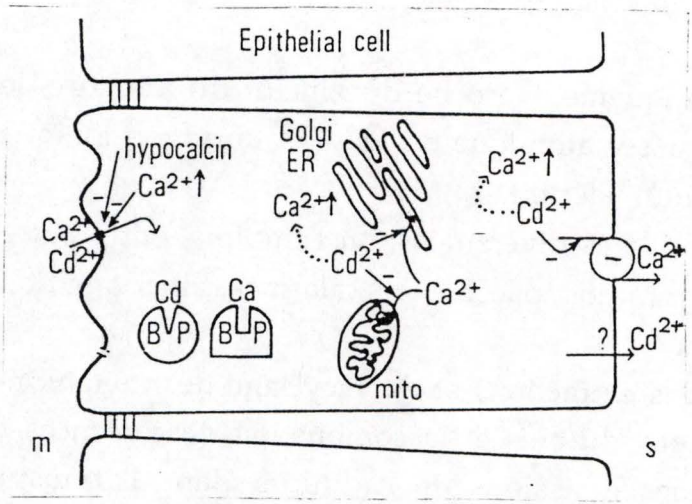


Fig. 36 : représentation des mécanismes par lesquels le cadmium interfère avec les échanges calciques (Verbost et al., 1989).

3. Interférences du cadmium avec le transport calcique.

L'entrée du calcium, essentielle à la croissance et à l'homéostasie calcique, se réalise principalement au niveau des branchies munies d'un épithélium ceinturé de jonctions serrées (Flick et al., 1985). Le transport du calcium est assuré par un processus transcellulaire. Le chemin emprunté par les ions Cd^{++} semble être celui naturellement suivi par les ions Ca^{++}. Les effets du cadmium peuvent donc se faire sentir en trois sites potentiels : les canaux calciques de la membrane apicale, les réserves de calcium cytosolique et les pompes calciques basolatérales assurant la translocation vers le sang (Flick et al., 1985). Des études réalisées chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*) démontrent que la diminution de la perméabilité apicale au calcium est indirectement liée à la présence du cadmium (Verbost et al., 1989b). L'augmentation du taux calcique cytosolique est, en réalité, consécutive à l'inhibition compétitive du cadmium sur les pompes Ca^{++}/ATPasiques de la membrane basolatérale (fig. 36). Verbost et son équipe (1988) ont pu prouver que la fixation du cadmium, lié dès son entrée aux protéines de liaison cytosoliques, s'effectue sur les pompes calciques de haute affinité, au site propre du transport de l'ion . Comme le calcium s'accumule, dans le cytosol, suite à l'inhibition de l'extrusion calcique basolatérale, un mécanisme de feed-back négatif ferme les canaux d'entrée apicale. Des résultats similaires ont été obtenus sur les Ca^{++}/ATPases entérocytaires et érythrocytaires (Verbost et al., 1987a; 1989).

Remarquons que des concentrations élevées en chlorure (Lin & Dunson, 1993) et en calcium exercent un effet protecteur vis à vis du cadmium. On l'explique par la formation de complexe Cd^{++}/Cl^{-} et la compétition Ca^{++}/Cd^{++} pour les protéines de transport apical impliquées dans les processus de diffusion facilitée (Pratap et al., 1989; Gill & Epple, 1992).

4. Autres effets du cadmium.

La pompe Na^{+}/K^{+}/ATPase s'avère moins sensible au cadmium que son homologue calcique. L'influx sodique ne semble pas affecté par l'exposition au

cadmium; du moins aux concentrations qui entravent l'activité de la Ca^{++}/ATPase. Le cadmium interférerait, à ce niveau, par compétition aux sites de liaison des ions magnésium à la Na^{+}/K^{+}/ATPase (Kinne-Saffran et al., 1993).

La cytotoxicité du cadmium résulterait d'interactions diverses avec les voies d'activation cellulaires impliquant les cations essentiels tels le calcium (déjà cité), le zinc et le cuivre (Veldhuizen-Tsoerkan et al., 1992). Il a été démontré, chez l'anguille américaine (*Anguilla rostrata*), que le cadmium interférait effectivement avec les ions Zn^{++} et Cu^{++} des métalloenzymes. En connaissant, par ailleurs, l'implication de l'ion zinc dans le fonctionnement des ARN/ADN polymérases ainsi que dans les motifs en doigts de zinc des protéines trans régulatrices de l'ADN (Evans & Hollenberg, 1988), on peut présumer que ces facteurs puissent être des cibles de premier plan pour le cadmium. Des études réalisées chez la moule *Mytilus edulis* ont, pour preuve, démontré l'implication du cadmium et d'autres métaux lourds (Hg,Pb) dans la cascade transcriptionnelle. Il en ressort que le cadmium induit la synthèse des protéines dépendantes du complexe Ca^{++}/Calmoduline telles les "heat shock proteins"(hsp) et les protéines métallothionéines-like (Veldhuizen-Tsoerkan et al., 1991). Il induit également la transcription du protooncogène c-fos impliqué dans la croissance et la différenciation cellulaire, mais inhibe, par contre, la synthèse du facteur 2 d'initiation. L'utilisation du phosphore radioactif ^{32}P démontre une action phosphorylante inscrite dans le cadre d'une réponse générale au stress (Veldhuizen-Tsoerkan et al., 1992).

5. Impact du cadmium sur l'architecture épithéliale.

Chez le Tilapia (*Oreochromis mossambicus*), les effets du cadmium consistent, pour l'essentiel, en un remodelage épithélial par augmentation des espaces intercellulaires, prolifération et apoptose des cellules à chlorure associée à une infiltration de leucocytes et globules rouges dans l'épithélium.

A côté des cellules pavimenteuses dont le relief apical de surface s'estompe et dont les complexes jonctionnels s'ouvrent, les cellules à chlorure semblent les plus altérées. Assez paradoxalement, leur nombre croît tandis que leur capacité à échanger les ions décline. En réalité, l'augmentation de l'effectif

est principalement liée à celle des cellules immatures, non ou peu fonctionnelles, alors que les cellules matures dégénèrent par apoptose et, dans une moindre mesure, par nécrose.

Dernièrement, des observations faites sur les cellules de Sertoli des testicules de rat ont établi l'impact spécifique du cadmium sur les filaments d'actine associés aux "tight junctions". Cet effet n'a toutefois pas été observé sur les cellules péritubulaires des testicules où les microfilaments sont associés à la myosine (Hew et al., 1993). Ceci concorde avec l'observation de l'ouverture des jonctions serrées unissant cellules à chlorure et cellules pavimenteuses des épithéliums branchiaux exposés au cadmium (Pratap & Wendelaar Bonga, 1993). Des altérations similaires sont enregistrées avec d'autres métaux lourds (cuivre, mercure, chrome, cuivre,...) ainsi qu'avec l'aluminium en milieu acide (Verbost et al., 1992).

Pour terminer, signalons que chez le tilapia, au terme de 35 jours d'empoisonnement par du cadmium ambiant, une restauration de l'architecture épithéliale initiale se manifeste lorsque les concentrations calciques sont élevées (de l'ordre de 0.8 mM) (Pratap & Wendelar Bonga, 1993).

F. But du travail

Inscrit dans le vaste projet de réintroduction, à plus ou moins longue échéance, du saumon atlantique disparu depuis plus de cinquante ans de nos rivières, notre travail s'est intéressé aux effets produits par un polluant présent dans nos cours d'eau, le cadmium.

Jusqu'à présent, les nombreuses études concernant l'impact de ce métal lourd sur le métabolisme cellulaire se sont, essentiellemnt, focalisées sur les perturbations engendrées au niveau des échanges ioniques. En effet, on sait, aujourd'hui, avec certitude, que le cadmium, internalisé par par voie orale ou branchiale, transite par les épithéliums d'échange où il provoque d'importants dérèglements des balances ioniques et, particulièrement, de la balance calcique (Verbost et al., 1989). Or, connaissant l'importance que revêt le calcium dans la régulation de la structure des composants cytosquelettiques, on peut présumer de l'impact qu'exercerait le cadmium sur ces structures.

En outre, des études récentes de plus en plus nombreuses tendent à démontrer que l'intégrité du réseau cytosquelettique est un facteur primordial dans les processus de transport ionique, notamment dans les phénomènes de régulation du volume cellulaire (pour revue récente, Al Habori, 1994) et le maintien des concentrations ioniques plasmatiques (Bertorello & Katz, 1993).

L'approche morphologique et immunohistochimique que nous désirons mener, première du genre réalisée à notre connaissance sur les branchies de poissons Salmonidés, poursuit l'objectif de suivre d'éventuelles modifications des structures cytosquelettiques, consécutives à une exposition au cadmium ambiant. Cette démarche est appliquée sur des cellules épithéliales hautement spécialisées dans les échanges ioniques, les cellules à chlorure de la branchie du saumon.

Matériel & Méthodes

1. Matériel biologique.

1.1. Maintenance des poissons.

Délivrés en octobre par le service de la pêche de la région Wallonne, les saumons atlantiques, âgés de quelques mois, sont répartis par trentaine dans des bassins de polyuréthane d'une capacité de 120 litres. Ces bassins, maintenus en chambre froide à 10°C et reliés en continu à l'eau de la ville de Namur, sont équipés d'aérateurs ainsi que de pompes de filtration d'eau. La température et l'oxygénation des bassins sont mesurés par un oxymètre muni d'une fonction température (WTW, modèle OXI 96). Les analyses physico-chimiques de 4 échantillons d'eau, prélevés aléatoirement, révèlent une concentration moyenne de 1,98 mM en ions Ca^{++}. Les poissons, exposés à un éclairage simulant la succesion naturelle du jour et de la nuit, sont nourris quotidiennement à 4%, en moyenne, de leur poids corporel avec du TROUVIT 1 (protéines brutes 48%, hydrates de carbone 21.5%, cendres 10%, humidité 10%, matières grasses 7.5% et cellulose 3%) enrichi à l'huile de foie de morue (80g/Kg de TROUVIT 1) (pour la maintenance des poissons, cfr Devos E., 1991).

1.2. Traitement au cadmium.

Par groupes de 6, les saumons non smolts sont transférés dans des bacs en plastique d'une capacité de 50 litres, équipés d'un aérateur. Après une journée d'acclimatation, les poissons sont traités au cadmium 10 µg/litre d'eau (27.4 µg de $Cd(NO_3)_2\text{-}4H_2O$/l). Les analyses, réalisées par le laboratoire de Chimie Analytique, sur des prélèvements journaliers de l'eau révèlent une diminution de la concentration en cadmium, vraissemblablement, comme cela fut précédemment démontré, suite à son accumulation dans les tissus (Thomas et al., 1983). Des 10 µg/l de cadmium détectés au premier jour d'expérience, il ne subsiste plus que 6 µg/l au troisième jour. Par référence aux travaux de Pratap (Pratap et al., 1989), et afin de minimiser les effets parasites engendrés par le stress, l'eau des bassins est donc renouvelée tous les trois jours.

1.3. Prélèvement des branchies.

A jeun depuis la veille, les poissons sont sacrifiés au deuxième, septième ou quatorzième jour d'expérience. Après section de la moëlle épinière et découpe des opercules, la tête est séparée du reste du corps. Les arcs branchiaux, dont l'accès est facilité par section de la mâchoire inférieure, sont isolés et plongés immédiatement dans une solution physiologique de poisson isosmotique. L'individualisation des filaments branchiaux est réalisée par section de leur cartilage de soutien.

2. Composition des solutions salines.

1. Solution physiologique de poisson.

Saccharose 250 mM, héparine (Léo, Belgique) 20 U/ml, NaCl (12.5 mM), PMSF (Sigma, USA, présolubilisé à 50 mM dans le méthanol) 0.2 mM et Hepes 5 mM, porté à pH 7.4.

2. PBS (Phosphate Buffered Saline)

NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.5 mM et Na_2HPO_4 16.3 mM, porté à pH 7.4.

3. Tampon cacodylate (Caco)

Cacodylate de sodium 0.05 M et $CaCl_2$ 3 mM.

4. Tampon "PIPES"

Pipes 65mM, Hepes 25mM, EGTA 10mM et $MgCl_2$ 2mM, porté à pH 6.9.

5. Tris Buffered Saline (TBS)

Tris 20 mM, NaCl 20 mM et NaN_3 20 mM, porté à pH 8.2.

L'osmolalité des solutions est contrôlée au moyen d'un osmomètre à abaissement cryoscopique (Fiske ONE-TEN Osmometer).

Abréviations :

PMSF : Phényl-méthyl- sulfonyl- fluoride.
PIPES : Acide pipérazine-N,N'-bis (2-éthane)-sulfonique.
HEPES : Acide N-(2-hydroxyéthyl)-pipérazine-N'-(2-éthanesulfonique).
EGTA : Acide éthylène-glycol-bis-(ß-aminoethyl) N ,N ,N',N'-tétra-acétique.
Tris : Tris (hydroxyméthyl) aminométhane.

3. Etude du cytosquelette en microscopie optique

3.1. Coupes à congélation.

Après dissection, les arcs branchiaux, isolés du plus gros de leur cartilage et sectionnés en fragments de 3 à 4 mm de longueur, sont disposés et orientés dans des nacelles de papier aluminium remplies d'un milieu d'enrobage cryoprotecteur, le Tissu-Tek (OCT Compound-Miles Laboratoires, USA). Les nacelles sont, de suite, immergées aux 3/4, en présence de carboglace, dans du méthanol refroidi à -80°C.

Après démoulage et dégrossisage, des coupes de 5 µm, réalisées au cryostat (Microm HM 500-OM), sont recueillies, par adhésion, sur des lames de verre adaptées (Menzel-Glaser, Allemagne). Les coupes, séchées à l'air quelques instants, sont alors stockées au congélateur à -80°C jusqu'au moment de leur utilisation.

3.2. Coloration topographique.

Une coloration Hémalun-Erythrosine (HE) permet de visualiser l'architecture du tissu branchial détaillée sur les coupes à congélation.

3.3. Colorations immunohisto-cytochimiques.

3.3.1. Marquage de l'actine polymérisée par la FITC-Phalloïdine.

Au sortir du congélateur, les coupes sont réhydratées, quelques minutes, dans le tampon PBS. Une fixation de 45 minutes est ensuite réalisée dans la formaldéhyde 3.5% (Fluka) diluée dans le PBS.

Après 3 lavages rapides de 2-3 minutes dans le tampon PBS, les coupes sont incubées à 37°C, pendant 30 minutes, dans une solution de PBS, additionné d'albumine de sérum bovine (Bovin Serum Albumin, BSA fraction V) 0,1% (Sigma) et de Triton X-100 1% (Merck). Après 3 nouveaux

lavages de 2-3 minutes, une goutte (20-30 µl) de FITC-phalloïdine à une dilution 1:30 dans le PBS/BSA 0,1% est déposée sur le tissu, à l'exception des coupes témoins.

Au terme d'une l'incubation de 45 minutes, réalisée à température ambiante et à l'abri de la lumière, les coupes sont lavées 3x5 minutes dans le PBS puis montées dans une solution de glycérol 90% tamponnée à pH 8,5 par du Tris 1M et contenant de la 1,4 diazabicyclo (2,2,2) octane (DABCO) pour contrer l'affaiblissement de la fluorescence. Après scellage des couvre-objets par du vernis, les lames peuvent être entreposées à -20°C dans le noir et ainsi, conservées plusieurs mois. Le matériel est observé sur un photomicroscope pour la diascopie et l'épifluorescence (Zeiss, Akioskop 20) et photographié sur film dias (Kodak, Elite 200).

3.3.2. Marquages indirects de l'actine et de la tubuline.

Des différentes méthodes testées lors de nos mises au point, nous avons opté pour celle qui s'inspire des travaux de Langanger et al. (1984). Les différentes mises au point ont tout d'abord été testées sur des fibroblastes de poumons humains (souche WI 38) en culture grâcieusement offerts par la laboratoire de Biochimie Cellulaire. Suite à différents essais, il s'est avéré que la meilleure façon de préserver les structures cytosquelettiques dans des conditions les plus proches possibles des conditions physiologiques, et ce, tout en préservant l'antigénicité des protéines à observer, était d'effectuer une préfixation en même temps qu'une première et légère perméabilisation. La méthode utilisée est la suivante :

Après réhydratation rapide des lames dans la solution PIPES, les coupes sont plongées 15 minutes dans ce tampon additionné de Triton X-100 0.2 % et de formaldéhyde 0.2 %.

Le matériel est ensuite lavé 2x10 minutes, sous agitation, dans le tampon "PIPES", puis perméabilisé dans le même tampon contenant 0.5% de Triton X-100 durant 15 minutes. Le Triton est alors éliminé par 3 lavages de 5 minutes, sous agitation.

Une fixation de 5 minutes est effectuée dans une solution de tampon "PIPES" contenant 2% de formaldéhyde. Les échantillons sont ensuite rincés 2x10 minutes sous agitation dans du tampon "PIPES", en présence de l'agent

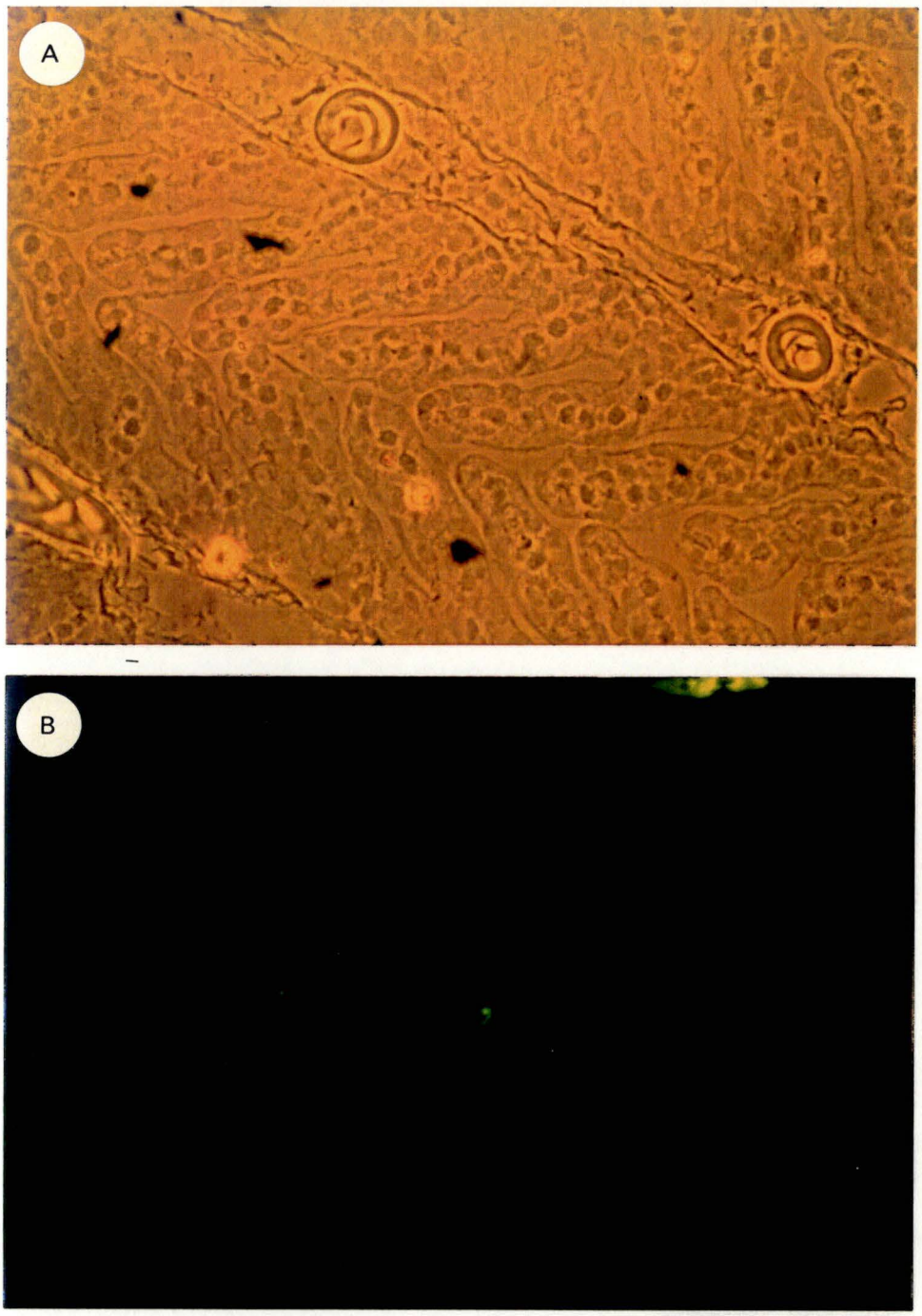


Fig. 37 : témoin négatif des marquages indirects de l'actine et de la tubuline où, seul, l'anticorps secondaire est mis en présence du tissu. Le contracte de phase (**A**) atteste bien de la présence du tissu en fluorescence (**B**). Mentionnons ici que l'omission de la molécule de phalloïdine fluorescente, lors du marquage direct de l'actine, donne une image tout à fait sombre (non figuré ici).

de "quenching", le chlorure d'ammonium (NH_4Cl) 50mM puis 1x 5 minutes au tampon "PIPES" seul.

La saturation des sites non spécifiques commence par 2 lavages de 5 minutes au tampon TBS-BSA 0.1% à 37°C et se poursuit par une incubation de 30 minutes dans une solution de sérum de chèvre purifié (Normal Goat Sérum-Sigma) à une concentration de 5% dans le TBS-BSA 0.1%.

Le matériel est ensuite recouvert de l'anticorps primaire anti-actine (Bio Makor n° 1082, Israël) ou anti-tubuline (Bio Makor n° 1081) à une dilution 1:20 dans le TBS-BSA 0.1% additionné de sérum de chèvre 1%, durant toute la nuit (excepté pour les témoins négatifs, pour lesquels le premier anticorps est omis, fig. 37). L'anti-actine, produite contre l'actine musculaire purifiée du poulet, et l'anti-tubuline, produite contre la tubuline purifiée extraite du cerveau embryonnaire de poulet, sont deux polyclonaux développés chez le lapin. Après quatre rinçages de 10 minutes au TBS-BSA, on dépose l'anticorps secondaire (Bio Sys BI 2107, France), un anti-lapin développé chez la chèvre et conjugué à la FITC, dilué dans le TBS-BSA à une dilution 1:400, pendant une heure dans l'obscurité. Pour terminer, avant leur montage, les lames sont encore lavées 2x10 minutes, sous agitation, dans le TBS et 2x10 minutes dans le PBS.

4. Etude du cytosquelette en microscopie électronique à transmission (TEM).

Désirant compléter notre étude du cytosquelette par la réalisation de marquages, et sachant par ailleurs qu'une extraction cytosolique améliore l'observation de ses composants, les micrographies électroniques sont réalisées sur des cellules perméabilisées.

4.5.1. Marquage indirect de l'actine par la méthode de l'immunogold.

Les marquages à l'or colloïdal sont réalisés selon une méthode dérivée de De Mey et collaborateurs (1981). Après isolement, les arcs branchiaux sont immergés dans la solution physiologique de poisson, débarrassés de la majeure partie du cartilage primaire, puis sectionnés en fragments de 2 mm de long.

Ceux-ci sont immédiatement plongés 15 minutes dans du tampon PIPES additionné de Triton X-100 0.2% et de glutaraldéhyde (Fluka) 0.5%. Le matériel est ensuite lavé 2x10 minutes, sous agitation, dans le tampon "PIPES", puis perméabilisé dans ce même tampon contenant 1% de Triton X-100 durant 15 minutes. Deux lavages de 10 minutes dans le "PIPES" additionné de $NaBH_4$ 1mg/ml (Merck) arrêtent la fixation par réduction de la glutaraldéhyde encore présente. Les étapes qui suivent, assurant la saturation des sites antigéniques aspécifiques, sont similaires à celles décrites pour les marquages indirects en optique. L'anticorps primaire anti-actine est également utilisé à une dilution 1/20 pendant une nuit. Après plusieurs rinçages, l'anticorps secondaire, un goat anti rabbit couplé à des particules d'or colloïdales de 10 nm (GAR 10 nm, Sigma n° G-7402) utilisé à une dilution 1:10, est déposé sur les échantillons jusqu'au lendemain.

Les tissus, lavés 4x10 minutes dans le TBS et 2x5 minutes dans la solution cacodylate 0.05M, sont alors postfixés par la glutaraldéhyde 2.5% dans la solution cacodylate pendant 30 minutes. Après trois lavages de 10 minutes dans le cacodylate, les filaments sont isolés avant de séjourner une heure dans le tétroxyde d'osmium (acide osmique, SPI-CHEM) dilué à 1% (préparé à 2% dans l'eau bidistillée et dilué à volume égal dans du cacodylate 1M).

Après trois rinçages de 10 minutes dans la solution cacodylate, les filaments sont stockés à 4°C avant d'être déshydratés par passages successifs dans des bains d'alcool de concentration croissante (1x5 minutes et 1x10 minutes dans chaque bain d'éthanol à 50, 70, 90 et 98%), puis 3x10 minutes dans l'éthanol absolu. L'inclusion qui suit se réalise progressivement par passage dans d'oxyde de propylène pur (4x5 minutes), dans le mélange oxyde de propylène-Epon 1:1 (2x15 minutes au rotor) pour aboutir dans l'Epon 812 pur (2 heures à 37°C au rotor). Une dernière étape d'orientation des échantillons sous stéréoscope précède la polymérisation de la résine à 37°C pendant la nuit, puis à 45°C pendant 24 heures et à 60°C pendant 72 heures. Les coupes ultra-fines de 500Å, réalisées après repérage sur coupes semi-fines, sont contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb et observées sur un microscope à transmission du modèle Philips 301.

5. Microscopie électronique à balayage (Scanning Electron Microscope, SEM).

5.1. Traitement des échantillons.

Dès leur prélèvement, les arcs branchiaux sont immergés dans la solution physiologique de poisson, sectionnés en fragments de 2-3 mm de long, puis fixés durant une heure et demi dans de la glutaraldéhyde (Fluka) 2% en solution cacodylate de sodium 0.05M. Après 4 rinçages de 10 minutes dans la solution cacodylate, les échantillons sont soumis à 5 bains successifs de 10 minutes, dans de l'acétone de concentration croissante (40%, 60%, 80%, 90% et 100%). Leur déshydratation est achevée par la méthode du "point critique" qui substitue à l'acétone du CO_2 liquide, ultérieurement éliminé par vaporisation (Critical point dryer, Balzers CPD 030). L'échantillon, dont l'aspect est alors sec et friable, est fixé, précautionneusement, sur un support métallique au moyen d'une colle à l'argent conductrice de courant. Pour que l'observation soit correcte, il faut veiller à orienter l'ouverture du V branchial parallèlement au support. Le tissu est alors recouvert d'une couche d'or par évaporation métallique, suivant la méthode du "sputtering" (50 nm d'or, 25 mA, distance 50 mm) (Balzers 07120). Les observations sont réalisées sur un microscope électronique à balayage de modèle Philips XL 20, sous une tension accélératrice de 10 kV.

5.2. Analyses des images.

Pris de façon aléatoire, différents champs, non contigus, de filaments primaires sont photographiés à un grossissement de 4324 fois (8000 fois à l'affichage écran) afin de mesurer les surfaces et les densités de cellules à chlorure présentes. Après transfert sur un ordinateur Macintosh Centris 610, les images sont traitées par un programme d'analyse d'image (NIH Image 1.55b57).

La surface (μm^2) de chaque cellule à chlorure est mesurée par le soulignage à l'écran de son périmètre. La surface ainsi déterminée est calculée par une fonction du programme NIH Image 1.55b57. Le nombre de cellules à chlorure par mm^2 de filament branchial est également calculé de cette manière.

5.3. Analyse statistique.

A partir d'un échantilon de six images des filaments primaires provenant de deux saumons exposés au cadmium pendant 14 jours et d'un échantillon de 9 images provenant de 2 saumons sains, un test t de Student a été réalisé pour comparer les deux valeurs moyennes des surfaces apicales calculées. Ce même test est effectué sur les valeurs moyennes obtenues par comptage du nombre de cellules à chlorure par mm^2 de filament branchial primaire.

Il y a acceptation de l'hypothèse nulle lorsque la probabilité de se tromper est supérieure à 0,05. A l'inverse, il y a rejet de l'hypothèse nulle lorsque la probabilité de se tromper est inférieure à 0,05. Par convention, lorsque la probabilité du t observé est inférieure à 0,05 et supérieure à 0,01, on considère que le test est significatif. Lorsque la probabilité du t observé est inférieure à 0,01, on considère que le test est hautement significatif.

Résultats

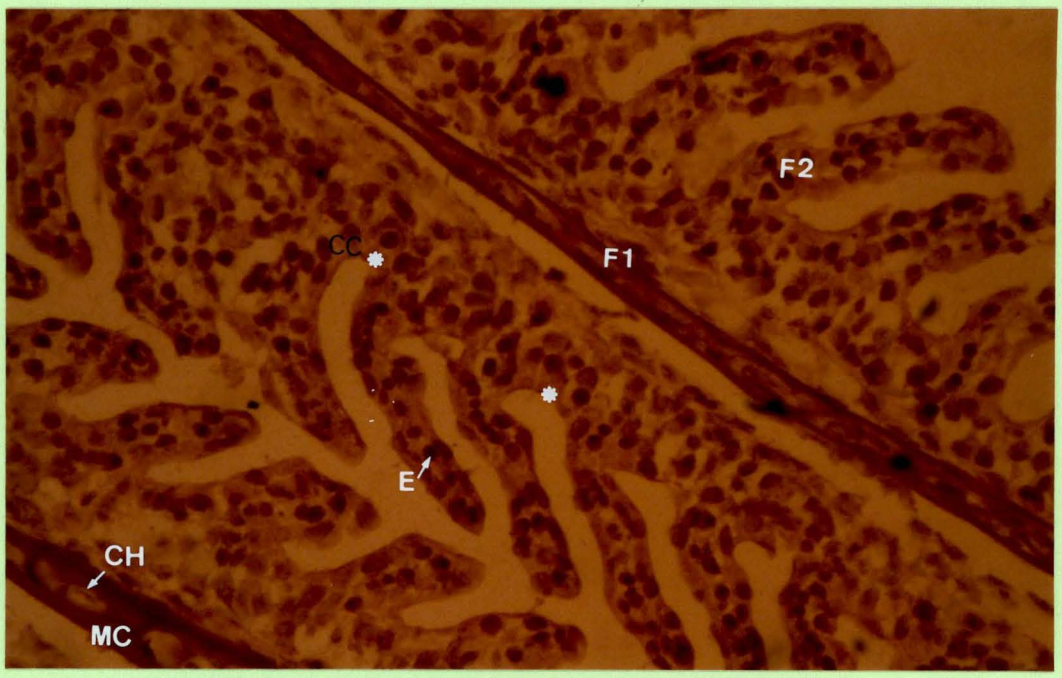


Planche 1 : coloration Hémalun-Erythrosine (H-E), réalisée sur coupe à congélation de filaments branchiaux de saumon. Gross. : 100x
CH : chondrocyte; **E** : érythrocyte; **F1** : filament primaire; **F2** : filament secondaire; **MC** : matrice cartilagineuse

1. MICROSCOPIE OPTIQUE.

1.1. Morphologie des filaments branchiaux en microscopie optique.

Les coupes à congélation réalisées pour les marquages immunocytochimiques et colorées par l'HE (planche 1) révèlent une architecture semblable, quoique l'identification précises des différents types cellulaires y soit difficile, à celle décrite dans notre l'introduction (point C.2.). Connaissant la localisation préférentielle des cellules à chlorure dans les creux interlamellaires, nous focaliserons notre observation sur ces zones.

1.2. Etude du cytosquelette des cellules à chlorure.

L'immunofluorescence, choisie pour sa rapidité d'emploi et sa bonne sensibilité, nous permet de déceler, en première approche, les éventuelles modifications de la répartition des constituants cytosquelettiques.

1.2.1. Immunofluorescence indirecte appliquée à la visualisation de l'actine.

L'actine étant une protéine hautement conservée au cours de l'évolution (cfr intro. D 3.1.) , les anticorps anti-actine polyclonaux présentés sur le marché n'ont, en général, que peu de spécificité d'espèce. Ceci autorise, dès lors, leur utilisation pour le matériel un peu particulier que constituent les branchies de poisson.

L'observation de la distribution actinique sur les branchies de saumons non traités, que révèle la FITC (fluorescein-iso-thio-cyanate) fluorescente conjuguée à l'anticorps secondaire, permet de constater qu'une bande corticale sous-membranaire souligne intensément et de façon quasi continue, les contours des épithéliums primaire et secondaire (planche 2).

Les cytoplasmes cellulaires, y compris ceux des chondrocytes (non visibles sur la planche 2) et des érythrocytes circulants, sont marqués plus discrètement. La matrice cartilagineuse (planche 3 B) apparaît, en toute logique, très sombre, donc non marquée.

En revanche, outre le liseré cortical observé chez les poissons témoins, des différences majeures sont perceptibles sur les échantillons traités au cadmium. Dès le deuxième jour d'exposition à 10µg Cd^{++}/l, des zones de marquage apical très intenses apparaissent exclusivement dans des cellules de l'épithélium primaire. Ces marquages se situent dans la région des creux interlamellaires (avec une localisation préférentielle sur les côtés), soit dans les zones abritant les cellules à chlorure.

Des marquages similaires apparaissent quelle que soit la durée d'exposition au cadmium (du moins entre 2 et 14 jours) (planche 3), et quelle que soit la dose testée (10, 30 et 50 µg/l) (planche 4).

1.2.2. Immunofluorescence directe appliquée à la visualisation des microfilaments.

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction (point D.4.3), la phalloïdine possède la propriété de former des complexes stables avec l'actine polymérisée. Son spectre d'action très large (jusqu'aux invertébrés) et sa grande spécificité font de la phalloïdine, couplée de façon covalente avec la FITC, un outil fort précieux pour l'étude de l'actine polymérisée (Wulf et al., 1979).

Nous comptions sur les marquages directs des microfilaments par la phalloïdine pour apporter la confirmation des résultats obtenus par marquage indirect de l'actine. Malheureusement, bien que le marquage soit indéniable, le signal de fluorescence que nous avons obtenu est trop faible pour pouvoir considérer que ces résultats sont significatifs sur les photographies (planche 5). Cependant, lors des observations en microscopie, avant la décroissance exponentielle de la fluorescence, des "spots" lumineux plus intenses ont pu être clairement aperçus dans les creux interlamellaires des poissons traités au cadmium. Des résidus très faibles de ce marquage sont encore décelables. En effet, un signal lumineux apical plus intense sur les filaments de poissons traités (illustré, ici, chez un poisson traité 2 jours au cadmium 10 µg/l, figure B de la planche 5) confirme nos précédents résultats.

1.2.3. Immunofluorescence indirecte appliquée à la visualisation des microtubules.

Le marquage de la tubuline apparaît, dans l'ensemble, fort semblable à celui décrit pour l'actine, étant donné qu'il est difficile sur des cellules aussi petites que les cellules branchiales de faire la distinction entre ces deux réseaux cytosquelettiques. On retrouve ainsi un liseré apical continu le long des épithéliums primaire et secondaire, ainsi qu'un marquage diffus des cytoplasmes tandis qu'une absence de fluorescence se manifeste dans la matrice cartilagineuse et les espaces nucléaires (planche 6).

La présence quasi exclusive de "spots" plus lumineux chez les poissons intoxiqués par rapport aux témoins, atteste de l'effet exercé à ce niveau par le cadmium.

Toutefois, une différence par raport au marquage de l'actine est décelée chez les poissons exposés au cadmium (10 µg/l). Les "spots" des creux interlamellaires sont, en effet, nettement moins intenses dans le cas présent (planche 7).

Des durées d'exposition variables (2, 7 et 14 jours) ainsi que des doses plus importantes de cadmium (30 et 50 µg) ne nous apportent aucune information complémentaire (planches 7 & 8).

A la vue de ces résultats obtenus en microscopie optique, tout laisse à penser que le cadmium est responsable d'une réorganisation cytosquelettique qui toucherait probablement davantage le réseau actinique que les structures microtubulaires.

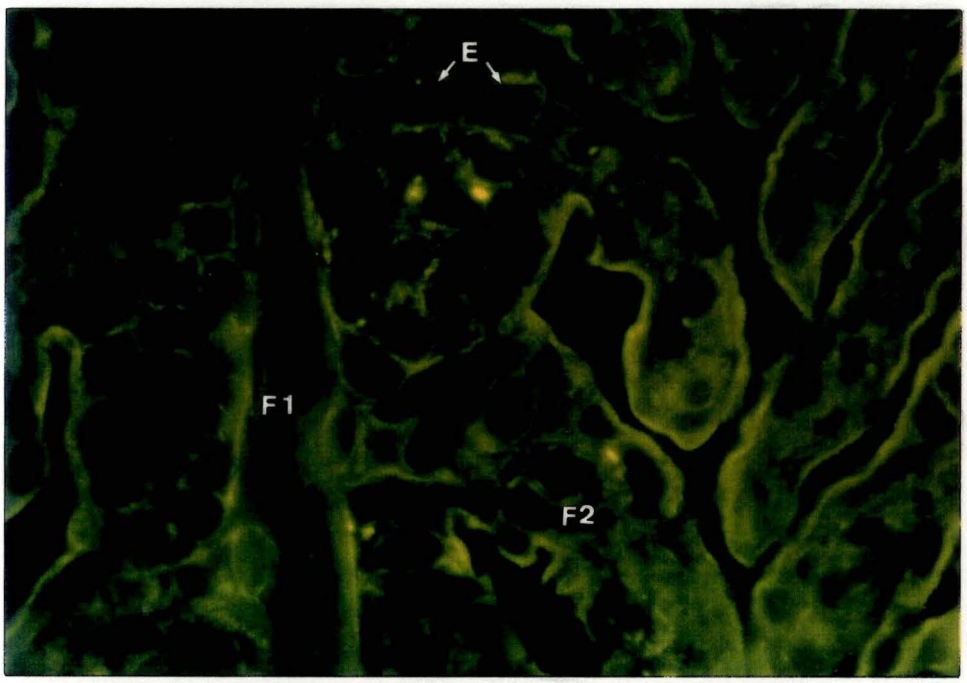
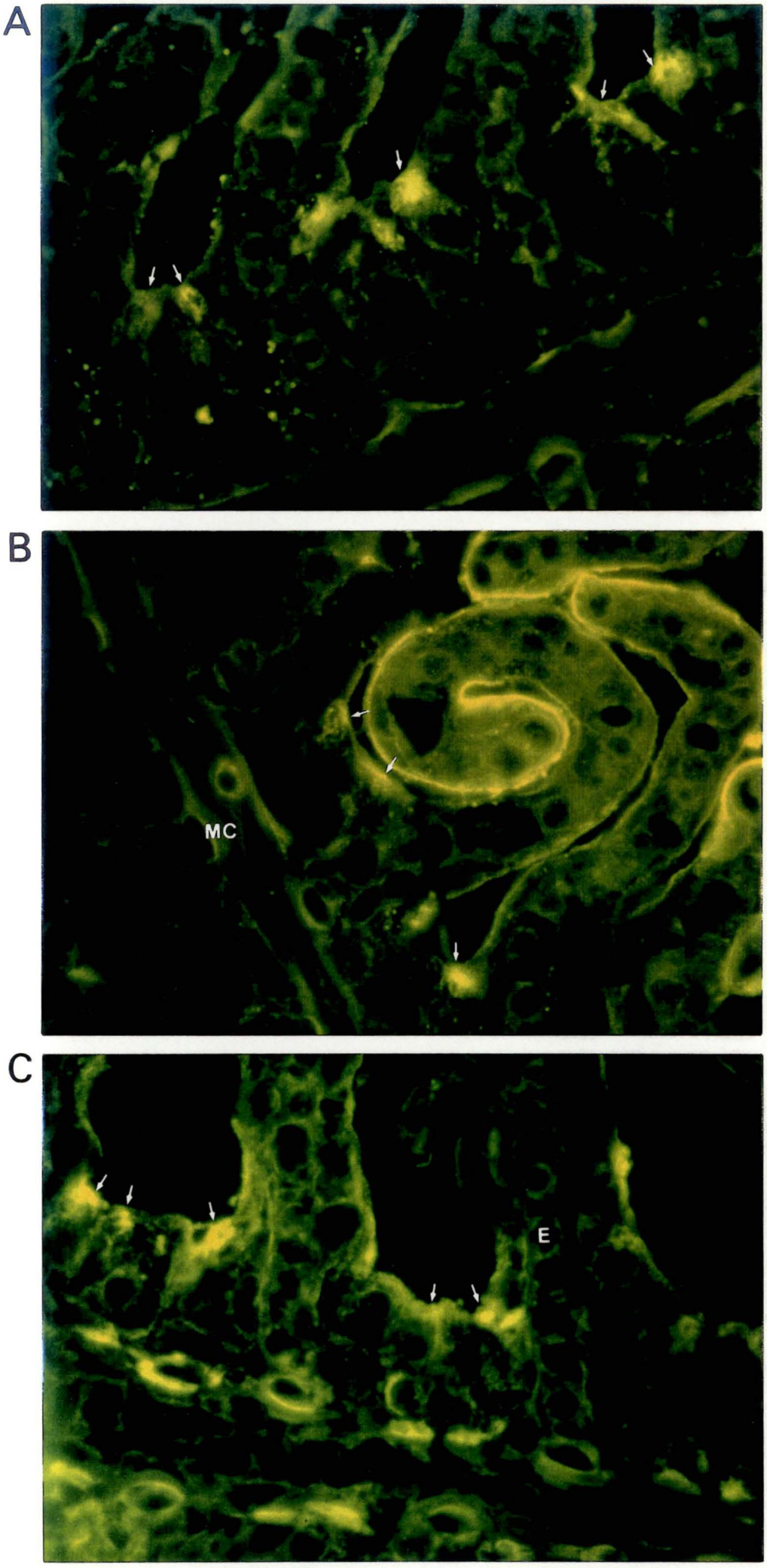


Planche 2 : marquage immunofluorescent indirect de l'actine, réalisé sur coupe à congélation de filaments branchiaux de saumon non exposé au cadmium.
Gross.: 250x
E : érythrocyte

Planche **3** : marquages immunofluorescents indirects de l'actine, réalisés sur coupes à congélation de filaments branchiaux de saumons exposés à des concentrations ambiantes en cadmium de 10 µg/l pendant 2 jours (**A**), 7 jours (**B**) et 14 jours (**C**). Gross. : 250x


A
B
MC
C
E

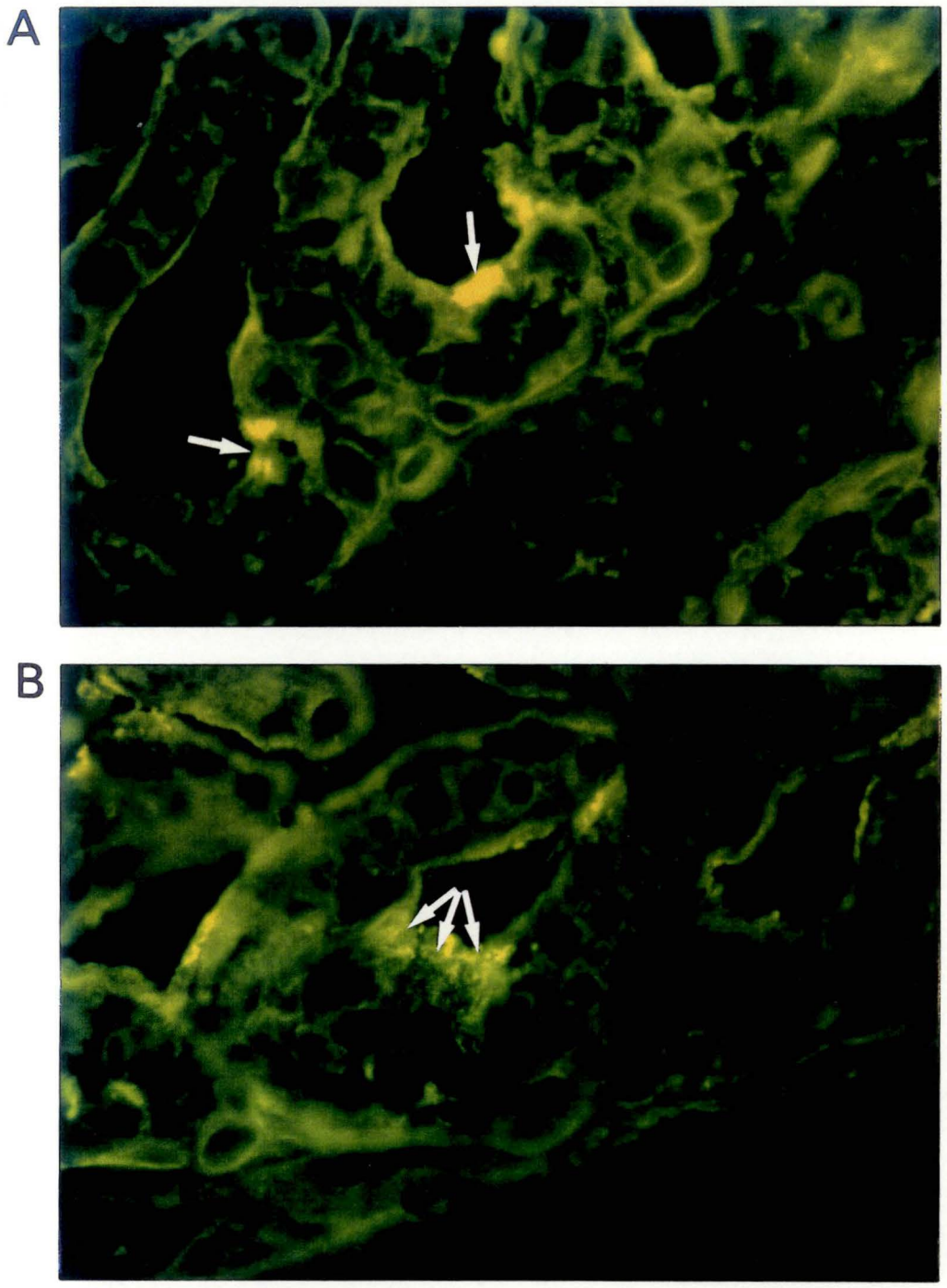


Planche 4 : marquages immunofluorescents indirects de l'actine, réalisés sur coupes à congélation de filaments branchiaux de saumons exposés pendant 2 jours à des concentrations ambiantes en cadmium de 30 µg/l (**A**) et 50 µg/l (**B**). Gross. : 250x

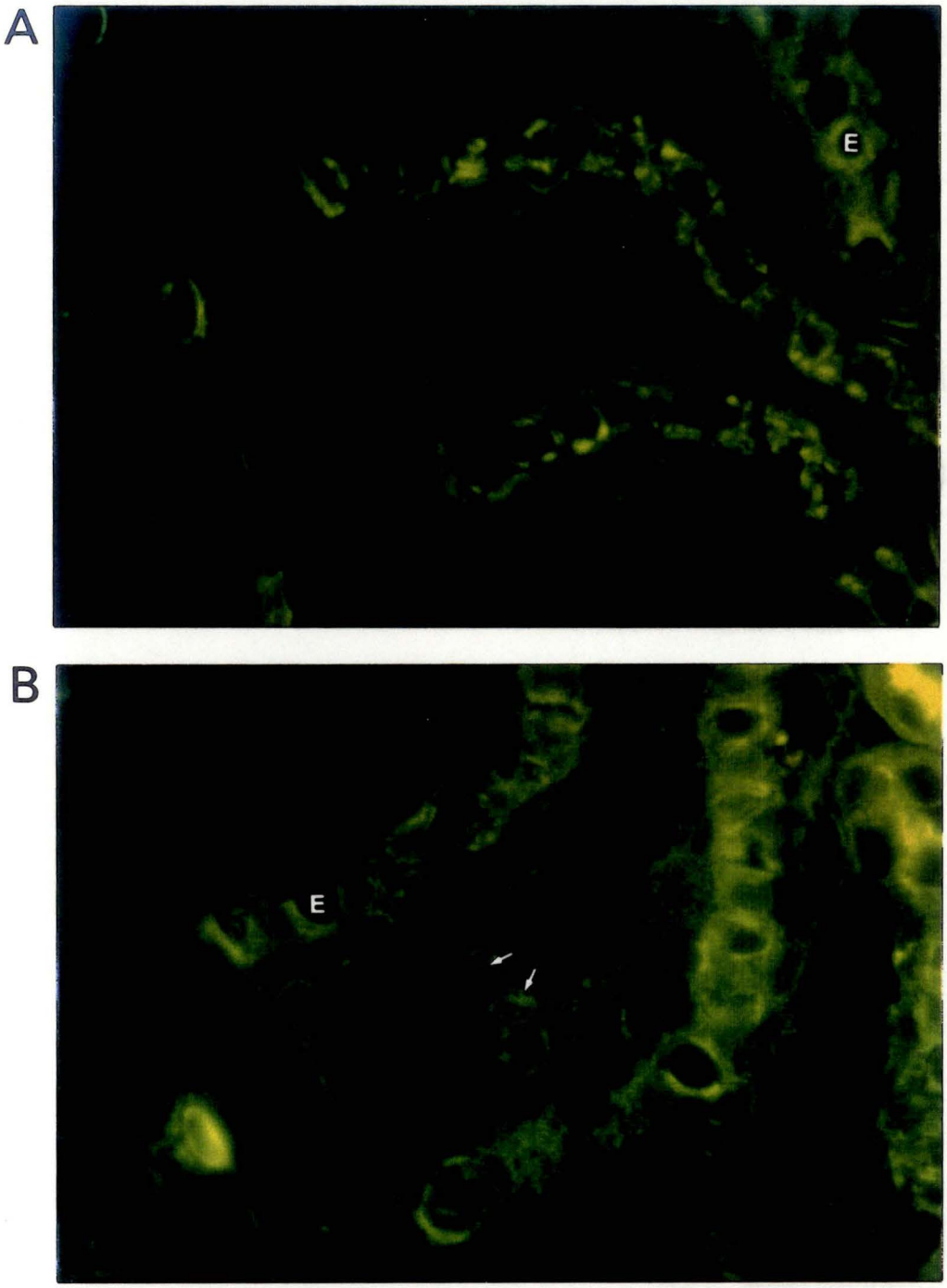


Planche 5 : marquages de l'actine, par la phallloïdine fluorescente, réalisés sur coupes à congélation de filaments branchiaux de saumons non exposés au cadmium (**A**) ou soumis à une concentration externe de 10 µg/l de cadmium pendant 2 jours (**B**). Gross. : 250x

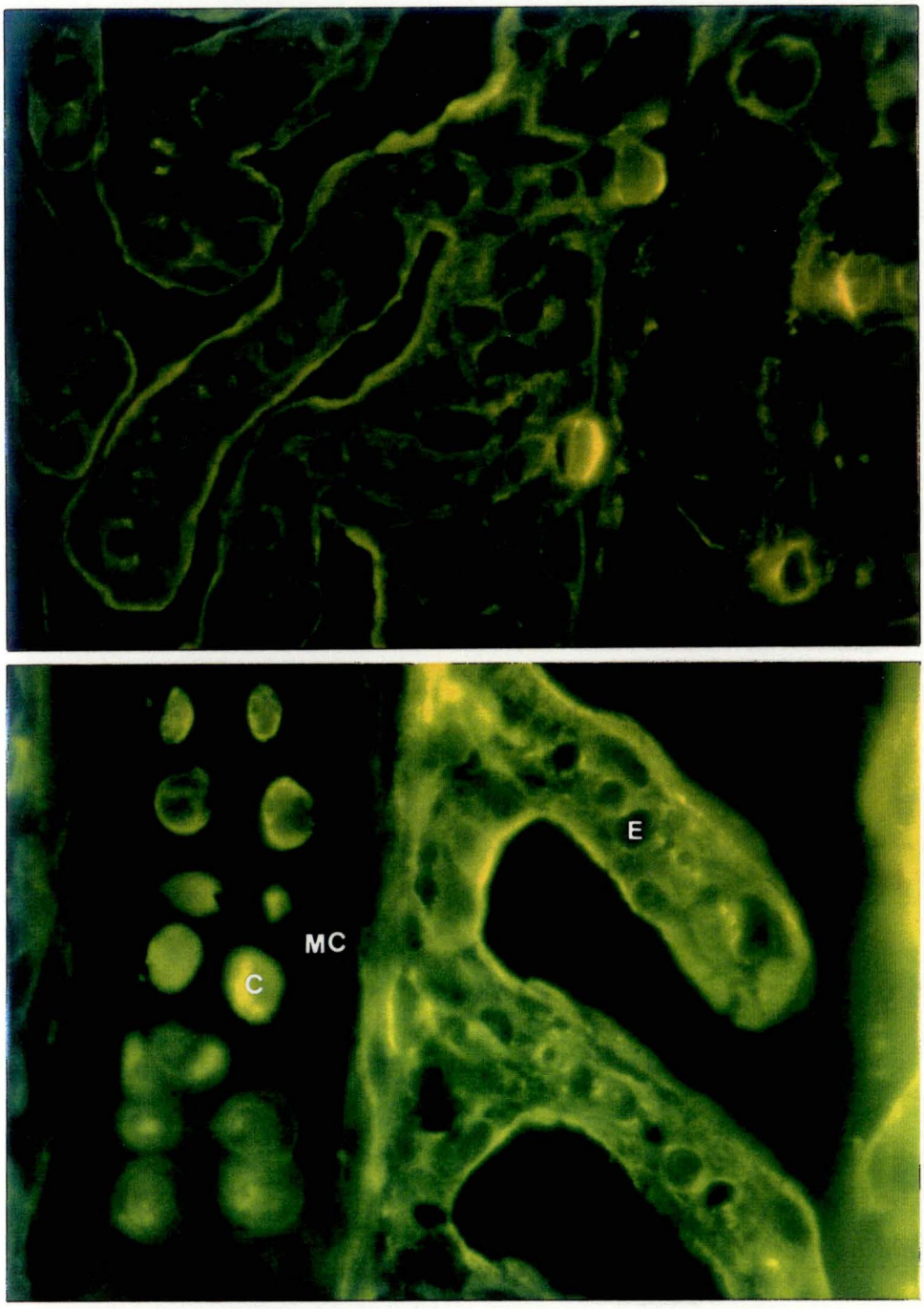
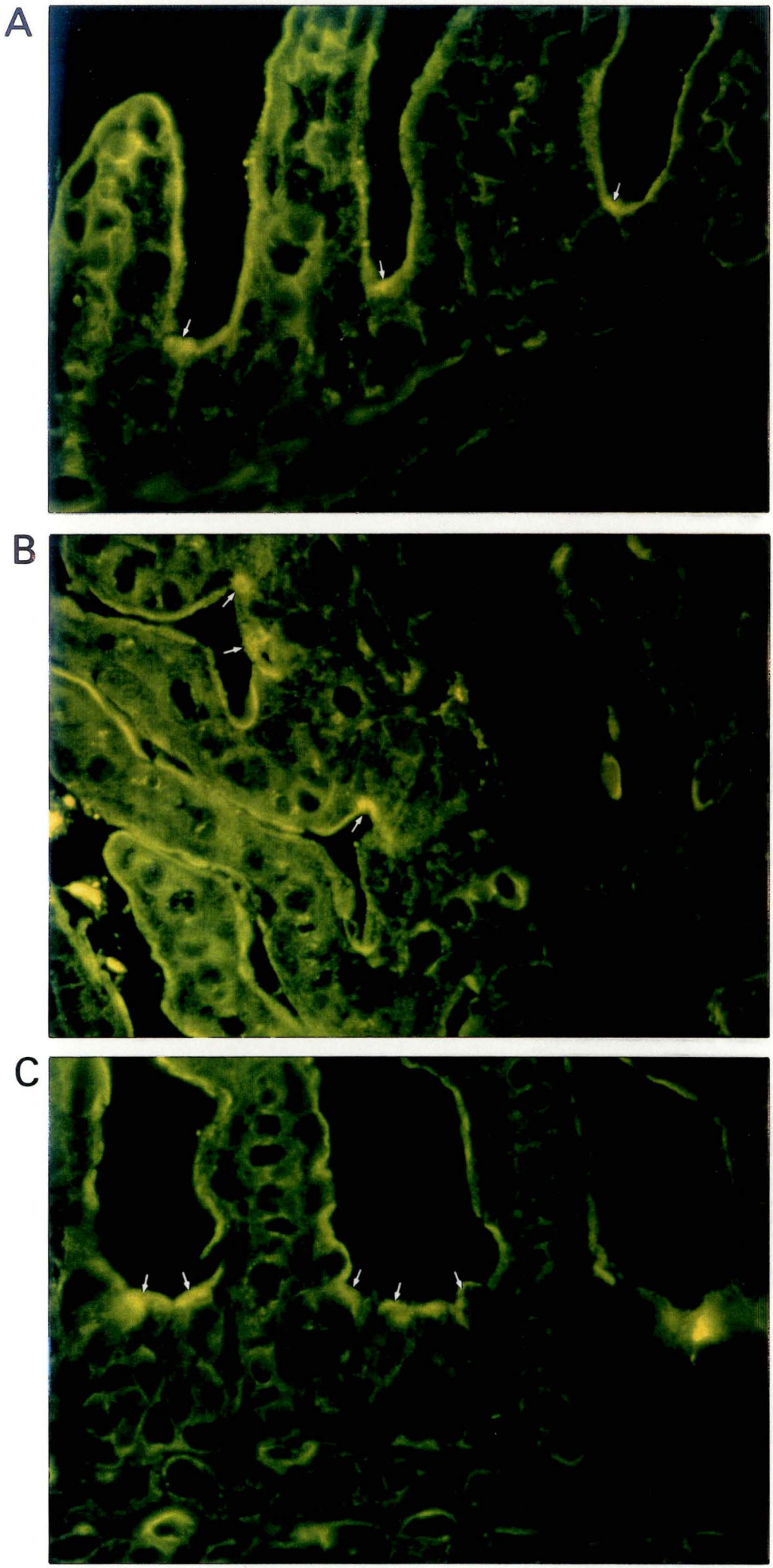


Planche 6 : marquage immunofluorescent indirect de la tubuline, réalisé sur coupe à congélation de filaments branchiaux de saumon non exposés au cadmium. Gross. : 250x

CH : chondrocyte; **E :** érythrocyte; **MC :** matrice cartilagineuse

Planche 7 : marquages immunofluorescents indirects de la tubuline, réalisés sur coupes à congélation de filaments branchiaux de saumons exposés à des concentrations ambiantes en cadmium de 10 µg/l pendant 2 jours (**A**), 7 jours (**B**) et 14 jours (**C**). Gross. : 250x


A
B
C

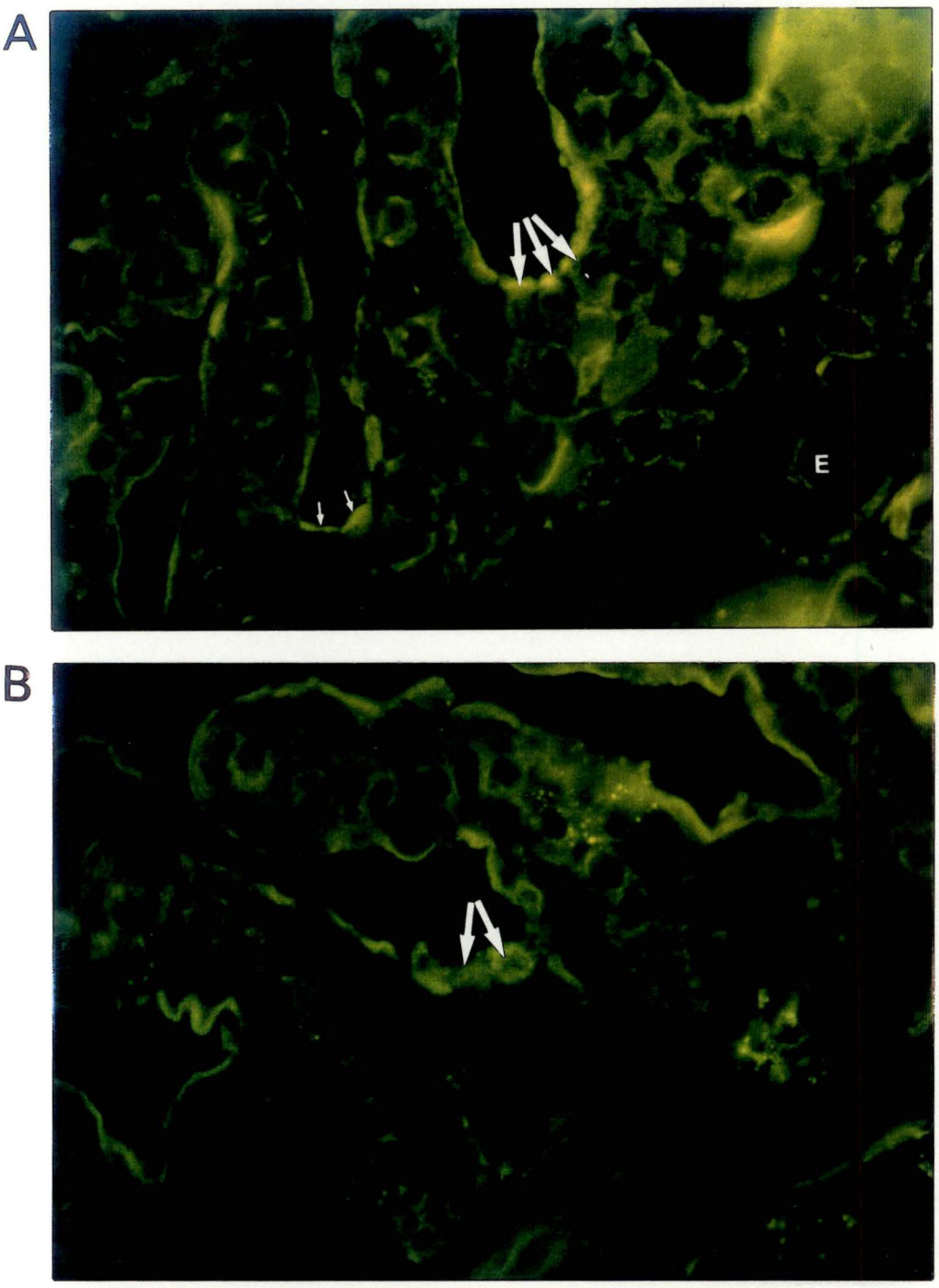


Planche 8 : marquages immunofluorescents indirects de la tubuline, réalisés sur coupes à congélation de filaments branchiaux de saumons exposés pendant 2 jours à des concentrations ambiantes en cadmium de 30 µg/l (**A**) et 50 µg/l (**B**). Gross. : 250x

2. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

2.1. Visualisation du cytosquelette en microscopie électronique à transmission.

Lors de la mise au point des marquages immunocytochimiques, il s'est avéré que la visualisation des éléments du cytosquelette était meilleure après extraction cytosolique. Nos observations ont donc été réalisées sur les tissus préalablement perméabilisés (*cfr* Matériel & Méthodes).

Comme le figure la planche 9, les cellules à chlorure observées sur l'épithélium branchial de *Salmo salar* se caractérisent par un pôle apical présentant des reliefs microvillositaires normalement recouverts par un "cell-coat" abondant, qui n'a cependant pas toujours été conservé par notre technique. Le système vésiculo-tubulaire, présentant un densité intermédiaire entre celle du réticulum endoplasmique et celle du système tubulaire sous-jacents (non figurés ici), se répartit depuis le Golgi (non figuré ici) jusque dans la région de l'apex cellulaire. Ce territoire sous-membranaire renferme également le réseau microfilamentaire du "terminal web", des filaments intermédiaires plus abondants au voisinage des complexes jonctionnels et quelques microtubules isolés qui longent, par ailleurs, l'axe baso-apical.

Les images obtenues en microscopie électronique à transmission viennent confirmer et affiner les résultats obtenus en microscopie optique. Les images à faibles grossissements révèlent une densification de l'espace sous-cortical dès le deuxième jour de traitement au cadmium. Des plages sombres situées dans la région du "terminal web" y sont observées. A plus fort grossissement, ces dernières sont identifiées comme étant des agrégats filamentaires, apparemment isolés des autres organites. Localisés tout le long du pôle apical jusque dans les régions latérales, ces agrégats pourraient figurer un remaniement du réseau actinique constituant le "terminal web" (planches 10, 11, 12, 13 & 14).

La comparaison de la structure des agrégats observés au deuxième jour de traitement aux concentrations de 10 µg/l et de 30 µg/l de cadmium suggère que la désorganisation plus prononcée dans la deuxième condition (30 µg/l)

pourrait être dépendante de la dose de cadmium (planche 15). Néanmoins, une étude plus approfondie s'avère utile pour étayer cette hypothèse .

D'autre part, nos observations, qui ne se prolongent pas au delà de 14 jours de traitement, ne permettent pas la mise en évidence d'une évolution temporelle de la structure des agrégats de nature filamentaire.

Un marquage de l'actine à l'or colloïdal précédent l'inclusion (pré-embedding), suivant la technique de l'immunogold, apporte la confirmation de la nature actinique des agrégats apicaux.

La détection de billes d'or sur les bords du système tubulaire laisse, d'autre part, supposer une interaction de l'actine avec cette structure. Ces résultats, tout à fait préliminaires, demandent naturellement confirmation.

En ce qui concerne les microtubules, peu d'informations complémentaires sont apportées par la microscopie électronique. Leur présence discrète est observée au pôle apical dans toutes les conditions testées. La mise au point d'un marquage immunocytochimique n'a toutefois pas pu être réalisée jusqu'à présent.

Les micrographies obtenues en microscopie électronique à transmission ne permettent pas d'observer de modifications majeures dans l'épaisseur de la région sous-corticale, ni dans le nombre ou la taille des microvillosités. De même, et assez étrangement, le réseau microfilamentaire constituant l'axe microvillositaire ne semble que peu ou pas affecté par le cadmium (planches 15 & 16).

Enfin, les complexes jonctionnels conservent apparemment leur intégrité après un traitement au cadmium. Les jonctions serrées restent effectivement bien fermées en présence du métal et la structure des desmosomes diffus ne semblent pas, à première vue, modifiée (planche 9).

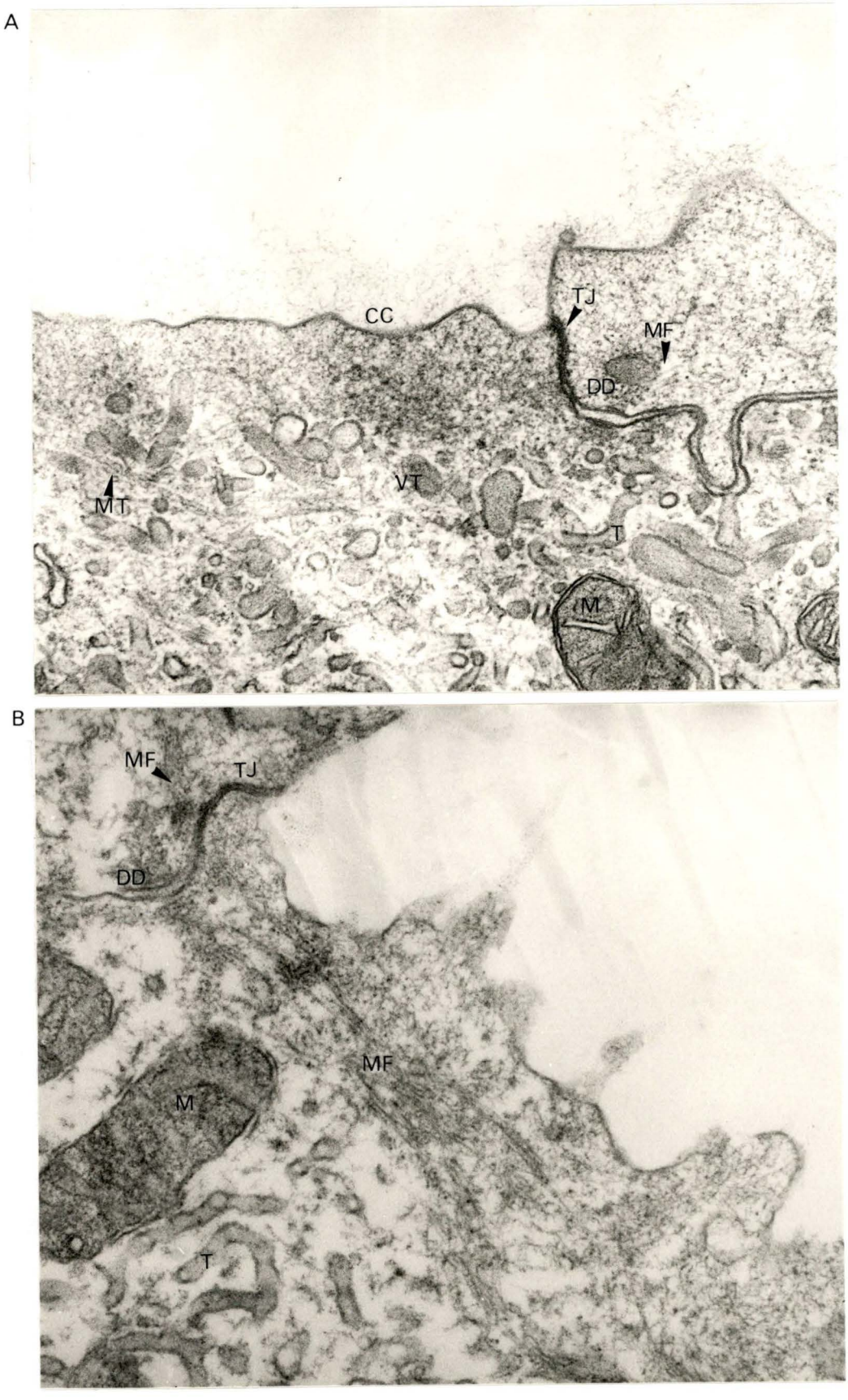


Planche **9** : micrographies électroniques (transmission) représentant les régions jonctionnelles apicales des cellules à chlorure chez un saumon témoin (fig. **A**; gross. 46 000x) et chez un saumon exposé à une concentration en cadmium ambiant de 10 µg/l pendant 7 jours (fig. **B**; gross. 60 000x).
CC : cell coat; **DD** : desmosome diffus; **M** : mitonchondrie; **MF**: microfilaments; **MT**: microtubules; **T :** système tubulaire; **TJ**: tight junction; **VT**: système vésiculo-tubulaire

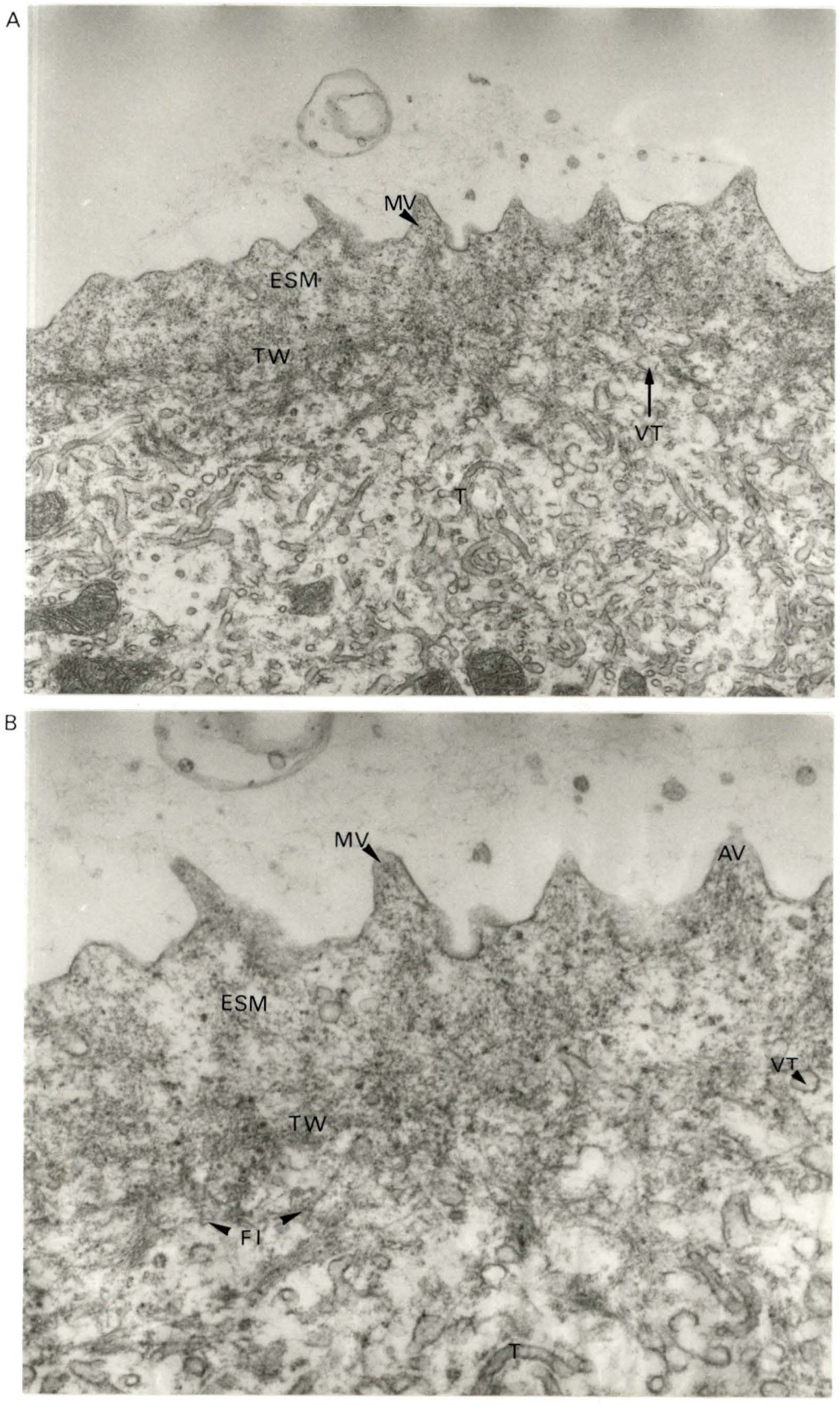
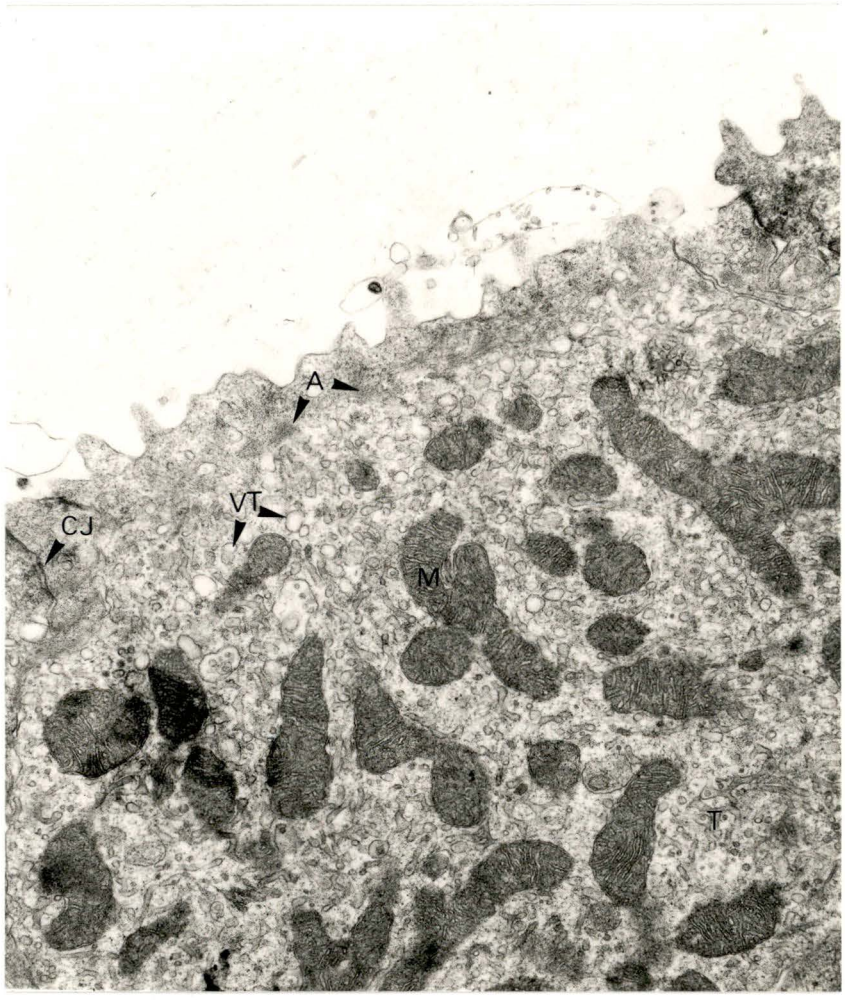


Planche **10** : micrographies électroniques (transmission) illustrant la région apicale d'une cellule à chlorure (gross. 23 000x à la Fig. **A** et gross. 46 000x à la Fig. **B**) chez un saumon non exposé au cadmium.

AV : actine villositaire ; **ESM** : espace sous-membranaire; **FI** : filaments intermédiaires; **M** : mitochondrie; **MV**: microvillosité; **T** : système tubulaire; **TW**: région du terminal web; **VT** : système vésiculo-tubulaire

Planche **11** : micrographies électroniques (transmission) illustrant la région apicale d'une cellule à chlorure (gross. 15 000x à la Fig. **A** et gross. 46 000x à la Fig. **B**) chez un saumon exposé à une concentration ambiante en cadmium de 10 µg/l pendant 2 jours. Les filaments du terminal web s'associent en agrégats, déjà visibles à faible grossissement.
A : agrégat actinique; **CJ** : complexe jonctionnel; **M** : mitochondrie; **T** : système tubulaire; **TW** : région du terminal web; **VT** : système vésiculo-tubulaire

A



B

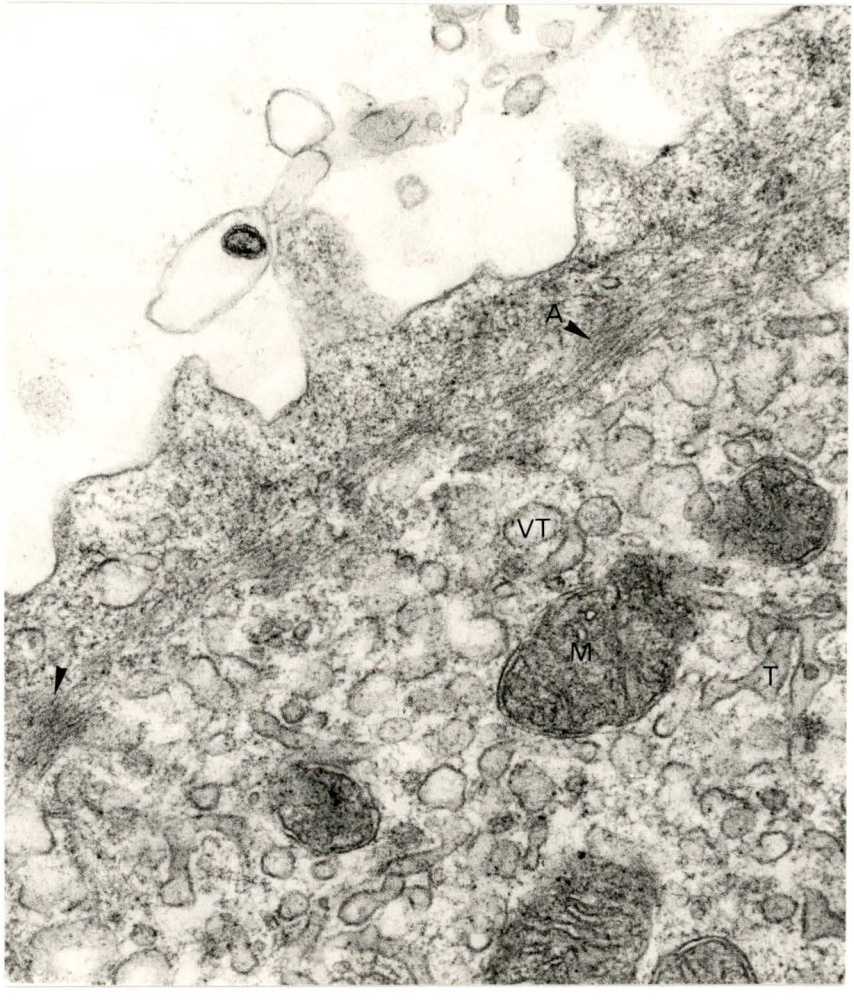
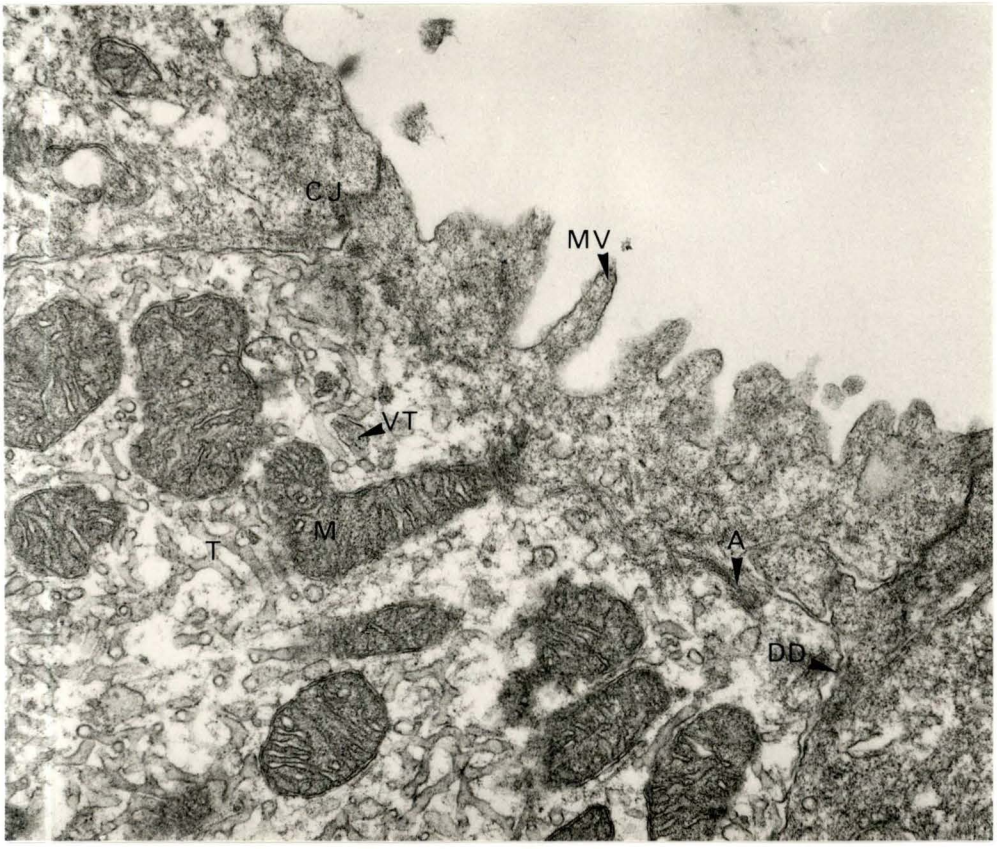


Planche **12** : micrographies électroniques (transmission) illustrant la région apicale d'une cellule à chlorure (gross. 23 000x à la Fig. **A** et gross. 46 000x à la Fig. **B**) chez un saumon exposé à une concentration ambiante en cadmium de 10µg/l pendant 7 jours. De nombreux agrégats sont visibles jusqu'à la périphérie de la zone mitochondriale sous-jacente.
A : agrégat actinique; **CJ** : complexe jonctionnel; **DD** : desmosome diffus; **ESM** : espace sous-membranaire; **M** : mitochondrie; **MV** : microvillosté; **T** : système tubulaire; **VT** : système vésiculo-tubulaire

A



B

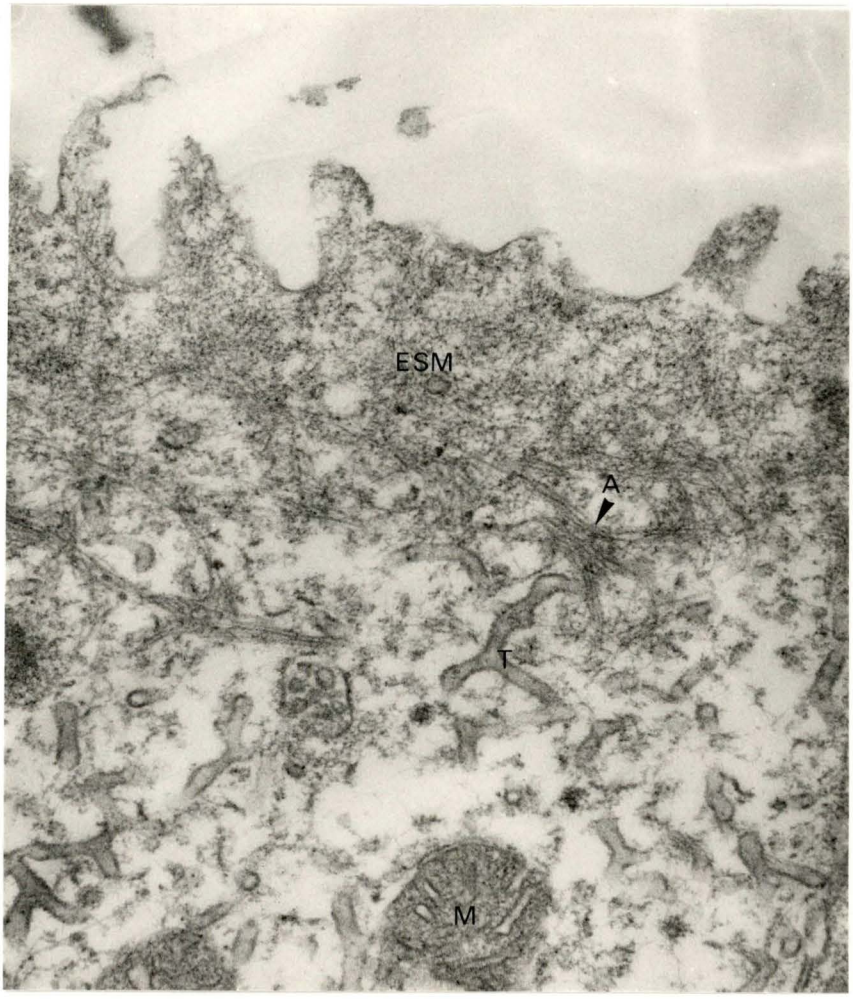


Planche **13** : micrographies électroniques (transmission) illustrant la région apicale d'une cellule à chlorure (gross. 23 000x à la Fig. **A** et gross. 46 000x à la Fig. **B**) chez un saumon exposé à une concentration ambiante en cadmium de 10µg/l pendant 14 jours.
A : agrégat actinique; **AV** : actine villositaire ; **M** : mitochondrie; **T** : système tubulaire; **TJ** : tight junction; **VT** : système vésiculo-tubulaire

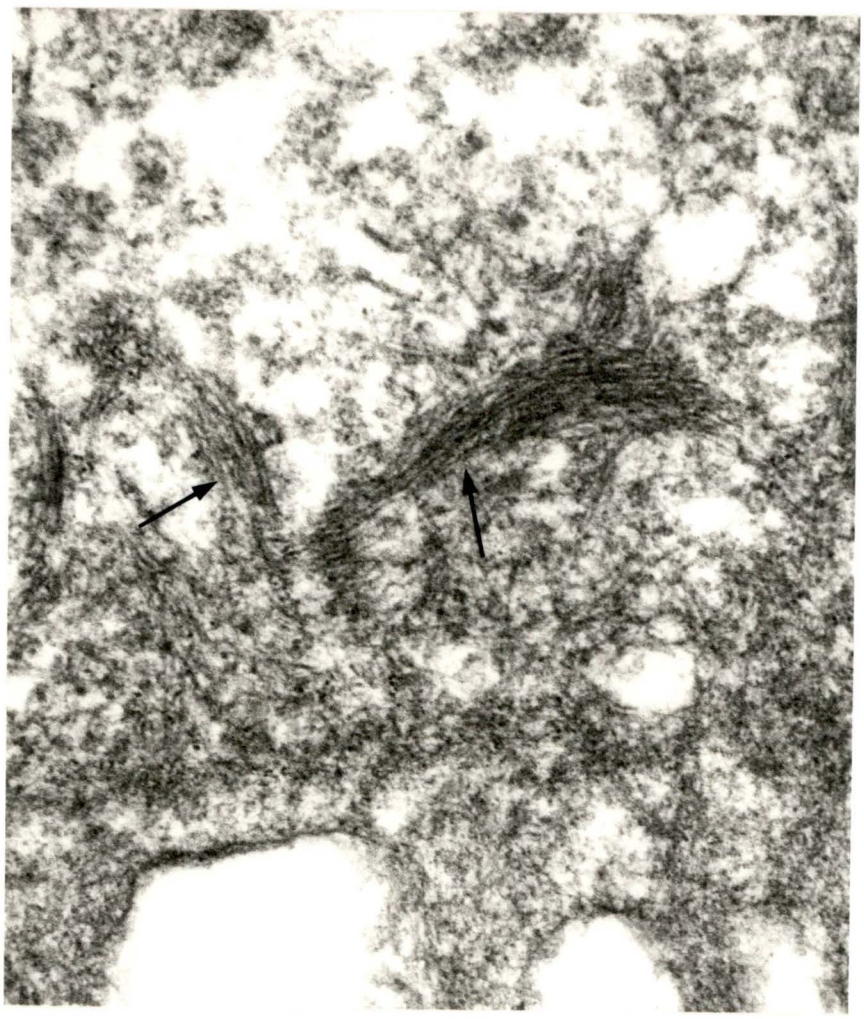


Planche **14** : micrographie électronique (transmission) illustrant un agrégat filamentaire cortical observé dans une cellule à chlorure (gross. 60 000x) chez un saumon exposé 14 jours à une concentration ambiante en cadmium de 10 µg/l.


A
AV
TJ
VT
A
M
T


B
A
T
M

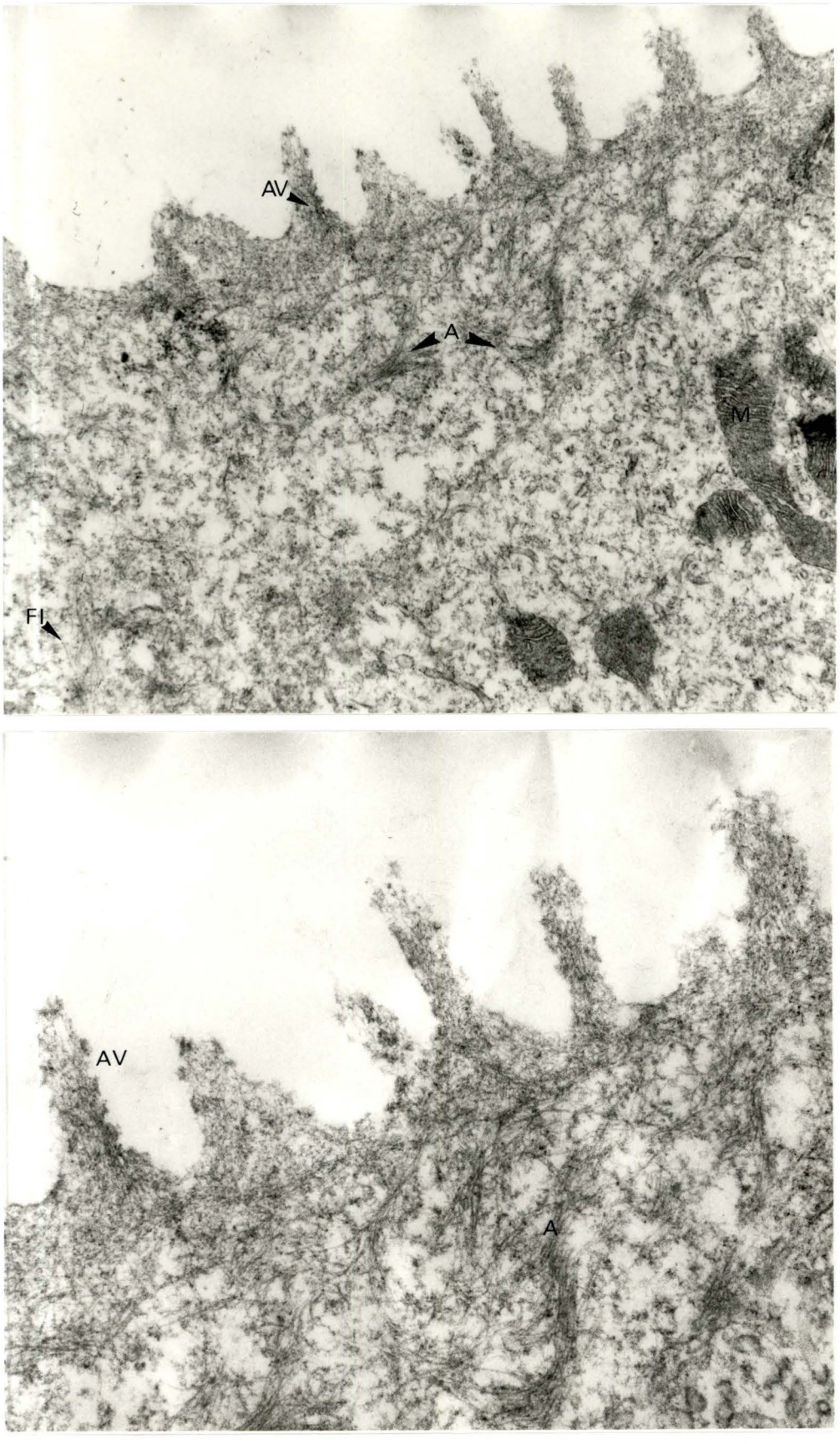


Planche **15** : micrographies électroniques (transmission) illustrant la région apicale d'une cellule à chlorure (gross. 23 000x à la Fig. **A** et gross. 46 000x à la Fig. **B**) chez un saumon exposé à une concentration ambiante en cadmium de 30 µg/l pendant 2 jours. Observons que les faisceaux d'actine présentent un aspect très désordonné et intriqué.
A : agrégat actinique; **AV** : actine villositaire ; **FI** : filaments intermédiaires; **M** : mitochondrie

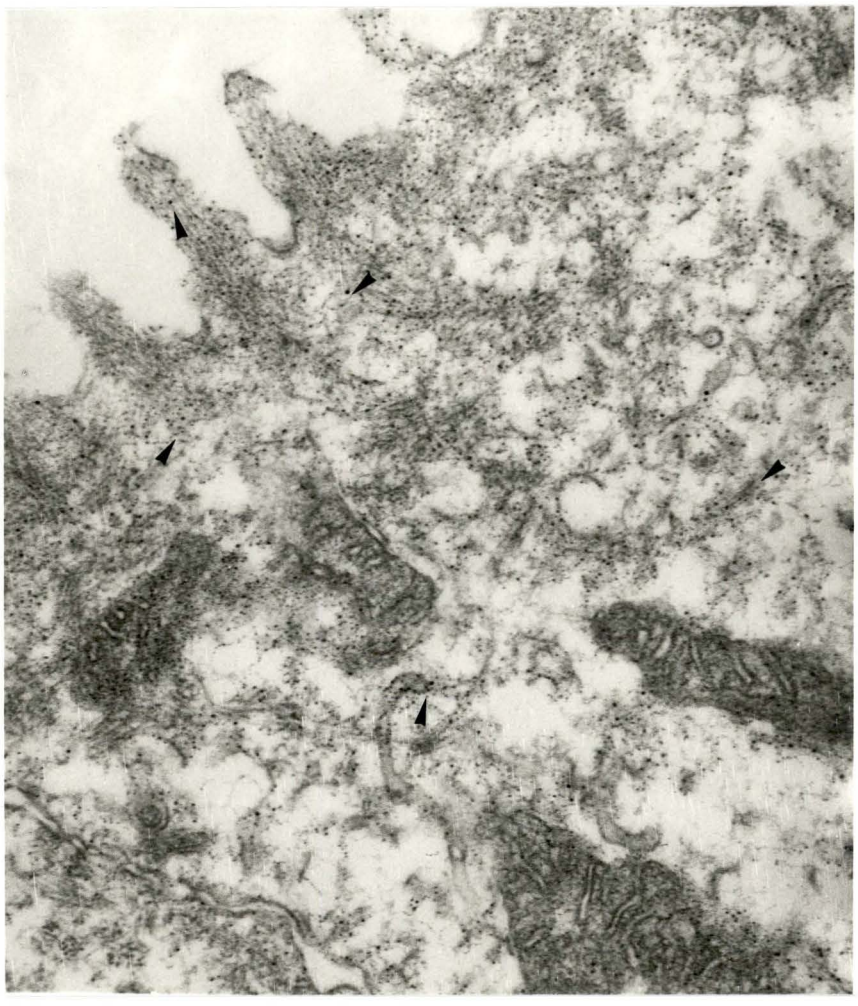


Planche **16** : micrographie électronique (transmission) illustrant le marquage, par la méthode de l'immunogold, du réseau actinique apical d'une cellule à chlorure chez un poisson exposé 7 jours à une concentration ambiante en cadmium de 10 µg/l (gross. 46 000x). On observe un dépôt de billes d'or notamment dans les structures villositaires apicales, sur les agrégats actiniques sous-corticaux, ainsi que sur les structures vésiculo-tubulaires.

2.2. Observation des surfaces cellulaires en microscopie électronique à balayage.

2.2.1. Analyse morphologique.

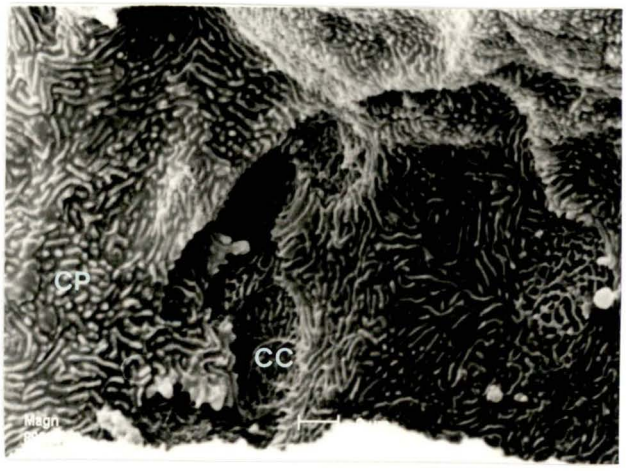
Les observations réalisées en microscopie électronique à balayage permettent d'identifier les deux types cellulaires les plus courants de l'épithélium des filaments primaires : les cellules pavimenteuses, de loin majoritaires et dotées de petites différenciations apicales nommées "microridges" ou "fingerprints", ainsi que les cellules à chlorure, qui se distinguent par leur nombreuses projections microvillositaires dessinant des figures variables. Une observation plus fine de ces microvillosités ne permet toutefois pas de déceler une différence significative de leur abondance, de leur taille ou de leur configuration chez les poissons sains ou ceux traités au cadmium (10 µg/l) durant 14 jours (planche 17, figures 1, 2, 3 & 4). Ceci rejoint les observations effectuées en microscopie électronique à transmission.

En outre, on ne constate pas l'apparition d'un quelqu'autre type de cellule, notamment du type "cellule accessoire" lors de l'intoxication au cadmium. Pour rappel, celles-ci, lorsqu'elles apparaissent lors de la smoltification, imbriquent leur pôle apical dans celui des larges cellules à chlorure.

D'autre part, et comme l'avait fait soupçonner la microscopie optique de fluorescence, les cellules à chlorure des poissons traités se localisent préférentiellement dans la région située à la base des creux interlamellaires, tandis qu'une localisation plus homogène, sur le filament primaire, caractérise les cellules à chlorure des poissons témoins. Les cellules à chlorure des poissons intoxiqués semblent, en outre, moins encryptées entre les cellules pavimenteuses que les cellules témoins.

Les images obtenues mettent également en évidence une différence importante dans le nombre et la taille des cellules à chlorure entre les filaments de poissons sains et ceux de poissons traités au cadmium (10 µg/l) durant 14 jours. Les résultats obtenus chez les poissons exposés durant 2 jours à 50 µg/l de cadmium, soit une dose cinq fois supérieure à celle préalablement testée, confirment ces résultats. De nombreuses et larges cellules à chlorure







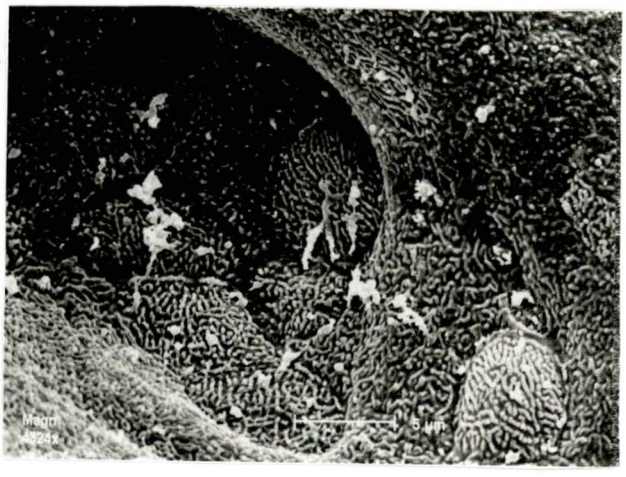






Planche **17** : micrographies électroniques à balayage figurant l'épithélium branchial primaire de saumons atlantiques témoins non traités (Fig.: 1 & 2), exposés pendant 14 jours au cadmium ambiant à concentration de 10 µg/l (Fig. 3 & 4) et pendant 2 jours à une concentration de 30 µg/l en cadmium (Fig. 5 & 6).
CC : cellule à chlorure; **CP** : cellule pavimenteuse

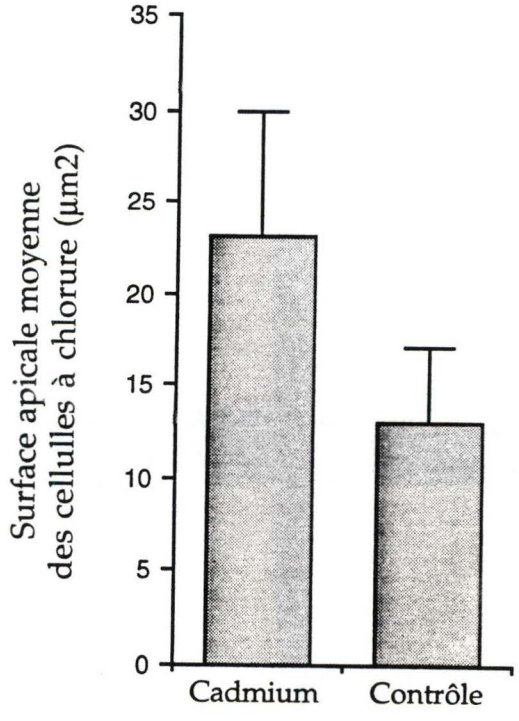


Fig. 38 : graphique représentant la densité moyenne des cellules à chlorure par mm^2 de surface épithéliale en fonction de l'exposition au cadmium (14 jours à 10 µg/l).

sont distribuées dans un épithélium dont le relief semble s'être accentué (Planche 17, fig. 5 & 6).

2.2.2. Analyse statistique.

Les différences, observées dans la taille et la densité des cellules à chlorure, entre les poissons sains et traités au cadmium (10 µg/l; 2 jours) ont fait l'objet d'une analyse statistique. Celle-ci se bass sur l'observation de micrographies reprises en annexe.

A. Analyse de la densité des cellules à chlorure. (cc/mm^2)

Le tableau repris ci-dessous permet une comparaison entre la densité moyenne des cellules à chlorure (cc) des branchies de saumons sains et intoxiqués. Ces valeurs sont reprises dans la figure 38 .

	Témoin	Cd 14 jours, 10 µg/l
n	9	6
m (cc/mm^2)	8912	18028
σ	1356	3001

La valeur de la variable *t* du test de Student calculée est de 28,00, avec un degré de liberté de 13; ce qui correspond à une probabilité de se tromper nettement inférieure à 1 %. Nous acceptons donc l'hypothèse alternative de l'augmentation du nombre de cellules à chlorure lors de l'exposition au cadmium; ce test se révélant hautement significatif.

B. Analyse de la surface apicale des cellules à chlorure. (μm^2)

Le tableau repris ci-dessous permet de comparer la densité moyenne des cellules à chlorure des branchies de saumons sains et intoxiqués. Ces valeurs sont reprises dans la figure 39.

Les calculs des surfaces cellulaires apicales, basés sur l'analyse bidimensionnelle, sous-estiment très légèrement les valeurs réelles puisqu'ils

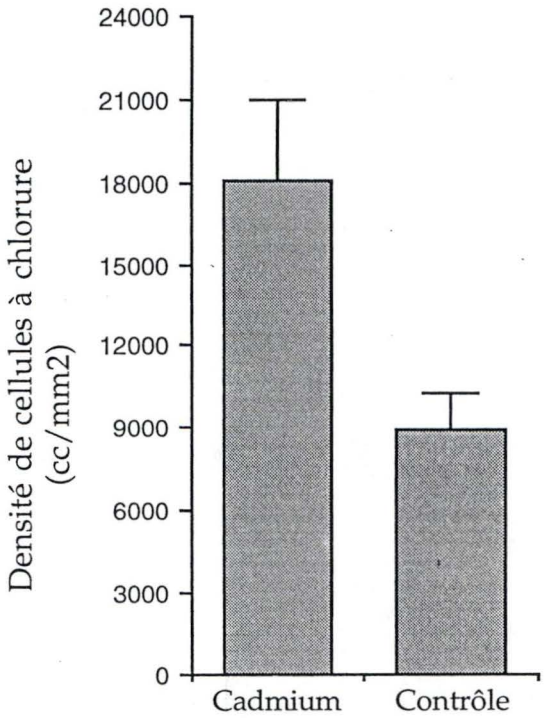


Fig. 39 : graphique représentant la surface apicale moyenne des cellules à chlorure en fonction de l'exposition au cadmium (14 jours à 10 µg/l).

ne tiennent pas compte de la surface des nombreuses projections microvillositaires, ni de l'encryptage partiel des cellules à chlorure entre les cellules pavimenteuses. Néanmoins, il est admis dans la littérature que cette analyse est la plus adéquate pour notre type de matériel (Laurent & Perry, 1990).

	Témoin	Cd 14 jours, 10 µg/l
n	26	32
$\bar{m}$ (cc/mm^2)	13,00	23,21
σ	6,76	4,078

La valeur de la variable *t* du test de Student calculée est de 6,76, avec un degré de liberté de 56; ce qui correspond à une probabilité de se tromper nettement inférieure à 1 %. Nous acceptons donc l'hypothèse alternative de l'augmentation de surface des cellules à chlorure lors de l'exposition au cadmium, ce test se révélant hautement significatif.

Discussion

Discussion générale.

Dans le cadre du projet "Saumon 2000", visant de manière large à la réimplantation du Saumon Atlantique dans nos rivières, nous nous sommes particulièrement intéressés aux effets du cadmium sur l'organisation branchiale et les structures cytosquelettiques des cellules à chlorure de ce poisson.

Les marquages immunohistochimiques que nous avons réalisés en microscopie optique sur les filaments branchiaux de *Salmo salar* permettent de montrer un effet significatif du cadmium sur les structures microfilamentaires. Ainsi, des modifications dans le marquage du réseau d'actine sont observées en présence de Cd^{++} au niveau des creux inter-lamellaires, à la jonction des filaments branchiaux primaires et secondaires, c'est-à-dire plus particulièrement à l'endroit où se localisent les cellules à chlorure.

Si la microscopie optique de fluorescence ne permet d'observer qu'une plus grande intensité du marquage latéro-apical des cellules à chlorure, les micrographies électroniques à transmission viennent confirmer et affiner ces observations. En présence de cadmium, pour les deux concentrations testées (10 et 30 µg/l) et quelle que soit la durée du traitement (du moins entre 2 et 14 jours), on relève la présence d'épais agrégats de microfilaments à l'aspect désordonné et situés dans la région corticale des cellules à chlorure.

Ces changements, intervenant dans des cellules spécialement impliquées dans les échanges ioniques, peuvent être mis en relation avec les observations réalisées lors des processus de régulation du volume cellulaire. En effet, plusieurs études ont pu démontrer que, dans divers types de cellules, les modifications des concentrations ioniques intracellulaires induites tant en conditions iso- qu'hypo-osmotiques sont accompagnées d'une réorganisation importante du réseau microfilamentaire (pour revue, Al-Habori, 1994). Cette dernière consiste en une dépolymérisation partielle du réseau de microfilaments suivie d'une repolymérisation progressive de l'actine autour du noyau et le long de structures radiaires mal organisées (Cornet et al., 1994). Les images de cellules à chlorure exposées au Cd^{++}, que nous avons obtenues en microscopie électronique à transmission, suggèrent également une

réorganisation actinique, mais figurée ici par des agrégats corticaux disparates et isolés des organites. Une localisation cytoplasmique plus profonde et périnucléaire n'a cependant pas été décelée, masquée peut-être - si elle existe - par les structures tubulaires et les nombreuses mitochondries présentes dans ces cellules.

Nos observations donnent cependant à penser que l'action du cadmium serait, plus précisément, ciblée sur les structures microfilamentaires associées au "terminal web". Dans le même ordre d'idée, c'est-à-dire dans le cadre d'une association filamentaire aux complexes jonctionnels, des micrographies réalisées chez le tilapia traité au cadmium (10 µg/l) montrent une ouverture des jonctions serrées unissant cellules à chlorure et cellules pavimenteuses (Pratap et Wendelaar-Bonga, 1993). En outre, différentes études réalisées sur l'endothélium testiculaire, les cellules MDCK (Madin-Derby Canine Kidney) et, plus récemment, les cellules de sertoli du testicule de rat, ont permis de montrer, tant *in vivo* qu'*in vitro*, que le cadmium détruit sélectivement les microfilaments d'actine associés aux jonctions serrées (Hew et al., 1993). Ce type de destruction est, par ailleurs, fort semblable à celui obtenu en présence de cytochalasine D dans le cas des entérocytes et conduisant à la formation d'agrégats sphériques concentrés au voisinage des jonctions serrées (Madara et al., 1986). Nos propres observations réalisées en microscopie électronique à transmission ne permettent cependant pas d'affirmer la présence d'un tel effet chez le saumon atlantique où les jonctions serrées apicales restent fermées en présence de cadmium. Néanmoins, étant donné l'importance des modifications du réseau microfilamentaire que nous avons décelées, nous ne pouvons exclure qu'une destruction analogue s'y répercute. En outre, et quoique nous n'ayons pu le démontrer, il ne serait pas impossible que l'effet du cadmium puisse aussi se manifester sur les structures des desmosomes diffus, étant donné les relations que celles-ci entretiennent avec le réseau microfilamentaire et le "terminal web". Pour poursuivre dans cette voie, il nous faudrait cependant recourir à d'autres techniques plus appropriées comme, notamment, la microscopie confocale (laser scanning confocal fluorescence, par ex.).

D'autre part, et de manière assez étonnante étant donné ce qui semble être une importante réorganisation du "terminal web", les observations que nous avons réalisées en microscopie électronique à transmission ne permettent pas de déceler, en présence de cadmium, des modifications dans le réseau microfilamentaire qui soutient les microvillosités apicales. De même, la

morphologie du relief cellulaire tel que visualisé en microscopie à balayage ne montre, en première étude, aucun changement dans le nombre, la taille et l'organisation de ces microvillosités. Ceci s'éloigne de ce qui se passe pour différents types de cellules soumises à des chocs osmotiques où la réorganisation microfilamentaire s'accompagne d'une modification de l'aspect et de la densité des microvillosités (Cornet et al., 1993; 1994). Dans le cas des ascites d'Ehrlich, le choc osmotique s'accompagne en outre de déformations importantes de la surface cellulaire sous forme d'expansions sphériques volumineuses dénommées "blebs" (Cornet et al., 1993). Celles-ci sont classiquement considérées comme des réponses habituelles des cellules à toute sortes de traumatismes (Trump et al., 1979). En présence de cadmium, aucune déformation superficielle de ce type n'a cependant pu être observée.

Considérons à présent quelles pourraient être les voies d'action du cadmium sur les structures microfilamentaires.

L'hypocalcémie, un des symptômes caractéristiques d'un empoisonnement par le cadmium chez le poisson, témoigne des fortes perturbations engendrées au niveau de la balance calcique (Verbost et al., 1987). Dans l'épithélium branchial, les transports de calcium s'effectuent via les cellules à chlorure, comme cela a pu être démontré chez l'anguille américaine (Flick et al., 1985), le tilapia (Flick et al., 1993) et les salmonidés (Perry, 1988). Les études réalisées par Verbost et son équipe (1989b) démontrent, en outre, que les deux cations Ca^{++} et Cd^{++} possèdent, au niveau de l'épithélium branchial, une voie d'entrée similaire. Toutefois, ces auteurs démontrent que le cadmium n'entre pas en compétition directe avec le calcium au niveau des transporteurs membranaires apicaux.

Rappelons ici, brièvement, que le calcium, entré passivement le long du gradient électrochimique en empruntant des chemins propres, est tamponné par association à des ligands protéiques (calcium binding proteins (CaBPs) et autre calmoduline). Les ions Ca^{++} peuvent ensuite gagner la membrane basolatérale d'où ils seront transloqués vers le compartiment sanguin. Contrairement à la traversée apicale, celle de la membrane basolatérale requiert des transporteurs actifs de haute affinité, les Ca^{++} ATPases. Comme l'inhibition de la pompe Ca^{++} ATPasique de haute affinité se manifeste déjà à des concentrations en cadmium de l'ordre du nanomolaire (soit une valeur cent fois supérieure à celle de la constante d'affinité pour le calcium), on identifie ce transporteur basolatéral comme la cible principale de l'ion

métallique. En conséquence de l'inhibition des Ca^{++} ATPases basolatérales et de leurs homologues mitochondriaux et réticuliniques par le Cd^{++}, le calcium libre s'accumule dans le cytosol, lié à des calciprotéines (Flick et al. , 1985); c'est alors que, par effet de feed-back négatif, les canaux du transport calcique apical se ferment (Verbost et al., 1989a). Un modèle analogue est proposé pour expliquer l'impact du cadmium sur les pompes calciques de l'épithélium intestinal du rat (Verbost et al., 1987) et des érythrocytes humains (Verbost et al., 1989b).

Remarquons d'autre part, que l'action qu'exerce le calcium sur les enzymes et autres protéines a souvent pour médiateur la calmoduline (celle-ci intervient notamment dans le régulation exercée par le calcium sur l'organisation du cytosquelette (pour revue, Mooseker et al., 1986; Carlier, 1991). Cependant, la détermination d'une constante d'affinité du cadmium pour la calmoduline des ionocytes mille fois inférieure aux concentrations cytosoliques moyennes en Cd^{++} laisse entrevoir le faible impact de la formation de ce complexe. Par conséquent, l'interaction entre le cadmium et la pompe calcique ne s'avère pas s'exercer au site de liaison de la calmoduline, mais bien directement au site de fixation de l'ion calcium (Verbost et al., 1989a).

Quant aux mouvements de sortie des ions Ca^{++}, ils s'effectuent en empruntant une voie paracellulaire par franchissement des complexes jonctionnels intercellulaires, le long du gradient de diffusion. On soupçonne qu'une interaction avec les protéines des complexes jonctionnels pourrait être à l'origine de l'augmentation de leur perméabilité. Cette voie semble, pour sa part, moins sensible au Cd^{++} que la voie d'entrée. Seules de concentrations micromolaires en cadmium stimulent significativement l'excrétion calcique chez la truite arc-en ciel (Verbost et al., 1987).

Les modifications de la balance calcique, induites par le cadmium et rappelées succintement ci-dessus, revêtent toute leur importance quand on connaît le rôle joué par le calcium dans la régulation de l'assemblage et du maintien de l'intégrité des réseaux cytosquelettiques, et tout particulièrement actiniques (pour revue Mooseker et al., 1986; Stossel, 1989). De même, des expériences réalisées sur les cellules d'ascites d'Ehrlich ont pu mettre en évidence le rôle prépondérant joué par les variations des concentrations internes en calcium sur la réorganisation microfilamentaire induite lors d'un choc hypo-osmotique (Cornet et al., 1993).

Rappelons cependant que la régulation de l'architecture actinique par le Ca^{++} se manifeste essentiellement à travers celle des protéines qui lui sont associées (pour revue récente, Janmey, 1994). Ainsi, les concentrations calciques élevées activent la fragmentation des polymères actiniques par les gelsoline, fragmine et autre severine, tandis qu'à l'inverse, les protéines assurant les liaisons interfilamentaires comme les α-actinine, fascine ou fimbrine, sont inhibées par le cation. La villine est, quant à elle, douée d'une extraordinaire versatilité d'action, assurant tout à tour le "cross-linkage", la fragmentation, la nucléation ou la dépolymérisation des filaments, en fonction de la valeur du taux de calcium intracellulaire. De manière analogue, de nombreuses protéines impliquées dans les interactions cytosquelette-membrane plasmique fixent le calcium (Bennett & Gilligan, 1993). Ainsi, la sous-unité α de la spectrine est dotée d'un site de liaison à la calmoduline, médiateur de l'action calcique, et d'un site de clivage pour la calpaine, elle-même tributaire du calcium. Par exemple, à des concentrations micromolaires en Ca^{++}, la calpaine sectionne la molécule de spectrine, réduisant de la sorte les liaisons interactiniques et les liaisons cytosquelette-membrane plasmique (Harris & Marrow, 1990).

En ce qui concerne le système microtubulaire, plus discret dans les cellules à chlorure, les images obtenues en microscopie optique et électronique ne permettent pas d'observer une modification drastique de leur réseau en présence de cadmium, telle que celle décelée pour les microfilaments. Pourtant, remarquons que l'assemblage des microtubules fait également l'objet d'une régulation par le calcium. Une augmentation de la concentration en calcium cytosolique, par micro-injection ou addition d'ionophores, provoque effectivement une dépolymérisation microtubulaire locale. Les taux calciques dépolymérisants s'avèrent, néanmoins, plus faibles lorsqu'ils sont appliqués à des extraits cellulaires plutôt qu'à des polymères de tubuline, ce qui suggère l'intervention d'un facteur de sensibilisation qui ne serait autre que la calmoduline (Marcum et al., 1978; Keith et al., 1983). Le complexe Ca^{++}/calmoduline régulerait l'assemblage microtubulaire par liaison à des protéines associées telles les protéines *tau* et MAP_2 (Lee & Wolff, 1984a,b). Rappelons, à ce propos qu'étant donné leur faible affinité, la formation d'un complexe cadmium/calmoduline est négligeable dans les cellules à chlorure. Par contre, il faut souligner que les réseaux de microfilaments et de microtubules établissent de nombreuses interactions (Schliwa et al., 1981) et

qu'une réorganisation du réseau d'actine pourrait se répercuter sur celui de tubuline, comme notamment démontré dans les kératinocytes humains (Zamansky et al, 1991).

De même, les étroites relations établies entre le réseau de microfilaments et les filaments intermédiaires nous poussent à émettre l'hypothèse selon laquelle le cadmium pourrait agir sur le réseau des filaments intermédiaires soit directement, soit indirectement via la réorganisation microfilamentaire. Nos micrographies électroniques ne nous apportant, malheureusement, aucun élément pour vérifier ces hypothèses et, le temps nous étant compté, nous n'avons pas pu explorer plus en avant cette voie.

Enfin, la microscopie électronique à balayage nous a permis de montrer une augmentation importante du nombre et de la taille des cellules à chlorure sur les branchies de poissons intoxiqués au cadmium. Une augmentation similaire du nombre global de cellules à chlorure a récemment été démontrée chez le tilapia soumis aux mêmes conditions (Pratap & Wendelaar Bonga, 1993). Dans ce cas, des analyses utrastructurales ont mis en évidence que le nombre total de cellules matures régresse et que seule la hausse du nombre de cellules immatures serait responsable de l'accroissement de l'effectif cellulaire global. Cette augmentation de la vitesse du renouvellement épithélial pourrait être notamment liée à l'accumulation du calcium cytosolique et à la fragmentation chromatique qui en découlerait. Notre étude ne nous à pas permis de déterminer une augmentation des cellules immatures dans le cas du saumon. On ne constate pas non plus l'apparition ni l'accroissement important du nombre de cellules accessoires qui caractérisent la smoltification. Par contre, l'augmentation de surface des larges cellules à chlorure pourrait suggérer une corrélation entre les processus faisant suite à un empoisonnement au cadmium et ceux apparaissant lors de la smoltification. Des colorations spécifiques des corps denses apicaux seraient cependant absolument nécessaires pour étayer cette hypothèse et déterminer les pourcentages respectifs des larges et petites cellules à chlorure lors de l'empoisonnement au cadmium.

Conclusions.

A la lumière des connaissances actuelles de la toxicité du cadmium, à des taux avoisinant ceux rencontrés dans nos eaux polluées, plusieurs arguments nous laissaient présager un effet du cadmium sur l'un ou l'autre élément du cytosquelette. L'approche morphologique et immunohistochimique pour laquelle nous avons opté est, à notre connaissance, la première du genre réalisée sur les épithéliums branchiaux de poissons salmonidés.

L'immunofluorescence optique, en révélant une différence dans le marquage actinique entre les poissons sains et ceux traités au cadmium, conforte notre hypothèse. Le recours à la microscopie électronique permet une observation plus fine de ces modifications et révèle d'importants agrégats corticaux. La nature actinique de ceux-ci a pu être déterminée grâce à l'utilisation d'un marquage indirect à l'or colloïdal.

Toutefois, nous devons émettre des réserves quant aux autres constituants cytosplasmiques, les microtubules et les filaments intermédiaires. Si nos données, malheureusement fragmentaires, ne permettent de déceler aucune modification flagrante dans leurs structures, l'approfondissement de leur étude s'avère nécessaire.

Pour terminer, nous avons pu mettre en évidence, grâce à la microscopie électronique à balayage, une augmentation très significative tant du nombre de cellules à chlorure que de leur surface, et ce, en présence de 10 et 50 µg/l de cadmium, après respectivement 2 et 14 jours de traitement.

Perspectives.

Notre étude s'inscrit dans le cadre, plus vaste, de la compréhension des processus cellulaires perturbés lors d'une pollution au cadmium. Les résultats obtenus démontrent l'intérêt de poursuivre l'investigation des effets de ce métal lourd sur les constituants cytosquelettiques, eux-mêmes impliqués dans de multiples fonctions cellulaires. Ainsi, la Na^+/K^+ ATPase, enzyme clé des processus de transports ioniques branchiaux, est confinée dans des territoires membranaires strictement déterminés. Sa localisation ainsi que son activité apparaissent directement tributaires de sa liaison avec le réseau d'actine (Bertorello & Katz, 1993). A côté de l'interférence immédiate du cadmium aux

sites régulateurs de la Na^+/K^+ ATPase (Kinne-Saffran, 1993), on peut, dès lors, envisager la possibilité d'une inhibition indirecte des pompes via des modifications de l'architecture actinique. Les marquages préliminaires que nous avons réalisés en microscopie électroniques semblent confirmer la présence d'actine le long des systèmes tubulaires, où se localise la pompe Na^+/K^+ ATPasique des cellules à chlorure. Ceci demande évidemment confirmation, si ce n'est un double marquage actine-Na^+/K^+/ATPase. En outre, on pourrait envisager l'étude des effets cumulés ou non du cadmium et de différents inhibiteurs cytosquelettiques, comme les cytochalasines, sur les activités des pompes ioniques. D'autre part, dans une optique plus "thérapeutique", un suivi prolongé du traitement au cadmium permettrait d'étudier d'éventuels mécanismes de récupération (comme précédemment décrits chez le tilapia), et des facteurs qui pourraient y contribuer (Ca^{++}, ions métalliques, ...) (Wendelaar Bonga & Pratap, 1993).

Bibliographie

Aebi U., Fowler W.E., Rew P. & Sun T.T. (1983)
The fibrillar substructure of keratin filaments unraveled. *J. Cell Biol.* 97: 1131-1143.

Al-Habori M. (1994)
Cell volume and ion transport regulation. *Int. J. Biochem.* 26: 319-334.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Watson J.D. (1983)
Biologie moléculaire de la cellule. Flammarion Médecine Sciences, pp 1146.

Arpin M., Algrain M. & Louvard D. (1994)
Membrane-actin microfilament connections: an increasing diversity of players related to band 4.1. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 136-141.

Bartels H., Schewe H. & Potter I.C. (1993)
Structural changes in the apical membrane of lamprey chloride cells after acclimation to seawater. *Am. J. Physiol.* 265: C733-C739.

Bennett V. & Gilligan D.M. (1993)
The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9: 27-66.

Bereiter-Hahn J. (1976)
Dimethylaminostyrylmethylpyridiniumiodine (DASPMI) as a fluorescent probe for mitochondria in situ. *Biochim. Biophys. Acta* 423: 1-14.

Bergen L.G. & Borisy G.G. (1983)
Tubulin-colchicine complex inhibits microtubule elongation at both plus and minus ends. *J. Biol. Chem.* 258: 4190-4194.

Bershadsky A.D. & Vasiliev J.M. (1988)
Cytoskeleton. New York, London, Plenum Press.

Bertorello A.M. & Katz A.I. (1993)
Short-term regulation of renal Na-K-ATPase activity: physiological relevance and cellular mechanisms. *Am. J. Physiol.* 265: F743-F755.

Boeuf G. (1987a)
Bases physiologiques de la salmoniculture: osmorégulation et adaptation à l'eau de mer. *La pisciculture Française* 87: 28-40.

Boeuf G. (1987b)
Bases physiologiques de la salmoniculture: le phénomène de la smoltification. *La pisciculture Française* 88: 5-21.

Boeuf G. (1993)
Salmonid smolting: a pre-adaptation to the oceanic environment. In : " Fish Ecophysiology", Rankin, J.C. & Jensen, F.B., eds.); Chapman & Hall, London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, pp.105-135.

Bouteille M., Bouvier D. & Seve A.P. (1983)
Heterogeneity and territorial organization of the nuclear matrix and related structures. *Int. Rev. Cytol.* 83: 135-182.

Bradley T.J. (1981)
Improved visualization of apical vesicles in chloride cells of fish gills using an osmium quick-fix technique. *J. Exp. Zool.* 217: 367-377.

Bray D. (1992)
Cell Movements. New York, London, Garland Publishing, Inc.

Bray D. & White J.G. (1988)
Cortical flow in animal cells. *Science* 239: 883-888.

Bremer A., Millonig R.C;, Sütterlin R., Engel A., Pollard T.D. & Aebi U. (1991)
The structural basis for the intrinsic disorder of the actin filament: the "lateral slipping" model. *J. Cell Biol.* 115: 689-703.

Carlier M.-F., Hill T.L. & Chen Y.-D. (1984)
Interference of GTP hydrolysis in the mechanism of microtubule assembly: an experimental study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 771-775.

Carlier M.F. (1991)
Actin: protein structure and filament dynamics. *J. Biol. Chem.* 266: 1-4.

Cassimeris L., Pryer N.K. & Salmon E.D. (1988)
Real-time observations of microtubule dynamic instability in living cells. *J. Cell Biol.* 107: 2223-2231.

Collot M. (1988)
Localisation et transport des organites subcellulaires en relation avec le cytosquelette. *Thèse de doctorat,FUNDP.*

Cooper J.A. (1987)
Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J. Cell Biol.* 105: 1473-1478.

Cornet M., Isobe Y. & Lemanski L.F. (1994)
Effects of anisosmotic conditions on the cytoskeletal architecture of cultured PC12 cells. *J. Morphol.* Sous presse.

Cornet M., Lambert I.H. & Hoffmann E.K. (1993)
Relation between cytoskeleton, hypo-osmotic treatment and volume regulation in Ehrlich ascites tumor cells. *J. Membrane Biol.* 131: 55-66`.

Coulombe P.A. & Fuchs E. (1990)
Elucidating the early stages of keratin filament assembly. *J. Cell Biol.* 111: 153-169.

Darnell J., Lodish H. & Baltimore D. (1990)
Biologie moléculaire de la cellule. (ed 2nd). De Boeck Université, 1990, pp 1102.

De Brabander M., Geuens G., Nuydens R., Willebrords R. & De Mey J. (1982)
Micortubule stability and assembly in living cells: the influence of metabilic inhibitors, taxol and pH. *Cold Spring Harbor Symp.* 46: 227-240.

De Mey J., Moeremans M., Nuydens R. & De Brabander M. (1981)
High resolution light and electron microscopic localization of tubulin with the IgS (Immunogold Staining) method. *Cell Biol. Int. Reports* 5: 889-899.

Derick L.H., Liu S.-C., Chishti A.H. & Palek J. (1992)
Protein immunolocalization in the spread erythrocyte membrane skeleton. *Eur. J. Cell Biol.* 57: 317-320.

Devos E. (1991)
Le cadmium et les Ca^{++} ATPases dans la smoltification du saumon atlantique *Salmo salar* L. *Mémoire de Licence* .

Dhermy D. (1991)
The spectrin super-family. *Biol. Cell* 71: 249-254.

Drenckhahn D., Jöns T., Kollert-Jöns A., Koob R., Kraemer D. & Wagner S. (1993)
Cytoskeleton and epithelial polarity. *Renal Physiol. Biochem.* 16: 6-14.

Dustin P. (1981)
Tubulines et microtubules: quelques problèmes actuels. *Ann. Biol.* 20(2): 141-159.

Dustin P., Brion J.-P. & Flament-Durand J. (1992)
What's new in the pathology of neuronal cytoskeleton: the significance of neurofibrillary tangles. *Pathol. Res. Pract.* 188: 248-253.

Echalier (1968)
Syllabus du cours de Biologie Animale, P. Devos .

Eichenlaub-Ritter U. & Tucker J.B. (1984)
Microtubules with more than 13 protofilaments in the dividing nuclei of ciliates. *Nature* 307: 60-62.

Euteneuer U. & McIntosh J.R. (1981)
Structural polarity of kinetochore mictotubules in PtK_1 cells. *J. Cell Biol.* 89: 338-345.

Evans R.M. & Hollenberg S.M. (1988)
Zinc fingers: gilt by association. *Cell* 52: 1-3.

Farrell K.W., Jordan M.A., Miller H.P. & Wilson L. (1987)
Phase dynamics at microtubule ends: the coexistence of microtubule length changes and treadmilling. *J. Cell Biol.* 104: 1035-1046.

Flemming W. (1879)
Zur kenntnis der zelle und ihrer lebenserscheinungen. *Arch. Mikros. Anat.* 16: 302-436.

Flik G., Fenwick J.C., Kolar Z., Mayer-Gostan N. & Wendelaar Bonga S.E. (1985)
Whole-body calcium flux rates in cichlid teleost fish *Oreochromis mossambicus* adapted to freshwater. *Am. J. Physiol.* 249: R432-R437.

Flik G. & Verbost P.M. (1993)
Calcium transport in fish gills and intestine. *J. Exp. Biol.* 184: 17-29.

Flik G., Van Der Velden J.A., Dechering K.J., Verbost P.M., Schoemakers T.J.M., Kolar Z.I. & Wendelaar Bonga S.E. (1993)
Ca^{2+} and Mg^{2+} transport in gills and gut of tilapia *Oreochromis mossambicus:* a review . *J. Exp. Zool.* 265: 356-365.

Foisner R., Feldman B., Sander L. & Wiche G. (1991)
Monoclonal antibody mapping of structural and functional plectin epitopes. *J. Cell Biol.* 112: 397-405.

Folmar L.C. & Dickhoff W.W. (1980)
The parr-smolt transformation (smoltification) and seawater adaptation in salmonids. A review of selected literature. *Aquaculture* 21: 1-37.

Franke W.W., Cowin P., Schmelz M. & Kapprell H.-P. (1987)
The desmosomal plaque and the cytoskeleton. *CIBA Fund. Symp.* 125: 26-44.

Friederich E., Huet C., Arpin M. & Louvard D. (1989)
Villin induces microvilli growth and actin redistribution in transfected fibroblasts. *Cell* 59: 461-475.

Fuchs E. & Weber K. (1994)
Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 345-382.

Georgatos S.D. & Blobel G. (1987)
Lamin B constitutes an intermediate filament attachment site at the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* 185: 117-125.

Georgatos S.D., Weaver D.C. & Marchesi V.T. (1985)
Site specificity in vimentin-membrane interactions: intermediate filament subunits associate with the plasma membrane via their head domains. *J. Cell Biol.* 100: 1962-1967.

Gill T.S., Bianchi C.P. & Epple A. (1992)
A trace metal (Cu and Zn) adaptation of organ systems of the american eel, *Anguilla rostrata. Comp. Biochem. Physiol.* 102c: 361-371.

Goss G.G., Perry S.F. & Laurent P. (1992)
Mechanisms of ion and acid-base regulation at the gills of freshwater fish. *J. Exp. Zool.* 263: 143-159.

Griepp E.B., Robbins E.S., Dolan W.J. & Sabatini D.D. (1981)
Role of microfilaments in tight junction formation. *J. Cell Biol.* 91: 118a.

Haimo L.T., Telzer B.R. & Rosenbaum J.L. (1979)
Dynein binds to and crossbridges cytoplamsic microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5759-5763.

Hammerton R.W., Krzeminski K.A., Mays R.W., Ryan T.A., Wollner D.A. & Nelson W.J. (1991)
Mechanism for regulating cell surface distribution of Na^+, K^+ -ATPase in polarized epithelial cells. *Science* 254: 847-850.

Harris A.S. & Morrow J.S. (1990)
Calmodulin and calcium-dependent protease 1 coordinately regulate the interaction of fodrin with actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 15754-15761.

Hartwig J.H., Chambers K.A. & Stossel T.P. (1989)
Association of gelsolin with actin filaments and cell membranes of macrophages and platelets. *J. Cell Biol.* 108: 467-479.

Hawkins M., Pope B., Maciver S.K. & Weeds A.G. (1993)
Human actin depolymerizing factor mediates a pH-sensitive destruction of actin filaments. *Biochemistry* 32: 9985-9993.

Heidemann S.R. & McIntosh J.R. (1980)
Visualization of the structural polarity of mictotubules. *Nature* 286: 517-519.

Hew K.W., Heath G.L., Jiwa A.H. & Welsh M.J. (1993)
Cadmium in vivo causes disruption of tight junction-associated microfilaments in rat sertoli cells. *Biol. Reprod.* 49: 840-849.

Hill A.M., Cassoly R., Chetrite G. & Pantalon D. (1985)
High molecular weight microtubule-associated proteins from pig brain are immunologically related to human erythrocyte membrane protein spectrin, ankyrin, protein 4.1 and 4.2. *Biol. Cell* 53: 141-148.

Hitt A.L. & Luna E.J. (1994)
Membrane interactions with the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 120-130.

Hoar W.S. (1988)
The physiology of smolting salmonids. In : "Fish Physiology, Vol. XI, Part B", Hoar, W.S. & Randall, D.J., eds.); Academic Press, Inc., Orlando, San Diego, San Francisco, New York, London, Toronto, Montreal, Sydney, pp.275-343.

Hootman S.R. & Philpott C.W. (1980)
Accessory cells in teleost branchial epithelium. *Am. J. Physiol.* 238: R199-R206.

Horio T. & Hotani H. (1986)
Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy. *Nature* 321: 605-607.

Hossler F.E. (1980)
Gill arch of the mullet, *Mugil cephalus*. III. Rate of response to salinity change. *Am. J. Physiol.* 238: R160-R164.

Hugues G.M. (1984)
General Anatomy of the gills. In : " Fish Physiology, Vol X, Part A", Hoar, W.S. & Randall, D.J., eds.); Academic Press, Inc., Orlando, San Diego, San Francisco, New York, London, Toronto, Montreal, Sydney, pp.1-72.

Janmey P.A. (1994)
Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. *Annu. Rev. Physiol.* 56: 169-191.

Kabsch W., Mannherz H.G., Suck D., Pai E.F. & Holmes K.C. (1990)
Atomic structure of the actin: DNase I complex. *Nature* 347: 37-49.

Kaiser H.W., O'Keefe E. & Bennett V. (1989)
Adducin: Ca^{++}-dependent association with sites of cell-cell contact. *J. Cell Biol.* 109: 557-569.

Karinch A.M., Zimmer W.E. & Goodman S.R. (1990)
The identification and sequence of the actin-binding domain of human red blood cell β-spectrin. *J. Biol. Chem.* 265: 11833-11840.

Karnaky K.J.,Jr, Degnan K.J., Garretson L.T. & Zadunaisky J.A. (1984)
Identification and quantification of mitochondria-rich cells in transporting epithelia. *Am. J. Physiol.* 246: R770-R775.

Karnovsky M.J. (1971)
Use of ferrocyonide-reduced osmium tetroxide in electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 284: 146.

Keith C., DiPaola M., Maxfield R. & Shelanski M.L. (1983)
Microinjection of Ca^{++}-calmodulin causes a localized depolymerization of microtubules. *J. Cell Biol.* 97: 1918-1924.

King J.A., Abel D.C. & DiBona D.R. (1989)
Effects of salinity on chloride cells in the euryhaline cyprinodontid fish *Rivulus marmoratus*. *Cell Tissue Res.* 257: 367-377.

Kinne-Saffran E., Hülseweh M., Pfaff Ch. & Kinne R.K.H. (1993)
Inhibition of Na, K-ATPase by cadmium: different mechanisms in different species. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 121: 22-29.

Korn E.D., Carlier M.-F. & Pantaloni D. (1987)
Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science* 238: 638-644.

Langanger G., De Mey J., Moeremans M., Daneels G., De Brabander M. & Small J.V. (1984)
Ultrastructural localization of α-actinin and filamin in cultured cells wiht the immunogold staining (IGS) method. *J. Cell Biol.* 99: 1324-1334.

Laurent P. & Dunel S. (1980)
Morphology of gill epithelia in fish. *Am. J. Physiol.* 238: R147-R159.

Laurent P. & Hebibi N. (1989)
Gill morphometry and fish osmoregulation. *Can. J. Zool.* 67: 3055-3063.

Laurent P. & Perry S.F. (1990)
Effects of cortisol on gill chloride cell morphology and ionic uptake in the freshwater trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Res.* 259: 429-442.

Laws E.A. (1993)
Aquatic pollution : an introductory text. (ed 2nd). New York, 9999.

Leblanc G. & Prignon C. (1993)
La réintroduction du saumon atlantique dans le bassin de la Meuse. Projet "Meuse Saumon 2000". *Document réalisé dans le cadre d'un stage avec l'Agence Québec-Wallonie* 13 p.

Lee Y.C. & Wolff J. (1984)
The calmodulin-binding domain on microtubule-associated protein 2. *J. Biol. Chem.* 259: 8041-8044.

Lee Y.C. & Wolff J. (1984)
Calmodulin binds to both microtubule-associated protein 2 and τ proteins. *J. Biol. Chem.* 259: 1226-1230.

Leterrier J.-F., Liem R.K.H. & Shelanski M.L. (1981)
Preferential phosphorylation of the 150,000 molecular weight component of neurofilaments by a cyclic AMP-dependent microtubule-associated protein kinase. *J. Cell Biol.* 90: 755-760.

Lin H.-C. & Dunson W.A. (1993)
The effect of salinity on the acute toxicity of cadmium to the tropical, estuarine, hermaphroditic fish, *Rivulus marmoratus* : a comparison of Cd, Cu, and Zn tolerance with *Fundulus heteroclitus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 25: 41-47.

Léna J.Y., Bamburg J.R., Rabié A. & Faivre-sarrailh C. (1991)
Actin-depolymerizing factor (ADF) in the cerebellum of the developing rat: A quantitative and immunocytochemical study. *J. Neurosci. Res* 30: 18-27.

Madara J.L., Barenberg D. & Carlson S. (1986)
Effects of cytochalasin D on occluding junctions of intestinal absorptive cells: further evidence that the cytoskeleton may influence paracellular permeability and junctional charge selectivity. *J. Cell Biol.* 102: 2125-2136.

Maetz J. (1971)
Fish gills : mechanisms of salt transfer in fresh water and sea water. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B.* 262: 209-249.

Maetz J. & Pic P. (1977)
Microtubules in the "chloride cell" of the gill and disruptive effects of colchicine on the salt balance of the seawater adapted *Mugil capito* . *J. Exp. Zool.* 199: 325-338.

Manfredi J.J., Parness J. & Horwitz S.B. (1982)
Taxol binds to cellular microtubules. *J. Cell Biol.* 94: 688-696.

Marcum J.M., Dedman J.R., Brinkley B.R. & Means A.R. (1978)
Control of microtubule assembly-disassembly by calcium-dependent regulator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3771-3775.

Marrs J.A., Napolitano E.W., Murphy-Erdosh C., Mays R.W., Reichardt L.F. & Nelson W.J. (1993) Distinguishing roles of the membrane-cytoskeleton and cadherin mediated cell-cell adhesion in generating different Na^+,K^+-ATPase distributions in polarized epithelia. *J. Cell Biol.* 123: 149-164.

McNiven M.A., Wang M. & Porter K.R. (1984)
Microtubule polarity and the direction of pigment transport reverse simultaneously in surgically severed melanophore arms. *Cell* 37: 753-756.

Meza I., Sabanero M., Cereijido M. & Snabes M. (1981)
Relationship between microfilaments and occluding junctions. *J. Cell Biol.* 91: 106a (Abstract).

Mitchison T. & Kirschner M. (1984a)
Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature* 312: 232-237.

Mitchison T. & Kirschner M. (1984b)
Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312: 237-242.

Mooseker M.S., Coleman T.R. & Conzelman K.A. (1986)
Calcium and the regulation of cytoskeletal assembly, structure and contractility. *CIBA Fund. Symp.* 122: 232-251.

Morgan T.E., Lockerbie R.O., Minamide L.S., Browning M.D. & Bamburg J.R. (1993)
Isolation and characterization of a regulated form af actin depolymerizing factor. *J. Cell Biol.* 122: 623-633.

Nelson W.N., Hammerton R.W. & McNeill H. (1990)
Role of the membrane-cytoskeleton in the spatial organization of the Na,K-ATPase in polarized epithelial cells. New York, The Rockefeller University Press, pp 77-87.

Pardee J.D., Simpson P.A., Stryer L. & Spudich J.A. (1982)
Actin filaments undergo limited subunit exchange in physiological salt conditions. *J. Cell Biol.* 94: 316-324.

Payan P., Girard J.P. & Mayer-Gostan N. (1984)
Branchial ion movements in teleosts: the roles of respiratory and chloride cells. In : " Fish Physiology", Hoar, W.S. & Randall, D.J., eds.); Academic Press, Inc., Orlando, San Diego, San Francisco, New York, London, Toronto, Montreal, Sydney, pp.39-64.

Perry S.F. & Flik G. (1988)
Characterization of branchial transepithelial calcium fluxes in freshwater trout, *Salmo gairdneri. Am. J. Physiol.* 254: R491-R498.

Philippart J.-Cl. (1988)
Le saumon. *Environnement,4/88* , 16 p.

Philpott C.W. (1980)
Tubular system membranes of teleost chloride cells: osmotic response and transport sites. *Am. J. Physiol.* 238: R171-R184.

Pic P. & Lahitette P. (1981)
Effects of cytochalasin B on water, Na^+ and Cl^- exchanges in the gill of seawater adapted mullet *Mugil capito. J. Comp. Physiol.* 141: 523-529.

Pisam M. (1981)
Membranous systems in the "chloride cell" of teleostean fish gill, their modifications in response to the salinity of the environment. *Anat. Rec.* 200: 401-414.

Pisam M., Auperin B., Prunet P., Rentier-Delrue F., Martial J. & Rambourg A. (1993)
Effects of prolactin on α and β chloride cells in the gill epithelium of the saltwater adapted Tilapia "Oreochromis niloticus". *Anat. Rec.* 235: 275-284.

Pisam M., Caroff A. & Rambourg A. (1987)
Two types of chloride cells in the gill epithelium of a freshwater-adapted euryhaline fish: *Lebistes reticulatus* ; their modifications during adaptation to saltwater. *Am. J. Anat.* 179: 40-50.

Pisam M., Prunet P., Boeuf G. & Rambourg A. (1988)
Utrastructural features of chloride cells in the gill epithelium of the atlantic salmon, *Salmo salar* , and their modifications during smoltification. *Am. J. Anat.* 183: 235-244.

Pisam M., Prunet P. & Rambourg A. (1989)
Accessory cells in the gill epithelium of the freshwater rainbow trout *Salmo gairdneri* . *Am. J. Anat.* 184: 311-320.

Pisam M. & Rambourg A. (1991)
Mitochondria-rich cells in the gill epithelium of teleost fishes: an ultrastructural approach. *Int. Rev. Cytol.* 130: 191-232.

Pisam M., Sardet C. & Maetz J. (1980)
Polysaccharidic material in chloride cell of teleostean gill: modifications according to salinity. *Am. J. Physiol.* 238: R213-R218.

Porter K.R. & Tucker J. (1981)
The ground substance of the living cell. *Sci. Am.* 244: 57-67.

Pratap H.B., Fu H., Lock R.A.C. & Wendelaar Bonga S.E. (1989)
Effect of waterborne and dietary cadmium on plasma ions of the teleost *Oreochromis mossambicus* in relation to water calcium levels. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18: 568-575.

Pratap H.B. & Wendelaar Bonga S.E. (1993)
Effect of ambient and dietary cadmium on pavement cells, chloride cells, and Na^+/K^+-ATPase activity in the gills of the freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* at normal and high calcium levels in the ambient water. *Aquat. Toxicol.* 26: 133-150.

Pratt L.F. & Cleveland D.W. (1988)
A survey of the α-tubulin gene family in chicken: unexpected sequence heterogeneity in the polypeptides encoded by five expressed genes. *EMBO J.* 7: 931-340.

Prunet P., Pisam M., Claireaux J.P., Bouteille M. & Rambourg A. (1994)
Effects of growth hormone on gill chloride cells in juvenile atlantic salmon (*Salmo salar*). *Am. J. Physiol.* 266: R850-R857.

Repasky E.A., Granger B.L. & Lazarides E. (1982)
Widespread occurrence of avian spectrin in nonerythroid cells. *Cell* 29: 821-833.

Sammak P.J. & Borisy G.G. (1988)
Direct observation of microtubule dynamics in living cells. *Nature* 332: 724-726.

Sardet C., Pisam M. & Maetz J. (1979)
The surface epithelium of teleostean fish gills. Cellular and junctional adaptations of the chloride cell in relation to salt adaptation. *J. Cell Biol.* 80: 96-117.

Schliwa M. (1976)
The role of divalent cations in the regulation of microtubule assembly. *J. Cell Biol.* 70: 527-540.

Schliwa M. (1986)
The cytoskeleton. An Introductory survey. Cell Biology Monographs, vol. 13. Wien, New York, Springer Verlag.

Schliwa M., Ezzell R.M. & Euteneuer U. (1984)
Erythro-9-[3-(2-Hydroxynonyl)]adenine is an effective inhibitor of cell motility and actin assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6044-6048.

Schliwa M., Van Blerkom J. & Porter K.R. (1981)
Stabilization of the cytoplasmic ground substance in detergent-opened cells and a structural and biochemical analysis of its compostion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4329-4333.

Schulze E. & Kirschner M. (1987)
Dynamic and stable populations of microtubules in cells. *J. Cell Biol.* 104: 277-288.

Shephard K.L. (1981)
The activity and characteristics of the Ca^{2+}ATPase of fish gills in relation to environmental calcium concentrations. *J. Exp. Biol.* 90: 115-121.

Sobue K. & Sellers J.R. (1991)
Caldesmon, a novel regulatory protein in smooth and nonmuscle actomyosin systems. *J. Biol. Chem.* 266: 12115-12118.

Steinert P.M., Jones J.C.R. & Goldman R.D. (1984)
Intermediate filaments. *J. Cell Biol.* 99: 22s-27s.

Steinert P.M. & Liem R.K.H. (1990)
Intermediate filament dynamics. *Cell* 60: 521-523.

Steinert P.M., Steven A.C. & Roop D.R. (1985)
The molecular biology of intermediate filaments. *Cell* 42: 411-419.

Stolz B. & Bereiter-Hahn J. (1988)
Increase of cytosolic calcium results in formation of F-actin aggregates in endothelial cells. *Cell. Biol. Int. Reports* 12: 321-329.

Stossel T.P. (1989)
From signal to pseudopod. How cells control cytoplasmic actin assembly. *J. Biol. Chem.* 264: 18261-18264.

Stossel T.P. (1994)
Comment les cellules se déplacent. *Pour la Science* 205: 62-70.

Takei Y. (1993)
Role of peptide hormones in fish osmoregulation. In : "Fish Ecophysiology", Rankin, J.C. & Jensen, F.B., eds.); Chapman & Hall, London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, pp.136-160.

Thomas D.G., Cryer A., Solbe J.F.de L.G. & Kay J. (1983)
A comparison of the accumulation and protein binding of environmental cadmium in the gills, kidney and liver of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Comp. Biochem. Physiol.* 76c: 241-246.

Tilney L.G., Bryan J., Bush D.J., Fujiwara K., Mooseker M.S., Murphy D.B. & Snyder D.H. (1973)
Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *J. Cell Biol.* 59: 267-275.

Towle D.W. (1990)
Sodium transport systems in gills. In : "Comparative Aspects of Sodium Cotransport Systems", Kinne, R.K.H., ed.); Karger, Basel, München, Paris, London, New York, New Dehli, Bangkok, Singapore, Tokyo, S, pp.241-263.

Traub P. & Nelson W.J. (1981)
Occurrence in various mammalian cells and tissues of the Ca^{2+}-activated protease specific for the intermediate-sized filament proteins vimentin and desmin. *Eur. J. Cell Biol.* 26: 61-67.

Trump B.F., Penttila A. & Berezesky I.K. (1979)
Studies on cell surface conformation following injury. I. Scanning and transmission electron microscopy of cell surface changes following P-chloromercuribenzene sulfonic acid (PCMBS)-induced injury of Ehrlich ascites tumor cells. *Virchows Archiv. B Cell Path.* 29: 281-296.

Ursitti J.A. & Wade J.B. (1993)
Ultrastructure and immunocytochemistry of the isolated human erythrocyte membrane skeleton. *Cell Motil. Cytoskeleton* 25: 30-42.

Valentin-Ranc C. & Carlier M.-F. (1991)
Role of ATP-bound divalent metal ion in the conformation and function of actin. Comparison of Mg-ATP, Ca-ATP, and metal ion-free ATP-actin. *J. Biol. Chem.* 266: 7668-7675.

Veldhuizen-Tsoerkan M.B., Van Der Mast C.A. & Holwerda D.A. (1991)
Short-term exposure to cadmium modifies phosphorylation of gill proteins in the sea mussel. *Comp. Biochem. Physiol.* 100b: 475-480.

Veldhuizen-Tsoerkan M.B., Van Der Mast C.A. & Holwerda D.A. (1992)
Cadmium-induced changes in macromolecular synthesis at transcriptional and translational level in gill tissue of sea mussels, *Mytilus edulis* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 103c: 411-417.

Verbost P.M., Senden M.H.M.N. & van Os C.H. (1987)
Nanomolar concentrations of Cd^{2+} inhibit Ca^{2+} transport systems in plasma membranes and intracellular Ca^{2+} stores in intestinal epithelium. *Biochim. Biophys. Acta* 902: 247-252.

Verbost P.M., Flik G., Lock R.A.C. & Wendelaar Bonga S.E. (1988)
Cadmium inhibits plasma membrane calcium transport. *J. Membrane Biol.* 102: 97-104.

Verbost P.M., Flik G., Pang P.K.T., Lock R.A.C. & Wendelaar Bonga S.E. (1989)
Cadmium inhibition of the erythrocyte Ca^{2+} pump. A molecular interpretation. *J. Biol. Chem.* 264: 5613-5615.

Verbost P.M., Van Rooij J., Flik G., Lock R.A.C. & Wendelaar Bonga S.E. (1989)
The movement of cadmium through freshwater trout branchial epithelium and its interference with calcium transport. *J. Exp. Biol.* 145: 185-197.

Verbost P.M., Lafeber F.P.J.G., Spanings F.A.T., Aarden E.M. & Wendelaar Bonga S.E. (1992)
Inhibition of Ca^{2+} uptake in freshwater carp, *Cyprinus carpio*, during short-term exposure to aluminium. *J. Exp. Zool.* 262: 247-254.

Verde F., Labbé J.C., Dorée M. & Karsenti E. (1990)
Regulation of microtubule dynamics by cdc2 protein kinase in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *Nature* 343: 233-238.

Voter W.A. & Erickson H.P. (1984)
The kinetics of microtubule assembly. Evidence for a two-stage nucleation mechansim. *J. Biol. Chem.* 259: 10430-10438.

Wedemeyer G.A., Saunders R.L. & Clarke W.G. (1980)
Environmental factors affecting smoltification and early marine survival of anadromous salmonids. *Mar. Fish. Rev.* 1-14.

Wolosewick J.J. & Porter K.R. (1979)
Microtrabecular lattice of the cytoplasmic ground substance. Artefact or reality. *J. Cell Biol.* 82: 114-139.

Wulf E., Deboben A., Bautz F.A., Faulstich H. & Wieland Th. (1979)
Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4498-4502.

Yen T.J., Machlin P.S. & Cleveland D.W. (1988)
Autoregulated instability of β-tubulin mRNAs by recognition of the nascent amino terminus of β-tubulin. *Nature* 334: 580-585.

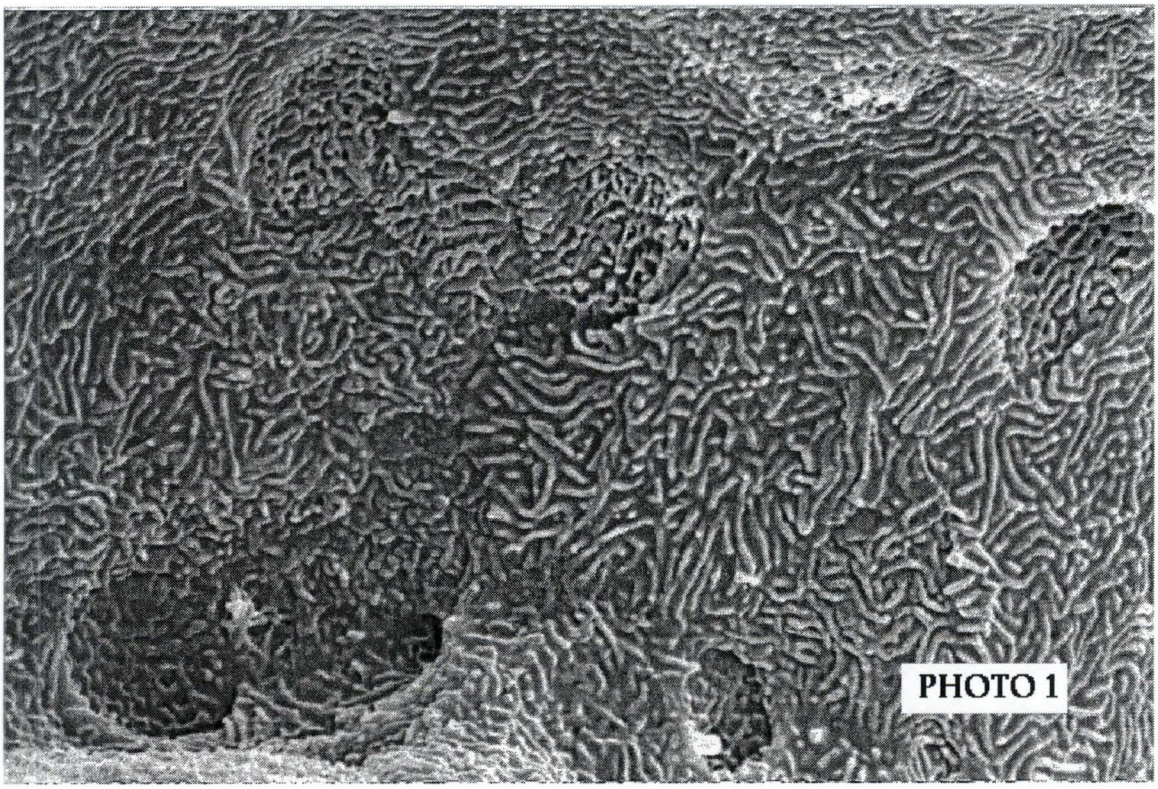
Zamansky G.B., Nguyen U. & Chou I.N. (1991) An immunofluorescence study of the calcium-induced coordinated reorganization of microfilaments, keratin intermediate filaments, and microtubules in cultured human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 97: 985-994.

Zheng Y., Jung M.K. & Oakley B.R. (1991)
γ-tubulin is present in *Drosophilia melanogaster* and *Homo sapiens* and is associated with the centrosome. *Cell* 65: 817-823.

Annexe

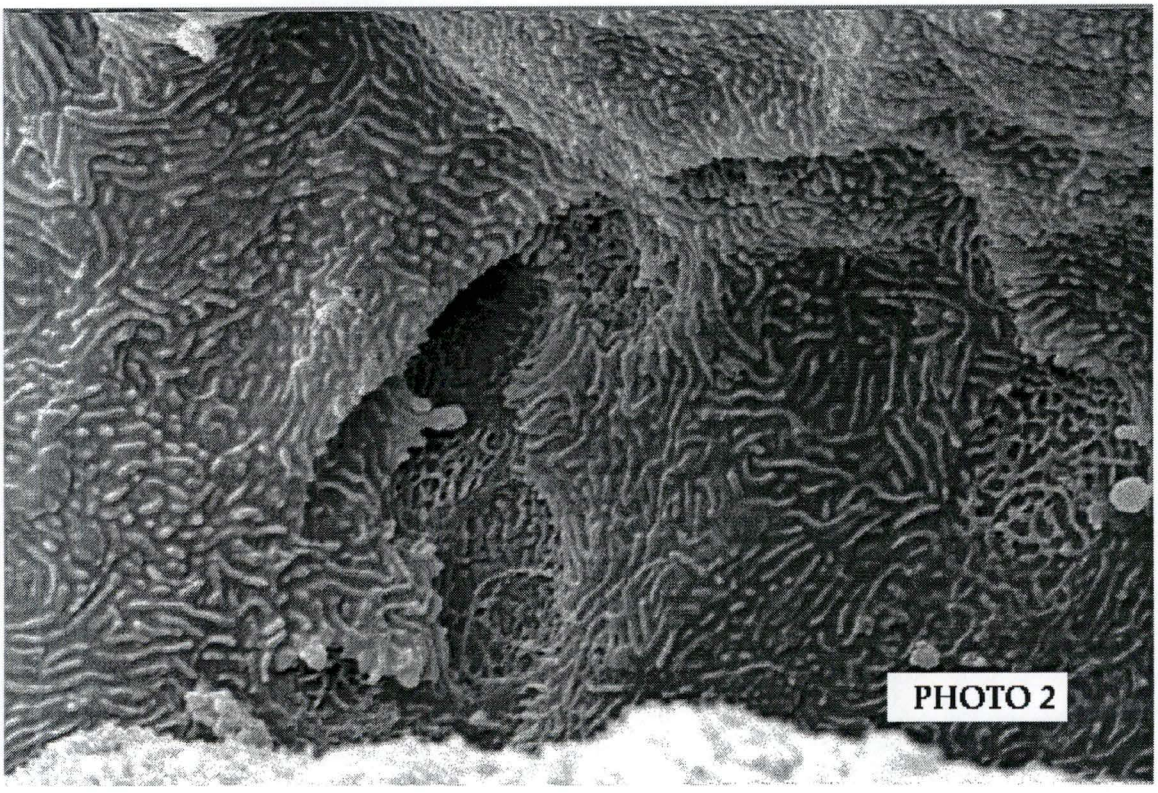
Photographie de microscopie électronique à balayage (SCAN) utilisée pour le calcul des surfaces cellulaires et des densités de cellules à chlorure. localisées sur les filaments primaires (X 5333)

Saumon non traité:



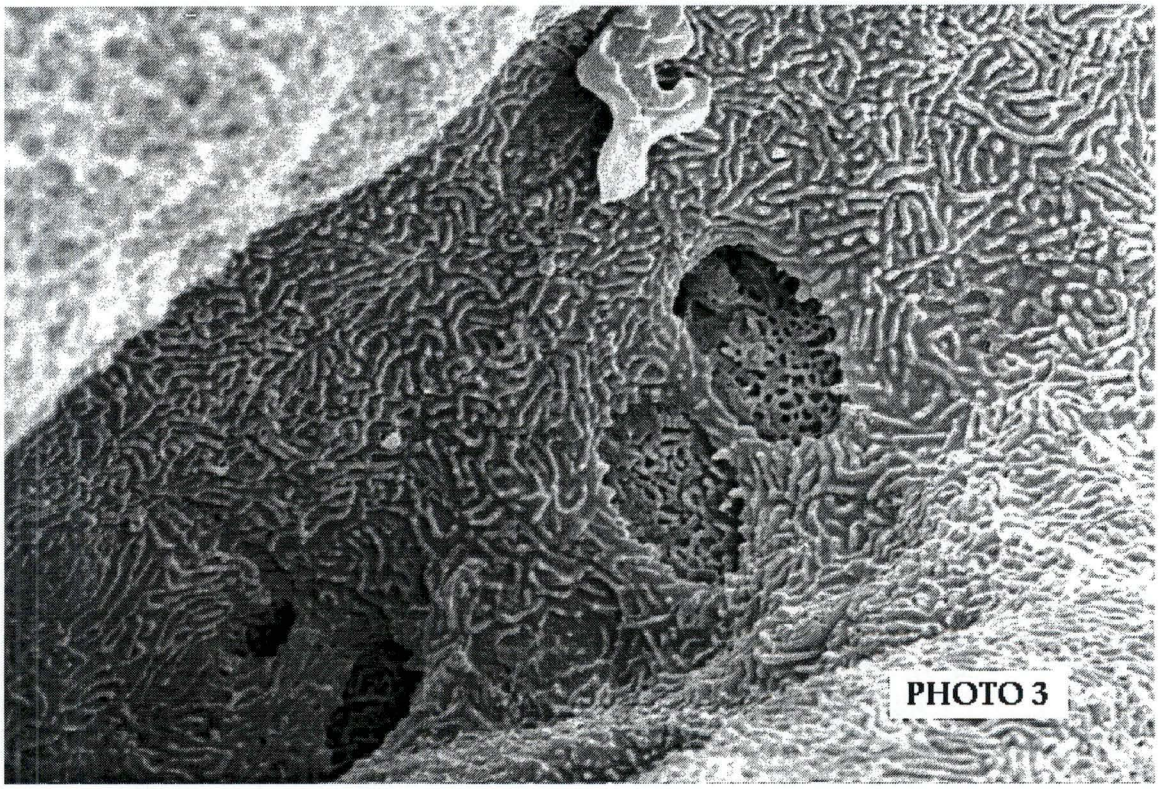
Photographie de microscopie électronique à balayage (SCAN) utilisée pour le calcul des surfaces cellulaires et des densités de cellules à chlorure. localisées sur les filaments primaires (X 5333)

Saumon non traité:



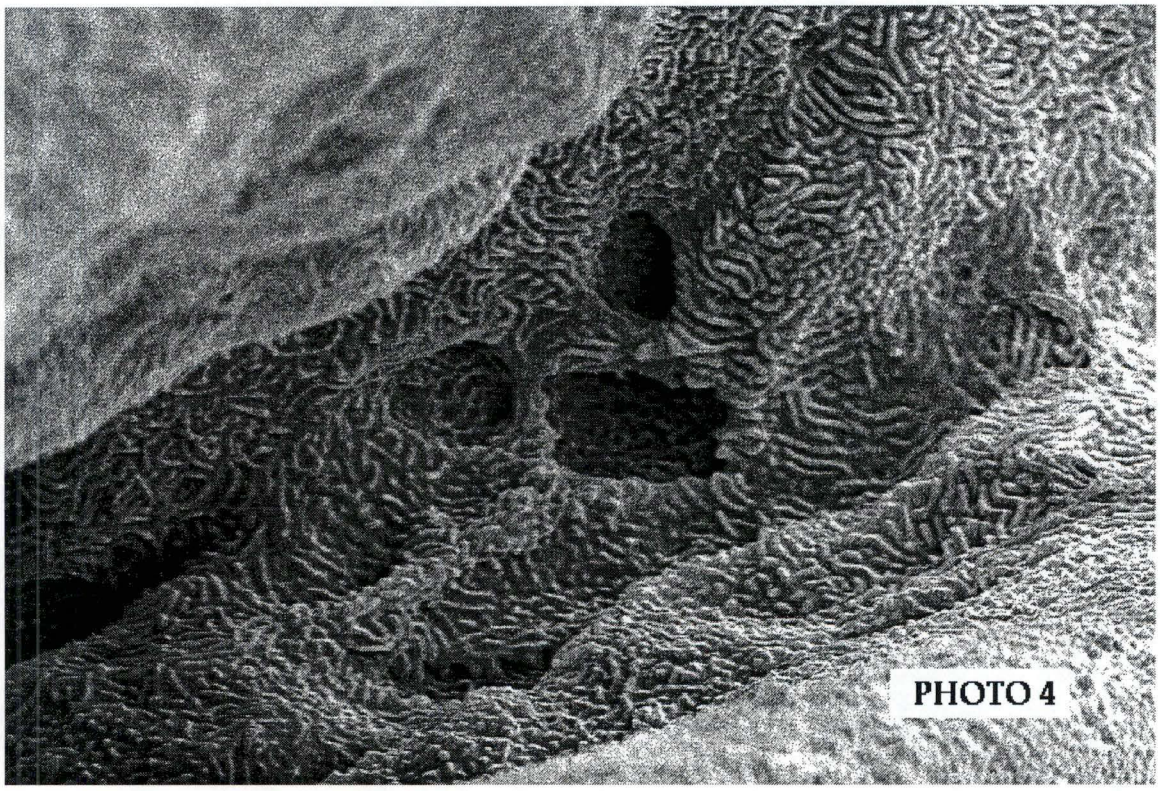
Photographie de microscopie électronique à balayage (SCAN) utilisée pour le calcul des surfaces cellulaires et des densités de cellules à chlorure. localisées sur les filaments primaires (X 5333)

Saumon non traité:



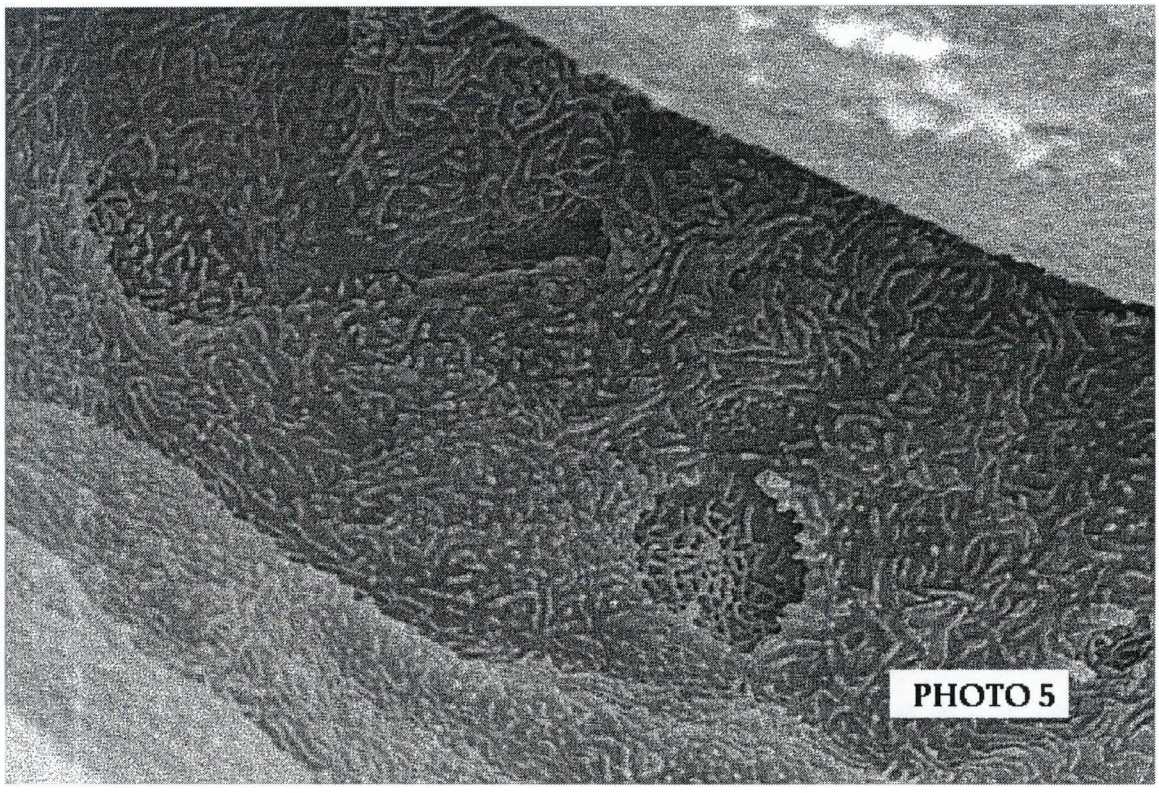
Photographie de microscopie électronique à balayage (SCAN) utilisée pour le calcul des surfaces cellulaires et des densités de cellules à chlorure. localisées sur les filaments primaires (X 5333)

Saumon non traité:



Photographie de microscopie électronique à balayage (SCAN) utilisée pour le calcul des surfaces cellulaires et des densités de cellules à chlorure. localisées sur les filaments primaires (X 5333)

Saumon non traité:



Photographie de microscopie électronique à balayage (SCAN) utilisée pour le calcul des surfaces cellulaires et des densités de cellules à chlorure. localisées sur les filaments primaires (X 5333)

Saumon non traité:

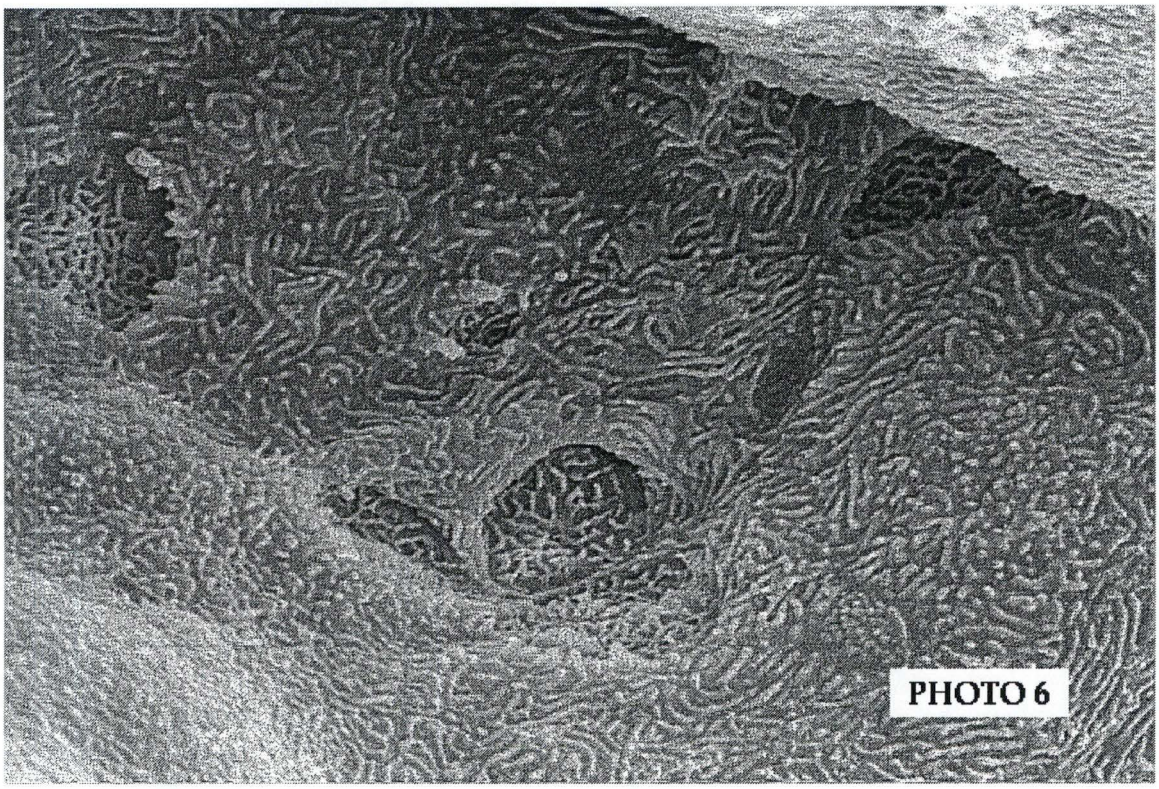
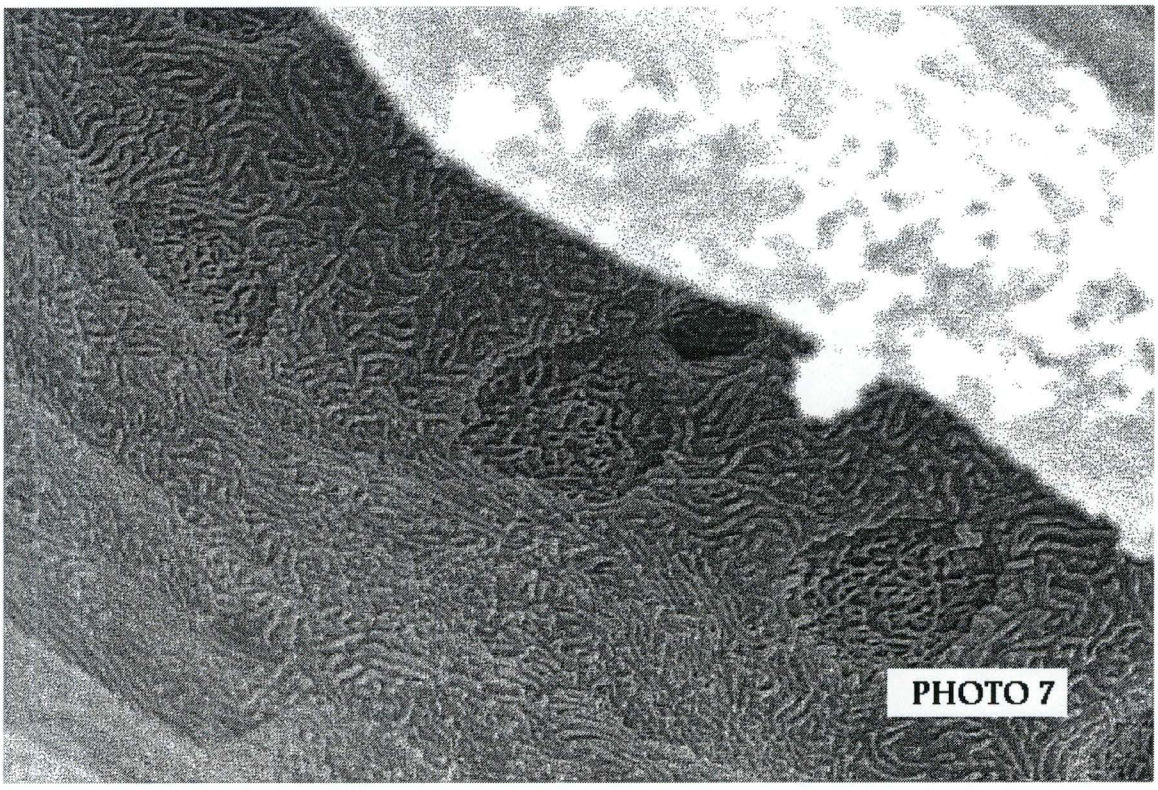


PHOTO 6

Photographie de microscopie électronique à balayage (SCAN) utilisée pour le calcul des surfaces cellulaires et des densités de cellules à chlorure localisées sur les filaments primaires (X 5333)

Saumon non traité:



Photographie de microscopie électronique à balayage (SCAN) utilisée pour le calcul des surfaces cellulaires et des densités de cellules à chlorure localisées sur les filaments primaires (X 5333)

Saumon non traité:

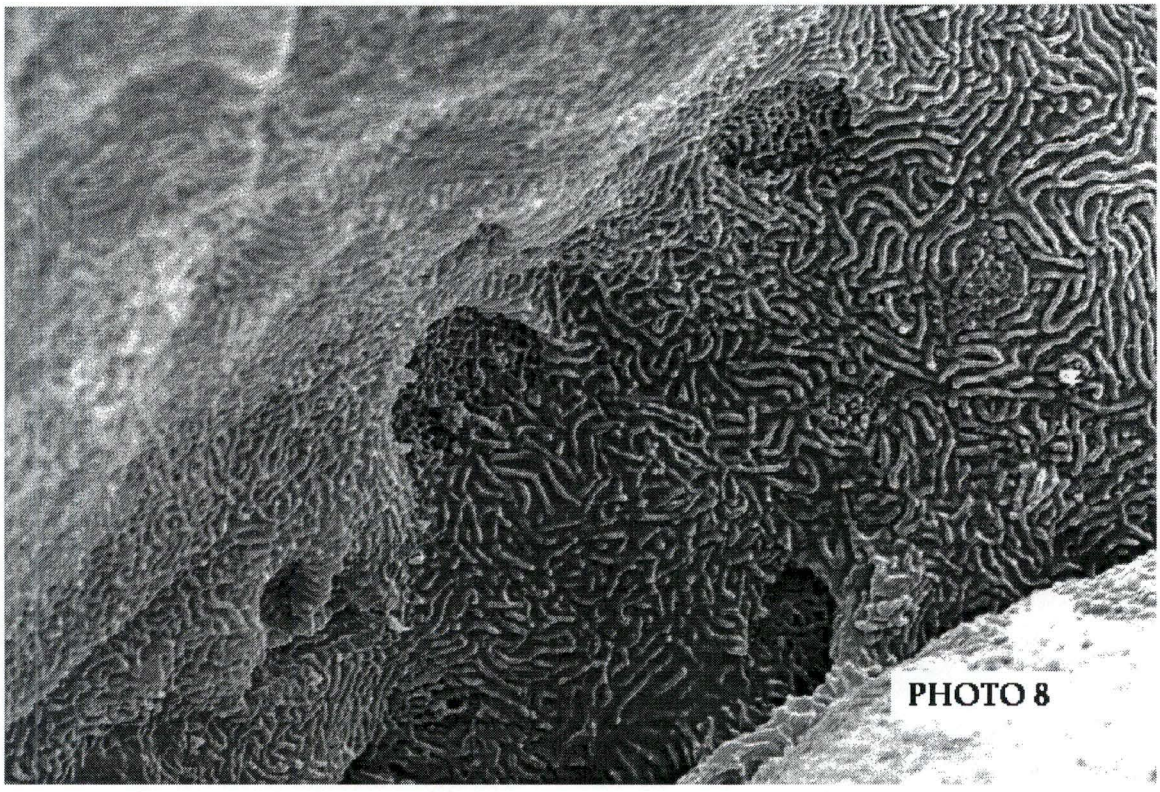


PHOTO 8

Photographie de microscopie électronique à balayage (SCAN) utilisée pour le calcul des surfaces cellulaires et des densités de cellules à chlorure localisées sur les filaments primaires (X 5333)

Saumon non traité:

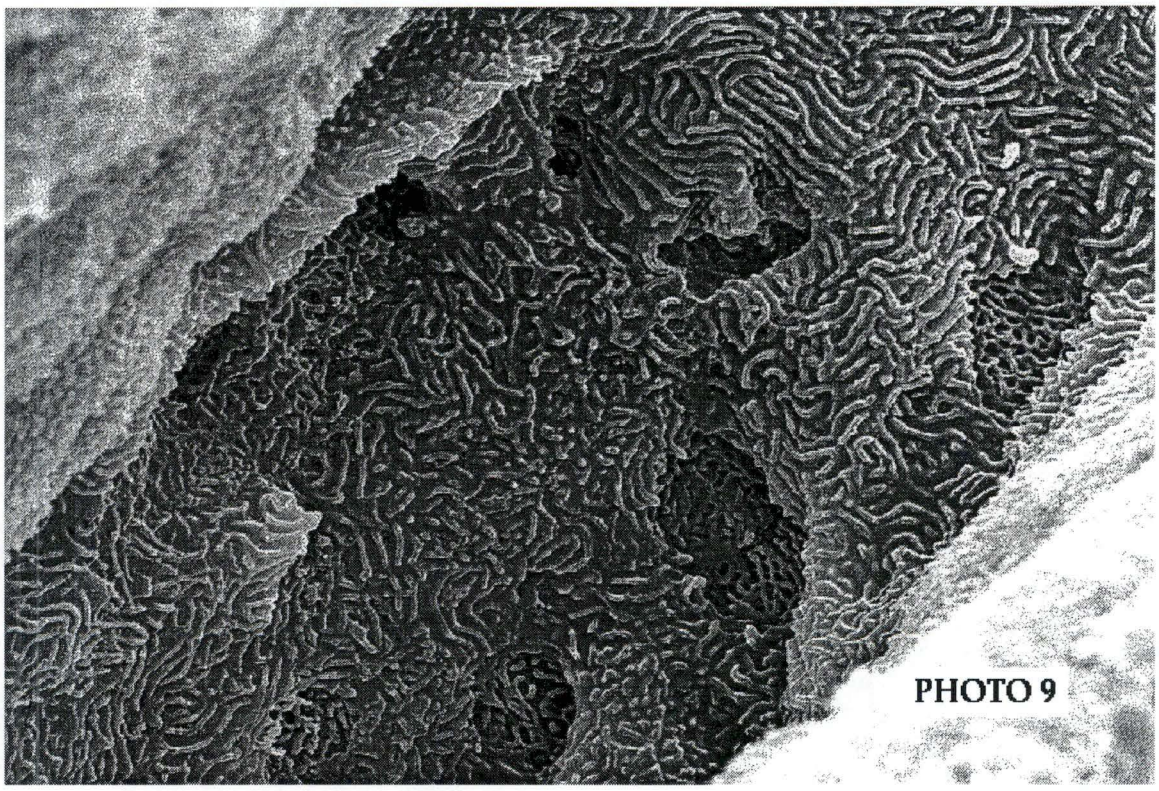


PHOTO 9

Photographie de microscopie électronique à balayage (SCAN) utilisée pour le calcul des surfaces cellulaires et des densités de cellules à chlorure. localisées sur les filaments primaires (X 5333)

Saumon traité au cadmium (10 µg/l) durant 14 jours:

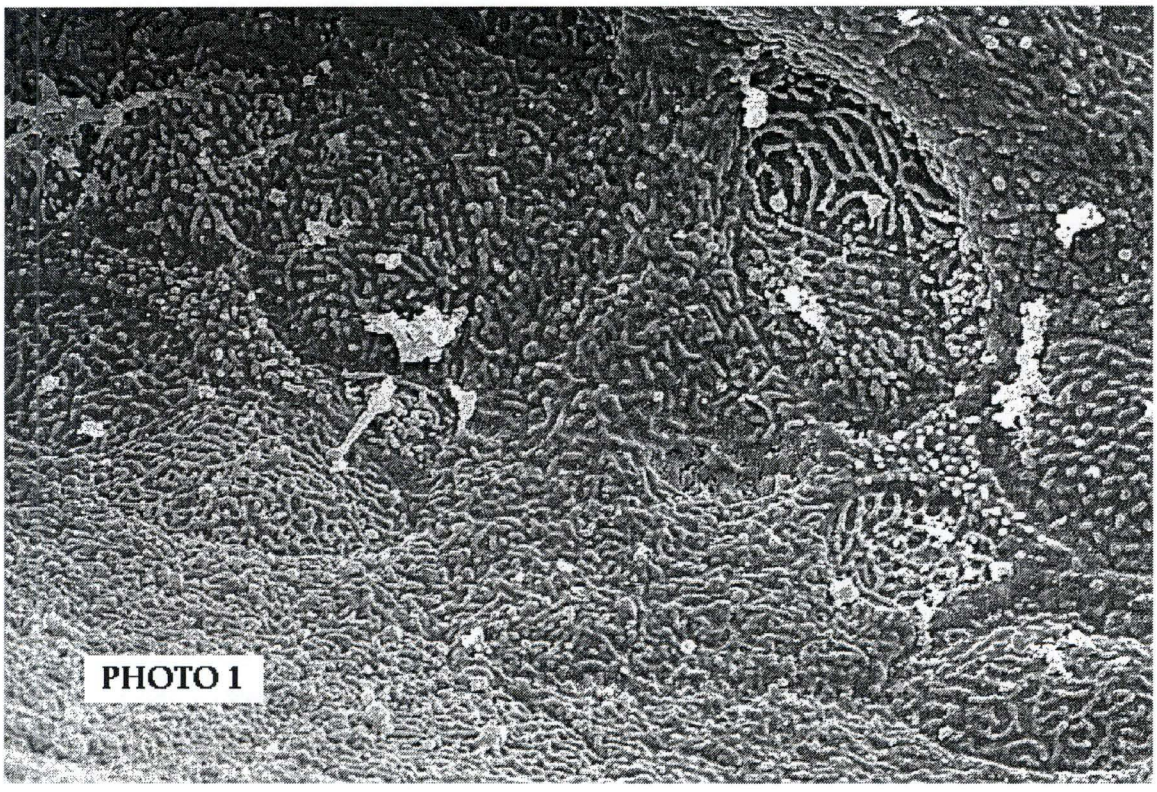
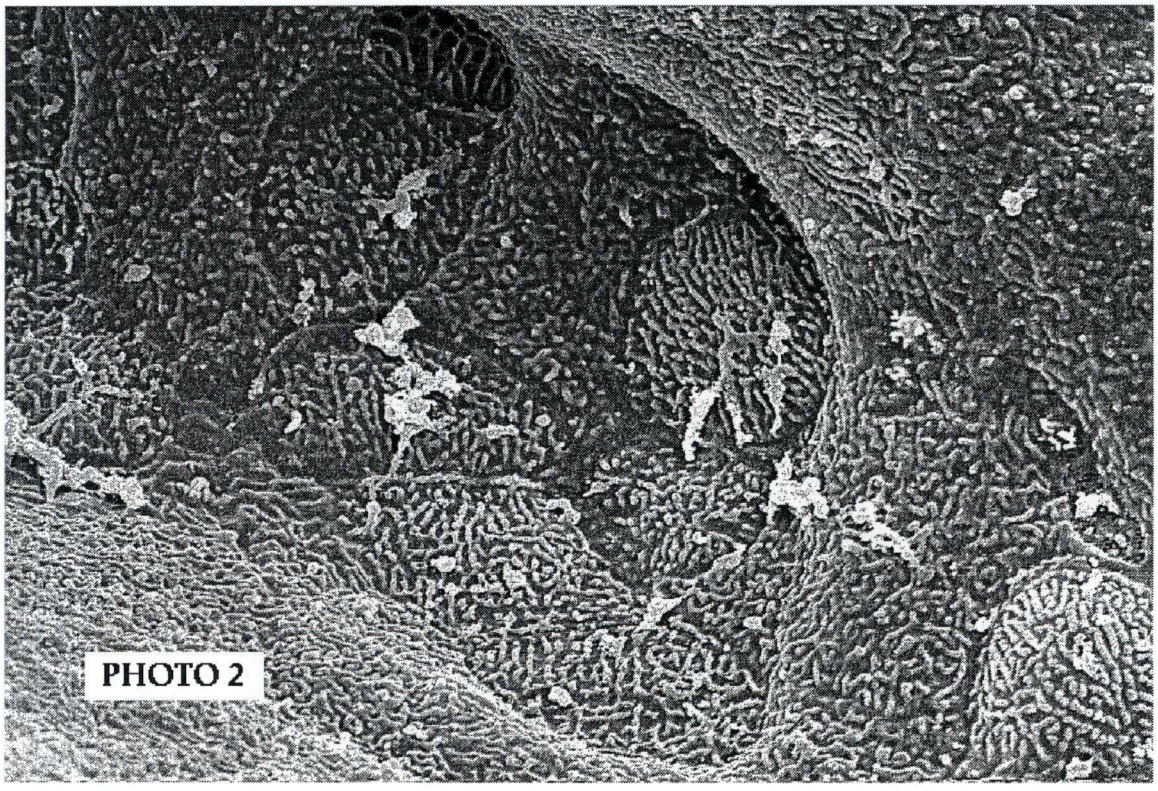


PHOTO 1

Photographie de microscopie électronique à balayage (SCAN) utilisée pour le calcul des surfaces cellulaires et des densités de cellules à chlorure. localisées sur les filaments primaires (X 5333)

Saumon traité au cadmium (10 µg/l) durant 14 jours:



Photographie de microscopie électronique à balayage (SCAN) utilisée pour le calcul des surfaces cellulaires et des densités de cellules à chlorure. localisées sur les filaments primaires (X 5333)

Saumon traité au cadmium (10 µg/l) durant 14 jours:

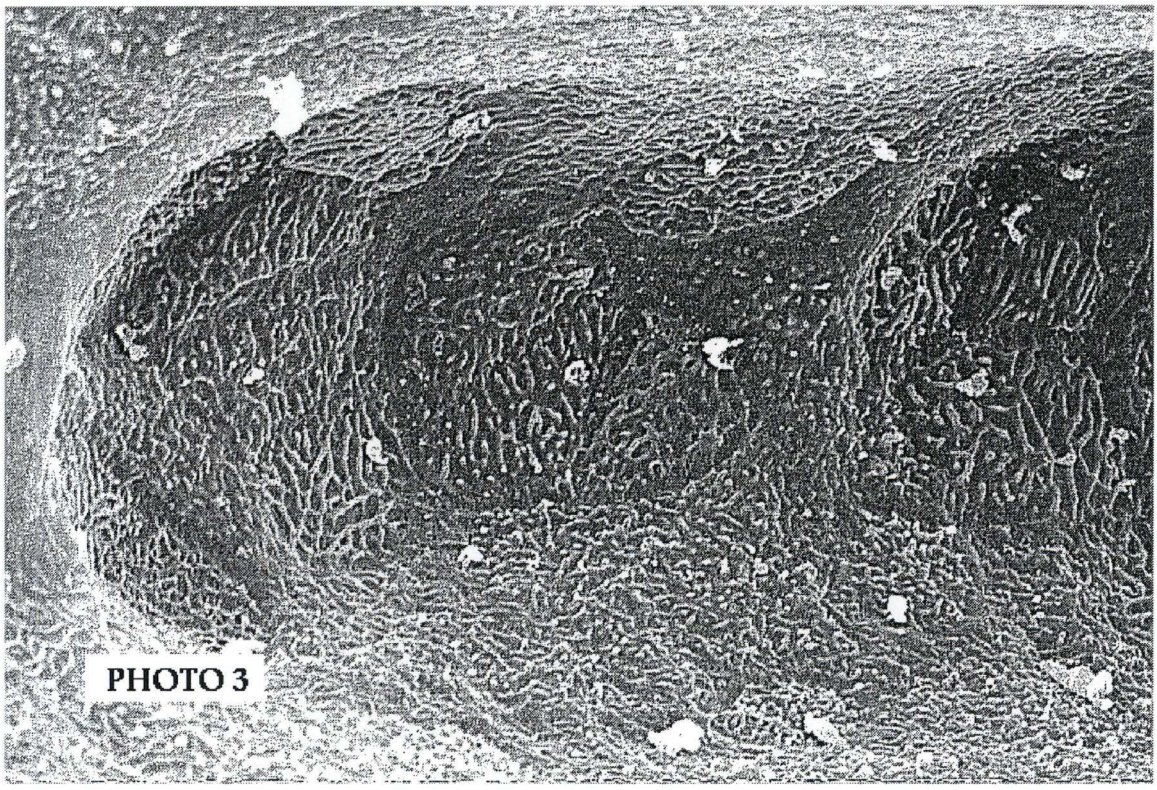


PHOTO 3

Photographie de microscopie électronique à balayage (SCAN) utilisée pour le calcul des surfaces cellulaires et des densités de cellules à chlorure. localisées sur les filaments primaires (X 5333)

Saumon traité au cadmium (10 µg/l) durant 14 jours:

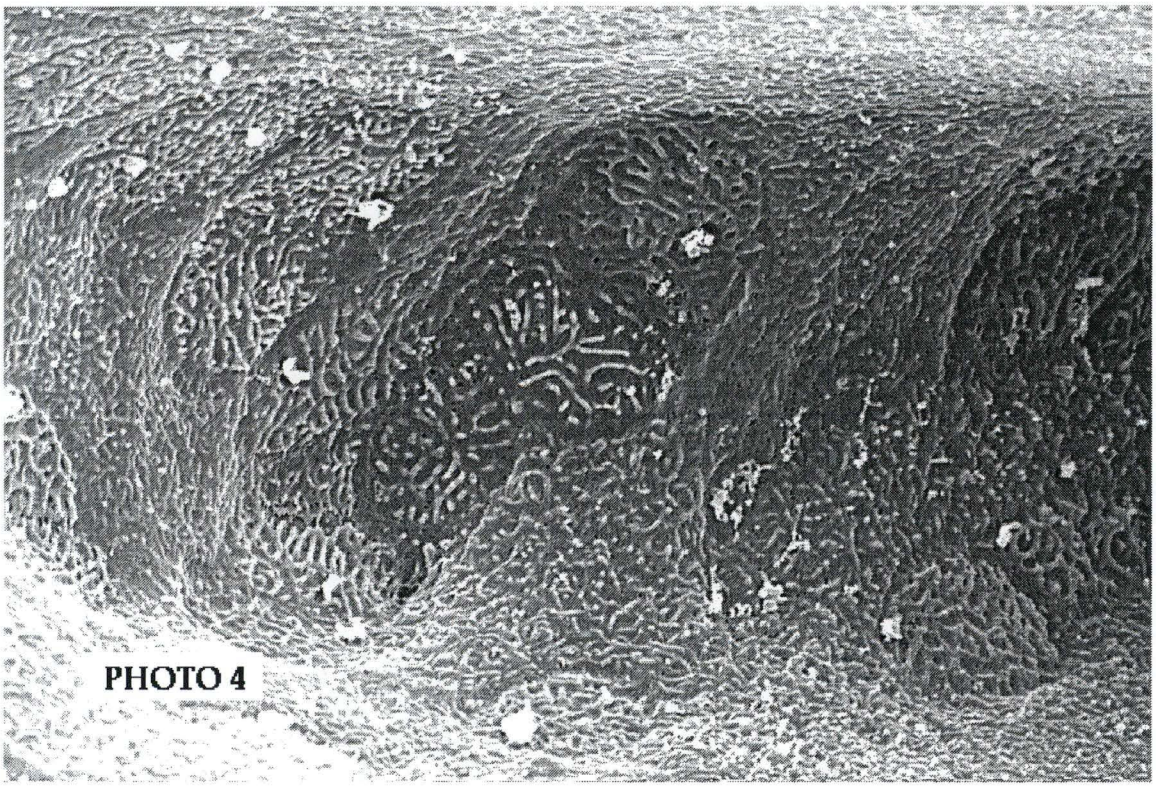
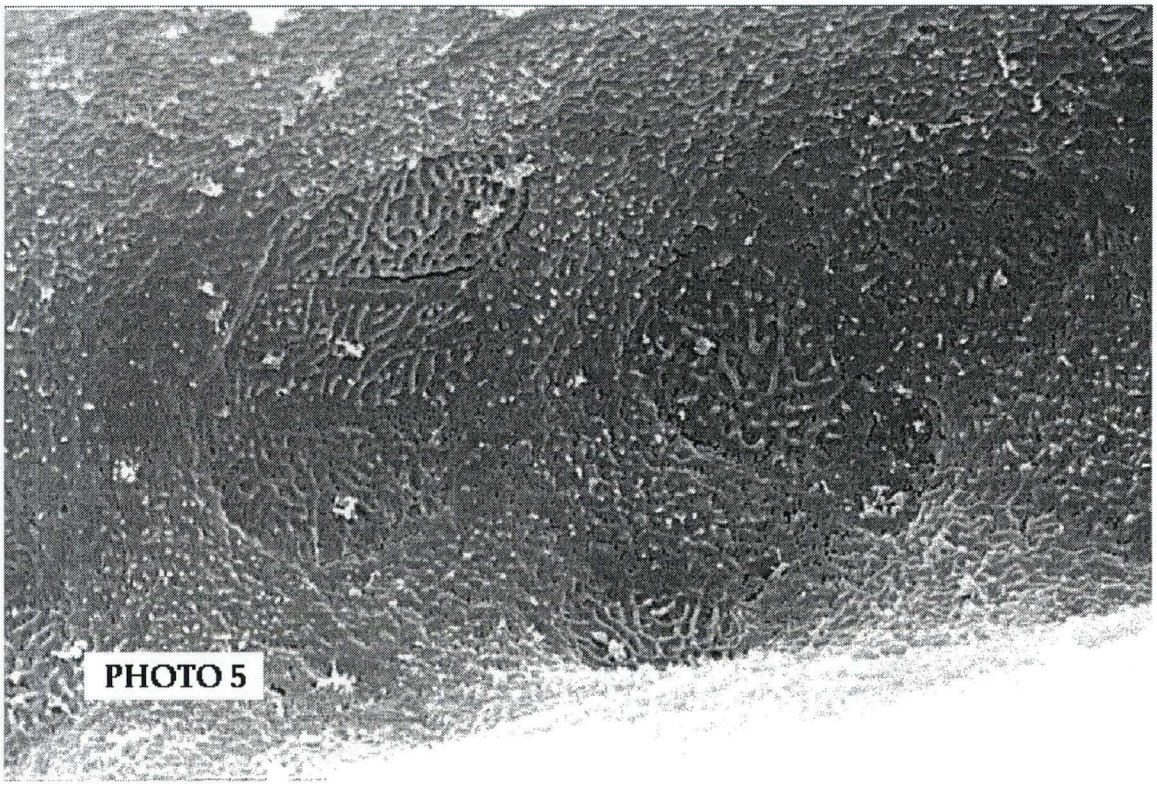


PHOTO 4

Photographie de microscopie électronique à balayage (SCAN) utilisée pour le calcul des surfaces cellulaires et des densités de cellules à chlorure. localisées sur les filaments primaires (X 5333)

Saumon traité au cadmium (10 µg/l) durant 14 jours:



Photographie de microscopie électronique à balayage (SCAN) utilisée pour le calcul des surfaces cellulaires et des densités de cellules à chlorure. localisées sur les filaments primaires (X 5333)

Saumon traité au cadmium (10 µg/l) durant 14 jours:

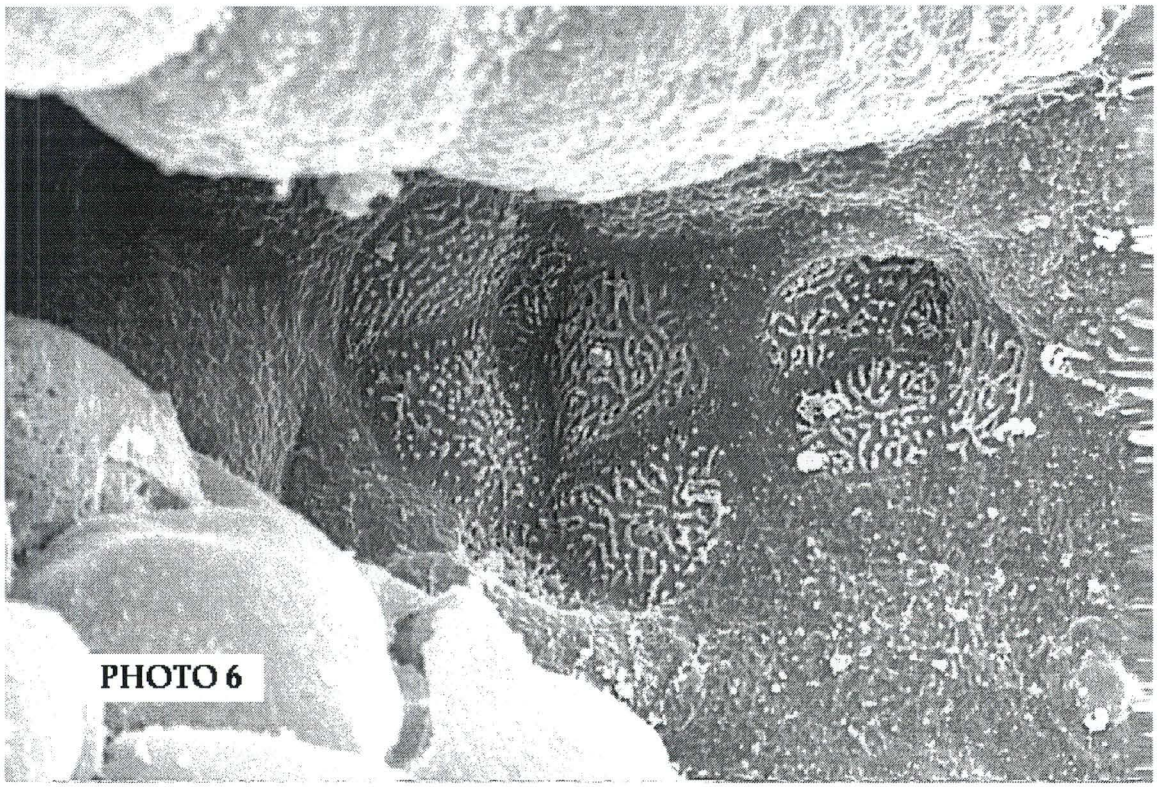


PHOTO 6