

50376
1987
167

50376
1987
167

N° d'ordre : 135

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

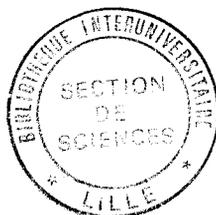
pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES

par

Ahmed NEJMEDDINE



EFFETS BIOLOGIQUES DU CADMIUM SUR UN INVERTEBRE MARIN (*NEREIS DIVERSICOLOR*) ISOLEMENT ET CARACTERISATION D'UNE METALLOPROTEINE INTERVENANT DANS LES PROCESSUS DE DETOXICATION

Soutenue le 10 Juillet 1987 devant la Commission d'Examen :

Président :	M.	PORCHET
Rapporteurs :	M.	SAUTIERE
	M.	PIHAN
Examineurs :	Mme	DHAINAUT-COURTOIS
	M.	DHAINAUT
	M.	BAERT

A la mémoire de mon père.

A ma mère, mes frères et leur femme , à mes soeurs et leur mari .

A tous mes neveux.

A ma chère future femme Chafika qui m'a bien soutenu pour réaliser ce travail.

A tous mes ami(es) et particulièrement, Chakir, Mhaouri, Jamaledine, Houssine, Mouna, Nezha, Olya, Hafid et Amine, qui m'ont toujours encouragé au cours de mes études.

Aux familles, Chraibi, Skali, Kabak, Nahid, Jamjami, Zoraf, Marzouki, Nejmeddine, Mamdouh, Aadouche et Zenjari.

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire d'Endocrinologie des Invertébrés (Unité Associée au CNRS n° 148) dirigé par Monsieur le Professeur Porchet à qui j'exprime toute ma reconnaissance pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et avoir accepté de juger ce travail.

Que Madame le Professeur N. Dhainaut-Courtois qui m'a si bien encadré et guidé au cours de ce travail et qui, avec une grande patience m'a initié à la recherche, veuille accepter ma profonde gratitude et toute ma reconnaissance.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur A. Dhainaut qui s'est intéressé de près à ce travail en m'apportant des conseils précieux dans les moments difficiles.

Je remercie Monsieur Bouquegneau, chercheur qualifié au Fonds national de la Recherche Scientifique à l'Université de Liège (Belgique), qui m'a initié aux techniques relatives à l'étude biochimique des métalloprotéines lors d'un stage effectué dans son laboratoire.

Que Monsieur le Docteur J.-L. Baert qui m'a toujours aidé par ses discussions logiques et fructueuses et qui m'a guidé dans mon étude biochimique, veuille accepter toute ma reconnaissance et ma considération.

Je remercie Monsieur le Professeur P. Sautière pour les analyses des acides aminés qui ont été effectuées dans son laboratoire et pour sa participation à mon Jury de thèse.

Que Monsieur le Professeur J.-P. Pihan trouve dans ce mémoire la récompense de tout "le savoir-faire" qu'il nous a appris au cours du premier et du deuxième cycles. Je le remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie Madame E. Porchet-Henneré , Directeur de Recherches, et son équipe des "monoclonaux" pour sa collaboration dans la fabrication de l'anticorps monoclonal. Qu'elle accepte toute ma considération.

Je tiens à remercier également Monsieur le Professeur B. Fournet et son étudiant P. Boulenguer de nous avoir accordé leur collaboration pour l'analyse des hydrates de carbone.

Tous les dosages des métaux lourds ont été effectués dans le laboratoire de Chimie marine dirigé par Monsieur le Professeur M. Wartel à qui j'exprime, ainsi qu'à son étudiant M. Skiker, tous mes remerciements.

Je tiens à remercier vivement Mademoiselle M. Masson pour toute l'aide et le soutien qu'elle m'a apportés pour la réalisation de ce travail.

Je remercie également Madame F. Bonet pour la dactylographie de ce mémoire, ainsi que Madame A. Auger et Monsieur D. Lazarecki pour les reproductions photographiques.

Je tiens particulièrement à remercier mes frères Mohamed et Larbi ; sans eux, ce travail n'aurait jamais été réalisé. Qu'ils trouvent dans ce mémoire la récompense de leurs grands efforts. Je n'oublierai jamais le soutien moral que ma mère et mes soeurs m'ont accordé jusqu'à maintenant.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

Pages

INTRODUCTION

I - SOURCE DE POLLUTION PAR LE CADMIUM	1
II - EFFETS DE L'INTOXICATION PAR LE CADMIUM	1
II.1. Chez l'homme	1
II.2. Chez l'animal	2
II.2.1. Vertébrés	2
II.2.2. Invertébrés	3
III - MODE D'ACTION DU CADMIUM	4
IV - REACTIONS DE DEFENSE DE L'ORGANISME	5
IV.1. Les sphérocristaux	6
IV.2. Les métalloprotéines	7
IV.2.1. Les métallothionéines	7
IV.2.1.1. Etude des métallothionéines	8
IV.2.1.1.1. Méthode de purification	8
IV.2.1.1.2. Caractérisation	10
IV.2.2. Autres protéines fixant le cadmium (non métallothionéines)	14
BUT DU TRAVAIL	15

CHAPITRE I - MATERIEL ET METHODES

A - MATERIEL BIOLOGIQUE	16
B - METHODES	16
I - Mode d'intoxication	16
II - Techniques	16
1. Techniques cytologiques conventionnelles	16
1.1. Microscopie photonique	16
1.2. Microscopie électronique	17

2. Techniques biochimiques	17
2.1. Dosage des métaux (zinc, cuivre, cadmium)	17
2.2. Techniques préparatives	20
2.2.1. Extraction tissulaire et chromatographie	20
a) Extraction tissulaire	20
b) Chromatographie	21
2.3. Techniques analytiques	22
2.3.1. Détermination du poids moléculaire	22
2.3.2. Analyse en HPLC (chromatographie de perméation)	23
2.3.3. Analyse électrophorétique	23
a) Electrophorèse en milieu dénaturant (SDS)	23
b) Electrofocalisation	23
c) Transfert électrophorétique sur la nitrocellulose	24
2.3.4. Absorption dans l'ultraviolet	24
2.3.5. Analyse des acides aminés	24
2.3.6. Etude de la composition en oses de la MP II	25
3. Méthodes immunologiques	25
3.1. Obtention des anticorps	25
3.1.1. Anticorps polyclonaux	25
3.1.2. Anticorps monoclonaux	26
3.2. Tests d'immunodétection	27
3.2.1. Test d'immunodiffusion	27
3.2.2. Immunodétection des protéines transférées sur nitrocellulose	27
3.2.3. Test ELISA	27
3.3. Immunoprécipitation	28
3.3.1. Préparation des échantillons	28
3.3.2. Technique d'immunoprécipitation	30
3.4. Immunocytochimie	30
3.4.1. En microscopie photonique	30
3.4.2. Sur des frottis de cellules	31
3.4.3. En microscopie électronique	32

CHAPITRE II - TESTS DE TOXICITE DU CADMIUM

A - ETUDE DE LA MORTALITE EN FONCTION DE LA DOSE DE CADMIUM ET DE LA TEMPERATURE	33
B - ETUDE ULTRASTRUCTURALE	33
1 - Epiderme	33
2 - Tissu nerveux	35
3 - Epithélium digestif	35
4 - Néphridie	35
5 - Cellules coelomiques	35
DISCUSSION	37

CHAPITRE III - BIOACCUMULATION DU CADMIUM, DU ZINC ET DU CUIVRE

A - ETUDE DE LA CINETIQUE D'ACCUMULATION DU CADMIUM	43
I - En fonction du temps	43
I.1. Dans les animaux entiers	43
I.2. Dans la partie insoluble des animaux	44
I.3. Recherche d'une éventuelle élimination du cadmium	44
II - Effet de la température	46
B - CINETIQUE D'ACCUMULATION DU ZINC ET DU CUIVRE LORS DE L'INTOXICATION PAR LE CADMIUM	48
1. Dans les animaux témoins (non contaminés)	48
2. Dans les animaux contaminés	50
C - REPARTITION DU CADMIUM, DU ZINC ET DU CUIVRE DANS LA PARTIE SOLUBLE	50
I - Animaux non intoxiqués	50
II - Animaux intoxiqués par le cadmium	52

D - CINETIQUE D'ACCUMULATION DU CADMIUM DANS LA FRACTION SOLUBLE DES ANIMAUX INTOXIQUES PAR 22 PPM DE CE METAL	52
---	----

DISCUSSION	57
------------	----

CHAPITRE IV - ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE LA PROTEINE MP II QUI COMPLEXE LE CADMIUM

A - ETUDE DES PROTEINES COMPLEXANT LE CADMIUM (METALLOPROTEINES)	62
I - Protéines composant le pic II	62
I.1. Purification de la MP II	62
I.2. Caractérisation	66
II - Protéines composant le pic I	73

DISCUSSION	75
------------	----

CHAPITRE V - LOCALISATION DE LA MP II A L'AIDE D'ANTICORPS POLY- ET MONOCLONAUX

RECHERCHE DES MECANISMES D'ACTION

A - LOCALISATION DE LA MP II	79
I - Détection de la MP II par des anticorps polyclonaux	79
I.1. Anticorps polyclonal de lapin anti-MP II	79
I.1.1. Fabrication	79
I.1.2. Immunocytochimie	79
I.1.3. Electrophorèse	81
I.1.4. Immunoprécipitation	83
I.2. Anticorps polyclonal de souris anti-coelomocytes	83
I.2.1. Fabrication	83
I.2.2. Détection de la MP II après transfert électrophorétique sur nitrocellulose	84

II - Localisation de la MP II à l'aide des anticorps monoclonaux	86
II.1. Obtention d'un anticorps monoclonal anti-MP II	86
II.2. Immunocytochimie	87
B - RECHERCHE DES MECANISMES D'ACTION DE LA MP II LORS DE L'ACTIVATION DES GRANULOCYTES	87
I - Activation <u>in vitro</u>	87
I.1. Electrophorèse	87
I.2. Immunoprécipitation	89
II - Activation <u>in vivo</u>	89
II.1. Immunocytochimie	89
II.2. Immunoprécipitation à partir du liquide coelomique et électrophorèse	90
DISCUSSION	92
DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES	94
BIBLIOGRAPHIE	100

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I - SOURCE DE POLLUTION PAR LE CADMIUM

Avant le développement industriel, les seules sources de production de cadmium étaient naturelles. Les retombées volcaniques, l'érosion des roches et le lessivage des sols constituaient les sources les plus importantes de pollution par ce métal lourd. Les processus de mobilisation du cadmium de façon naturelle étaient très lents à cause de la faible teneur en cadmium des moyens de transport (air et eau). L'industrie a élevé de façon remarquable les concentrations en cadmium dans les milieux naturels ; celui-ci ne s'y trouve pas sous une forme libre mais constitue un sous-produit dans la fusion et le raffinage des minerais de zinc et de plomb. Ainsi, les installations industrielles peuvent alimenter en cadmium plusieurs secteurs de l'environnement. La pollution atmosphérique peut amener de 0 à 1,5 μg de cadmium par jour (Muskett, 1979) dans l'environnement des zones industrielles. La concentration normale dans l'air est de 0,001 $\mu\text{g}/\text{m}^3$; elle est bien supérieure en zone urbaine ou industrielle, en particulier dans les grandes villes américaines et japonaises (jusqu'à 0,083 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Les concentrations sont encore plus élevées dans les zones industrielles qui utilisent le cadmium (0,166 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ au Japon à Annaka).

A côté de la pollution atmosphérique, nous citerons également celle des eaux et par conséquent celle des aliments qui constitue un danger pour la santé de l'homme. Ce dernier est, en dehors des risques professionnels, exposé à d'autres possibilités d'absorption du cadmium dans l'environnement.

II - EFFETS DE L'INTOXICATION PAR LE CADMIUM

II.1. Chez l'homme

Constituant le dernier maillon de la chaîne alimentaire, l'homme est exposé à de hauts risques d'intoxication par certains métaux lourds tels que le cadmium. En effet, les produits de la mer (huîtres, crustacés, moules, poissons) peuvent concentrer le cadmium jusqu'à 100.000 fois par rapport à la concentration dans l'eau de mer. Mais la sensibilisation des gens et la prise de conscience des risques inhérents à la présence de cadmium dans

l'environnement n'ont été effectives que depuis la maladie Itai-Itai apparue au Japon. Cette intoxication a été provoquée par des eaux de boisson et la consommation des aliments pollués (riz, poissons, céréales, etc.) (Fukushima, 1970 ; Tsuchiya, 1976 ; Nogawa, 1977). Cette maladie s'est manifestée par des troubles osseux, dus probablement à une mauvaise mobilisation du calcium, l'accroissement du taux de la phosphatase alcaline dans le sang, la protéinurie et la glucosurie. Effectivement, il a été observé qu'en cas d'inhalation massive du cadmium il apparaît, après quelques heures, une soif intense, des nausées, des vertiges accompagnés de céphalées ; d'autres troubles plus graves peuvent apparaître plus tardivement au niveau des poumons, des reins et du foie. Ces trois organes constituent les lieux d'accumulation du métal et se trouvent par conséquent les plus atteints. Magos (1974) et Amacher (1975) ont montré successivement au niveau du foie et du rein la synthèse d'une protéine ayant la capacité de fixer les métaux lourds par ordre d'affinité décroissante : Hg, Cd, Zn, Cu (Pulido, 1966). Cette protéine est appelée métallothionéine à cause de sa richesse en cystéine et par conséquent en groupes thiols qui permettent la liaison avec le métal. A côté des trois organes cités ci-dessus, le cadmium a été trouvé dans le pancréas, les testicules, la thyroïde et les glandes salivaires (Friberg, 1959 ; Lewis, 1972 ; Nordberg, 1972), le coeur et les grosses artères (Amacher, 1975).

Dans le cas d'une intoxication chronique, les symptômes et les effets du cadmium sont très différents. Le rein est l'organe cible ; lorsqu'il est atteint, une protéinurie apparaît rapidement, indiquant une lésion des tubes proximaux en particulier. On note également la présence de calculs rénaux avec une fréquence assez élevée chez les travailleurs exposés à la poussière de cadmium.

II.2. Chez l'animal

II.2.1. Vertébrés

Plusieurs auteurs ont étudié l'action du cadmium sur la reproduction. Ils ont montré que ce métal peut provoquer la stérilité (Fowler et al., 1982 ; Maines et al., 1982 ; Baranski et al. ; Dwiverdi, 1983 ; Saksena et al., 1983). Il provoque une hypertension (Boehme, 1979 ; Revis et al., 1981 ; Templeton et Cherian, 1983) et des malformations embryonnaires (Yoneyama,

1983). Strauss (1976) a observé des lésions des cellules épithéliales alvéolaires de type I avec destruction membranaire après exposition à du chlorure de cadmium à 0,1 % en aérosol. Chez des rats exposés à un aérosol de 0,5 % de chlorure de cadmium pendant 1 heure, Bus (1978) a noté des troubles tels qu'une augmentation de l'activité de la glucose 6-phosphate déshydrogénase, de la superoxide dismutase. Après exposition de rats et de souris pendant 15 mn à 10 mg Cd/m³ sous forme d'oxyde, Bouley (1977) a observé une augmentation temporaire du poids des poumons, une diminution suivie d'une prolifération des macrophages alvéolaires et l'apparition de nombreux lymphocytes et de cellules polymorphonucléaires, correspondant à un phénomène inflammatoire.

Plusieurs auteurs ont supposé que la mort des poissons par intoxication aiguë par le cadmium résultait d'une asphyxie provoquée par la nécrose du tissu branchial et par le dépôt à sa surface de matériel cellulaire mort et du mucus précipité (Schweiger, 1957 ; Mount et Stephan, 1967 ; Gardner et Yevich, 1970). Ce mécanisme a été également invoqué pour expliquer l'action toxique vis-à-vis des poissons d'autres métaux tels que le zinc et le cuivre (Schweiger, 1957 ; Burton et al., 1972 ; Eisler et Gardner, 1973).

Chez les Mammifères, plusieurs auteurs ont montré les mêmes effets que chez l'homme après une intoxication chronique, à savoir des malformations osseuses (Gale et Ferm, 1973) des néphropathies tubulaires se traduisant par une protéinurie (Friberg, 1948 ; Pujol et al., 1970 ; Nomiya et al., 1973 ; Foulkes et Gieske, 1973), une modification des propriétés des vaisseaux sanguins (Thind, 1973).

II.2.2. Invertébrés

Beaucoup d'Invertébrés sont rapidement tués par des concentrations de cadmium inférieures à 1 ppm. L'intoxication par ce métal provoque chez l'Insecte Locusta migratoria des altérations des corps adipeux consistant en une réduction des réserves énergétiques ; le fonctionnement de l'appareil génital femelle est altéré par l'inhibition des synthèses, au niveau du corps jaune (Martoja et al., 1983).

Chez le crabe, le cadmium cause, dans les cellules de la glande digestive, un accroissement de l'activité golgienne qui se traduit par une nette augmentation du nombre de

dictyosomes, des saccules et des vésicules, et l'apparition simultanée de nombreux lysosomes, primaires et secondaires de type phagolysosomes; les vacuoles digestives se transforment en d'énormes corps résiduels où sont séquestrées des inclusions denses aux électrons (Chassard-Bouchaud, 1983).

Chez un Nématode, Caenorhabditis elegans, Popham et Webster (1982) ont observé un certain nombre d'altérations survenant au niveau de l'oesophage et de l'intestin après intoxication par le cadmium et le mercure.

Argopecten irradians soumis à 0,7 ppm de cadmium pendant 5 jours présente une extrusion massive de concrétions calcifiées par la plupart des cellules épithéliales du rein. Des dommages morphologiques ne sont toutefois observés que dans une faible zone de cet organe (in Delval, 1984).

Chez l'Annélide Polychète, Nereis diversicolor, à l'exception de l'apparition de sphérocristaux dans l'intestin, il n'a pas été enregistré de modifications notables des tissus lors d'une intoxication à 13°C provoquée par 22 ppm de cadmium ajoutés expérimentalement à l'eau d'élevage. Par contre, si une intoxication par une concentration de 44 ppm pendant 4 jours semble encore sans effet, la prolongation de l'expérience à 11 jours entraîne systématiquement la lyse de certains tissus tels que l'épiderme et l'arrêt de la libération de neurohormones (Dennaï, 1984 ; Dennaï et al, 1986).

III - MODE D'ACTION DU CADMIUM

Le cadmium est un métal non essentiel au fonctionnement de l'organisme. Classé parmi les éléments du groupe II B dans la classification de Mendeleev, le cadmium possède une forte électropositivité et par conséquent une grande affinité pour les groupements amines, sulfhydriles et phosphates. Ces groupements forment dans la majorité des cas des sites actifs de nombreuses enzymes (Somers, 1960). C'est sa grande affinité pour de nombreuses molécules organiques (acides aminés et notamment la cystéine, les bases puriques, les porphyrines, les ptéridines) qui lui confère toute sa toxicité et son grand pouvoir d'accumulation dans les différents tissus.

Dans le cas d'une intoxication par le cadmium, certaines réactions enzymatiques sont perturbées par le fait que ce métal

peut, par sa grande affinité, remplacer le zinc qui est le cofacteur de certaines enzymes. Ce métal peut également interférer avec l'activité enzymatique en réagissant avec un groupement fonctionnel faisant partie ou non d'un site actif d'une molécule. Ainsi, Vallée et Ulmer (1972) ont montré que le cadmium peut se substituer au zinc au niveau du site actif de la carboxypeptidase A du pancréas bovin, ce qui lui donne un pouvoir d'hydrolyse important vis-à-vis des esters. Cette substitution du zinc par le cadmium a été observée dans d'autres protéines que les enzymes, par exemple dans l'albumine et la mercaptalbumine de l'homme et du boeuf (Gurd et Wilcox, 1956) et dans les métallothionéines du rat et de la souris (Suzuki et Yoshikawa, 1974).

L'interaction du cadmium avec les groupements phosphates et les bases hétérocycliques des acides nucléiques laisse supposer des anomalies génétiques et des perturbations de la synthèse protéique ainsi que des effets cancérogènes (Eichhorn, 1975 ; Stoll et al., 1976).

Le cadmium entre également en compétition avec le calcium et le baryum dans les systèmes enzymatiques de la contraction musculaire, notamment au niveau des fibres musculaires lisses vasculaires (Toda, 1973). Il exerce aussi une action compétitive vis-à-vis du fer et du cuivre comme cofacteur des mono-amines oxydases et diminue l'activité de ces systèmes enzymatiques (Glauser, 1976).

IV - REACTIONS DE DEFENSE DE L'ORGANISME

Les Invertébrés et Vertébrés, y compris l'homme, sous exposition à une intoxication chronique par le cadmium, développent plusieurs mécanismes de défense. Ces réactions se traduisent soit par une diminution d'absorption du métal, soit par une excrétion urinaire. En effet, chez les sujets exposés professionnellement, les taux du cadmium excrété par l'urine sont beaucoup plus importants que chez les non exposés et non fumeurs. L'élimination du cadmium peut être également faite par une excrétion fécale qui est beaucoup plus importante que la précédente (Klaassen, 1977). Cette excrétion se fait par une élimination du cadmium contenu dans la bile et les sécrétions pancréatiques (Nordberg, 1972 ; Elinder, 1978). Chez l'homme, Elinder (1978) a trouvé en moyenne 2,5 ng de cadmium/g dans la bile. Après injection intraveineuse de doses faibles de cadmium à des rats (67 à 120 µg) les concentrations biliaires les plus élevées

apparaissent après 15 à 30 minutes ; 5 % de la dose administrée a été retrouvée dans le tube digestif et les fèces (Cikrt, 1974).

En plus du processus d'élimination, l'organisme peut très bien développer d'autres moyens de défense tels que la synthèse de protéines ayant la capacité de fixer les métaux appelées d'une manière générale métalloprotéines. Les cellules peuvent également accumuler le métal sous forme de concrétions minérales appelées sphérocristaux. Certaines métalloprotéines et les sphérocristaux, en fixant le métal, peuvent le rendre inactif et par conséquent non toxique pour l'organisme.

IV.1. Les sphérocristaux

Ainsi appelés à cause de leur forme, les sphérocristaux sont des formations concentriques qui apparaissent chez des animaux intoxiqués par des métaux lourds. Selon certains auteurs, ces concentrations minérales joueraient un rôle important dans le piégeage du cadmium, elles permettraient son accumulation dans l'organisme tout en diminuant sa toxicité. En effet, l'apparition de ces sphérocristaux a été signalée, chez les Annélides (Boilly et Richard, 1978 ; Dennaï, 1984 ; Nejmeddine, 1985 ; Dennaï et al., 1986), chez les Crustacés (Chassard-Bouchaud, 1982), chez les Insectes (Martoja et al., 1983 ; Martoja et Martoja, 1984) et chez les Protozoaires (Simkiss, 1976). Simkiss (1981) et Mason et al. (1982) ont montré que lors d'une exposition des animaux de quelques heures, la plupart des métaux lourds radioactifs sont incorporés rapidement dans les sphérocristaux. Ballan-Dufrançais (1982) a tiré la même conclusion après avoir suivi au microscope électronique le processus de bioaccumulation de métaux dans les sphérocristaux de Pecten maximus à l'aide d'une microsonde aux rayons X. Une intoxication par le manganèse provoque chez ce mollusque la formation de concrétions rénales (Mauri, 1982). Chez Argopecten irradians, Carmichael et al. (1981) ont montré que les sphérocristaux jouent un rôle important dans l'accumulation, l'excrétion et la détoxification du cadmium. Chez l'anguille, Noël-Lambot (1980) a observé des corpuscules intestinaux très chargés en métaux.

A côté de ces formations minérales, l'animal peut réagir par d'autres moyens qu'il peut posséder spécifiquement. Les Crustacés ont un exosquelette qui fixe les métaux polluants et permet par conséquent une détoxification régulière à chaque mue (Poirier et al., 1981). Les poissons par une sécrétion abondante du mucus

lors de leur intoxication par le $HgCl_2$, arrivent à diminuer l'absorption de ce métal (chez Serranus cabrilla (Radoux et al., 1979)).

IV.2. Les métalloprotéines

Ces protéines se distinguent des autres par la forte affinité qu'elles possèdent vis-à-vis des métaux lourds en général et du cadmium en particulier. Elles sont subdivisées, en particulier, à cause de leur composition en acides aminés et leur spectre d'absorption en ultraviolet à 250 et 280 nm, en 2 groupes : les métallothionéines et les métalloprotéines (non-métallothionéines).

IV.2.1. Les métallothionéines

Cette dénomination leur a été attribuée pour la première fois en 1957 par Margoshes et Vallée quand ils ont montré qu'une protéine cytoplasmique du cortex rénal du cheval, assez riche en cadmium et en zinc, a un taux très élevé en cystéine (30 % des résidus d'acides aminés) et ne contient pas d'acides aminés aromatiques (Kägi et Vallée, 1960, 1961).

Après sa découverte, cette métallothionéine a d'abord été recherchée surtout chez les Mammifères y compris l'homme et les Vertébrés en général. Chez l'homme, cette catégorie de protéines est synthétisée essentiellement par le foie et secondairement par la rate (Amacher, 1975), par les reins (Magos, 1974), l'intestin (Squibb, 1976) mais aussi par les testicules, le pancréas et d'autres organes.

Chez les Mammifères, des protéines semblables à la métallothionéine du cheval ont été trouvées et identifiées surtout au niveau du foie et du rein chez le lapin (Nordberg et al., 1974 ; Piscator, 1964), chez la chèvre (Mjor-Grimsrud, 1979), chez le veau (Briggs et al., 1982) et chez le porc (Bremner et al., 1976a). En plus de ces 2 organes cibles qui constituent des réserves de métallothionéines lors d'une intoxication, il y a d'autres tissus qui peuvent synthétiser ce genre de protéines. Il en existe au niveau du pancréas (Yau et Menear, 1977), de la rate (Shaik, 1971 ; Amacher et Ewing, 1977) et des testicules (Nordberg, 1971 ; Chen, 1972 ; Singh, 1974). L'isolement et l'identification des métallothionéines ont été effectués également chez les oiseaux (Weser et al., 1973) et chez les Poissons (Bouquegneau et al., 1975, Bouquegneau et Noël-Lambot, 1978 ; McCarter et Roche, 1983 ; Delval, 1984).

Durant ces dernières années, la recherche des métallothionéines a été élargie aux Invertébrés qui constituent un danger d'intoxication par le fait qu'ils se placent généralement dans le début de la chaîne alimentaire et par leur pouvoir de concentration de métaux lourds ; les Murex, par exemple, peuvent concentrer un million de fois le cadmium des eaux de (Martoja et Martoja, 1984). Ce sont les Mollusques qui ont été les plus étudiés, surtout les espèces consommables par l'homme. Quelques exemples sont donnés dans le tableau 1.

IV.2.1.1. Etude des métallothionéines

IV.2.1.1.1. Méthodes de purification

Les méthodes de purification de ces protéines sont basées essentiellement sur les techniques d'extraction tissulaire à partir des organes susceptibles d'accumuler les métaux lourds et par conséquent de synthétiser des métallothionéines. Cette extraction elle-même est basée sur une homogénéisation du tissu suivie d'une centrifugation. En général, l'homogénéisation est faite dans 2 à 3 volumes (V/W) de solution saline isotonique (Olafson et al., 1979) ou dans du saccharose (Noël-Lambot, 1980). L'homogénat est ensuite centrifugé pendant 1 heure à 100 000xg (Noël-Lambot, 1980). Quand l'échantillon est riche de lipides, il est préférable de centrifuger une première fois à 20 000xg pendant 15 mn à 4°C pour éliminer la couche lipidique qui se forme sur le surnageant et ensuite reprendre ce surnageant pour le centrifuger à 80 000xg pendant 1 heure (Roesijadi et al., 1981).

D'autres procédures ont été mises au point pour la purification des métallothionéines. Olafson et al. (1979) ont montré que la dénaturation des homogénats à 90°C pendant 10 mn et leur centrifugation à 12 000xg pendant 10 mn permettent l'élimination de la plupart des activités protéolytiques, autres que les métallothionéines. Mais cette technique présente l'inconvénient d'exclure la méthode de séparation par chromatographie d'échange d'ions et sur gel de polyacrylamide qui nécessitent du matériel non dénaturé.

Buhler et al. (1974) ont essayé un fractionnement par des précipitations et des centrifugations successives. Ils ont précipité par 95 % d'éthanol à -20°C la fraction des métallothionéines qu'ils ont récupérée par centrifuga-

Tableau 1 - Répartition des métalloprotéines chez quelques espèces d'Invertébrés.

	METALLOTHIONEINES	NON-METALLOTHIONEINES METALLOPROTEINES	AUTEURS	Année
POLYCHETES	<i>Eudystylia vancouveri</i> (Cu)	<i>Nereis diversicolor</i>	Young et Roesijadi Ce travail	1983 1987
OLIGOCHETES	<i>Eisenia fetida</i>		Yamamura et al.	1981
MOLLUSQUES	<i>Helix pomatia</i> (Cd) <i>Clemmys mutica</i> (Cd, Cu) <i>Murex trunculus</i> (Cd) <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Cu) <i>Mytilus edulis</i> (L) (Cd) <i>Patella vulgata</i> (Cd) <i>Patella caerulea</i> (Cd) <i>Littorina littorea</i> (Cd) <i>Scyliorhinus canicula</i> (Cd, Zn, Cu)	<i>Buccinum tenuissimum</i> (Cd) <i>Pecten maximus</i> (Cd) <i>Crassostrea virginica</i> (Cd) <i>Helix pomatia</i> (Cu) <i>Pecten maximus</i> (Cd) <i>Mizuhopecten yessoensis</i> (Cd)	Dohi et al. Stone et Overnell Ridlington et Fowler Dallinger et Wieser Stone et al. Evtushenko et al. Dallinger et Wieser Yamamura et Suzuki Bouquegneau et al. Viarengo et al. Frazier et al. Noël-Lambot Noël-Lambot Noël-Lambot Hidalgo et al.	1983 1985 1979 1984 1986 1986 1984 1984 1983 1985 1980 1979 1979 1985
CRUSTACES	<i>Cancer pagurus</i> (Cd, Cu) <i>Cancer magister</i> <i>Scylla serrata</i> <i>Carcinus maenas</i>	<i>Palaemon elegans</i> (Cd, Cu, Zn)	Overnell Olafson et al. Olafson et al. Whites et Rainbow Wong et Rainbow	1984 1979 1979 1986 1986
INSECTES	<i>Blatella germanica</i> (Hg) <i>Drosophila melanogaster</i> (Cd) <i>Chironomus yoshimatsui</i> (Cd)	<i>Locusta migratoria</i> (Cd, Hg) <i>Pteronarcys californica</i> (Cd)	Martoja et al. Clubb et al. Bouquegneau et al. Maroni et Watson Yamamura et al.	1983 1975 1985 1984 1983



tion à 3 000xg pendant 20 mn et extraite par 200 ml d'H₂O durant 10 mn. Une deuxième centrifugation est réalisée à 20 000xg pendant 2 h. En principe le dernier surnageant contient les métallothionéines. Noël-Lambot (1980) a utilisé une technique dérivée de cette dernière ; elle consiste en une précipitation par 45 et 80 % d'acétone.

Après cette extraction tissulaire, la fraction soluble est chromatographiée par gel filtration qui est généralement du Séphadex G 75 (Pharmacia) ou de l'ACA 54 (I.B.F. Pharmindustrie). Le premier gel a été utilisé par Siewicki et al. (1983), Cherian et al. (1979) et Bouquegneau et al. (1975). Le deuxième gel a été utilisé par Noël-Lambot (1980), Martoja et al. (1982).

Cette chromatographie de gel filtration est suivie d'une séparation sur une résine échangeuse d'ions qui est représentée généralement par de la DEAE cellulose. Cette deuxième technique permet la séparation des substances de poids moléculaires voisins selon leur charge électrique (Suzuki et Yamamura, 1979 ; Ley et al., 1983).

En général, les différentes étapes de purification citées ci-dessus sont suffisantes pour donner un produit bien propre et bien isolé. Si une première élution par un gradient linéaire de NaCl ne donne pas de produit pur, on refait une deuxième élution par un gradient plus lent (Martoja et al., 1983).

IV.2.1.1.2. Caractérisation des métallothionéines

IV.2.1.1.2.1. Poids moléculaire

Quel que soit l'espèce ou l'organe à partir duquel la métallothionéine est extraite, les déterminations du poids moléculaire faites par chromatographie sur colonne calibrée conduisent à des résultats assez homogènes. Ces poids moléculaires varient entre 9 000 et 12 000 D (Pulido et al., 1966b ; Olafson et Thompson, 1974 ; Nordberg et al., 1975 ; Bremner et Davies, 1975 ; Richards et Cousins, 1977). Mais d'autres auteurs qui ont réalisé des chromatographies avec des métallothionéines dénaturées ont trouvé un poids moléculaire proche de 6 000 D (Kägi et al., 1974 ; Bühler et Kägi, 1974). Généralement le calcul du poids moléculaire à partir de la composition en acides aminés donne une valeur comprise entre 6 000 et 7 000 D (Nordberg et

al., 1972 ; Richards et al., 1977 ; Kojima et al., 1976 ; Kojima et Kägi, 1978). Néanmoins, d'autres auteurs obtiennent par cette même technique une valeur d'environ 10 000D(Suda et al. ; Winge et al., 1975a).

IV.2.1.1.2.2. Spectre d'absorption en ultraviolet

La métallothionéine présente un spectre d'absorption en ultraviolet très particulier qui lui est donné par sa composition en acides aminés. L'absence des acides aminés aromatiques entraîne une non absorbance à 280 nm et par contre la liaison cadmium-soufre (due à la présence de cystéine) provoque l'apparition d'un pic à 250 nm (Kägi et Vallée, 1961 ; Nordberg et al., 1974).

IV.2.1.1.2.3. Résistance à la chaleur Cherian et al. (1978) ont

montré que la métallothionéine reste stable à une température de 80°C pendant 10 minutes. Certains auteurs, comme Olafson et al. (1979), se sont basés sur cette propriété pour faire un premier fractionnement à partir d'un homogénat de tissus.

IV.2.1.1.2.4 Composition en acides aminés

L'analyse des acides aminés représente l'étape la plus importante dans la caractérisation d'une métallothionéine. La composition en acides aminés d'une métallothionéine montre une forte teneur en cystéine (de l'ordre de 30 %), une quasi absence d'acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine, tryptophane) ainsi que l'histidine et l'arginine et elle montre également une quantité considérable de lysine, sérine, glycine et alanine. La structure primaire de la métallothionéine a été déterminée respectivement pour le foie et le rein de cheval, pour le foie humain, pour le Neurospora crassa et pour Scylla senata par Kojima et al. (1976), Kissling et al. (1977), Lerch (1980) et Lerch et Ammer (1982). Ces structures sont fortement semblables et la caractéristique principale en est la distribution des 20 résidus cystéiques le long de la chaîne. Ceux-ci sont principalement associés selon la séquence Cys-X-Cys. une deuxième caractéristique de la séquence est l'étroite association de la cystéine avec la sérine et la lysine et, à quelques exceptions près, la position de

ces trois acides aminés est constante d'une métallothionéine à l'autre (in Noël-Lambot, 1980).

IV.2.1.1.2.5 Polymorphisme

Les métallothionéines isolées à partir d'un même organe peuvent exister sous différentes formes extrêmement semblables du point de vue poids moléculaires. Ces différentes formes ont été détectées par des techniques de séparation basées sur la charge électrique des molécules (Pulido et al., 1966b ; Suzuki et al., 1983 ; Nordberg et al., 1972 ; Nordberg, 1978 ; Noël-Lambot, 1980 ; Bremner et Young, 1976 a, b). Ces composés diffèrent très peu par la composition surtout au niveau de la nature des métaux qui y sont fixés (Pulido et al., 1966b ; Nordberg et al., 1976). Kojima et Kägi (1978) ont pu démontrer qu'il s'agissait d'isoprotéines, c'est-à-dire des protéines différant quelque peu par la structure primaire.

IV.2.1.1.2.6. Induction de la synthèse des métallothionéines

L'augmentation de la teneur des métallothionéines en réponse à une intoxication par des métaux constitue un stade ultime dans la caractérisation de ces protéines. Le cadmium est le métal lourd qui possède l'action la plus puissante sur l'induction de la synthèse de ces protéines; il est suivi par le mercure inorganique, le zinc et le cuivre (Webb, 1972 ; Chen et al., 1975 ; Bremner et Young, 1976b). Par contre, de nombreux autres métaux n'ont pas montré cet effet d'induction des métallothionéines : le chrome et le nickel (Piotrowski et Szymanska, 1976), le vanadium, le manganèse (Mogilnicka et al, 1975), cité par Piotrowski et Szymanska, 1976). Chez les Mammifères, des auteurs ont montré que dans le foie il y a un délai de 2 à 5 heures entre l'injection de métal et l'apparition de la protéine et que la synthèse est maximale une dizaine d'heures après l'administration (Chen et al., 1975 ; Shaikh et Smith, 1977).

Le temps d'apparition est beaucoup plus court dans le rein, il est de l'ordre de 30 minutes et le maximum se situe entre 3 et 5 heures (Probst et al., 1977a ; Shaikh et Smith, 1977).

IV.2.1.1.2.7. Rôle des métallothionéines

Leur apparition après une intoxication de l'organisme par le cadmium ou le mercure a entraîné plusieurs auteurs à penser que ces protéines jouent un rôle dans la défense de l'animal. Leur rôle protecteur vis-à-vis de ces produits toxiques se traduit par une fixation de ces métaux en les rendant biologiquement inertes et inoffensifs et en constituant ainsi un mécanisme de détoxification (Piscator, 1964 ; Nordberg, 1971 ; Nordberg et al., 1971). Les métallothionéines constitueraient, en dehors de toute intoxication, un réservoir de métaux essentiels comme le zinc et le cuivre qu'elles peuvent fournir au moment de la synthèse des enzymes métalliques (Richards et al., 1976 ; O'Brady et al., 1979) et assurer ainsi l'homéostasie de la teneur en métaux des cellules. Il a été démontré qu'une première contamination, en provoquant l'apparition de métallothionéines dans les tissus, facilite la fixation sur ces protéines des métaux administrés par la suite (Nordberg, 1971 ; Yau et Menear, 1977 ; Probst et al., 1977b). Ce prétraitement par une administration de faibles doses de cadmium provoque une réduction de toxicité de ce métal s'il est administré en grandes quantités (Yoshikawa, 1970, 1973 ; Bouquegenau et al., 1975).

Ce mécanisme développé chez les animaux exposés à des intoxications leur permet une meilleure résistance et par conséquent une certaine adaptation au milieu. L'existence des métallothionéines permet donc de concevoir que des quantités importantes de cadmium puissent ainsi être progressivement accumulées sans dommage pour l'organisme. Tanaka et Sueda (1973), Valberg et al. (1977) ont suggéré que les métallothionéines pourraient agir, au niveau de la muqueuse intestinale, comme une barrière à l'absorption du cadmium.

IV.2.1.1.2.8. Critères de détermination des métallothionéines

Ces critères ont été résumés par Vallée (1979) :

- Contenu en métal très élevé (cadmium, zinc, cuivre)
- Teneur en cystéine : 30 % de la composition totale en acides aminés.

- La quantité d'ions métalliques liés aux groupements S-H est de 1/3.
- Généralement, il existe 7 atomes grammes de Me^{2+} pour 20 à 21 groupements S-H des métallothionéines.
- Les acides aminés aromatiques, l'histidine et les ponts disulfures sont normalement absents. La protéine de Mammifères contient une seule méthionine.
- La métallothionéine ne présente pas d'absorption à 280 nm.
- La cadmium-thionéine absorbe à 250 nm.
- Le poids moléculaire de ces protéines est situé entre 6000-7000D.
- La chromatographie d'exclusion sur gel et le volume d'élution correspondant à un poids moléculaire de celui de métallothionéines sont insuffisants pour identifier cette protéine. D'autres caractéristiques sont nécessaires, l'absorption en ultraviolet et surtout la composition en acides aminés.

IV.2.2. Autres protéines fixant le cadmium (non métallothionéines)

Récemment, il a été montré qu'en plus des métallothionéines qui ont été décrites chez un certain nombre de vertébrés et d'invertébrés, d'autres protéines ne possédant pas les mêmes caractéristiques que les métallothionéines ont néanmoins la capacité de fixer le cadmium. Cette catégorie de protéines diffère des métallothionéines surtout par sa composition en acides aminés, son spectre d'absorption en ultraviolet et quelquefois par le poids moléculaire. Ces métalloprotéines ont été trouvées et décrites chez quelques espèces d'Invertébrés : chez Locusta migratoria (Martoja et al., 1983), chez Crassostrea virginica (Riddigton et Fowler, 1979), chez Pecten maximus (Stone et al., 1986) ; Eudystylia vancouveri (Young et Roesijadi, 1983). Ces quelques exemples sont réunis dans le tableau 1.

BUT DU TRAVAIL

Des travaux antérieurs ont montré qu'à 13°C Nereis diversicolor, espèce euryhaline bien adaptée à une vie dans la vase des estuaires, résiste bien à une intoxication provoquée par 22 ppm de cadmium ajoutée expérimentalement à l'eau d'élevage.

Parmi les mécanismes de défense possibles, plusieurs ont été envisagés : faible absorption, piégeage par les sphérocristaux, complexation avec une protéine (Dennaï, 1984 ; Nejmeddine, 1985 ; Dennaï et al., 1986).

Il nous a paru intéressant de poursuivre ces travaux en étudiant la toxicité du métal et sa bioaccumulation non seulement en fonction de la concentration utilisée et de la durée de l'intoxication mais encore de la température.

En ce qui concerne les moyens de détoxification, notre effort a essentiellement porté sur l'identification, la caractérisation et la localisation par voie immunologique de la métalloprotéine détectée précédemment (Nejmeddine, 1985 ; Dennaï et al., 1986) et dont le poids moléculaire apparent, calculé sur la base de l'analyse des acides aminés, est de 10 kD.

Chapitre I

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

A - MATERIEL BIOLOGIQUE

Les Nereis diversicolor O.F. Müller ont été récoltées à Petit-Fort-Philippe (Nord) et à Luc-sur-Mer (Normandie). Après la récolte, les animaux ont été gardés à 4°C dans de l'eau de mer renouvelée tous les 2 jours. Le sexe et l'âge des vers ont été déterminés par examen des produits génitaux au microscope photonique après prélèvement dans le liquide coelomique.

B - METHODES

I - Mode d'intoxication

Les animaux ont été regroupés par 5 dans des pots contenant 200 ml d'eau de mer à laquelle nous avons ajouté du nitrate de cadmium ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$), sel facilement soluble dans l'eau. Cette eau a été renouvelée toutes les 24 heures afin de lui assurer une teneur en polluant assez constante. Un morceau de papier filtre de superficie connue (6x5 cm) était ajouté dans le milieu d'élevage pour éviter que les animaux s'enroulent et se segmentent. Ce papier n'a pas été changé pendant la période d'intoxication pour restreindre au maximum l'adsorption non spécifique.

Une seule dose (22 ppm) a été utilisée pour pratiquer des intoxications chroniques. Pour l'étude du pourcentage de mortalité nous avons testé des doses déterminées antérieurement comme létales (44 ppm, 55 ppm) (Dennai et al., 1986).

II - Techniques

1 - Techniques cytologiques conventionnelles

1.1. Microscopie photonique

Des métamères et des prostomiums ont été fixés dans du Bouin Hollande dépourvu d'acide acétique, lavés, déshydratés par l'alcool, inclus dans la cytoparaffine (point de fusion 56°C-58°C) et coupés à 7 µm à l'aide d'un microtome. Les coupes ont été colorées selon la méthode de Clark (1955).

1.2. Microscopie électronique

Des fragments de métamères, d'intestin moyen (prélevés vers le 30ème métamère) et des prostomiums ont été fixés dans un mélange de glutaraldéhyde à 6 % dans un tampon phosphate de sodium (0,4 M, pH 7,2) additionné de 2,5 % de chlorure de sodium. Ils ont ensuite été lavés pendant 12 heures dans un mélange de tampon phosphate 0,4 M (1 volume) et de sucrose (0,33 M) (3 volumes), postfixés pendant une heure à température ambiante dans un mélange de tétroxyde d'osmium à 2 % dans un tampon 0,4 M (pH 7,2) additionné de 2,5 % de chlorure de sodium puis déshydratés par l'acétone. Après inclusion dans l'araldite, les coupes ont été effectuées aux ultramicrotomes Porter-Blum MT I et LKB (UM III) et contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb (Reynolds, 1963). Les observations ont été réalisées au microscope électronique Jeol 120 CX.

2 - Techniques biochimiques

Les principales étapes sont résumées dans les tableaux 2 et 3.

2.1. Dosage des métaux (zinc, cuivre, cadmium)

Les différents dosages ont été réalisés dans le laboratoire de chimie marine dirigé par le Professeur Wartel. Pour le dosage des 3 métaux, nous avons procédé à une minéralisation à 110°C de l'homogénat d'animaux entiers pendant 12 heures, suivie d'une attaque à l'eau régale qui est un mélange d'acide chlorhydrique (12 N) et d'acide nitrique (14 N) (2 ml du mélange/gramme de poids frais). Cette attaque a été réalisée dans un bain-marie à 60°C pendant 24 heures. Les échantillons ont ensuite été dilués d'un facteur 100 par de l'eau distillée et filtrés sur du papier Whatman 2 V. Les culots et les fractions aliquotes des surnageants obtenus après centrifugation des homogénats tissulaires ont été traités de la même façon. Dans le cas des fractions d'éluion obtenues par chromatographie sur colonne, les métaux ont été directement dosés à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption atomique (SAAF) (Perkin-Elmer, 2380) équipé d'un brûleur air-acétylène.

Tableau 2 - Techniques préparatives.

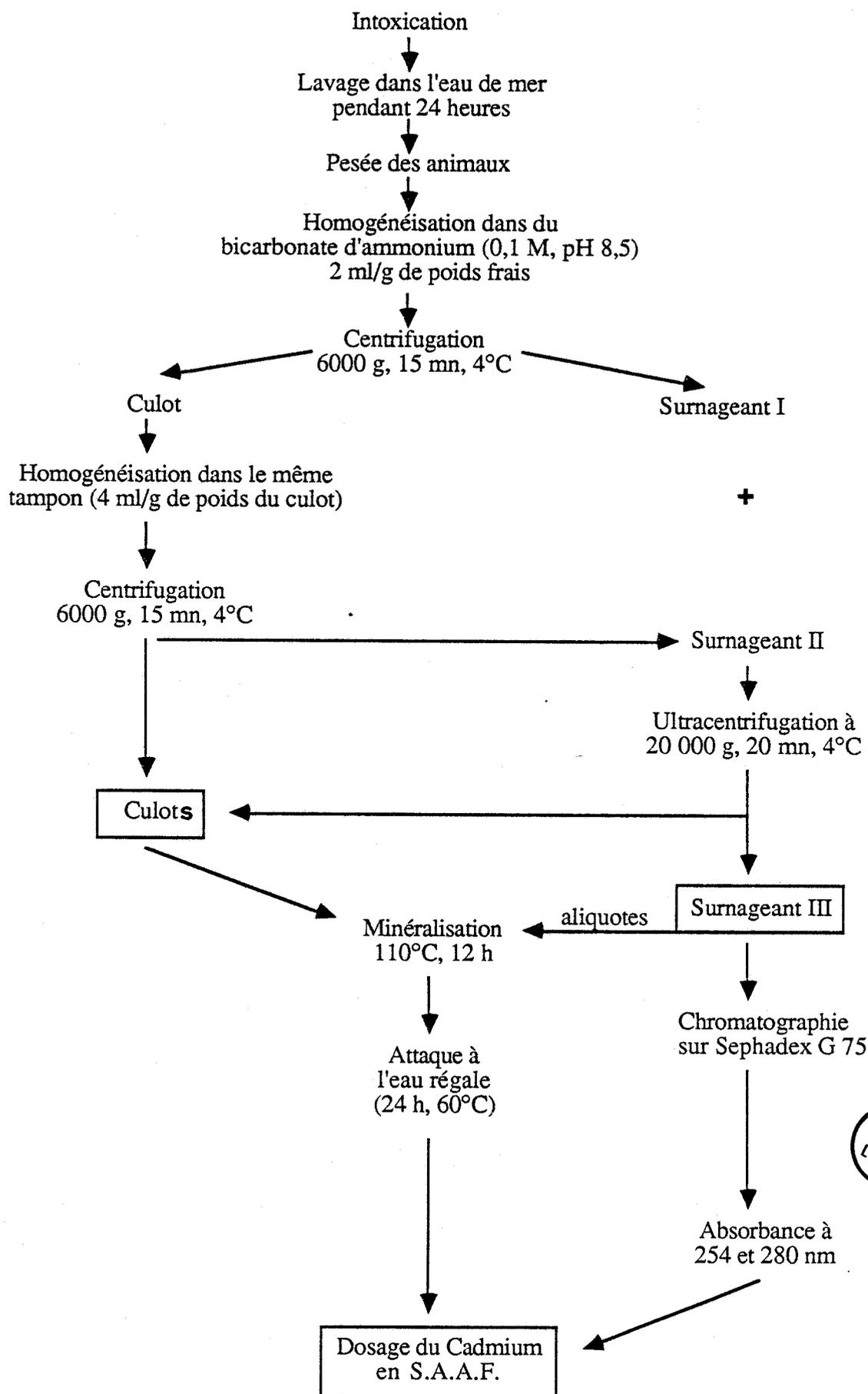
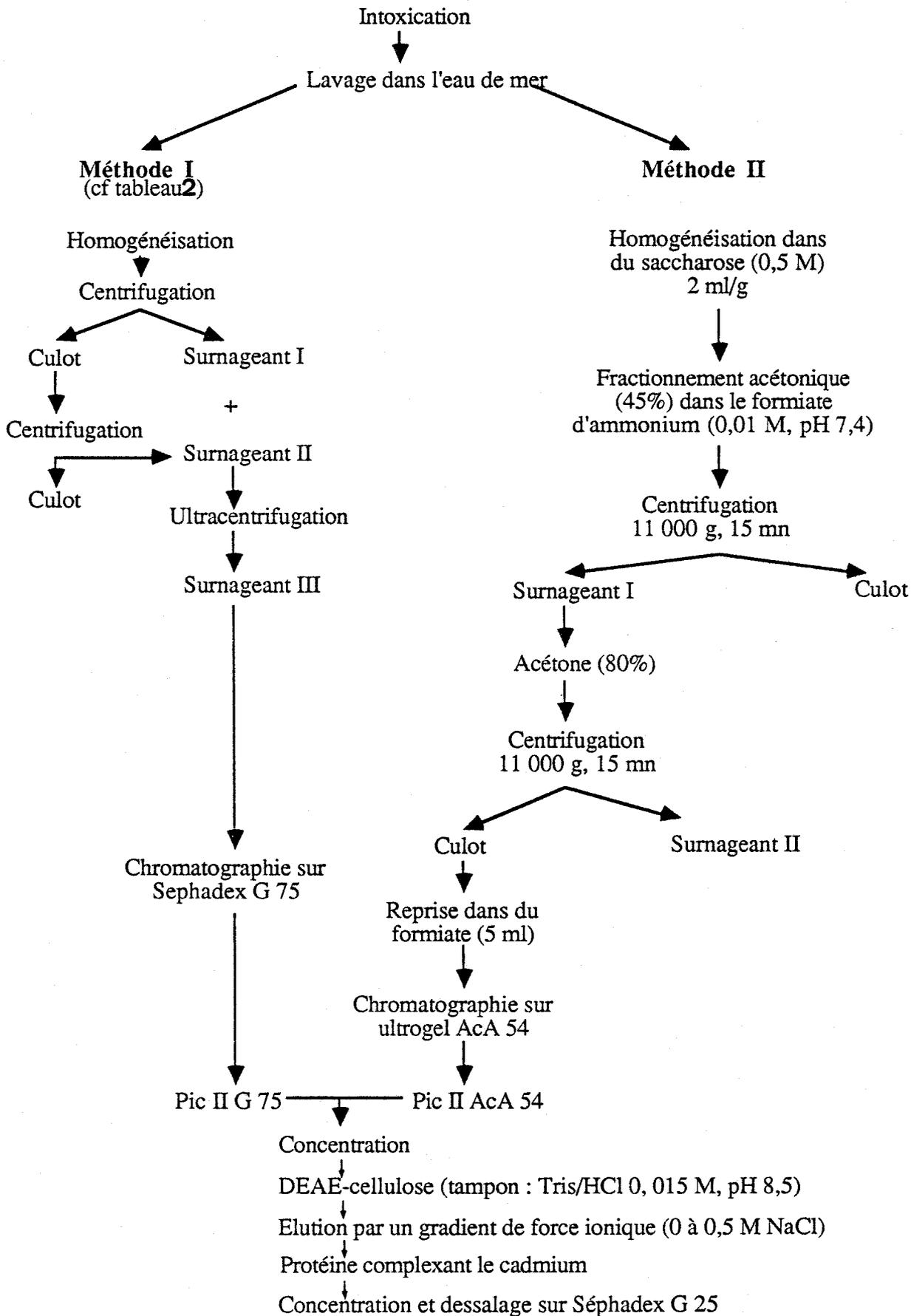


Tableau 3 - Principales phases de purification de la protéine complexant le Cadmium (MP II)



Des solutions témoins composées du mélange d'acide chlorhydrique et d'acide nitrique (voir ci-dessus) ont été traitées de la même manière que les autres échantillons afin de contrôler toute contamination pouvant éventuellement provenir de ce mélange d'acides.

L'appareil affiche les concentrations métalliques directement en ppm. Trois mesures ont été effectuées après aspiration de l'échantillon durant 4 secondes, la mesure obtenue est donc la moyenne précisée par l'écart-type. Les résultats obtenus sont exprimés en $\mu\text{g/g}$ de poids frais du tissu, pour le dosage des métaux dans les animaux entiers et dans la fraction insoluble et en $\mu\text{g}/\text{fraction}$ pour les fractions chromatographiées.

2.2. Techniques préparatives

2.2.1. Extraction tissulaire et chromatographie

a. Extraction tissulaire

Les animaux intoxiqués ou témoins ont été lavés pendant 24 heures pour éliminer toute contamination des échantillons par du cadmium absorbé non spécifiquement. Ils ont ensuite été pesés et homogénéisés dans 2 volumes de tampon (bicarbonate d'ammonium 0,1 M, pH 8,5) à l'aide d'un homogénéiseur POLYTRON. Cet homogénat a été centrifugé à 6 000xg pendant 15 minutes à 4°C. Le culot obtenu à l'issue de cette première centrifugation a été réhomogénéisé et centrifugé de nouveau à 6 000xg pendant 15 minutes à 4°C. Les 2 surnageants obtenus ont été regroupés et centrifugés à 20 000xg pendant 20 minutes à 4°C dans une ultracentrifugeuse BECKMAN L 5-65. Le surnageant final a été chromatographié immédiatement ou gardé à -20°C. Dans quelques cas, une étape de fractionnement a été introduite entre l'extraction et la chromatographie pour éliminer la majeure partie des protéines de haut poids moléculaire car notre but initial était de purifier d'éventuelles métallothionéines (poids moléculaire voisin de 10 kD). Ce fractionnement consiste en une addition au surnageant d'acétone préalablement refroidi à -20°C, jusqu'à une concentration de 45 %. Après élimination du précipité par centrifugation, un nouveau précipité a été formé lors de l'adjonction de l'acétone à 80 %. Ce second précipité a été récupéré et redissous dans un minimum de bicarbonate d'ammonium 0,05 M. Toutes ces opérations ont été effectuées à 4°C. Il s'agit d'une méthode utilisée par Noël-Lambot (1980) selon une technique dérivée de celle de Bühler et al. (1974).

b. Chromatographie

- Gel filtration

La filtration sur tamis moléculaire permet de séparer les constituants d'un mélange selon leur poids moléculaire. Suzuki (1983) a bien défini les conditions expérimentales pour séparer des protéines métalliques : la colonne utilisée ne doit pas adsorber les métaux ; les tampons ne doivent pas comporter de ligands pour les différents métaux étudiés ; leur pH doit être neutre ou légèrement basique pour éviter la dissociation des métaux et leur contenu en sels doit être réduit pour ne pas obturer la tête du brûleur lors du dosage des métaux. Nous avons utilisé 2 sortes de gels, le Sephadex G 75 et l'ultrogel ACA 34 qui ont respectivement un pouvoir de séparation des protéines ayant un poids moléculaire compris entre 70 - 3 kD et 350 - 20 kD. Selon la résolution souhaitée et le volume de l'échantillon, nous avons choisi une colonne de 100 cm de longueur et de 2,1 cm de diamètre pour le Sephadex G 75 et une autre de 120 cm de longueur et de 1,2 cm de diamètre pour l'Ultrogel. Avant leur utilisation elles ont été rincées avec de l'acide chlorhydrique 1 N. Les gels, gonflés dans de l'eau bidistillée et dégazés ont été déposés dans les colonnes par sédimentation et stabilisés par 3 volumes de tampon formiate d'ammonium (0,01 M ; pH 7,4) dans le cas du Sephadex G 75 et du Tris/HCl 15 mM pH 8,5 dans le cas de l'Ultrogel. Les débits ont été réglés différemment, selon le type de gel utilisé, par une pompe péristaltique (LKB) (12 ml/h pour le Sephadex G 75 et 4 ml/h pour l'Ultrogel).

Les fractions de 4 ml ont été recueillies par un collecteur qui est relié à 2 cellules qui enregistrent la densité optique à 250 et à 280 nm de façon continue au cours de la séparation. Ces mêmes fractions ont été soumises à l'analyse du cadmium ainsi que parfois du zinc et du cuivre selon la technique décrite précédemment.

- Echange d'ions

Le matériel protéique composant les fractions chromatographiées sur gel-filtration Sephadex G 75 et enrichies de cadmium a été concentré soit :

- sur membrane de type Amicon UM 2 (Frankenne et al., 1980) ; cette membrane laisse passer, sous pression d'azote, toute substance ayant un poids moléculaire inférieur à 2 kD,
- sur un appareil microprodicon,

- par lyophilisation (technique la plus souvent utilisée).

Ce matériel protéique concentré a ensuite été soumis à une dialyse sur le tampon Tris/HCl 15 mM, pH 8,5 puis à une chromatographie d'échange d'ions. La résine utilisée (DEAE-Cellulose Whatman DE 52) a d'abord été mise sous forme ionique convenable par plusieurs rinçages avec du tampon (Tris/HCl 15 mM, pH 8,5) enrichi de NaCl à 20 %. Elle a ensuite été équilibrée dans le même tampon par rinçage sur une colonne (1,5 x 40 cm) jusqu'à l'obtention d'un équilibre de pH et d'osmolarité entre l'éluant et l'éluat. L'échantillon a alors été introduit dans la colonne de DEAE-cellulose et élué dans un premier temps (avec un débit de 10 ml/h) par 2 volumes de tampon (Tris/HCl 15 mM, pH 8,5) puis dans un deuxième temps par un gradient 0-0,5 M NaCl réalisé à l'aide d'un formeur de gradient dont le premier compartiment contient 100 ml de tampon et le deuxième 100 ml de la même solution ajustée en NaCl 0,5 M. Des fractions de 2 ml ont été collectées et soumises à des mesures d'absorbance à 215 nm et à 250 nm puis à un dosage de cadmium par SAAF.

- Dessalage des échantillons

Les fractions correspondant au pic majeur obtenu après la chromatographie d'échange d'ions ont été regroupées et concentrées sur un appareil microprodicon. Le produit concentré a été dessalé par 2 techniques :

- par une filtration sur une colonne (1,1 x 100 cm) remplie par un gel de Sephadex G 25 équilibré dans du tampon Tris/HCl 15 mM, pH 8,5. Les fractions obtenues ont été analysées au spectrophotomètre pour mesurer la densité optique à 215 nm afin de récupérer les produits.

- par dialyse sur de l'eau bidistillée à 4°C pendant 36 heures en changeant l'eau toutes les 12 heures.

Après dessalage le produit obtenu a été lyophilisé et gardé à 4°C. Il a ensuite été soumis à des techniques analytiques pour identification et caractérisation.

2.3. Techniques analytiques

2.3.1. Détermination du poids moléculaire

La métalloprotéine isolée à l'issue d'une chromatographie échangeuse d'ions a été analysée, après son dessalage et sa concentration, en FPLC sur une colonne (30 x 1 cm)

de gel filtration Superose 12 (Pharmacia) équilibrée et stabilisée dans du tampon Tris/HCl 20 mM pH 7,4. L'élution a été effectuée par le même tampon avec un débit de 0,3 ml/mn. Avant son utilisation, la colonne a été calibrée à l'aide des substances standards de poids moléculaires connus ; sérum albumine, 76 kD ; ovalbumine, 43 kD ; β -lactoglobuline, 36,8 kD et Cytochrome C, 12,4 kD.

2.3.2. Analyse en HPLC (chromatographie de perméation)

200 μ l de l'échantillon ont été injectés dans une colonne I 250 (30 x 0,78 cm) (Waters). La séparation est basée sur la différence de poids moléculaires. La colonne permet une séparation de substances ayant un poids moléculaire compris entre 10 et 500 kD. Le débit utilisé a été de 1 ml/mn.

2.3.3. Analyse électrophorétique

a. Electrophorèse en milieu dénaturant (SDS)

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS est effectuée selon la méthode de Laemmli (1970). Des gels de 0,75 mm d'épaisseur sont utilisés. Le gel de séparation est constitué par un gradient d'acrylamide 5-25 %. Avant le dépôt, les protéines sont traitées 3 minutes au bain-marie bouillant dans le tampon d'échantillon Tris/HCl 62,5 mM, pH 6,8, SDS 2 %, saccharose 10 %, β -mercaptoéthanol 5 %. Un mélange de protéines témoins de poids moléculaire 94 kD (phosphorylase B) ; 67 kD (albumine) ; 43 kD (ovalbumine) ; 30 kD (anhydrase carbonique) ; 20 kD (trypsine inhibiteur) et 14,4 kD (α -lactalbumine) est analysé conjointement aux échantillons.

Après 16 à 20 heures de migration (4-5 mA), le gel est coloré pendant deux heures sous agitation par le bleu de Coomassie à 0,1 % dans le mélange isopropanol 25 %-acide acétique 10 %-eau 65 %. Il est décoloré par l'acide acétique 10 %.

b. Electrofocalisation

L'électrofocalisation est réalisée dans un gel d'acrylamide à 5 % contenant 3 % d'ampholines (pH 3,5-9,5 ; Ultro PAG, LKB). Après 90 minutes de migration (450 V-16 mA), le gel est coloré par le bleu de Coomassie G 250 à 0,15 % dans une

solution de méthanol à 40 % puis décoloré dans du méthanol à 10 % contenant de l'acétate d'éthyle 5 % (Trah et Schleger, 1982).

Un mélange de protéines témoins de point isoélectrique 9,45 (ribonucléase), 8,3 (myoglobine de baleine), 7,3 (myoglobine de cheval), 5,9 (conalbumine) et 4,4 (ferritine) est analysé conjointement aux échantillons.

c. Transfert électrophorétique sur la nitrocellulose

Après l'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS, le gel à répliquer est équilibré pendant 30 mn dans le tampon de transfert, constitué par une solution de Tris 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 10 % à pH 8,3.

Le transfert des protéines sur une feuille de nitrocellulose (porosité 0,45 μ m) est ensuite opéré à 50 mA pendant 4 à 5 heures. Les protéines transférées sont alors détectées par coloration dans le noir Amidon (0,1 % en méthanol 45 % - acide acétique 10 %).

2.3.4. Absorption dans l'ultraviolet

L'absorbance des fractions chromatographiées a été mesurée à 3 longueurs d'onde (215 nm, 254 nm et 280 nm) à l'aide d'une cellule spectrophotométrique (ISCO) ou au moyen d'un spectrophotomètre (BECKMAN). Un spectre d'absorption a également été réalisé pour le produit isolé, dissous dans du bicarbonate d'ammonium 0,05 M pH 8,5.

2.3.5. Analyse des acides aminés

La métalloprotéine purifiée à l'issue de la chromatographie d'échange d'ions, dessalée par dialyse suivie d'une gel filtration sur Séphadex G 25 a été lyophilisée et soumise à une étude de la composition en acides aminés. Pour cela, l'échantillon a été hydrolysé par l'acide chlorhydrique 6 N (1 ml/mg de protéine) à 110°C en tube scellé sous vide. L'hydrolyse est réalisée sur une durée de 24 et 72 heures. L'hydrolysat, redissous dans un tampon de citrate de sodium 0,2 M pH 2,2 est placé dans un analyseur automatique BECKMAN de type 119 CL. Pour la détermination de la cystéine (dosée en tant qu'acide cystéique), l'échantillon a été oxydé par l'acide performique selon la technique de Hirs (1956).

2.3.6. Etude de la composition en oses de la métalloprotéine MP II

Après dialyse dans de l'eau pure et filtration sur Sephadex G 25 pour éliminer tous les sels et d'éventuels contaminants de sucres, le produit isolé a été soumis à une chromatographie en phase gazeuse pour déterminer sa composition molaire en oses.

Nous avons utilisé la technique de Clamp et al. (1967) modifiée par Fournet et Leroy (non publié). 1,03 milligrammes de MP II purifiée et 1 microgramme de mésoinositol (témoin interne) ont été lyophilisés dans un tube sovirel. Les produits ont été méthanolysés 24 heures à 80°C par 500 microlitres de méthanol chlorhydrique 0,5 N. Le tube a été ensuite refroidi, neutralisé par du carbonate d'argent (pH 7,0) et N réacétylé par 20 microlitres d'anhydride acétique 10 heures à l'abri de la lumière. Le tube a été ensuite centrifugé et le surnageant a été délipidé par deux extractions à l'heptane (2 x 250 microlitres). Le méthanol a été ensuite séché sous azote et le résidu sec a été repris par 50 microlitres de pyridine et 50 microlitres de BSTFA (Bisilyl-TriFluoro-Acetamido). 0,1 microlitre a alors été injecté dans une colonne capillaire de silicone OV 01 (0,3 mm x 25 m), la température du détecteur et de l'injecteur étant de 220°C et le gradient de température allant de 120 à 240°C (2°C/mn). Le gaz vecteur étant l'ammoniac à 0,05 Bar. Pour affiner et déterminer de façon définitive la composition en sucres de la MP II, nous avons soumis les mêmes échantillons ayant servi à la chromatographie en phase gazeuse à une spectrométrie de masse associée à une chromatographie en phase gazeuse (Riber Mag 1010, Reuil-Malmaison, France) avec une ionisation chimique en utilisant l'ammoniac comme gaz vecteur.

3 - Méthodes immunologiques

3.1. Obtention des anticorps

3.1.1. Anticorps polyclonaux

- Sérum de lapin anti MP II

L'anticorps polyclonal anti MP II a été obtenu par la méthode de Vaitukaitis et al. (1971). Nous avons

injecté environ 1,5 mg de MP II purifiée à un jeune lapin. Deux rappels d'immunisation, décalés de 10 jours, ont été pratiqués 15 jours après la lère injection. Après 6 semaines, des prélèvements de sang ont été effectués régulièrement et la présence d'anticorps a été testée par la méthode d'immunodiffusion d'Ouchterlony (1949).

- Sérum de souris anti-coelomocytes

100 μ l de suspension contenant 1.10^6 à 1.10^8 cellules (coelomocytes) ont été ajoutés à 100 μ l d'adjuvant de Freund pour pratiquer 1 injection sous-cutanée et 2 autres intrapéritonéales à 3 souris avec un intervalle de 2 semaines entre chaque injection. 15 jours après la troisième injection, un peu de sang a été prélevé au niveau du sinus rétroorbital à l'aide d'une pipette Pasteur effilée, stérile. Les sérums récupérés après centrifugation ont été dilués au 1/100 et 1/1000 dans le tampon phosphate salé et testés selon la technique ELISA (voir plus loin) sur les antigènes totaux (coelomocytes). La réaction obtenue, fortement positive pour les 3 souris, permet d'affirmer qu'elles ont été immunisées d'une manière importante.

Dans le cadre de notre travail, nous avons vérifié, par la technique de l'immunodétection après électrophorèse et transfert sur de la nitrocellulose, si le sérum obtenu à partir de ces 3 souris contenait des anticorps dirigés contre la MP II purifiée.

Après obtention d'une réaction positive, nous avons abordé la production d'un anticorps monoclonal. Dans ce but, une quatrième injection d'une dose de 10 μ g de MP II a été effectuée par voie intraveineuse (dans une veine latérale de la queue), deux mois après la troisième injection. Cette opération constitue le "boostage", pratiqué 2 jours avant la fusion.

3.1.2. Anticorps monoclonaux

Cette étude a été réalisée en collaboration avec E. Porchet-Henneré. Après l'immunisation des trois souris et le test du sérum par immunoblot sur l'antigène MP II, nous avons retenu la souris la mieux immunisée contre cette métalloprotéine pour réaliser l'étape suivante de la fabrication des anticorps monoclonaux. - La fusion : la rate de la souris immunisée a été prélevée et écrasée sur un tamis avec le piston d'une grosse seringue. Les cellules spléniques sont fusionnées avec les cellules myélomateuses

SP₂O selon la méthode de Kohler et Milstein (1975). Les cellules en milieu Dulbecco sont réparties dans des plaques à 96 puits contenant des cellules péritonéales de souris. La sélection des hybridomes est faite par addition de milieu HAT au cours des premiers jours de culture. Les surnageants de culture ont été testés sur la MP II par la technique ELISA. Les surnageants positifs ont été testés, sur l'homogénat total des animaux transféré après électrophorèse, sur une feuille de nitrocellulose. Ce test a été réalisé pour détecter la spécificité des anticorps produits.

3.2. Tests d'immunodétection

3.2.1. Test d'immunodiffusion

Ce test est réalisé selon la technique classique d'Ouchterlony (1949). Il consiste en un dépôt, dans des puits faits au niveau du gel d'agarose coulé sur une plaque de verre horizontale, de sérum de lapin entouré par d'autres dépôts d'antigènes à différents stades de purification. Les arcs formés lors des réactions Ag-Ac ont été révélés par coloration au bleu de Coomassie.

3.2.2. Immunodétection des protéines transférées sur nitrocellulose

Après le transfert électrophorétique des protéines, les feuilles de nitrocellulose ont été incubées pendant 1 heure dans une solution de Tween 20 à 0,05 % dans le tampon TBS (Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, 150 mM NaCl). A l'issue de ce traitement, les feuilles ont été mises en incubation pendant 2 heures dans le sérum dilué (1/250) puis lavées 4 fois par le tampon TBS-Tween, et incubées de nouveau pendant 1 heure dans une solution d'IgG-anti IgG de lapin ou IgG-anti IgG de souris, marquée à la peroxydase, à la dilution de 1/500. L'immunodétection a été réalisée dans un mélange de 50 ml de tampon TBS, 3 ml de 4-chloro-1-naphthol à 0,3 % dans le méthanol et 10 µl H₂O₂ pendant 10 mn.

3.2.3. Test ELISA

- Préparation des plaques de microtitration

Ce test a été réalisé sur plaque de polyvinyle à 96 puits recouverts par l'antigène. Une solution anti-

génique de MP II dans 10 ml a été préparée pour ce recouvrement. Dans chacun des puits ont été répartis 100 µl de cette solution (0,5 µg de MP II par puits). Après 3 heures de contact à t° ambiante, la solution antigénique contenant encore environ 60 % d'antigène a été récupérée. Les puits ont été saturés avec 200 µl de PBS contenant 2 % de SAB (Sérum Albumine Bovine) pendant 30 minutes puis lavés avec du PBS contenant 0,1 % de SAB, 0,05 % de Tween 20. La plaque a été séchée à l'abri de la poussière, enveloppée d'un parafilm et conservée à 4°C.

- Réalisation du test

100 µl de chacun des surnageants à tester ont été déposés dans les puits recouverts. Parallèlement, nous avons déposé des témoins positifs : 100 µl de sérum de souris immunisée (prélevé juste avant la fusion) dilué au 1/100, 1/1000, 1/10000 et des témoins négatifs : 100 µl de PBS et 100 µl de surnageant de culture SP₂O. Nous avons laissé incuber 2 heures à 37°C après avoir recouvert la plaque. Nous avons lavé ensuite au moins 3 fois par du PBS contenant 0,1 % de SAB et 0,05 % Tween 20 (200 µl) puis nous avons appliqué 100 µl de conjugué : sérum de mouton anti IgG de souris marqué à la peroxydase (Biosys) dilué dans le PBS au 1/10 000. Après 2 heures d'incubation à 37°C et des lavages soigneux avec 200 µl de PBS contenant 0,1 % de SAB et 0,05 % de Tween 20, nous avons procédé à la révélation de la réaction. Dans chacun des puits, nous avons réparti 100 µl de substrat (9 mg d'OPD ont été dissous dans 25 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 5,5 et additionnés de 16 µl d'H₂O₂ 30 vol) et avons laissé en contact 30 minutes à 37°C. La réaction a été arrêtée par addition de 100 µl d'HCl 1 N par puits. L'intensité de la coloration a été évaluée à l'oeil nu.

3.3. Immunoprécipitation

3.3.1. Préparation des échantillons

- à partir des coelomocytes :

Après avoir ponctionné le contenu coelomique (liquide coelomique, coelomocytes et ovocytes) de Néréis femelles, nous avons séparé les coelomocytes des ovocytes à l'aide du nylon de maille égale à 30 µm de diamètre qui laisse passer les coelomocytes et garde les ovocytes. Par une centrifugation à 3 000xg

pendant 5 minutes, nous avons ensuite récupéré le culot formé pratiquement que par des coelomocytes. Ces derniers ont été homogénéisés dans 1 ml du tampon Tris/HCl 50 ml, pH 7,4, NaCl 0,15 M, Triton X 100 0,5 %, PMSF 0,2 mM. L'homogénat a été centrifugé à 5 000 × g pendant 10 minutes pour éliminer toute la partie insoluble. Le surnageant a été soumis à la technique d'immunoprécipitation puis à une analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide-SDS.

- à partir des granulocytes :

En collaboration avec M. M'Berri, nous avons pu isoler une catégorie de coelomocytes, les granulocytes. L'isolement de cette catégorie cellulaire a été réalisé ainsi :

Après prélèvement de l'ensemble des cellules coelomiques et séparation des coelomocytes des ovocytes par filtration sur nylon de maille de 30 µm de diamètre, les coelomocytes ont été lavés dans du tampon phosphate pH 7,2, 50 mM, NaCl 0,5 M (PBS) et déposés sur du sérum foetal de veau à 40 % dans du PBS. Avec ce traitement, les éléocytes sédimentent au fond du tube et les granulocytes restent en suspension à la surface du sérum. Ces derniers ont été récupérés soigneusement et lavés 3 à 4 fois par du PBS afin d'éliminer toute contamination protéique due au sérum. Après isolement, ces granulocytes ont été traités de la même façon que précédemment pour réaliser les analyses électrophorétiques.

- à partir du liquide coelomique :

Nous avons pratiqué une injection de 55 ppm de cadmium dans la cavité coelomique d'une dizaine de Néréis. 1 à 2 h après, un prélèvement du liquide coelomique a été effectué soigneusement à partir de ces animaux traités. Ce liquide coelomique a été centrifugé à vitesse basse pour éliminer toutes les cellules coelomiques. Une fraction aliquote du surnageant a été analysée par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS. Le reste du surnageant a été soumis à une immunoprécipitation. L'immunoprécipité a été repris par du tampon d'échantillon de Laemmli pour l'analyser en électrophorèse également.

- à partir du produit de dégranulation des granulocytes:

Les granulocytes isolés par la technique décrite ci-dessus ont été incubés pendant 45 mn à t° ambiante dans un milieu contenant 18,33 g/l de NaCl, 0,35 g/l de KCl, 1,48

MgCl₂. 6 H₂O, 0,44g/l de NaHCO₃ (pH 7,4) ; à cette solution saline nous avons ajouté soit : 55 ppm de cadmium soit de l'ionophore-calcium qui sont 2 agents capables de provoquer la dégranulation de cette population cellulaire. Les produits du milieu de dégranulation récupérés par centrifugation ont été traités de la même manière que le liquide coelomique puis analysés en électrophorèse dans les mêmes conditions opératoires que précédemment.

3.3.2. Technique d'immunoprécipitation

100 µl de la fraction d'anticorps polyclonal ont été ajoutés à 5 mg du gel Protéine A-Sepharose 4 B préalablement gonflé. A ce mélange, nous avons ensuite ajouté 50 µl de l'échantillon. L'ensemble a été agité 4 heures à t° ambiante. A l'issue de l'incubation et d'une centrifugation à basse vitesse, le surnageant a été éliminé et le gel a été lavé 4 fois par 1 ml de la solution tampon Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 0,5 M, Triton X 100 0,5 % puis par 1 ml du tampon Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M. L'élution a été réalisée en ajoutant 50 µl du tampon d'échantillon de Laemmli et en portant l'ensemble à 100°C pendant 3 minutes.

Parallèlement à cette immunoprécipitation, nous avons pratiqué une concentration des différents échantillons à l'aide d'ATCA à 100 %. Les différents échantillons (immunoprécipités et produits concentrés par ATCA) ont été analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS.

3.4. Immunocytochimie

3.4.1. En microscopie photonique

Nous avons utilisé des réactions de type indirect (Coons, 1978) qui se déroulent en deux temps.

- Incubation dans du sérum spécifique

Après fixation dans du Bouin Hollande sublimé (10 % HgCl₂) et inclusion dans la paraffine, les coupes ont été, après déparaffinage, placées pendant 15 minutes dans du tampon Coons pH 7,2. L'incubation des coupes en présence du sérum spécifique anti MP II a été réalisée pendant 12 heures à t° ambiante en chambre humide afin d'éviter tout risque de dessèchement. L'immunsérum a été dilué au 1/200 et au 1/100 dans du tampon Coons pH 7,2

- Incubation dans du sérum marqué

Après incubation avec l'anticorps spécifique, les coupes ont été rincées dans 2 bains de tampon Coons puis incubées 45 minutes à t° ambiante et en chambre humide avec le sérum marqué à la peroxydase, dilué au 1/40 dans le même tampon.

Ce sérum marqué est constitué d'immunoglobulines de mouton anti-lapin entières ou d'immunoglobulines de mouton anti-lapin fraction Fab couplées à la peroxydase de rai-fort.

- Révélation

Après rincage dans du tampon de Coons puis dans l'eau distillée, l'activité peroxydasique est révélée par une réaction enzymatique colorée ; le chromogène utilisé étant le 4-chloro-1-naphthol et le substrat l'H₂O₂. Le précipité bleu-violet apparu étant soluble dans le toluène et le benzène, le montage se fait dans la glycérine diluée (glycérine 9 vol/tampon 1 vol). Les lames ainsi montées ont été examinées au microscope photonique.

3.4.2. Sur des frottis de cellules

Avant toute incubation les cellules ont été traitées comme suit : le liquide coelomique a été ponctionné et déposé, après avoir ajouté un volume équivalent d'eau de mer, sur des lames de verre propres. Elles ont été gardées horizontalement en chambre humide à 4°C pendant 60 minutes pour permettre aux cellules de bien adhérer sur les lames. Le surnageant a été ensuite absorbé à l'aide d'un papier filtre et les cellules ont été fixées dans du paraformaldéhyde 3 %, glutaraldéhyde 0,1 % dans du PBS pendant 10 minutes. Nous avons augmenté la perméabilité des cellules par du PBS contenant 0,1 % de triton X 100 puis nous les avons incubées pendant 12 heures dans du surnageant de culture. Une deuxième incubation a été réalisée avec du sérum anti-souris marqué à la peroxydase. Tous les lavages ont été effectués dans du PBS contenant 0,1 % de sérum albumine bovine, 0,1 % de Tween 20. Finalement la révélation des réactions immunologiques (Ag-AC) a été réalisée à l'aide du 4-chloro-1-naphthol (4mg de chloronaphthol dans 10 ml du tampon Tris avec 0,01 % H₂O₂).

La même technique a été utilisée pour du liquide coelomique total et non fixé. Il a été ponctionné à partir d'animaux ayant reçu une injection de billes de latex dans leur cavité coelomique.

3.4.3. En microscopie électronique

Les réactions immunocytochimiques utilisées sont de type indirect et se déroulent en 3 temps. Elles ont été réalisées selon la méthode de Sternberger (1970) qui consiste en un marquage par le complexe peroxydase anti-péroxydase (PAP) ou celle décrite par Beauvillain et al. (1984) à l'or colloïdal.

- Incubation avec sérum non spécifique

Les coupes ultrafines ont été déposées sur des grilles en nickel recouvertes par une membrane de parlodion (0,8 % dans l'acétate d'isoamyle). Ces grilles ont été placées dans de l'eau oxygénée à 10 % pendant 8 mn afin de démasquer tous les sites antigéniques. Après le lavage dans de l'eau distillée puis dans le tampon de Coons, les coupes ont été incubées 5 à 10 mn avec du sérum non spécifique de chèvre dilué au 1/100 dans le Coons afin de bloquer tous les sites antigéniques non spécifiques.

- Incubation avec sérum spécifique

Après l'incubation dans le sérum non spécifique, les coupes ont été incubées dans le sérum spécifique dilué au 1/500 dans le tampon de Coons pH 7,4 pendant 24 à 48 heures à 4°C. Elles ont ensuite été lavées dans du tampon de Coons (15 mn) et dans du PBS (2 x 15 mn) pour éliminer l'excès d'antigène.

- Incubation avec sérum anti IgG de lapin marqué à l'or colloïdal (révélation)

Lavées deux fois dans le PBS, les coupes ont été incubées avec le sérum anti IgG de lapin marqué à l'or colloïdal dilué au 1/100 dans du PBS (2 heures à 4°C). Nous avons ensuite procédé à la coloration par l'acétate d'uranyle (15 mn).

RESULTATS
ET
DISCUSSIONS

Chapitre II

TESTS DE TOXICITE DU CADMIUM

TESTS DE TOXICITE DU CADMIUM

A - ETUDE DE LA MORTALITE EN FONCTION DE LA DOSE DE CADMIUM ET DE LA TEMPERATURE

Des travaux antérieurs (Dennaï, 1984 ; Nejmeddine, 1985 ; Dennaï et al., 1986) ont permis d'établir qu'à 13°C Nereis diversicolor résiste assez bien à une dose de 22 ppm ajoutée expérimentalement à l'eau de mer. Par contre, les doses de 44 et 55 ppm entraînent la mort de l'animal à brève échéance.

Dans ce travail, nous avons recherché l'effet de la température sur la toxicité du métal. Nous avons choisi deux températures assez différentes mais auxquelles l'animal est soumis couramment dans son environnement naturel : 4°C et 16,5°C.

Comme le montre la figure 1, à 16,5°C la dose de 22 ppm provoque la mort de tous les animaux dans un délai de 15 jours alors qu'à 4°C, le pourcentage de mortalité reste voisin de 25. Avec 44 et 55 ppm, 100 % de mortalité ont été observés au bout de 10 jours pour une température de 16,5°C et de 20 jours à 4°C. Les 3 doses sont donc mal supportées à 16,5°C. Ce résultat révèle probablement un accroissement dans l'accumulation du métal dans l'animal. C'est ce phénomène que nous nous sommes proposé d'étudier (cf chapitre suivant) mais auparavant nous avons tenu à vérifier l'état des différents tissus.

B - ETUDE ULTRASTRUCTURALE

Il a été montré antérieurement (Dennaï, 1984 ; Dennaï et al., 1986) que les tissus de Néréis soumises à une intoxication par 22 ppm pendant 11 jours à 13°C ne présentent aucune modification notable à l'exception des sphérocristaux qui apparaissent dans l'épithélium digestif. Pour nos observations, nous avons choisi de soumettre les Néréis à une intoxication par 55 ppm pendant 4 jours à 13°C. Les résultats obtenus diffèrent selon les types cellulaires envisagés.

1 - Epiderme (Pl. I, fig. a)

Les structures sont bien conservées. La cuticule n'est

Fig. 1

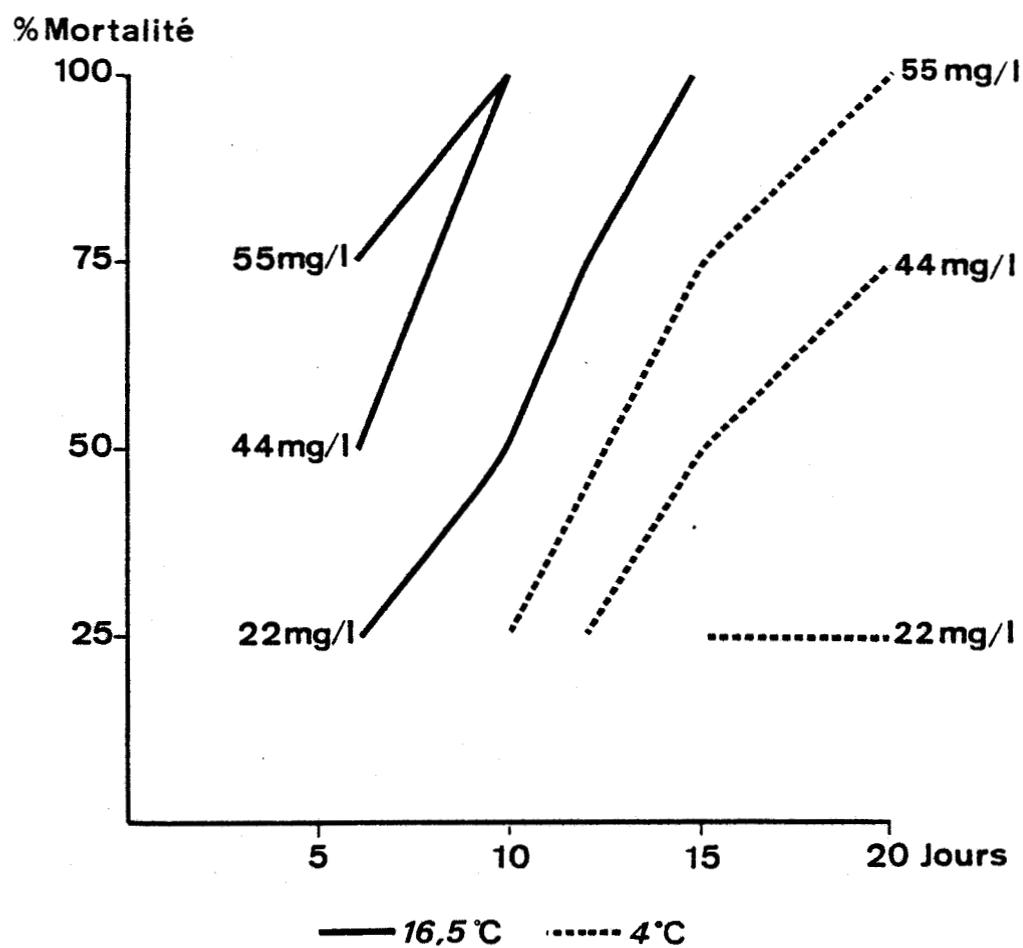


Figure 1 - Test de toxicité du cadmium. Pourcentage de mortalité en fonction de la concentration du métal, de la température et de la durée de l'exposition.

pas altérée. Les lysosomes sont toutefois plus nombreux que dans l'épiderme normal.

2 - Tissu nerveux

L'aspect général est encore bon. Dans la névroglie, desmosomes et gliofilaments semblent normaux. Il faut toutefois noter la présence de corps denses de type lysosomal dont l'apparition semble être liée à l'intoxication (Pl. I, fig. b). Il en est de même pour des formations dues à la coalescence de grains de sécrétion à l'intérieur de certaines cellules neurosécrétrices. La figure b de la planche II présente une cellule C II du noyau 20 du cerveau de Néréis (Dhainaut-Courtois et al., 1986). Dans quelques cas, des formations à allure tout-à-fait pathologique résultant, semble-t-il, de la coalescence de mitochondries et peut-être d'autres organites cellulaires tels que réticulum ou microtubules ont été observées dans des axones situés dans le cerveau (Pl. II, fig. a).

3 - Epithélium digestif

C'est de loin ce tissu qui présente les transformations les plus précoces et les plus spectaculaires avec l'apparition des sphérocristaux (Pl. III, figs a, b). Sur une même coupe transversale de l'intestin moyen, certaines cellules présentent encore des organites apparemment bien conservés (Pl. III, fig. a) tandis que d'autres cellules sont beaucoup plus altérées (Pl. III, fig. b).

4 - Néphridie

La planche IV présente deux aspects de la néphridie, soit à proximité de la lumière néphridiale (fig. a), soit au contact d'un vaisseau sanguin (fig. b). On remarquera que l'aspect général des cellules est normal ; les mitochondries et les formations ciliaires, en particulier, ne présentent pas d'altération. Toutefois, la comparaison avec des tissus d'animaux non intoxiqués (illustration non donnée) semble indiquer que les nombreux lysosomes visibles sur la figure a sont, au moins partiellement, dus à l'intoxication.

5 - Cellules coelomiques

Une classification basée sur l'ultrastructure de ces cellules a été établie par Baskin (1974) et Dhainaut (1984). Comme leur nom l'indique, les éléocytes contiennent des gouttelettes

lipidiques qui apparaissent en gris moyen sur les photographies de microscopie électronique (Pl. V, fig. b) tandis que les granulocytes renferment de nombreux granules. Des caractères spécifiques ont par ailleurs permis de subdiviser les granulocytes en granulocytes I, II et III. Nous retiendrons ici que les granulocytes I se caractérisent par la présence de microfilaments. La comparaison entre un granulocyte I d'animal témoin (Pl. VI, fig. b) et celui d'un ver contaminé montre que l'intoxication provoque une perte de granules (dégranulation) (cf chapitre V). Les éléocytes, qui sont des macrophages (Dhainaut, 1984), présentent chez les animaux intoxiqués de nombreux corps résiduels dont des sarcolytes qui résultent de la phagocytose de fragments de fibres musculaires en dégénérescence (Pl. V, fig b).

DISCUSSION

Les expériences d'intoxication réalisées avec plusieurs doses de cadmium à 4°C, 13°C ou 16,5°C établissent l'importance de la température sur la toxicité du métal. Cet effet est probablement lié à des variations de métabolisme et laisse envisager une plus grande sensibilité des vers pendant l'été. Tous nos travaux ont été réalisés sur des Néréis femelles d'âge moyen. Il conviendrait aussi de comparer les effets sur des Néréis mâles et sur des animaux d'âges différents.

Les examens réalisés en microscopie électronique montrent par ailleurs qu'au bout de 4 jours les tissus sont généralement peu altérés même avec une concentration très forte de cadmium (ici 55 ppm). On notera toutefois un début de dégénérescence au niveau des fibres musculaires et l'apparition de quelques formations pathologiques dans le tissu nerveux. En fait, les réponses à l'intoxication sont surtout marquées par le développement de nombreux sphérocristaux dans l'intestin et de lysosomes dans d'autres tissus tels que l'épiderme et la néphridie. Il n'est pas impossible que l'accumulation des grains de sécrétion dans certaines cellules neurosécrétrices et cellules gliales, due à un arrêt de libération, et l'apparition des sphérocristaux soient liées à un dérèglement du métabolisme du calcium. Des microanalyses préliminaires réalisées à Créteil ont en effet révélé que ces formations concentriques sont riches en calcium et en phosphore. Il convient aussi de rappeler les modifications observées au niveau des éléocytes et surtout des granulocytes I. Celles-ci ne sont nullement spécifiques du cadmium puisqu'il a été montré par ailleurs que des intoxications par le chlorure mercurique (Dennaï, 1984) et par des sels de chrome et de plomb (Arrouijal, inédit) provoquent les mêmes effets. Comme nous le verrons dans le chapitre V, il s'agit d'un mécanisme de défense que nous avons pu étudier en détail grâce à l'obtention d'anticorps poly- et monoclonaux.

PLANCHE I

Ultrastructure de l'épiderme (fig. a) et de la névroglie (fig. b) d'une Néréis intoxiquée par 55 ppm de cadmium durant 4 jours (t° : 13°C).

Figure a - Au niveau du parapode, l'épiderme est peu modifié. on remarquera néanmoins la présence de nombreux lysosomes. Cut, cuticule ; Ep, épiderme. X 20.000.

Figure b - Névroglie (Ng) dans le cerveau. La structure fine est encore peu modifiée : desmosomes et gliofilaments semblent normaux. Toutefois, des corps denses de forme variée apparaissent dans les prolongements gliaux (←) X 38.000.

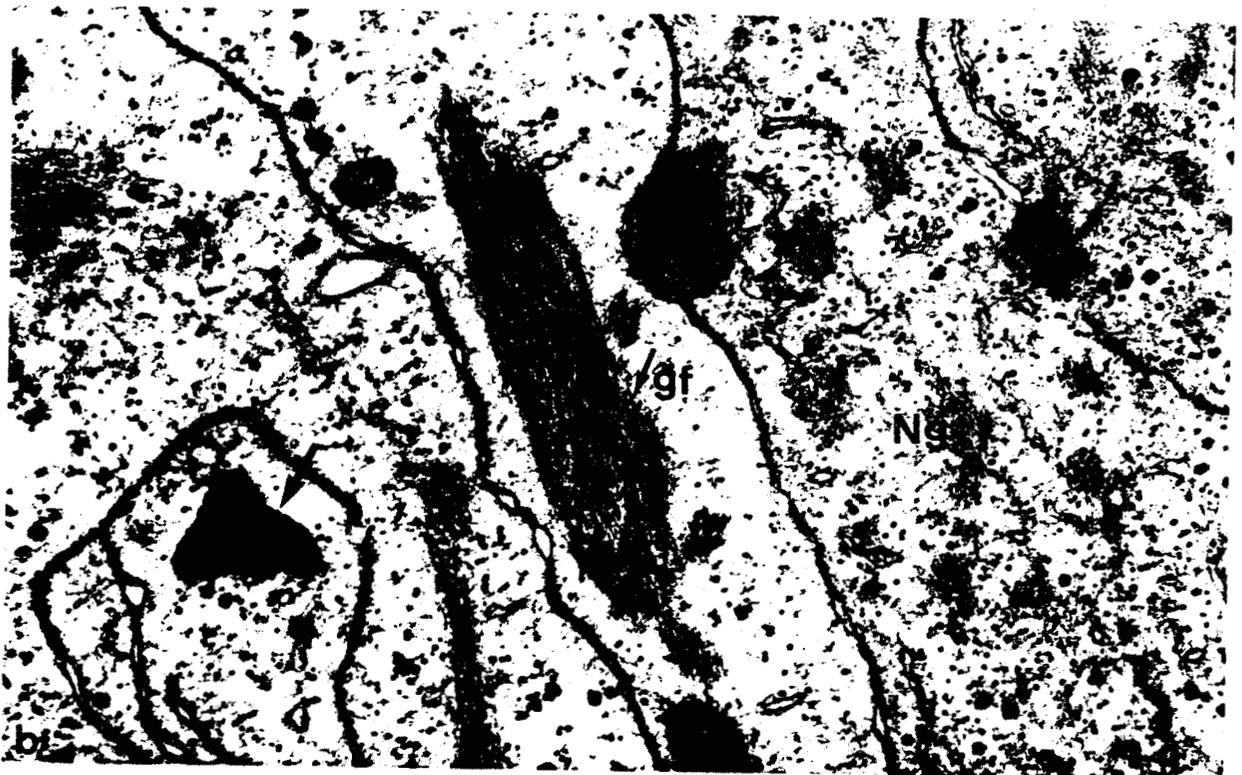
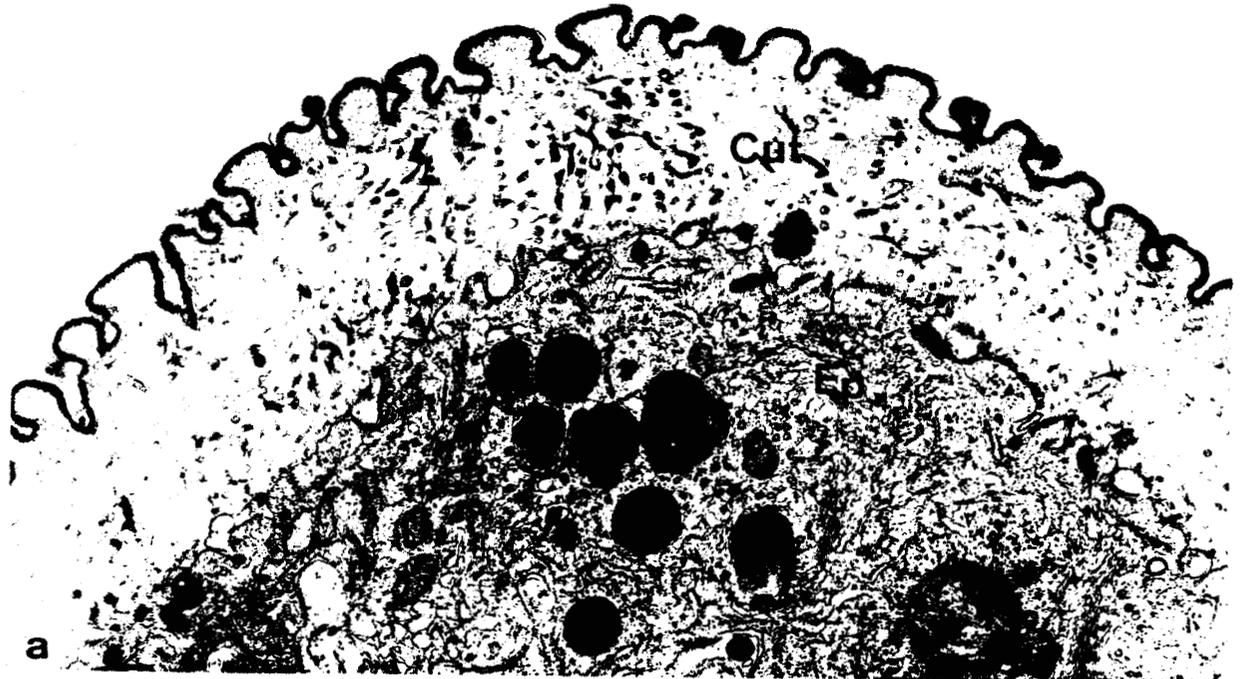


PLANCHE II

Ultrastructure de neurones dans le cerveau d'une Néréis intoxiquée par 55 ppm de cadmium pendant 4 jours (t° : 13°C).

Figure a - Apparition dans un axone d'une formation pathologique (←) résultant probablement de la coalescence de mitochondries et peut-être d'autres organites cellulaires (microtubules, par exemple). X 20.000.

Figure b - Cellule neurosécrétrice C II située dans le noyau 20 du cerveau. Remarquer les nombreux corps denses dus à la coalescence des grains élémentaires de neurosécrétion. N, noyau ; nu, nucléole. X 20.000.

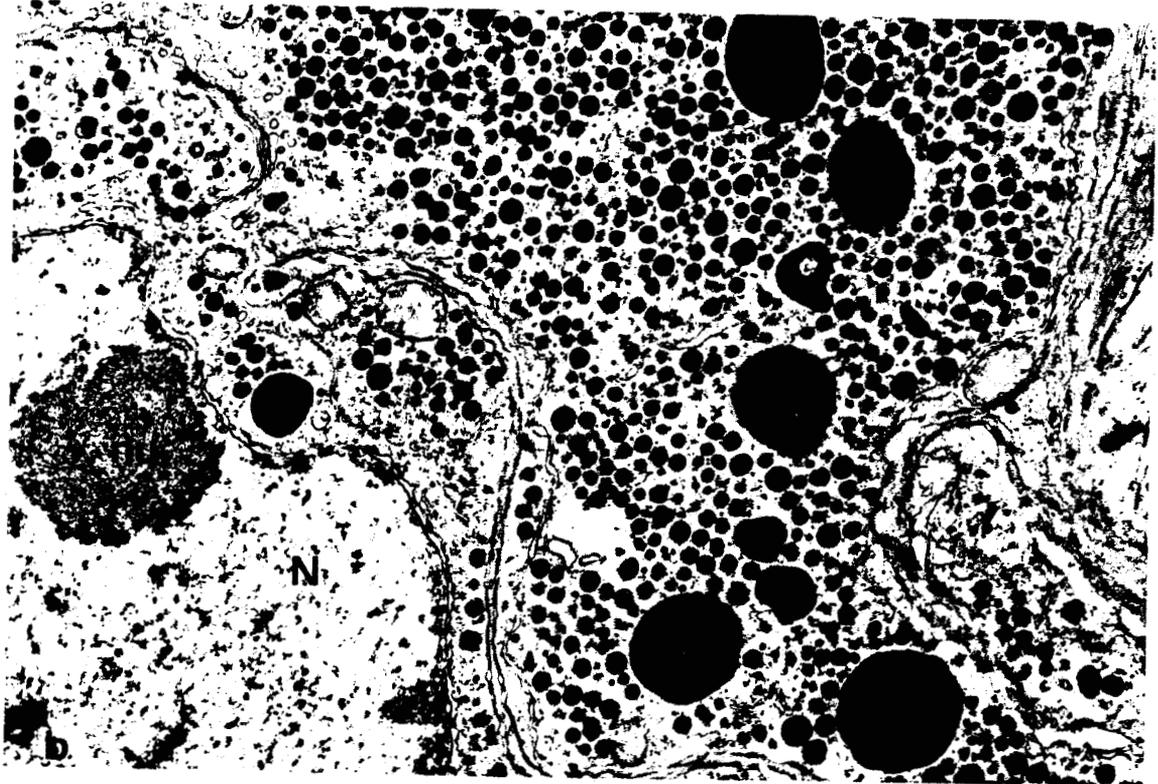


PLANCHE III

Ultrastructure de l'épithélium de l'intestin moyen d'une Néréis intoxiquée par 55 ppm de cadmium pendant 4 jours (t° : 13°C). Remarquer la présence de nombreux sphérocristaux.

Figure a - Les organites cellulaires et les microvillosités (Mv) ont un aspect proche de la normale. X 20.000.

Figure b - Dans une zone pourtant proche de celle présentée sur la figure a, les altérations au niveau du cytoplasme sont plus importantes. X 58.000.

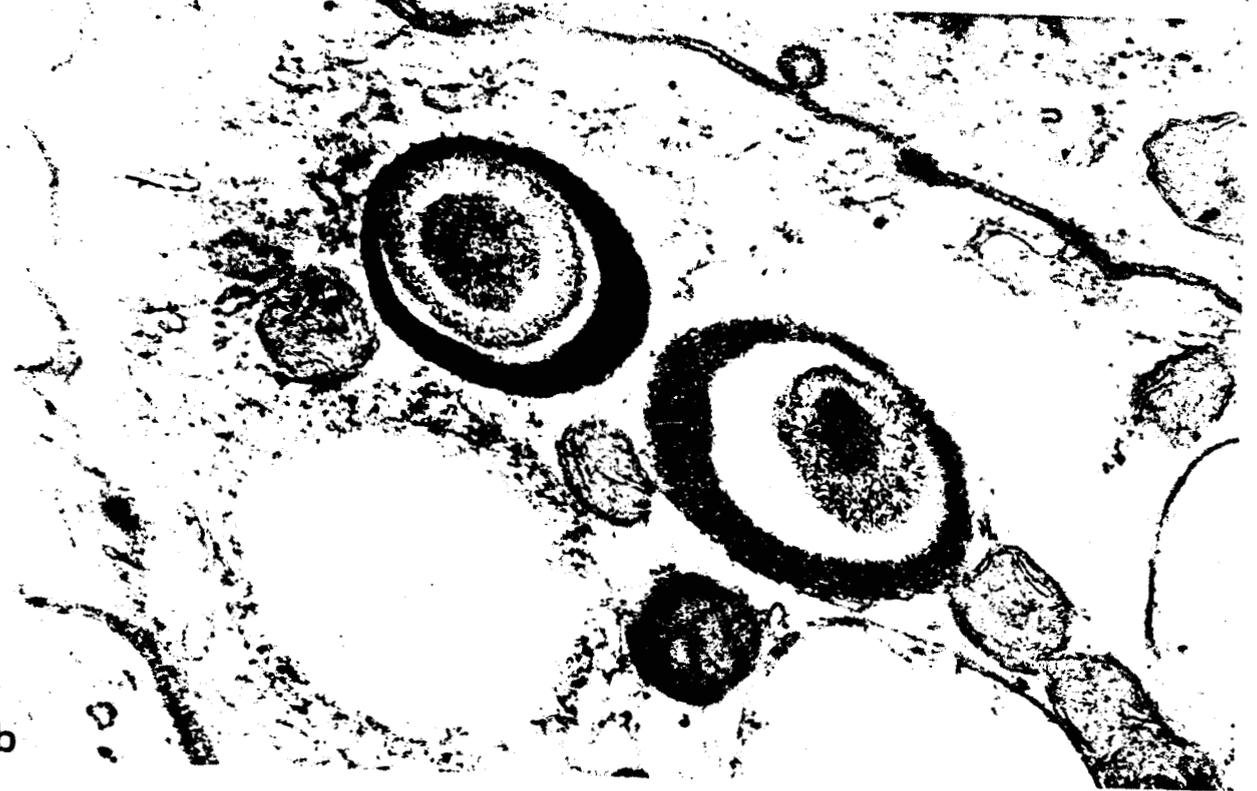
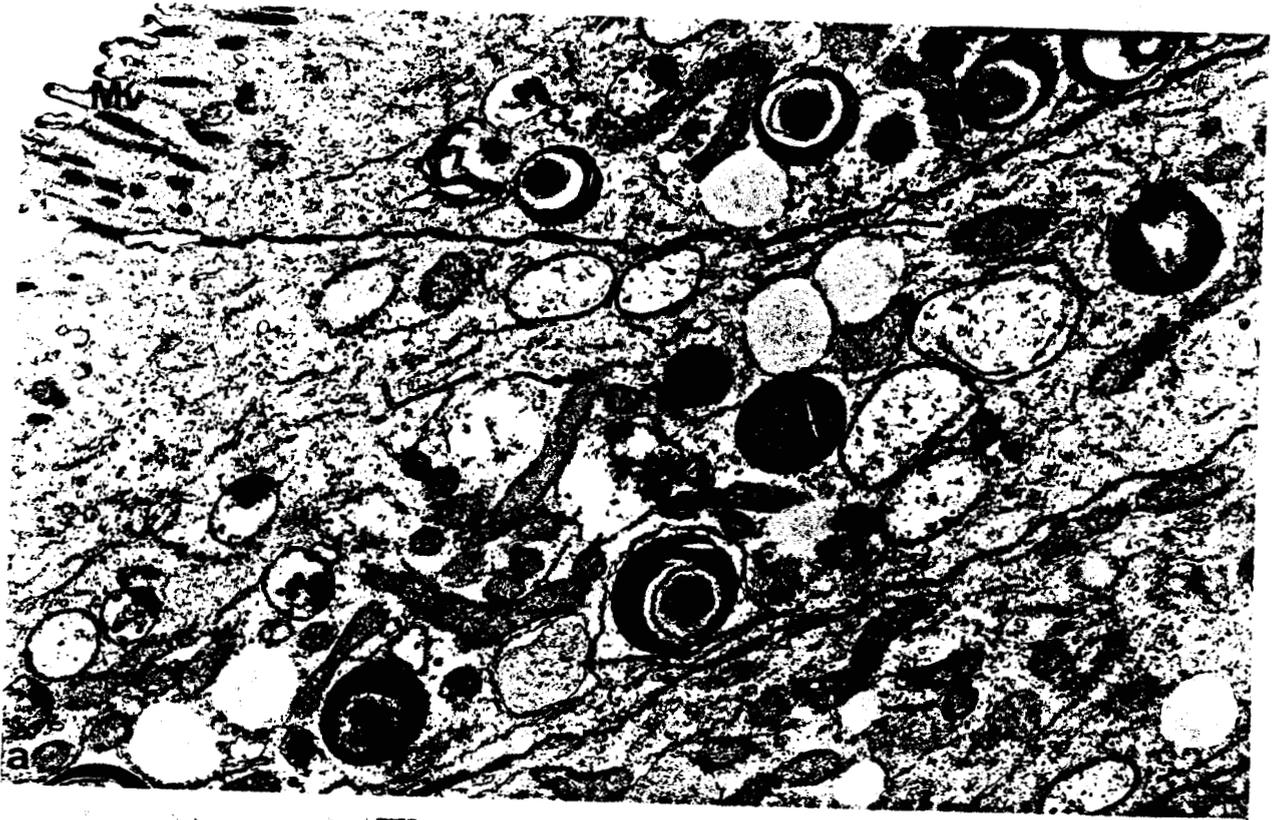


PLANCHE IV

Ultrastructure de la néphridie d'une Néréis intoxiquée par 55 ppm de cadmium pendant 4 jours (t° : 13°C).

Figure a - Cellules bordant la lumière néphridiale (LN). On remarquera la présence de nombreuses formations de type lysosomal. X 14.400.

Figure b - Contact entre la néphridie (N) et le vaisseau sanguin (VS). La structure paraît tout à fait normale. X 20.000.



BU
LILLE

PLANCHE V

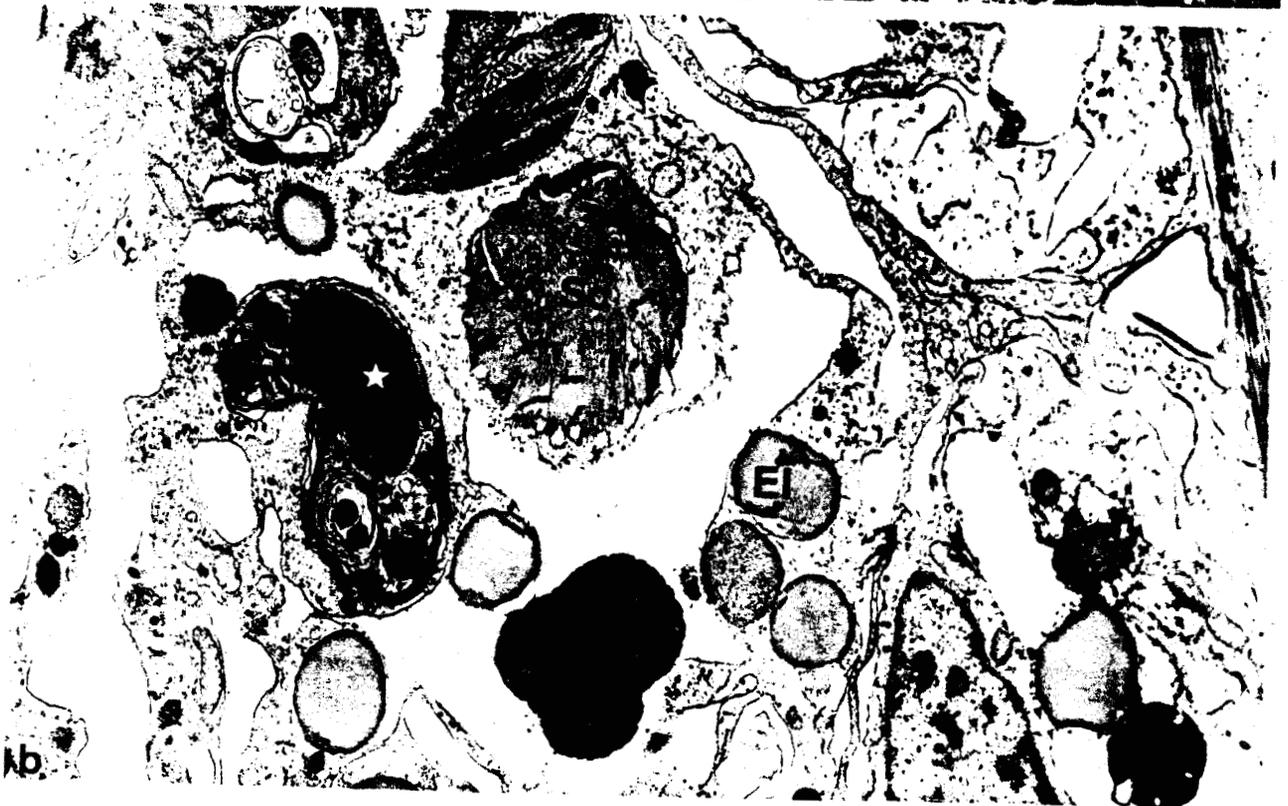
Ultrastructure de certains coelomocytes chez une Néréis intoxiquée par 55 ppm de cadmium pendant 4 jours (t° : 13°C).

Figure a - Les granulocytes I (GI) ont perdu la majorité de leurs granules (comparer avec la figure b de la planche VI) mais de nombreux microfilaments (mf) restent visibles dans leur cytoplasme. Les granulocytes II (GII) ont un aspect normal. X 14.400.

Figure b - L'éléocyte (E1) caractérisé par la présence de nombreuses gouttelettes lipidiques contient un corps résiduel à allure de formation myélinique (*) et des sarcolytes (Sc), résultats de la phagocytose de fragments de fibres musculaires en dégénérescence. X 9.600.



a



b

Chapitre III

**BIOACCUMULATION DU CADMIUM,
DU ZINC ET DU CUIVRE**

BIOACCUMULATION DU CADMIUM, DU ZINC ET DU CUIVRE

A - ETUDE DE LA CINETIQUE D'ACCUMULATION DU CADMIUM

Nous avons étudié l'accumulation du cadmium par la Néréis en fonction du temps et de la température. Nous avons choisi la concentration de 22 ppm de cadmium qui permet une intoxication chronique (Dennaï et al., 1986).

Pour détecter une éventuelle élimination du cadmium, nous avons placé les animaux intoxiqués dans de l'eau de mer non contaminée en la changeant toutes les 24 heures pendant une durée égale à celle de l'intoxication. Les résultats réunis dans les tableaux 4, 5 et 6 et les figures 2, 3 et 4, sont exprimés en μg de cadmium par gramme de poids frais de l'animal (ppm).

I - EN FONCTION DU TEMPS

I.1. Dans les animaux entiers

Trois lots de 5 animaux ont été traités par du cadmium pendant des durées différentes (4, 8, 12, ... 28 jours). Ils étaient maintenus à 4°C. Après le dosage du cadmium dans ces animaux, nous avons constaté que, comme le montre la figure 2, la vitesse d'absorption est faible au début (entre 0 et 8 jours) et qu'elle s'accroît entre 8 et 12 jours d'intoxication. Vers le 16ème jour de traitement, l'accumulation s'est fortement atténuée, ce qui se traduit par la formation d'un plateau au niveau de la courbe (fig. 2). La quantité maximale absorbée pendant 28 jours est de l'ordre de 55 ppm. Nous avons calculé les facteurs de concentration qui correspondent aux rapports entre la quantité du métal absorbé par l'animal et la quantité de ce métal dans l'eau de mer contaminée. Ces facteurs se sont révélés assez faibles : pour la plus longue durée d'intoxication (28 jours) à 4°C, nous avons trouvé que le facteur de concentration est à peu près de l'ordre de 2,5 (tableau 4).

Tableau 4 - Cinétique d'accumulation du cadmium dans les animaux intoxiqués par 22 ppm de ce métal et de son élimination après désintoxication des animaux dans de l'eau non polluée

Durée d'intoxication en jours	Cd en $\mu\text{g/g}$ de poids frais	Dans les animaux entiers	Facteurs de concentration	Dans la partie insoluble des animaux intoxiqués	Dans les animaux désintoxiqués après lavage
4		14,36	0,64	4,16	8,00
8		19,14	0,87	14,00	14,90
12		48,82	2,22	17,50	25,10
16		52,48	2,40	27,27	42,10
20		53,78	2,44	30,10	
24		52,45	2,40	33,75	
28		52,30	2,40	30,20	

I.2. Dans la partie insoluble des animaux

Nous avons trouvé le même type de résultats à savoir que la courbe présente la même allure (Fig. 2) que celle relative aux animaux entiers; néanmoins la vitesse d'accumulation ainsi que la quantité globale du cadmium absorbé sont plus faibles (Tableau 4). Ceci veut dire que le cadmium absorbé est réparti entre les 2 fractions (soluble et insoluble) de la Néréis.

La figure 2 montre aussi que l'accumulation du cadmium par des Néréis exposées à une concentration de 22 ppm de cadmium dans l'eau de mer ne se fait pas de façon linéaire en fonction du temps. En effet, il semble que la teneur en cadmium de la Néréis atteigne plus rapidement un équilibre dans le cas d'une exposition à cette concentration car elle n'est pas significativement plus élevée après 28 jours d'intoxication qu'après 16 jours.

I.3. Recherche d'une éventuelle élimination du cadmium

L'équilibre de la teneur en cadmium atteint au bout de 16 jours nous a fait penser à une certaine élimination de ce métal par la Néréis. Par conséquent, nous avons réalisé une expérience dans ce sens. Cette expérience consiste en un lavage des animaux intoxiqués pendant une durée équivalente à celle de la contamination. L'eau de lavage a été renouvelée régulièrement.

Figure 2 - Cinétique d'accumulation du cadmium dans les Néréis intoxiquées par 22 ppm de cadmium. A : Néréis entières ; B : fraction insoluble (culot).

Figure 3 - Cinétique d'élimination du cadmium chez les Néréis intoxiquées par 22 ppm de cadmium.

Fig.2

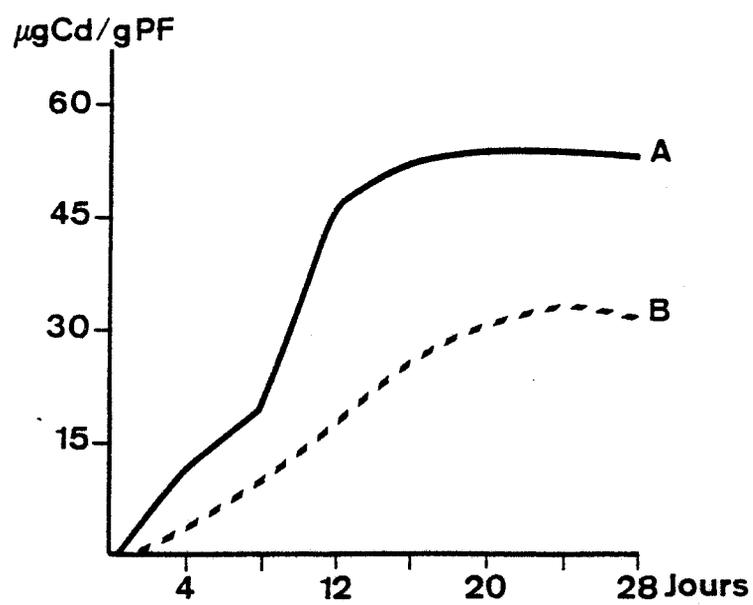
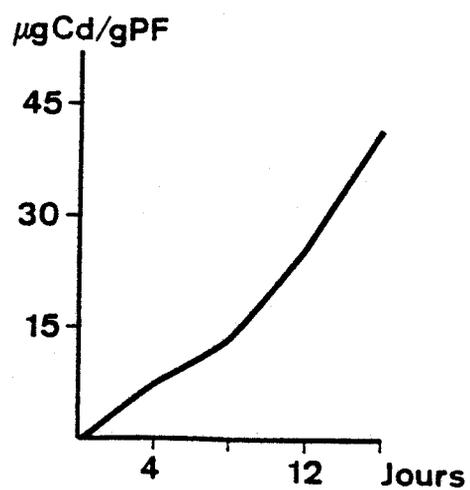


Fig.3



Les résultats obtenus après le dosage du cadmium dans ces animaux lavés sont illustrés par la figure 3 et le tableau 4. Ils montrent qu'après une désintoxication pendant 4, 8, 12 et 16 jours la charge en polluant des Néréis n'a pas varié de façon très significative. En comparant la teneur en cadmium avant et après la désintoxication, nous pouvons en déduire que l'élimination reste très faible, du moins pendant les 12 jours de désintoxication. Nous n'avons pas pu prolonger l'expérience au delà de 16 jours à cause de la mort des animaux.

II - EFFET DE LA TEMPERATURE

Comme nous l'avons signalé dans l'introduction, la température peut jouer un rôle très important dans le phénomène d'accumulation des métaux lourds en général et du cadmium en particulier. Nous avons décidé de tester cet effet de la température sur l'accumulation du métal par la Néréis. En effet, comme le montrent la figure 4 et le tableau 5, la vitesse d'accumulation et la quantité absorbée par l'animal sont beaucoup plus importantes à 13°C qu'à 4°C. Dans les premiers jours de l'intoxication, la quantité de cadmium accumulée à 13°C est 2 fois supérieure à celle absorbée à 4°C. Ceci explique l'importance de la vitesse d'accumulation à cette température également. Ce rapport a triplé au bout de 16 jours d'intoxication.

Tableau 5 - Effet de la température sur l'accumulation du cadmium dans les animaux entiers. Le dosage est exprimé en µg de Cd/g de poids frais des animaux.

Cd en µg/g de poids frais	Durée d'intoxication en jours	4	8	12	16
	4°C		13,69	20,58	38,88
13°C		32,83	46,66	88,75	125,60

Fig.4

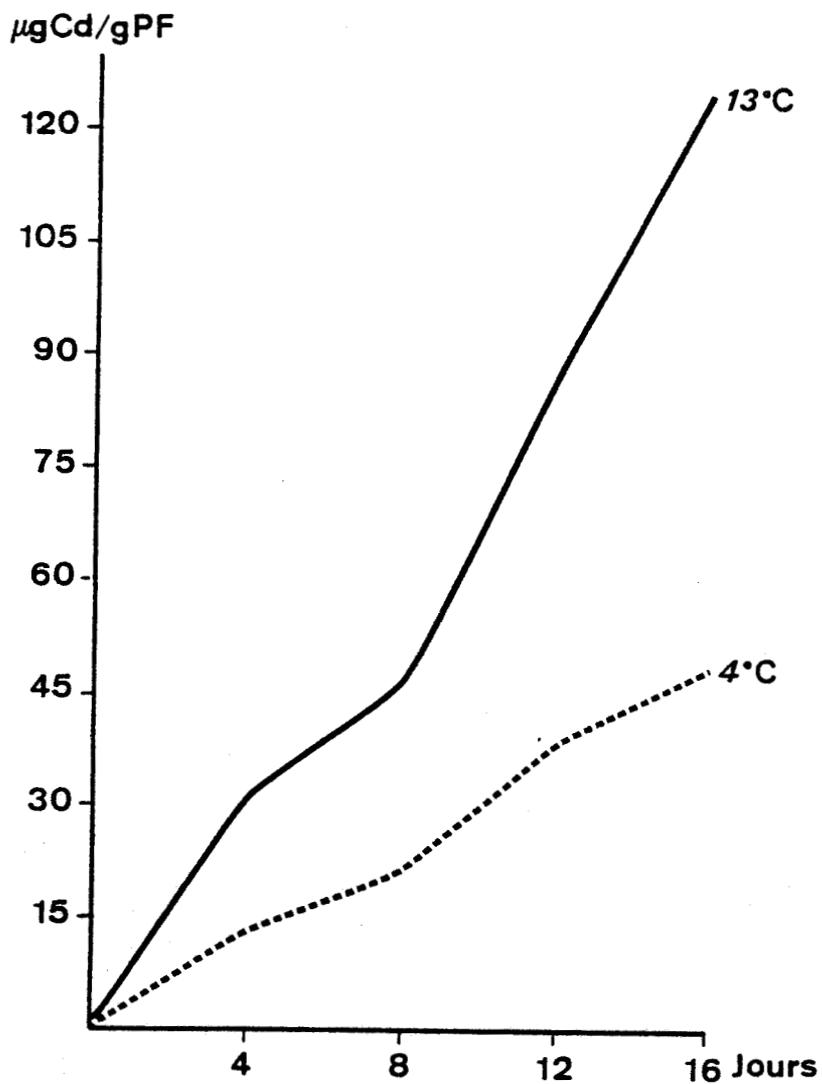


Figure 4 - Effet de la température sur la bioaccumulation du cadmium chez les animaux ayant été soumis à une intoxication expérimentale par 22 ppm de cadmium.

B - CINETIQUE D'ACCUMULATION DU ZINC ET DU CUIVRE LORS DE L'INTOXICATION PAR LE CADMIUM

Dans le but de contrôler l'influence de l'intoxication par le cadmium sur l'accumulation de 2 métaux essentiels, le zinc et le cuivre, nous avons intoxiqué par 22 ppm de cadmium 2 lots de 5 animaux pour chaque durée de contamination. Ces animaux ont servi pour le dosage du zinc, du cuivre et du cadmium. A côté de ces animaux traités par le cadmium, d'autres non contaminés ont servi de témoins. Les résultats de cette expérience sont illustrés par le tableau 4 et la figure 5.

1 - Dans les animaux témoins (non contaminés)

Nous n'avons pas détecté la présence du cadmium dans les animaux provenant du milieu naturel et non traités expérimentalement, les valeurs affichées par l'appareil ont été très inférieures à la limite de détection. Par contre, pour les métaux essentiels, nous avons trouvé 22,17 µg/g de poids frais pour le zinc et 3,40 µg/g de poids frais pour le cuivre (Tableau 6). Ces 2 valeurs trouvées représentent la moyenne sur un nombre d'échantillons égal à trois (n = 3).

Tableau 6 - Teneurs en cadmium, zinc et cuivre des animaux entiers intoxiqués par 22 ppm de cadmium.

Durée d'intoxication en jours	4	8	12	16	20	24	28	Témoins non intoxiqués
µg/g de poids frais								
Cadmium	8,01	20,15	24,17	37,17	32,31	33,80	33,72	non détecté
Zinc	19,04	22,40	20,67	28,14	25,48	30,72	43,32	22,17
Cuivre	3,91	4,40	3,39	5,81	5,67	5,09	8,11	3,52

Fig. 5

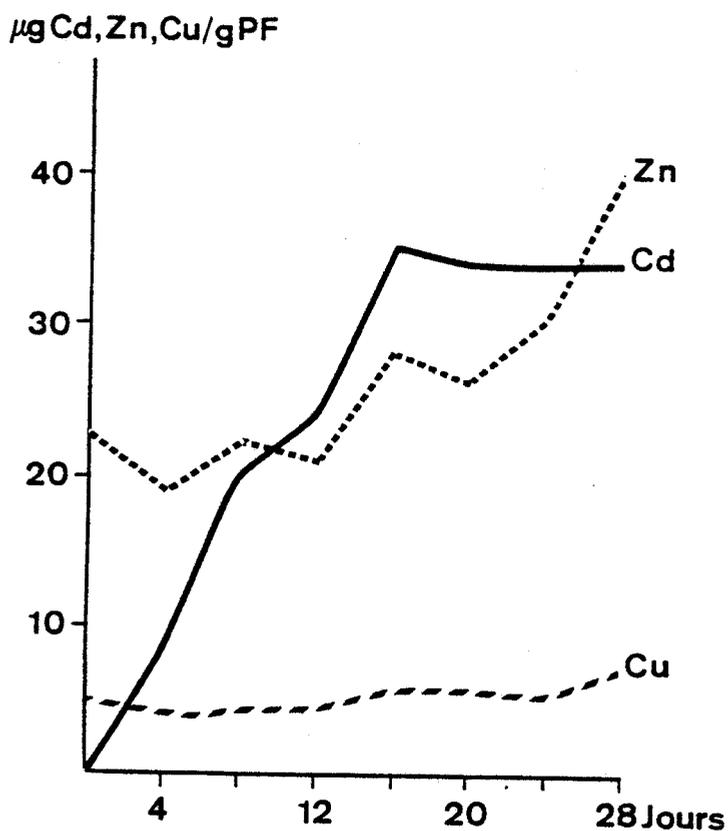


Figure 5 - Cinétique d'accumulation du cadmium, du cuivre et du zinc chez les animaux ayant été contaminés par 22 ppm de cadmium.



2 - Dans les animaux contaminés

Comme le montrent la figure 5 et le tableau 4, le taux du cuivre reste presque invariable au cours de cette intoxication. Par contre, pour le zinc, les animaux présentent une variation significativement positive lors de l'intoxication par le cadmium. La teneur en zinc dans les animaux augmente en fonction du temps d'intoxication (Fig. 5).

C - REPARTITION DU CADMIUM, DU ZINC ET DU CUIVRE DANS LA PARTIE SOLUBLE

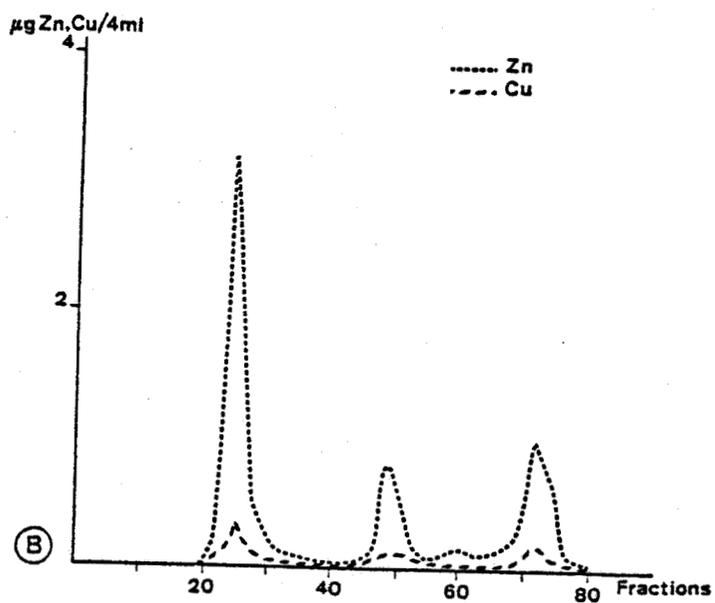
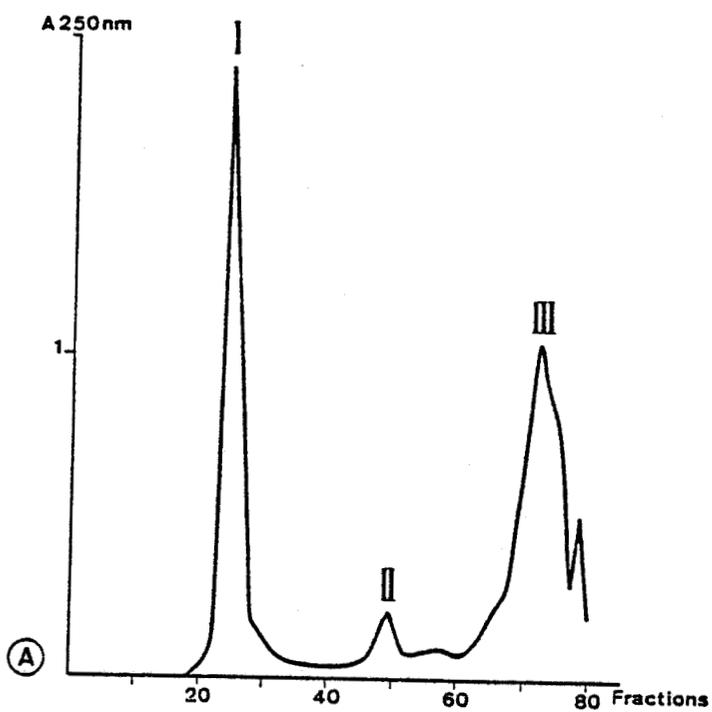
I - Animaux non intoxiqués

Le surnageant obtenu par ultracentrifugation à partir d'animaux non traités a été chromatographié par gel filtration Sephadex G 75. Le résultat de cette chromatographie est illustré par la figure 6. Celle-ci montre deux profils, l'un représentant la densité optique des différentes protéines (Fig. 6A) et l'autre montrant la répartition des métaux lourds (Cd, Zn et Cu) dans la partie soluble de ces animaux (Fig. 6B). En effet, l'absorbance à 250 nm des différentes fractions chromatographiées montre un profil composé de 3 pics majeurs, le premier (pic I) représentant des protéines de haut poids moléculaire (supérieur à 70 kD), le deuxième (pic II) sort dans un volume d'élution correspondant aux protéines de poids moléculaire à peu près compris entre 10 kD et 20 kD et le troisième correspond aux protéines de poids moléculaire inférieur à 5 kD composé d'un mélange de peptides, de fragments d'acides nucléiques et de molécules biologiques de petite taille (Brown et al., 1977).

Après le dosage des 3 métaux lourds dans la fraction soluble des animaux non intoxiqués, il s'est avéré qu'elle ne contient pas de cadmium ; la mesure a été très inférieure à la limite de détection de l'appareil (inférieure à 0,025 ppm). Pour le zinc et le cuivre qui sont des métaux nécessaires au bon déroulement du métabolisme de l'organisme, ils étaient représentés au niveau des 3 pics protéiques mais de façon beaucoup plus importante pour le zinc et surtout au niveau du premier pic des protéines de haut poids moléculaire (Fig. 6B). Ce résultat reste comparable à celui enregistré dans les animaux entiers (voir chapitre I).

Figure 6 - Profils chromatographiques de la fraction soluble, extraite d'animaux non traités (témoins), éluée d'une colonne de Sephadex G 75 (100x2,1 cm). Eluant : formiate d'ammonium 0,01 M, pH 7,4 ; débit 12 ml/h. A : absorbance à 250 nm ; B : Concentration des métaux ($\mu\text{g}/4 \text{ ml}$) dans les fractions éluées.

Fig. 6



II - Animaux intoxiqués par le cadmium

Après extraction tissulaire des animaux intoxiqués par 22 ppm de cadmium pendant 11 jours à 4°C, le surnageant de cet extrait soluble obtenu par centrifugation a été chromatographié sur gel filtration Séphadex G 75 dans les mêmes conditions que précédemment. Le profil chromatographique de la densité optique est le même que pour l'extrait soluble des animaux non traités. Il est composé de 3 pics majeurs élués dans les mêmes volumes d'éluion (Fig. 7A). Nous avons noté, après dosage des 3 métaux lourds dans les fractions chromatographiées, l'apparition du cadmium au niveau des 3 pics même s'il est négligeable dans le dernier pic (Fig. 7B). Nous avons également constaté que la quantité du zinc, exprimée en $\mu\text{g/g}$ de poids frais, a augmenté par rapport à celle mesurée dans la fraction soluble des animaux non intoxiqués. En ce qui concerne la quantité du cuivre, sa variation n'a pas été significative. Ce résultat obtenu dans la fraction soluble va dans le même sens que ce que nous avons noté chez les animaux entiers.

D - CINETIQUE D'ACCUMULATION DU CADMIUM DANS LA FRACTION SOLUBLE DES ANIMAUX INTOXIQUES PAR 22 PPM DE CE METAL

- 4 jours : Après 4 jours de contamination, nous avons noté l'apparition de 2 pics de cadmium qui coïncident avec ceux des protéines de haut poids moléculaire et des protéines de poids moléculaire compris entre 10 et 20 kD. Nous n'avons pas enregistré de cadmium dans le troisième pic protéique (Fig. 8). Cet enregistrement a été effectué sur plusieurs échantillons.

- 11 jours : La quantité de cadmium que les animaux ont pu fixer sur leur partie soluble pendant 11 jours d'intoxication est nettement plus élevée que pour la période de 4 jours. Cette quantité de cadmium dosée dans chaque fraction chromatographiée est répartie sur les 2 premiers pics comme précédemment mais avec une intensité plus grande au niveau du pic II (Fig. 9).

- 22 jours : Pendant 22 jours de contamination nous n'avons noté qu'une faible augmentation de la quantité du cadmium fixé sur le pic I et une légère diminution au niveau du pic II (Fig. 10). Ce qui indique une diminution d'absorption qui pourrait être liée à une certaine saturation.

Ce résultat de cinétique d'accumulation de cadmium dans la

fraction soluble de la Néréis va dans le même sens que celui obtenu chez les animaux entiers (voir ci-dessus).

Figure 7 - Profils chromatographiques de la fraction soluble extraite d'animaux traités par 22 ppm de cadmium pendant 11 jours et éluée d'une colonne de Sephadex G 75 (100x2,1 cm). Eluant : formiate d'ammonium 0,01 M, pH 7,4 ; débit 12 ml/h.
A : Absorbance à 250 nm ; B : Concentration des métaux ($\mu\text{g}/4\text{ml}$) dans les fractions éluées.

Fig.7

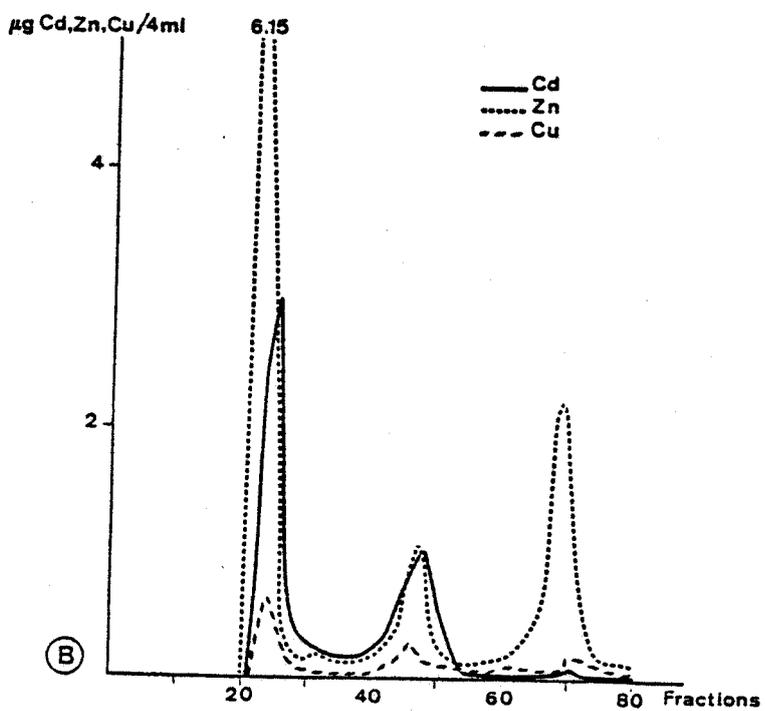
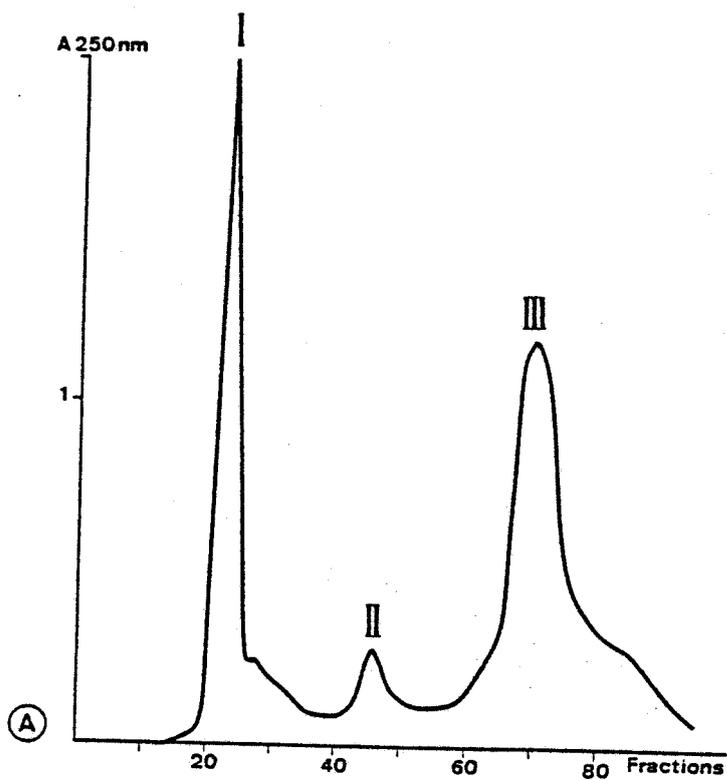


Figure 8 - Profils chromatographiques de la fraction soluble extraite d'animaux intoxiqués par 22 ppm de cadmium pendant 4 jours et éluée d'une colonne de Sephadex G 75 (100x2,1 cm). Eluant : formiate d'ammonium 0,01 M, pH 7,4 ; débit 12 ml/h.

Figure 9 - Profils chromatographiques de la fraction soluble extraite d'animaux intoxiqués par 22 ppm de cadmium pendant 11 jours et éluée d'une colonne de Sephadex G 75 (100x2,1 cm). Eluant : formiate d'ammonium 0,01 M, pH 7,4 ; débit 12 ml/h.

Fig. 8

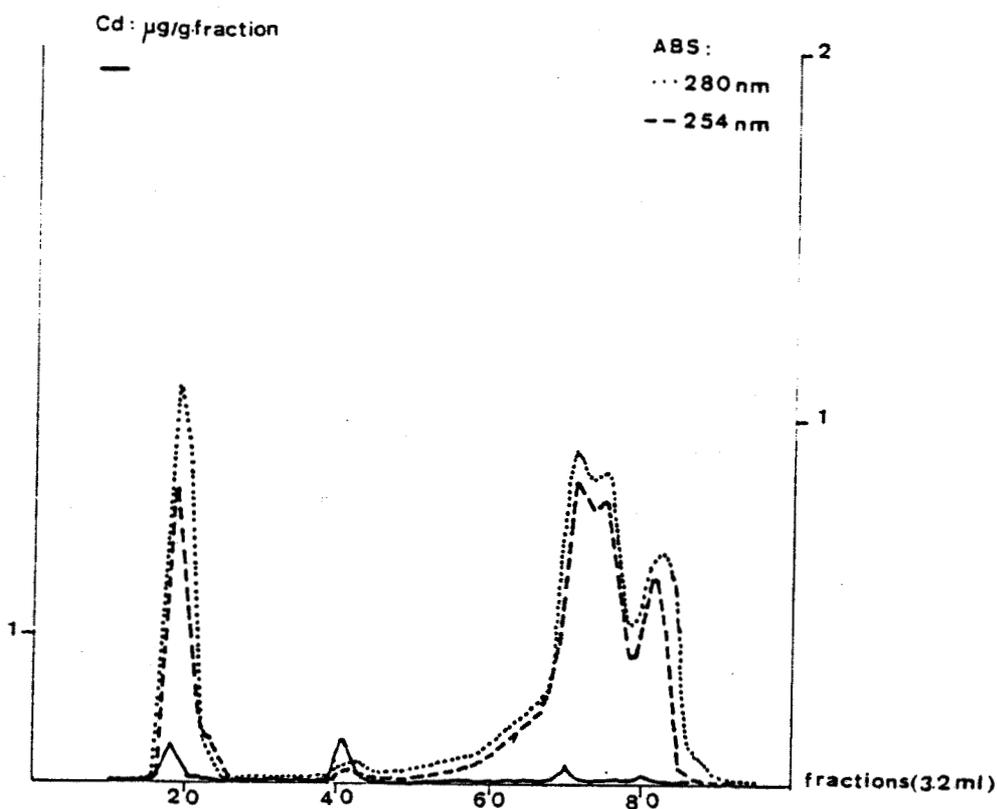


Fig. 9

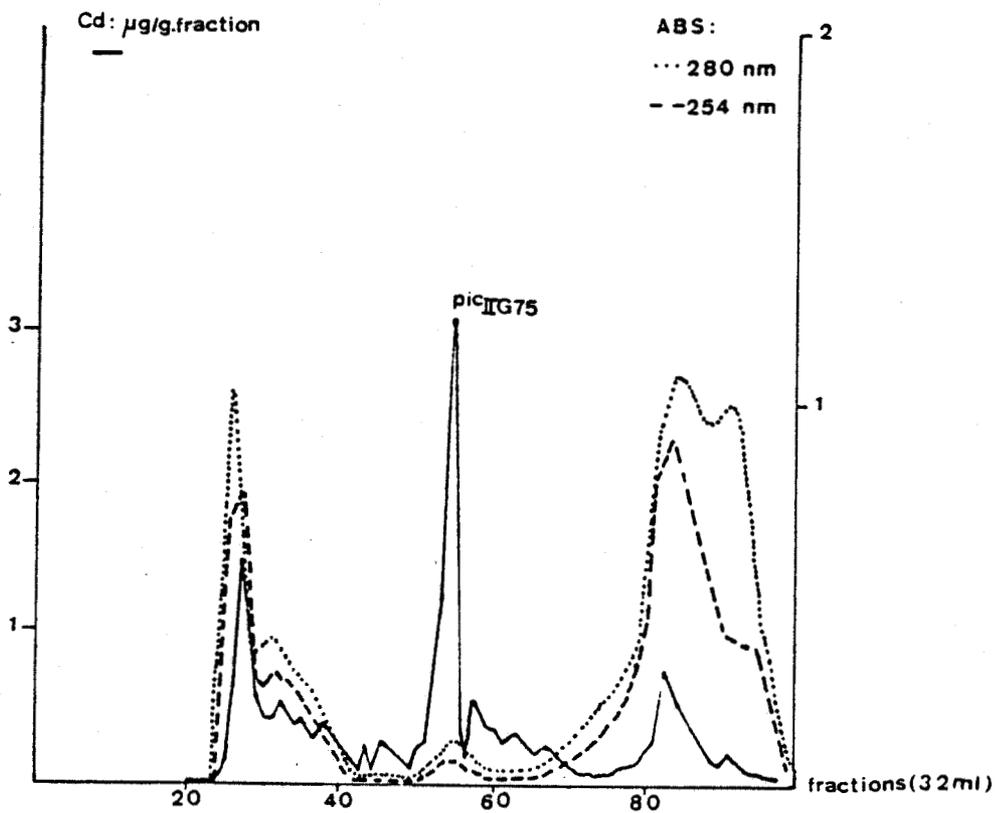


Fig.10

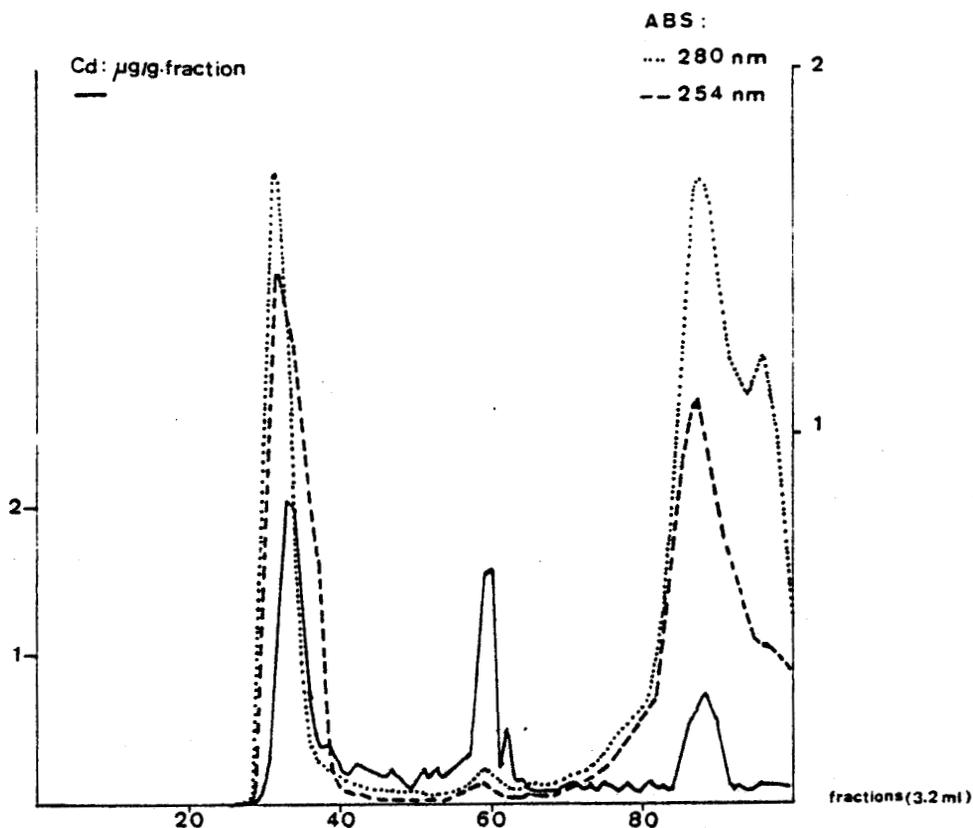


Figure 10 - Profils chromatographiques de la fraction soluble extraite d'animaux intoxiqués par 22 ppm de cadmium pendant 22 jours et éluee d'une colonne de Sephadex G 75 (100x2,1 cm). Eluant : formiate d'ammonium 0,01 M, pH 7,4 ; débit 12 ml/h.



DISCUSSION

L'intoxication aiguë qui provoque en général la mort de l'individu dans un délai assez court, s'exprime par concentration ou dose létale (CL 50 ou DL 50), c'est-à-dire que cette valeur, généralement pour une durée de 48 ou 96 heures, provoque la mort de 50 % des individus intoxiqués. Cette dose létale est très variable selon les espèces. Elle est très faible pour de nombreuses espèces de Vertébrés et d'Invertébrés, qui sont tuées par des concentrations inférieures à 1 ppm de cadmium. Par exemple, Enoplus brevis Bastian ne résiste pas à 1 ppm de cadmium (Howel et Smith, 1983) ; Patella vulgata, Patella caerulea et Nucella lapilus ne supportent pas la dose de 2 ppm, Mytilus edulis est tuée par 5 ppm (Noël-Lambot, 1980). Pour certains poissons d'eau douce, une concentration aussi faible que 0,01 ppm de cadmium est létale (Doudoroff, 1953 ; Ball, 1967 ; Kumada et al., 1972). Mais il faut toutefois noter qu'il y a d'autres espèces qui résistent à des doses de cadmium beaucoup plus élevées. Dans ce sens, Gauthier et Flatan (1977) ont montré que le Vibrio marin (bactérie) supporte jusqu'à 200 ppm de cadmium ; il est d'ailleurs pour cela considéré comme souche peu sensible. L'insecte d'eau douce Eusthenia spectabilis est considéré comme espèce très résistante à des doses très élevées de cadmium. En effet, Everard et Swain (1983) ont montré que la dose létale (DL 50) pour cet insecte est de 204 ppm, ce qui est très élevé. Dans le cas de Nereis diversicolor, l'examen des courbes de mortalité permet de conclure que cet animal supporte des doses assez fortes (22 ppm). Ce résultat est en accord avec les conclusions d'autres auteurs qui ont montré que, dans la nature, la Néréis peut s'adapter à un environnement riche en cadmium et que la concentration du métal à l'intérieur du ver est grossièrement proportionnelle à celle rencontrée dans le sédiment (Bryan et Hummerston, 1973).

La dose létale (DL 50) traduit le degré de toxicité du métal. Cette toxicité est dépendante de la quantité accumulée par l'animal. En effet, les résultats que nous avons rapportés dans ce sens chez Nereis diversicolor montrent qu'elle ne concentre pas le cadmium de façon très importante par comparaison avec d'autres espèces. L'exemple le plus spectaculaire est celui des Murex qui ont la capacité de concentrer un million de fois le cadmium de l'eau de mer qui en est très pauvre (Martoja et Martoja, 1984) alors que

Nereis diversicolor ne concentre que 2,5 fois la dose de 22 ppm pour une durée d'intoxication de 28 jours à 4°C. Ce résultat obtenu chez Nereis diversicolor reste comparable à celui rapporté pour d'autres appartenant à la même classe d'Annélides (Polychètes) : Perinereis nuntia var. valla et Neanthes japonica. Ces 2 espèces, par rapport à la concentration du milieu d'élevage (1,7 µg/g de poids sec), n'accumulent, respectivement, que 0,5 et 0,4 ± 1 µg/g de poids sec pendant 200 jours. Par contre, un ver de terre, Eisenia fetida (Annélide Oligochète) a un pouvoir d'accumulation plus élevé. Dans un milieu artificiel de concentration 1,7 µg/g de poids sec, E. fetida arrive à concentrer 2,3 à 7,5 (More et Kurihara, 1979). Il a été démontré que l'intensité d'accumulation du cadmium est très variable selon les espèces ; en général, les Mollusques accumulent de façon importante, les Téléostéens beaucoup moins (Noël-Lambot, 1980).

Cette différence d'accumulation du cadmium, qu'il conviendrait toutefois d'établir pour des durées identiques, est sans doute le reflet d'une différence dans les mécanismes physiologiques mis en jeu lors des phénomènes de détoxification. Cette différence d'accumulation ne réside pas uniquement dans la quantité absorbée mais également dans la manière et la vitesse avec lesquelles l'individu fait son accumulation. Noël-Lambot a montré que quelques poissons (exemple : anguilles) et quelques invertébrés comme la Patelle concentrent le métal de façon linéaire en fonction du temps et de la dose croissante du cadmium. Noël-Lambot explique cette augmentation continue du métal toxique dans ces espèces par leur très faible pouvoir d'élimination. Cet auteur a émis l'hypothèse que l'absorption du métal qu'on observe n'est qu'une absorption nette qui résulte de la différence entre l'absorption réelle (ou flux entrant) et l'élimination (ou flux sortant). Chez la Néréis, au cours de l'étude de la cinétique d'accumulation du cadmium, nous avons observé un certain équilibre de concentration au bout de 16 jours d'intoxication, ce qui nous a fait penser à une certaine élimination importante. Mais après l'étude de cette élimination (en plaçant les animaux dans de l'eau non polluée) nous savons que la quantité accumulée pendant 16 jours de contamination a varié de façon légèrement significative. Cette élimination n'est pas suffisante pour expliquer l'équilibre de concentration. Ceci nous laisse penser que l'absorption (ou flux entrant) ne se fait plus de la même manière à cause probablement d'une certaine saturation. Donc, une absorption

très faible et une légère élimination pourraient expliquer un tel équilibre de concentration en cadmium chez cette Annélide. Cette relativement faible absorption constituerait l'un des moyens permettant à l'animal de résister à des doses assez élevées de cadmium.

Comme il a été décrit par plusieurs auteurs, la cinétique d'accumulation du cadmium est influencée par plusieurs paramètres comme la dose utilisée, le temps d'exposition, la salinité, la température, la présence d'autres métaux dans le milieu, etc. Nous avons voulu tester l'effet de la température sur la cinétique d'accumulation du cadmium chez la Néréis. Effectivement, à 2 températures différentes, la Néréis accumule de façon très différente le cadmium, à savoir qu'à 13°C la quantité absorbée est presque le triple de celle accumulée à 4°C et ceci pour une même dose de cadmium et pour une même durée d'intoxication. Ce fait confirme d'autres résultats obtenus chez d'autres espèces par plusieurs auteurs (voir, par exemple, Vernberg et al., 1974) ; il explique également le grand pourcentage de mortalité obtenu lors de l'intoxication des Néréis à 16,5°C (voir chapitre II) parce que la toxicité du métal et son accumulation varient dans le même sens.

L'influence de l'accumulation du cadmium par ce facteur température nous paraît logique parce qu'une faible température comme 4°C agit sur le métabolisme de l'animal en diminuant son turnover. Comme le cadmium intervient dans le métabolisme de certaines protéines ayant un rôle enzymatique ou autre (appelées généralement métalloprotéines), il est donc normal qu'il soit absorbé de façon beaucoup moins importante qu'à 16,5°C.

En ce qui concerne l'influence de l'intoxication par le cadmium sur la cinétique d'accumulation du zinc et du cuivre dans les animaux et surtout dans quelques organes comme le foie, les reins et le tube digestif, il a été démontré par plusieurs auteurs qu'il y a des variations généralement positives (Noël-Lambot, 1980 ; Webb, 1972) et exceptionnellement négatives (Delval, 1984) pour le zinc, instables et parfois nulles pour le cuivre.

Dans les Néréis intoxiquées par le cadmium nous avons constaté que la quantité du cuivre est restée à peu près stable au cours de toute la période d'intoxication. Par contre, le taux du zinc dans les animaux a augmenté de façon significative, ce qui va dans le même sens que ce qui a été trouvé chez d'autres espèces (voir ci-dessus). Mais le problème qui se pose pour comparer nos résultats à ceux des autres auteurs est que ces derniers ont dosé

ces deux métaux essentiels dans des organes bien précis. La variation de ces deux métaux pourrait donc s'expliquer par une certaine redistribution à l'intérieur du corps quoique Noël-Lambot ait aussi émis l'hypothèse de l'absorption accrue du métal à partir du milieu extérieur. Cette hypothèse pourrait éventuellement expliquer l'augmentation du zinc dans la Néréis intoxiquée par le cadmium.

Ces résultats démontrent donc l'interférence du cadmium avec le métabolisme du zinc. Du fait de leur grande similitude, le cadmium et le zinc entrent vraisemblablement en compétition au niveau de très nombreux sites cellulaires.

Comme pour les animaux entiers, le dosage du zinc et du cuivre par SAAF, dans la fraction soluble d'animaux intoxiqués par le cadmium, a montré une certaine variation positive pour le zinc par rapport aux animaux non intoxiqués. Par contre, la quantité du cuivre n'a pas varié de façon significative. L'augmentation de la quantité du zinc dans la fraction soluble d'organes (foie, branchies) provenant d'animaux contaminés a été déjà signalée chez les poissons (Noël-Lambot, 1980 ; Delval, 1984) et chez le rat (Whanger et Deagen, 1983 ; Sugawara, 1977). Cette augmentation de la quantité du zinc pourrait bien être liée à une redistribution de la partie insoluble vers la partie soluble comme il a été constaté par Delval (1984). Ceci fait penser à une interférence de métabolisme des trois métaux lourds, cadmium, zinc et cuivre.

L'existence de deux métaux essentiels et d'un autre toxique au niveau des métalloprotéines laisse envisager que ces protéines jouent un double rôle chez la Néréis, à savoir qu'elles constituent un réservoir de zinc et de cuivre pour les organismes non intoxiqués (Delval, 1984 ; Whanger et Ridlington, 1981) et qu'elles font partie d'un système de détoxification pour les métaux lourds tels que le cadmium (Kito et al., 1982 ; Woodworth et al., 1983) ou le mercure (Bouquegneau, 1979).

Nereis diversicolor a déjà fait l'objet d'une étude expérimentale de l'intoxication par le cadmium. En effet, Dennaï (1984) et Dennaï et al., (1986) ont montré que le cadmium se fixe d'abord au niveau de la partie insoluble puis dans la partie soluble. Après l'étude de cette dernière par chromatographie, nous avons pu montrer que le cadmium apparaît de façon simultanée au niveau des deux premiers pics (celui des protéines de haut poids moléculaire et des protéines de poids moléculaire proche de 20 kD) après 4 jours d'intoxication. Nous n'avons rien enregistré au niveau du troisième pic.

Dans la bibliographie, un animal proche des Polychètes ayant montré la particularité de fixer sur 4 niveaux différents est Eisenia fetida (Annélide Oligochète) (63 à 70 kD, 10 kD et inférieur à 2 kD (Yamamura, 1981)).

Chez Enoplus brevis Bastian, le cadmium se fixe sur des protéines de poids moléculaires 63 kD et 29 kD sous conditions dénaturantes, et 450 kD et 28 kD sous conditions non dénaturantes (Howell et Smith, 1983).

Au bout de 11 jours d'intoxication, nous avons noté une augmentation du taux du cadmium au niveau des 2 pics avec une quantité plus importante au niveau du deuxième pic. Par contre, au niveau du troisième pic, il y a eu apparition d'une quantité faible de cadmium. Après 22 jours d'intoxication, la quantité de cadmium fixé sur les différentes fractions protéiques a continué à augmenter au niveau du pic I mais nous n'avons pas enregistré d'augmentation de ce métal au niveau du pic II ainsi qu'au niveau du pic III pendant cette période de traitement. Ce qui est intéressant à noter, c'est qu'il n'y a pas eu de déplacement apparent du cadmium au niveau des différents pics contrairement à ce qui a été observé par Dennaï (1984) chez la même espèce, par Siewicki et al. (1983) qui ont montré qu'après une intoxication expérimentale, la fixation du cadmium au niveau des protéines de haut poids moléculaire disparaît, et par Yamamura et al. (1983) qui ont noté une décharge rapide après une fixation rapide du cadmium sur des grosses protéines et ensuite une fixation lente sur des protéines de poids moléculaire plus faible. Il est toutefois très important de noter que l'accumulation du cadmium, aussi bien au niveau des animaux entiers qu'au niveau de la fraction protéique, dépend de plusieurs paramètres, à savoir l'âge des animaux, la température, la salinité, la saison, la compétition entre les métaux... Tous ces facteurs peuvent jouer soit individuellement soit en synergie, soit en antagonisme pour provoquer des modifications importantes dans les phénomènes d'accumulation des différents métaux lourds. Comme nous n'avons pas de données suffisantes sur l'action de ces différents paramètres, nous ne pouvons malheureusement pas tirer de conclusions définitives.

Chapitre IV

ISOLEMENT ET CARACTERISATION
DE LA PROTEINE MP II QUI COMPLEXE
LE CADMIUM

ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE LA PROTEINE MP II
QUI COMPLEXE LE CADMIUM

I - PROTEINES COMPOSANT LE PIC II

I.1. Purification

I.1.1. Chromatographie de gel filtration

La première étape de fractionnement qui précède toute chromatographie est celle qui consiste en une extraction de la phase soluble par homogénéisation et double centrifugation (voir chapitre I). Un sous-fractionnement de cette phase soluble d'animaux intoxiqués a été réalisé par une chromatographie de gel filtration sur Séphadex G 75. La figure 7 montre le résultat de cette filtration. Comme il a été signalé antérieurement pour d'autres études utilisant la même technique, nous retrouverons le même type de profil chromatographique présentant 3 pics (I, II et III) de protéines coïncidant avec 3 pics de cadmium, de zinc et de cuivre. Ce qui est intéressant à noter c'est l'apparition du pic II qui sort dans le même volume d'élution que celui trouvé pour la cadmium-thionéine (métallothionéine) chez différentes espèces. A titre d'exemple, nous citerons la cadmium-thionéine trouvée dans le foie de l'anguille (Noël-Lambot, 1980) et qui est en même temps une Hg-thionéine (Bouquegneau et al., 1975).

A l'issue de ce travail préliminaire, nous nous sommes posé la question suivante : Est-ce que Nereis diversicolor est capable de synthétiser des protéines possédant les mêmes propriétés que les métallothionéines décrites chez plusieurs espèces (voir introduction) ?

Pour répondre à cette question, nous nous sommes proposé de poursuivre la purification de la métalloprotéine présente dans le pic II pour pouvoir la caractériser. A cette fin nous avons suivi les critères de détermination de métallothionéines qui ont été résumés par Vallée en 1979 (voir introduction).

Avant d'aborder une autre étape de purification, nous avons voulu contrôler la composition en protéines du pic II. Ce contrôle a été réalisé par 2 techniques sensibles.

- La première consiste en une analyse en HPLC d'une fraction aliquote de 200 μ l du pic II dont les fractions qui le formaient ont été regroupées et lyophilisées. Le résultat de cette analyse est illustré par la figure 11 qui montre que le pic II est composé de 5 fractions protéiques. Nous en avons déduit que ce pic II est encore hétérogène. Pour connaître la nature de ces composantes protéiques (estimation des poids moléculaires) nous avons fait appel à la deuxième technique.

- Celle-ci consiste en une analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide 5-25 % en présence de SDS. Cette analyse a confirmé celle établie par HPLC en montrant que le pic II est formé d'au moins 4 bandes protéiques ayant un poids moléculaire compris entre 40 et 10 kD (Fig. 12). La bande ayant un poids moléculaire inférieur à 14,4 kD (\approx 10 kD) est la plus intense.

Avec ces deux analyses de contrôle, nous avons pu montrer qu'après la gel filtration sur Séphadex G 75, la fraction protéique du pic II est encore hétérogène. Nous avons alors entrepris une autre étape de purification basée sur une séparation selon la charge des différentes composantes.

I.1.2. Chromatographie d'échange d'ions

Les fractions du pic II riches en cadmium ont été regroupées et lyophilisées. Le lyophilisat a été repris par 2 à 3 ml du tampon Tris/HCl 15 mM, pH 8,5 et déposé sur une colonne de DEAE-cellulose. Après la première élution par le même tampon 0 M NaCl, une deuxième élution a été réalisée avec un gradient linéaire 0-0,5 M NaCl. Le résultat de cette expérience est montré par la figure 13. Le profil chromatographique de cette figure montre deux pics protéiques majeurs. Les mêmes fractions, après chromatographie d'échange d'ions ont servi pour le dosage du cadmium. Après avoir rapporté les mesures du dosage du métal sur celles de la densité optique nous avons constaté que le premier pic élué coïncide avec un pic de cadmium. Après avoir regroupé et concentré les fractions riches en cadmium et constituant le sommet du premier pic de la chromatographie d'échange d'ions, nous avons repris une fraction aliquote dans du tampon d'échantillon de Laemmli pour l'analyser en électrophorèse en gel de polyacrylamide 5-25 % en présence de SDS.

Figure 11 - Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) de la fraction pic II G 75 (II) d'animaux intoxiqués pendant 11 jours, séparée par filtration sur Séphadex G 75 (cf fig. 6A). Eluant : Tris/NaCl 0,2 M, pH 7,4 ; débit 1 ml/mn.

Figure 12 - Analyse des protéines au cours de la purification de la métalloprotéine (MP II) de la Néréis. Les protéines de chaque étape de purification ont été analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS. A : extrait soluble ; B : protéines de la fraction (pic II) obtenue par gel filtration sur Séphadex G 75 ; C : MPII isolée par chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE-cellulose. Les poids moléculaires des substances standards sont indiqués sur la gauche.

Fig-11

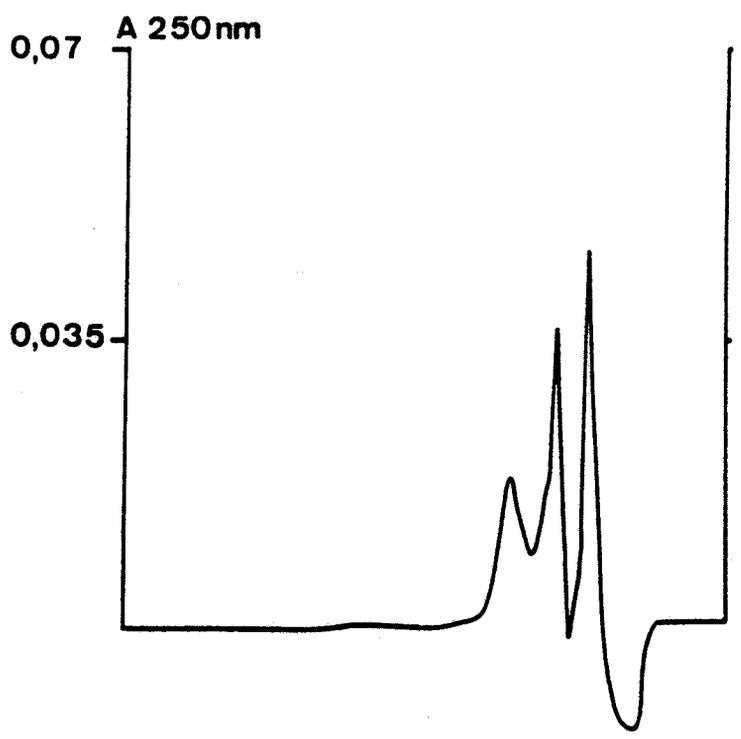
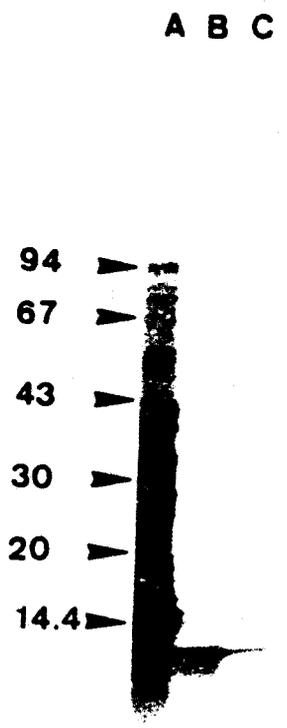


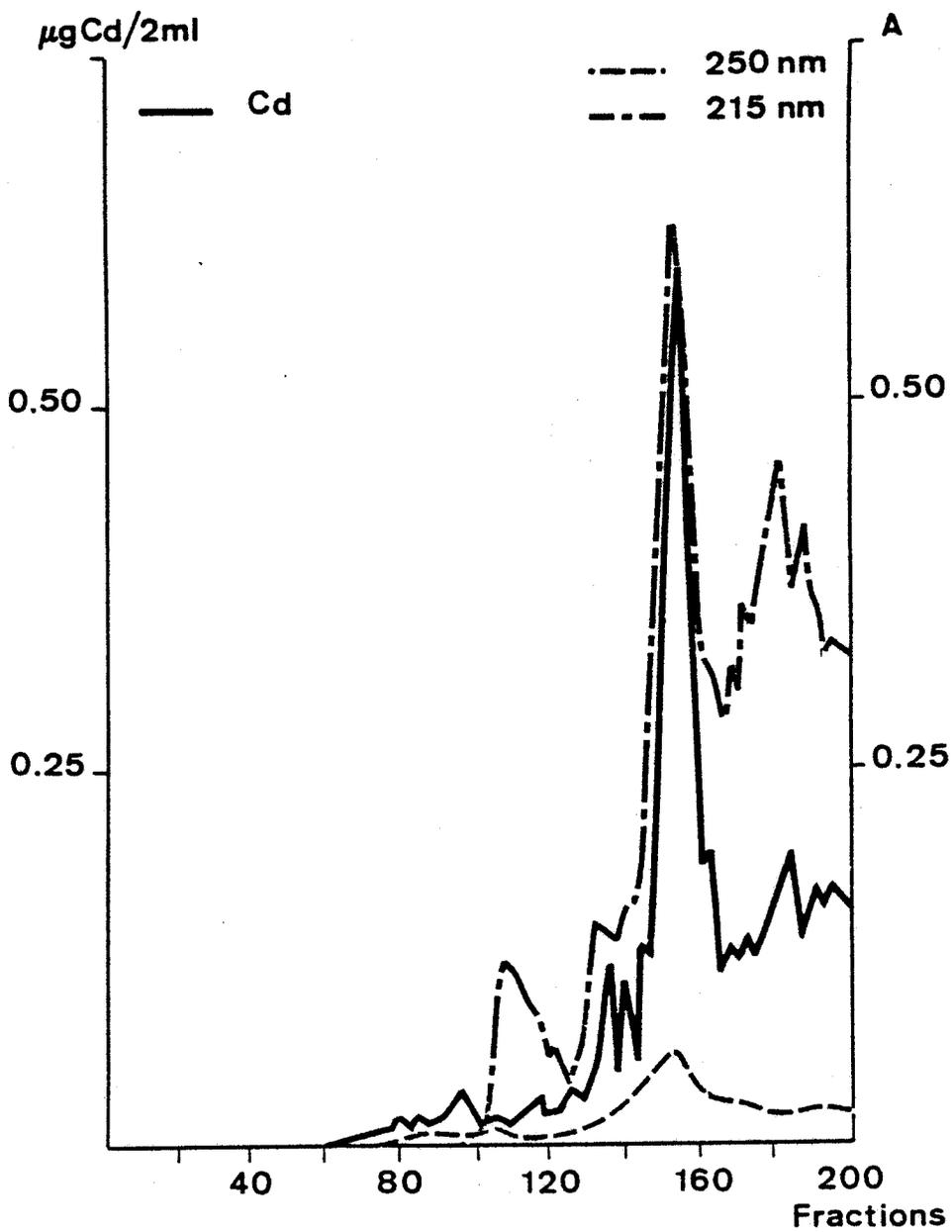
Fig-12



MW x 10⁻³

Figure 13 - Etude par chromatographie d'échange d'ions (sur DEAE-cellulose, volume des fractions : 2 ml) de la fraction fixant le cadmium (pic II) obtenue par gel filtration sur Séphadex G 75. Eluant : Tris/HCl 15 mM, pH 8,5 avec 0-0,5 M NaCl ; débit 10 ml/h.

Fig.13



Le résultat de cette analyse est illustré par la figure 12. Cette électrophorèse a montré que la protéine fixant le cadmium est représentée par une seule bande migrant vers une zone de poids moléculaire ≈ 10 kD. Alors, après extraction tissulaire et 2 chromatographies successives dont la première permet une séparation selon le poids moléculaire et la deuxième assure une séparation selon la charge des substances, nous avons pu obtenir un produit à l'état pur.

Après purification de cette protéine complexant le cadmium, nous avons pensé à la caractériser pour savoir s'il s'agissait d'une métallothionéine ou d'une autre protéine ayant la faculté de lier les métaux lourds.

I.2. Caractérisation

Avant toute analyse, l'échantillon purifié a été concentré et dessalé par une dialyse dans de l'eau pure à 4°C pendant 36 heures en changeant l'eau toutes les 12 heures. Avec cette dialyse, il peut très bien y avoir un risque de contamination de l'échantillon par des substances étrangères, surtout les sucres. Afin d'éliminer tout contaminant, quelle que soit sa nature, nous avons procédé à une filtration de l'échantillon sur une colonne de Sephadex G 25. En effet, nous avons noté la présence d'un pic protéique homogène sortant dans un volume d'éluion d'exclusion et un second pic plus retardé correspondant aux sels (Fig. 14). L'échantillon ainsi dessalé a été lyophilisé et soumis à différentes analyses.

I.2.1. Détermination du poids moléculaire de la molécule native

Le lyophilisat de la molécule purifiée a été repris dans 1 ml du tampon Tris/HCl 20 mM, pH 7,4. 200 μ l de cette solution ont été analysés en FPLC sur une colonne de Supérose 12 préalablement calibrée par des substances témoins de poids moléculaires connus. Les conditions de cette analyse ont été décrites dans le chapitre I. La figure 15 montre le résultat de cette analyse. La métalloprotéine est éluée dans un volume d'éluion correspondant à un poids moléculaire compris entre celui de la β -lactoglobuline (36,8 kD) et le cytochrome C (12,4 kD). Après un calcul plus précis à partir des logarithmes des poids moléculaires des substances standards, il s'est révélé que la molécule native fixant le cadmium

Fig.14

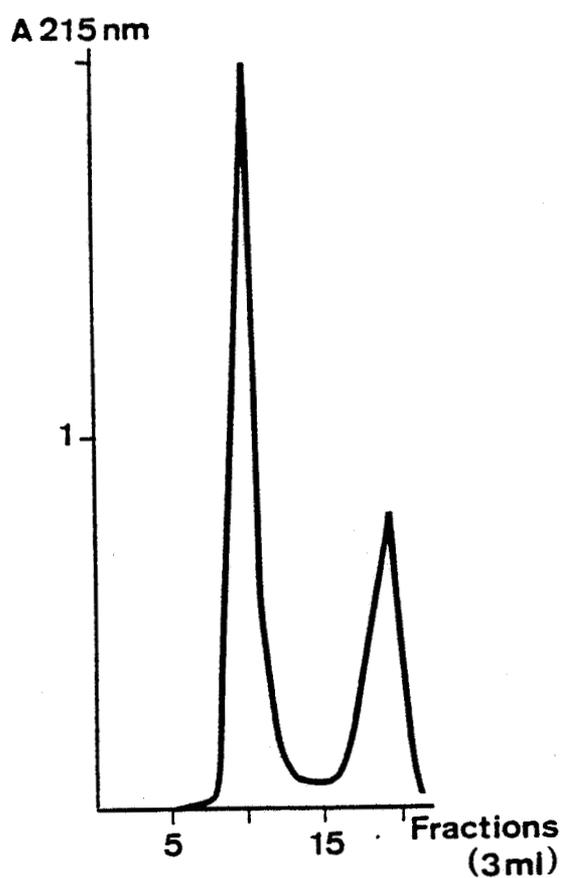


Figure 14 - Dessalage de la fraction MP II par filtration sur une colonne de Séphadex G 25 (100xl cm). Eluant : Tris/HCl 15 mM, pH 8,5 ; débit 10 ml/h.



Fig.15

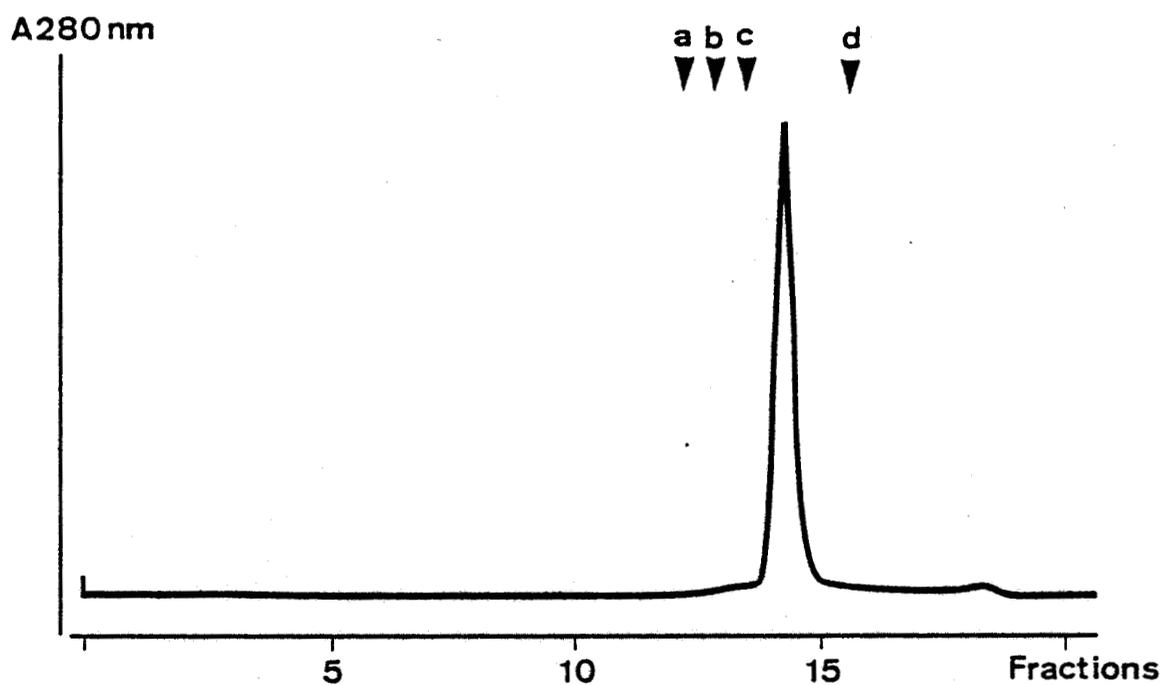


Figure 15 - Etude par gel filtration en FPLC sur une colonne de Supérose 12 (30x1 cm ; Pharmacia) de la MP II purifiée par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-cellulose (cf fig. 13) et dessalée par gel filtration sur Sephadex G 25. Poids moléculaires des substances standards : a, sérum albumine (67 kD); b, ovalbumine (43 kD) ; c, β -lactoglobuline (36,8 kD) ; d, cytochrome C (12,4 kD).

possède un poids moléculaire très voisin de 20 kD. Cette valeur est proche de celle estimée à partir de la gel filtration en basse pression sur Sephadex G 75. En plus de la détermination du poids moléculaire, cette méthode analytique a confirmé l'homogénéité du produit en montrant lors de l'élution un seul pic bien symétrique (Fig. 15).

I.2.2. Spectre d'absorption en ultraviolet

Le spectre d'absorption dans l'ultraviolet a été réalisé pour la fraction purifiée de la protéine fixant le cadmium. Ce spectre ne présente pas les mêmes caractéristiques que les métallothionéines. La métalloprotéine isolée présente une absorbance négligeable à 250 nm (longueur d'onde où peut absorber la liaison Cd-S). Par contre, elle a montré une légère absorbance à 280 nm (longueur d'onde où absorbent les acides aminés aromatiques). Ce spectre montre un léger épaulement à 230 nm (Fig. 16a). L'absorbance à 280 nm et la non-absorbance à 250 nm sont liées à la nature de la composition de la molécule en acides aminés. Pour cela nous avons réalisé l'analyse des acides aminés qui est une étape ultime dans l'identification et la caractérisation de telles protéines.

I.2.3. Analyse des acides aminés

L'analyse de la composition de la métalloprotéine en acides aminés a été effectuée sur un échantillon purifié, dialysé et bien dessalé. Les résultats de cette analyse sont regroupés dans le tableau 7. La protéine complexant le cadmium présente une composition en acides aminés très différente de celle des métallothionéines définie par Margoshes et Vallée(1957), Bouquegneau et Noël-Lambot (1978), Kägi et Nordberg (1979). En effet, les résultats de cette analyse montrent que cette métalloprotéine présente un taux assez élevé en acides aminés aromatiques et en histidine (respectivement : 10 % et 3,3 %), une très faible quantité de cystéine (0,9 %), 13 % d'acide aspartique et d'acide glutamique et approximativement 10 % de glycine, alanine et lysine (voir tableau 7).

I.2.4. Détermination du contenu métallique

Le contenu en cadmium de cette métalloprotéine a été déterminé en dosant le cadmium dans une fraction de protéine purifiée et dont la quantité est connue soit par dosage des protéines selon la technique de Bradford (1976), soit par pesée quand le

Tableau 7 - Comparaison de la composition en acides aminés (exprimée en mole pour 100 moles d'acides aminés) de la MP II de Nereis diversicolor et d'autres protéines de faible contenu en cystéine et de faible poids moléculaire (5 kD - 20 kD) : poids moléculaire apparent basé sur l'analyse des acides aminés.

	Annélide <u>Nereis</u> <u>diversicolor</u> (1)	Mollusque <u>Buccinum</u> <u>tenuissimum</u> (2)		Mollusque <u>Crassostrea</u> <u>virginica</u> (3)	Insecte <u>Locusta</u> <u>migratoria</u> (4)
		F	II A	F	II B
PM (apparent)	10 kD	8 kD	13 kD	10 kD	5 kD
Protéine (% W/W)	≈ 99,98	79,5	91,3		78,7
Analyse d'acides aminés					
Acide aspartique	13,3	9,9	9,4	12,9	10,9
Thréonine	2,8	9,0	11,8	5,8	9,0
Sérine	6,8	7,5	7,3	7,3	9,0
Acide glutamique	12,9	7,7	6,5	9,7	12,9
Proline	3,5	5,7	4,4	4,4	11,0
Glycine	8,5	8,3	9,0	9,5	10,9
Alanine	9,8	8,1	8,0	6,6	11,0
Cystéine	0,9	4,9	4,0	7,6	2,1
Valine	5,3	6,0	6,3	6,1	4,3
Méthionine	1,1	1,4	1,3	1,5	-
Isoleucine	4,3	4,4	4,4	3,9	2,2
Leucine	6,9	5,9	5,4	4,5	4,1
Thyrosine	3,5	1,6	3,6	2,6	-
Phénylalanine	6,6	3,6	5,0	3,5	2,1
Histidine	3,3	2,3	1,0	8,9	2,2
Lysine	9,2	6,1	6,4	1,2	6,3
Arginine	1,1	2,5	3,0	2,9	2,0
Tryptophane	ND	5,6	3,2	ND	-
Cadmium (%)	≈ 1,6	0,6	1,0	ND	1,0

(1) Ce travail.

(2) Dohi et al. (1983) (in Stone et Overnell, 1985).

(3) Ridlington et Fowler (1979).

(4) Martoja et al. (1983).

ND : non déterminé.



produit est sous forme lyophilisée. Ainsi, nous avons pu déterminer que le métal forme 1,6 % de la molécule. Ceci est très faible par rapport à ce qui a été observé pour les métallothionéines (Tableau 7).

I.2.5. Analyse des hydrates de carbone

Afin d'éviter toute contamination de l'échantillon purifié, celui-ci a été soumis à une dialyse suivie d'une gel filtration sur Séphadex G 25 avant d'aborder l'analyse des sucres. Pour cette dernière, nous avons précisé antérieurement les différents traitements de l'échantillon avant toute procédure analytique. Après les deux chromatographies en phase gazeuse, la première sur colonne remplie et l'autre sur colonne capillaire, nous avons détecté la présence d'un taux très faible en sucres au niveau de cette métalloprotéine. La première analyse a donné 2,36 % et la deuxième a montré un taux plus faible (1,05 %) sur un échantillon plus propre. Cette chromatographie en phase gazeuse qui est une technique sensible a révélé la présence des mêmes sucres dans les deux cas malgré la différence des taux décelés. Les sucres détectés appartiennent aux groupes des pentoses et des hexoses. Les pentoses sont représentés par le xylose, les méthylpentoses par le rhamnose et le fucose et les hexoses par le mannose et le glucose. Dans cette analyse, nous avons détecté un taux négligeable de N-acétyl-glucosamine.

Comme la quantité des sucres détectés est très faible ainsi que celle de l'osamine, nous avons utilisé une technique plus sensible, elle consiste en une analyse en spectrophotométrie de masse. Les échantillons qui ont servi à l'analyse en chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire ont été passés en spectrophotométrie de masse. Le résultat de cette analyse a confirmé la quantité et la nature des sucres décelés par la chromatographie en phase gazeuse mais il a démontré l'absence totale des osamines. Ce résultat est en accord avec celui qui a été constaté lors de l'analyse des acides aminés.

I.2.6. Détermination du pH isoélectrique

Une fraction aliquote de la fraction protéique du produit purifié a été analysée en électrofocalisation. Sur le même gel, nous avons analysé conjointement des substances de pH isoélectrique connu (voir chapitre I). Le résultat de cette analyse, illustré par la figure 16b, montre que la MP II est présentée par 2 bandes dont la plus basique (≈ 6) est moins intense que la bande

Figure 16a - Spectre d'absorption en ultraviolet de la MP II de Néréis après chromatographie sur DEAE-cellulose (cf fig. 13) et gel filtration sur Séphadex G 25.

Figure 16b - Détermination du point isoélectrique (pHi) de la MP II par électrofocalisation en gel d'acrylamide à 5 % contenant 3 % d'ampholine. A : analyse de la fraction MP II. Les pHi des substances standards sont indiqués sur la gauche.

Fig-16a

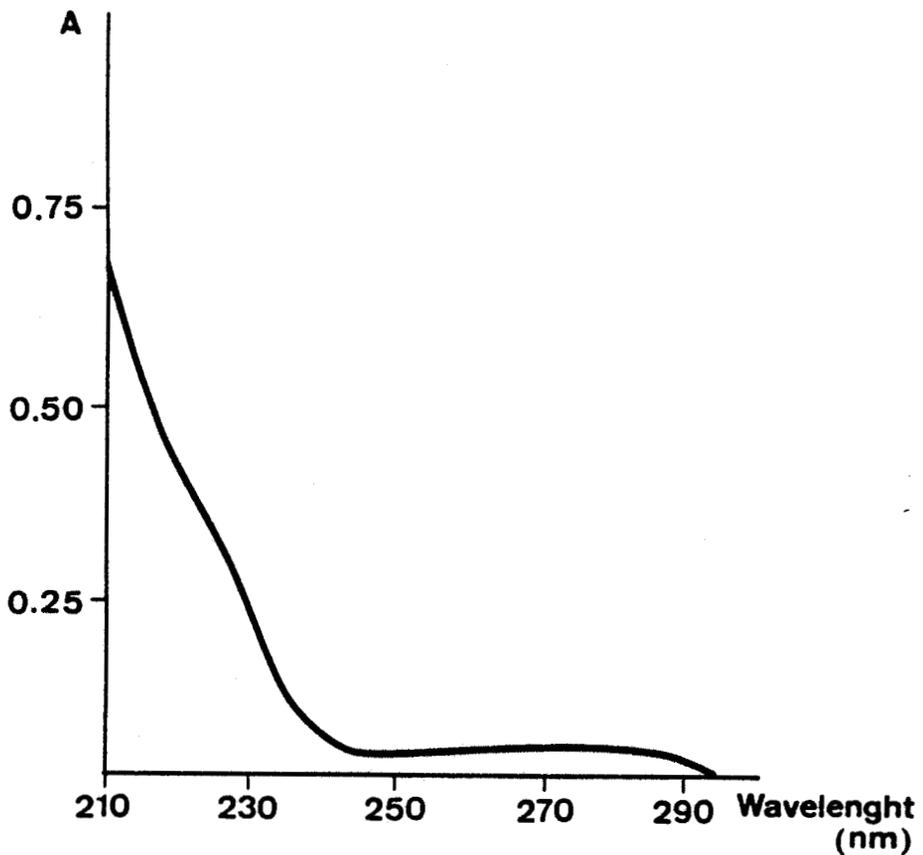
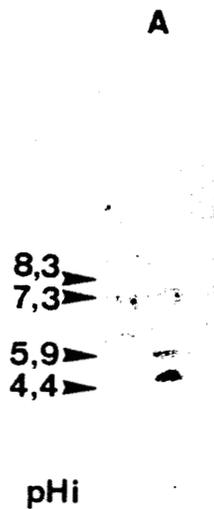


Fig-16b



acide ($\approx 4,5$). Ce résultat montre d'abord que la MP II possède un pH acide et qu'elle pourrait exister sous deux formes ayant un poids moléculaire identique et possédant une même composition en acides aminés mais différant par leur charge. Cette différence de charge pourrait éventuellement être liée à une différence de contenu de cadmium.

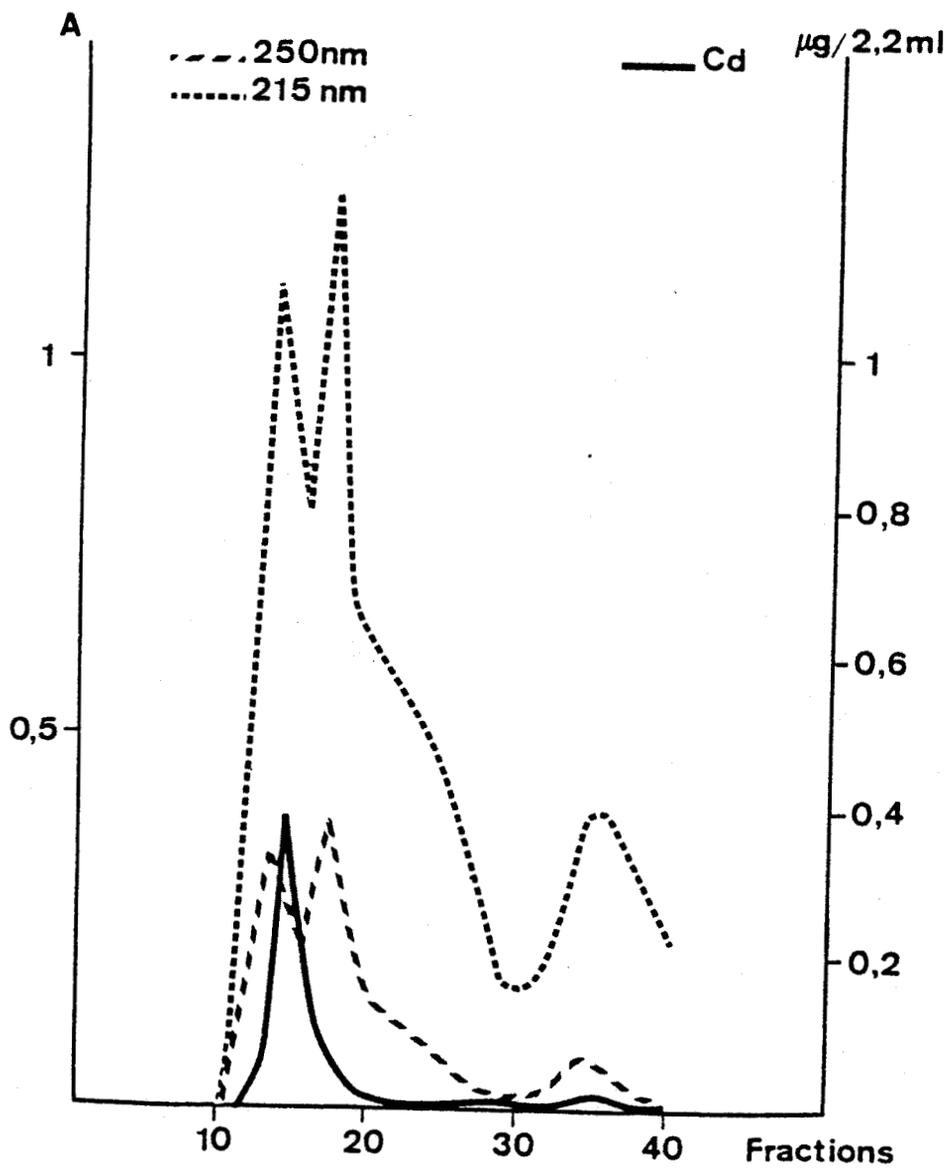
II - PROTEINES COMPOSANT LE PIC I

Comme le montre la figure 7, à l'issue de la chromatographie de gel filtration (Sephadex G 75), nous avons noté la présence d'un pic important de cadmium coïncidant avec le pic protéique correspondant aux protéines de haut poids moléculaires (supérieur à 70 kD). Pour avoir une idée sur le poids moléculaire de cette ou de ces grosses molécules, nous avons concentré le pic I et nous l'avons analysé par une autre gel filtration en utilisant de l'ultrogel (ACA 34) qui peut séparer correctement entre 350 et 20 kD (voir chapitre I). Le résultat de cette analyse chromatographique, comme l'indique la figure 16c, montre que le pic I a été sous-fractionné en 3 autres pics dont le premier seul contient le cadmium. Etant donné le volume d'élution de ce premier pic, nous pouvons déduire qu'il s'agit d'une protéine de très haut poids moléculaire ayant la capacité de fixer le cadmium également.

Cette première approche étant faite, il faut néanmoins continuer à purifier ce produit en utilisant d'autres techniques de séparation qui peuvent se baser, outre la différence de taille, sur la charge du produit (chromatographie échangeuse d'ions) pour pouvoir le caractériser.

Figure 16c - Sous-fractionnement du pic I (cf fig. 6A) obtenu par chromatographie sur Séphadex G 75, sur colonne d'ultrogel ACA 34 (120x1,1 cm). Eluant : Tris/HCl 15 mM, pH 8,5 ; débit 4 ml/h.

Fig.16c



DISCUSSION

Les résultats apportés par cette étude confirment ceux obtenus précédemment chez la même espèce (Nereis diversicolor) par Dennaï et al. (1986), Nejmeddine et al. (1987).

Les analyses électrophorétiques et celles d'acides aminés montrent que le produit purifié possède un poids moléculaire très proche de 10 kD. Or, la détermination du poids moléculaire de la protéine native sur une gel filtration en FPLC a montré que celle-ci sort dans un volume d'éluion correspondant à un poids moléculaire très voisin de 20 kD. Ceci nous permet de suggérer que cette molécule est de forme dimérique et que les deux monomères sont très probablement identiques. De plus, cette présente étude a pu établir définitivement que la molécule n'est pas une métallothionéine. En effet, le spectre d'absorption en ultraviolet a révélé une absorbance très négligeable à 250 nm et par contre, une légère absorbance à 280 nm. Ce résultat est à rapprocher de celui de l'analyse d'acides aminés qui a montré un taux très faible en cystéine (0,9 %) (origine d'une non-absorbance à 250 nm) et une présence non négligeable d'acides aminés aromatiques responsables de la légère absorbance observée à 280 nm.

D'un autre côté, les résultats de l'analyse des hydrates de carbone qui ont révélé un taux très faible en sucres totaux nous permettent de conclure que cette métalloprotéine n'est pas une glycoprotéine. Néanmoins, il convient de noter ici que les sucres détectés comme le rhamnose et le xylose qui sont rarement présents chez les animaux, ont été déjà signalés chez Nereis diversicolor par Porchet (1974).

De plus, les analyses effectuées par spectrophotométrie d'absorption atomique de flamme ont montré que, contrairement aux métallothionéines, le taux du cadmium lié à cette métalloprotéine MP II après les procédures d'isolement est faible.

Finalement, le traitement des surnageants obtenus à partir d'animaux non intoxiqués (témoins) a révélé que la MP II de la Néréis a la capacité de fixer également d'autres métaux lourds comme le zinc et le cuivre et qu'elle existe au niveau des vers récoltés dans l'environnement naturel. Ces résultats pourraient, au moins en partie, expliquer la relativement faible bioaccumulation du cadmium

dans des vers contaminés. L'effet inhibiteur du zinc sur l'accumulation du cadmium a en effet été expérimentalement montré dans les Polychètes N. diversicolor (Bryan et Hummerstone, 1974) et N. virens (Ray et al., 1979).

Les résultats de cette étude peuvent être comparés avec ceux obtenus chez d'autres espèces spécialement chez les Invertébrés. Une fraction protéique, liant le cadmium, le zinc et le cuivre, décrite sous 2 ou 3 isoformes sur DEAE-Sephadex et ayant un poids moléculaire apparent d'environ 9 kD (déterminé par SEC-HPLC) a été trouvée chez une Annélide Polychète, Neanthes arenaccodentata (Jenkins et Sanders, 1986). Young et Roesijadi (1983) ont montré l'existence d'une protéine fixant le cuivre et ayant un poids moléculaire proche de 5 kD chez un Polychète, Eudistylia vancouveri. Malheureusement, pour ces deux espèces, l'analyse de la composition d'acides aminés n'a pas été donnée. D'un autre côté, des protéines et des glycoprotéines ayant la faculté de lier les métaux lourds et en particulier le cadmium, mais différentes des métallothionéines, ont été découvertes chez plusieurs espèces animales et végétales (pour revue, voir Stone et Overnell, 1985). Parmi les métalloprotéines trouvées chez les Invertébrés, plusieurs ont, en commun avec la MP II de la Néréis, un poids moléculaire apparent qui est relativement faible (5 kD-20 kD), ce qui rappelle également le poids moléculaire des métallothionéines (6 kD-12 kD). Les principales propriétés de ces molécules sont résumées dans le tableau 7. Comme il a pu être montré, les molécules ont un taux, souvent très faible de cystéine et, par contre, un taux souvent considérable d'acides aminés aromatiques et d'histidine. Ces molécules, après les procédures de purification, présentent un contenu en métal très faible par rapport aux métallothionéines. Ce fait pourrait être lié à la grande différence qui existe entre les taux de cystéine qui sont responsables de la liaison du cadmium. Des taux d'hydrates de carbone, plus ou moins considérables, ont été décrits dans des fractions complexant le cadmium. Comme il a été discuté antérieurement, la présence de ces sucres pourrait être liée, au moins partiellement, à une incomplète purification.

En plus, à l'aide de la technique d'électrofocalisation, nous avons pu démontrer que la MP II possède un pH acide (Fig. 16b) et qu'elle existe probablement sous 2 isoformes à concentrations différentes puisque les 2 bandes ne sont pas de la même intensité. D'autres travaux ultérieurs devraient nous permettre de bien séparer

ces 2 isoformes. Le produit purifié par chromatographie d'échange d'ions à basse pression a été réanalysé en FPLC par la même méthode. Le résultat obtenu montrant la séparation de deux fractions (une retardée et l'autre retenue), semble confirmer celui obtenu par électrofocalisation. Un polymorphisme de cette protéine est envisageable puisqu'il a été bien démontré chez d'autres espèces. En effet, par des techniques de séparation basées sur les différences de charges électriques des molécules, on a pu établir qu'au sein d'un même organe, il pouvait exister 2 ou 3 formes de métallothionéines (Suzuki et al., 1983 ; Noël-Lambot, 1980 ; Nordberg et al., 1978). Ces composés possèdent le même poids moléculaire et diffèrent très peu par la composition en acides aminés (Richards et al., 1977) mais peuvent varier par la nature des métaux liés (Pulido et al., 1966b). Jenkins et Sanders (1986) ont montré également l'existence d'une fraction fixant le cadmium, le zinc et le cuivre décrite sous 2 ou 3 isoformes chez une Annélide Polychète, Neanthes arenaccodentata.

Pour conclure, N. diversicolor, comme d'autres Invertébrés tels qu'une Annélide Oligochète (Eisenia fetida) (Yamamura et al., 1981), un certain nombre de Mollusques, de Crustacés et d'Insectes (pour revue, voir Stone et Overnell, 1985 et Stone et al., 1986), ne possède pas de métallothionéines ayant les caractéristiques définies par Kägi et Nordberg (1980). Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Noël-Lambot (1980) qui n'a pas trouvé de métallothionéines dans un autre Polychète (Arenicola marina) récolté dans un milieu pollué.

Chapitre V

**LOCALISATION DE LA MP II A L'AIDE
D'ANTICORPS POLY- ET MONOCLONAUX.
RECHERCHE DES MECANISMES D'ACTION**

LOCALISATION DE LA MP II A L'AIDE D'ANTICORPS POLY- ET MONOCLONAUX
RECHERCHE DES MECANISMES D'ACTION

Il est maintenant bien établi que la protéine appelée métal-
loprotéine II (MP II) parce qu'elle apparait au niveau du deuxième
pic majeur dans les profils d'élution sur Séphadex G 75, ne possède
pas les caractéristiques d'une métallothionéine définies par Kojima
et Kägi (1978).

La protéine étant purifiée et caractérisée, il nous a paru
intéressant d'en rechercher la localisation exacte par voie immuno-
cytochimique. Une confirmation des résultats obtenus a été recher-
chée ultérieurement par électrophorèse et immunoprécipitation.

A - LOCALISATION DE LA MP II

I - Détection de la MP II par des anticorps polyclonaux

I.1. Anticorps polyclonal de lapin anti MP-II

I.1.1. Fabrication

Après purification de la métaloprotéine,
nous avons fabriqué un anticorps polyclonal dirigé contre cette pro-
téine en immunisant un lapin selon la méthode de Vaitukaitis et al.
(1971). Le sérum prélevé du lapin a été testé par immunodiffusion
selon la méthode d'Ouchterlony (1949) pour vérifier si le lapin a
bien réagi contre la MP II. En effet, le résultat illustré par la
figure 17 montre qu'il y a eu une réaction positive entre l'anti-
corps et l'antigène purifié. Cette réaction se traduit par la forma-
tion de 2 arcs de précipitation. La présence de 2 arcs pourrait être
liée aux 2 isoformes de la MP II qui se trouvent probablement en
différentes concentrations dans le milieu (voir chapitre précédent).

I.1.2. Immunocytochimie

Possédant un anticorps dirigé contre cette

Figure 17 - Mise en évidence de la présence d'anticorps anti MP II dans le sérum de lapin immunisé par une solution d'antigène purifié (MP II). Immunodiffusion du sérum (puits e) contre la MP II purifiée (puits a, b) et la fraction pic II (puits c, d).

Figure 18 - Diagramme électrophorétique obtenu, en gel de polyacrylamide-SDS à partir d'homogénats de coelomocytes (A) et de la fraction soluble d'animaux entiers (B). Sur A, une bande protéique a migré au même niveau que la MP II visible sur B. Les poids moléculaires des standards sont indiqués sur le côté gauche de la figure.

Figure 19 - Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS. A : poids moléculaires de substances standards ; B : homogénat d'une population purifiée de granulocytes ; C : protéines des granulocytes immunoprécipitées par l'anticorps anti MP II ; D : sérum seul (témoin).

Fig-17

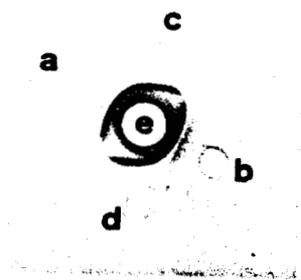
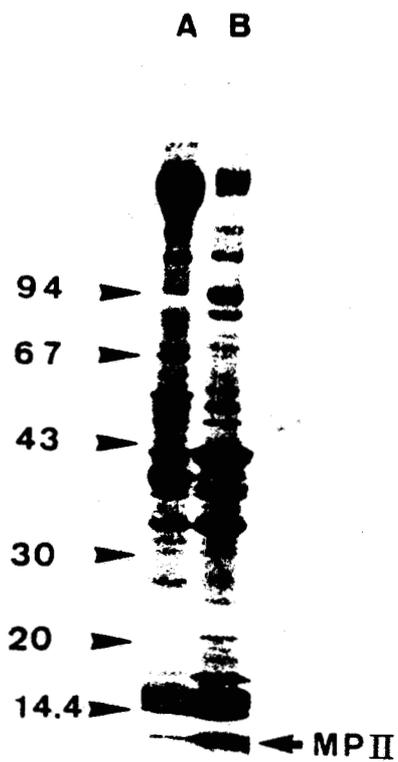


Fig-18



PM x 10⁻³

Fig-19



PM x 10⁻³



protéine, nous nous sommes proposé de rechercher sa localisation au niveau des différents tissus de la Néréis par des techniques immunocytochimiques en microscopie photonique sur coupes à la paraffine et en microscopie électronique.

I.1.2.1. Microscopie photonique

Des travaux antérieurs (Baskin, 1974 ; Dhainaut, 1984) ont montré que certaines cellules libres dans le liquide coelomique de la Néréis (les coelomocytes) peuvent être classées en deux grandes catégories : les éléocytes et les granulocytes. Ces derniers peuvent à leur tour, en fonction de leur morphologie et de leur structure fine, être divisés en 3 types : les granulocytes I, II et III.

La réaction immunocytochimique réalisée selon le protocole décrit dans le chapitre I à l'aide de l'anticorps polyclonal anti-MP II montre clairement que certains granulocytes sont immunoréactifs. L'aspect des cellules ayant réagi semble indiquer qu'il s'agit de granulocytes I (Pl. VI, fig. a).

I.1.2.2. Microscopie électronique

Les résultats obtenus en microscopie photonique sont confirmés par l'observation au microscope électronique de coupes traitées par l'anticorps anti-MP II. La révélation à l'or colloïdal précise très finement l'immunoréaction au niveau des granules des granulocytes I (Pl. VI, figs c et d).

I.1.3. Electrophorèse

Les résultats apportés par la technique d'immunocytochimie ont été contrôlés dans un premier temps par la technique d'électrophorèse.

Etant donné que les réactions immunologiques (Ag-Ac) ont été repérées au niveau des coelomocytes en général (en microscopie photonique, Pl. VI, fig. a) et plus précisément au niveau d'une catégorie cellulaire de ces coelomocytes, les granulocytes I (en microscopie électronique, Pl VI, figs c, d) nous avons procédé dans un premier temps à l'isolement des coelomocytes et à l'analyse de leurs protéines constitutives par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS. Dans un deuxième temps, nous avons amélioré la séparation cellulaire par l'isolement de la catégorie de granulo-

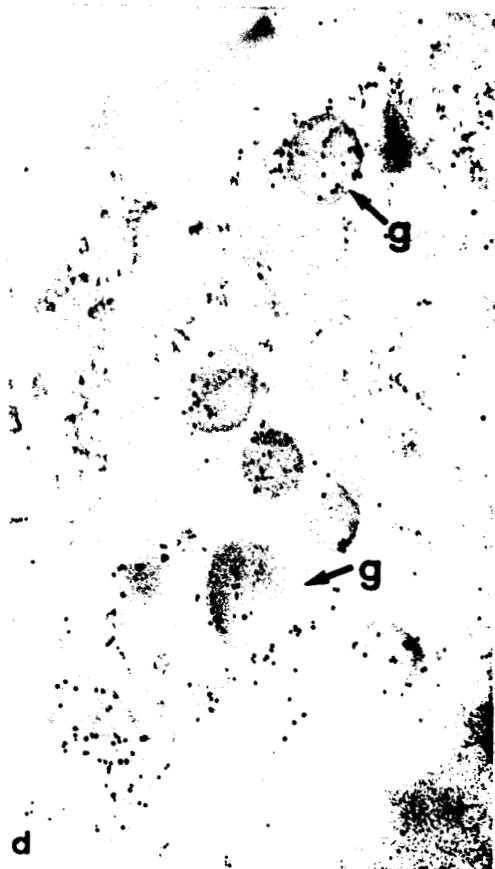
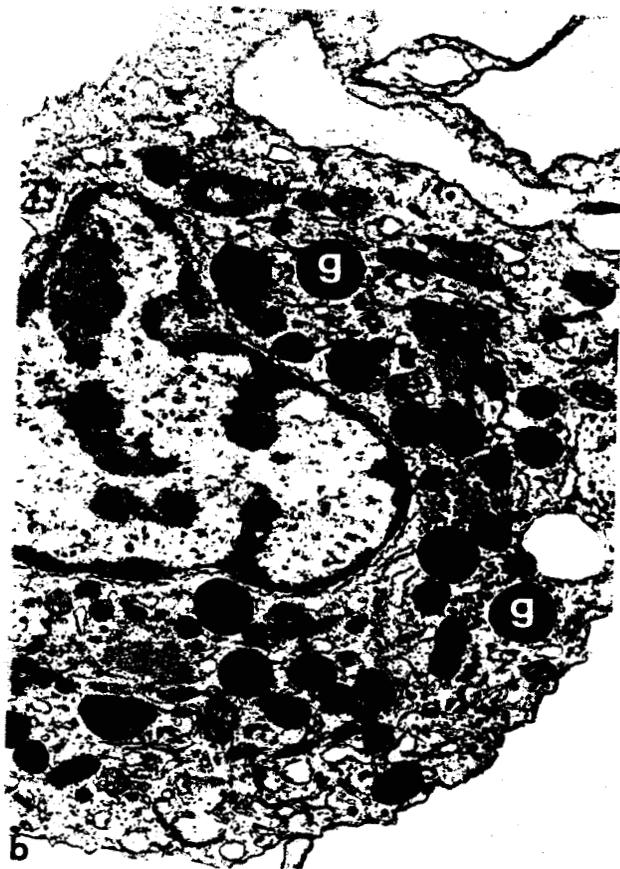
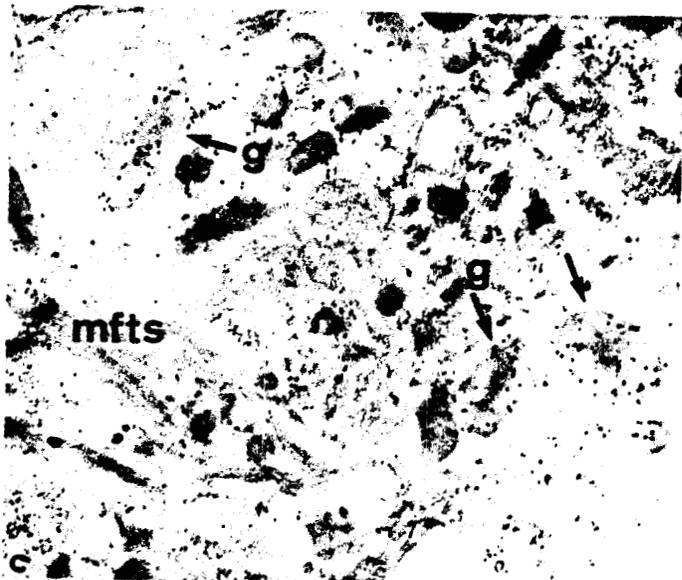
PLANCHE VI

Localisation immunocytochimique de la MP II à l'aide de l'anticorps polyclonal de lapin anti-MP II.

Figure a - Microscopie photonique. Coupe au niveau du coelome de N. diversicolor traitée par l'Ac anti-MP II. Parmi les coelomocytes, seuls les granulocytes (flèches) présentent une réaction positive. El, éléocytes ; V, vaisseau sanguin. X 440.

Figure b - Ultrastructure d'un granulocyte I caractérisé par la présence de granules (g) et de microfilaments (mfts). X 18.000.

Figures c, d - Réaction immunocytochimique obtenue à l'aide de l'Ac anti-MP II au niveau d'un granulocyte I. Remarquer les particules d'or colloïdal sur les granules (g). mfts, microfilaments. Fig. c : X 38.000 ; Fig. d, X 58.000.



cytes et étudié comme précédemment leur contenu protéique. Les différentes phases de séparation cellulaire et de traitement pour l'analyse électrophorétique ont été décrites dans le chapitre I. Les figures 18 et 19 montrent le résultat de ces analyses électrophorétiques. Dans les deux cas, aussi bien pour les coelomocytes dans leur ensemble que pour les granulocytes isolés, nous avons noté la présence d'une bande protéique qui migre dans une zone qui correspond aussi au poids moléculaire de la MP II (≈ 10 kD). Le résultat obtenu par voie électrophorétique semble confirmer le précédent réalisé par voie immunocytochimique. Néanmoins, il reste possible que les deux bandes visualisées correspondent à 2 protéines totalement différentes mais qui possèdent un poids moléculaire apparent très voisin. Afin de tester cette hypothèse, nous avons envisagé un autre moyen de contrôle plus précis puisqu'il s'agit d'une reconnaissance immunologique par la technique d'immunoprécipitation.

I.1.4. Immunoprécipitation

Pour cette expérience nous avons utilisé les coelomocytes et les granulocytes préparés de la même façon que précédemment. Une fraction aliquote de chaque broyat a été ajoutée au complexe anticorps-protéine A Sépharose préalablement formé. Après 4 heures d'incubation sous agitation (voir chapitre I), les 2 immunoprécipités ont été analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS. Le résultat obtenu et illustré par la figure 19 montre que dans le cas des 2 immunoprécipités, nous retrouvons une bande qui comigre avec la MP II. Ainsi, comme le montre cette figure, nous avons réussi à démontrer que les granulocytes possèdent au moins un site de stockage de la MP II si ce n'est un site de synthèse.

I.2. Anticorps polyclonal de souris anti-coelomocytes

I.2.1. Fabrication

Des cellules coelomiques (coelomocytes) ont été isolées, lavées plusieurs fois et ont été injectées à 3 souris. Après les 2 rappels d'immunisation nous avons prélevé le sérum des 3 souris et nous l'avons testé par immunocytochimie sur des coelomocytes. Ce test a montré que les 3 souris ont bien répondu à cette immunisation.

I.2.2. Détection de la MP II après transfert électrophorétique sur nitrocellulose

Les résultats de l'immunocytochimie, d'électrophorèse et ceux de l'immunoprécipitation qui ont montré la présence de la métalloprotéine au niveau des coelomocytes, nous ont conduit à tester l'immunsérum obtenu à partir de 3 souris qui ont été immunisées par un extrait de coelomocytes. Nous avons préféré réaliser ce test par la technique sensible d'immunodétection des protéines transférées sur une feuille de nitrocellulose après leur analyse en électrophorèse. Pour ce test un broyat de coelomocytes ainsi qu'une fraction aliquote de la métalloprotéine purifiée ont été analysés en gel de polyacrylamide-SDS et transférés sur une feuille de nitrocellulose. Après les différents traitements (voir chapitre I) réalisés pour ce transfert, nous avons découpé la feuille de nitrocellulose en 4 languettes contenant chacune les 2 pistes des 2 échantillons. Une portion a servi pour la coloration par du noir amidon pour vérifier l'efficacité du transfert, tandis que les 3 autres portions ont été utilisées pour effectuer la révélation par les 3 sérums des 3 souris (S_1 , S_2 , S_3). La figure 20 montre qu'il y a bien une réaction positive au niveau des différentes bandes protéiques du broyat des coelomocytes parmi lesquelles il faut constater une légère bande qui migre dans la même zone que la MP II (piste B). Mais ce qui est très important à noter c'est l'immunoréaction de la MP II purifiée vis-à-vis des 3 sérums anti-coelomocytes, avec une intensité plus grande pour celui obtenu à partir de la souris S_1 . Ainsi, nous avons montré à la fois que les 3 souris ont produit des anticorps dirigés contre plusieurs produits protéiques issus des coelomocytes (ce qui servira pour d'autres études ultérieures de ces cellules qui jouent un rôle important dans le métabolisme de l'animal) et que la métalloprotéine est bien localisée au niveau de ces cellules puisqu'elle a été reconnue par cet anticorps anti-coelomocytes. Ceci confirme le résultat précédent.

Figure 20 - Immunodétection de la MP II et des protéines de coelomocytes (B) qui ont été analysés d'abord par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (Av : avant transfert) puis transférées sur une feuille de nitrocellulose (Ap : après transfert) par un anticorps anti-coelomocytes de souris (S₁, S₂, S₃ : immatriculation des souris immunisées). Les poids moléculaires des substances standards sont indiqués sur la piste A.

Figure 21 - Analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide-SDS de l'extrait soluble de Néréis (A) avant le transfert sur la nitrocellulose (Av). Après transfert (Ap) 13 surnageants de culture d'hybridomes (1, 2... 13) ont été testés pour contrôler leur spécificité vis-à-vis de la MP II. Les poids moléculaires des substances standards sont indiqués sur la gauche de la figure.

Fig.20

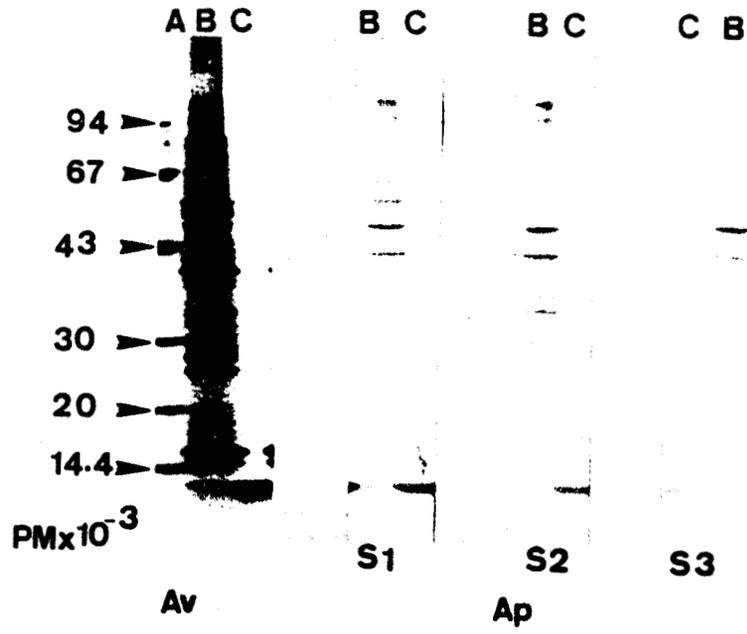
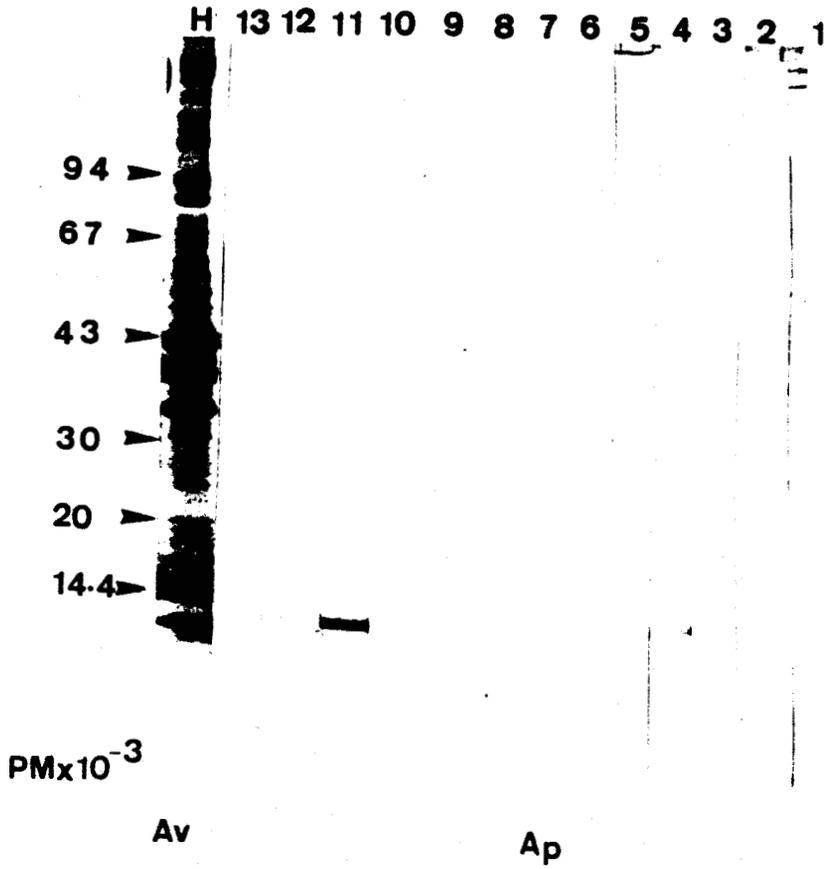


Fig.21



II - Localisation de la MP II à l'aide des anticorps monoclonaux

II.1. Obtention d'un anticorps monoclonal anti-MP II

Compte tenu du résultat obtenu avec l'anticorps polyclonal anti-coelomocytes qui a reconnu la MP II, nous avons entrepris la fabrication d'un anticorps monoclonal anti-MP II à partir de la souris S₁ qui a montré une réaction immunologique plus importante que les autres (voir Fig. 20). A cette fin nous avons effectué une dernière injection stimulante à l'aide de 10 µg du produit purifié dans la veine latérale de la queue, 2 jours avant la fusion (voir chapitre I).

Après le contact des cellules spléniques de la souris immunisée avec les cellules myélomateuses SP₂O, les produits de cette fusion ont été répartis sur 960 puits pour effectuer leur culture. Les surnageants de culture ont été testés par le système ELISA en utilisant la MP II comme antigène de recouvrement. Nous avons ainsi obtenu 13 surnageants positifs sur 151 surnageants testés. Ces 13 surnageants de culture contenant des anticorps dirigés contre la métalloprotéine ont été soumis à un test d'immunodétection réalisé sur des protéines de l'homogénat total de la Néréis transférées sur une feuille de nitrocellulose ultérieurement à une séparation par électrophorèse. Ce test a eu pour but de contrôler la spécificité des anticorps contenus dans les différents surnageants de culture. La révélation par les 13 surnageants de culture a montré que quelques surnageants (comme le 4, le 11 et le 12) n'ont réagi pratiquement qu'avec la bande protéique correspondant à la MP II (Fig. 21). Parmi ces surnageants, nous avons retenu le 4, le 11 et le 12 à cause de leur réaction spécifique avec la MP II et nous avons ensuite effectué le clonage des cultures correspondant aux surnageants 4 et 11. Après le test des surnageants de culture obtenus à l'issue de ce premier clonage, nous avons noté, par l'utilisation du test ELISA, que tous les surnageants étaient positifs. Il est donc apparu qu'un seul clonage était suffisant pour la production d'un anticorps monoclonal.

Pour la suite de ce travail et l'exploitation de l'anticorps monoclonal, il faut signaler que nous avons utilisé uni-

quement le surnageant de culture 4 que nous avons appelé anticorps monoclonal MP II 4.

II.2. Immunocytochimie

Des coelomocytes qui sont composés, rappelons le, de 2 catégories cellulaires : éléocytes et granulocytes, eux-mêmes divisés en 3 types cellulaires (granulocytes I, II, III) (Dhainaut, 1984) ont été ponctionnés à partir de la cavité coelomique d'animaux non intoxiqués et ont été étalés sur des lames de verre (voir chapitre I). Après incubation des granulocytes qui ont la faculté de rester adhérents au support, avec l'anticorps monoclonal MP II 4 et la révélation de la réaction immunologique, nous avons constaté qu'il n'y a qu'un seul type de granulocytes (type I) qui a réagi positivement (Pl. VII, fig. a). Ces granulocytes I sont tous colorés sauf la partie correspondant au noyau. Les éléocytes et les autres types de granulocytes ne présentent aucune réaction positive. Sur la même planche, la figure b montre que les cellules qui ont réagi ont tendance à devenir moins denses au fur et à mesure que les substances immunoréactives diffusent au cours de l'étalement cellulaire.

Avec ce résultat apporté par l'anticorps monoclonal, nous avons pu préciser de façon plus significative la localisation de la MP II au niveau des granulocytes du type I et au niveau des substances émises lors du phénomène de dégranulation (Pl. VII, fig. c).

B - RECHERCHE DES MECANISMES D'ACTION DE LA MP II LORS DE L'ACTIVATION DES GRANULOCYTES

I - Activation in vitro

Il a été démontré que les granulocytes mis en contact avec des corps étrangers ou en incubation avec des agents toxiques (ionophore A 23187 (Sigma) ; lipopolysaccharide (Sigma)) libèrent le contenu de leurs granules dans le milieu de culture (M'Béri et al., inédit). Dans notre travail, nous avons cherché à déterminer si le cadmium pouvait avoir une action directe sur la dégranulation de ces cellules et plus exactement sur la libération de la MP II.

I.1. Electrophorèse

La figure 22 montre qu'une population de granulocy-

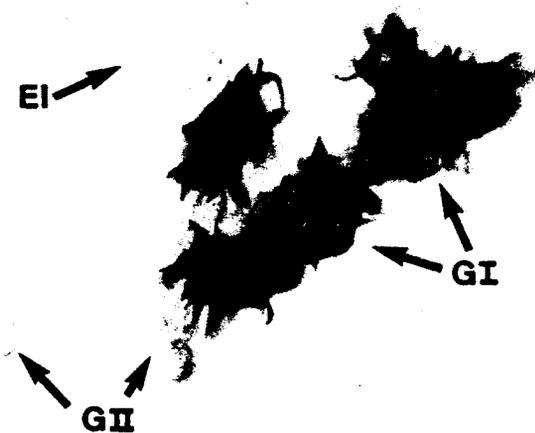
PLANCHE VII

Localisation immunocytochimique en microscopie photonique de la MP II à l'aide de l'anticorps monoclonal (MP II 4) anti-MP II.

Figure a - Parmi les différents types de coelomocytes, un seul type de granulocytes (GI) est immunoréactif. E1, éléocyte ; GII, granulocyte de type II.

Figure b - Immunoréaction pendant le processus d'étalement des granulocytes I (GI). S, sarcolyte.

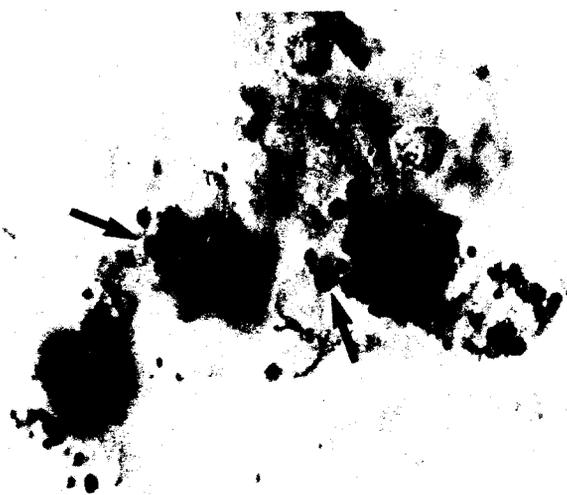
Figure c - Dégranulation d'une substance immunoréactive à partir des granulocytes I (flèches).



a



b



c

tes mise en culture dans un milieu contenant 55 ppm de cadmium a expulsé le contenu de ses granules cytoplasmiques dans le milieu de culture. Parmi les différents constituants du milieu de culture, détectés par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS, nous avons retrouvé une bande protéique correspondant à la métalloprotéine MP II. Toutefois, cette bande est moins importante que celle détectée lors de l'analyse d'un échantillon d'une population de granulocytes traités par l'ionophore-calcium (Fig. 23).

I.2. Immunoprécipitation

30 à 60 μ l du milieu de culture où nous avons incubé des granulocytes avec une solution de cadmium (55 ppm) ont été ajoutés à 5 mg de protéine A-Sépharose et 20 μ l de sérum de lapin. Les différentes étapes de cette expérience ont été signalées dans le chapitre I. L'immunoprécipité a été récupéré et analysé en électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS. Comme le montre la figure 22, une bande protéique qui comigre avec la MP II a été mise en évidence dans l'immunoprécipité, ce qui n'est pas visualisé dans la piste d'électrophorèse correspondant aux anticorps du sérum seul analysé antérieurement (Fig. 19). Ce résultat confirme que la bande protéique détectée précédemment lors de l'analyse électrophorétique de l'ensemble des protéines présentes dans le milieu de culture des granulocytes soumis à l'action du cadmium correspond effectivement à la métalloprotéine MP II.

Avec ces 2 résultats, nous avons pu démontrer à la fois l'action directe du cadmium sur l'activation des granulocytes en provoquant leur dégranulation et la libération de la MP II dans le milieu de culture.

II - Activation in vivo

II.1. Immunocytochimie

En collaboration avec E. Porchet-Henneré, nous avons injecté des billes de latex dans la cavité coelomique des Ne-reis diversicolor, puis nous avons effectué une ponction du liquide coelomique que nous avons déposé sur une lame de verre. Ce dépôt a été traité par l'anticorps monoclonal MP II 4. Après révélation, il est apparu qu'il y a une grande quantité de "gouttes" d'immunoprécipitation prouvant l'existence d'une grande dégranulation (Fig. 24).

II.2. Immunoprécipitation à partir du liquide coelomique et électrophorèse

Le liquide coelomique des animaux ayant reçu une injection de cadmium dans leur cavité coelomique a été prélevé, centrifugé et incubé avec l'anticorps polyclonal de lapin. L'immunoprécipité a montré une bande protéique comigrant avec la MP II après analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide-SDS (Fig. 25).

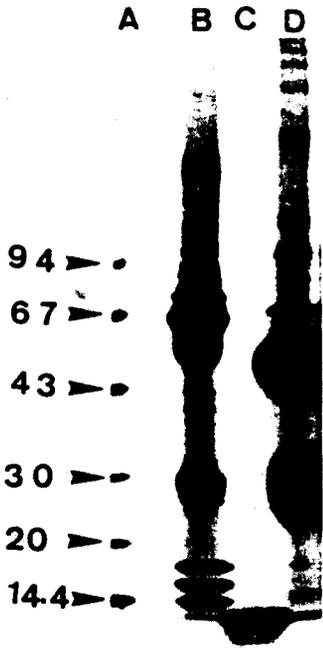
Figure 22 - Analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide-SDS. A : Poids moléculaire des substances standards ; B : Milieu de culture des granulocytes incubés en présence de 55 ppm de cadmium ; C : MP II purifiée ; D : Protéines du milieu de dégranulation immunoprécipitées par l'anticorps anti-MP II de lapin.

Figure 23 - Etude par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS du milieu de dégranulation provoquée par l'ionophore-calcium (A) et du milieu de dégranulation provoquée par le cadmium (B). Les poids moléculaires des standards sont indiqués sur la droite de la figure.

Figure 24 - Détection des immunoprécipités (←) liés aux réactions de l'anticorps monoclonal MP II 4 avec la MP II dans le liquide coelomique prélevé dans des animaux ayant reçu des injections de billes de latex (b) dans leur cavité coelomique.

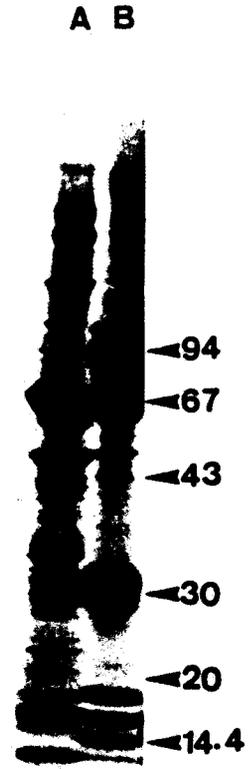
Figure 25 - Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS. A : liquide coelomique des animaux traités par 55 ppm de cadmium (injecté dans le coelome) ; B : protéines du même liquide coelomique immunoprécipitées par l'anticorps anti-MP II de lapin ; C : Poids moléculaires des substances standards.

Fig-2 2



PMx10⁻³

Fig-23



PMx10⁻³

Fig-24

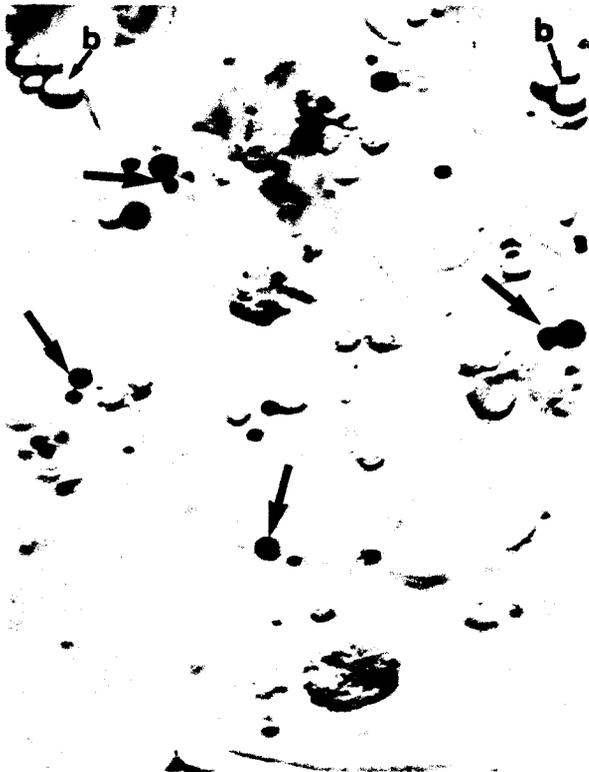
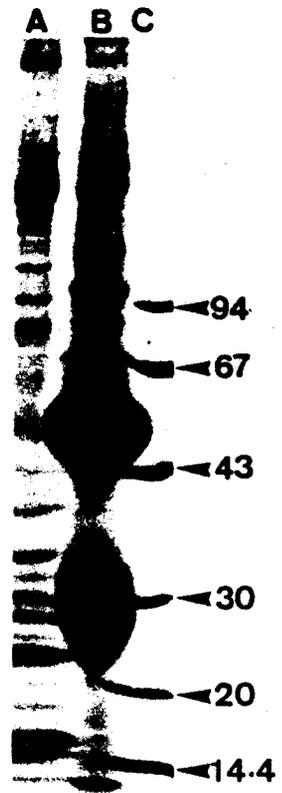


Fig-25



PMx10⁻³

DISCUSSION

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude semble bien indiquer que des granulocytes synthétisent la MP II. Celle-ci serait ensuite exportée vers le liquide coelomique comme en témoigne sa mise en évidence par voie électrophorétique du liquide coelomique et des produits de dégranulation (M'Béri et al., inédit). Les granulocytes de type I apparaissent particulièrement impliqués dans ce processus. Dans le cas d'animaux intoxiqués in vivo, ces cellules présentent une raréfaction caractéristique de leurs granules généralement considérés comme lysosomes primaires (Dhainaut, 1984). Toutefois, il n'est pas exclu que les autres types de coelomocytes puissent également contenir la MP II. Leur plus faible réaction immunocytochimique pourrait être liée à une plus faible teneur antigénique. A notre connaissance, il existe peu d'exemples d'Invertébrés où le site de synthèse de protéines capables de complexer le cadmium a été démontré. Il convient toutefois de citer le cas de l'Huitre Crassostrea gigas, où Martoja et Martin (1985) ont pu, par réduction du ferricyanure ferrique, détecter dans les amoebocytes à zinc et cuivre une protéine sulfhydrilée de complexation du cadmium.

En ce qui concerne la Néréis, à l'aide de l'anticorps monoclonal (MP II 4) nous avons pu confirmer que le site de synthèse se trouve au niveau des granulocytes I. L'examen cytologique révèle que les granules cytoplasmiques de ces cellules, réactifs aux anticorps, sont vraisemblablement élaborés par l'appareil de Golgi (Dhainaut, 1984) et donc de production endogène. Ces cellules sont connues pour leur coopération avec les granulocytes II lors de l'encapsulation des corps étrangers (Porchet-Henneré et al., 1987). De plus il faut signaler qu'à notre connaissance, il n'a jamais été fabriqué d'anticorps monoclonaux anti-métalloprotéines chez les Invertébrés ; par contre, récemment Talbot et al. (1986) ont pu produire des anticorps monoclonaux anti-métalloprotéines et métallothionéines chez le lapin. Cet anticorps monoclonal (MP II 4) constitue un réactif spécifique pour l'étude des processus immunologiques développés par les granulocytes I. Il constituera ainsi un marqueur

spécifique des granulocytes I pour toute autre étude nécessitant un repérage de cette population cellulaire. Cet anticorps monoclonal constitue également un outil précieux qui pourra servir à identifier la présence de la MP II dans des circonstances variées, à quantifier sa sécrétion par l'utilisation d'une technique type ELISA et qui pourra aider à établir la structure de la MP II ainsi que contribuer à sa purification par chromatographie d'affinité antigène-anticorps.

Dans les conditions opératoires utilisées, l'analyse électrophorétique du contenu protéique obtenu après dégranulation provoquée par le cadmium a donné lieu à une bande moins intense par rapport à celle obtenue à partir du milieu de dégranulation des granulocytes lors de leur contact avec de l'ionophore-calcium. Le fait d'obtenir cette bande dans les 2 cas pourrait indiquer que cette protéine MP II n'est pas synthétisée ni libérée spécifiquement en réponse à l'action du cadmium. Il est tout-à-fait possible que cette MP II intervienne également dans d'autres processus de défense de l'organisme. Il est possible aussi qu'elle ait comme rôle spécifique de fixer les métaux lourds mais qu'elle soit libérée de façon non spécifique lors d'une agression.

DISCUSSION ET CONCLUSION

GENERALES

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES

Notre travail relatif aux effets du cadmium chez l'Annélide Nereis diversicolor a, dans un premier temps, permis de confirmer des résultats obtenus antérieurement (Dennaï et al., 1986), à savoir que ce ver marin supporte bien une concentration de 22 ppm de ce métal lourd ajouté expérimentalement à l'eau d'élevage. Ces données prouvent que cette espèce euryhaline, bien adaptée à la vie dans la vase des estuaires, est particulièrement résistante puisqu'il a été démontré par d'autres auteurs qu'un grand nombre d'animaux, Invertébrés et Vertébrés, ne supportent pas une concentration supérieure à 2 ppm. Par exemple, Noël-Lambot (1980) a observé que les 3 Mollusques, Patella vulgata, Patella caerulea et Nucella lapillus sont rapidement tués avec une faible dose de cadmium (2 ppm). Il a même été démontré que pour certains poissons d'eau douce, une concentration aussi faible que 0,01 ppm de cadmium est létale (Doudoroff, 1953 ; Ball, 1967 et Kumada et al., 1972). Le résultat obtenu chez Nereis diversicolor est en accord avec les conclusions d'autres auteurs qui ont montré que, dans la nature, cette espèce peut s'adapter à un environnement riche en cadmium (Bryan et Hummerstone, 1973). En ce qui concerne la Néréis, il convient toutefois de noter que les expériences que nous avons réalisées à des températures différentes (4°C, 13°C et 16,5°C) ont permis d'établir l'effet de ce facteur abiotique sur la toxicité du métal. Ceci peut sans doute s'expliquer par des variations du métabolisme du ver et de la bioaccumulation enregistrée par dosages en SAAF. En effet, le facteur de concentration calculé pour des animaux intoxiqués par 22ppm à 4°C a presque doublé pour une température de 13°C. L'effet de la température sur l'accumulation des métaux lourds a été étudié chez d'autres espèces (Noël-Lambot, 1980 ; Vernberg et al., 1974). Outre ce facteur que nous avons étudié particulièrement, il faut noter que l'absorption du cadmium peut dépendre également d'autres facteurs tels que l'âge et le sexe des animaux (Noël-Lambot, 1980 ; Martoja et al., 1983), la saison de récolte des animaux (Delval, 1984), la salinité, la présence d'autres métaux dans le milieu, la dose et la nature chimique du métal (Bremner, 1978). Il conviendrait donc maintenant de tester chez la Néréis l'influence sur la toxicité du cadmium d'autres facteurs aussi divers que l'âge, le sexe des animaux, la salinité du milieu, l'action simultanée de plusieurs métaux lourds qui peuvent d'ailleurs intervenir en synergie ou avoir des effets antagonistes.

Un point qui semble également important à signaler est représenté par ces variations dans la teneur en cuivre et surtout en zinc en fonction de l'intoxication par le cadmium que nous avons pu quantifier mais que nous ne sommes pas encore en mesure d'expliquer. Les résultats apportés dans l'étude de l'influence de l'intoxication par le cadmium sur la teneur en zinc et en cuivre aussi bien dans les animaux entiers que dans leur partie soluble, nous permettent toutefois de suggérer qu'une intoxication de la Néréis par le cadmium peut entraîner une augmentation de la quantité de zinc dans l'ensemble du corps, et en particulier dans la partie soluble. L'augmentation de la teneur en zinc dans la fraction soluble de certains organes comme le foie a déjà été décrite chez des poissons (Noël-Lambot, 1980 ; Webb, 1972). La quantité de cuivre n'a pas changé de façon significative aussi bien dans l'animal entier que dans sa partie soluble. La variation de la quantité de ces 2 métaux lourds (cuivre et zinc) lors d'une intoxication par le cadmium pourrait s'expliquer par une certaine redistribution dans le corps ou/et une absorption accrue du métal à partir du milieu extérieur (Noël-Lambot, 1980). Ces variations montrent qu'il existe une interférence du cadmium avec le métabolisme du zinc. Du fait de leur similitude, le cadmium et le zinc entrent vraisemblablement en compétition au niveau de très nombreux sites cellulaires.

Dans sa thèse, Dennaï (1984) a montré par une étude ultrastructurale que les tissus de la Néréis ne sont pas du tout altérés lors d'une intoxication de plus de 11 jours par 22 ppm de cadmium. Il a également été observé en microscopie photonique que les tissus et organes (y compris le cerveau) semblent encore tout-à-fait normaux lors d'une intoxication de 4 jours par 55 ppm de cadmium. Toutefois, il a pu aussi être établi par culture organotypique que, lors de ce type d'intoxication, la libération au niveau de l'aire neurohémale de certains neuropeptides et, en particulier d'un facteur inhibiteur de la maturation sexuelle (la néréidine), est stoppée (Dennaï et al., 1986).

Notre étude ultrastructurale a donc été effectuée essentiellement sur des vers intoxiqués dans les mêmes conditions (55 ppm pendant 4 jours à 13°C). Nos résultats confirment la faible altération des organes au bout de 4 jours marquée seulement au niveau de l'épiderme, de l'ensemble du tissu nerveux et des néphridies par l'abondance de lysosomes. Trois faits marquants doivent néanmoins être mentionnés : présence de figures d'allure pathologique dans

quelques axones, agglomération des grains de sécrétion dans les péricaryons des cellules neurosécrétrices (reflet probable de l'arrêt de libération), phénomène de dégranulation observée dans certaines cellules libres dans la cavité coelomique de l'animal, les granulocytes I, et abondance de sphérocristaux dans l'épithélium intestinal. Ces derniers ont été observés chez d'autres espèces d'Invertébrés : chez les Insectes (Martoja et Martoja, 1984), chez les Crustacés (Chassard-Bouchaud, 1982) et chez les Protozoaires (Simkiss, 1976). Simkiss (1981) et Mason et al. (1982) ont montré que lors d'une exposition des animaux de quelques heures, la plupart des métaux radioactifs sont incorporés rapidement dans les sphérocristaux. Ballan-Dufrançais (1982) a tiré la même conclusion après avoir suivi au microscope électronique le processus de bioaccumulation de métaux dans les sphérocristaux de Pecten maximus à l'aide d'une microsonde aux rayons X. Les mécanismes de formation de ces sphérocristaux sont apparemment très variés. Nous citerons ici quelques exemples tout en précisant que l'implication du système lysosomal est un aspect commun aux tissus des Invertébrés et que la majorité contiennent du fer, du cuivre et du calcium (Brown, 1982). D'après Brown, il y a 4 processus majeurs dans la formation des sphérocristaux.

- Le premier peut exister chez divers animaux (des Coelentérés aux Insectes). Il implique la formation de ces granules à partir de l'appareil de Golgi ou bien à partir de citernes qui lui sont associées (exemple : Musca domestica (Sohal et al., 1977, cités par Brown (1982)).

- Le deuxième site d'initiation est le réticulum endoplasmique et ses citernes, comme dans le cas de dépôt de sels chez l'Insecte marin Petrobius maritimus.

- La troisième possibilité est représentée par le dépôt de minéraux dans des vésicules ou vacuoles d'origine inconnue. C'est le cas des Mollusques (George et al., 1975) et des Crustacés (Hryinewiecka-Szyfter, 1972 ; Brown 1976 ; Hopkin et Nott, 1980).

- Le quatrième site d'initiation est constitué par les mitochondries. Les premières études des tissus d'Invertébrés (Wigglesworth et Salpeter, 1962) suggèrent que les concrétions minérales sont formées par minéralisation des mitochondries. Chez les Mammifères, les études ont démontré l'accumulation de calcium (Wasserman et Kallfelz, 1970) et la capture de l'or (Stuve et Gall, 1970) au niveau des mitochondries. Mais à la lumière des résultats obtenus,

les auteurs (George et Pirie, 1979) suggèrent qu'il n'y a pas un mécanisme unique pour les accumulations. On trouve ces dernières dans divers organites (mitochondries, lysosomes, vésicules dérivées de l'appareil de Golgi) et dans des vésicules de pinocytose. La signification des sphérocristaux présents chez la Néréis nous échappe encore. En effet, l'injection dans la cavité coelomique de cadmium radioactif (durée d'incorporation : 3 heures) que nous avons effectuée très récemment, a apporté la preuve que le métal peut effectivement s'accumuler dans l'épithélium digestif, mais surtout à l'apex des cellules. Cette observation plaide plutôt en faveur d'une excrétion du métal dans la lumière intestinale que d'un piégeage au niveau des sphérocristaux dont une étude préliminaire effectuée par microanalyse aux rayons X a révélé qu'ils sont riches en calcium et en phosphore. Ce dernier résultat qu'il conviendra de confirmer par la suite peut être aussi le reflet d'un dérèglement du métabolisme du calcium.

Notre étude biochimique a confirmé dans un premier temps l'existence, chez la Néréis, d'au moins deux protéines capables de complexer le cadmium (Dennai, 1984 ; Nejmeddine, 1985 ; Dennai et al., 1986). Il s'agit d'une catégorie de protéines de haut poids moléculaire (supérieur à 100 kD) et d'une autre de faible poids moléculaire (MP II) que nous avons réussi à caractériser après purification (voir chapitre IV et Nejmeddine et al., 1987). Par l'étude électrophorétique et l'analyse des acides aminés, nous avons trouvé que la MP II possède un poids moléculaire de 10 kD. Après analyse en FPLC du produit natif, il s'est révélé que le produit purifié possède, en fait, un poids moléculaire très proche de 20 kD. Ceci nous a permis de suggérer que la MP II est de forme dimérique et qu'elle est constituée de 2 sous-unités très probablement identiques. Lors de la caractérisation de cette métalloprotéine, il s'est avéré que les principales caractéristiques de la molécule (faible proportion de cystéine, absence d'absorbance à 250 nm, présence d'acides aminés aromatiques et finalement des traces de sucres) sont différentes de celles des métallothionéines bien connues pour leur intervention dans certains processus de détoxification (Margoshes et Vallée, 1957). Il convient toutefois de rappeler ici que des protéines assez comparables à celles que nous avons trouvées chez la Néréis ont été signalées chez d'autres Invertébrés (Tableaux 1 et 7). La glycoprotéine isolée à partir d'une larve d'Insecte Pteronar-

cys californica (Clubb et al., 1975) présente, par exemple, des caractéristiques très proches de celles de la MP II, à savoir qu'elle renferme 1,9 % de cystéine et un taux très élevé en sucres. L'hypothèse que ce genre de protéines pourrait jouer le même rôle que les cadmium-thionéines (voir rôle des métallothionéines dans l'introduction) (Bouquegneau et Noël-Lambot, 1978) a déjà été avancée (Martoja et al., 1983). D'autres protéines et glycoprotéines ayant la propriété de lier les métaux lourds et en particulier le cadmium, mais différentes des métallothionéines, ont été découvertes chez plusieurs autres espèces animales et végétales (pour la revue, voir Stone et Overnell, 1985).

Dans le but de localiser le site de synthèse de la métalloprotéine MP II présente chez la Néréis, nous avons fabriqué un anticorps polyclonal anti-MP II. L'utilisation de cet anticorps dans les techniques immunocytochimiques et d'immunoprécipitation a révélé que la MP II est très vraisemblablement synthétisée par les granulocytes. Une localisation plus fine a été obtenue au niveau des granules des granulocytes I à l'aide de cet anticorps utilisé par voie immunocytochimique à haute résolution (Dhainaut-Courtois et al., 1987). Selon toute vraisemblance, cette MP II serait ensuite exudée vers le liquide coelomique comme en témoigne la mise en évidence par voie électrophorétique des produits de dégranulation et du liquide coelomique. A notre connaissance, il existe peu d'exemples d'Invertébrés où le site de synthèse de protéines capables de complexer le cadmium a été démontré. Il convient toutefois de citer le cas de l'Huître, Crassostrea gigas, où Martoja et Martin (1985) ont pu, par réduction du ferricyanure ferrique détecter dans les amoebocytes à zinc et cuivre une protéine sulfhydrilée de complexation du cadmium.

Les résultats obtenus avec l'anticorps polyclonal ont été confirmés par l'anticorps monoclonal anti-MP II. De plus, il a été prouvé que ce dernier ne marque que les granulocytes I. L'examen cytologique révèle que les granules cytoplasmiques de ces cellules, réactifs aux anticorps, sont vraisemblablement élaborés par l'appareil de Golgi (Dhainaut, 1984) et donc de production endogène. A notre connaissance, il n'a jamais été fabriqué d'anticorps monoclonaux anti-métalloprotéine chez les Invertébrés. Par contre, Talbot et al. (1986) ont récemment pu produire des anticorps monoclonaux anti-métalloprotéines et métallothionéines chez le lapin. Cet anticorps monoclonal anti-MP II constitue donc un réactif spécifique pour l'étude des processus immunologiques développés par les granu-

locytes I. Il constituera également un marqueur spécifique des granulocytes I pour toute étude nécessitant un repérage de cette population cellulaire. Cet anticorps monoclonal constitue aussi un outil précieux qui pourra servir à identifier la présence de la MP II dans des circonstances variées, à quantifier sa sécrétion par l'utilisation d'une technique type ELISA et à contribuer à établir sa structure.

En conclusion, les différentes techniques que nous avons utilisées dans notre étude ont apporté des résultats précieux quant à la toxicité du cadmium, sa bioaccumulation et certains mécanismes de détoxification mis en oeuvre lors d'une intoxication expérimentale de la Néréis.

Nous espérons dans un avenir relativement proche  pouvoir obtenir la séquence de la MP II, ce qui nous permettrait de mieux comprendre le phénomène de complexation du cadmium qui s'effectue à son niveau. De plus, les résultats préliminaires que nous avons obtenus très récemment avec la méthode de radioautographie laissent également envisager que nous serons bientôt en mesure de décrire la cinétique d'accumulation du cadmium ainsi que les principales étapes de son métabolisme dans ce ver marin.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- AMACHER D.E. (1975). In Haguenoer J.M. et Furon D; (1981).
- AMACHER D.E. et EWING K.L. (1975). A soluble cadmium-binding component in rat and dog spleen. Arch. Environ. Health, 30, 510-513.
- BALL I.R. (1967). The toxicity of Cd to rainbow trout (Salmo gairdnerii Richardson). Wat. Res., 1, 805-806.
- BALLAN-DUFRANCAIS C., JEANTET A.Y. et HALPERN S. (1982). Localisation intracellulaire par microanalyse X de métaux et de métalloïdes dans la glande digestive d'un Mollusque bivalve (Pecten maximus). Implication des processus de digestion. C. R. Acad. Sci. Sér. III, 294, 673-678.
- BARANSKI B., STEIKIEWICZ I., SITAREK K. et SZYMCZAK W. (1983). Effects of oral, subchronic Cadmium administration on fertility, prenatal and postnatal progeny development in rats. Arch. Toxicol., 54, 297-302.
- BASKIN D.G. (1974). The coelomocytes of Nereid Polychaetes. Contemp. Topics Immunobiol., 4, 55-64.
- BEAUVILLAIN J.-C., TRAMU G. et GARAUD J.-C. (1984). Coexistence of substances related to enkephalin and somatostatin in granules of the guinea-pig median eminence : demonstration by use of colloidal gold immunocytochemical methods. Brain Res., 301, 389-393.
- BOEHME D.H., SAMPSON L.T. et MARK M. (1979). Cadmium and hypertension : Tissue levels in human heart aorta and brain. Fed. Proc. 38, 1209.
- BOILLY B. et RICHARD A. (1978). Accumulation du fer chez une Annélide Polychète : Magelona papillicornis O.F. Müller. C. R. Acad. Sci. Sér. D, 286, 1005-1008.
- BOUQUEGNEAU J.-M. (1979). Evidence for the protective effect of metallothioneins against inorganic mercury injuries to fish. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 23, 218-219.
- BOUQUEGNEAU J.-M., CERDAY Ch. et DISTECHE A. (1975). Fish mercury binding thionein related to adaptation mechanisms. FEBS Let., 55, 173-177.
- BOUQUEGNEAU J.-M. et NOEL-LAMBOT F. (1978). Les métallothionéines, structure, fonctions et incidence dans les milieux marins par les métaux lourds. Act. Biochim. Mar. Colloque GABIM, 219-232.
- BOUQUEGNEAU J.-M., MARTOJA M. et TRUCHET M. (1983). Localisation biochimique du cadmium chez Murex trunculus L. (Prosobranchie Néogastéropode) en milieu naturel non pollué et après intoxication expérimentale. C. R. Acad. Sc. Sér. III, 296, 1121-1124.
- BOUQUEGNEAU J.-M., BALLAN-DUFRANCAIS C. et JEANTET A.Y. (1985). Storage of Hg in the ileum of Blatella germanica : biochemical characterization of metallothionein. Comp. Biochem. Physiol. 80C, 95-98.
- BOULEY (1977). In Haguenoer J.M. et Furon D. (1981).

- BREMNER I. et DAVIES N. (1975). The induction of metallothionein in rat liver by zinc injection and restriction of food intake. *Biochem. J.*, 149, 733-738.
- BREMNER I. et YOUNG B.W. (1976a). Isolation of (copper-zinc)-thioneins from pig liver. *Biochem. J.*, 155, 631-635.
- BREMNER I. et YOUNG B.W. (1976b). Isolation of (copper-zinc)-thioneins from the livers of copper-injected rats. *Biochem. J.*, 157, 517-520.
- BRIGGS R.W. et ARMITAGE I.M. (1982). Evidence for site selective binding in calf liver metallothionein. *J. Biol. Chem.*, 257, 1259-1262.
- BROWN B.E. (1976). Observations on the tolerance of the isopod Asellus meridianus Rac to copper and lead. *Water Res.*, 10, 555-559.
- BROWN D.A., BAWDEN C.A., CHATEL K.W. et PARSONS T.R. (1977). The wildlife community of Iona Island Jetty, Vancouver, B.C. and heavy-metal pollution effects. *Environ. Conser.*, 4, 213-216.
- BRYAN G.W. and HUMMERSTONE L.G. (1973). Adaptation of the polychaete Nereis diversicolor to estuarine sediments containing high concentrations of zinc and cadmium. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 53, 839-857.
- BÜHLER R.H.O. et KÄGI J.H.R. (1974). Human hepatic metallothionein. *FEBS Let.*, 39, 229-234.
- BURTON D.T., JONES A.H. et CAIRNS J. Jr (1972). Acute zinc toxicity to Rainbow Trout (Salmo gairdnerii) : confirmation of the hypothesis that death is related to tissue hypoxia. *J. Fish. Res. Bd Can.*, 29, 1463-1466.
- BUS (1978). In Haguenoer J.M. et Furon D. (1981).
- CARMICHAEL N.G. et FOWLER B.A. (1981). Cadmium Accumulation and toxicity in the kidney of the Bay Scallop Argopecten irradians. *Mar. Biol.*, 65, 35-45.
- CHASSARD-BOUCHAUD C. (1982). Localisation ultrastructurale du Cadmium dans la glande digestive du Crabe Carcinus maenas (Crustacé Décapode). Microanalyse par spectrographie des rayons X. *C. R. Acad. Sc. Sér. III*, 294, 153-157.
- CHASSARD-BOUCHAUD C. (1983). Rôle des lysosomes et des sphérocristaux dans le phénomène de concentration de l'uranium chez la moule Mytilus edulis (L.). Microanalyse par spectrographie des rayons X. *C. R. Acad. Sc. Sér. III*, 296, 581-586.
- CHEN R.W., WHANGER P.D., GANTHER H.E. et HOEKSTRA W.G. (1972). A low molecular weight cadmium-binding protein in testes of rats : possible role in cadmium-induced testicular damage. *Fed. Proc.*, 31, 699.
- CHEN R.W., WHANGER P.D. et WESWIG P.H. (1975). Biological function of metallothioneins from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61, 920-926.

- CHERIAN M.G. et GOYER R.A. (1977). Characteristics of Copper and Zinc Induced Metallothioneins. In : Trace substances in environmental health XI. Edited by D.D. Hemphill, University of Missouri, 193-200.
- CHERIAN M.G. et GOYER R.A. (1978). Metallothioneins and their role in the metabolism and toxicity of metals. *Life Sci.*, 23, 1-10.
- CIRKT (1974). In Haguenoer J.M. et Furon D. (1981).
- CLAMP J.R., DAWSON G. et HOUGH L. (1967). *Biochim. Biophys. Acta*, 28, 342-350.
- CLARK R.B. (1975). The posterior lobes of the brain of Nephtys and the mucus gland of the prostomium. *Quart. J. Micr. Sci.*, 96, 545-565.
- CLUBB R.W., LORDS J.L. et GAUFIN A.R. (1975). Isolation and characterization of a glycoprotein from the stonefly Pteronarcys californica, with binds cadmium. *J. Insect Physiol.*, 21, 53-60.
- DALLINGER R. et WIESER W. (1984). Molecular fraction of Zn, Cu, Cd, and Pb in the Midgut Gland of Helix pomatia L. *Comp. Biochem. Physiol.*, 79C, 125-129.
- DAVIS B.J. (1964) Disc electrophoresis. II. Methods application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 404-427.
- DELVAL C. (1984). Réactions du flet vis-à-vis des pollutions par les métaux (Cu, Zn, Cd et Pb) sur le littoral de la Mer du Nord : détoxification, métallothionéines. Thèse 3ème Cycle, Univ. Lille I., 172 p.
- DENNAI N. (1984). Effets histophysio-pathologiques et biochimiques de l'intoxication d'un ver marin (Nereis diversicolor) par deux métaux lourds (le cadmium et le mercure). Thèse 3ème Cycle, Univ. Lille I, 45 p.
- DENNAI N., DHAINAUT-COURTOIS N., BOUQUEGNEAU J.-M. et NEJMEDDINE A. (1986). Effets du cadmium et du mercure sur un ver marin (Nereis diversicolor O.F. Müller). Mécanismes de détoxification. *C. R. Acad. Sc.*, 302, 489-494.
- DHAINAUT A. (1984). Aspect cytophysiologique des coelomocytes de Néridiens (Annélides Polychètes). *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, 73, 135-150.
- DHAINAUT-COURTOIS N., TRAMU G., BEAUVILLAIN J.-C. et MASSON M. (1986). A qualitative approach of the Nereis neuropeptides by use of antibodies to several vertebrate peptides. *Neurochem. Int.*, 8, 327-338.
- DHAINAUT-COURTOIS N., NEJMEDDINE A., BAERT J.-L. et DHAINAUT A. (1987). Localisation immunocytochimique en microscopie électronique d'une protéine complexant le cadmium chez un ver marin (Nereis diversicolor O.F. Müller). *C. R. Acad. Sc. Paris* (sous presse).
- DOHI Y., OHBA K. et YONEYAMA Y. (1983). Purification and molecular properties of two cadmium-binding glycoproteins from the hepatopancreas of a whelk, Buccinum tenuissimum. *Biochim. Biophys. Acta*, 745, 50-60.

- DOUDOROFF P. et KATZ M. (1953). Critical review of literature on the toxicity of industrial wastes and their components to fish. II. The metals as salts. *Sewage Ind. Wastes*, 25, 802-839.
- DWIVERDI C. (1983). Cadmium-induced sterility : possible involvement of the cholinergic system. *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.*, 12, 151-156.
- EICHHORN G.L. (1975). Active sites of biological macromolecules and their interaction with heavy metals. In : Ecological toxicology Research. Effects of heavy metals and organo-halogen compounds. Proc. NATO SC. Com. Conference on Eco-Toxicology. Mont Gabriel, Québec, Canada, May 6-10, 1974. McIntyre et Mills Eds, Plenum Press, New York.
- EISLER R. et GARDNER G.R. (1973). Acute toxicology to an estuarine teleost of mixtures of Cd, Cu and Zn salts. *J. Fish. Biol.*, 5, 131-142.
- ELINDER (1978). In Haguenoer J.M. et Furon D. (1981).
- EVERARD L.B. et SWAIN R. (1983). Isolation, characterization and induction of metallothionein in Stonefly Eusthenia spectabilis following exposure to cadmium. *Comp. Biochem. Physiol.*, 75C, 275-280.
- EVTUSHENKO Z.S., BELCHEVA N.N. et LUKYANOVA O.N. (1986). Cadmium accumulation in organs of the Scallop Mizuhopecten yessoensis. II. Subcellular distribution of metals and metal-binding proteins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 83C, 377-383.
- FOULKES E.C. et GIESKE T. (1973). Specificity and metal sensitivity of renal amino acid transport. *Biochim. Biophys Acta*, 318, 439-445.
- FOWLER J.F., SINGH D.N. et DWIVERDI C. (1982). Effect of cadmium on meiosis. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 29, 412-415.
- FRANKENNE F., NOEL-LAMBOT F. et DISTECHE A. (1980). Isolation and characterization of metallothioneins from cadmium loaded mussel, Mytilus edulis. *Comp. Biochem. Physiol.*, 66C, 179-182.
- FRAZIER J.M., GEORGE S.S., OVERNELL J., COOMBS T.L. et KAGI J. (1985). Characterization of two molecular weight classes of cadmium binding proteins from the Mussel, Mytilus edulis (L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 80C, 257-262.
- FRIBERG L. (1948). Albuminurie et Lésions rénales chez les ouvriers exposés à la poussière de cadmium et de nickel. *J. ind. Hyg. Tox.*, 30, 32-36.
- FRIBERG L. (1959). In Haguenoer J.M. et Furon D. (1981).
- FUKUSHIMA (1970). In Haguenoer J.M. et Furon D. (1981).
- GALE T.F. et FERM V.H. (1973). Skeletal malformations resulting from cadmium treatment in the Hamster. *Biol. Neonate*, 23, 149-160.
- GARDNER G.R. et YEVICH P.P. (1970). Histological and hematological responses of an estuarine teleost to Cd. *J. Fish. Res. Bd Can.*, 27, 2185-2196.

- GAUTHIER M. et FLATAN G. (1977). Concentration et mode de fixation du cadmium par un *Vibrio* marin. C. R. Acad. Sc. Sér. D, 285, 817-820.
- GEORGE S.G., PIRIE B.J.S. et COOMBS T.L. (1975). Absorption, accumulation and excretion of iron complexes by *Mytilus edulis* (L.). Proceed. Int. Conf. Heavy metals in the environment, 27-31, 887-900.
- GEORGE S.G. et PIRIE B.J.S. (1979). The occurrence of cadmium in subcellular particles in the kidney of the marine mussel *Mytilus edulis*, exposed to cadmium : the use of electron microprobe analysis. Biochem. Biophys. Acta, 580, 234-244.
- GLAUSER (1976). In Haguenoer J.M. et Furon D. (1981).
- GURD F. et WILCOX P. (1956). Complex formation between metallic cations and proteins, peptides, and amino acids. In : Advances in protein chemistry, XI, Anson M.L., Bailey K. et Edsall J.T. eds, Acad. Press, New York, 311-427.
- HAGUENOER J.M. et FURON D. (1981). Toxicologie et hygiène industrielles. Tome 1. Les dérivés minéraux. Edition : technique et documentation, Paris, 213-238.
- HIDALGO J., TORT L. et FLOS R. (1985). Cd-Zn-, Cu-binding protein in the Elasmobranch *Scyliorhinus canicula*. Comp. Biochem. Physiol., 81C, 159-165.
- HIRS C.H.W. (1967). Performic acid oxidation. In : Methods in enzymology. S.P. Colowick et N.O. Kaplan eds, Acad. Press, New York, Vol. II, 197-199.
- HOPKIN S.P. et NOTT J.A. (1980). Studies on the digestive cycle of shore crab *Carcinus maenas* (L.) with special reference to the B cells in the hepatopancreas. J. Biol. Assoc. U.K., 60, 891-907.
- HOWELL R. et SMITH L. (1983). Binding of heavy metals by the marine nematode *Enoplus brevis* Bastian 1865. Nematol., 29, 39-48.
- HRYNIEWIECKA-SZYFTER Z. (1972). Ultrastructure of the hepatopancreas of *Porcellio scaber* in relation of the function of iron and copper accumulation. Bull. Soc. Amis. Sc. Lett. Poznam, 12-13, 135-142.
- JENKINS K.D. et SANDERS B.M. (1986). Relationships between free cadmium ion activity in sea water, cadmium accumulation and subcellular distribution, and growth in polychaetes. Envir. Health Perspect., 65, 205-210.
- KÄGI J.H.R. et VALLEE B.L. (1960). Metallothionein : a Cd- and Zn-containing protein from equine renal cortex. J. Biol. Chem., 235, 3460-3465.
- KÄGI J.H.R. et VALLEE B.L. (1961). Metallothionein : a Cd- and Zn-containing protein from equine renal cortex. II. Physicochemical properties. J. Biol. Chem., 236, 2435-2442.
- KÄGI J.H.R., HIMMELHOCH S., WHANGER P.D., BETHUNE J.L. et VALLEE B.L. (1974). Equine hepatic and renal metallothioneins. Purification, molecular weight, amino acid composition and metal content. J. Biol. Chem., 249, 3537-3542.

- KÄGI J.H.R. et NORDBERG M. (1979b). Metallothionein and other low molecular weight metal-binding proteins. *Exper. Suppl.* 34, 41-124.
- KISSLING M.M. et KÄGI J.H.R. (1977). Primary structure of human hepatic metallothionein. *FEBS Let.* 82, 247-250.
- KITO H., TAZAWA T., OSE Y., SATO T. et ISHIKAWA T. (1982). Protection by metallothioneins against cadmium toxicity. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73C, 135-139.
- KLASSEN (1977). In Haguenoer J.M. et Furon D. (1981).
- KOHLER G. et MILSTEIN C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495-497.
- KOJIMA Y., BERGER C., VALLEE B.L. et KÄGI J.H.R. (1976). Amino-acid sequence of equine renal metallothionein-1B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 3413-3417.
- KOJIMA Y. et KÄGI J.H.R. (1978). Metallothionein. *Trds Biochem. Sci.*, 3, 90-93.
- KUMADA H., KIMURA S., YOKOTE M. et MATIDA Y. (1972). Acute and chronic toxicity, uptake and retention of cadmium in freshwater organisms. *Bull. Freshwater Fisheries Res. Lab.*, 22, 157-165.
- LAEMMLI U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage TH. *Nature*, 227, 680-685.
- LERCH K. (1980). Copper metallothionein, a copper binding protein from Neurospora crassa. *Nature*, 284, 368-70.
- LERCH K. et AMMER D. (1982). Crab metallothionein. Primary structures of metallothioneins 1 and 2. *J. Biol. Chem.*, 257, 2420-2426.
- LEWIS (1972). In Haguenoer J.M. et Furon D. (1981).
- LEY H.L., FAILLA M.L. et CHERRY D.S. (1983). Isolation and characterization of hepatic metallothionein from rainbow trout (Salmo gairdneri). *Comp. Biochem. Physiol.*, 74B, 507-513.
- MCCARTER J.A. et ROCH M. (1983). Hepatic metallothionein and resistance to copper in juvenile Coho Salmon. *Comp. Biochem. Physiol.*, 74C, 133-137.
- MAGOS (1974). In Haguenoer J.M. et Furon D. (1981).
- MAINES M.D., CHUNG A.S. et KUTTY R.K. (1982). The inhibition of testicular heme oxygenase activity by Cadmium. A novel cellular response. *J. Biol. Chem.*, 257, 14116-14121.
- MARGOSHES M. et VALLEE B.L. (1957). A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. chem. Soc.*, 79, 4813-4814.
- MARONI G. et WATSON D. (1985). Uptake and binding of cadmium, copper and zinc by Drosophila melanogaster larvae. *Insect. Biochem.* 15, 55-63.
- MARTOJA R., TRUCHET M. et BOUQUEGNEAU J.-M. (1982). Une néphropathie provoquée par le Cadmium chez l'anguille adaptée à l'eau de mer. *C. R. Acad. Sc. Sér. III*, 295, 369-374.

- MARTOJA R., BOUQUEGNEAU J.-M. et VERTHE C. (1983). Toxicological effects and storage of Cadmium and Mercury in an Insect Locusta migratoria (Orthoptera). *J. Invert. Pathol.*, 42, 17-32.
- MARTOJA M. et MARTOJA R. (1984). La bioaccumulation de métaux, processus physiologique normal et conséquence de la pollution. *Le Courrier du CNRS*, 54, 32-37.
- MARTOJA R. et MARTIN J.-L. (1985). Recherche des mécanismes de détoxification du cadmium par l'Huitre Crassostrea gigas (Mollusque, Bivalve). I. Mise en évidence d'une protéine sulfhydrilée de complexation du métal dans les amœbocytes à zinc et cuivre. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 300, 549-554.
- MOUNT D.I. et STEPHAN C.E. (1967). A method for detecting Cd poisoning in fish. *J. Wildlife Manag.*, 31, 168-172.
- MUSKETT (1979). *In* Haguenoer J.M. et Furon D. (1981).
- NEJMEDDINE A. (1985). Contribution à l'étude cytologique et biochimique des mécanismes de défense chez une Annélide (Nereis diversicolor) soumise à une intoxication chronique par le cadmium. *D.E.A. Univ. Lille I*, 33 p.
- NEJMEDDINE A., DHAINAUT-COURTOIS N., BAERT J.-L., SAUTIERE P., FOURNET B. et BOULENGUER P. (1987). Purification and characterization of a cadmium-binding protein from Nereis diversicolor (Annelida, Polychaeta) (sous presse).
- NOEL-LAMBOT F. (1979). Cadmium accumulation correlated with increase in metallothionein concentration in the limpet Patella caerulea. 1st Conf. Eur. Soc. Comp. Physiol. Biochem. : Animals and Environmental Fitness, 27-31 August 1979, Liège Belgique, Pergamon Press.
- NOEL-LAMBOT F. (1980). La bioaccumulation du cadmium en milieu marin. Thèse Doct. Univ. Liège, 258 p.
- NOGAWA (1977). *In* Haguenoer J.M. et Furon D. (1981).
- NOMIYAMA K., SATO C. et YAMAMOTO A. (1973). Early signs of cadmium intoxication in rabbits. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 24, 625-635.
- NORDBERG G.F. (1971). Effects of acute and chronic cadmium exposure on the testicles of mice. *Environ. Physiol.*, 1, 171-187.
- NORDBERG G.F. (1972). Cd metabolism and toxicity. *Environ. Physiol., Biochem.*, 2, 7-36.
- NORDBERG G.F., PISCATOR M. et LIND B. (1971). Distribution of Cd among protein fractions of mouse liver. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 29, 456-470.
- NORDBERG G.F., NORDBERG M., PISCATOR M. et VESTERBERG O. (1972). Separation of two forms of rabbit metallothionein by isoelectric focusing. *Biochem. J.*, 126, 491-498.
- NORDBERG G.F., GOYER R. et NORDBERG M. (1975). Comparative toxicity of cadmium-metallothionein and cadmium chloride on mouse kidney. *Arch. Pathol.*, 99, 192-197.
- NORDBERG M. (1978). Studies on metallothionein and cadmium. *Environ. Res.*, 15, 381-404.

- NORDBERG M., TROJANOWSKA B. et NORDBERG G.F. (1974). Studies on metal-binding proteins of low molecular weight from renal tissue of rabbits exposed to Cd or Hg. *Environ. Physiol-Biochem.*, 4, 149-158.
- O'BRADY F., PANEMAGALORE M. et DAY F.A. (1979). In vivo and ex vivo induction of rat liver metallothionein. In : Metallothionein. Kägi et Nordberg Eds, 34, 261-271.
- OLAFSON R.W. et THOMPSON J.A.J. (1974). Isolation of heavy metal binding proteins from marine vertebrates. *Mar. Biol.*, 28, 83-86.
- OLAFSON R.W., SIM R.G. et BOTO K.G. (1979a). Isolation and chemical characterization of the heavy metal binding protein metallothionein from marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62B, 407-416.
- OLAFSON R.W., KEARNS A. et SIM R.G. (1979b). Heavy metal induction of metallothionein synthesis in the hepatopancreas of the crab Scylla serrata. *Comp. Biochem. Physiol.* 62B, 417-424.
- OUCHTERLONY ö. (1949). Antigen-antibody reaction in gels. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 26, 507-515.
- OVERNELL J. (1984). The partition of copper and cadmium between different charge-forms of metallothionein in the digestive tubule of the Crab, Cancer pagurus. *Comp. Biochem.*, 77C, 237-243.
- PIOTROWSKI J.K. et SZYMANSKA J.A. (1976). Influence of certain metals on the level of metallothionein-like proteins in the liver and kidneys of rats. *J. Toxicol. Environ. Hlth.*, 1, 991-1002.
- PISCATOR M. (1964). Cd in the kidneys of normal beings and the isolation of metallothionein from liver of rabbits exposed to Cd. *Nord. Hyg. Tidskr.*, 45, 76-82.
- POIRIER L. et COSSA D. (1981). Distribution tissulaire de cadmium chez Meganyctiphanes norvegica (Euphausiacée) : état naturel et accumulation expérimentale de formes solubles. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38, 1449-1453.
- POPHAM J.D. et WEBSTER J.M. (1982). Ultrastructural changes in Caenorhabditis elegans (Nematoda) caused by toxic levels of Mercury and silver. *Ecotoxicol., Environ. Saf.*, 6, 183-189.
- PORCHET M. (1974). Activité endocrine cérébrale chez les Nereidae. Données quantitatives, influence sur la teneur en glucides des ovocytes et du liquide coelomique, mécanisme régulateur de la sécrétion hormonale. Thèse Doct. Etat, Univ. Lille I.
- PORCHET-HENNERE E., M'BERI M., DHAINAUT A. et PORCHET M. (1987). Ultrastructural study of the encapsulation response of the Polychaete Annelid Nereis diversicolor. *Cell Tissue Res.* (sous presse).
- PROBST G.S., BOUSQUET W.G. et MIYA T.S. (1977a). Kinetics of cadmium-induced hepatic and renal metallothionein synthesis in the mouse. *Toxicol. appl. Pharmacol.*, 39, 51-60.
- PROBST G.S., BOUSQUET W.G. et MIYA T.S. (1977b). Correlation of hepatic metallothionein concentrations with acute cadmium toxicity in the mouse. *Toxicol. appl. Pharmacol.*, 39, 61-69.

- PUJOL M., ARLET, J., BOLLINELLI R. et CARLES P. (1970). Tubulopathie des intoxications chroniques par le cadmium. Archives des Maladies professionnelles, de Médecine du Travail et de Sécurité Sociale (Paris)., 31, 637-648.
- PULIDO P., FUWA K. et VALLEE B.L. (1966a). Determination of cadmium in biological material by A.A.S. Anal. Biochem., 14, 393-404.
- PULIDO P., KÄGI J.H.R. et VALLEE B.L. (1966b). Isolation and some properties of human metallothionein. Biochem., 5, 1768-1777.
- RADOUX D. et BOUQUEGNEAU J.-M. (1979). Uptake of mercuric chloride from sea water by Serranus cabrilla. Bull. Environ. Contamin. Toxicol., 22, 771-778.
- RAY S. et WHITE M., (1981). Metallothionein-like protein in lobsters (Homarus americanus). Chemosphere, 10, 1205-1213.
- REVIS N.W., ZINSMEISTER A.R. et BULL R. (1981). Artherosclerosis and hypertension induction by lead and cadmium ions : an effect prevented by Calcium ion. Proc. Natl Acad. Sci., 78, 6494-6498.
- REYNOLDS E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., 142, 310-325.
- RICHARDS M.P. et al. (1976). In Haguenoer J.M. et Furon D. (1981).
- RICHARDS M.P. et COUSINS R.J. (1977). Isolation of an intestinal metallothionein induced by parenteral zinc. Biochem. Biophys. Res. Commun., 75, 286.
- RICHARDS M.P. et al. (1977). In Haguenoer J.M. et Furon D. (1981).
- RIDLINGTON J.W. et FOWLER B.A. (1979). Isolation and partial characterization of a cadmium-binding protein from the American oyster (Crassostrea virginica). Chem. Biol. Interact., 25, 127-138.
- ROESIJADI G. (1981). The significance of low molecular weight, metallothionein-like proteins in marine invertebrates : current status. Mar. Environ. Res., 4, 167-179.
- SAKSENA S., WHITE M.J., MERTZLUFFT J. et LAU I.F. (1983). Prevention of Cadmium-induced sterility by zinc in the mare rat. Contraception, 27, 521-535.
- SCHWEIGER G. (1957). The toxic action of heavy metals salts on fish and organisms on which fish feed. Arch. Fischereiwiss., 8, 54-78.
- SHAIKH Z.A. et LUCIS O.J. (1971). Isolation of Cd-binding proteins. Experientia, 27, 1024-1025.
- SHAIKH Z.A. et SMITH J.C. (1977). The mechanisms of hepatic and renal metallothionein biosynthesis in Cadmium-exposed rats. Chim. Biol. Inter., 19, 161-171.
- SIEWICKI T.C., SYLDOWSKI J.S. et WEBB E.S. (1983). The nature of cadmium binding in commercial eastern oysters (Crassostrea virginica). Arch. Environ. Contamin. Toxicol., 12, 290-304.

- SIMKISS K. (1976). Intracellular and extracellular routes in biomineralisation. Symp. Soc. Exp. Biol., 30, 423-444.
- SIMKISS K. (1981). Calcium and pyrophosphate and cellular pollution. Trds Biochem. Sc., 3-5.
- SQUIBB K.S., COUSINS R.J., SILBON B.L. et LEVIN S. (1976). Liver and intestinal metallothionein : function in acute cadmium toxicity. Exp. mol. Pathol., 25, 163-171.
- STERNBERGER L.A., HARDY P.H., CUCULIES J.J. et MAYER A.G. (1970). The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry : preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antiperoxidase) and its use in identification of spirochetes. J. Histochem. Cytochem., 18, 315-333.
- STOLL R.E., WHITE J.F., MIYA T.S. et BOUSQUET W.F. (1976). Effects of cadmium in nucleic acid and protein synthesis in rat liver. Toxicol. appl. Pharmacol., 37, 61-74.
- STONE H.C. et OVERNELL J. (1985). Non-metallothionein Cadmium-binding proteins. Comp. Biochem. Physiol., 80C, 9-14.
- STONE H.C., WILSON S.B. et OVERNELL J. (1986). Cadmium binding components of scallop (Pecten maximus) digestive gland. Partial purification and characterization. Comp. Biochem. Physiol., 85C, 259-268.
- STRAUSS (1976). In Haguenoer J.M. et Furon D. (1981).
- STUVE J. et GALL P. (1970). Role of mitochondria in the handling of gold by the kidney : a study by electron microscopy probe microanalysis. J. Cell Biol., 44, 667-676.
- SUDA T., HORIUCHI N., OGATA E., EZAWA I., OTAKI N. et KIMURA M. (1974). Prevention by metallothionein of Cd-induced inhibition of vitamin D activation reaction in kidney. FEBS Let., 42, 23-26.
- SUKAWARA N. (1977). Influence of cadmium on zinc distribution in the mouse liver and kidney : Role of metallothionein. Toxicol. appl. Pharmacol., 42, 377-386.
- SUZUKI Y. et YOSHIKAWA H. (1974). Role of metallothionein in the liver and protection against Cd toxicity. Ind. Hlth, 12, 141-151.
- SUZUKI T.K., YAMAMURA M. (1979). Gel and anion exchange chromatography properties of copper containing metallothioneins. Arch. Environ. Contamin. Toxicol., 8, 471-485.
- SUZUKI K.T., SUNAGA H., AOKI Y. et YAMAMURA M. (1983). Gel permeation, ion exchange and reversed-phase columns for separation of metallothioneins by high performance liquid chromatography - atomic absorption spectrophotometry. J. Chromat., 281, 159-166.
- TALBOT B.G., BILODEAU G. et THIRION J.-P. (1986). Monoclonal antibodies against metallothioneins and metalloproteins. Mol. Immunol., 23, 1133-1136.
- TANAKA K. et SUEDA K. (1973). Cadmium binding components in the supernatant fraction of liver, kidney and intestinal mucosa homogenates of cadmium-administered rats. Jap. J. Hyg., 28, 492-496.

- TEMPLETON D.M. et CHERIAN M.G. (1983). Cadmium and Hypertension. TIPS reviews. Trds Pharmacol. Sc., 4, 501-503.
- THIND G.S. (1973). Influence of propranolol on the vascular effects of cadmium and isoproterenol in rabbit aorta. Arch. int. Pharmacol., 205, 181-191.
- TODA (1973). In Haguenoer J.M. et Furon D. (1981).
- TRAH T.J. et SCHLEYER M. (1982). Formaldehyde fixation of proteins and small polypeptides after isoelectric focusing in polyacrylamids gels. Anal. Biochem., 127, 326-329.
- TSUCHIYA (1976). In Haguenoer J.M. et Furon D. (1981).
- VAITUKAITIS J., ROBBINS J.B., NIESCHLAG E. et ROSS G.T. (1980). A rapid method for removal of (^{125}I) iodide following iodination of protein solutions. Anal. Biochem., 106, 118-122.
- VALBERG L.S., HAIST J., CHERIAN M.G., DELAQUERRIERE-RICHARDSON L. et GOYER R. (1977). Cadmium-induced enteropathy : comparative toxicity of cadmium chloride and cadmium-thionein. J. Toxicol. Environ. Hlth, 2, 963-975.
- VALLEE B.L. (1979). Metallothionein : historical. Review and perspectives. In : Metallothionin, Kägi J.H.R. et Nordberg M. eds, p. 19-40.
- VALLEE B.L. et ULMER D.D. (1972). Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. Ann. Rev. Biochem., 41, 91-128.
- VERNBERG W.B., DE COURSEY P.J. et O'HARA J. (1974). Multiple environmental factor effects on physiology and behavior of the Fiddler crab, Uca pugilator. In : Pollution and Physiology of marine organisms. Vernberg F.J. et Vernberg W.B. eds, Acad. Press, New York, San Francisco, London, p. 381-425.
- WASSERMAN R.M. et KALLFELZ F.A. (1970). Transport of calcium across biological membranes. In : Biological calcification. Schraer H. ed., Amsterdam, p. 313-345.
- WEBB M. (1972). Binding of Cd ions by rat liver and kidney. Biochem. Pharmacol., 21, 2751-2771.
- WESER U., DONAY F. et RUPP H. (1973). Cadmium-induced synthesis of hepatic metallothionein in Chicken and Rats. FEBS Let., 32, 171-173.
- WHANGER P.D. et RIDLINGTON J.W. (1981). Role of metallothionein in zinc metabolism. In : Biological roles of metallothionein. Foulkes E.C. ed, Elsevier-North Holland, p. 263-278.
- WHANGER P.D. et DEAGEN J.T. (1983). Effect of dietary mercury level and cadmium on rat tissues metallothionein : mercury binding and influences on zinc. Environ. Res., 30, 372-380.
- WHITE S.L. et RAINBOW P.S. (1986). A preliminary study of Cu-, Cd and Zn-binding components in the hepatopancreas of Palaemon elegans (Crustacea : Decapoda). Comp. Biochem. Physiol., 83C, 111-116.
- WIGGLESWORTH V.B. et SALPETER M.M. (1962). Histology of the Malpighian tubules in Rhodnius prolixus Stal (Hemiptera). J. Insect Physiol., 8, 299-307.

- WINGE D.R., PREMAKUMAR R. et RAJAGOPALAN K.V. (1975). Metal-induced formation of metallothionein in rat liver. Arch. Biochem. Biophys., 170, 242-252.
- WONG V.W.T. et RAINBOW P.S. (1986). Two metallothioneins in the shore Crab, Carcinus maenas. Comp. Biochem. Physiol., 83A, 149-156.
- WOODWORTH J., EVANS A.S.A. et PASCOE D. (1983). The production of cadmium binding protein in three species of freshwater fish. Toxicol. Lett., 15, 289-295.
- YAMAMURA M., MORI T. et SUZUKI K.T. (1981). Metallothionein induced in the earthworm. Experientia, 37, 1187-1189.
- YAMAMURA M., SUZUKI K.T., HATAKEYAMA S. et KUBOLA K. (1983). Tolerance to Cadmium and Cadmium-binding proteins induced in the midge larva Chironomus yoshimatsui (Diptera Chironomidae). Comp. Biochem. Physiol., 75C, 21-24.
- YAMAMURA M. et SUZUKI K.T. (1984). Isolation and characterization of metallothionein from the tortoise Clemmys mutica. Comp. Biochem. Physiol., 79C, 63-69.
- YAU E.T. et MENNEAR J.H. (1977). Pancreatic metallothionein : protection against cadmium-induced inhibition of insulin secretory activity. Toxicol. appl. Pharmacol., 39, 515-520.
- YONEYAMA M., SHARMA R.P. et KLEINSCHUSTER S.J. (1983). Methylmercury and organogenesis in vitro : inhibition of glutamine synthetase induction and alteration of selected cellular enzymes in aggregation of dissociated embryonic chick retinal cells. Arch. Environ. Contamin. Toxicol., 12, 157-162.
- YOSHIKAWA H. (1970). Preventive effect of pretreatment with low dose of metals in the acute toxicity of metals in mice. Ind. Health, 8, 184-191.
- YOSHIKAWA H. (1973). Ind. Health, 11, 113.
- YOUNG J.S. et ROESIJADI G. (1983). Reparatory adaptation of copper-induced injury and occurrence of a copper-binding protein in the polychaete, Eudistylia vancouveri. Mar. Poll. Bull., 14, 30-32.

RESUME

Dans notre étude, nous avons montré que le ver marin, Nereis diversicolor, résiste bien à une concentration de 22 ppm de cadmium ajouté expérimentalement à l'eau d'élevage, à condition que la température ne soit pas trop élevée (4 à 13°C).

La toxicité du métal lourd est en effet température-dépendante et devient importante vers 16°C.

La structure fine des tissus est très peu altérée lors d'une intoxication chronique. Il convient toutefois de noter l'apparition spectaculaire de sphérocristaux dans l'intestin et la dégranulation des granulocytes I (cellules libres dans la cavité coelomique du ver (Dhainaut, 1984)).

Parmi les moyens de détoxification possibles, deux sont maintenant bien établis : la faible bioaccumulation du cadmium étudiée par dosages par S.A.A.F. et la présence de deux métalloprotéines capables de complexer le métal (masse moléculaire supérieure à 100 kD et voisine de 10 kD). La dernière protéine dont la masse moléculaire apparente (10 kD) est comparable à celle des métallothionéines a retenu notre attention. Appelée métalloprotéine II (MP II) parce qu'elle apparaît sur le deuxième pic après filtration sur Séphadex G 75, cette protéine est maintenant parfaitement purifiée et caractérisée. Il est certain que ses propriétés et sa composition en acides aminés diffèrent de celles des métallothionéines et il semble également très probable que cette MP II possède, en fait, une forme dimérique.

Des anticorps poly- et monoclonaux ont été obtenus contre la MP II. Son site de synthèse révélé par l'étude immunocytochimique en microscopie électronique est situé dans les granulocytes I, cellules déjà connues pour leur rôle de défense antibactérienne.

L'étude de la structure moléculaire de la MP II et de son mécanisme d'action se poursuit.

