

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Accumulation du cadmium dans les organes du crabe chinois, *Eriocheir sinensis*, lors de stress chroniques et aigus : mise en relation avec la synthèse de metallothioneines

Duchêne, Caroline

Award date:
2003

[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.



**FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**ACCUMULATION DU CADMIUM DANS LES ORGANES DU CRABE CHINOIS, *ERIOCHEIR
SINENSIS*, LORS DE STRESS CHRONIQUES ET AIGUS. MISE EN RELATION AVEC LA
SYNTHÈSE DE METALLOTHIONEINES.**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Duchêne Caroline

Août 2003

Accumulation du cadmium dans les organes du crabe chinois, *Eriocheir sinensis*, lors de stress chroniques et aigus. Mise en relation avec la synthèse de métallothionéines

DUCHENE Caroline

Résumé

Le cadmium est un métal non essentiel largement répandu dans l'environnement suite aux activités humaines. De ce fait, il peut s'accumuler dans les organismes aquatiques et induit des effets néfastes. Les principaux objectifs de ce travail étaient de comprendre les mécanismes d'accumulation du cadmium chez un crustacé euryhalin : le crabe chinois, *Eriocheir sinensis*. Pour ce faire, des organismes acclimatés à l'eau douce ont été contaminés sous différentes conditions : les premiers à 0,5 mg Cd²⁺/l pendant 3 jours (stress aigu) ; les seconds, à 10 µg Cd²⁺/l pendant 30 jours (stress chronique) ; 3 jours à 0,5 mg Cd²⁺/l après ce stress chronique (CC10); d'autres encore à 50 µg Cd²⁺/l pendant 30 jours (C50) et enfin, un dernier groupe qui a été contaminé à 0,5 mg Cd²⁺/l pendant 3 jours après ce stress chronique (CC50). Des dosages de cadmium par spectrométrie d'absorption atomique (AAS) ont été effectués sur les hépatopancréas, les branchies postérieures et antérieures, l'hémolymphe, la carapace et les muscles. Une accumulation du cadmium s'observe au niveau des branchies antérieures et de l'HP principalement au niveau duquel, une acclimatation a été mise en évidence. Les concentrations les plus élevées sont rencontrées dans les branchies antérieures pour lesquelles, les concentrations moyennes se situent entre 4,729 µg Cd²⁺/g PS (T) et 775,806 (CC50). Les autres organes ont des concentrations entre 1,132 µg Cd²⁺/g PS (T) et 279,755 µg Cd²⁺/g PS (CC50) pour l'hépatopancréas, et entre 0,353 µg Cd²⁺/g PS (T) et 210,230 µg Cd²⁺/g PS (CC10) pour les branchies postérieures. Dans les autres organes, les concentrations sont plus faibles. Des différences significatives sont observées entre les différentes conditions. Pour tous les organes mis à part l'hépatopancréas, le stress aigu permet une plus forte accumulation tandis que pour ce dernier, un temps d'exposition plus important est nécessaire afin d'observer une accumulation plus élevée.

Le second objectif était de mettre au point un dosage des métallothionéines totales (par saturation à l'argent) dans les hépatopancréas et de mettre en relation les concentrations en métallothionéines et celles en cadmium. Nous avons déterminé que les concentrations en métallothionéines étaient comprises entre 325 (T) et 600 µg équivalents MT/g PF (CC50). Des différences significatives étaient observées entre les T et les CC10, C50 et CC50. De plus, nous avons mis en évidence une corrélation positive entre cadmium et métallothionéines.

Et voilà, après quelques mois de travail, l'heure des remerciements est venue...

Je tiens tout d'abord à remercier les Professeurs Jean-Pierre Descy, Jean-Claude Micha et Patrick Kestemont pour leur accueil au sein de l'URBO, au cours de ce mémoire.

J'exprime ma reconnaissance au Professeur Pierre Devos, promoteur de ce mémoire, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

J'adresse mes plus profonds remerciements à Frédéric Silvestre, tuteur de ce travail, dont la porte a toujours été ouverte pour répondre à la moindre de mes questions, ainsi qu'à mes angoisses et qui m'a guidé dans ce premier travail scientifique.

Je tiens à remercier également tout ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Je pense tout particulièrement à Pierre Cambier pour m'avoir autorisée à utiliser le spectro mais aussi à Edouard pour ses nombreux conseils dans les électrophorèses et les colonnes HPLC.

Je voudrais remercier toutes les personnes qui ont du se farcir la lecture et la relecture de ce travail.

Je désire remercier tous mes collègues de l'URBO avec qui j'ai passé mes quatre années d'études. Merci à Nicolas pour sa bonne humeur constante au labo, à Stéphane et Robert pour leurs réconforts dans les moments plus pénibles (second sess, coup de blues,...) mais aussi pour leur joie de vivre...

Un merci tout particulier à Van, Gez, Christine et Stéphanie pour les délires et les cancons (hein Christinette...)

Merci beaucoup à Van et Poulette pour vos oreilles ouvertes et prêtes à tout entendre et vos conseils (en tout genre) toujours les bienvenus... Merci de m'avoir supporter pendant quatre années. Merci pour tous les bons moments passés et vive les bouteilles de Martini...

Un tout grand merci à toi Gez pour tout ce que tu as fait, surtout le dernier week-end du mémoire !!!!

Merci à tous ceux qui m'ont fait découvrir le folklore de Namur. Je pense en particulier à Ben, Jean-Phi, Tutu, Nico, Thaib, Phil, Dav...

Un tout grand merci également à François pour les moments agréables passés en ta compagnie, merci pour ton humour et pour tout le reste aussi !

Non, non, Pierre, je ne t'avais pas oublié ! Comment aurais-je pu... Un tout grand merci à toi pour m'avoir donné le goût des stats !!!! Et un merci tout particulier pour tous les voyages qu'on a fait ensemble... Que c'était « agréable » !!!

Et enfin, mes derniers remerciements s'adressent tout particulièrement à mes parents, pour leur aide, leur soutien moral et financier durant toutes mes années d'études, et sans qui je n'aurais jamais pu réussir. Merci de tout cœur d'être des parents si géniaux et si cool...

Merci à tous.

Caro

Résultats

| | |
|---|-----------|
| Accumulation du cadmium dans les organes du crabe chinois..... | 25 |
| Influence du stress aigu sur l'accumulation du cadmium..... | 27 |
| Répartition du cadmium dans les différents organes pour chaque condition de stress..... | 28 |
| Corrélation entre les concentrations en cadmium et la taille des organismes..... | 30 |
| Synthèse de métallothionéines dans les hépatopancréas des crabes chinois..... | 31 |
| Corrélation entre la synthèse de métallothionéines et l'accumulation de cadmium dans l'hépatopancréas..... | 32 |

Discussion

| | |
|---|-----------|
| Accumulation du cadmium dans les organes du crabe chinois..... | 33 |
| 1. Chez les organismes témoins..... | 33 |
| 2. Influence du stress aigu dans l'absorption du cadmium..... | 34 |
| 3. Effet du stress chronique sur l'absorption du cadmium..... | 35 |
| 4. Influence du stress chronique préalable au stress aigu sur l'accumulation du cadmium..... | 36 |
| Répartition du cadmium dans les différents organes pour chaque condition de stress..... | 37 |
| Synthèse de métallothionéines dans les hépatopancréas des crabes chinois..... | 38 |
| Corrélation entre la synthèse de métallothionéines et l'accumulation de cadmium dans l'hépatopancréas..... | 40 |
| Conclusion et Perspectives..... | 41 |

Références bibliographiques

Synthèse Bibliographique

Le Cadmium.....1

Accumulation du cadmium dans les différents tissus de crustacés.....3

1. Voies d'entrée du cadmium.....3
2. Transport du cadmium dans l'organisme.....4
3. Accumulation dans les différents organes.....4
4. Facteurs influençant l'accumulation et la toxicité du cadmium.....4

Mécanismes de défense et acclimatation des organismes à des polluants.....5

Conditions et Mécanismes.....5

Les métallothionéines.....7

1. Propriétés des métallothionéines.....7
2. Les différentes classes.....7
3. Structure des métallothionéines.....8
4. Fonctions des métallothionéines.....8
5. Induction des métallothionéines.....9
 - a. Mécanisme d'induction.....9
 - b. Organes.....10
 - c. Cinétique.....11

Utilisation comme biomarqueur.....12

Description de l'espèce étudiée.....13

1. Distribution et abondance.....13
2. Cycle de vie.....13
3. Croissance.....14
4. Alimentation.....14

Objectifs du mémoire.....14

Matériel et Méthodes

Contamination des organismes.....16

Dosage du cadmium.....17

1. Par spectrométrie d'absorption atomique (AAS)17
2. Analyse des résultats.....18

Dosage des métallothionéines dans les branchies et l'hépatopancréas.....19

1. Par spectrophotométrie.....19
 - a. Purification partielle des métallothionéines.....19
 - b. Dosage par spectrophotométrie.....20
2. Par saturation à l'argent.....21
3. Analyse des résultats.....24

Abréviations:

| | |
|-------------------|--|
| A | Adénosine |
| AAS | Spectrométrie d'absorption atomique |
| ADN | Acide DésoxyRibonucléique |
| AgNO ₃ | Nitrate d'argent |
| ARN | Acide RiboNucléique |
| ARNm | Acide RiboNucléique messenger |
| C | cystéine |
| C10 | Organismes qui ont subi un stress chronique de 10 µg Cd/l pendant 30 jours |
| C50 | Organismes qui ont subi un stress chronique de 50 µg Cd/l pendant 30 jours |
| Ca ⁺⁺ | ion calcium |
| CC10 | Organismes qui ont subi un stress chronique de 10 µg Cd/l pendant 30 jours puis, un stress aigu de 0,5 mg Cd/l pendant 3 jours |
| CC50 | Organismes qui ont subi un stress chronique de 50 µg Cd/l pendant 30 jours puis, un stress aigu de 0,5 mg Cd/l pendant 3 jours |
| Cd | Cadmium |
| Cd ⁺⁺ | ion cadmium |
| CdCl ₂ | chlorure de cadmium |
| Cd-MT | Cadmium lié aux métallothionéines |
| Cu/Zn | Cuivre/zinc |
| Cu-MT | Cuivre lié aux métallothionéines |
| DTNB | Acide 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoïque |
| DTNB | 5-5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) |
| DTT | Dichlorodiphényltrichloroethane |
| EDTA | Ethylene diamine tetra acetic acid |
| G | Guanine |
| g | Gramme |
| GIF | Growth Inhibitory Factor |
| HNO ₃ | Acide nitrique |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| HSE | Heat Shock Element |
| HSP | Heat Shock Protein |
| KCl | Chlorure de potassium |
| KDa | Kilodalton |
| LD | Limite de Détection |
| mg | milligramme |
| ml | Millilitre |
| mm | Millimètre |
| mM | Millimolaire |
| mOsm/kg | milli-osmole/kilogramme |
| MRE | Metal Responsive Element |
| MT | métallothionéine |
| MTF | Metal Transcription Factor |
| MTI | Metallothionein transcription inhibitor |
| MXR | Multi Xenobiotic Resistance |
| NaCl | Chlorure de Sodium |
| Ni-Cd | Nickel-cadmium |
| nm | Nanomètre |
| O ₂ | Oxygène |
| PBS | Phosphate-Buffer Salin |
| ppm | parts par million |
| Q.L.D. | Quantité Limite Détectable |
| SDS | Sodium Dodécyl Sulfate |
| T | Thyrosine |
| t° | Température en degré celcius |
| TC | Organismes témoins qui ont subi un stress chronique à 0,5 mg Cd/l pendant 3 jours |
| USA | United States of America |
| Zn-MT | Zinc lié aux métallothionéines |
| % | pourcent |
| % sat | Pourcentage de saturation en oxygène |
| °C | Degré celcius |
| µl | Microlitre |
| µm | micromètre |
| µS/cm | microsiemens/ centimètre |

Synthèse
Bibliographique

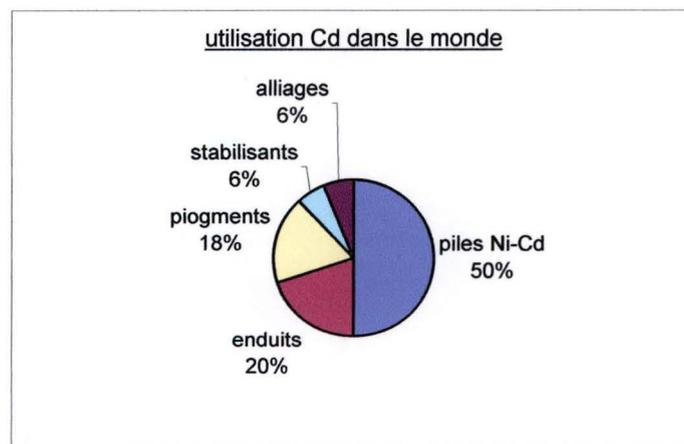


Fig 1 : utilisation du cadmium dans le monde (d'après Hoskin, 1991)

Le cadmium

Le cadmium est un métal du sous-groupe IIb dans la série de transition du tableau périodique des éléments. C'est un métal ductile, blanc argenté avec des teintes de bleu, lustré dont le point de fusion est de 321°C et le point d'ébullition de 765°C. Il a un numéro atomique de 48, une masse atomique de 112,4 g/mol et une masse volumique de 8,65 g/cm³ à 20°C (Nriagu, 1980).

A l'état naturel, il existe principalement au degré d'oxydation +2. Il peut également se trouver à l'étage d'oxydation 0, c'est-à-dire à l'état métallique (CNRC, 1979).

Son utilisation peut être très variée. A l'échelle mondiale, il y a cinq grands domaines d'utilisation du cadmium : les piles Ni-Cd (qui représentent près de 50 % de la consommation mondiale de cadmium), les enduits (20 %), les pigments (18 %), les stabilisants dans les plastiques et les produits synthétiques (6 %), et les alliages (6 %) (Hoskin, 1991) (Fig 1). Mais on retrouve également de petites quantités de cadmium dans les tubes-images de téléviseurs, les fils de téléphone, les radiateurs d'automobile, les barres de commande et les blindages de réacteurs nucléaires, les huiles moteurs et les agents de vulcanisation du caoutchouc (CCMRE, 1987).

En Belgique, trois groupes d'industries produisent énormément de cadmium : la métallurgie du zinc et du plomb, les usines productrices d'engrais phosphatés et le secteur utilisant le cadmium comme revêtement de surface. Les concentrations en cadmium sont alors beaucoup plus élevées dans les eaux près de ces industries.

A l'état naturel, le zinc est étroitement lié au cadmium et il est impossible de les séparer totalement. (Claeys et al., 1992).

En général, les concentrations en cadmium sont très faibles dans l'eau. La concentration dans l'eau douce est de l'ordre de 1 µg/l et de l'ordre de 0,1 µg/l dans l'eau de mer (Claeys et al., 1992). Mais ces concentrations peuvent cependant varier énormément. Par exemple, ce métal est trouvé à une concentration moyenne inférieure à 0,2 µg/l au niveau de la station de pompage de Tailfer. Cependant, en aval de Liège, il peut atteindre la concentration de 7 µg/l (RIWA, 1992).

Depuis 1988, les concentrations en cadmium dans la Meuse ne cessent de diminuer (Devos, 1999).

Une étude, menée dans le Bénélux, rapporte que la valeur percentile 60 s'élevait à 1,2 µg Cd/l en Belgique durant la période 1978-1982 alors que jusqu'à ce jour la norme de concentration dans les eaux est de 1 µg/l. Aux Pays-Bas, cette valeur était de 0,5 µg/l et de 0,2 µg/l pour la Luxembourg. Ceci peut être expliqué par une production importante d'engrais phosphatés et une concentration anormalement élevée de l'industrie des non-ferreux (Claeys et al., 1992).

A titre de comparaison, on peut trouver dans certains lacs canadiens des concentrations bien supérieures à celles trouvées dans nos régions. Ainsi, dans le lac Schist des concentrations d'environ 900 µg/l ont été mesurées (tableau 1). Par contre, dans le fleuve Saint-Laurent, il est présent en concentration beaucoup plus faible ; 0.002 µg/l environ.

Les concentrations mesurées dans les sédiments et dans les sols sont reprises dans les tableaux 2 et 3.

Les principales causes naturelles de pénétration du cadmium dans l'atmosphère sont le transport éolien de particules du sol, les incendies de forêt et les émissions volcaniques. A l'échelle de la planète, on estime que les émissions naturelles de cadmium dans l'atmosphère sont d'environ 1 300 tonnes par année (Nriagu, 1989). Les activités humaines rejettent dans l'atmosphère de 3 à 10 fois plus de cadmium que les sources naturelles (soit de 3 100 à 12 000 tonnes par année) (Yeats et Bewers, 1987 ; Nriagu et Pacyna, 1988) (tableau 4).

Le cadmium peut provoquer de graves dommages chez les individus qui en ingèrent soit par inhalation, soit par l'alimentation ou encore par absorption d'eau contaminée.

Les premiers effets mortels du cadmium chez l'homme ont été découverts en 1968 au Japon. Il s'agissait de la maladie Itai-itai. Cette maladie est un type du syndrome acquis de Fanconi. Elle se manifeste par une atrophie des reins et l'ostéoporose au niveau du fémur, du pubis et des côtes.

Chez l'homme, une exposition prolongée diminue le calcium contenu dans les os et les rend ainsi beaucoup plus fragiles (Goldsmith et Hildyard, 1990).

Les plus fortes concentrations de cadmium dans le corps humain se retrouvent dans les reins (surtout le cortex rénal) et le foie, bien que l'on puisse déceler ce métal dans presque tous les tissus des adultes des pays industrialisés (Elinder, 1985). Les concentrations dans les reins augmentent avec l'âge jusqu'à 40 à 60 ans, après quoi elles se réduisent (Chung et al, 1986).

Les effets les plus courants dus à l'administration de chlorure de cadmium par voie orale sont une réduction de la croissance, une modification du poids ou des paramètres histopathologiques des organes (notamment les reins, les testicules, le foie et l'intestin), ainsi que des effets sur le système immunitaire (Ministère des Approvisionnements et Services Canada, 1994).

Les concentrations chez l'homme peuvent varier selon le type d'alimentation et selon la quantité ingérée. Toutefois, les concentrations les plus importantes se trouvent chez les invertébrés marins et surtout les crustacés.

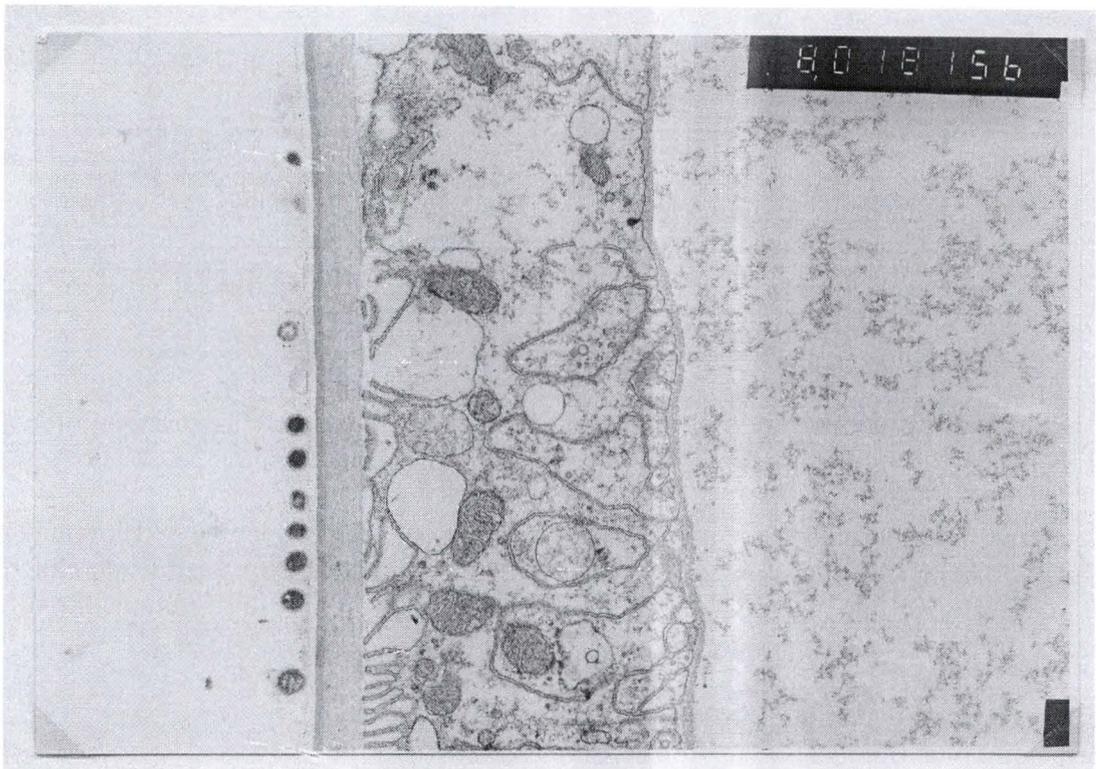


Fig 2 : coupe transversale dans l'épithélium d'une branchie antérieure d'*Eriocheir sinensis* (X 8000).

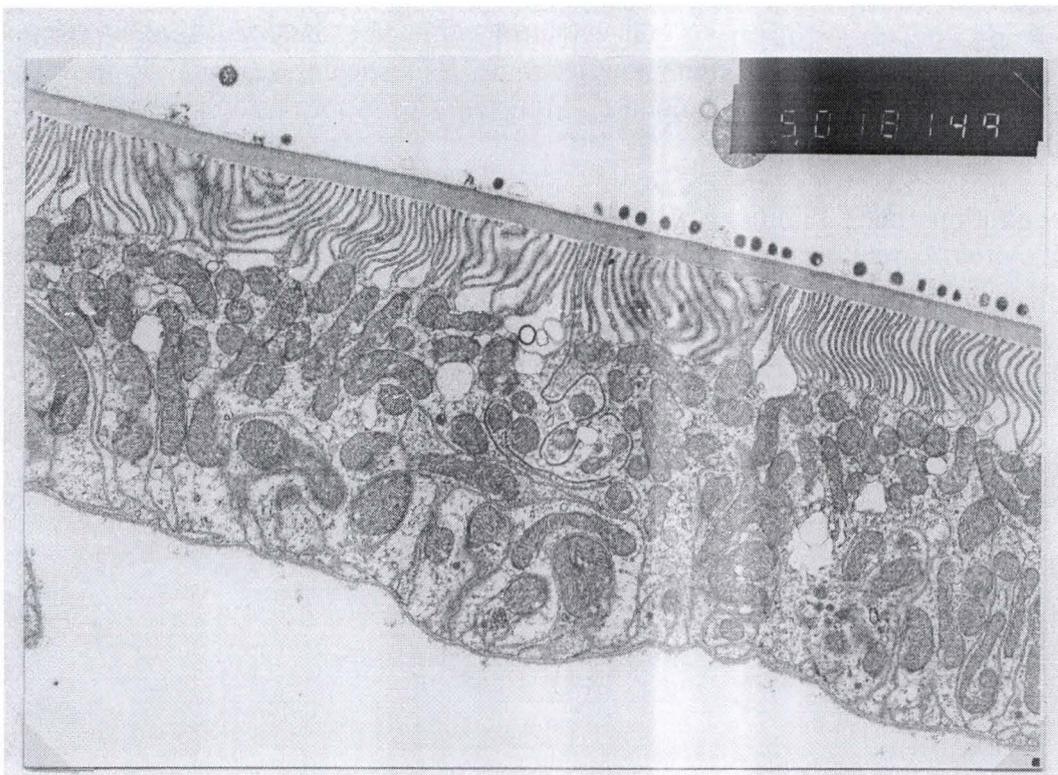


Fig 3 : coupe transversale dans l'épithélium d'une branchie postérieure d'*Eriocheir sinensis* (X 5000).

Accumulation du cadmium dans les différents tissus de Crustacés.

1. Voies d'entrée du cadmium.

Il existe différentes sources de cadmium qui pourraient provoquer une accumulation de celui-ci dans un organisme aquatique. Il peut provenir de l'alimentation ou de l'eau environnante (Jennings et Rainbow, 1979).

A partir de ces deux sources, le cadmium peut pénétrer dans l'organisme par différentes voies. Il peut pénétrer dans l'organisme par les surfaces qui sont en contact avec le milieu extérieur, c'est-à-dire soit par les branchies, soit par la carapace (tégument), ou alors par le système digestif (Rainbow, 1997).

Il peut y avoir adsorption passive des ions de cadmium sur la carapace, mais une plus grande quantité de cadmium sera trouvée dans les branchies (Jennings et Rainbow, 1979).

Chez *Eriocheir sinensis* (Milne-Edwards, 1854), le crabe chinois, les branchies antérieures et les branchies postérieures ne jouent pas les mêmes rôles (Péqueux and Obersnel, 1996 ; Pedersen and Bjerregaard, 1995). Les branchies antérieures sont uniquement respiratoires tandis que les postérieures interviennent activement dans le transport des ions et donc dans l'osmorégulation. Cette différence de fonction s'explique par des différences dans l'ultrastructure de la cuticule des branchies antérieures et postérieures.

L'épithélium des branchies antérieures est fin (2 à 4 μm) et est recouvert d'une cuticule épaisse (environ 1 μm) qui est perméable aux gaz. Celui des branchies postérieures est plus épais (jusqu'à 10 μm) et la cuticule qui le recouvre est plus fine (0,3 μm).

Ces différences montrent que les branchies antérieures ont un rôle respiratoire tandis que les postérieures sont osmorégulatrices. L'épithélium fin effectue des échanges gazeux alors que celui qui est plus épais effectue des transports ioniques. (Fig 2 et 3).

Gutknecht (1983) a montré que le passage du cadmium à travers la membrane branchiale se fait sous la forme de Cd^{++} et non sous la forme de CdCl_2 . Etant donné que le cadmium a le même diamètre que l'ion Ca^{++} (rayon atomique du calcium : 0,99 Å et celui du cadmium est de 0,90 Å), il peut passer à travers les canaux à calcium de la membrane apicale des cellules épithéliales par diffusion (Verbost, 1989).

Lorsque la source de cadmium est la nourriture ingérée, il pénétrera dans l'organisme par l'intestin et se retrouvera dans l'hépatopancréas (McPherson et Brown, 2001).

Le pompage des métaux à travers la paroi gastro-intestinale est plus important dans la partie antérieure de l'intestin (Shears et Fletcher, 1989).

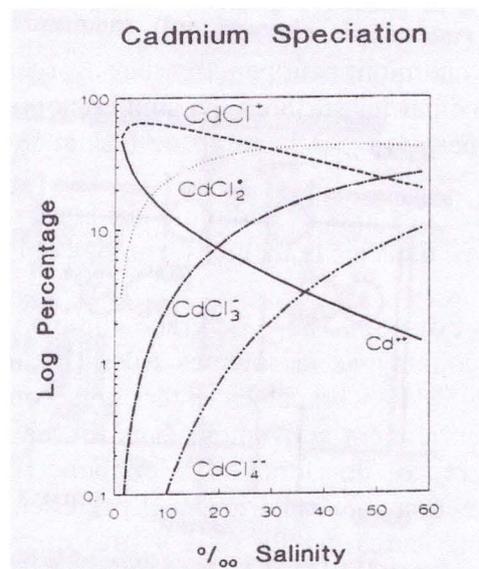


Fig 4 : représentation de la spéciation du cadmium en fonction de la salinité (d'après Rainbow, 1995).

2. Transport du cadmium dans l'organisme.

Qu'il provienne de la carapace ou des branchies, le cadmium est dirigé vers l'hépatopancréas via l'hémolymphe (Bryan, 1971). Cet auteur stipule que les ions de cadmium se lient à l'hémocyanine (pigment sanguin) de l'hémolymphe.

L'absorption du cadmium est un processus de diffusion à partir du cadmium de l'eau vers l'hémolymphe faisant suite à l'absorption du métal sur la cuticule des branchies (Bryan, 1971). Il postule que l'affinité du métal pour l'hémocyanine de l'hémolymphe doit être suffisante pour créer un gradient de concentration allant de l'eau vers l'hémolymphe.

De l'hémolymphe, le cadmium, alors lié à l'hémocyanine, est dirigé vers les organes comme l'hépatopancréas pour le stockage ou vers les glandes antennaires pour l'excrétion. Là aussi, le cadmium est largué dans ces organes suivant un gradient de concentration de cadmium entre l'hémolymphe et les organes (Wright, 1977).

3. Accumulation dans les différents organes.

Dans un milieu contaminé par le cadmium, une forte concentration en cadmium sera observée surtout dans l'hépatopancréas, ce qui reflète bien le rôle de l'hépatopancréas en tant qu'organe de stockage à long terme (Rainbow, 1998). Cette concentration est généralement plus élevée que celle mesurée dans les branchies (Legras et al., 2000).

Une étude de Mouneyrac et al. (2001) montre que dans un milieu pollué (estuaire de la Gironde en France), une concentration de 2,7 µg/g poids sec est mesurée dans l'hépatopancréas du crabe *Pachygrapsus marmoratus* alors qu'elle est de 0,46 µg/g poids sec dans les branchies.

4. Facteurs influençant l'accumulation et la toxicité du cadmium.

La quantité de cadmium absorbée peut varier suivant différents facteurs tels que la salinité du milieu, l'âge et le sexe des individus, leur taille,...

La salinité est le paramètre le plus important. Elle peut faire varier le taux de cadmium entrant car elle détermine les formes de cadmium et donc leur biodisponibilité pour le crabe (Bjerregaard et Depledge, 1994).

Si la salinité dans le milieu environnant est faible, le cadmium se trouve sous forme d'ions libres, Cd^{2+} . C'est la forme la plus toxique pour les individus. Tandis que lorsque la salinité est élevée, le cadmium se trouve associé avec les ions chlorure et est beaucoup moins toxique. En résumé, lorsque la salinité est faible, il y a moins d'ions chlorure et donc plus d'ions libres de cadmium ce qui signifie une toxicité plus importante pour les organismes (Fig 4).

La salinité peut jouer également sur les mécanismes d'osmorégulation des individus (Roast et al., 2002).

Les voies d'entrées étant pour la plupart des transports passifs, une diminution de pompage s'observe au point isosmotique.

Lorsqu'un organisme est plongé dans un milieu où la pression osmotique est inférieure à celle du corps, il y a une entrée d'eau dans le corps par osmose, qui est alors éliminée via une urine plus abondante et isosmotique. Cette perte de sels est compensée par un pompage actif d'ions essentiels (comme le sodium et le calcium). Donc il y a plus d'ions métalliques qui seront pompés en même temps que ces ions essentiels.

Si l'organisme est plongé dans un milieu où la pression osmotique est cette fois supérieure à celle de son corps, cela va provoquer une sortie d'eau par osmose. Afin de remplacer cette eau perdue, l'animal va en ingérer une plus grande quantité. Pour maintenir une osmolarité constante de l'hémolymphe, l'organisme va pomper des ions (chlorure et sodium, par exemple). Par ce pompage, des ions métalliques vont également être pompés (Spaargaren, 1971).

Par contre, lorsque l'animal est dans un milieu où les pressions osmotique et corporelle sont identiques, il y a moins d'échange d'eau ou d'ions ; et aussi moins d'entrée de métal.

L'accumulation de cadmium via les branchies peut aussi varier en fonction de la concentration en calcium dans le milieu externe. Wright (1977) a mesuré des concentrations opposées en calcium et en cadmium dans les branchies et l'hémolymphe. Il suggère une compétition entre ces deux ions pour les sites de liaison ; le cadmium et le calcium ayant plusieurs propriétés similaires (dont leur rayon atomique plus ou moins identique), ils peuvent être confondus lorsqu'ils sont pompés par la pompe Ca^{2+} des branchies.

Deux autres paramètres qui font varier l'accumulation de cadmium sont la taille et le sexe des organismes. Radhakrishnaiah et al. (1991) ont mené une étude sur des crabes de taille et de sexe différents et ont observé que les mâles et les organismes de petite taille absorbaient plus de cadmium que les femelles et ceux de grande taille.

La température est un paramètre qui peut aussi influencer sur la concentration de cadmium ingéré dans le sens où elle peut provoquer une augmentation de l'activité métabolique et contribue alors à une augmentation de concentration du cadmium transféré à partir des branchies vers l'hépatopancréas (O'Hara, 1973).

Mécanismes de défense et acclimatation des organismes à des polluants

1. Conditions et mécanismes

Les organismes réagissent contre des polluants en mettant en place des mécanismes de défense comme une synthèse de métallothionéines, de protéines de stress (HSP), le système MXR (multixenobiotic resistance) qui leur permettent de survivre et/ou de s'acclimater.

L'organisme est alors capable de résister à un stress qui normalement serait léthal.

Une acclimatation à n'importe quelle contamination ou pollution suppose une exposition à cette pollution à long terme et non à court terme. Ceci suppose également que l'intensité du stress est inférieure à celle qui provoquerait la mort des organismes.

On parle alors de stress chronique. Dans ces conditions, les différents moyens de survie sont exploités. Par exemple, l'induction de toute une série de protéines qui jouent un rôle important dans la réparation et/ou l'élimination des protéines cellulaires endommagées par le facteur responsable du stress, ou dans la régulation ou la neutralisation de ce facteur (Dhainaut et al., 1997).

Les HSP sont exprimées dans les cellules en l'absence de stress mais elles sont surexprimées dans de mauvaises conditions. Les HSP 70 vont alors jouer un rôle de protéines chaperonnes et se lier à des protéines cibles au niveau des sites hydrophobes pour moduler leur repliement et/ou leur transport à travers des membranes biologiques (Feige et Polla, 1994).

Ces protéines peuvent être induites par des contaminants présents dans l'environnement comme le cadmium. L'induction de ces protéines fait intervenir une séquence HSE (Heat Shock Element) comprise dans les gènes des HSP (Mosser et al., 1990).

La concentration de ces protéines n'est pas la même dans tous les types de cellules. Elle est maximale dans les organes cibles (Stringham et Candido, 1994).

Un autre système qui peut être mis en place pour résister à un stress est le système MXR.

Ce système est présent chez les individus non exposés à la pollution mais fortement induits chez les organismes ayant toujours vécu dans un milieu pollué (Kurelec et al., 1995). Ce mécanisme agit comme une pompe qui élimine les produits chimiques endogènes et les xénobiotiques des cellules et donc évite leurs accumulations et leurs effets cytotoxiques (Bard, 2000). Mais ce système est assez fragile dans le sens où certaines classes de produits chimiques peuvent compétitivement inhiber ce MXR ce qui provoque une bioaccumulation de xénobiotiques et donc une augmentation des toxines dans les cellules (van des Oost et al., 2003).

La résistance MXR peut être considérée comme une première ligne de défense vis-à-vis de nombreux xénobiotiques, les expulsant hors de la cellule afin d'éviter leur accumulation.

Il existe une multitude d'autres moyens de lutter contre un polluant. Nous avons choisi de nous focaliser sur la synthèse de métallothionéines dans les organes cibles. Celles-ci vont piéger les ions métalliques et les rendre non-toxiques pour la cellule.

Les métallothionéines

1. Propriétés des métallothionéines.

Ces protéines possèdent différentes propriétés qui sont communes aux différentes familles (Harmer, 1986).

- Leur structure primaire est composée d'une soixantaine d'acides aminés.
- Elles sont de faible poids moléculaire : 6-7 KDa.
- 30 % environ de leurs acides aminés sont représentés par des cystéines.
- Elles peuvent contenir une quantité importante de métaux (de quatre à douze atomes par mole) qui se lient exclusivement aux cystéines en formant des liaisons thiolates.
- Il n'y a aucun acide aminé aromatique ni d'histidine.
- Ces protéines sont très stables à haute température.

2. Les différentes classes.

Auparavant, quatre classes de métallothionéines ont été mises en évidence. Ces différentes classes différaient par la localisation des acides aminés cystéine et selon leur mode de synthèse (Roesijadi, 1992).

Classe 1 : retrouvée partout dans le règne animal et dans tous les organes, c'est un polypeptide avec une localisation des cystéines similaires à celles des métallothionéines découvertes en premier lieu dans un rein de cheval en 1958.

Classe 2 : retrouvée aussi dans toutes les espèces étudiées et dans quasiment tous les organes. Mais chez celles-ci, la place des cystéines ne ressemble que vaguement à celle des métallothionéines de la classe 1.

Classe 3 : mise en évidence dans le cerveau humain et dans les neurones (Giacconi et al., 2003).

Classe 4 : présente uniquement dans certains tissus stratifiés, la majorité des résidus non-cystéines sont différents (Romero-Isart et al. 2002).

Actuellement, cette classification a été revue étant donné qu'elle ne fait pas une distinction des similarités structurales entre et à l'intérieur des classes.

Le modèle le plus récent de classification des métallothionéines subdivise ces dernières en familles, sous-familles, sous-groupes et isoformes isolées et allèles.

Les métallothionéines sur lesquelles nous nous sommes attardés dans ce travail sont celles des crustacés qui font partie de la famille 3.

Ces protéines sont de petites protéines qui comprennent 18 cystéines.

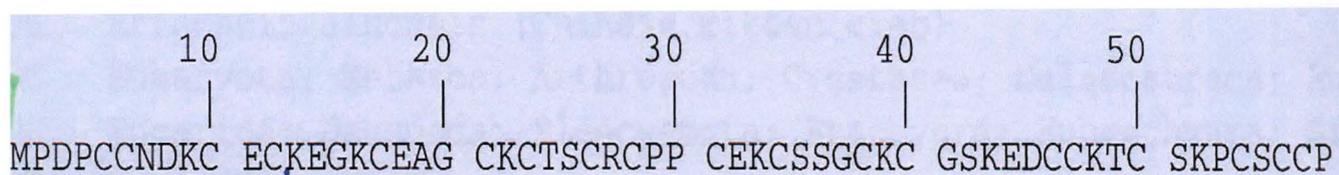


Fig 5 : séquence d'acides aminés de la métallothionéine des crustacés

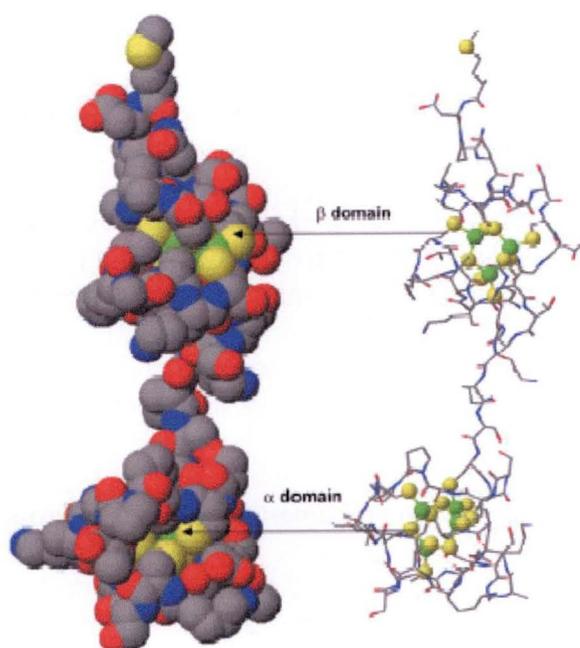


Fig 6 : structure tertiaire d'une molécule de métallothionéine.

Elles se distinguent des autres familles par la suite d'acides aminés P-(GD)-P-C-C-x (3 ou 4)-C-x-C qui est localisée à l'extrémité N-terminale (Fig 5).

Elles possèdent 58 à 60 acides aminés (avec ou sans les Met de l'extrémité N-terminale).

3. Structure des métallothionéines.

Les différentes classes de ces protéines sont composées de deux domaines : domaine α (composé de 30 acides aminés) et le domaine β (composé de 31 acides aminés) qui sont reliés par une courte séquence d'acides aminés flexible composée d'une suite de lysine (Romero-Isart et al., 2002) (Fig6).

Chacun de ces deux domaines peut lier un certain nombre d'ions métalliques en fonction du nombre d'acides aminés cystéine présents dans le domaine. Le domaine α contient 11 cystéines et peut lier 4 atomes métalliques bivalents (M_4S_{11}) tandis que le domaine β peut lui, lier 3 atomes de métaux bivalents grâce à ses 9 cystéines (M_3S_9) (Klaassen et al., 1999).

Les métallothionéines de crustacés sont également composées de deux domaines globulaires contenant chacun 9 cystéines. Celles-ci peuvent lier 3 ions métalliques bivalents (et non plus 3 et 4 ions) (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>).

Les deux domaines sont globulaires avec un diamètre de 15-20 Å.

Le repliement des deux domaines est topologiquement identique mais leur chiralité est opposée.

Dans les deux domaines, la chaîne polypeptidique fait trois tours pour former une spirale autour des atomes métalliques (Hamer, 1999).

En conclusion, les métallothionéines sont des protéines désignées à se lier aux métaux lourds de manière coopérative et étroite et ces protéines peuvent adopter différentes conformations suivant le métal qui s'y lie.

4. Fonctions des métallothionéines.

Depuis leur découverte en 1958 par Margoshes et Vallee (1958), diverses fonctions leur ont été attribuées.

Tout d'abord, elles ont un rôle important dans l'homéostasie des métaux essentiels tels que le zinc et le cuivre (Klaassen et al., 1999).

Grâce à leurs groupements sulfhydrils, les métallothionéines peuvent se lier à ces métaux quand elles sont encore sous forme d'apo-protéines et devenir, une fois liées aux métaux, des métallothionéines (Ejnik et al., 2002). Ainsi, elles peuvent réguler le transport à travers tout l'organisme des atomes métalliques essentiels qui sont présents dans l'individu.

Grâce à cela, ces protéines peuvent réguler l'activation et l'inactivation de nombreux effecteurs moléculaires qui dépendent de la présence du zinc.

Lorsque du cuivre est séquestré dans la protéine, celle-ci réglera la mise en action de diverses enzymes telle la Cu/Zn superoxyde dismutase ou encore la cytochrome *c* oxydase ainsi que de nombreux facteurs de transcriptions. (Klaassen et al., 1999).

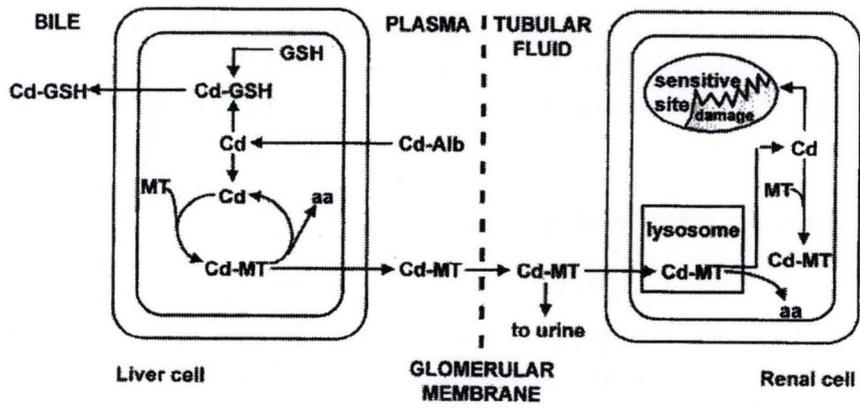


Fig 7 : mécanisme de détoxification du cadmium au niveau des reins et du foie

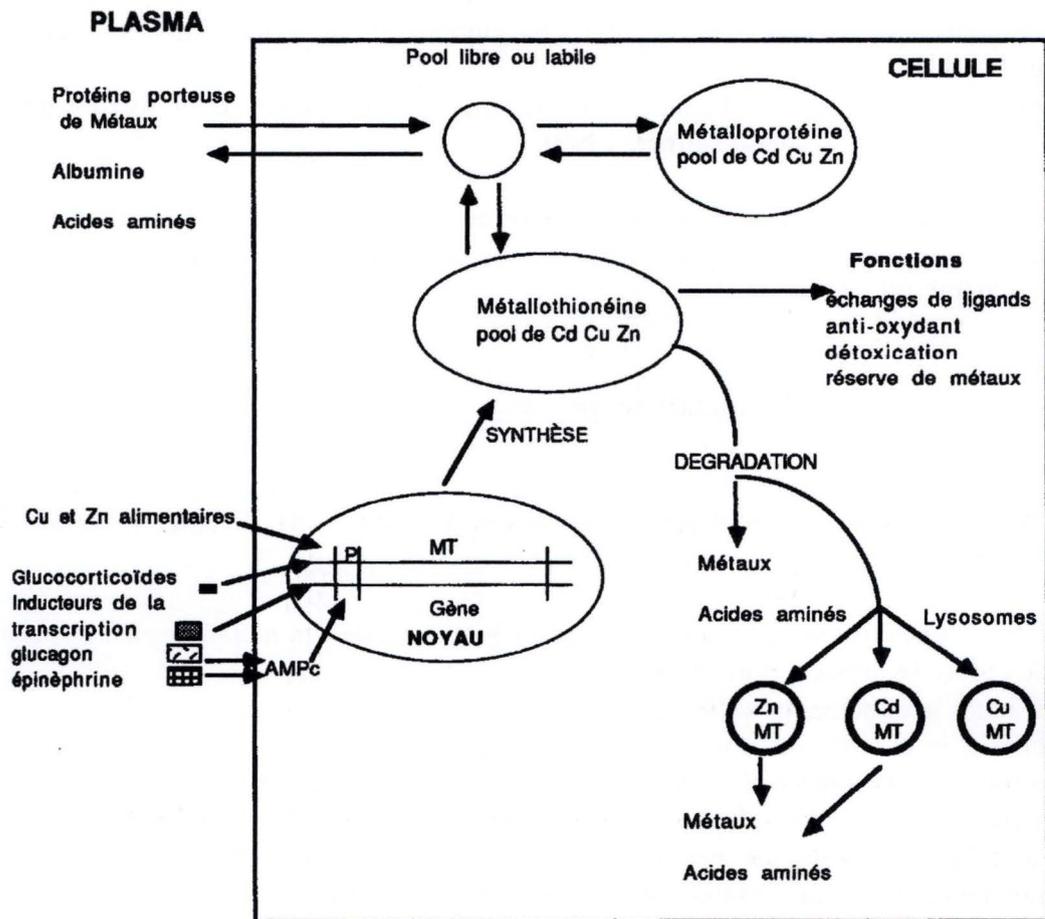


Fig 8 : synthèse du métabolisme et des fonctions supposées des métallothionéines

Les métallothionéines sont donc impliquées dans les nombreuses fonctions normales du cuivre et du zinc en situation normale.

Un second rôle qui peut leur être attribué est un rôle de protection contre la toxicité des métaux lourds tels le cadmium, le mercure, le plomb,...

Grâce à leur structure, les métallothionéines peuvent séquestrer les atomes métalliques toxiques pour l'organisme. La force de liaison entre les métallothionéines et les métaux est différente selon ces derniers. C'est le mercure qui se lie le plus fort à ces protéines, ensuite par ordre décroissant de force de liaison, ce sont l'argent, le cuivre, le cadmium et le zinc.

Etant piégés, les ions métalliques ne peuvent plus se fixer sur les protéines de haut poids moléculaire et sont incapables de les dénaturer (Amiard et Cosson, 1997).

(Fig 7 et 8).

Le rôle de protection contre les agents oxydants leur est également attribué. En effet, elles agissent comme anti-oxydant vis-à-vis des médicaments contre le cancer ou autres substances comme différentes drogues,...

Vu leur caractère nucléophile et grâce aux groupements -SH des cystéines, elles sont capables de se lier aux substances électrophiles que sont les médicaments ou drogues (Lazo et al., 1998).

Les métallothionéines trouvées dans le cerveau sont impliquées dans un processus qui retarde l'avancement de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Pick, ... (Giacconi et al., 2003).

Elles agissent comme un facteur d'inhibition de la croissance neuronale (GIF : growth inhibitory factor).

5. Induction des métallothionéines.

a. Mécanisme d'induction.

Une synthèse de protéines se déroule en deux étapes (Campbell, 1995) (Fig 9).

Tout d'abord, il y a une étape appelée transcription pendant laquelle l'ADN est copié en un brin d'ARNm. Cette étape est initiée par l'activation d'un facteur de transcription et d'une ARN polymérase. Une fois ces facteurs activés, la transcription a lieu.

Ensuite, vient l'étape de traduction. L'ARNm est lu par un ribosome et traduit en une suite d'acides aminés dont le repliement lui assurera une fonction bien précise.

Actuellement, la séquence de l'ARNm des métallothionéines d'*Eriocheir sinensis* est bien connue (Fig 10). Elle est composée de 177 paires de bases (38A, 48C, 56G et 35T). La séquence primaire d'acides aminés est également connue (Fig 5). Elle comprend 58 acides aminés et a un poids moléculaire de 6130 Da (Li et al., 2001).

Plusieurs facteurs peuvent activer l'expression des gènes de métallothionéines.

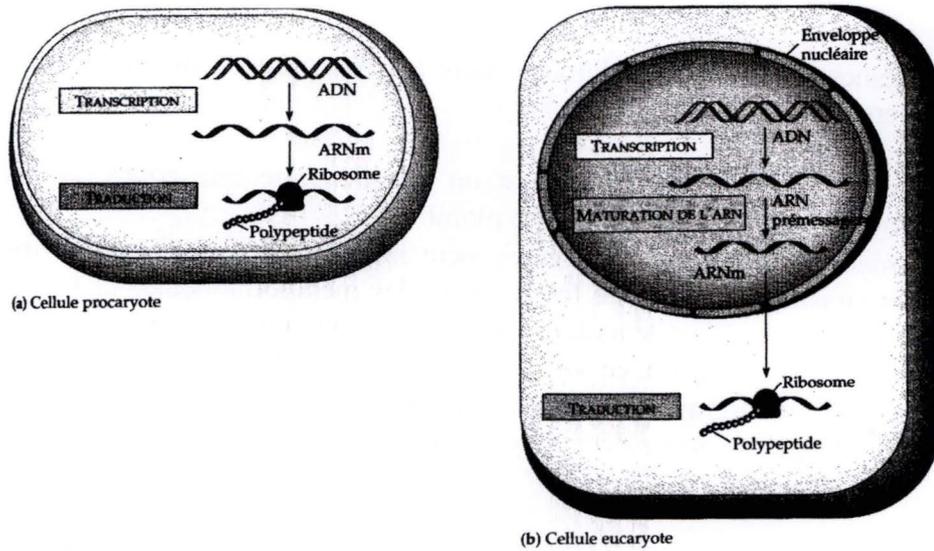


Fig 9 : mécanisme d'induction des protéines (d'après Campbell, 1995)

atgcctgacc cttgctgtaa cgacaagtgt gagtgcaagg agggaaaatg cgaggcaggg
 tgtaagtgca catcctgtcg ctgccctcca tgcgagaagt gctcgtccgg gtgcaagtgt
 ggcagcaagg aggactgctg caagacctgc tccaagcctt gctcctgctg ccctag

Fig 10 : séquence d'ARNm de la métallothionéine chez *Eriocheir sinensis*

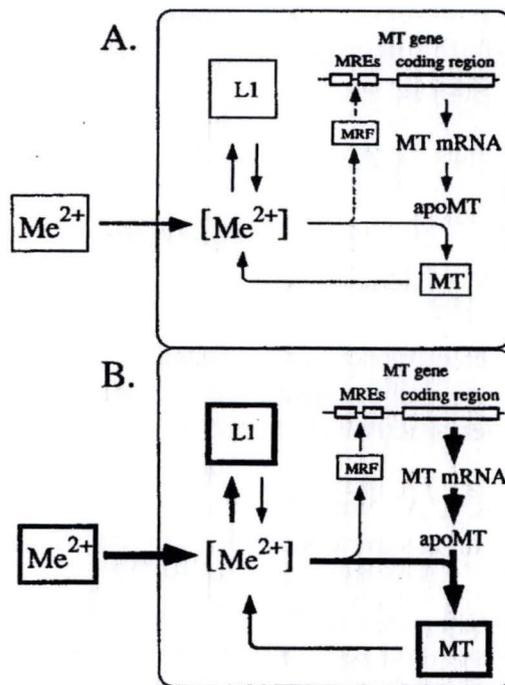


Fig 11 : distribution du métal dans le cas A : d'une induction de MT et B : quand les MT sont déjà induites

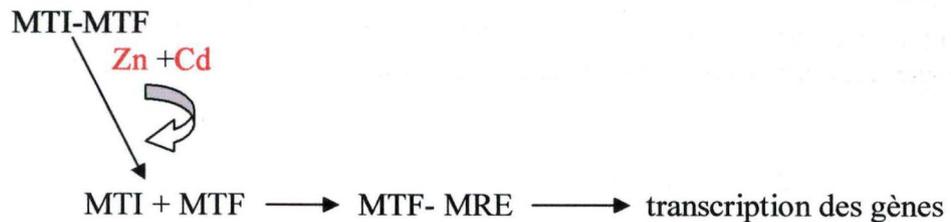
Le facteur qui déclenche la synthèse de métallothionéines, dans le cas d'une exposition au cadmium, est la concentration en cadmium elle-même (Roesijadi, 1992). Plus il y a de cadmium dans la cellule, plus elle synthétise ces protéines.

Les métaux peuvent induire cette expression. Ils activent les MRE (metal responsive elements) qui eux vont activer les MTF (metal transcription factor). Ces derniers agissent sur les gènes des métallothionéines en activant leur expression (fig 11).

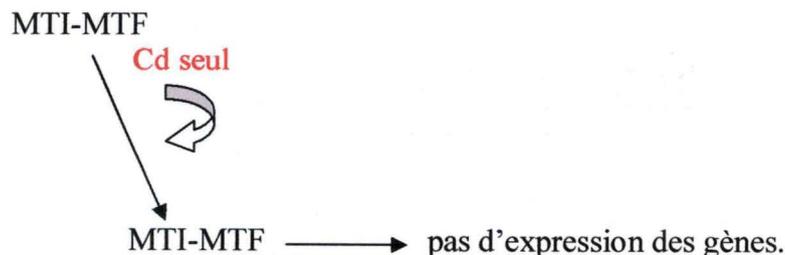
L'extrémité 5' des gènes de métallothionéines contient une boîte TATA ainsi que d'autres éléments incluant les séquences MREs. Lorsqu'elles se lient au cadmium, ces MREs vont à leur tour se lier aux MTF. C'est cette séquence qui sert de médiateur dans l'expression des gènes de métallothionéines induite par les métaux (Klaassen et al., 1999).

Ce MTF est sous le contrôle d'un inhibiteur sensible au zinc. En l'absence de zinc, le MTF reste complexé à l'inhibiteur tandis qu'en présence de zinc, le MTI (metallothionein transcription inhibitor) se dissocie du MTF qui peut alors interagir avec le MRE et induire l'activation des gènes de métallothionéines.

Dans le cas de la présence de zinc et de cadmium



Dans le cas de présence de cadmium sans zinc.



b. Organes.

Cette synthèse de métallothionéines chez de telles espèces se fait dans tous les organes qui sont contaminés par le cadmium c'est-à-dire les branchies et l'hépatopancréas (Legras et al., 2000).

Les métallothionéines sont synthétisées dans les branchies puisqu'une quantité importante de cadmium s'y trouve. Ceci confirme son rôle majeur dans l'absorption du métal.

Elles sont également synthétisées dans l'hépatopancréas puisque c'est l'organe majeur de détoxification à long terme du contaminant (Mouneryacet al., 2001).

c. Cinétique.

Beaucoup d'études démontrent une relation entre le cadmium accumulé (soit par alimentation, soit par eau du milieu ambiant ou soit par des injections directes de cadmium dans l'organisme) et la synthèse de métallothionéines.

En général, chez *Carcinus maenas*, le crabe vert, c'est dans les branchies que se trouve la synthèse la plus importante de métallothionéines (Chan et al., 2002). Ceci est probablement dû à son rôle de pompage du métal.

Par la suite, c'est dans l'hépatopancréas que se fait cette synthèse. Chan (2002) proposait l'hypothèse d'une redistribution du cadmium des différents organes vers l'hépatopancréas qui est l'organe de stockage et de détoxification.

Chez la souris, la synthèse de métallothionéines augmente de 17 à 25 fois en 1 heure lorsque l'animal est exposé au cadmium. L'accumulation maximale d'ARNm de métallothionéine est atteinte après 4-6 heures d'exposition (Hamer, 1986).

Dans une étude réalisée par Pedersen et al. (1998), des crabes (*Carcinus maenas*) étaient contaminés à différentes concentrations (0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 et 4 mg Cd/ kg poids sec) pendant différentes périodes (1, 6, 10, 15, 20 jours respectivement).

Ils ont observé que dans l'hépatopancréas, il y avait des concentrations de cadmium 200 fois supérieures (597,6 nmol/g) par rapport aux crabes témoins (3,2 nmol/g). Les concentrations en métallothionéines étaient proportionnelles à celles de cadmium accumulé dans cet organe : il y avait 6 fois plus de MT dans l'hépatopancréas des crabes contaminés (63 nmol/g poids sec) par rapport aux crabes témoins (10,1 nmol/g poids sec).

La présence de métallothionéines chez les crabes témoins provient du fait qu'il y a une synthèse due à la présence naturelle de cuivre et de zinc dans l'organisme.

La demi-vie biologique des métallothionéines varie en fonction de la nature du métal associé. Elle est beaucoup plus longue s'il s'agit du complexe Cd-MT que si c'est Zn-MT.

Le rendement de la dégradation des métallothionéines par la trypsine en 24 heures est de 15% pour le complexe Cd-MT et de 17% s'il s'agit du complexe Zn-MT. Par contre, les extraits de lysosomes dégradent ces deux MT respectivement de 17% et 50% en 1 heure. Tandis que la Cu-MT résiste à cette dernière dégradation. Il y a formation d'agrégats insolubles de Cu-MT dans les lysosomes suite, probablement à une oxydation des groupes thiols et à la formation de ponts disulfures intermoléculaires (Amiard et Cosson, 1997).

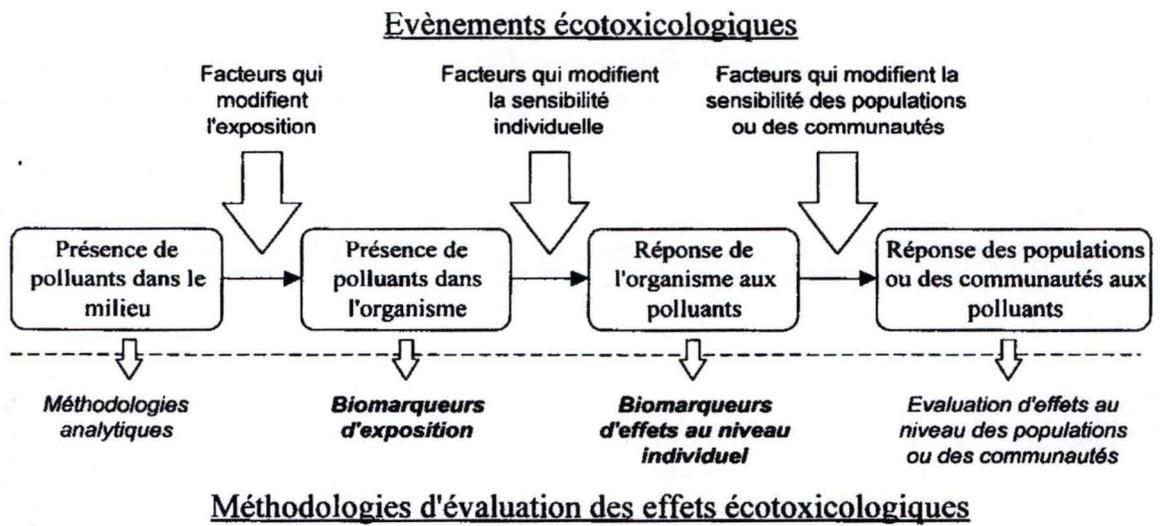


Fig 12 : représentation des méthodologies faisant appel à l'utilisation des biomarqueurs dans l'évaluation des risques écotoxicologiques

Utilisation comme biomarqueur

Un biomarqueur est indispensable pour refléter l'état de l'environnement dans lequel vivent les individus (van der Oost et al., 2003) (Fig 12).

Un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic et al., 1997).

Différents types de biomarqueurs peuvent être mis en évidence.

Tout d'abord, les biomarqueurs d'exposition indiquent que le polluant a pénétré dans l'organisme. Ils sont le résultat de l'interaction du polluant avec des molécules biologiques dans les tissus et/ou dans les liquides corporels.

Ensuite, les biomarqueurs d'effet montrent qu'après être entré dans l'organisme et avoir été distribué dans les différents organes, ce polluant a exercé un effet, toxique ou non, sur une cible critique.

Et enfin, les biomarqueurs de sensibilité qui signalent l'existence d'une sensibilité génétique différente vis-à-vis de certains toxiques dans la pollution (Lagadic et al. 1997).

Les biomarqueurs contribuent surtout au maintien de l'homéostasie de l'organisme. On peut dire aussi qu'ils tamponnent l'action des polluants sur les individus si elle est assez limitée. Quand la dose et/ou la durée d'exposition augmentent, certains biomarqueurs interviennent alors pour compenser l'action des polluants, surtout pour limiter leur toxicité. Les métallothionéines sont des biomarqueurs de compensation. Elles font donc partie des biomarqueurs qui montrent la souffrance de l'organisme mais favorisent sa guérison (Lagadic et al., 1997).

Si la durée d'exposition et/ou la dose interne augmente encore, l'intervention des biomarqueurs de compensation n'est plus suffisante. Cela conduit à une issue fatale pour les organismes. Le milieu sera alors colonisé par des espèces plus résistantes, que l'on appelle les espèces bioindicatrices de pollution.

Les biomarqueurs sont plus sensibles que les bioindicateurs et permettent donc de déceler une contamination avant qu'elle ne produise un effet sur une population entière. C'est là un de leurs avantages.

Un autre avantage est que l'utilisation de biomarqueurs d'exposition et d'effet, combinés à l'utilisation d'espèces sentinelles apporte une aide précieuse en matière d'évaluation de l'impact des pollutions sur l'écosystème à long terme, donc, sur leur état de santé.

Parmi les biomarqueurs, il est possible de distinguer plusieurs catégories en fonction de leur sensibilité à diverses catégories de toxiques. Certains parmi les biomarqueurs d'exposition ou d'effet renseignent sur des perturbations d'ordre général liées à la présence d'un ou de plusieurs toxiques tandis que d'autres manifestent une sensibilité particulière à certaines classes de polluants comme les métallothionéines qui sont sensibles aux métaux lourds (Lagadic et al., 1997).



Fig 13 : *Eriocheir sinensis* d'après <http://www.nhm.ac.uk/zoology/crab/>

Par exemple, chez *Carcinus maenas*, les métallothionéines sont de bons biomarqueurs lors d'une exposition au cadmium. Pedersen et al. (1998) ont observé des concentrations 6 fois supérieures chez les individus contaminés par rapport aux individus témoins.

Dans leur étude, Pedersen et al. (1997) ont conclu que les métallothionéines pouvaient être utilisées comme biomarqueur chez *Carcinus maenas* mais uniquement dans certains tissus parce qu'une certaine corrélation a été observée entre les concentrations en cadmium et en métallothionéines synthétisées suite à cette contamination.

Description de l'espèce étudiée

Le crabe chinois, *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards, 1854) fait partie de l'ordre des Décapodes et de la famille des *Grapsidae* (Fig 13).

1 Distribution et abondance.

Il s'agit d'une espèce qui vivait initialement dans les rivières côtières et dans les estuaires de Corée et de Chine, près de la Mer Jaune (Veldhuizen, 1999).

En 1912, il a été aperçu en Allemagne et depuis, il est retrouvé un peu partout dans l'hémisphère Nord : en Asie (en Corée et en Chine), en Amérique du Nord (Californie dans le détroit de la rivière de Windsor, Ontario) et en Europe (Danemark, Hollande, Belgique, nord de la France) (Clark et al., 2003).

Cette dispersion a pu se produire via les courants océaniques, les transports d'eau de lest, les transports humains,... (Veldhuizen, 1999).

Il est caractérisé par des poils bruns qui recouvrent les pinces antérieures. Ces poils sont plus abondants chez les mâles et absents chez les juvéniles (Falciai et Minervini, 1996).

Une de leurs particularités est qu'ils vivent dans les eaux douces mais peuvent vivre également en eau salée. Ils vivent la majeure partie de leur vie en eau douce mais retournent en mer pour pondre. Ils sont donc catadromes (Clark et al., 2003).

2 Cycle de vie.

Les trois stades principaux sont :

- a. Le stade larvaire
- b. Le stade juvénile
- c. Le stade adulte

Les œufs sont portés par la femelle jusqu'à leur éclosion au printemps ou au début de l'été.

Pour que cette ponte ait lieu, la stabilité du milieu marin est un des paramètres nécessaires, c'est pourquoi les crabes vont migrer des eaux douces vers les eaux de mer (Veldhuizen, 1999). C'est également en eau de mer que l'accouplement aura lieu.

Les larves sont planctoniques pendant 1 à 2 mois durant lesquels elles vont passer par différents stades de vie.

Les juvéniles ont une taille d'environ 25-40 mm et vont se développer surtout dans les zones où la végétation est submergée.

Les adultes arrivent à maturité vers l'âge de 4-5 ans selon les conditions environnementales (Robbins et al., 2003).

A la fin de l'été et au début de l'automne, ces crabes migrent vers des eaux plus salées pour la reproduction. Le développement gonadal a lieu pendant cette migration et les œufs (250 000-1 000 000) vont éclore au printemps (Veldhuizen, 1999).

3 Croissance.

Le taux de croissance est inversement proportionnel à la taille.

Les petits crabes grandissent de 24% à chaque mue alors que les plus grands ne grandissent que de 11% (Veldhuizen, 1999).

4 Alimentation.

Ces invertébrés sont omnivores et se nourrissent principalement de macroinvertébrés. Ils consomment aussi la végétation submergée.

Objectifs du mémoire

Le premier objectif du mémoire est de mettre au point le dosage quantitatif du cadmium et des métallothionéines chez *Eriocheir sinensis*. Ces techniques doivent être rapides et simples afin de pouvoir les utiliser ultérieurement dans des études applicables aux conditions de terrain en écotoxicologie.

Les concentrations en cadmium sont mesurées dans différents organes : les branchies, l'hépatopancréas, la carapace, les muscles et l'hémolymphe. Celles des métallothionéines sont mesurées dans les branchies et dans l'hépatopancréas.

Un second objectif est de distinguer les différences dans l'accumulation du cadmium dans les organes du crabe chinois ainsi que la synthèse de métallothionéines en stress aigu, en stress chronique et en stress aigu provoqué après un stress chronique. Cela permettra de démontrer un rôle possible des métallothionéines dans l'acclimatation des crabes chinois au cadmium ainsi que leur utilisation en tant que biomarqueurs dans des pollutions au cadmium.

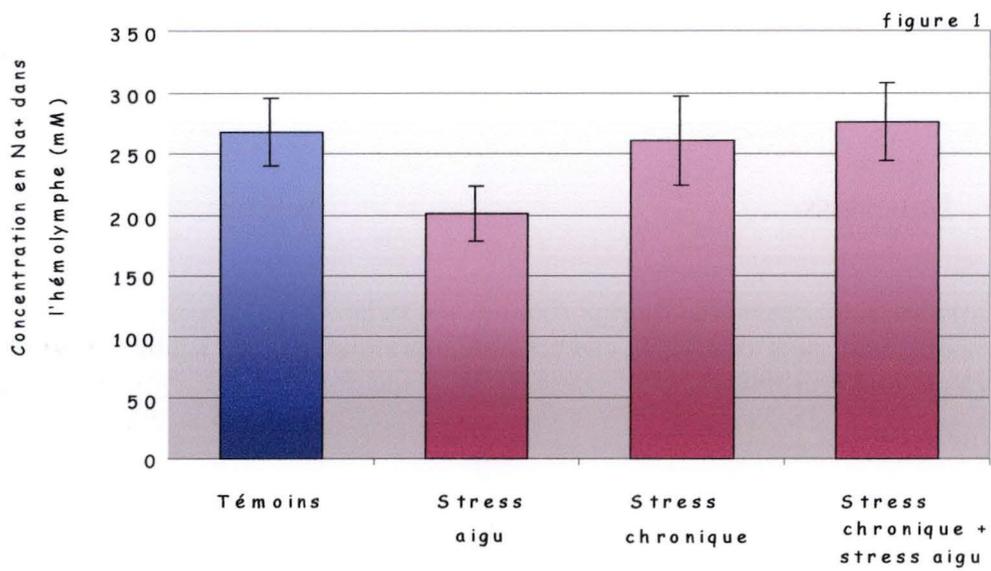


Fig. 14: Concentration en sodium dans l'hémolymph (mM) chez les organismes témoins, c'est-à-dire, ceux ayant subi un stress aigu ou un stress chronique et chez les individus ayant subi les deux stress consécutivement.

Ce travail scientifique a été mis sur pieds afin de confirmer ce qui avait été observé lors des expériences réalisées dans le laboratoire d'écotoxicologie.

Ces expériences consistaient à mesurer la concentration en sodium dans l'hémolymph chez des crabes chinois, *Eriocheir sinensis* témoins, des témoins qui ont été contaminés avec une concentration de 0,5 mg Cd²⁺/l pendant 3 jours ainsi que sur des organismes qui ont subi d'abord un stress chronique d'une concentration de 50 µg Cd²⁺/l pendant 30 jours et ensuite, une moitié de ce groupe a subi un stress aigu de 0,5 mg Cd²⁺/l pendant 3 jours (Fig 14).

Ces expériences se sont révélées très intéressantes puisqu'elles montraient une acclimatation des organismes lors du stress chronique alors qu'en stress aigu (TC), aucune acclimatation ne s'observait. Cette acclimatation s'est manifestée par des concentrations en sodium identiques chez les témoins (T), chez les organismes ayant subi un stress chronique (C50) et chez ceux qui ont subi un stress aigu après le stress chronique (CC50). Alors qu'en condition de stress aigu (TC), une diminution de cette concentration était constatée.

Le but de ce mémoire est également de confirmer cette acclimatation en observant les accumulations de cadmium dans les différents organes chez les crabes stressés et chez les témoins. De la sorte, nous pourrions comparer les différentes concentrations mesurées et de voir s'il y a également une acclimatation au niveau de l'accumulation du cadmium.

Matériel et Méthodes

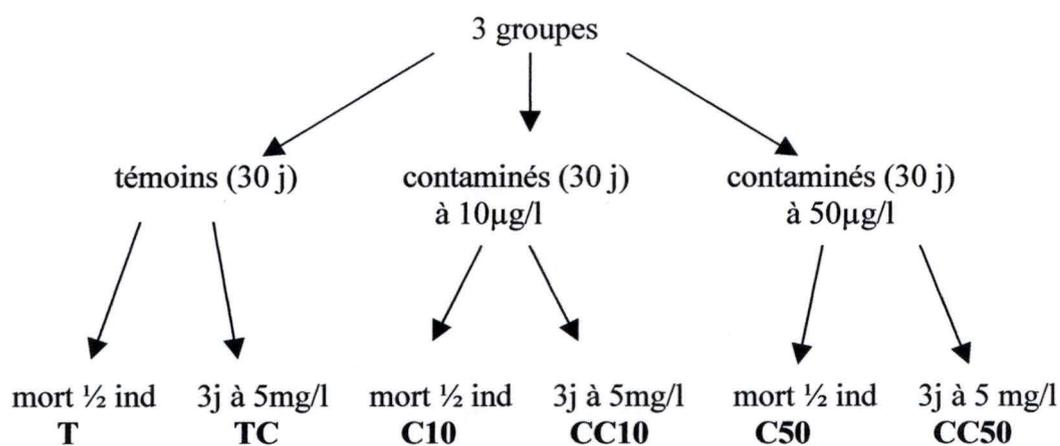


Fig 15 : répartition des groupes de contamination

| | moyenne |
|---------|---------|
| T° | 14,41 |
| pH | 8,22 |
| O2 conc | 7,88 |
| O2 % | 80,02 |
| conduct | 681,78 |

Fig 16 : tableau des moyennes des paramètres physicochimiques mesurés pendant Les contaminations

| | Mortalité |
|---|----------------------|
| Bac témoins | 9 morts/30 individus |
| Bac contamination 10 µg Cd ²⁺ /l | 3 morts/30 individus |
| Bac contamination 50 µg Cd ²⁺ /l | 4 morts/30 individus |

Fig 17 : mortalité des crabes

Contamination des organismes

Les crabes chinois, *Eriocheir sinensis* (Milne Edouard, 1854), proviennent d'un lac d'eau douce situé à Emden, au Nord-Ouest de l'Allemagne. Différents paramètres du lac ont été mesurés au moment de la capture en automne 2002 ou sur un échantillon d'eau ramené au laboratoire.

| | |
|---------------------------------------|--------|
| Température (°C) (à 14h) | 14,6 |
| Concentration Cd ²⁺ (mg/l) | <0.001 |
| Concentration Ca ²⁺ (mg/l) | 0,032 |
| Concentration O ₂ (mg/l) | 8,6 |
| Saturation en O ₂ (% sat) | 85 |
| Conductivité (µS/cm) | 2600 |
| Salinité (‰) | 0,6 |
| Osmolarité (mOsm/kg) | 20 |
| pH | 7.9 |

Avant de débiter les contaminations, les crabes ont d'abord été acclimatés à l'eau courante de Namur pendant une période de 1 mois. Cette eau a comme caractéristiques physico-chimiques une concentration en Cd²⁺ inférieure à 1 µg/l, une concentration en Ca²⁺ de 0,037 mg/l et une osmolarité de 2 mOsm/kg. Les dosages de cadmium et de calcium ont été effectués par spectrométrie d'absorption atomique. Celui du cadmium a été réalisé par le CEBEDEAU (Centre Belge d'Etude et de Documentation de l'eau) à Liège tandis que celui du calcium s'est fait à Namur aux FUNDP.

Après cette période, les crabes en intermue ont été répartis dans trois bassins contenant chacun 30 mâles ayant un poids moyen de 85,5 grammes et une largeur moyenne (mesurée à l'endroit où la carapace est la plus large c'est-à-dire près de la dernière paire de pattes) de 54,5 mm. L'annexe 1 reprend le détail des poids et taille de chaque individu.

Ces organismes ont d'abord été soumis à un **stress chronique** de 30 jours.

Le premier bassin ne contenait pas de cadmium et les organismes servaient de témoins. Les crabes du second bac étaient soumis à une concentration de 10 µg Cd²⁺/l et le troisième contenait une concentration de 50 µg Cd²⁺/l. Le cadmium servant aux contaminations a été ajouté sous forme de CdCl₂ (*Sigma*, Saint-Louis, USA)

Par la suite, la moitié des organismes dans chaque bassin ont été tués alors que les autres ont subi un **stress aigu** qui correspondait à une contamination de 0,5 mg Cd²⁺/l pendant 3 jours au bout desquels ils ont également été tués (Fig 15). Les organismes sont tués en broyant leurs ganglions cérébraux.

Pendant toute la période des contaminations, l'eau des bassins a été changée régulièrement (les lundi, mercredi et vendredi) et les organismes ont été nourris (3 bâtons de concentré de poissons (surimi) pour 5 organismes) aux mêmes dates. L'eau était continuellement oxygénée par deux pompes dans chaque bassin. Lorsque l'eau était changée, différents paramètres étaient mesurés (t°, pH, concentration en O₂, %O₂, conductivité). La moyenne de ces

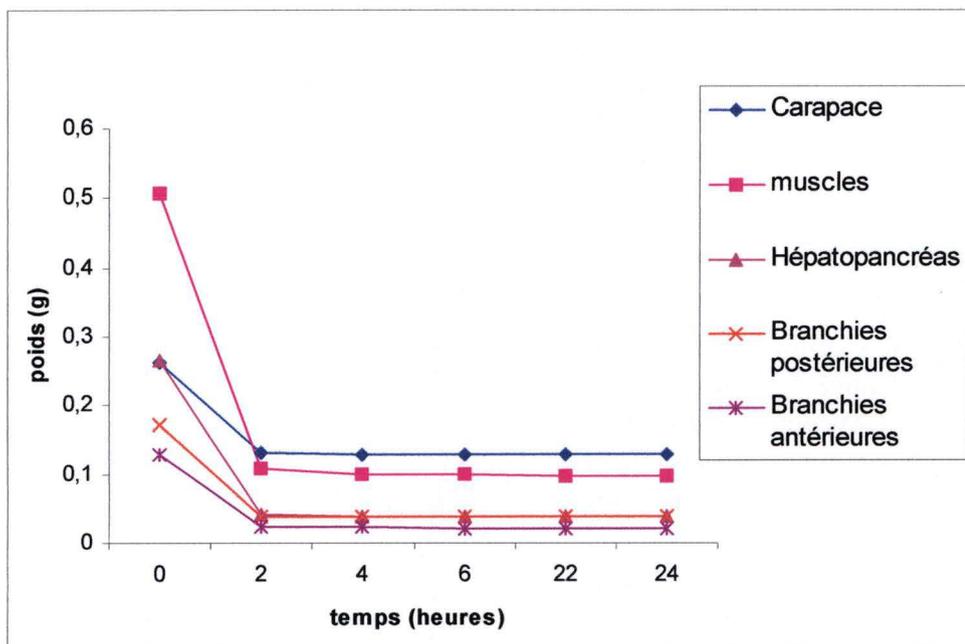


Fig 18 : Evolution des poids des organes analysés pendant les 24 heures de déshydratation

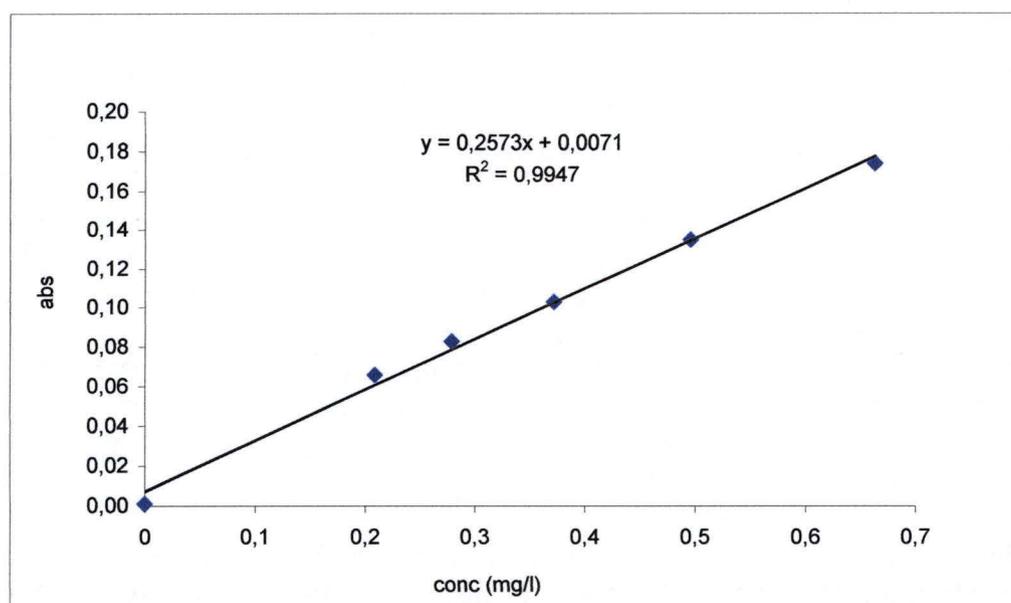


fig 19 : Exemple de droite étalon obtenue lors du dosage du Cd par AAS

paramètres est reprise à la figure 16, aucune différence n'a été remarquée entre les différents bassins. Afin de suivre le taux de mortalité, le nombre de crabes morts était noté à chaque changement d'eau (Fig 17). On peut remarquer que la mortalité n'est pas plus importante chez les crabes ayant subi les conditions de stress que chez les témoins.

Avant de tuer les crabes, ils ont été pesés et mesurés (voir annexe) et un prélèvement d'hémolymphe (environ 2 ml) a été effectué en implantant une seringue dans la première articulation d'une des pattes.

Différents organes ont été prélevés : les 3 plus grandes branchies antérieures (groupées) et les 3 branchies postérieures (également groupées) (les branchies de la partie gauche du corps ont été séparées de celles de la partie droite), l'hépatopancréas, les muscles des pattes et quelques morceaux de carapace.

Ces échantillons ont d'abord été fixés dans l'azote liquide et ensuite conservés à -80°C jusqu'à l'analyse.

Dosage du cadmium

1. Par spectrométrie d'absorption atomique (AAS).

Afin de réaliser le dosage de cadmium dans les différents organes, deux étapes sont nécessaires.

Tout d'abord une déshydratation : les organes ont été placés dans une étuve à 120°C pendant 24 heures après quoi la déshydratation est totale (Fig 18).

Ensuite, les organes ont été digérés et minéralisés dans l'acide nitrique (HNO_3 95% pour analyse, *Sigma*, Saint-Louis, USA).

La quantité d'acide était de 1 ml pour tous les organes contaminés et de 0.8 ml pour les organes prélevés sur les organismes témoins afin de concentrer au maximum ces derniers (étant donné que le volume minimum pour doser au spectromètre est de 0,6 ml) dans lesquels la concentration en cadmium devait être très faible. Les organes sont restés 24 heures dans un bain-marie à 80°C , au bout desquelles la minéralisation était complète.

Chaque échantillon digéré a été centrifugé à 12 000 g pendant 15 minutes afin de séparer toutes les petites particules de graisse qui auraient pu rester dans l'échantillon.

La concentration en cadmium a alors été déterminée grâce à un spectromètre d'absorption atomique (AAS) à une longueur d'onde de 228.8 nm.

Le spectromètre prenait 3 mesures à 0.5 seconde d'intervalle.

Pour convertir l'absorbance donnée en concentration ($\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$ de poids sec), une droite d'étalonnage a été établie avec 5 concentrations différentes à partir d'une solution stock de cadmium (*Sigma*, Saint-Louis, USA): 0.209 ppm, 0.279 ppm, 0.372 ppm, 0.496 ppm, 0.663 ppm dans l'acide HNO_3 (Fig 19).

Blancs

| | abs | concentration (mg/l) |
|---------|--------|----------------------|
| 1 | 0,008 | |
| 2 | 0,006 | |
| 3 | 0,005 | |
| 4 | 0,005 | |
| 5 | 0,004 | |
| 6 | 0,006 | |
| 7 | 0,004 | |
| 8 | 0,004 | |
| 9 | 0,004 | |
| 10 | 0,005 | |
| moyenne | 0,0051 | 14,423 |
| ET | 0,0013 | |
| LD | 0,0077 | 21,701 |
| QLD | 0,038 | 108,504 |

Standards (0,497 mg/l)

| | abs |
|---------|-------------|
| 1 | 0,181 |
| 2 | 0,181 |
| 3 | 0,181 |
| 4 | 0,182 |
| 5 | 0,182 |
| 6 | 0,183 |
| 7 | 0,182 |
| 8 | 0,183 |
| 9 | 0,182 |
| 10 | 0,182 |
| moyenne | 0,182 |
| ET | 0,001 |
| CV | 0,4% |

Fig 20 : concentrations des limites de détection (LD), des quantités limites détectables (QLD) et du coefficient de variabilité (CV) (ET: écart-type)

Afin de réaliser ce dosage, différentes mises au point ont été nécessaires. Nous avons d'abord comparé la méthode classique de dosage de cadmium (dosage du cadmium qui se trouve dans les échantillons) et la méthode par ajout d'une quantité connue de cadmium (le standard 1 avait une concentration de 0,5 mg/l et le second 1 mg/l).

De cette comparaison, nous avons tiré comme conclusion que la méthode par ajout de standard n'était pas nécessaire étant donné que les pentes des graphes des deux méthodes étaient identiques.

Ensuite, nous avons déterminé la limite de détection (LD) de l'appareil comme étant la moyenne de 10 mesures consécutives d'un blanc (HNO₃):

$$L.D. = \text{moyenne des 10 blancs} + (2 \times \text{écart type})$$

Cette valeur correspond à la limite en dessous de laquelle toute mesure est affectée d'une erreur de 50%. Dans notre cas, elle était de 7,2 mg/l ce qui correspond environ à 5 µg de cadmium par test de 0,6 ml.

Nous avons également calculé la quantité limite détectable (Q.L.D.) qui est de 5 fois la L.D. Elle valait 36,1 mg/l (25 µg de cadmium par test de 0,6 ml) dans nos expériences.

Nous avons aussi passé 10 fois un même standard (0,497 mg/l) au spectromètre afin de déterminer la précision de cet appareil. Cette précision se calcule en faisant le rapport entre l'écart type et la moyenne des dix mesures d'absorption du standard. Ce rapport est ensuite multiplié par 100 pour obtenir un pourcentage (Fig 20). Nous avons obtenu un coefficient de variabilité de 0,4%.

2. Analyse des résultats

Après avoir vérifié l'homogénéité des variances par le test de Levene (Dagnelie, 1975), nous avons réalisé une analyse de la variance à un critère de classification (ANOVA 1) et un test de Scheffé pour mettre en évidence des différences significatives ($P < 0,05$) entre les différentes conditions de stress.

Les valeurs tenues en compte dans ces analyses sont celles qui étaient comprises dans un intervalle de confiance de 99%.

Dosage des métallothionéines dans les branchies et l'hépatopancréas

1. Par spectrophotométrie.

Cette technique consiste à doser les métallothionéines partiellement purifiées par quantification des résidus –SH en utilisant le réactif d'Ellman (DTNB: acide 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoïque). Ce réactif va se lier aux groupements –SH des protéines et le spectrophotomètre mesure la quantité de DTNB lié aux protéines en effectuant une lecture à 412 nm (Viarengo et al., 1997).

Pour ne pas surestimer la quantité de métallothionéines, il faut que celles-ci soient purifiées au maximum et ainsi, lorsque le DTNB se liera aux groupements –SH, il ne restera plus que ceux des métallothionéines.

a. Purification partielle des métallothionéines.

L'échantillon est d'abord homogénéisé dans un tampon sucrose 0,5M auquel est ajouté du Tris-HCl 20 mM (*Janssen*, Beerse, Belgique), un cocktail d'anti-protéases (1 ml/20 g de tissus) (*Sigma*, Saint-Louis, USA) et du β -mercaptoéthanol (0,01%) (*Sigma*, Saint-Louis, USA).

Les branchies sont diluées 10 fois dans ce tampon et l'hépatopancréas, 3 fois.

L'homogénat est centrifugé à 30 000 g pendant 20 minutes à 4°C.

Ensuite, pour faire précipiter les protéines moins solubles que les métallothionéines, le surnageant est mélangé à 1,05 ml d'éthanol (*Vel*, Leuven, Belgique) et 80 μ l de chloroforme (*Vel*, Leuven, Belgique). Ces deux réactifs doivent être ajoutés au surnageant très lentement (cette manipulation doit prendre environ 10 minutes) et dans une chambre froide (4°C).

Le mélange est centrifugé à 6 000 g pendant 10 minutes à 4°C et le surnageant contenant les métallothionéines est récupéré.

Afin de faire précipiter les métallothionéines, le surnageant est mélangé avec 1 mg d'ARN (*Sigma*, Saint-Louis, USA), 40 μ l d'HCl 37% (*Vel*, Leuven, Belgique) et 3 volumes d'éthanol 87% (conservé à –20°C) (*Vel*, Leuven, Belgique) comme décrit par Viarengo (1997).

L'échantillon est placé une heure à –20°C après quoi il est centrifugé à 6 000 g pendant 10 minutes à 4°C.

Après ces différentes centrifugations, le culot est lavé avec une solution contenant 87% d'éthanol (*Vel*, Leuven, Belgique), 12% du tampon d'homogénéisation et 1% de chloroforme (*Vel*, Leuven, Belgique).

Le tout est centrifugé à 6 000 g pendant 10 minutes à 4°C.

A (2X) B (2X)

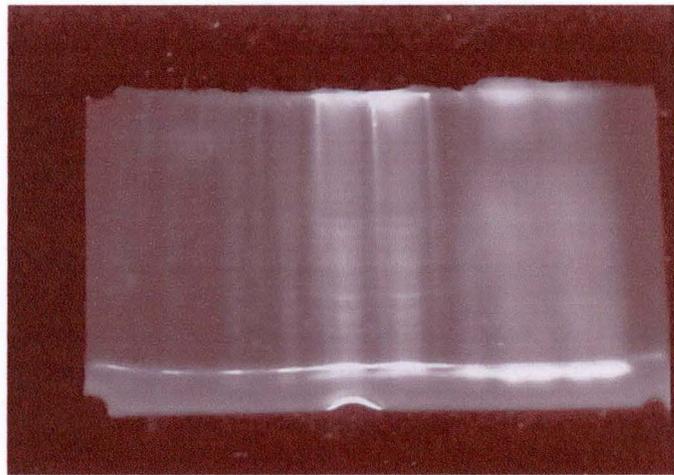


Fig 21 : Gel de SDS 10% réalisé pour comparer la purification des MT par la technique de haute température (A) et celle d'éthanol/chloroforme (B) avec un marquage des MT par le thyolite

Le culot est ensuite séché à l'azote afin d'empêcher l'oxydation des métallothionéines.

Pour vérifier la purification, on fait une électrophorèse. Dans ce but, le culot final est mis en présence de thiolyte (substance fluorescente se liant aux groupements -SH des protéines) 6 mM (100 µl) (*Sigma*, Saint-Louis, USA) et la solution incube 30 minutes dans le noir. Ensuite, l'échantillon est laissé 30 minutes dans un bain-marie à 37°C après y avoir ajouté du SDS 4% (100 µl) (*Sigma*, Saint-Louis, USA). Pour terminer, la solution finale est déposée sur le gel (SDS 15%T - 0.4%C).

Le gel est chargé avec 20 µl d'échantillon et il migre à 250 volts pendant 1h30 environ dans un tampon composé de Tris-HCl 0,05M pH 8,5 (*Janssen*, Beerse, Belgique), de glycine 0,38M (*Sigma*, Saint-Louis, USA), de SDS 1% (*Sigma*, Saint-Louis, USA) et de β-mercaptoéthanol 0,01% (*Sigma*, Saint-Louis, USA).

Pour autant que les métallothionéines soient purifiées au maximum, elles peuvent être quantifiées par spectrophotométrie.

b. Dosage par spectrophotométrie.

Le culot séché à l'azote n'est plus mis en suspension dans le thiolyte mais bien dans une solution de NaCl 0,25 M (150 µl) et de HCl 1N (150 µl) (*Vel*, Leuven, Belgique) et contenant de l'EDTA 4mM.

Ensuite, à ce mélange, on ajoute 4,2 ml de NaCl 2M contenant du DTNB 0,43mM (*Sigma*, Saint-Louis, USA).

Ces ajouts se font à température ambiante.

Cette solution est tamponnée avec du Na-phosphate 0,2M, pH 8.

Ce mélange est centrifugé à 3 000 g pendant 5 minutes.

Ensuite, l'absorbance est lue à 412nm.

Différentes mises au point ont été nécessaires avant d'appliquer cette technique à nos échantillons expérimentaux.

Au départ, selon Viarengo (1997), nous devions travailler avec un gel de SDS à 10% (Fig 21). Or, il est impossible d'observer les métallothionéines sur le gel avec cette concentration en acryl étant donné le faible poids moléculaire des métallothionéines (6130 Da). Les protéines se trouvaient dans la ligne de migration. C'est alors que nous avons décidé de changer cette concentration et nous avons travaillé avec des gels de SDS 15%T-0,4%C. N'ayant aucun résultat correct (plusieurs bandes étaient présentes sur le gel), nous avons laissé l'échantillon au repos 1h30 à -20°C et non plus 1h en pensant que les métallothionéines n'avaient pas précipité après 1h. Aucun résultat ne nous satisfaisait. Par mesure de précaution, nous avons aussi essayé de laisser l'échantillon 12h. En comparant avec l'échantillon qui y était resté 1h, aucune amélioration n'a été observée.

Toujours pour améliorer les conditions de précipitation des métallothionéines, les concentrations en éthanol/chloroforme ainsi que celles de l'ARN/HCl/éthanol ont été modifiées.



Fig 22 : Gel avec différentes concentrations en éthanol, chloroforme et ARN pour comparer différentes conditions de précipitation des MT par le thyolite

- A. 1,05 ml éth + 80 μ l chl + 1 mg ARN
- B. 1,55 ml éth + 120 μ l chl + 1 mg ARN
- C. 1,05 ml éth + 80 μ l chl + 2 mg ARN
- D. 1,55 ml éth + 120 μ l chl + 2 mg ARN

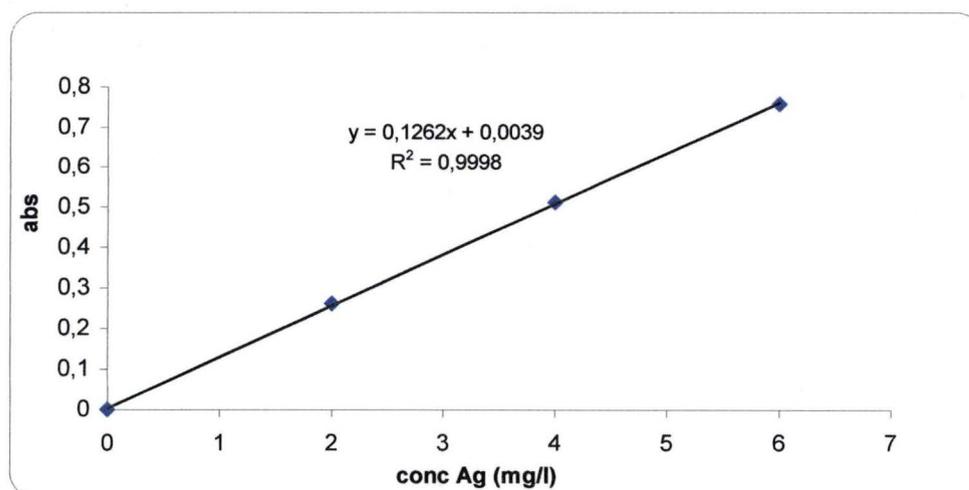


fig 23 : exemple de droite étalon obtenue lors du dosage d'argent par AAS

| | Normal | 1 ^{ème} test | 2 ^{ème} test | 3 ^{ème} test |
|--------------------|---------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Ethanol | 1.05 ml | 1.55 ml | 1.05 ml | 1.55 ml |
| Chloroforme | 80 µl | 120 µl | 80 µl | 120 µl |
| ARN | 1 mg | 1 mg | 2 mg | 2 mg |

Après ces différentes modifications, nous voyions toujours plusieurs bandes sur le gel, ce qui nous montrait que les métallothionéines n'étaient pas purifiées du tout (fig 22).

Vu que selon la littérature, les métallothionéines sont des protéines stables à haute température, nous avons tenté de les purifier en chauffant l'échantillon à 75°C pendant une durée de 15 minutes en espérant que les autres protéines précipitent (étant donné qu'elles sont moins résistantes à la chaleur, elles se dénaturent et précipitent). Dans ce cas, nous avons observé une bande de protéines sur le gel mais nous n'avions aucune certitude que c'étaient bien les protéines recherchées étant donné qu'elles ne se trouvaient pas à la bonne hauteur sur le gel.

Puisque nous nous demandions où étaient les métallothionéines, nous avons gardé tous les culots et surnageants après l'homogénéisation. Des bandes plus ou moins pures apparaissaient sur le gel dans le culot obtenu après la première centrifugation (c'est-à-dire après l'ajout d'éthanol et de chloroforme) mais ces résultats n'étaient pas reproductibles et donc ils n'étaient pas fiables.

Puisque toutes ces modifications ne nous montraient pas la présence de métallothionéines partiellement purifiées, nous avons choisi de faire un gel de 11 cm (et plus un mini-gel) et de le colorer avec le bleu de Coumassie (*Sigma*, Saint-Louis, USA). Ainsi, nous pouvions comparer les bandes obtenues avec le thioylte et celles obtenues avec le bleu de Coumassie. Vu que les bandes correspondaient, nous avons pensé que les métallothionéines n'étaient peut-être pas dénaturées. Au lieu d'utiliser le β -mercaptoéthanol, nous avons utilisé le DTT (*Sigma*, Saint-Louis, USA) comme agent réducteur et nous avons remarqué que cela ne changeait rien à la purification des métallothionéines.

C'est alors que nous avons mis sur le gel, en même temps que nos fractions, une solution de 20 µl de métallothionéines purifiées de lapin (*Sigma*, Saint-Louis, USA) diluées dans le tampon d'homogénéisation (1 mg/ml) ainsi que des marqueurs moléculaires. Même la bande à laquelle on s'attendait (celle des métallothionéines purifiées) n'apparaissait pas sur le gel.

Vu les difficultés rencontrées, il aurait fallu alors passé beaucoup trop de temps sur la mise au point. Étant donné qu'un des objectifs du travail était de mettre au point une technique rapide et que celui-ci n'était pas atteint avec cette technique, une autre option s'offrait à nous : dosage des métallothionéines par saturation à l'argent.

2. Par saturation à l'argent.

Le principe de cette manipulation est de quantifier les métallothionéines totales de manière indirecte en dosant l'argent qui se lie aux métallothionéines. Lors de la saturation, l'argent déplace le cadmium ainsi que tous les autres métaux se liant moins fortement que lui aux métallothionéines et va se fixer aux groupements -SH. Par spectrométrie d'absorption atomique (AAS), l'argent est dosé.

Etant donné que la concentration en argent est proportionnelle à celle de métallothionéines, cette dernière peut être calculée.

Afin de réaliser le dosage d'argent sur les échantillons expérimentaux, il faut effectuer différents traitements dont le premier est une homogénéisation des échantillons au moyen d'un potter (2 x 30 secondes à froid) dans un tampon sucrose 0.25M auquel est ajouté une certaine quantité d'anti-protéase pour les homogénats de foie (1ml/20 g). L'hépatopancréas est dilué trois fois et les branchies cinq fois. Les homogénats sont centrifugés à une vitesse de 18 000 g pendant 20 minutes. Une quantité de 400 µl d'homogénat est mélangée à 400 µl de tampon glycine 0,5M (*Sigma*, Saint-Louis, USA) (mis à un pH de 8 avec du NaOH 4N). Un volume de 0,5 ml de solution d'argent 2,5 µg Ag²⁺/ml (préparée à partir d'une solution d'AgNO₃ (*Vel*, Leuven, Belgique) diluée dans de l'eau distillée) est ajouté à ce mélange et l'échantillon est laissé au repos pendant 5 minutes à température ambiante.

Un traitement avec de l'hémolysat de globules rouges de mouton va suivre cette saturation pour faire précipiter l'argent qui n'est pas lié aux métallothionéines.

L'hémolysat de globules rouges a été préparé à partir de sang de mouton maintenu sous héparine au frais (4°C).

10 ml de ce sang ont été mélangés avec 80 ml d'une solution de KCl isotonique (1,15%) (*Vel*, Leuven, Belgique) héparinisée. Ce mélange a ensuite été centrifugé à 500 g pendant 5 minutes. Après cette centrifugation, le culot est mis en suspension dans 30 ml de cette même solution de KCl mais sans héparine. Le tout est centrifugé à 500 g pendant 5 minutes. Ces deux dernières opérations sont à effectuer 2 fois. Après ceci, le culot est lysé dans 15 ml d'un tampon Tris-HCl 30 mM (pH 8) (*Janssen*, Beerse, Belgique). Le mélange est laissé au repos pendant 10 minutes à température ambiante et est ensuite centrifugé à 8000 g pendant 10 minutes.

Le culot est abandonné et le surnageant est divisé en aliquots de 1,5 ml et gardé jusqu'à son utilisation à -20°C.

200 µl de cet hémolysat est ajouté à l'échantillon et celui-ci est ensuite laissé pendant 1,5 minute dans un bain-marie à 100°C. Ceci a pour but de faire précipiter l'argent (en se liant à l'hémoglobine) qui est en excès dans l'échantillon et donc qui n'est pas lié aux métallothionéines. Ce traitement n'affecte pas les métallothionéines car elles sont résistantes à haute température. Ensuite, l'échantillon est centrifugé à 1 200 g pendant 10 minutes. L'ajout de l'hémolysat, le passage dans le bain-marie et la centrifugation sont effectués 3 fois.

Une dernière centrifugation sans traitement par hémolysat aura lieu pour éliminer les dernières traces de particules dans le surnageant. Celle-ci se fait à une vitesse de 1 200 g pendant 10 minutes également.

L'échantillon est alors prêt à être passé au spectromètre d'absorption atomique.

La lecture se fait à une longueur d'onde de 328,1 nm. Trois lectures se font sur chaque échantillon toutes les secondes.

La droite d'étalonnage est réalisée à partir de trois standards ayant les concentrations suivantes : 2 , 4 et 6 mg Ag²⁺/l (Fig 23). Ces solutions standards ont été préparées à partir d'une solution stock de 1 g Ag²⁺/l et ont été diluées dans le tampon d'homogénéisation c'est-à-dire le tampon sucrose 0,25M.

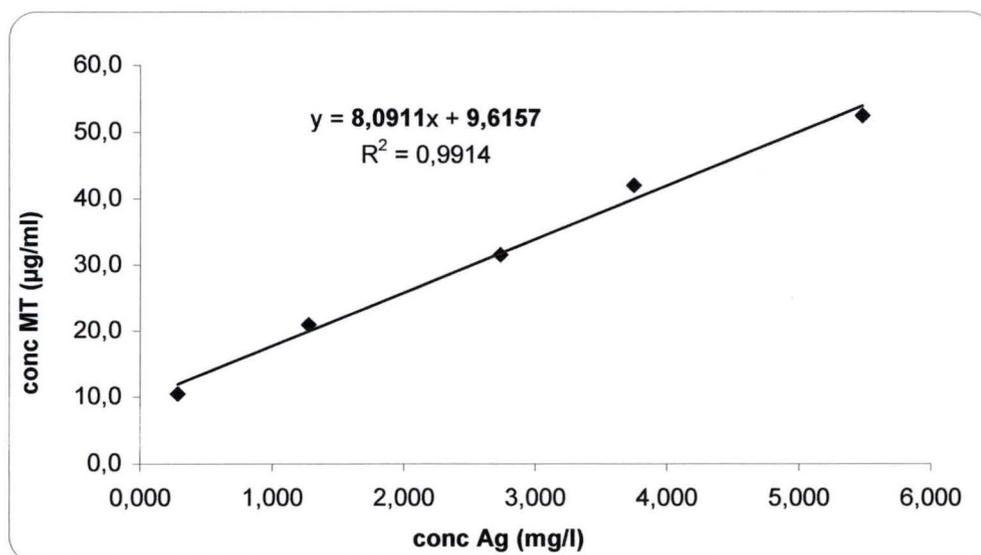


fig 24 : droite étalon des métallothionéines obtenue grâce à un dosage d'argent sur un dosage d'argent sur un échantillon de MT purifiée de lapin de concentration connue.

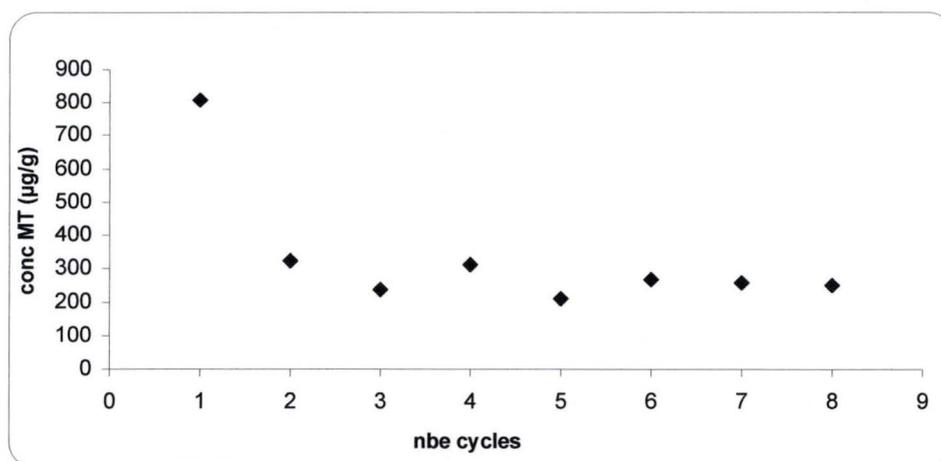


fig 25 : Evolution de la concentration en MTs en fonction du nombre de cycles dans les hépatopancreas

Le spectromètre nous donne les concentrations d'argent en mg/l. Etant donné que nous voulons doser les métallothionéines, une conversion a été nécessaire pour obtenir la concentration en métallothionéines ($\mu\text{g/g}$ poids frais) en utilisant la formule suivante :

$$\frac{(\text{Conc Ag} \times \text{pente} + \text{ord à l'origine}) \times \text{vol}_{\text{tot}} \times \text{dilution}}{\text{vol d'homogénat}}$$

Cette formule se base sur la droite étalon obtenue (Fig 24) en dosant l'argent sur des échantillons de métallothionéines purifiées de lapin différentes (*Sigma*, Saint-Louis, Belgique) ayant subi le même traitement que les échantillons expérimentaux .

Avant de faire les mesures, il est primordial d'être certain que la totalité de l'argent en excès ait précipité avec l'hémolysat. Nous avons donc, sur un même échantillon, déterminé le nombre de cycles de traitements par hémolysat à effectuer.

Dans ce but, nous avons prélevé jusqu'à 8 fois 400 μl d'homogénat que nous avons mélangé à 400 μl de tampon glycine 0,5 M. A chacun de ces mélanges, nous avons ajouté 0,5 ml d'argent 2,5 $\mu\text{g/ml}$ et ensuite, les échantillons ont été placés dans le bain-marie pendant 1,5 minute. Après cela, les échantillons étaient centrifugés à 1 200 g pendant 10 minutes. Ces opérations ont été réalisées une seule fois pour un échantillon, deux fois pour un second, une troisième pour un troisième échantillon et ainsi de suite jusqu'au huitième échantillon. Après ces traitements, les échantillons ont tous été centrifugés une dernière fois sans traitement par hémolysat. Ensuite, nous avons mesuré l'absorbance au spectromètre.

De cette expérience, il en ressort que déjà après 3 cycles de traitement par hémolysat, la concentration en argent reste stable. Nous pouvons conclure que trois cycles suffisent pour enlever l'argent en excès (Fig 25 et 26).

Pour avoir la certitude que l'argent dosé ne se lie qu'aux métallothionéines et pas à d'autres protéines, ou qu'il n'en reste plus en solution, une HPLC (chromatographie liquide à haute performance) a été réalisée sur les homogénats d'hépatopancréas et de branchies après 3 et 5 (par précaution) cycles de traitement à l'hémolysat.

Le principe de l'HPLC est de séparer les différentes protéines présentes dans l'échantillon selon leur poids moléculaire. L'échantillon est passé sur un gel de séphadex G75 qui sépare les protéines dont le poids moléculaire peut aller de 3 à 70 kDa. Les petites protéines pénètrent dans les billes du gel et sont donc freinées tandis que les plus grosses protéines se faufilent entre les billes et sortent de la colonne plus rapidement. Grâce à une lecture d'absorbance des protéines, nous pouvons calculer le volume d'élution des protéines qui nous intéressent (ici les MT) ainsi que leur poids moléculaire (pour reconnaître la protéine à déterminer). Ces deux observations nous permettent de savoir dans quelle fraction se trouve la protéine visée.

Ensuite, un dosage d'argent (par AAS) a été réalisé sur les différentes fractions récoltées.

100 μl de nos échantillons étaient placés sur la colonne ayant une hauteur de 300 mm, un diamètre de 10 mm. Cette colonne est remplie de 24 ml d'un tampon PBS et notre échantillon est donc dilué 240 fois.

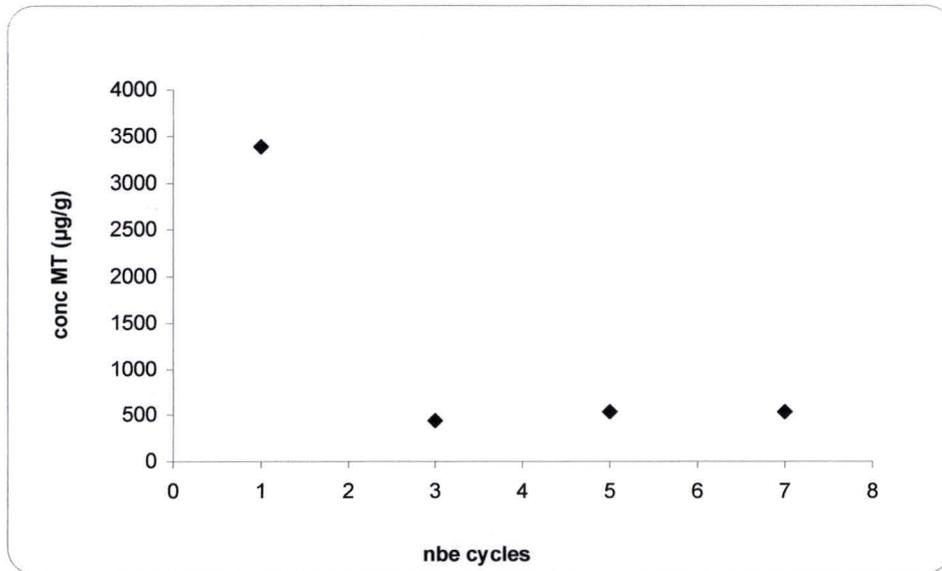


fig 26 : Evolution de la concentration en MT en fonction du nombre de cycles dans les branchies

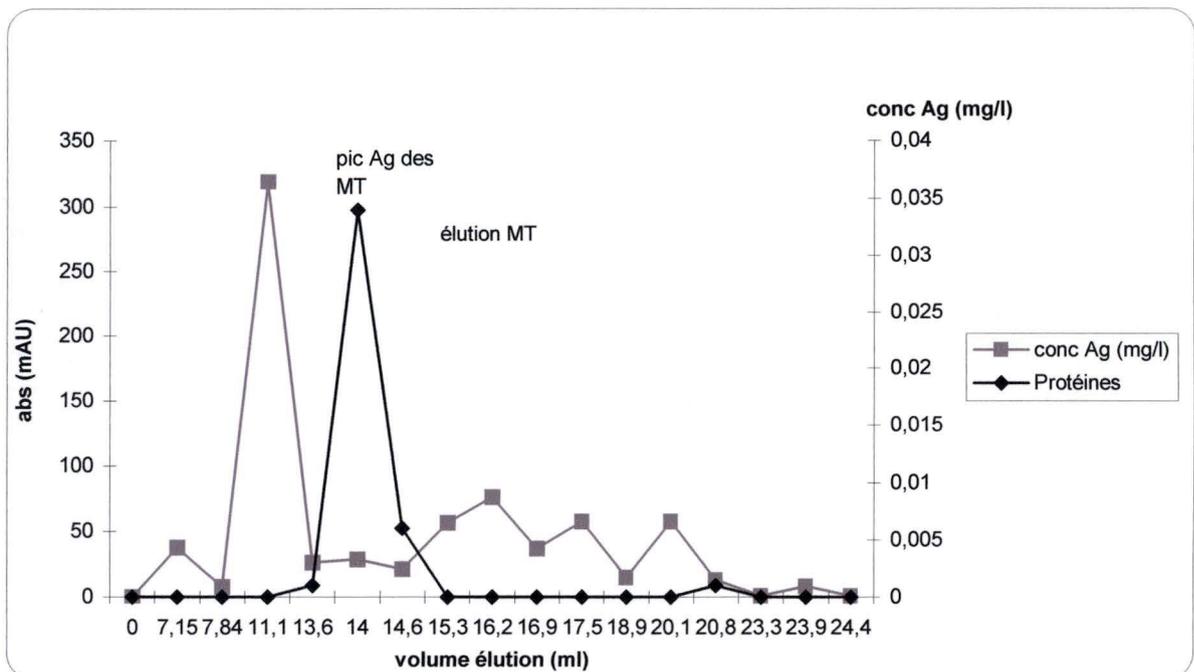


fig 27 : graphe de superposition du dosage de l'Ag dans les différentes fractions de l'HPLC et de l'élution des protéines lors de l'HPLC

Chacune des 40 fractions contenait 0,7 ml de solution (échantillon mélangé au tampon) passée sur la colonne et donc un total de 28 ml était analysé. Ceci nous donnait la certitude d'avoir récolté tout l'échantillon.

Pour vérifier que l'argent ne se lie qu'aux métallothionéines, nous avons calculé le volume d'élution de ces dernières et nous avons regardé la concentration en argent dans la fraction où devaient se trouver les métallothionéines.

Le calcul du volume d'élution est basé sur une droite d'étalonnage réalisée à partir de l'hémoglobine passée sur le même gel.

Vu que nous connaissons le volume mort (7,3 ml) ainsi que le poids moléculaire de la métallothionéine (6130 Da), nous avons pu calculer aisément son volume d'élution de la manière suivante :

$$\begin{aligned}V_e/V_o &= -0,6386 \times \log PM + 4,4234 \\V_e &= (-0,6386 \times 3,79 + 4,4234) \times 7,3 \\V_e &= \mathbf{14,63 \text{ ml}}\end{aligned}$$

Ce qui correspond aux fractions qui se trouvent aux alentours de la fraction 20 (une petite erreur peut-être attribuée à l'appareil)

De toute manière, après 3 cycles, nous ne trouvons de l'argent que dans la fraction 20 qui correspond à celle où se trouvent les métallothionéines (Fig 27)

Ces calculs et observations ont été certifiés sur l'hépatopancréas et sur les branchies.

Ces deux tests nous permettent d'être certains de doser l'argent lié uniquement aux métallothionéines et non pas lié à une autre protéine ou resté libre dans la solution.

3. Analyse des résultats

Après avoir vérifié l'homogénéité des variances par un test de Levene (Dagnelie, 1975), nous avons réalisé une analyse de la variance à un critère de classification (ANOVA 1) et un test de Scheffé pour mettre en évidence des différences significatives entre les concentrations en métallothionéines dans les différentes conditions de stress. Les valeurs tenues en compte dans ces analyses sont celles qui étaient comprises dans un intervalle de confiance de 99%.

Afin d'observer la corrélation possible entre les concentrations en cadmium et celles en métallothionéines dans les hépatopancréas des crabes, nous avons réalisé un test de corrélation en ne prenant en compte uniquement les valeurs correspondant à un intervalle de confiance de 99%.

Résultats

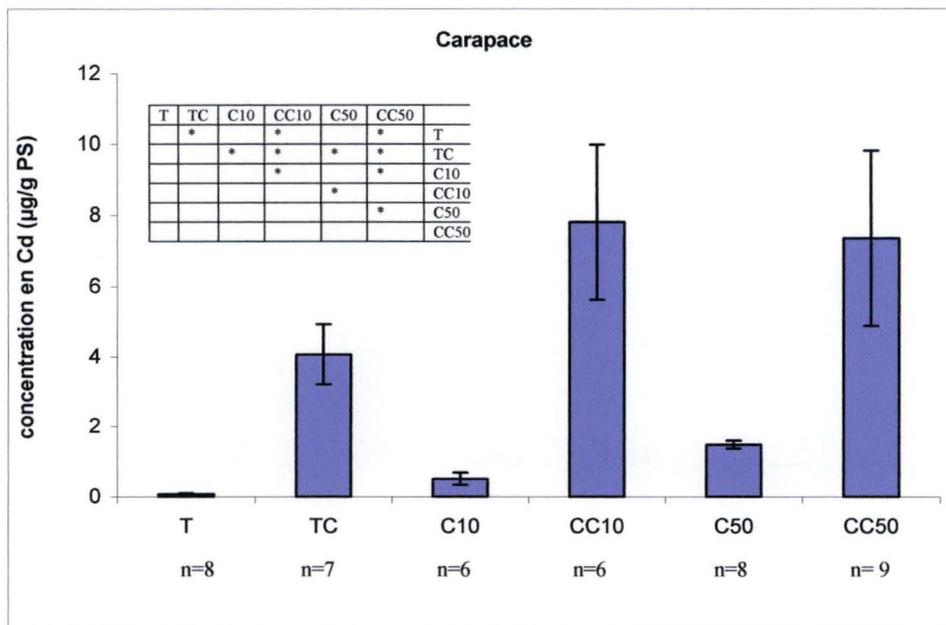
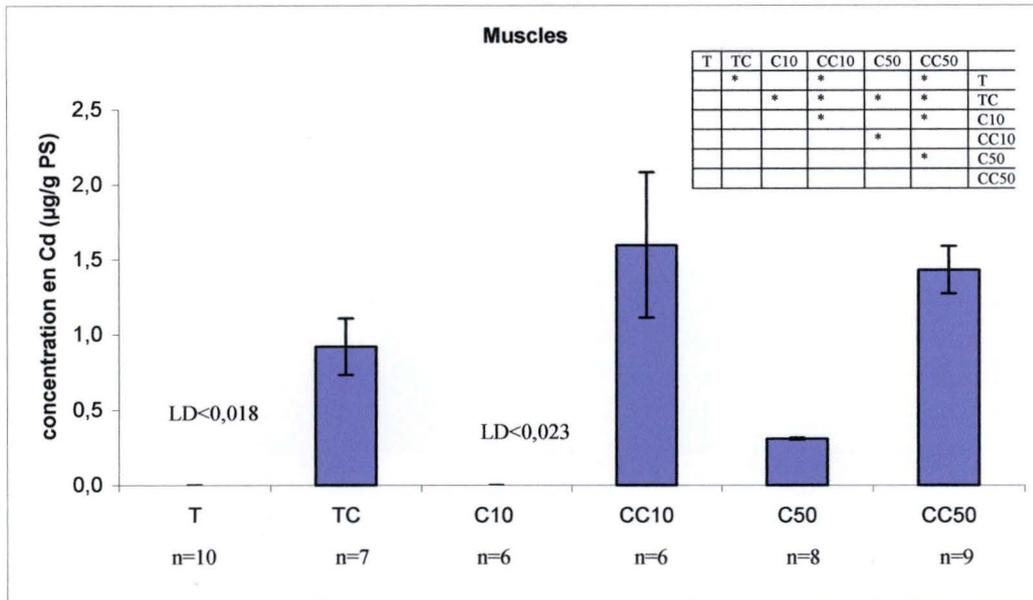


Fig 30 : Concentration en cadmium ($\mu\text{g/g PS}$) dans les organes du crabe chinois après différents stress (T : organismes témoins, TC : témoins ayant subi une contamination aiguë de $0,5 \text{ mg Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 3 jours, C10 : crabes stressés à $10 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$, CC10 crabes ayant subi un stress aigu de $0,5 \text{ mg Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 3 jours après un stress chronique de $10 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 30 jours, C50 : crabes ayant subi un stress chronique de $50 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 30 jours, CC50 : crabes ayant subi un stress aigu de $0,5 \text{ mg Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 3 jours après un stress chronique de $50 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 30 jours)

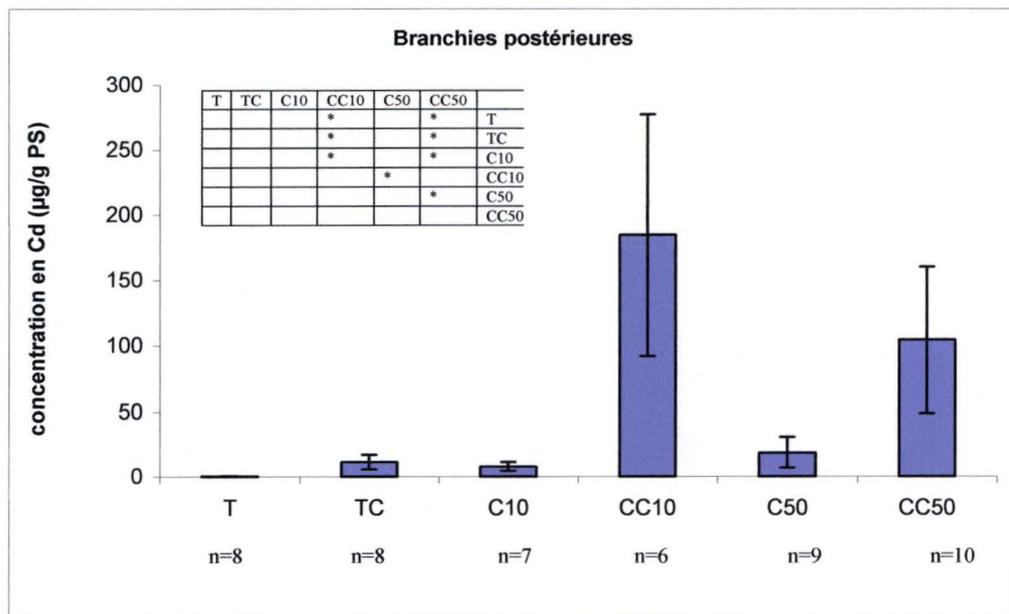
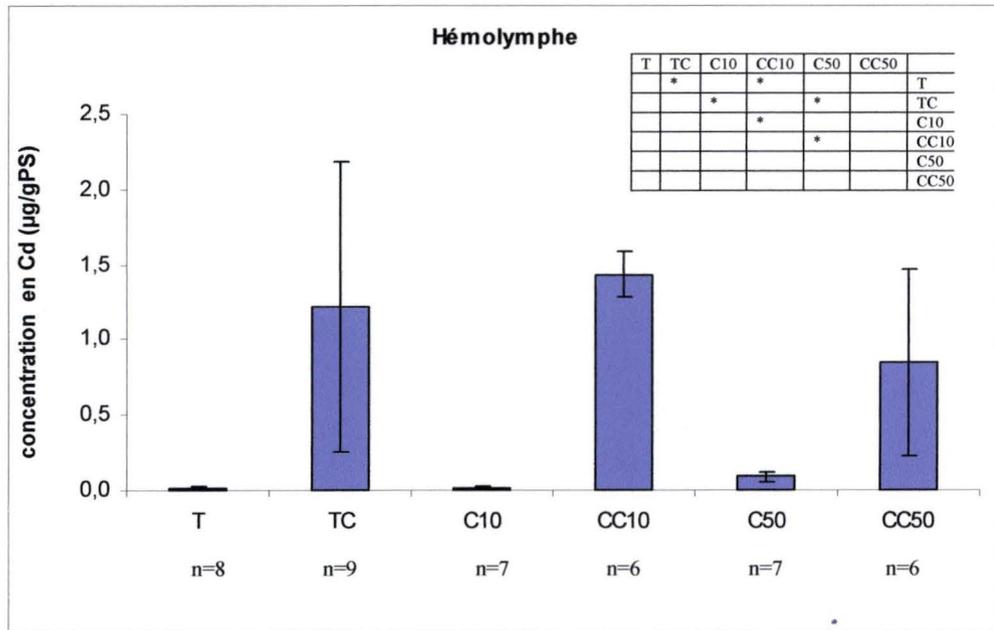


Fig 31 : Concentration en cadmium ($\mu\text{g/g PS}$) dans les organes du crabe chinois après différents stress (T : organismes témoins, TC : témoins ayant subi une contamination aiguë de $0,5 \text{ mg Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 3 jours, C10 : crabes stressés à $10 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$, CC10 crabes ayant subi un stress aigu de $0,5 \text{ mg Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 3 jours après un stress chronique de $10 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 30 jours, C50 : crabes ayant subi un stress chronique de $50 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 30 jours, CC50 : crabes ayant subi un stress aigu de $0,5 \text{ mg Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 3 jours après un stress chronique de $50 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 30 jours)

Accumulation du cadmium dans les organes du crabe chinois, *Eriocheir sinensis*.

Dans le but de mieux comprendre comment s'accumule le cadmium dans l'organisme étudié, des dosages de ce métal ont été réalisés sur différents organes : muscles, carapace, hémolymphe, branchies postérieures, branchies antérieures et hépatopancréas) après différentes contaminations (voir annexe 3).

Sur base de tests statistiques (Anova 1 et test de Scheffé par la suite) dont les résultats détaillés se trouvent en annexe 4, nous pouvons faire plusieurs observations.

| | Concentrations ($\mu\text{g/gPS}$) |
|------------------------|--------------------------------------|
| Muscles | < LD |
| Carapace | 0,069 |
| Hémolymphe | 0,019 |
| Branchies postérieures | 0,269 |
| Branchies antérieures | 4,143 |
| Hépatopancréas | 0,844 (<LD) |

Tableau 1 : Concentrations en cadmium ($\mu\text{g/g PS}$) dans différents organes des crabes témoins.

Sur base du tableau 1 qui concerne les organismes témoins, nous pouvons constater qu'une concentration assez importante en cadmium apparaît dans les branchies antérieures (4,1 $\mu\text{g/g PS}$). Le facteur de bio-concentration pour celles-ci est d'au moins 8285 par rapport à la concentration en cadmium présente dans l'eau de ville .

Nous voyons également que l'hépatopancréas est capable d'accumuler lui aussi une certaine quantité de cadmium mais la concentration finale est moindre (0,844 $\mu\text{g/g PS}$) que celle observée dans les branchies antérieures. Les autres organes sont peu impliqués dans ce processus d'accumulation du cadmium.

Maintenant que nous avons observé la situation des crabes témoins, nous pouvons nous focaliser sur les différentes contaminations et les comparer aux témoins.

En observant les figures 30, 31 et 32, plusieurs choses peuvent être mises en évidence.

Tout d'abord, on constate dans les **muscles**, une augmentation de l'accumulation du cadmium chez les organismes témoins qui ont subi un stress aigu (TC). La concentration en cadmium est de 0,138 $\mu\text{g/g PS}$ chez les organismes témoins (T) alors qu'elle est de 0,920 $\mu\text{g/g PS}$ chez les organismes ayant subi un stress aigu (TC). Les contrastes de Scheffé confirment que cette différence est bien significative (à $P < 0,05$)

On observe également que les concentrations en cadmium dans les muscles des organismes ayant subi un stress chronique (C10 et C50) ne diffèrent pas significativement bien que les

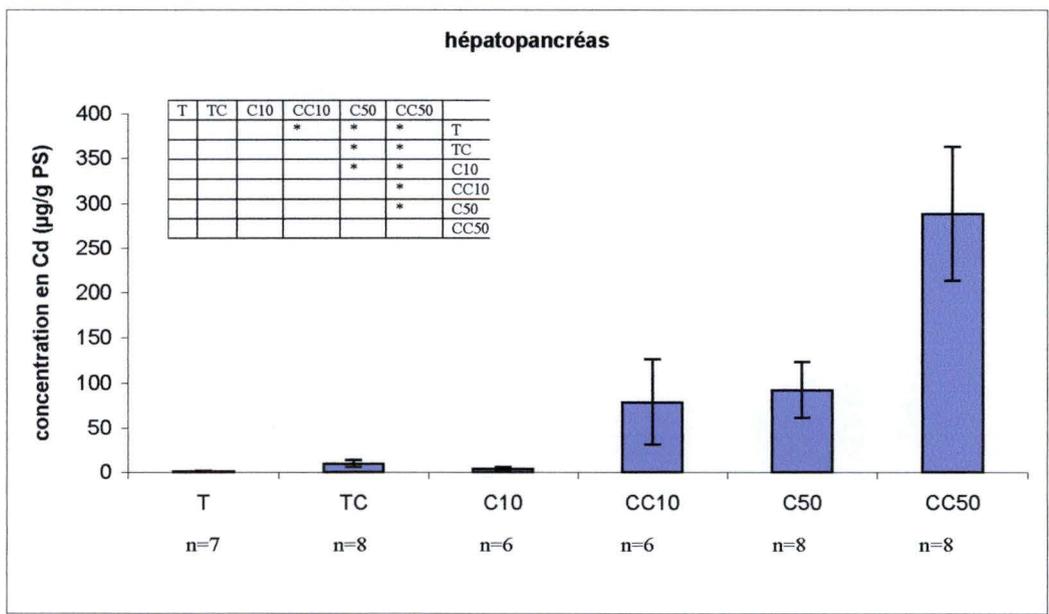
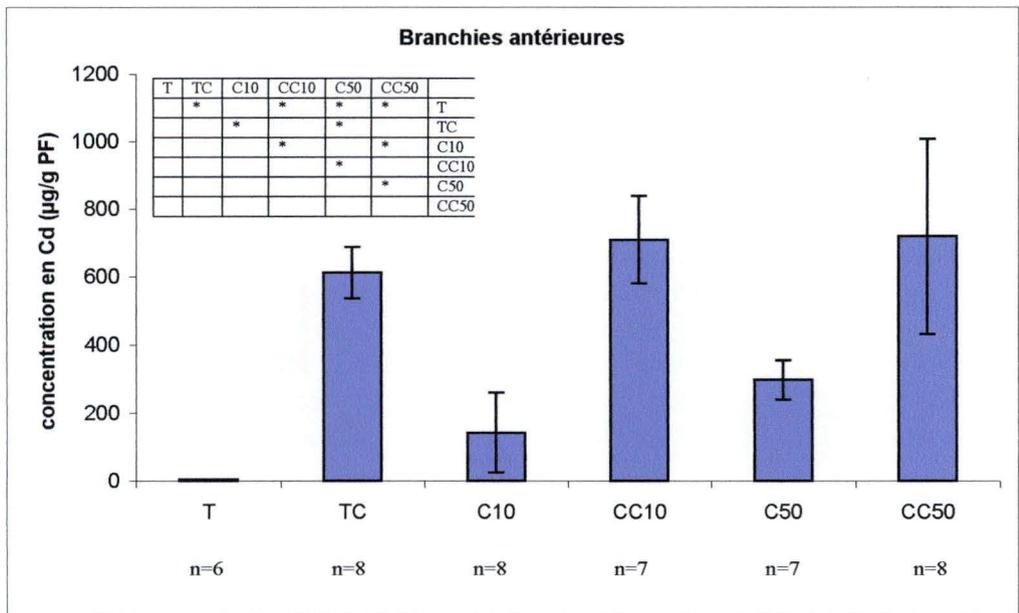


Fig 32 : Concentration en cadmium ($\mu\text{g/g PS}$) dans les organes du crabe chinois après différents stress (T : organismes témoins, TC : témoins ayant subi une contamination aiguë de $0,5 \text{ mg Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 3 jours, C10 : crabes stressés à $10 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$, CC10 crabes ayant subi un stress aigu de $0,5 \text{ mg Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 3 jours après un stress chronique de $10 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 30 jours, C50 : crabes ayant subi un stress chronique de $50 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 30 jours, CC50 : crabes ayant subi un stress aigu de $0,5 \text{ mg Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 3 jours après un stress chronique de $50 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 30 jours

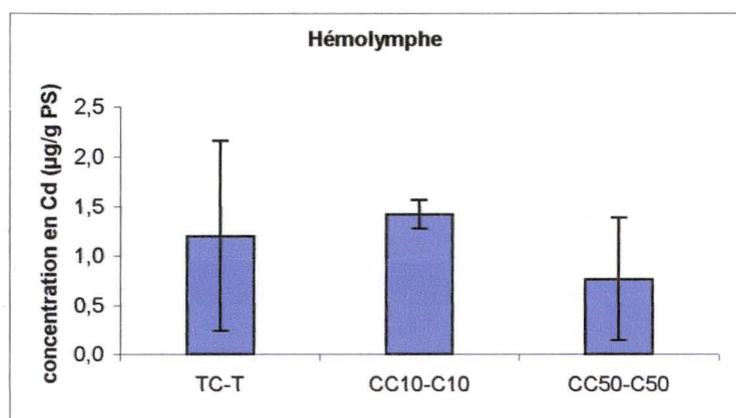
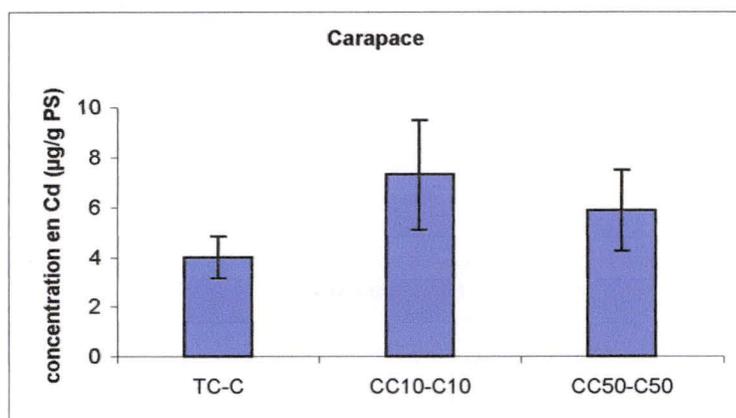
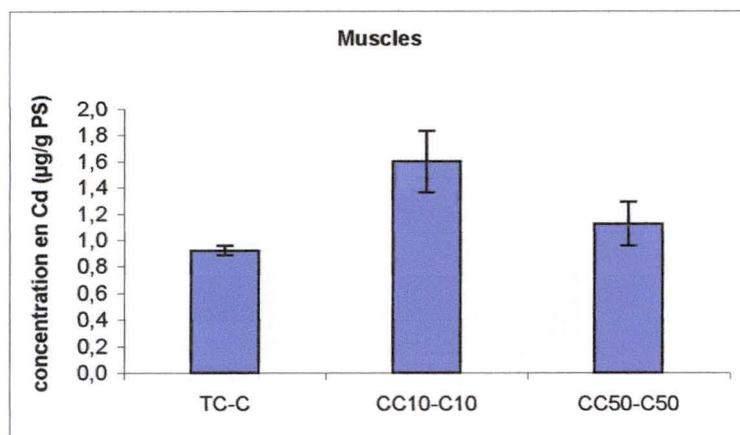


Fig 33 : Différence de concentration en cadmium ($\mu\text{g/g PS}$) dans les différents organes du crabe chinois entre les stress aigus et les stress chroniques (T : organismes témoins, TC : témoins ayant subi une contamination aiguë de $0,5 \text{ mg Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 3 jours, C10 : crabes stressés à $10 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$, CC10 crabes ayant subi un stress aigu de $0,5 \text{ mg Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 3 jours après un stress chronique de $10 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 30 jours, C50 : crabes ayant subi un stress chronique de $50 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 30 jours, CC50 : crabes ayant subi un stress aigu de $0,5 \text{ mg Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 3 jours après un stress chronique de $50 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 30 jours)

concentrations en cadmium du stress augmentent (elle est inférieure à la LD chez les C10 et 0,308 $\mu\text{g/g}$ PS chez les C50).

Concernant le stress aigu après stress chronique, l'accumulation du cadmium est nettement supérieure aux témoins (T). Elles sont de 0,138 $\mu\text{g/g}$ PS chez les T et elle augmente de plus de 10 fois par rapport aux témoins soit à 1,596 $\mu\text{g/g}$ PS pour les CC10 et 1,430 $\mu\text{g/g}$ PS pour les CC50.

L'accumulation du cadmium dans la **carapace** est comparable à ce qui s'observe dans les muscles.

Le stress aigu (TC) induit une forte accumulation par rapport aux témoins (T). La quantité de cadmium accumulée passe de 0,069 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g PS}$ à 4,069 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g PS}$.

Par contre, les concentrations retrouvées dans les organismes ayant subi des stress chroniques ne diffèrent pas de celles des témoins (elles sont de 0,069 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g PS}$ pour les T, de 0,517 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g PS}$ pour les C10 et de 1,478 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g PS}$ pour les C50).

Par rapport aux TC, ces concentrations sont significativement différentes.

La concentration en cadmium des témoins est beaucoup plus faible que celle des animaux qui ont subi un stress aigu après un stress chronique. Les CC10 accumulent 100 fois plus et les CC50, 90 fois plus de cadmium que les T

Si nous regardons maintenant l'**hémolymphe**, nous constatons que l'accumulation après un stress aigu est beaucoup plus importante (1,216 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g PS}$) que celle observée chez les organismes témoins (0,019 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g PS}$ c'est-à-dire 65 fois moins). Les contrastes de Scheffé confirment ces observations.

Les stress chroniques ne modifient pas la concentration dans ce liquide corporel.

Le stress aigu (TC) provoque une augmentation de l'accumulation du cadmium par rapport aux stress chroniques (C10 et C50) : les concentrations observées sont de 1,216 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g PS}$ pour les TC alors qu'elles sont de 0,017 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g PS}$ pour les C10 et de 0,087 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g PS}$ pour les C50.

Les stress aigus après les stress chroniques (CC10 et CC50) ne diffèrent pas des TC.

Dans les **branchies postérieures**, le schéma d'accumulation est quelque peu différent.

L'accumulation de cadmium lors du stress aigu n'est pas significativement différente des témoins (la concentration moyenne chez ces témoins est de 0,269 $\mu\text{g/g}$ PS). Les concentrations observées lors des stress chroniques (C10 et C50) ne sont pas différentes non plus des T mais bien des TC. D'autres différences s'observent lorsque nous comparons les stress aigus après les stress chroniques (CC10 et CC50) et les témoins (T) : 184,268 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g PS}$ pour les CC10 et 104,078 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g PS}$ pour les CC50 par comparaison aux témoins (0,269 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g PS}$). En réalité, cela correspond à une augmentation de 520 fois pour les CC10 et de 300 fois pour les CC50 par rapport aux T.

Les **branchies antérieures** accumulent 150 fois plus de cadmium pendant le stress aigu (611,552 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g PS}$) par rapport à 4,143 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g PS}$ chez les témoins. Cela correspond à un facteur de bio-concentration de 1257 pour les organismes ayant subi un stress aigu.

Le cadmium accumulé pendant les stress chroniques (C10 et C50) ne diffère par rapport aux T que lorsque la concentration du stress est de 50 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$ (les concentrations sont de 142,531 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g PS}$ en moyenne pour les C10 et de 297,653 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g PS}$ en moyenne pour les C50 alors qu'elle est de 4,143 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g PS}$ pour les T).

Les concentrations mesurées chez les TC (611,552 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g PS}$) sont significativement différentes de celles chez les organismes qui ont subi des stress chroniques (C10 et C50).

On trouve que les TC accumulent 6 fois plus que les C10 et 2 fois plus que les C50.

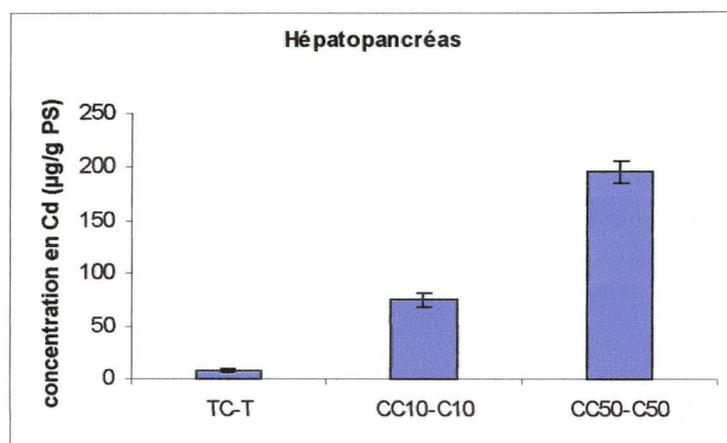
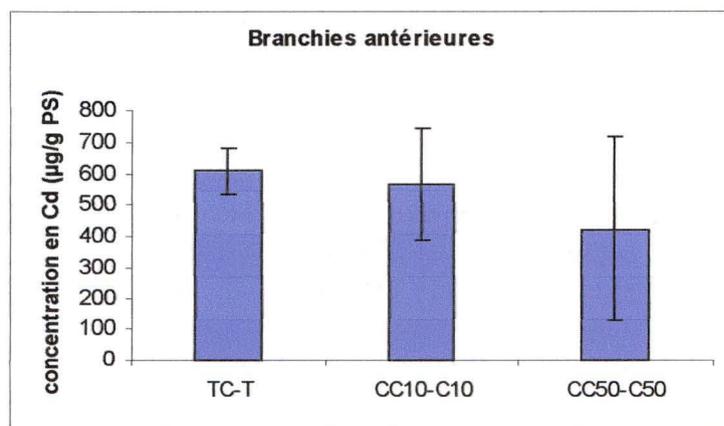
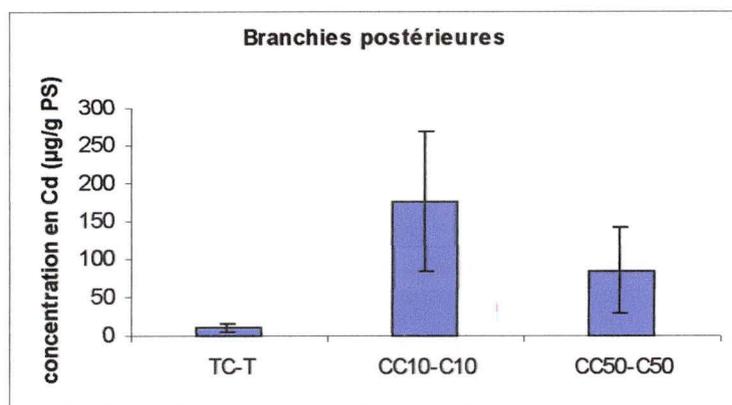


Fig 34 : Différence de concentration en cadmium ($\mu\text{g/g PS}$) dans les différents organes du crabe chinois entre les stress aigus et les stress chroniques (T : organismes témoins, TC : témoins ayant subi une contamination aiguë de $0,5 \text{ mg Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 3 jours, C10 : crabes stressés à $10 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$, CC10 crabes ayant subi un stress aigu de $0,5 \text{ mg Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 3 jours après un stress chronique de $10 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 30 jours, C50 : crabes ayant subi un stress chronique de $50 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 30 jours, CC50 : crabes ayant subi un stress aigu de $0,5 \text{ mg Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 3 jours après un stress chronique de $50 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 30 jours)

Par contre le stress aigu (TC) ne diffère pas des stress aigu (CC10 et CC50) consécutifs aux stress chroniques. Nous pouvons d'ailleurs observer que ces trois valeurs correspondent à un maximum.

Si nous nous focalisons maintenant sur l'**hépatopancréas**, nous voyons que chez les organismes qui ont subi un stress aigu (TC), la concentration en cadmium n'augmente pas de manière significative par rapport aux organismes témoins (T) : 9,223 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g PS}$ pour les TC par rapport à 0,844 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g PS}$ pour les T.

Les concentrations mesurées pour les T ne sont différentes de celles mesurées pour les organismes ayant subi des stress chroniques (C10 et C50) que lorsque la concentration du stress est de 50 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$. La concentration pour les T est de 0,844 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g PS}$, de 3,246 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g PS}$ pour les C10 et de 91,939 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g PS}$ pour les C50.

Il en va de même pour les concentrations des TC (9,223 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g PS}$).

Nous pouvons récapituler les effets des différents stress comme dans le tableau suivant.

| Muscles | Carapace | Hémolymphe | Branchies postérieures | Branchies antérieures | Hépatopancréas |
|---------|----------|------------|------------------------|-----------------------|----------------|
| TC > T | TC > T | TC > T | TC = T | TC > T | TC = T |
| C = T | C = T | C = T | C = T | C > T | C > T |
| TC > C | TC > C | TC > C | TC = C | TC > C | TC < C |
| CC = TC | CC > TC | CC = TC | CC > TC | CC = TC | CC > TC |

Tableau 2 : Récapitulatif des effets des différents stress (TC : stress aigu, T: témoins, C: stress chroniques de 10 et 50 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 30 jours, CC : stress aigu de 0,5 mg Cd^{2+}/l pendant 3 jours suivant un stress des deux stress chroniques de 30 jours).

Influence du stress aigu sur l'accumulation du cadmium

Afin de comprendre ce qui intervient dans l'accumulation du cadmium durant les stress aigus, nous avons soustrait la valeur de concentration observée pour les témoins et les stress chroniques à celle des stress aigus correspondants.

Ceci nous permet de comparer la part de cadmium accumulé suite au stress aigu (Fig 33 et 34).

Dans les muscles, nous pouvons observer que la part de cadmium accumulée pendant le stress aigu (TC-T) est plus faible que les parts accumulées lors des stress aigus précédés par des stress chroniques (CC10-C10 et CC50-C50). Par contre, il n'y a pas de différence entre les deux stress aigus précédés par les stress chroniques.

Nous constatons que dans la carapace, le stress aigu provoque une accumulation plus importante lorsqu'il est précédé d'un stress chronique. Nous voyons également que la quantité

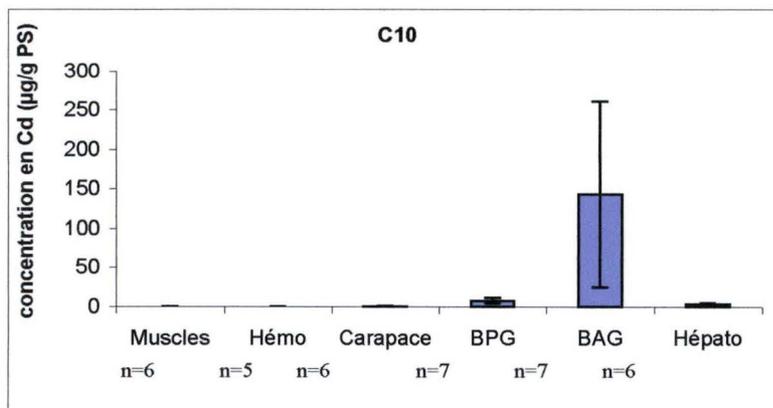
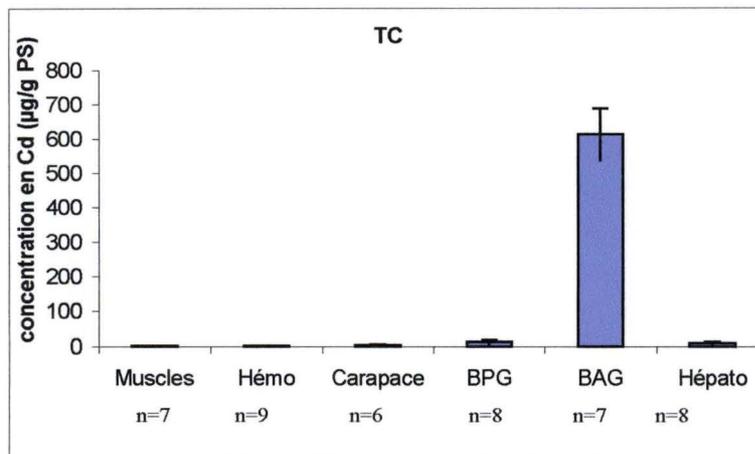
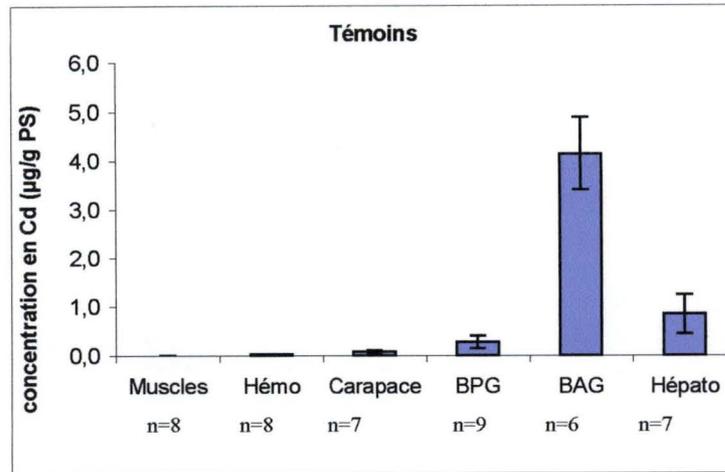


Fig 35 : Concentrations en cadmium ($\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$) dans les différents organes selon les stress (T : organismes témoins, TC : témoins ayant subi une contamination aiguë de $0,5 \text{ mg Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 3 jours, C10 : crabes stressés à $10 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$)

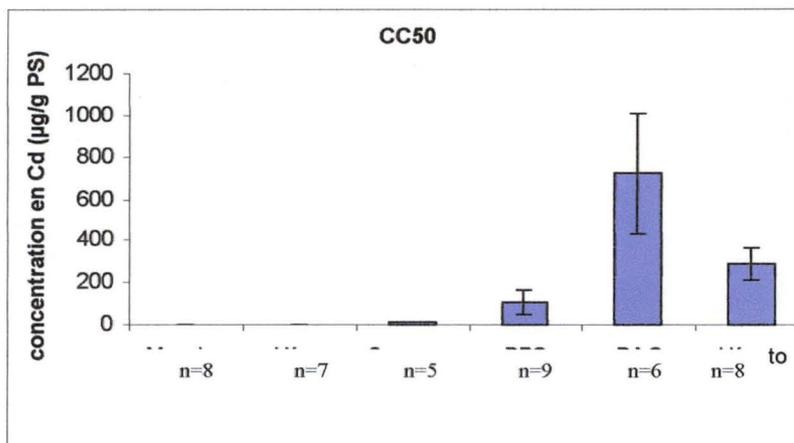
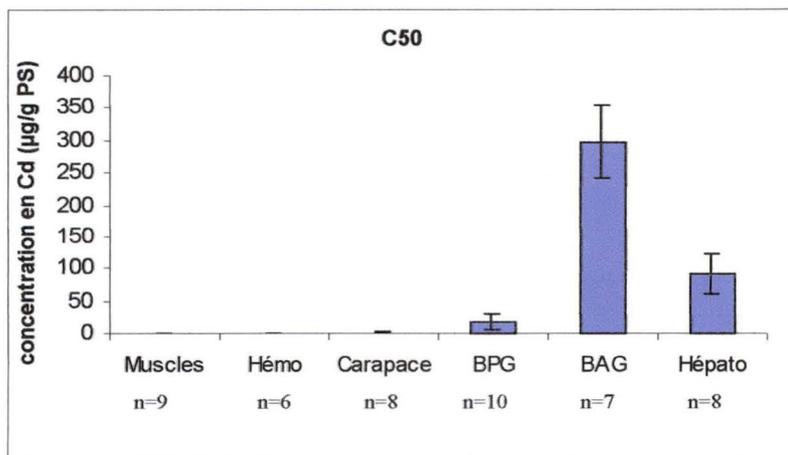
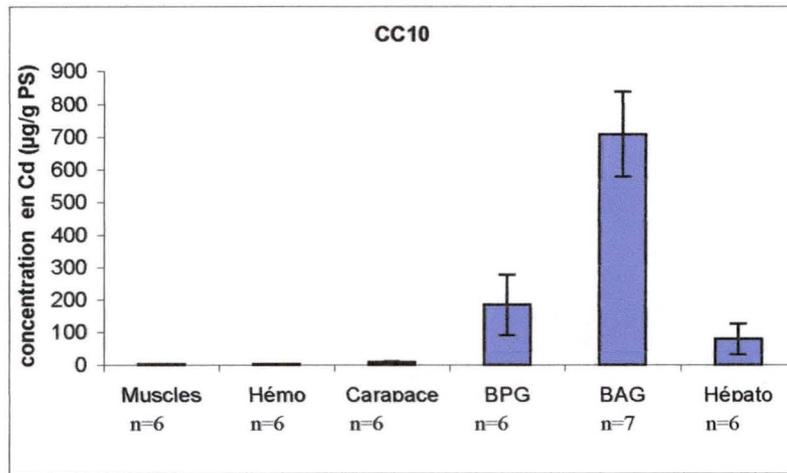


Fig 36 : Concentrations en cadmium ($\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$) dans les différents organes selon les stress
 CC10 crabes ayant subi un stress aigu de $0,5\text{mg Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 3 jours après un stress
 chronique de $10\ \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 30 jours, C50 : crabes ayant subi un stress chronique de $50\ \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$
 pendant 30 jours, CC50 : crabes ayant subi un stress aigu de $0,5\ \text{mg Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant
 3 jours après un stress chronique de $50\ \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 30 jours)

de cadmium accumulé lors du CC10-C10 est plus importante que celle accumulée pendant le stress aigu CC50-C50.

Par contre, dans l'hémolymphe, les concentrations sont semblables dans les trois situations.

Pour les branchies postérieures, nous constatons que la quantité de cadmium accumulée pendant le stress aigu (TC) est très faible. De plus, la part de cadmium attribuable au CC50 est plus faible que celle du CC10.

Dans le cas des branchies antérieures, nous voyons qu'il n'y a pas de différence entre les trois conditions de stress aigu.

Enfin, pour l'hépatopancréas, la part de cadmium attribuable aux stress aigus augmente avec la concentration de cadmium lors des stress tandis que la quantité de cadmium accumulée pendant le stress aigu sans stress chronique préalable est très faible.

Répartition du cadmium dans les différents organes pour chaque condition de stress

La problématique soulevée ici est de savoir dans quels organes le cadmium s'accumule en fonction des stress

Sur base de la figure 35, nous pouvons constater que chez les crabes témoins, une valeur située sous la limite de détection est observée dans les muscles, l'hémolymphe, la carapace, les branchies postérieures et l'hépatopancréas. Il n'y a que les branchies antérieures qui accumulent le cadmium ($4,143 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$ en moyenne) avec un facteur de bio-concentration de 8285 au moins par rapport à la concentration en cadmium dans l'eau du bassin.

Par contre, lorsqu'un stress aigu est affligé aux organismes, le cadmium s'accumule dans les branchies antérieures ($611,6 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$) et, en beaucoup plus faibles quantités, dans les branchies postérieures ($11,51 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$) et l'hépatopancréas ($9,22 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$ en moyenne)

Quand on place les crabes dans des conditions de stress chronique avec une concentration de $10 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$, il n'y a, à nouveau, que les branchies antérieures qui accumulent le cadmium ($142,5 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$ en moyenne). Les autres organes n'accumulent que des concentrations plus faibles.

Par contre, lorsque la concentration en cadmium du stress chronique augmente, non seulement les branchies antérieures ($297,6 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$), mais aussi les branchies postérieures ($18,8 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$) et l'hépatopancréas ($91,9 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$) accumulent le métal (Fig 36)

Dans des conditions de stress aigu précédé d'un stress chronique, nous voyons que les branchies antérieures, les branchies postérieures ainsi que l'hépatopancréas accumulent le cadmium.

Les quantités absorbées sont plus ou moins identiques pour les deux conditions dans les branchies antérieures mais elles passent de 78,6 à 288,1 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$ dans l'hépatopancréas. Par contre, elles diminuent dans les branchies postérieures (passant de 184,3 à 104,1 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$) malgré le fait que la concentration du stress augmente.

Nous pouvons résumer l'accumulation moyenne du cadmium comme suit :

| | |
|-------------|--|
| T | BA > HP > BP > muscles > carapace > hémolymphe 4,14 > 0,844 > 0,269 > 0,138 > 0,069 > 0,019 |
| TC | BA > BP > HP > carapace > hémolymphe > muscles 611,6 > 11,5 > 9,22 > 4,07 > 1,22 > 0,920 |
| C10 | BA > BP > HP > carapace > muscles > hémolymphe 142,5 > 7,86 > 3,246 > 0,517 > 0,232 > 0,017 |
| CC10 | BA > BP > HP > carapace > muscles > hémolymphe 708,2 > 184,3 > 78,6 > 7,81 > 1,60 > 1,43 |
| C50 | BA > HP > BP > carapace > muscles > hémolymphe 297,7 > 91,9 > 18,8 > 1,48 > 0,308 > 0,087 |
| CC50 | BA > HP > BP > carapace > muscles > hémolymphe 719 > 288 > 104,1 > 7,346 > 1,43 > 0,848 |

Tableau 3 : ordre d'accumulation du cadmium dans les différent organes du crabe chinois et les concentrations moyennes ($\mu\text{g/g}$ PS) mesurées dans chaque organe et dans chaque condition.

On remarque donc bien ce qui a été dit précédemment : des concentrations toujours très faibles dans les muscles (allant de 0,138 à 1,60 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$ PS pour toutes les situations), l'hémolymphe (allant de 0,019 à 1,43 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{ml}$) et la carapace (allant de 0,069 à 7,35 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$ PS), des concentrations plus importantes dans les trois autres organes, allant jusqu'à 719 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$ PS pour les branchies antérieures quand une condition CC50 lui est affligée.

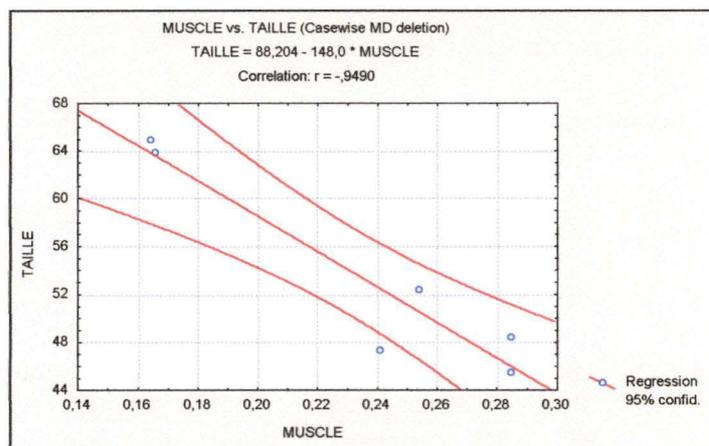
Ainsi, l'ordre observé chez les témoins (BA>HP>BP>muscles>carapace>hémolymphe) ne se retrouve pas dans les conditions de stress.

En effet, nous pouvons constater, d'après le tableau 3, qu'en condition de stress aigu, les branchies postérieures des crabes (11,5 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$ PS) accumulent plus de cadmium que l'hépatopancréas (9,22 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$ PS). Cet ordre se retrouve également dans les situations de stress (chroniques et aigu après chroniques) mais uniquement avec la concentration la plus faible (10 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$). Si on observe l'ordre des C50 et CC50, on voit que comme chez les témoins, l'hépatopancréas accumule plus de cadmium (91,9 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$ PS chez les C50 et 288 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$ PS chez les CC50) que les branchies postérieures (18,8 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$ PS chez les C50 et 104,1 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$ PS chez les CC50).

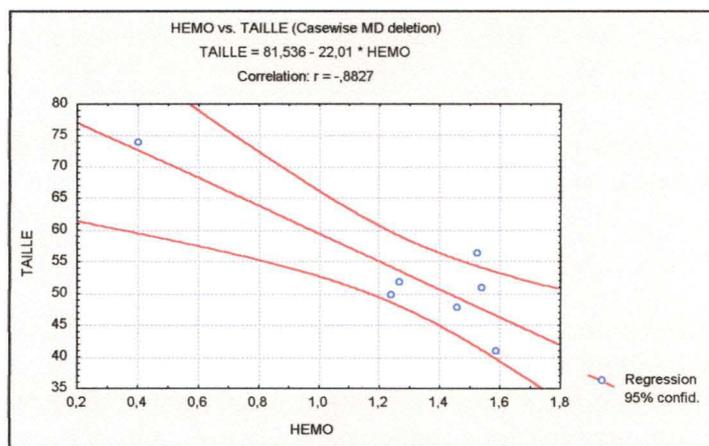
Des changements peuvent se voir également pour les muscles, la carapace et l'hémolymphe. Chez les témoins, ce sont les muscles qui accumulent la plus grande quantité de cadmium (0,138 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$ PS). Ensuite, c'est la carapace (0,069 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$ PS) et pour terminer, l'hémolymphe (0,019 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$ PS).

En observant les conditions de stress, nous remarquons que la carapace accumule plus de cadmium que les deux autres organes. Nous observons également qu'en stress aigu,

A



B



C

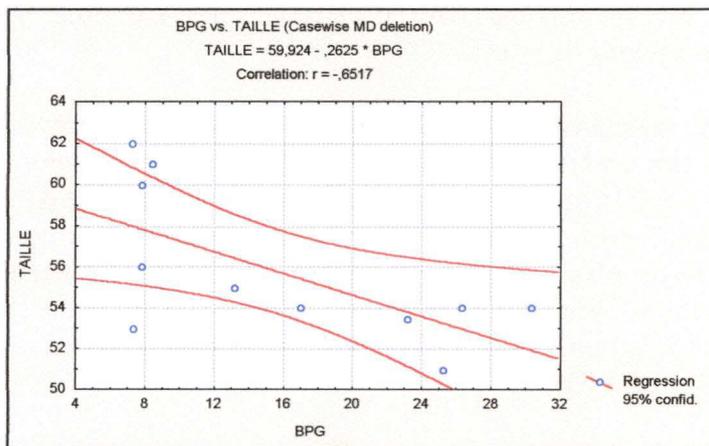


Fig 37 : Corrélation entre la taille (mm) et la concentration en cadmium ($\mu\text{g/g}$ PF ou $\mu\text{g/ml}$ pour l'hémolymph) dans différents organes et différentes conditions (A : les muscles en C10, B : l'hémolymph en CC10 ; C : les branchies postérieures en TC)

l'hémolymphe accumule plus de métal ($1,22 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{ml}$) que les muscles ($0,920 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g PS}$) mais que pour les autres conditions de stress, c'est dans les muscles qu'une plus grande part du cadmium sera retrouvée par rapport à l'hémolymphe.

Nous pouvons constater en regardant le tableau 3 que, de manière générale, le cadmium s'accumule dans les branchies antérieures, ensuite, dans les branchies postérieures et puis dans l'hépatopancréas lorsqu'il s'agit de stress de faibles concentrations (C10). Par contre, lorsque les concentrations deviennent plus importantes ($50 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$), c'est toujours dans les branchies antérieures que les concentrations sont plus importantes et ensuite, dans l'hépatopancréas et non plus dans les branchies postérieures.

En conclusion de ce chapitre, nous pouvons signaler qu'il y a deux groupes de structures bien distincts. D'une part, nous avons les muscles, la carapace et l'hémolymphe qui sont des organes qui n'accumulent pas beaucoup de cadmium dans les conditions normales (témoin) et dans les différentes conditions de stress.

D'autre part, nous avons un autre groupe reprenant les branchies postérieures, les branchies antérieures et l'hépatopancréas qui accumulent, eux beaucoup plus de cadmium. Ces deux groupes ont réagi différemment l'un de l'autre dans les différentes situations de stress que nous avons affligées aux crabes pendant les périodes de contaminations. Nous pouvons remarquer également que ces deux groupes ne se mélangent jamais.

Corrélation entre les concentrations en cadmium et la taille des organismes.

Afin de déterminer si les concentrations mesurées pouvaient être en relation avec la taille et/ou le poids des animaux, nous les avons pesés et mesurés avant de les disséquer.

Des corrélations ont été effectuées entre ces concentrations en cadmium et le poids ainsi qu'avec la taille pour les différents organes et dans les différentes situations de stress.

Cette comparaison se justifie étant donné que le poids des individus a été pris après les périodes de stress et que certains organismes avaient perdu une ou plusieurs pattes. Étant donné que cette variable n'est pas sûre à 100 %, il est donc préférable de traiter la taille et non pas le poids des animaux.

Les résultats de ces corrélations (détaillés dans l'annexe 6 ainsi que la figure 37) montre que pour les individus qui ont subi un stress chronique de $10 \mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 30 jours, les concentrations en cadmium dans les **muscles** sont corrélées à la taille ($r = -0,93$) et au poids ($r = -0,95$) des organismes. Il en va de même pour les concentrations en cadmium dans l'**hémolymphe** ($r = -0,88$ pour la taille et $-0,94$ pour le poids) pour les organismes qui ont subi ce même stress plus un stress aigu de $0,5 \text{ mg Cd}^{2+}/\text{l}$ pendant 3 jours.

On observe également qu'un stress aigu, la concentration en cadmium dans les **branchies postérieures** est corrélées à la taille ($r = -0,65$) mais pas au poids.

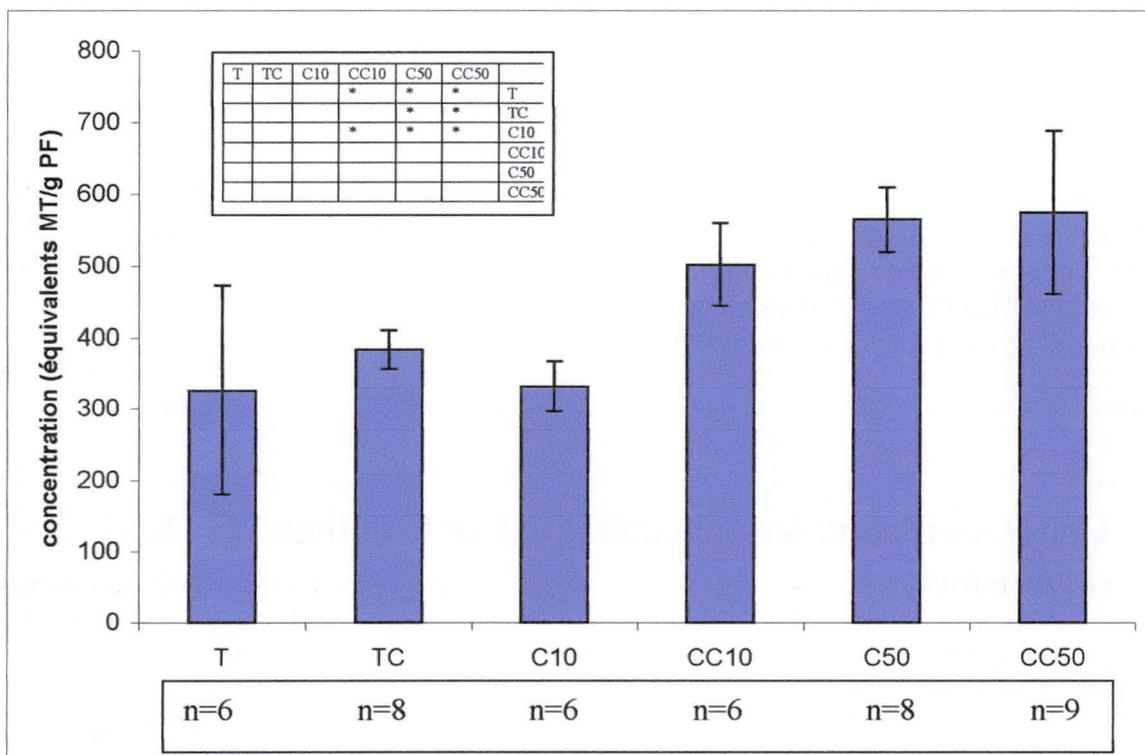


Fig 38 : concentrations en métallothionéines (équivalents MT/g PF) mesurées dans les hépatopancreas des crabes témoins et contaminés (T : organismes témoins, TC : témoins ayant subi une contamination aiguë de 0,5 mg Cd²⁺/l pendant 3 jours, C10 : crabes stressés à 10 µg Cd²⁺/l, CC10 crabes ayant subi un stress aigu de 0,5mg Cd²⁺/l pendant 3 jours après un stress chronique de 10 µg Cd²⁺/l pendant 30 jours, C50 : crabes ayant subi un stress chronique de 50 µg Cd²⁺/l pendant 30 jours, CC50 : crabes ayant subi un stress aigu de 0,5 mg Cd²⁺/l pendant 3 jours après un stress chronique de 50 µg Cd²⁺/l pendant 30 jours)

Les graphes représentant ces corrélations sont présentés à la figure 37.

Pour les autres stress et autres organes, aucune corrélation n'est mise en évidence.

Synthèse de MT dans les hépatopancréas des crabes chinois.

L'objectif de cette partie était de mettre en évidence une synthèse de métallothionéines dans les hépatopancréas des crabes stressés et de comparer ces résultats avec ceux des organismes témoins. L'objectif était aussi de mettre en évidence cette synthèse de métallothionéines dans les branchies antérieures et postérieures mais par manque de temps, nous n'avons pu remplir cette partie de l'objectif que nous nous étions fixé.

A partir de la figure 38, nous pouvons voir que la concentration moyenne en métallothionéines chez les organismes témoins est de 325 équivalents MT/g PF.

Nous constatons, également, que la quantité de métallothionéines synthétisées n'est pas différente quand nous comparons les témoins (T) et les organismes qui ont subi un stress aigu (TC) (383 équivalents MT/g).

Il n'y a pas non plus de différence significative ($p = 1$) entre les T et C10 (332 équivalents MT/g) mais les concentrations de métallothionéines entre les T (325 équivalents MT/g) et C50 (564 équivalents MT/g) sont significativement différentes ($p = 0,0005$).

Lorsque nous comparons les témoins (T) et les stress aigus après les stress chroniques (CC10 et CC50), nous remarquons que les concentrations sont significativement différentes dans les deux cas. La quantité de métallothionéines synthétisées par les organismes témoins est de 325 équivalents MT/g alors qu'elle est de 502 équivalents MT/g chez les CC10 et de 575 équivalents MT/g chez les CC50.

Si nous comparons les synthèses de métallothionéines entre les stress chroniques, nous voyons qu'elles sont significativement différentes ($p = 0,0063$). Par contre, entre les stress aigus, elles ne diffèrent pas (la concentration en métallothionéines chez les CC10 est de 502 équivalents MT/g et elle est de 575 équivalents MT/g chez les CC50).

On remarque donc que les concentrations en métallothionéines ne diffèrent pas entre les CC10, C50 et CC50. On observe, sur la figure 38 qu'il y a un plateau à partir de la condition CC10.

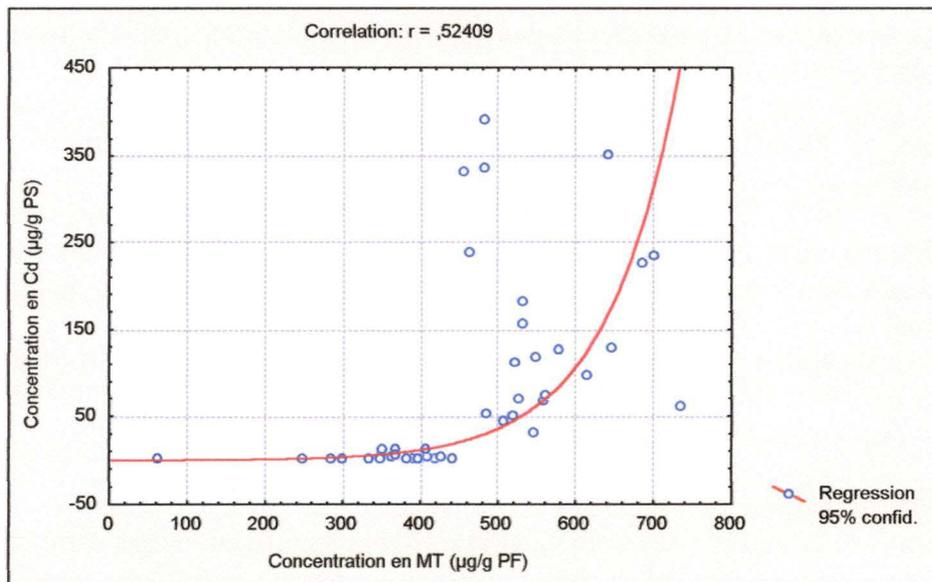


Fig 39 : graphe de corrélation entre les concentrations en cadmium dans les hépatopancréas des crabes témoins et contaminés par différentes concentrations en cadmium et les concentrations en métallothionéines synthétisées lors de ces différents stress

Corrélation entre la synthèse de métallothionéines et l'accumulation de cadmium dans l'hépatopancréas

Des corrélations ont été faites entre les concentrations de métallothionéines synthétisées et les concentrations en cadmium mesurées dans les hépatopancréas des crabes après les différentes conditions de stress.

Nous pouvons observer sur la figure 39 qu'il y a une corrélation significative entre les concentrations en métallothionéines synthétisées pendant les différents stress et les concentrations en cadmium mesurées dans les même hépatopancréas est significative ($r = 0,53$ à $P < 0,05$).

Plus les concentrations en cadmium mesurées sont élevées, plus les métallothionéines sont synthétisées. Cette corrélation est de nature exponentielle.

Discussion

Accumulation du cadmium dans les organes du crabe chinois.

Cette première partie de la discussion vise, sur base des dosages du cadmium dans les différents organes, à situer notre étude par rapport aux données déjà parues dans la littérature.

1. Chez les organismes témoins

Les résultats obtenus pour le dosage du cadmium dans les différents organes des crabes témoins montrent que nous avons de très faibles valeurs pour les organes tels que la carapace, les muscles et l'hémolymphe. Ces structures étant plus inertes dans l'accumulation des métaux, nous comprenons les faibles concentrations mesurées.

Par contre, des concentrations plus importantes sont trouvées dans les autres organes (0,353 µg équivalent MT/g dans les branchies postérieures ; 1,132 µg équivalent MT/g dans l'hépatopancréas et 4,729 µg équivalent MT/g dans les branchies postérieures).

On peut constater que même une faible concentration en cadmium ($<0,001$ mg Cd²⁺/l) peut entraîner une accumulation.

Tout d'abord, dans l'hépatopancréas, nous trouvons une concentration supérieure à celle observée dans les branchies postérieures mais inférieure à celle observée dans les branchies antérieures. O'Hara (1973) avait déjà mis l'accent sur le rôle de l'hépatopancréas en tant qu'organe accumulateur. Puisque cet organe est le siège de la détoxification et surtout du stockage du métal, qui y est donc accumulé.

Ensuite, dans les branchies antérieures, une concentration supérieure aux autres organes y est mesurée. Comme l'ont déjà démontré beaucoup d'auteurs (Bryan, 1964 ; O'Hara, 1973 ; Jennings & Rainbow, 1979), c'est l'organe qui accumule la plus grande concentration de cadmium.

Dans les branchies postérieures, par contre, une faible concentration en cadmium est mesurée. Ces branchies accumulent 14 fois moins de cadmium que les branchies antérieures.

Selon Rainbow (1997), de nombreuses voies d'entrée sont possibles pour ce métal (transport passif, les canaux à calcium, les voies paracellulaires,...). Par ailleurs, il est bien connu que l'épithélium des branchies postérieures chez *E. sinensis* a une ultrastructure totalement différente de celui des branchies antérieures. Alors que ces dernières ont un épithélium fin recouvert d'une épaisse cuticule, les branchies postérieures ont un épithélium épais et une cuticule plus fine.

Ces différences entre les branchies antérieures et postérieures montrent que les premières n'ont qu'un rôle respiratoire et ne participent pas à l'osmorégulation, alors que les secondes pompent des ions du milieu extérieur.

Mais alors, comment se fait-il que les branchies antérieures accumulent plus de cadmium que les branchies postérieures ? Lignon (1987) nous apprend que la cuticule des branchies postérieures chez le crabe chinois présente une faible sélectivité aux ions Na⁺ par rapport à la

cuticule des branchies antérieures. Nous pouvons supposer que la différence du pompage observé entre les branchies antérieures et postérieures peut être expliquée par cette différence de sélectivité de la cuticule aux cations.

En résumé, chez les organismes témoins, les branchies antérieures présentent une concentration en cadmium supérieure aux autres organes. Ensuite, c'est dans l'hépatopancréas que la concentration est la plus importante vu son rôle de stockage et de détoxification. Dans les autres organes pour lesquels la concentration a été mesurée, de faibles concentrations sont mesurées.

Le fait que les branchies antérieures accumulent plus de cadmium que l'hépatopancréas est fort surprenant. Mouneyrac & al. (2001) ainsi que d'autres études comme Legras al. (2000) montrent qu'en général, chez les organismes témoins, c'est l'hépatopancréas qui accumule le plus de cadmium.

2. Influence du stress aigu dans l'absorption du cadmium

Si nous comparons les quantités de cadmium accumulées dans les différents organes du crabe chinois après un stress aigu de 3 jours à 0,5 mg Cd²⁺/l, nous constatons que pour les muscles, la carapace, l'hémolymphe, l'hépatopancréas ainsi que les branchies antérieures et postérieures, l'accumulation est nettement supérieure (de 5,67 fois pour les muscles à 139,7 fois pour les branchies antérieures) à celle observée chez les témoins.

De manière intéressante, seul l'hépatopancréas ne présente pas de différence entre les témoins (T) et le stress chronique (TC).

Comment expliquer ces résultats ? Reprenons organe par organe.

Nous pouvons remarquer que les muscles et la carapace réagissent tous les deux plus ou moins de la même manière lorsqu'on leur impose un stress aigu.

Dans la carapace, une concentration nettement supérieure est mesurée lors d'un stress aigu (4,281 µg Cd²⁺/g PS alors que chez les témoins, elle est de 0,075 µg Cd²⁺/g PS).

Bjerregaard (1991) montrait, lui aussi, une accumulation importante du cadmium dans la carapace (37 µg Cd²⁺/g PS) lorsque des crabes *Carcinus maenas* étaient maintenus 33 jours dans un bassin contenant une concentration de 1 mg Cd²⁺/l.

Jennings & Rainbow (1979), ayant fait la même observation lors d'une autre étude sur *C. maenas*, avaient expliqué cette constatation par le fait que le cadmium s'absorbe sur la carapace. Et donc, plus il y a du cadmium dans le milieu environnant, plus il va s'absorber sur la carapace.

Nos observations sont identiques à celles de Bjerregaard (1991). Nous pouvons supposer que nos constatations s'expliquent par les mêmes phénomènes d'absorption que ceux décrits par Jennings & Rainbow (1979).

Dans les branchies postérieures, il y a aussi une augmentation de l'accumulation du cadmium. Le phénomène d'accumulation a déjà été expliqué dans le paragraphe précédent.

Dans les branchies antérieures, nous mesurons également une concentration supérieure dans cette condition de stress aigu par rapport à celle des témoins. Nous pouvons dire, en reprenant la littérature (Roast & al., 2002) que le cadmium peut pénétrer dans les branchies antérieures

de *E. sinensis* via de nombreuses voies dont les pompes à calcium. Vu que les ions de calcium et de cadmium ont des rayons identiques, ces pompes permettraient l'entrée du cadmium lors du pompage des ions calcium. Si les métaux sont pris par cette pompe, les mécanismes d'osmorégulation serviraient d'intermédiaires à la prise des métaux dépendant de l'activité d'une telle pompe.

L'hémolymphe contient également une concentration supérieure en cadmium dans les organismes après un stress aigu. Ceci est logique si nous suivons le trajet du cadmium dans l'organisme.

En effet, nous savons par Taylor & Taylor (1992) que l'hémolymphe arrive par le vaisseau afférent dans les branchies puis s'infiltré à l'intérieur des lamelles des celles-ci où ont lieu tous les échanges.

Nous savons actuellement que le cadmium peut passer à travers la membrane basolatérale par simple diffusion (Verbost, 1989). Dès lors, plus il y a de cadmium accumulé dans les branchies antérieures, plus il y en aura qui pourra passer dans l'hémolymphe. On comprend donc l'augmentation de la concentration du cadmium dans l'hémolymphe lorsque la concentration dans les branchies antérieures augmente.

Par contre, il n'y a pas d'augmentation de la concentration du cadmium dans l'hépatopancréas après le stress aigu. Il est probable que la durée du stress (3 jours) ne soit pas suffisante pour permettre à l'hépatopancréas d'exercer sa fonction de stockage du métal. Ou bien que cet organe est impliqué dans les processus physiologiques à long terme et non à court terme. On verra par ailleurs, que la concentration en cadmium n'est différente dans cet organe que lorsqu'il s'agit d'un stress de longue durée et avec une concentration en cadmium importante.

3. Effet du stress chronique sur l'absorption du cadmium

Nous n'avons observé aucune différence importante entre les organismes témoins et les organismes ayant subi un stress chronique et ce, pour tous les organes lorsque la concentration du stress chronique est faible. Lorsqu'elle passe à 50 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$, nous avons que l'accumulation est plus importante dans les branchies antérieures et dans l'hépatopancréas.

Concernant la concentration de 10 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$, Jennings & Rainbow (1979) avaient déjà montré qu'une contamination avec la même concentration pendant 40 jours ne provoquait aucune différence significative entre les différents organes examinés de *C. maenas* (hépatopancréas, branchies, muscles, carapace et, regroupé, le reste du corps).

Cette concentration choisie n'est probablement pas assez importante pour provoquer des différences d'accumulation de cadmium dans les organes.

Par contre, une concentration de 50 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{l}$ provoque un phénomène d'accumulation plus important au niveau des branchies antérieures et de l'hépatopancréas. Ceci a déjà été montré par Rainbow & al (1999).

A long terme et avec une concentration suffisante en cadmium, le cadmium est surtout pompé par les branchies antérieures et il est transporté par l'hémolymphe jusqu'à l'hépatopancréas où il est stocké. Ce processus mis en place pour défendre l'organisme ne s'observe qu'à long terme et pour des concentrations suffisamment élevées.

Lors du stress chronique, les organes accumulent beaucoup moins de cadmium que dans le stress aigu sauf pour les branchies postérieures et l'hépatopancréas.

Un stress de longue durée mais d'intensité moindre provoque donc une accumulation plus faible dans les organes qu'un stress de forte intensité mais de courte période.

On peut dire que les branchies antérieures ainsi que la carapace, l'hémolymphe et les muscles sont des structures qui réagissent rapidement à de fortes concentrations alors que l'hépatopancréas ainsi que les branchies postérieures sont plutôt des organes qui accumulent le métal lors de stress de longues périodes.

4. Influence d'un stress chronique préalable au stress aigu sur l'accumulation du cadmium.

Pour les muscles, la carapace, l'hémolymphe, les branchies postérieures et postérieures, nous voyons qu'un stress chronique préalable ne modifie pas l'accumulation pendant le stress aigu.

Dans les branchies antérieures, nous observons une augmentation de cadmium dans les conditions TC, CC10 et CC50 par rapport aux trois autres conditions (T-C10-C50).

Il est intéressant de noter que ces trois conditions (TC, CC10 et CC50) sont identiques alors que la situation de départ est fort différente dans chacune des trois conditions. On remarque qu'il y a un maximum de concentration de cadmium dans les branchies antérieures.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce plateau.

Tout d'abord, les branchies antérieures peuvent avoir atteint un maximum de saturation. Et donc, si nous augmentons la concentration du stress, nous ne verrons pas d'augmentation de la concentration de cadmium accumulée dans ces organes. Le plateau correspondrait au maximum de cadmium que les branchies peuvent accumuler.

Une autre hypothèse est que les branchies seraient trop abîmées lors des stress importants (comme c'est le cas ici) et ne seraient plus fonctionnelles. Elles ne pourraient plus accumuler de cadmium. Lors des dissections des crabes, nous avons de fait remarqué que dans ces conditions, les branchies avaient subi des changements. Certaines étaient plus blanches, d'autres étaient totalement noires ou encore un peu nécrosées.

Dans l'hémolymphe, nous avons mesuré des concentrations nettement supérieures dans les organes qui ont été placés dans les conditions CC10 et CC50 par rapport à la condition de stress chronique simple. Les concentrations en cadmium dans l'hémolymphe augmentent par ailleurs lors d'un stress aigu, qu'il soit précédé ou non d'un stress chronique.

Martin & Rainbow (1998) ont montré que chez *C. maenas*, la concentration de cadmium accumulée dans l'hémolymphe est proportionnelle à la concentration en cadmium dans le milieu externe.

Avant cela, Bjerregaard (1988) avait montré que le taux d'élimination du cadmium à partir de l'hémolymphe chez *C. maenas* ne change pas lorsqu'on augmente sa concentration dans le milieu environnant.

En réalité, l'hémolymphe sert au transport du cadmium des branchies vers d'autres organes comme l'hépatopancréas. Ce transport peut se faire parce que les ions métalliques se lient aux pigments de l'hémolymphe c'est-à-dire à l'hémocyanine.

Dans les conditions de nos expériences, la concentration en cadmium augmente. Donc, en admettant que l'absorption de cadmium par l'organisme soit proportionnelle à la

concentration externe en cadmium et que la quantité absorbée ne soit pas éliminée plus rapidement, nous devons trouver des concentrations plus importantes dans l'hémolymphe des organismes stressés.

Par contre, pour l'hépatopancréas, l'accumulation de cadmium en stress aigu est nettement supérieure s'il y a eu un stress chronique préalable.

Donc, pendant le stress chronique un mécanisme encore inconnu prédispose l'hépatopancréas à accumuler plus de cadmium par la suite pendant un stress aigu.

Dans ces mêmes conditions, nous voyons que dans l'hémolymphe, il y a une diminution de la concentration de sodium lors d'un stress aigu alors qu'elle reste identique aux témoins dans les conditions C50 et CC50. Le fait que cette concentration reste identique pendant ces deux derniers stress signifie qu'il y a une acclimatation de l'organisme qui se met en place (communications personnelles).

Nous pouvons rapprocher ces deux constatations et supposer que le phénomène d'acclimatation observé dans l'hémolymphe est en rapport avec l'acclimatation observée au niveau de l'hépatopancréas dans les mêmes conditions.

Il se pourrait qu'un processus se mette en place pendant le stress chronique et qu'il entraînerait une acclimatation de l'organisme à ces contaminations pendant le stress aigu qui suit.

Répartition du cadmium dans les différents organes pour chaque condition de stress

Pour expliquer le rôle de chaque organe en condition de stress, nous pouvons reprendre le tableau 3 dans la partie résultats :

| | |
|-------------|--|
| T | BA > HP > BP > muscles > carapace > hémolymphe 4,14 > 0,844 > 0,269 > 0,138 > 0,069 > 0,019 |
| TC | BA > BP > HP > carapace > hémolymphe > muscles 611,6 > 11,5 > 9,92 > 4,07 > 1,22 > 0,920 |
| C10 | BA > BP > HP > carapace > muscles > hémolymphe 142,5 > 7,86 > 3,246 > 0,517 > 0,232 > 0,017 |
| CC10 | BA > BP > HP > carapace > muscles > hémolymphe 708,2 > 184,3 > 78,6 > 7,81 > 1,60 > 1,43 |
| C50 | BA > HP > BP > carapace > muscles > hémolymphe 297,7 > 91,9 > 18,8 > 1,48 > 0,308 > 0,087 |
| CC50 | BA > HP > BP > carapace > muscles > hémolymphe 719 > 288 > 104,1 > 7,346 > 1,43 > 0,848 |

Dans le premier groupe d'organes, reprenant les branchies antérieures et postérieures ainsi que l'hépatopancréas, dans les conditions des témoins (T), ce sont les branchies antérieures

qui accumulent la plus grande concentration de cadmium. Ensuite, c'est l'hépatopancréas et pour terminer, les branchies postérieures. Ceci se vérifie également lorsqu'un stress chronique de forte concentration est imposé aux animaux. Par contre, lorsqu'un stress aigu ou un stress chronique tout deux de faible concentration est appliqué aux crabes, les branchies postérieures accumulent plus de métal que l'hépatopancréas. On peut en déduire que l'hépatopancréas est un organe qui accumule beaucoup de cadmium lorsque le stress est important et de longue durée.

Dans le second groupe de structures qui comprend les muscles, la carapace et l'hémolymphe, nous voyons que chez les organismes témoins, ce sont les muscles qui accumulent le plus de cadmium. Ensuite, c'est la carapace et pour finir, l'hémolymphe.

Dès qu'un stress quelconque est imposé aux crabes, la carapace montre une accumulation plus importante que les deux autres structures. Les muscles accumulent un peu moins de cadmium que la carapace quand les animaux sont stressés sauf en condition de stress aigu. Dans cette condition, c'est l'hémolymphe qui accumule le plus de cadmium.

Les muscles, étant des organes plus difficiles à atteindre, n'accumulent pas beaucoup de métal lorsque le stress ne dure que trois jours. Par contre, lorsque le stress dure 30 jours, ces organes ont le temps d'accumuler une certaine quantité de cadmium, ce qui fait qu'au total, ils en accumulent plus que l'hémolymphe qui n'est qu'un tissu de transit.

En conclusion, il apparaît que le cadmium se trouve toujours accumulé en concentration importante dans les branchies antérieures. Pour l'hépatopancréas, la durée de la contamination intervient davantage que l'intensité. Enfin, cette constatation n'est valable que pour cet organe et non pour les autres structures.

Synthèse de métallothionéines dans l'hépatopancréas du crabe chinois

Nous avons appris par la littérature (Pedersen & al., 1997 ; Legras & al, 2000 ; Mouneyrac & al, 2001) qu'une synthèse de métallothionéines se mettait en place lorsqu'il y avait une contamination des individus par les métaux toxiques. Ces protéines ont comme rôles principaux de détoxifier ces métaux et de protéger la cellule des dommages qu'ils pourraient y causer.

L'objectif que nous voulions remplir dans cette partie était de voir si une contamination chronique préalable pouvait influencer la synthèse de métallothionéines lors d'un stress aigu. Un second objectif de cette partie est de mettre en relation les concentrations en métallothionéines avec celles du cadmium.

Nos résultats nous montrent bien une synthèse de métallothionéines dans l'hépatopancréas des organismes contaminés.

Chez les témoins, on constate qu'elles sont déjà présentes à un taux basal de 325,8 µg équivalent MT/g PF par les crabes. Ceci est dû au fait que ces protéines ne se lient pas

uniquement aux métaux traces mais également aux métaux essentiels présents dans l'organisme. Elles interviennent dans le métabolisme d'éléments tels le cuivre et le zinc. Elles ont comme rôle de stocker ces éléments essentiels en surplus dans l'hépatopancréas (Klaassen & al., 1999).

Les concentrations en métallothionéines chez les organismes témoins telles que nous les avons trouvées dans la littérature, sont plus faibles que celles que nous avons mesurées. Del Ramo (1995) signale une concentration d'environ 125 µg MT/g PF.

Pedersen & al (1996) ont, eux, mesuré des concentrations de 111,2 µg MT/g PF dans l'hépatopancréas de *C. maenas*.

En stress aigu, aucune synthèse de métallothionéine n'est observée. Il se pourrait que les 3 jours de stress ne soient pas suffisants pour qu'une synthèse se mette en place.

Si on calcule la concentration en cadmium due uniquement au stress aigu dans les trois conditions de notre expérimentation T, C10 et C50, on remarque qu'il y a uniquement une augmentation dans le cas de CC10-C10.

La capacité de résister à une pollution ultérieure est potentiellement pressentie à ce stade.

L'augmentation est présente également dans les conditions C50 mais elle n'est pas plus forte qu'en C10

On peut émettre l'hypothèse que le système de défense fonctionne déjà à sa capacité maximum en C10. Ceci voudrait dire que l'organisme a atteint son maximum de synthèse et que toute augmentation n'aurait plus d'effet sur la synthèse de ces protéines. Ceci peut être vérifié si nous reprenons les concentrations en cadmium mesurées dans les hépatopancréas où nous observions que la concentration en cadmium continuait à augmenter de manière significative pendant ces différents stress. Donc, la concentration en cadmium augmente toujours alors que la synthèse en métallothionéines reste stable. Il se pourrait donc que l'organisme ait atteint son maximum de synthèse.

Ceci peut être mis en relation avec la réorientation du stockage du cadmium dans l'hépatopancréas dans ces conditions. Nous avons dit que l'hépatopancréas était un organe de stockage lors de stress de longue durée et de concentration suffisante. Nous constatons que la synthèse de métallothionéines augmente juste dans ces conditions.

En résumé, un stress dû au cadmium provoque une synthèse de métallothionéines dans les hépatopancréas mais il faut que ce soit un stress de longue durée et d'intensité assez importante. Cette capacité de résistance est cependant limitée (si on se réfère au plateau de métallothionéines).

Corrélation entre la synthèse de métallothionéines et l'accumulation de cadmium dans l'hépatopancréas

Plusieurs auteurs (Wedderburn & al ; 1998, Pedersen & al ; 1997) ont montré que les métallothionéines synthétisées lors d'une contamination au cadmium pouvaient être mises en rapport avec la concentration du polluant. Dans ce cas, ces protéines peuvent être utilisées comme biomarqueurs de pollution métallique.

L'objectif de cette dernière partie était de voir si les métallothionéines peuvent être utilisées comme biomarqueurs lors d'une pollution au cadmium dans des conditions qui se rapprochent de celles rencontrées dans l'environnement.

Nos résultats sont positifs. On observe bien cette corrélation qui, dans notre cas est de type exponentiel, entre les concentrations en cadmium et celles de métallothionéines dans l'hépatopancréas. Ceci signifie qu'il y a une faible augmentation à faible concentration en cadmium. Ensuite, la synthèse est beaucoup plus rapide aux fortes concentrations.

Les métallothionéines peuvent être importantes dans l'adaptation aux concentrations élevées en métaux dans l'environnement, bien que l'efficacité de ce processus dépend de la capacité du système.

Conclusions et Perspectives

Conclusions et perspectives

Depuis plusieurs années déjà, nos cours d'eau et nos mers sont touchés par des problèmes de pollution de plus en plus pressants. Nous parlons aujourd'hui de pollution thermique, pollution nucléaire, pollution métallique,...

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un soucis environnemental et de santé publique. En effet, le cadmium peut avoir plusieurs effets néfastes non seulement sur les organismes aquatiques mais également sur l'homme. Il peut causer des dommages au niveau du système immunitaire, endocrinien, ... et avoir une issue fatale dans la certains cas.

Pour ces raisons, nous avons décidé de mettre sur pieds ce travail basé sur une espèce modèle : *Eriocheir sinensis*.

Cette espèce a été choisie en raison de son utilisation importante dans la vie quotidienne et pour son caractère invasif qui fait du crabe chinois une espèce à large répartition géographique. De plus elle présente l'intérêt d'être euryhaline. Cette caractéristique lui vaut d'augmenter encore sa distribution spatiale à travers les cours d'eau, les zones côtières.

Comme premier objectif, nous voulions mettre au point à la fois une technique de dosage du cadmium et surtout de dosage des métallothionéines totales. Ces techniques se devaient d'être faciles, rapides, peu coûteuses et assez sensibles afin de pouvoir être appliquées dans les circonstances rencontrées en écotoxicologie. Etant donné ces caractéristiques, la technique de spectrométrie d'absorption atomique se révélait un choix approprié pour le dosage du cadmium.

Pour le dosage des métallothionéines, nous avons fait le choix de la spectrophotométrie. Elle était décrite par Viarengo (1997) comme étant rapide et facile. Mais une mise au point devait être faite au préalable pour être applicable à notre espèce d'étude. Cette mise au point s'est révélée difficile et par manque de temps, nous avons opté pour la saturation à l'argent. Il s'agit d'une technique très rapide avec une mise au point très simple. Elle est peu coûteuse et assez sensible. C'est pourquoi nous avons traité nos échantillons avec cette technique.

L'objectif suivant était de mettre en relation les concentrations de cadmium avec celles des métallothionéines dans le but de mettre en évidence une utilisation éventuelle de ces protéines comme biomarqueurs chez les organismes aquatiques lors d'une pollution au cadmium. Cet objectif a été rempli vu les résultats positifs que nous avons obtenus.

Nos résultats montrent l'importance des conditions de stress (durée et concentrations) ainsi que de l'organe étudié dans le niveau d'accumulation du cadmium et des métallothionéines. En effet, un stress aigu à forte concentration semble plus important qu'un stress chronique à faible concentration pour l'accumulation du cadmium dans tous les organes excepté dans l'hépatopancréas pour lequel le temps d'exposition est plus important. Cela traduit le fait que l'hépatopancréas nécessite une durée d'exposition plus longue avant d'accumuler le cadmium. De manière intéressante, nos expérience de stress chronique précédent un stress aigu, montre que l'hépatopancréas jouerait un rôle primordial dans l'acclimatation des organismes lors de pollutions. En effet, cet organe « détournerait » une partie du cadmium entrée dans l'animal afin de le stocker en grande quantité dans ses tissus. Une synthèse plus importante des

métallothionéines dans ces conditions permettrait à l'hépatopancréas d'être toujours fonctionnel alors que les quantités de cadmium sont importantes.

Ainsi, les phénomènes de pollutions observés de nos jours, doivent être étudiés au cas par cas en fonction de l'intensité et de la durée, afin de déterminer l'impact qu'elles ont sur les organismes. Ces derniers ont en effet la possibilité de réagir en modifiant leur physiologie afin de survivre dans de telles conditions.

Il serait intéressant de comprendre les mécanismes mis en place pendant un stress chronique qui expliquerait un détournement du cadmium vers certains organes.

Nous pourrions aussi étendre les domaines de recherche à d'autres polluants et à d'autres espèces.

Mais une perspective à court terme serait de mettre au point la technique de dosage des métallothionéines par spectrophotométrie sur l'espèce étudiée, *Eriocheir sinensis*.

**Références
Bibliographiques**

Références bibliographiques :

- Amiard, J. C., Cosson, R. P. Les méthallothionéines. Dans: Lagadic, L., Caquet, T., Amird, J. C., Ramade, F. *Biomarqueurs en Ecotoxicologie: Aspects Fondamentaux*, Masson, Paris. 53-66 (1997).
- Bjerregaard, P. Interaction between selenium and cadmium in the haemolymph of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Aquat. Toxicol.* **13**, 1-12 (1988).
- Bjerregaard, P. Relationship between physiological condition and cadmium accumulation in *Carcinus maenas* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* **Vol. 99A, No.1/2**, 75-83 (1991).
- Brian, G. W. Zinc regulation in the lobster *Homarus vulgaris*. I. Tissue zinc and copper concentrations. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **44**, 549-563 (1964).
- CCMRE (Conseil canadien des ministres des ressources et de l'environnement), «Recommandations pour la qualité des eaux au Canada . document préparé par le Groupe de travail sur les recommandations pour la qualité des eaux (1987).
- Chan, J., Huang, Z., Merrifield, M. E., Salgado, M. T., Stillman, M. J. Studies of metal binding reactions in metallothioneins by spectroscopic, molecular modeling techniques. *Coordination Chemistry Reviews* **00**, 1-21 (2002).
- Chung, J., N.O. Nartey et M.G. Cherian . Metallothionein Levels in Liver and Kidney of Canadians - A Potential Indicator of Environmental Exposure to Cadmium. *Arch. Environ. Health* **41**, 319-323 (1986).
- Clark, P. F., Rainbow, P. S., Robbins, R. S., Smith, B., Yeomans, W. E., Thomas, M., Dobson, G. The alien Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (crustacea: decapoda: brachyura), in the Thames catchment. <http://www.nhm.ac.uk/zoology/crab/referencepaper.html>
- CNRC (Conseil national de recherches du Canada) . Les effets du cadmium dans l'environnement canadien . CNRC **16744**, Ottawa (Ont.) (1979).
- Del Ramo, J., Torreblanca, A., Martinez, M., Pastor, A., Diaz-Mayans, J. Quantification of cadmium-induced metallothionein in crustaceans by silver-saturation method. *Marine Environmental Research* **39**, 121-125 (1995).
- Ejnik, J., Robinson, J., Zhu, J., Forsterling, H., Shaw, C. F., Petering, D. H. Folding pathway of apo-metallothionein induced by Zn²⁺, Cd²⁺ and Co²⁺. *Journal of Inorganic Biochemistry* **88**, 144-152 (2002).
- Elinder, C.-G., L., Friberg, T., Kjellström. Normal Values for Cadmium in Human Tissues, Blood, and Urine in Different Countries. *Cadmium and Health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal*, vol.I, 81-102 (1985).
- Giacconi, R., Cipriano, C., Muzzioli, M., Gasparini, N., Orlando, F., Mucchogiani, E. Interrelationships among brain, endocrine and immune response ageing and successful

ageing: role of metallothionein III isoform. *Mechanisms of Ageing and Development* **00**, 1-8 (2003).

Gutknecht, J. Cadmium and thallos ion permeabilities through lipid bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* **735**, 185-188 (1983).

Hamer. Metallothionein. *Annual Review of Biochemistry* **55**, 913-951 (1996).

Hoskin, W.M.A. Cadmium. *Annuaire des minéraux du Canada 1990*, Énergie, Mines et Ressources Canada, Ottawa (Ont.) **17**, 1-17.7 (1991).

Jennings, J. R., Rainbow, P. S., Studies on the uptake of cadmium by crab *Carcinus maenas* in the laboratory. I. Accumulation from seawater and a food source. *Marine biology* **50**, 131-139 (1979).

Klaassen, C. D., Liu, J., Choudhuri, S. Métallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 267-94 (1999).

Lazo, J. S., Kuo, S. M., Woo, E. S., Pitt, B. R. The protein thiol metallothionein as an antioxidant and protectant against antineoplastic drugs. *Chemico-Biological Interactions* **111-112**, 255-262 (1998)

Légras, S., Mouneyrac, C., Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Rainbow, P. S. Changes in metallothionein concentrations in response to variation factors (salinity, sex, weight) and metal contamination in crabs from a metal-rich estuary. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **246**, 259-279 (2000).

Li, B., Fu, X., Liu, Q., Chen, Y. Cloning of crab metallothionein cDNAs. <http://us.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?Q95U92> (2001).

Martin, D. J., Rainbow, P. S. The kinetics of zinc and cadmium in the haemolymph of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Aquatic Toxicology* **40**, 203-231 (1998).

Ministère des Approvisionnement et services. Le cadmium et ses composés. Canada. (1994)

Mouneyrac, C., Amiard-Triquet, C., Amiard, J. C., Rainbow, P. S. Comparison of metallothionein concentrations and tissue distribution of trace metals in crabs (*Pachygrapsus marmoratus*) from a metal-rich estuary, in and out of the reproductive season. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **129**, 193-209 (2001).

Nriagu, J.O., Pacyna, J.M., Quantitative Assessment of Worldwide Contamination of Air, Water and Soils by Trace Metals, *Nature* **333**, 134-139 (1988).

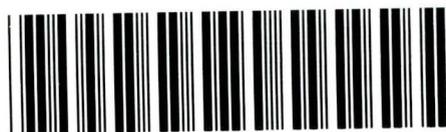
O'Hara, J. Cadmium uptake by fiddler crabs exposed to temperature and salinity stress. *J.Fish.Res.Bd.Can.* **30**, 846-848 (1973).

Pedersen, S. N., Pedersen, K. L., Hojrup, P., Knudsen, J., Depledge, M. H. Induction and identification of cadmium-, zinc- and copper-methallothioneins in the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **120**, 251-259 (1998).

- Pedersen, S. N., Lundebye, A. K., Depledge, M. H. Field application of metallothionein and stress protein biomarkers in the shore crab (*Carcinus maenas*) exposed to trace metals. *Aquatic Toxicology* **37**, 183-200 (1997).
- Pedersen, T. V., Bjerregaard, P. Calcium and cadmium fluxes across the gills of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Mar.Poll.Bull.* **31**, 73-77 (1995).
- Rainbow, P. S., Ecophysiology of trace metal uptake in the crustaceans. *Estuary, Coastal and Shelf Science* **44**, 169-175 (1997).
- Rainbow, P. S., Amiard-Triquet, C., Amiard, J. C., Smith, B. D., Best, S. L., Nassiri, Y., Langston, W. J. Trace metal uptake rates in crustaceans (amphipods and crabs) from coastal sites in NW Europe differentially enriched with trace metals. *Marine Ecology Progress Series* **183**, 189-203 (1999).
- Roast, S. D., Rainbow, P. S., Smith, B. D., Nimmo, M., Jones, M. B. Trace metal uptake by the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* : the role of osmoregulation. *Marine Environmental Research* **53**, 453-464 (2002).
- Roesijadi, G. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*. **22**, 81-114 (1992).
- Romero-Isart, N., Vasak, M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneines. *Journal of Inorganic Biochemistry* **88**, 388-396 (2002).
- Sylvestre, F., Trausch, G., Péqueux, A., Devos, P. Uptake of Cadmium through isolated perfused gills of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. Soumis le 12/06/2003 à CBP part C. (2003).
- Taylor, H. H., Taylor, E. W. Gills and lungs: the exchange of gases and ions. *Microscopic anatomy of invertebrates* **10**, 171-175 (1992).
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **13**, 57-149 (2003).
- Veldhuizen, T. C., Stanish, S. Overview of the life history, distribution, abundance and impacts of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. CA 95816 (1999).
- Verbost, P. M., Van Rooij, J., Flik, G., Lock, R. A. C., Wendelaar Bonga, S. E. The movement of cadmium through freshwater trout branchial epithelium and its interference with calcium transport. *J.Exp.Biol.* **145**, 185-197 (1989).
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, R. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research*, vol. **44**, No. **1**, 69-84 (1997).
- Wedderburn, J., Cheung, V., Bamber, S., Bloxham, M., Delpledge, M. H. Biomarkers of biochemical and cellular stress in *Carcinus maenas*: an *in situ* field study. *Marine Environmental Research* vol. **46**, No. **1-5**, 321-324 (1998).

Wright, D. A., The uptake of cadmium into the haemolymph of the shore crab *Carcinus maenas* : the relationship with copper and other divalent cations. *J.Exp.Biol.*, **67**, 147-161 (1977).

Yeats, P.A., Bowers, J.M., Nriagu J., «Evidence for Anthropogenic Modification of Global Transport of Cadmium», *Cadmium in the Aquatic Environment*, Toronto (Ont.), 19-34 (1987).



20.045.440