

50376
1992
262

62767

50376
1992
262

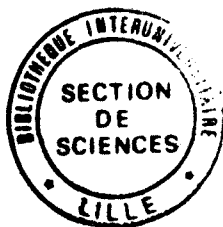
UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

UFR DE BIOLOGIE

THESE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR D'UNIVERSITE EN
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par



Sylvain DEMUYNCK



IDENTIFICATION DES METALLOPROTEINES (MYOHEMERYTHRINE ET
HEMOGLOBINE) LIANT LE CADMIUM CHEZ L'ANNELIDE POLYCHETE
ENDOBENTHIQUE *NEREIS DIVERSICOLOR*. DISTRIBUTION TISSULAIRE ET
CINETIQUE DU METAL EN CONDITIONS EXPERIMENTALES

Présentée le 2 décembre 1992 devant la Commission

JURY : Président : M. A. DHAINAUT
 Rapporteurs : M. J. JOOSSE,
 : M. Z. MASSOUD
 Examineurs : Mme N. DHAINAUT-COURTOIS,
 : Melle P. VASSEUR

*A ma femme Catherine
et mon fils Kévin*

REMERCIEMENTS

Je remercie Madame le Professeur N. DHAINAUT-COURTOIS, dirigeant le Service d'Ecotoxicologie du Laboratoire de Biologie Animale de l'Université des Sciences et Technologies de Lille , qui m'a accueilli dans son service et qui a assuré le suivi du travail de thèse.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur A. DHAINAUT, Directeur du Laboratoire de Phylogénie Moléculaire des Annélides (ERS 20 CNRS) , pour le vif intérêt qu'il a porté à mon travail. Je le remercie également d' accepter de présider mon jury de thèse.

J'ai pu déterminer la séquence de la protéine MP II dans le Laboratoire de Biologie de l'Université Libre d'Amsterdam dirigé par Monsieur le Professeur J. JOOSSE. Je tiens tout particulièrement à lui exprimer ma gratitude et par ailleurs, je le remercie d'accepter de juger ce travail.

Je remercie Monsieur Z. MASSOUD, Directeur Scientifique de l'IFREMER qui me fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de mon travail.

Je remercie Mademoiselle le Professeur P. VASSEUR du Centre des Sciences de l'Environnement de Metz d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur P. SAUTIERE qui m'a permis de démarrer le travail de séquence dans son laboratoire (URA 409 CNRS) et Monsieur le Docteur D. KMIECIK dont l'aide m'a été précieuse dans cette partie du travail.

J'adresse mes vifs remerciements à Messieurs les Docteurs K.W.LI et R. VAN der SCHORS du laboratoire de Biologie de l'Université Libre d'Amsterdam sans lesquels ce travail n'aurait pu aboutir.

Il m'est agréable de remercier toutes les personnes du Laboratoire ERS 20 CNRS qui ont contribué à ce travail et en particulier Madame E. PORCHET-HENNERE, Directeur de recherche CNRS, qui m'a fourni les anticorps anti-MP II et Monsieur le Docteur J.-L. BAERT pour ses conseils en biochimie.

Je remercie Madame F. BONET qui a assuré la mise en forme et la dactylographie de ce mémoire.

Enfin, je tiens particulièrement à remercier ma femme CATHERINE, mes parents et mes beaux-parents ainsi que mes amis qui m'ont soutenu tout au long de ce travail.



SOMMAIRE

	Page
INTRODUCTION	1
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I - Le cadmium dans l'environnement	3
II - Sources d'exposition et effets du cadmium chez l'homme	4
III - Réactions de défense de l'organisme	5
III.1- Elimination	5
III.2- Intervention de la métallothionéine	6
IV - Effet du cadmium chez les invertébrés	6
IV.1- Bioaccumulation	7
IV.2- Stockage	8
IV.3- Moyens de résistance et de détoxification	8
IV.3.1- Excrétion du cadmium	8
IV.3.2- Les métalloprotéines liant le cadmium	9
IV.3.2.1- La métallothionéine <i>sensu stricto</i>	9
IV.3.2.2- Les métalloprotéines proches des métallothionéines	10
IV.3.2.3- Les métalloprotéines non-métallothionéines	11
IV.3.2.4- Métalloprotéines de masse moléculaire élevée	11
IV.3.2.5- Rôle des métallothionéines et des métalloprotéines	12
IV.3.3- Structures intracellulaires de stockage des métaux lourds	13
IV.3.3.1- Les lysosomes	13
IV.3.3.2- Les sphérocristaux et formations minérales	13
MATERIEL et METHODES	15
I - Matériel biologique	15
I.1- Présentation de <i>Nereis (Hediste) diversicolor</i> O.F. Müller	15
I.2- Récolte et maintien des animaux	15
II - Méthodes	16
II.1- Conditions d'exposition des néréis au cadmium	16
II.2- Extraction tissulaire	16
II.3- Techniques chromatographiques pour l'étude des métalloprotéines liant le cadmium	16
II.3.1- Préparation de la métalloprotéine MP II	16
II.3.2- Etude de la métalloprotéine MPI	17
II.4- Méthodes électrophorétiques	18
II.4.1- Electrophorèse monodimensionnelle en milieu dénaturant (SDS)	18
II.4.2- Electrophorèse bidimensionnelle	18

II.4.3-	Transfert électrophorétique des protéines	18
II.4.4-	Electrofocalisation	19
II.5-	Dosage des métaux par absorption atomique	19
II.5.1-	Spectrophotométrie d'absorption atomique en flamme (SAAF)	19
II.5.2-	Torche à plasma d'argon	20
II.6-	Spectrométrie de masse	20
II.7-	Méthode immunologiques	20
II.7.1-	Immunodétection des protéines après transfert électrophorétique	20
II.7.2-	"Slot-immunobinding assay"	21
II.7.3-	Immunocytochimie	21
II.7.3.1-	Incubation dans le sérum spécifique	21
II.7.3.2-	Incubation dans le sérum marqué	22
II.7.3.3-	Révélation	22
II.8-	Séquençage en acides aminés de la protéine MP II de la néréis	22
II.8.1-	Principe de la dégradation d'Edman	22
II.8.2-	Séquençage N-terminal	23
II.8.3-	Clivage de la molécule et séparation des peptides par HPLC	23
II.8.3.1-	Coupage chimique par le bromure de cyanogène (CNBr)	23
II.8.3.2-	Clivages enzymatiques	24
II.9-	Techniques utilisées pour la mise en évidence des sites tissulaires d'accumulation du cadmium	25
II.9.1-	Radioautographie	25
II.9.2-	Technique histochimique de détection des cations métalliques divalents	25
II.9.2.1-	Principe de la technique	25
II.9.2.2-	Préparation des échantillons	26
II.9.2.3-	Réaction	26
II.9.2.4-	En microscopie électronique	26
II.10-	Technique de coloration négative (microscopie électronique)	27
RESULTATS		28
I - Etude de la protéine MP II liant le cadmium		28
I.1- Préparation de la protéine MP II		28
I.1.1-	Fractionnement de l'extrait soluble de néréis exposées au cadmium	28
I.1.2-	Fractionnement du pic II B	29
I.1.3-	Recherche de la MP II dans les fractions obtenues après la chromatographie d'échange d'ions	30
I.1.4-	Analyse électrophorétique	30
I.1.5-	Electrofocalisation	30
I.1.6-	Dessalage de la MP II	30

I.2-	Détermination de la structure primaire de la protéine MP II liant le cadmium	31
I.2.1-	Détermination de la séquence N-terminale de la MP II	31
I.2.2-	Séquence en acides aminés de l'isoforme de la protéine MP II liant le cadmium	31
I.2.2.1-	Clivage chimique par le CNBr	32
I.2.2.2-	Clivage enzymatique par l'endoprotéinase Arg-C du fragment M 2	33
I.2.2.3-	Clivage de la protéine par une endoprotéinase Lys-C spécifique	33
I.3-	Masse moléculaire de la MP II	34
I.4-	Contenu métallique	34
II -	Relations entre la MP II de la néréis, les myohémérythrines et les hémérythrines coelomiques	35
II.1-	Comparaison des séquences en acides aminés	35
II.2-	Identité immunologique	37
	Discussion	38
III -	Etude de la métalloprotéine MP I de <i>Nereis diversicolor</i>	40
III.1-	Identification de la métalloprotéine MP I	41
III.2-	Structure de la MP I en microscopie électronique	42
	Discussion	42
IV -	Etude de l'accumulation du cadmium chez <i>Nereis diversicolor</i>	43
IV.1-	Dans les animaux entiers	43
IV.2-	Dans les fractions soluble et insoluble	44
IV.3-	Distribution du cadmium entre les protéines de la fraction soluble	45
V -	Sites d'accumulation du cadmium	46
V.1-	Distribution tissulaire du cadmium	46
V.1.1-	Détection histochimique	46
V.1.2-	Radioautographie (Cd^{109})	47
V.2-	Sites intracellulaires de stockage du cadmium	47
	DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS	49
	BIBLIOGRAPHIE	

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les recherches rapportées dans cette thèse entrent dans le cadre d'une approche, en conditions expérimentales, des effets biologiques d'un élément minéral toxique, le cadmium, chez une annélide polychète estuarienne : *Nereis diversicolor* O.F. Müller (*Hediste diversicolor*, nouvelle dénomination).

Cette étude a été réalisée dans le Laboratoire de Phylogénie moléculaire des Annélides (ERS 20 CNRS) sous la direction du Professeur N. Dhainaut-Courtois et avec la collaboration de laboratoires extérieurs, en particulier le Laboratoire de Biologie de l'Université Libre d'Amsterdam (Pays-Bas). Elle a bénéficié partiellement du support financier de deux contrats [Programme Interdisciplinaire de Recherches sur l'Environnement (PIREN)/CNRS ; IFREMER/Région Nord-Pas-de-Calais].

Très abondante dans les zones estuariennes où les teneurs en éléments minéraux toxiques (tels que le cadmium ou le plomb) sont très souvent élevées, *Nereis diversicolor* a été étudiée afin de déterminer les moyens lui conférant cette importante capacité d'adaptation. Les travaux antérieurs (Dennaï, 1984 ; Nejmeddine, 1987) ont montré qu'en conditions expérimentales, le cadmium s'accumule principalement dans la fraction soluble des animaux. A ce niveau, il se lie à des protéines de masse moléculaire élevée : métalloprotéine I (MP I > 70 kDa) et faible : métalloprotéine II (MP II: comprise entre 20 et 10 kDa) (Dennaï *et al.*, 1986). Cette dernière protéine a été isolée et sa composition en acides aminés a montré qu'il ne s'agissait pas d'une métallothionéine en raison de sa très faible teneur en cystéine (0,9 moles pour 100 moles d'acides aminés) et de la présence d'acides aminés aromatiques (Nejmeddine *et al.*, 1988). Par ailleurs, la fabrication d'anticorps poly- et monoclonaux dirigés contre la MP II a permis de montrer qu'elle était localisée dans certains granules d'une catégorie de cellules libres du milieu intérieur, les granulocytes de type I (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1987 ; Porchet-Henneré *et al.*, 1987).

Dans notre travail, nous nous sommes attaché à préciser la nature de cette protéine liant le cadmium par la détermination de sa structure primaire. Nous avons également déterminé la nature du composé MP I de masse moléculaire plus élevée. Enfin, les sites d'accumulation du cadmium chez la néréis ont été précisés.

L'exposé de ces recherches est conduit de la façon suivante :

- après un rappel des principaux effets du cadmium chez l'homme, nous avons résumé l'état actuel des connaissances relatives aux effets du cadmium chez les invertébrés marins en insistant sur les moyens de résistance et de détoxification les plus décrits : métalloprotéines liant le cadmium et stockage cellulaire ;
- le matériel et les techniques utilisées dans ce travail sont ensuite décrits ;

- les résultats expérimentaux sont présentés en 5 parties.
 - . La première et la seconde partie sont consacrées à la caractérisation de la métalloprotéine MP II de faible masse moléculaire liant le cadmium, par la détermination de sa structure primaire et la comparaison de cette métalloprotéine avec d'autres protéines ayant des similarités de structure.
 - . La troisième partie concerne le ligand du cadmium de masse moléculaire élevée MP I.
 - . La quatrième partie traite de l'accumulation du cadmium chez la néréis, dans les animaux entiers, dans les fractions insolubles et solubles et également au sein de la fraction soluble en fonction de la dose et de la durée de l'exposition au métal.
 - . Enfin, la dernière partie concerne la recherche des sites tissulaires de stockage du cadmium chez la néréis.

Dans une discussion générale terminant cette thèse, la signification de l'implication des deux protéines MP I et MP II dans la fixation du cadmium est analysée et un schéma général des différentes étapes de la métabolisation du cadmium chez la néréis est proposé.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I - Le cadmium dans l'environnement

Avant le développement industriel, les principales sources d'exposition au cadmium provenaient des retombées volcaniques, de l'érosion des roches et du lessivage des sols contenant naturellement du cadmium. Les risques d'intoxication étaient alors très limités en raison de sa faible teneur dans les compartiments géochimiques et la lenteur de la mobilisation du cadmium par l'air et l'eau. Depuis 1829, date à laquelle a commencé la production industrielle du cadmium, celle-ci n'a cessé d'augmenter. De 80 tonnes par an avant 1914, la production mondiale du cadmium a atteint plus de 18 000 tonnes par an en 1979. Ce n'est qu'avec la maladie itaï-itaï survenue au Japon en 1946 à la suite de la consommation d'eau de boisson et d'aliments pollués (riz, poisson, céréales...) par le cadmium, que la prise de conscience des risques d'intoxication liée au rejet de cadmium dans l'environnement a réellement vu le jour et que des réglementations ont été établies. Cependant, le problème demeure car moins de 5 % du cadmium consommé étant recyclé, le reste est disséminé dans l'environnement. Celui-ci atteint le milieu marin par les voies atmosphérique et aquatique. Selon le groupe de travail GESAMP (Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution, 1985), l'activité humaine représente 50 % des apports en cadmium à l'océan. Selon Nriagu (1980), le flux anthropique de cadmium vers l'atmosphère serait de 5,5 à 7,3.10³ tonnes/an provenant principalement de la métallurgie (73 %), de l'incinération des déchets (19 %) et de la fabrication des engrais phosphatés contenant du cadmium (3 %). En comparaison, les sources naturelles d'émission se situeraient entre 0,4 et 0,8.10³ tonnes/an. Les apports en cadmium à l'océan par la voie aquatique sont également très élevés. Ils ont été estimés entre 400 et 7000 tonnes/an pour le cadmium dissous (Cossa et Lassus, 1989). Bien que les teneurs dans les eaux de surface et dans les sédiments en milieu océanique demeurent faibles (respectivement 5 ng/l et 0,2 µg/g), dans les mers et les zones estuariennes et littorales celles-ci sont beaucoup plus élevées, résultant à la fois du phénomène de mobilisation de cadmium à partir des particules fluviales et des sédiments mais surtout des rejets d'effluents industriels et urbains, des rejets de station d'épuration, des engrais phosphatés et de la déposition atmosphérique en provenance des centres industriels. Ainsi à l'échelle nationale, des zones touchées par la contamination ont été identifiées sur le littoral au niveau de la vasière Ouest-Gironde, du bassin Marennes-Oléron et également dans la baie de la Seine. Sur le littoral Nord/Pas-de-Calais, la situation est également très préoccupante. C'est en effet la région du littoral où le flux de cadmium par les retombées atmosphériques est le plus élevé (600 µg/m²/an, Flamant, 1985). Outre le milieu physique, le compartiment biologique est également atteint. Le cadmium se concentre à la fois dans les végétaux et les animaux. Métal parmi les plus toxiques avec le mercure car n'ayant aucun rôle physiologique connu, la modification du cycle biogéochimique est à la fois une source de risques pour l'équilibre de l'écosystème mais également pour la santé humaine.

II - Sources d'exposition et effets du cadmium chez l'homme

En dehors des expositions liées à l'utilisation du cadmium en milieu professionnel, l'homme y est exposé par l'intermédiaire de l'air, des eaux de boissons et des aliments. L'apport par l'air représente selon Muskett *et al.* (1979) une charge de 1,5 µg/j de Cd. Afin de prévenir les intoxications par l'intermédiaire de l'eau, un critère de 0,5 µg/l a été proposé pour les eaux douces aux USA par l'Agence pour la protection de l'environnement (USEPA). Pour la CEE la concentration en cadmium de l'eau potable doit être inférieure à 5 µg/l (directive du 16 juin 1975). On estime jusqu'à 20 µg l'apport journalier par l'intermédiaire de l'eau. Concernant l'exposition par l'intermédiaire des aliments, celle-ci est la plus élevée. Le cadmium se concentre en effet de manière importante dans certaines denrées alimentaires telles que le lait et les céréales, les viandes et particulièrement les abats comme le foie et les rognons (Sharma et Shupe, 1977 ; Ragaini *et al.*, 1977) et dans les organismes aquatiques tels que les mollusques et certains crustacés. En France, des teneurs moyennes de 100 µg de cadmium ont été relevées dans des huîtres de Gironde, la consommation de 2 huîtres représentant une quantité de cadmium proche de la quantité maximale admissible quotidiennement (Cossa et Lassus, 1989). Selon le groupe d'études FAO/WHO (1972), l'apport alimentaire tolérable pour un adulte serait de 57 à 71 µg/Cd par jour. Cependant, selon Friberg *et al.* (1974), un apport quotidien de 200 à 390 µg/Cd chez un adulte entraînerait l'apparition de lésions rénales à l'âge de 50 ans. Le tabac est également une importante source d'apport de cadmium et constitue certainement une interférence dans la pathologie pulmonaire (emphysème). Selon Lauwerys (1983), la charge corporelle en cadmium serait deux fois plus importante chez un fumeur.

L'introduction du cadmium dans l'organisme se fait principalement par les voies pulmonaires (surtout en milieu professionnel) et par la voie digestive. Selon l'USEPA (1980) l'absorption par cette dernière voie est faible et représente environ 5 % du cadmium ingéré, valeur également retenue par l'OMS (Organisation Mondiale pour la Santé). Par des études réalisées chez des individus atteints de la maladie itaï-itaï, il a été montré que l'absorption du cadmium augmente sous l'effet de carences en calcium, en fer ou en protéines. La charge en cadmium augmente avec l'âge. D'environ 1 µg chez le nouveau-né, elle atteindrait 10 à 30 mg chez l'adulte de 50 ans (GESAMP, 1985). Le cadmium dans l'organisme est véhiculé par le sang (Snyder *et al.*, 1975) ; il est lié initialement à la plasmalbumine (Friberg *et al.*, 1974) puis au niveau des érythrocytes à des protéines telles que la métallothionéine et l'hémoglobine (Lucis *et al.*, 1969 ; Nordberg, 1972 ; Nordberg et Nordberg, 1975).

Les principaux organes où s'accumule le cadmium sont les poumons (exposition en milieu professionnel et chez les fumeurs), le foie et surtout le rein. Dans ces deux derniers, Pulido *et al.* (1966) ont montré la synthèse d'une protéine riche en cystéine, la métallothionéine, ayant la capacité de fixer les métaux lourds, par ordre d'affinité décroissante, Hg, Cd, Zn, Cu, par des liaisons avec les groupements thiols. Dans le rein, le cadmium se concentre essentiellement au niveau du cortex. Cette accumulation représenterait un tiers du contenu total

en cadmium du corps (GESAMP, 1985). Dans cet organe, les lésions surviennent au niveau du cortex à partir d'une concentration critique estimée à 200 µg/g de poids frais (OMS) et se traduisent par une diminution de la réabsorption tubulaire des protéines (GESAMP, 1985). Cette lésion est considérée comme le premier signe de l'intoxication humaine. La protéinurie concerne plutôt des protéines de masse moléculaire élevée telles que les immunoglobulines G, l'albumine ou la transferrine. Plus tardivement ces lésions entraînent l'aminocidurie concernant surtout la thréonine et la sérine, mais également la glucosurie et l'enzymurie.

Dans le cas des intoxications chroniques (cas de la maladie itaï-itaï par exemple), en plus des lésions rénales, on note l'apparition de pseudofractures dans les os, parfois de calcs osseux et d'une déminéralisation osseuse (ostéomalacie). Cette dernière pourrait résulter d'une perturbation de la régulation calcique et de l'homéostasie du phosphore engendrée par les lésions rénales (*in* Haguenoer et Furon, 1981). En ce sens, expérimentalement, le cadmium diminue l'incorporation du calcium dans les os (Yamagushi et Yamamoto, 1976 ; Ando *et al.*, 1978). Surtout observée chez les femmes âgées, enceintes ou allaitant un enfant, il semblerait que cette déminéralisation osseuse résulte de la contamination par le cadmium associée à des déficiences en calcium et en vitamine D, ainsi qu'à des perturbations hormonales liées à la grossesse ou la lactation (Tsuchiya, 1978).

Possédant la propriété de se fixer aux radicaux thiols et au niveau des groupements sulfate ou carbonyle, le cadmium entraîne la perturbation du métabolisme des acides aminés soufrés et la modification de l'activité de certaines enzymes. Le cadmium agit également en compétition avec certains cations métalliques comme le Ba²⁺ ou le Ca²⁺, sur les systèmes enzymatiques de la contraction musculaire, principalement des muscles lisses vasculaires (Toda, 1973) ou avec le Fe²⁺ et Cu²⁺ co-facteurs des monoamines oxydases (Glauser *et al.*, 1976). La toxicité du cadmium est diminuée par le zinc et expérimentalement par le sélénium (USEPA, 1980 ; Stokinger, 1981). Enfin, des effets activateurs ou inhibiteurs du cadmium sur divers réactions et métabolismes ont été décrits. On peut citer l'augmentation du catabolisme de la sérum albumine (Kench et Sutherland, 1967), l'augmentation des réactions d'oxydoréduction et des réactions de phosphorylation des mitochondries (Jacobs *et al.*, 1956) ou l'inhibition de la β-oxydation des acides gras (Vigliani *et al.*, 1966).

III - Réactions de défense de l'organisme

III.1.- Elimination

Le cadmium est un toxique cumulatif. A ce titre son élimination est faible. La demi-vie biologique du cadmium dans le corps est en effet estimée entre 10 et 30 ans (Friberg *et al.*, 1974). L'élimination s'effectue par l'urine, les fécès et également à un degré moindre par les phanères. Normalement faible, l'excrétion urinaire du cadmium augmente dès que les lésions rénales apparaissent (Friberg *et al.*, 1974) à la fois en raison d'une détérioration de l'épithélium tubulaire et d'une diminution de la réabsorption du cadmium au niveau des tubules proximaux

(Roels *et al.*, 1981). Supérieure à l'excrétion urinaire, l'excrétion fécale représente l'élimination du cadmium présent dans la bile et les sécrétions pancréatiques (Elinder *et al.*, 1978).

III.2- Intervention de la métallothionéine

Le terme de métallothionéine revient à Margoshes et Vallée (1957) lesquels ont mis en évidence dans le cortex rénal du cheval l'existence d'une protéine ayant un taux très élevé en cystéine (environ 33 %) et également relativement riche en cadmium et en zinc. Elle a ensuite été rapportée chez d'autres mammifères dont l'homme mais également chez les oiseaux (Weser *et al.*, 1973), chez les poissons (Bouquegneau et Noël-Lambot, 1978 ; McCarter et Roch, 1983 ; Delval, 1984). Son rôle physiologique n'est pas connu avec certitude. Il semble qu'elle soit impliquée dans la régulation de métaux essentiels tels que le zinc et le cuivre. Chez l'homme, elle est synthétisée principalement par le foie et secondairement les reins (Magos, 1974), la rate (Amacher et Ewing, 1975), l'intestin (Squibb *et al.*, 1976) mais également par les testicules, le pancréas et d'autres organes. Sa synthèse est inductible par certains métaux lourds dans l'ordre décroissant : Cd, Hg, Zn et Cu (Webb, 1972 ; Chen *et al.*, 1975 ; Bremner et Young, 1976). Sa capacité à fixer les métaux lourds non-essentiels (Hg, Cd) a conduit à l'hypothèse d'un rôle de protection de cette protéine contre les toxiques métalliques. Cet effet protecteur se traduirait par la transformation du cadmium en une forme biologiquement inactive après sa fixation aux résidus de cystéine (Piscator, 1964 ; Nordberg, 1971 ; Nordberg *et al.*, 1971). De même la métallothionéine présente dans la muqueuse intestinale constitue probablement une barrière à l'absorption du cadmium par voie digestive (Tanaka et Sueda, 1973 ; Valberg *et al.*, 1977). Ce rôle de protection est appuyé par le fait qu'au niveau du foie l'apparition de cette protéine se fait entre 2 et 5 heures après l'injection de métal chez les mammifères, la synthèse étant maximale vers une dizaine d'heures (Chen *et al.*, 1975 ; Shaikh et Smith, 1977). Dans le rein les délais sont plus courts, de 30 minutes (Probst *et al.*, 1977) et 3 à 5 heures (Shaikh et Smith, 1977). Plus récemment, ce rôle a été remis en question par le fait que l'induction de la synthèse de la métallothionéine peut également être provoquée par une grande variété de composés organiques et des facteurs physiologiques (*in* Kāgi et Schäffer, 1988). De plus, la production de quantités excessives de Cd-thionéine a été soupçonnée comme facteur responsable des lésions rénales dans le cas d'intoxications chroniques par le métal (Nordberg et Nordberg, 1987).

IV - Effet du cadmium chez les invertébrés

Outre les études menées chez les vertébrés, de nombreux travaux ont été effectués chez les invertébrés et notamment sur les espèces marines représentant une des causes majeures dans les intoxications par le mercure de populations au Japon (maladie de Minamata, 1953-1960) et par le cadmium (maladie itaï-itaï, 1946). Une attention particulière a été portée sur les mécanismes contrôlant la bioaccumulation et également sur les moyens mis en œuvre par ces

organismes pour tolérer d'importantes charges de ces métaux toxiques sans apparemment présenter de lésions.

IV.1- Bioaccumulation

Chez les organismes marins, l'accumulation du cadmium s'effectue à la fois par l'intermédiaire de l'eau, de la nourriture et des particules détritiques. Il est généralement admis que l'eau représente la source d'apport majeure et ceci particulièrement chez les animaux de petite taille (*in* Cossa et Lassus, 1989). L'apport par l'alimentation ne représenterait que 10 %. En milieu marin, les formes chimiques dominantes et les plus stables dans l'eau sont les complexes ioniques chlorés (Dyrssen et Wedborg, 1973). A la fois par des mesures réalisées *in situ* sur la moule (*Mytilus edulis*) (Cossa, 1989) et par des expositions menées en laboratoire sur différents invertébrés marins [les crustacés : *Panaeus duorum* et *Palaemonetes vulgaris* (Nimmo *et al.*, 1977), *Palaemonetes pugio* (Engel et Fowler, 1979) ; les annélides : *Nereis diversicolor* (Bryan et Hummerstone, 1973), *Nereis virens* (Ray *et al.*, 1980), *Nereis japonica* (Ueda *et al.*, 1976), *Glycera dibranchiata* (Rice et Chien, 1979)], il a été montré que l'accumulation du cadmium est proportionnelle à la concentration dans le milieu. Dans le cas des expérimentations en laboratoire, l'accumulation varie de plus linéairement avec la durée de l'exposition chez la majorité des espèces étudiées. Selon Ray (1984), l'accumulation du cadmium à partir de l'eau de mer s'effectuerait par un phénomène de diffusion passive à travers les surfaces perméables de l'animal.

Les différentes voies de pénétration sont classiquement le tégument, la surface intestinale et les branchies lorsqu'elles existent. La première phase de la capture du métal consisterait en une occupation des sites cationiques des membranes. Il semble que le métal puisse, en plus de la diffusion, pénétrer par un processus actif en empruntant par exemple les pompes à calcium (Bjerregaard et Depledge, 1988). Cependant, selon Ray (1984), ce transport actif serait quasi inexistant aux faibles concentrations de cadmium trouvées dans l'eau de mer ou utilisées dans les études expérimentales.

La bioconcentration du cadmium de l'eau de mer chez les organismes marins se traduit par des facteurs de concentration entre les organismes et l'eau variant de 10^2 à 10^5 selon les espèces (*in* Cossa et Lassus, 1989). Cette concentration est à la fois sous la dépendance de nombreux paramètres abiotiques (saison, température, salinité, forme chimique du métal et interactions avec les autres métaux du milieu) et de paramètres biotiques (âge, sexe, taille, mode et rythme d'alimentation, état physiologique). Cependant, malgré les variations, les différents groupes biologiques ont pu être classés selon leur niveau de concentration en cadmium (Bryan, 1976) (fig. 1).

Groupe		Niveau de concentration ($\mu\text{g/g}$ de poids sec)
Plancton		2
Algue macroscopique		1,2
Copépode		4
Cœlentéré		0,2
Polychète		0,1
Mollusque	céphalopode	1,0
	huître	15,5
	moule	5,1
	patelle	1-12
	bigorneau	2,0
Tunicier		< 1
Poisson (muscle) (1)		0,03-0,2

Figure 1 Niveau de concentration en cadmium dans différents groupes d'organismes marins, d'après Bryan (1976). (1), Amiard *et al.*, 1983.

Les mollusques ont généralement les facteurs de concentration les plus élevés, principalement les bivalves, par le fait qu'ils filtrent des quantités importantes d'eau de mer pour assurer leur respiration et leur nutrition. A ce titre, chez la moule, l'introduction du cadmium se fait principalement par les branchies (Pasteels, 1968).

IV.2- Stockage

Comme les vertébrés, les invertébrés stockent le cadmium au niveau d'organes-cibles. Ceux-ci sont : le foie ou son équivalent [hépatopancréas ou glande digestive (Engel *et al.*, 1985 ; Overnell, 1986)], le rein (Gould *et al.*, 1985 ; Robinson *et al.*, 1985) et les branchies (Dethlefsen, 1977). Chez les crustacés décapodes, la glande verte représente également un site majeur d'accumulation du cadmium (Eisler *et al.*, 1972 ; Hutcheson, 1974 ; Jennings et Rainbow, 1979 ; Davies *et al.*, 1981 ; Ray *et al.*, 1981). C'est au niveau du foie et ses équivalents, du rein et des branchies qu'a été rapportée l'existence de métalloprotéines chez les mollusques et les crustacés. Dans le cas des annélides, l'intestin interviendrait dans le stockage de cadmium associé à des métalloprotéines (Morgan *et al.*, 1989 ; Nejmeddine, 1992).

IV.3- Moyens de résistance et de détoxication

IV.3.1- Excrétion du cadmium

Chez les invertébrés marins, l'élimination du cadmium est généralement très faible, voire nulle (Ray, 1984). Ainsi, chez la moule *Mytilus edulis*, la demi-vie biologique du cadmium a été estimée entre 14 et 29 jours (Scholz, 1980). Chez l'huître *Crassostrea virginica* contaminée expérimentalement puis replacée dans de l'eau non polluée pendant 40 jours, il n'a pas été constaté de baisse de la concentration en cadmium (Greig et Wenzloff, 1978 ; Zarogian, 1979). De tels résultats ont également été observés en transférant des animaux de zones contaminées dans des zones réputées non polluées (Luten *et al.*, 1986). Chez les crustacés, par contre,

Figure 2 Structure primaire des métallothionéines de classe I (1-8) et II (9). La numérotation est basée sur la séquence de la MT-2 humaine. (-) espacements introduits pour un meilleur ajustement des différentes séquences, (.) séquences incomplètes. (Ac) Acétyl. (x) Acides aminés non déterminés.

	1	10	20	30
Vertébrés MT Classe I	1	AcMDP - N C S C A A G D S	- C T C A G S C K C K E C K C T S C K K	- - - - S C C S
	2	AcMDP - N C S C P T G G S	- C T C A G S C K C K E C R C T S C K K	- - - - S C C S
	3	AcMDP Q D C T C A A G D S	- C S C A G S C K C K N C R C R S C R K	- - - - S C C S
	4	AcMDP - - C E C S K T G T	- C N C G G S C T C K N C S C T T C N K	- - - - S C C P
Invertébrés MT Classe I	5	S D P - - C N C I E T G T	- C A C S D X C P A T G C K C G P
	6	P G P - - C - C - - K D K	- C E C A E G G C K T G C K C T S	- C R C A P - - - C E
	7	P G P - - C N C I E T N V	- C I C G T G C S G K C C R C G D A C K C A S G C K C S	
	8	P D P - - C - C - - N D K	- C D C K E G E C K T G C K C T S C R C	- - - - P P C E
MT Classe II	9	M P D V K C V C C T E G K E C A C F G Q D C C V T G E C C K D G	- - - - - T C C G	
	40	50	60	
	1	C C P V G C A K C A Q G C I C K G	- A S D K C S C C A	
	2	C C P G G C A R C A Q G C V C K G	- A S D K C S C C A	
	3	C C P A G C N N C A K G C V C K E P	A S S K C S C C H	
	4	C C P S G C P K C A S G C V C K G K T C	- D T S C C Q	
	5			
	6	K C T S G C - K C P S K D E C	- A K T C S K P C . . .	
	7	G C K V V C - K C S G T C K C G C D C T	G P T N C K C E S G C S C K	
	8	Q C S S G C - K C A N K E D C R K T C S	K P C S C C P	
	9	I C T N A A C K C A N G C K C G S G C S	C T E G N C A C	

- 1 : MT-2 humaine (Kissling et Kägi, 1977).
- 2 : MT-1a de cheval (*in Kay et al.*, 1991).
- 3 : MT de poulet (McCormick *et al.*, 1987).
- 4 : MT de la plie (*in Kay et al.*, 1991).
- 5 : MT de l'huître *Crassostrea virginica* (Roesijadi *et al.*, 1989).
- 6 : MT du homard *Homarus americanus* (Brouwer *et al.*, 1989).
- 7 : MT Mu 20-1 de la moule *Mytilus edulis* (Mackay *et al.*, 1990).
- 8 : MT-2 du crabe *Scylla serrata* (Lerch *et al.*, 1982).
- 9 : MTa de l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus* (Nemer *et al.*, 1985).

certaines espèces semblent capables d'éliminer le cadmium. C'est le cas de *Carcinus maenas* qui excrète 50 % du cadmium accumulé en 10 jours environ (Jennings et Rainbow, 1979). Chez les crustacés, une élimination régulière du cadmium fixé au niveau de l'exosquelette s'effectue lors de la mue (Poirier et Cossa, 1981). Chez les annélides, *Nereis japonica* élimine 30 % du cadmium accumulé pendant les 7 jours suivant son transfert dans de l'eau non polluée (Ueda *et al.*, 1976). Par contre, ni *Nereis virens* (Ray *et al.*, 1980) ni *Nereis diversicolor* (Nejmeddine, 1987 ; Septier, 1989) ne semblent éliminer du cadmium à la suite d'expositions expérimentales à ce métal. Chez *N. diversicolor*, il a été observé néanmoins une diminution des teneurs en métaux lourds des animaux provenant d'un site très pollué et transférés pendant trois mois dans un site moins pollué (Septier, 1989).

IV.3.2- Les métalloprotéines liant le cadmium

Actuellement, il est généralement admis que la bioconcentration du cadmium consiste, après le transport à travers la membrane, en une suite de complexations du métal par des molécules d'affinité croissante pour celui-ci. L'augmentation de la spécificité de la liaison serait réalisée par une suite d'équilibres, la liaison la plus stable étant constituée par l'association du cadmium aux métallothionéines. Des métalloprotéines capables de lier le cadmium ont en ce sens été rapportées chez la majorité des organismes étudiés, à la fois animaux et végétaux. Ces métalloprotéines peuvent être subdivisées en plusieurs catégories :

- la métallothionéine (*sensu stricto*),
- les protéines proches des métallothionéines,
- les métalloprotéines non-métallothionéines parmi lesquelles certaines ont une masse moléculaire élevée.

IV.3.2.1- La métallothionéine *sensu stricto*

Baptisée ainsi en raison de sa particulière richesse en cystéine et sa capacité à fixer certains cations métalliques, cette protéine découverte dans le cortex rénal du cheval par Margoshes et Vallée (1957) a par la suite été mise en évidence chez de nombreux autres vertébrés dont les poissons (*in* Kāgi et Kojima, 1987). A la suite de l'hypothèse d'un rôle protecteur de cette molécule vis-à-vis des métaux lourds toxiques (Piscator, 1964), les recherches ont été étendues aux invertébrés. Bien que très souvent qualifiées de "metallothionein (MT)-like proteins" par les auteurs, seules quelques molécules décrites présentent l'ensemble des caractéristiques des métallothionéines des mammifères. De plus, pour un grand nombre de ces molécules, la caractérisation est souvent trop incomplète pour permettre de leur attribuer le nom de MT (Stone et Overnell, 1985). Afin d'éviter l'utilisation abusive du terme métallothionéine, une redéfinition de la métallothionéine a été faite selon des recommandations émises par le Comité d'étude de la nomenclature des métallothionéines : "Toute protéine ou polypeptide ressemblant aux MTs de mammifères par plusieurs des critères suivants peut être qualifiée de métallothionéine" (Fowler *et al.*, 1987) :

Figure 3 Composition en acides aminés des métalloprotéines proches des métallothionéines (metallothionein-like proteins). Les résultats sont exprimés en pourcentage molaire. (-) acide aminé non présent ou non déterminé.

	1	2	3	4		5			6	7	8	9	10
MMapp (kDa)	3,7	11				27,5	27,5	24	19 (dimère?)	10	10	10	
AA				MTa	MTb	D2	L2	L3		EW-IIB	10 IV		MT2
Asx	5,8	9,4	8,0	11,2	12,0	14,1	16,5	13,5	10,9±1,7	9,8	9,8	11,8	6,6
Thr	6,7	4,6	7,1	7,2	6,8	6,6	7,5	6,3	2,7±0,8	5,7	7,4	7,7	3,3
Ser	2,9	11,4	14,0	8,8	8,5	8,3	6,4	6,4	10,6±0,6	6,1	8,4	12,7	13,1
Glx	12,0	8,5	9,8	7,7	8,5	10,2	6,8	8,4	9,3±0,7	8,5	10,5	13,9	3,3
Pro	1,7	2,8	3,1	3,8	4,1	-	-	-	2,9±1,1	4,0	5,9	2,4	3,3
Gly	14,0	8,8	15,1	11,0	10,6	9,3	14,1	7,1	11,8±1,2	17,0	14,3	18,1	8,2
Ala	5,8	6,2	4,7	8,7	8,9	9,1	12,7	12,2	7,2±1,2	10,0	7,9	5,6	11,5
Cys	34,1	25,8	20,6	21,0	20,0	18,5	20,3	12,9	16,5±1,3	15,4	11,6	10,2	32,8
Val	2,0	2,3	0,9	3,2	2,7	1,3	-	1,2	2,8±0,5	4,6	6,1	2,6	1,6
Met	-	-	-	<0,5	<0,5	-	-	-	-	-	-	-	1,0
Ile	2,0	2,6	0,6	1,8	1,5	0,6	-	0,3	1,9±0,1	2,2	3,1	2,3	1,6
Leu	1,7	4,8	1,9	2,6	2,7	6,0	3,1	3,9	10,0±1,5	5,1	4,8	4,1	-
Tyr	-	-	-	1,8	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-
Phé	-	4,2	0,1	1,0	1,0	0,8	-	-	1,7±0,4	traces	1,2	-	-
His	-	-	-	1,0	1,4	0,5	-	-	-	-	-	-	-
Lys	11,1	7,1	13,6	8,8	8,6	8,1	16,1	16,5	10,0±1,2	8,6	5,9	8,6	13,1
Arg	-	1,4	0,4	0,8	0,9	6,4	3,8	3,9	1,6±0,4	3,0	3,0	traces	3,3
Trp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- 1 Zn-BP d'œuf d'oursin *Anthocardis crassispina* (Ohtake *et al.*, 1983).
- 2 Cd-BP (hépatopancréas + rein) du mollusque *Murex trunculus* (Dallinger *et al.*, 1989b).
- 3 Cd-BP du mollusque *Helix pomatia* (Dallinger *et al.*, 1989a).
- 4 MTa et MTb du mollusque *Patella vulgata* (Noël-Lambot *et al.*, 1980).
- 5 (Cd-Zn)-BP de canal alimentaire postérieur des oligochètes *Dendrodrilus rubidus* (D2) et *Lumbricus rubellus* (L2, L3) (Morgan *et al.*, 1989).
- 6 Cd-BP de l'oligochète *Lumbriculus variegatus* (Bauer-Hilty *et al.*, 1989).
- 7 (Cd-Zn-Cu)-BP EW-IIB de l'oligochète *Eisenia fetida* (Yamamura *et al.*, 1981).
- 8 Cd-BP 10 IV du mollusque *Mytilus edulis* (Frazier *et al.*, 1985).
- 9 Cd-BP d'hépatopancréas du mollusque *Arion lusitanicus* (Dallinger *et al.*, 1989c).
- 10 Métallothionéine MT-2 humaine (Kissling et Kägi, 1977) pour comparaison.

- masse moléculaire comprise entre 6 et 7 kDa,
- 60 acides aminés environ parmi lesquels 20 cystéines,
- 7 cations métalliques divalents/molécule,
- absence d'acides aminés aromatiques,
- cystéines sous forme réduite (SH) et liées aux ions métalliques par des ponts disulfures (-S-S) entraînant en spectroscopie des propriétés caractéristiques des complexes métal-thiolates et des domaines métal-thiolates.

Prenant en considération les relations structurales entre ces molécules et la MT de mammifères, trois classes de MT ont été définies (Fowler *et al.*, 1987) :

- la classe I regroupe les MTs de mammifères et les peptides d'autres phyla ayant une structure primaire proche,
- la classe II comprend des MTs ne montrant qu'une correspondance éloignée voire pas de correspondance avec la structure primaire des MTs de mammifères,
- enfin la classe III regroupe les polypeptides formés par la répétition d'unités γ -glutamyl cysteinyl (Robinson et Jackson, 1986).

En définitive, alors que les MTs identifiées chez les vertébrés appartiennent toutes de manière nette à la classe I (cf fig. 2) notamment par la position invariable des résidus de cystéine arrangés en motifs caractéristiques Cys-Cys, Cys-X-Cys et Cys-X-Y-Cys (où X et Y sont des acides aminés quelconques), il n'en est pas de même pour les invertébrés. Concernant la classe I, on peut citer les cas de l'huître *Crassostrea virginica* (Roesijadi *et al.*, 1989), du homard *Homarus americanus* (Brouwer *et al.*, 1989), de la moule *Mytilus edulis* (Mackay *et al.*, 1990), du crabe *Scylla serrata* (Lerch *et al.*, 1982) . Parmi les MTs de classe II on trouve la "MTa" de l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus* (Nemer *et al.*, 1985) et également une métallothionéine isolée chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Slice *et al.*, 1990).

IV.3.2.2- Les métalloprotéines proches des métallothionéines

Dans ces protéines, rapportées chez de nombreux invertébrés marins (fig. 3), la teneur en cystéine est généralement plus faible (15-20 %) et/ou celle en acides aspartique et glutamique plus élevée que dans la métallothionéine. La deuxième différence tient au fait qu'en général ces métalloprotéines *in vivo* ne sont pas saturées en métal ou le sont mais à un taux plus bas que dans le cas des métallothionéines de mammifères (Roesijadi, 1981). Dans cette catégorie on peut citer, par exemple, le cas de la moule *Mytilus edulis* (George *et al.*, 1979 ; Frankenne *et al.*, 1980 ; Frazier *et al.*, 1985) qui possède deux protéines, respectivement de 20 et 10 kDa, existant chacune sous la forme de 4 composants, 2 contenant environ 15 % de cystéine et les 2 autres 25 %. Un autre exemple est le cas de l'oursin *Anthocardaris crassisipina* (Ohtake *et al.*, 1983) possédant une protéine de composition en acides aminés proche de celle de la métallothionéine avec un taux élevé de cystéine (34 %) et un rapport Cys/métal de 3 mais une masse moléculaire très faible (3,7 kDa) en comparaison de celle des métallothionéines. Ce type

Figure 4 Composition en acides aminés des métalloprotéines non métallothionéines. Les résultats sont exprimés en pourcentage molaire. (-) acide aminé non présent ou non déterminé.

MM app (kDa)	1		2		3	4	5		6	7	
	10	12			14,4	^a 6	8	13	^a 13,5	14	14
AA	PI	PII	T1	T2			FIIA	FIIB	MPII	CdBP14a	CdBP14b
Asx	15,9	10,0	9,5	8,9	12,2	10,9	9,9	9,4	13,4	12,8	12,8
Thr	5,0	4,9	5,8	9,2	7,0	9,0	9,0	11,8	1,7	4,3	5,1
Ser	5,0	3,9	8,7	7,4	7,3	9,0	7,5	7,3	4,2	4,3	6,8
Glx	8,7	3,5	22,6	19,7	12,2	12,9	7,7	6,5	10,9	8,5	9,4
Pro	6,8	4,0	8,2	7,1	5,6	11,0	5,7	4,4	3,4	4,3	5,1
Gly	8,5	14,0	6,0	5,4	9,4	10,9	8,3	9,0	8,4	8,5	9,4
Ala	7,9	13,2	6,0	7,2	5,8	11,0	8,1	8,0	9,2	6,0	7,7
Cys	4,0	6,0	2,2	1,6	7,8	2,1	4,9	4,0	0,8	0	0
Val	4,0	6,0	2,0	1,3	5,4	4,3	6,0	6,3	5,0	6,8	6,0
Met	1,0	1,0	1,8	1,8	1,2	-	1,4	1,3	0,8	2,6	1,7
Ile	7,8	3,4	3,6	5,2	4,7	2,2	4,4	4,4	5,0	3,4	2,6
Leu	7,6	3,9	4,6	4,7	5,7	4,1	5,9	5,4	7,6	8,5	6,8
Tyr	2,0	2,5	-	-	2,3	-	1,6	3,6	4,2	2,6	2,6
Phé	5,0	5,0	2,2	2,2	2,8	2,1	3,6	5,0	7,6	8,5	6,8
His	0,9	3,8	-	-	6,5	2,2	2,3	1,0	4,2	6,0	5,1
Lys	6,9	7,1	14,7	15,2	0,8	6,3	6,1	6,4	10,9	12,0	10,3
Arg	3,0	3,2	2,0	3,1	2,5	2,0	2,5	3,0	0,8	0,9	1,7
Trp	-	-	-	-	0,3	-	5,6	3,2	1,7	-	-

- 1 (Cd-Zn)-BP de placenta humain (Chow *et al.*, 1987).
- 2 Cd-BP de testicule du primate *Erythrocebus patas* (Waalkes *et al.*, 1988).
- 3 Hg-BP de branchie de la moule *Mytilus edulis* (Roesijadi et Hall, 1981).
- 4 (Cd-Cu)-Glycoprotéine du criquet *Locusta migratoria* (Martoja *et al.*, 1983).
- 5 Cd-BP du buccin *Buccinum tenuissimum* (Dohi *et al.*, 1983).
- 6 Cd-BP de l'annélide polychète *Nereis diversicolor* (ce travail).
- 7 Cd-BPs de l'annélide oligochète *Allolobophora caliginosa* (Nejmeddine, 1992).

de métalloprotéine liant le cadmium a également été isolé chez les annélides oligochètes *Eisenia foetida* (Yamamura *et al.*, 1981), *Dendrodrilus rubidus* et *Lumbricus rubellus* (Morgan *et al.*, 1989) et chez les mollusques *Helix pomatia* et *Murex trunculus* (Dallinger *et al.*, 1989a,b) et *Patella vulgata* (Noël-Lambot *et al.*, 1980). Chez cette dernière, le rapport Cys/métal est de 2 contre 3 dans les métallothionéines.

IV.3.2.3- Les métalloprotéines non-métallothionéines

Des protéines ayant la capacité de fixer les métaux lourds ont été décrites chez la majorité des organismes étudiés. Les différences principales avec les métallothionéines sont la masse moléculaire, la teneur en cystéine, généralement très faible, ainsi que la quantité de métal fixé.

Par ailleurs, il convient de souligner que de telles molécules ont été rapportées également chez des organismes possédant des métallothionéines. Ainsi chez l'homme, il a été mis en évidence au niveau du placenta (fig 4) 2 protéines liant le Cd et le Zn de 10 et 12 kDa ayant un taux de cystéine faible (4 mol p. 100) (Chow *et al.*, 1987). Chez un primate *Erythrocebus patas*, Waalkes *et al.* (1988) ont également montré l'existence dans les testicules d'une protéine liant le Cd de même type (taux de cystéine 2,2 mol p. 100). Chez les invertébrés, un grand nombre de ces protéines a été isolé. C'est le cas de la moule *Mytilus edulis* qui possède au niveau des branchies une protéine de 14,4 kDa ne correspondant pas à une métallothionéine (Roesijadi et Hall, 1981), du criquet *Locusta migratoria* (Martoja *et al.*, 1983), du buccin *Buccinum tenuissimum* (Dohi *et al.*, 1983), du gastéropode *Nassarius reticulatus* (Andersen *et al.*, 1989) et également des annélides polychète et oligochète *Nereis diversicolor* (Nejmeddine *et al.*, 1988) et *Allolobophora caliginosa* (Nejmeddine, 1992)

IV.3.2.4- Métalloprotéines de masse moléculaire élevée

La fixation de métaux toxiques dont le cadmium à des protéines de masse moléculaire élevée (> 70 kDa) a été rapportée chez de nombreux invertébrés à la fois chez des animaux issus directement de l'environnement et après des expositions menées en laboratoire. Ainsi chez *Mercenaria mercenaria* (mollusque bivalve) intoxiqué expérimentalement par le cadmium, 83 % du métal de la fraction soluble du rein sont associés à ce type de ligand (Carmichael *et al.*, 1980). De même, chez *Nassarius reticulatus* (mollusque gastéropode) prélevé dans des sites pollués, Andersen *et al.* (1989) ont observé une quantité élevée de plomb associée aux protéines de masse moléculaire supérieure à 70 kDa. Chez les annélides, ce type de molécule a été mentionné chez l'oligochète *Eisenia foetida* (Suzuki *et al.*, 1980) et également chez les polychètes *Neanthes arenaceodentata* (Jenkins et Sanders, 1986 ; Mason et Jenkins, 1991) et *Nereis diversicolor* (Dennaï, 1984 ; Nejmeddine *et al.*, 1988) à la suite d'expositions expérimentales des animaux au cadmium. Cette fixation serait non spécifique selon Jenkins et Sanders (1986) mais pourrait cependant représenter un important mécanisme de la toxicité métallique. Alors qu'il a été observé chez *Mizuhopecten yessoensis* (Evtushenko *et al.*,

1986) et chez *Mytilus edulis* (Köhler et Riisgard, 1982 ; Nolan et Duke, 1983) .que le cadmium est initialement lié aux protéines de masse moléculaire élevée chez les animaux exposés expérimentalement au cadmium, chez *Littorina littorea* (Langston et Zhou, 1986) et chez *Murex trunculus* (Dallinger *et al.*, 1989b) c'est le phénomène inverse qui a été observé. Selon Dalla Via *et al.* (1989), dans ce dernier cas, le transfert du cadmium indiquerait des niveaux de contamination pour lesquels les capacités de détoxification des organismes commencent à être dépassées. Dans la majorité des études, ces molécules n'ont pas été isolées et leur nature demeure inconnue. On peut cependant citer le cas de l'huître *Saccostrea cucullata* chez qui une protéine de masse moléculaire très élevée (550 kDa) liant le zinc correspondrait à une ferritine (Webb *et al.*, 1985). Il a également été rapporté que l'hémocyanine, pigment respiratoire riche en cuivre présent chez de nombreux crustacés et mollusques, peut aussi complexer des métaux tels que le cadmium ou le zinc (Depledge et Rainbow, 1990). Chez le crabe *Carcinus maenas*, 70 % du zinc total présent dans l'hémolymphe lors d'intoxication des animaux sont fixés par l'hémocyanine (Martin *et al.*, 1977).

IV.3.2.5- Rôle des métallothionéines et des métalloprotéines

Le rôle physiologique des métallothionéines est encore à l'heure actuelle très controversé. En effet, il est généralement admis qu'elles exercent un rôle dans l'homéostasie du zinc (au moins pour les métallothionéines de la classe I). Par contre, l'hypothèse d'un rôle dans le stockage et la détoxification des éléments tels que le mercure et le cadmium avancée dès 1964 par Piscator a été remise en question par certains auteurs (Nordberg et Nordberg, 1987). L'idée d'un effet protecteur pour la métallothionéine est en contradiction avec l'apparition de lésions dans les organes où sa concentration est la plus élevée. La métallothionéine peut cependant exercer une protection temporaire de l'organisme contre l'effet des métaux lourds, l'apparition des lésions n'intervenant qu'après une exposition très longue au métal. En ce sens il a été clairement montré que la toxicité du cadmium est diminuée par sa fixation à la métallothionéine (Webb, 1972 ; Suzuki et Yoshikawa, 1974). De même, 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 ensuite (Probst *et al.*, 1977). Concernant les métalloprotéines proches des métallothionéines et les non-métallothionéines, il est très difficile d'affirmer qu'elles exercent un rôle dans la défense de l'organisme. Il est en effet nécessaire de préciser leur nature et de déterminer leur structure primaire. Rappelons que le cadmium ayant une grande affinité pour les groupements thiols, mais également pour les groupements carbonyles, peut se combiner à de très nombreux types de protéines. A ce titre, l'hémocyanine peut fixer le cadmium bien que sa fonction réelle soit une fonction respiratoire et non pas la détoxification.

IV.3.3- Structures intracellulaires de stockage des métaux lourds

IV.3.3.1- Les lysosomes

Il existe un certain nombre d'exemples pour lesquels l'intervention des lysosomes dans le piégeage et l'élimination des cations divalents non-essentiels a été postulée. Les preuves tangibles sont par contre encore relativement rares. Nous citerons néanmoins le cas de la moule *Mytilus edulis* où 30 à 40 % du cadmium total ont été trouvés au niveau des lysosomes tertiaires (George et Pirie, 1979), le reste étant lié à une protéine de type métallothionéine. Par des expériences *in vitro* d'incorporation de cadmium et de zinc dans les lysosomes tertiaires ou granules de lipofuchsine, George (1983) a présenté un schéma général du métabolisme de ces métaux dans la cellule rénale de la moule. Il semblerait que les lysosomes tertiaires permettent d'exercer un double contrôle des concentrations intracellulaires de métaux divalents. D'une part, ils permettraient l'équilibre du contenu métallique cytoplasmique en fixant de manière non spécifique et réversible soit des ions libres du cytoplasme tels que Ca^{2+} ou Mg^{2+} soit des complexes faiblement liés de métaux lourds divalents avec des acides aminés ou des protéines. D'autre part, ils permettraient un contrôle cinétique et agiraient comme piège pour les excès de métaux par une fixation irréversible. Celle-ci pourrait être due à une modification de la structure interne du lysosome par peroxydation lipidique qui, formant des pigments lipoprotéiques, augmenterait les pontages entre les molécules de lipofuchsine et formerait ainsi un réseau emprisonnant les cations divalents. De ce deuxième contrôle pourraient résulter l'accumulation et la détoxification de concentrations élevées de nombreux métaux divalents. De même, Ballan-Dufrançais *et al.* (1982) ont montré chez *Pecten maximus*, par microanalyse aux rayons X, la présence de cadmium dans les lysosomes (vésicules V2) des amœbocytes de la glande digestive. Selon ces auteurs, les vésicules restent dans les cellules sous forme de corps résiduels et sont à rapprocher des lysosomes tertiaires (George, 1983). Les amœbocytes de la glande digestive joueraient un rôle complémentaire de celui des organes excréteurs pour le nettoyage du milieu intérieur en stockant les métaux originaires du sang.

IV.3.3.2- Les sphérocristaux et formations minérales

Ces formations intracellulaires essentiellement minérales ont été décrites chez de nombreux invertébrés : chez les crustacés *Callinectes sapidus* (Becker *et al.*, 1974) et *Cancer pagurus* (Guary et Négrel, 1981), chez les mollusques *Haliotis tuberculata* (Bryan *et al.*, 1977) et *Argopecten gibbus* (Carmichael *et al.*, 1979), chez les annélides *Magelona papillicornis* (Boilly et Richard, 1978) et *Nereis diversicolor* (Dennaï *et al.*, 1986 ; Dhainaut-Courtois *et al.*, 1988). Principalement composées de phosphates de calcium et de magnésium, ces structures pourraient à la fois jouer un rôle de réserve d'ions essentiels et intervenir dans le piégeage de métaux non-essentiels (Simkiss, 1979 ; Martoja et Martoja, 1984). Cette dernière idée est étayée par le fait que des métaux lourds toxiques tels que le cadmium ont été observés dans les concrétions rénales d'*Argopecten gibbus* à des concentrations de l'ordre de

546 ppm (Carmichael *et al.*, 1979). Chez *Haliotis tuberculata*, outre les éléments Zn, Cu, Mg et Mn, la présence de plomb associé ou inclus dans les concrétions des viscères a également été observée (Bryan *et al.*, 1977). De même, chez *Pecten maximus* Ballan-Dufrançais *et al.* (1982) ont observé l'incorporation dans les sphérocristaux de la majorité des métaux lourds radioactifs après exposition des animaux pendant quelques heures aux différents métaux. Chez le crabe *Cancer pagurus*, Guary et Négrel (1981) ont constaté l'incorporation dans les sphérocristaux de l'hépatopancréas d'éléments radioactifs tels que le plutonium ^{237}Pu apportés expérimentalement par la nourriture et par l'injection dans la glande digestive. Plus encore que le piégeage d'éléments toxiques, les sphérocristaux pourraient intervenir comme processus d'excrétion en emprisonnant les métaux en excès (Simkiss, 1976 ; Coombs et George, 1978). Cette idée est soutenue par le fait qu'il a été observé un rejet des sphérocristaux dans la lumière du tube digestif ou de l'appareil excréteur (Simkiss, 1976). Il est probable qu'au moins une partie des métaux toxiques piégés par les sphérocristaux est excrétée en même temps. Il s'agirait là d'une fonction secondaire, la fonction principale des sphérocristaux étant la détoxification du calcium ionique et du phosphore sous forme de phosphates (Simkiss, 1977).

MATERIEL ET METHODES

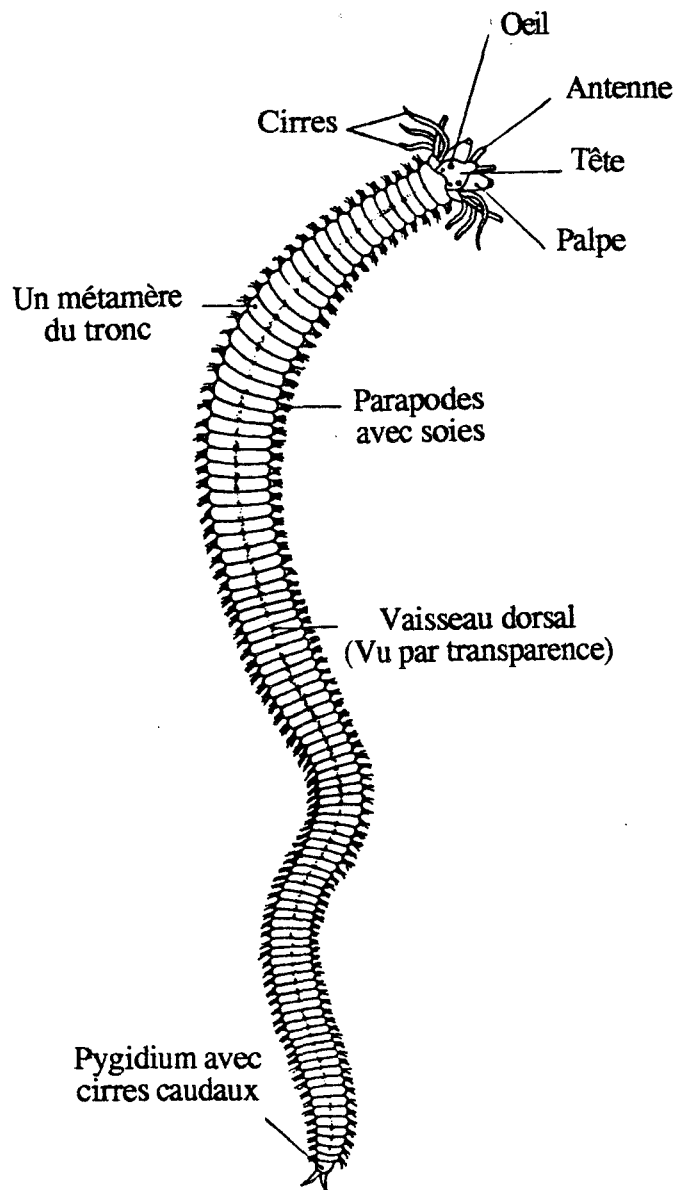


Figure 5 Morphologie externe d'une néréis, vue dorsale (d'après Boué et Chanton, 1957).

MATERIEL et METHODES

I - Matériel biologique

I.1- Présentation de *Nereis diversicolor* O.F. Müller

Nereis diversicolor (*Hediste diversicolor* selon la nouvelle dénomination) est un ver (fig. 5) appartenant à l'embranchement des annélides. Son corps est composé de segments appelés métamères ayant tous la même organisation (fig. 6) portant latéralement deux expansions, les parapodes servant à la locomotion et pourvus de nombreuses soies (classe des polychètes). La tête (fig. 7) est constituée des deux premiers métamères (prostomium et péristomium) portant des organes sensoriels développés (2 paires d'yeux, 1 paire de palpes, 4 paires de cirres tentaculaires). La bouche, localisée en position ventrale du second métamère, se prolonge par une trompe exsertile armée de deux puissantes mâchoires. Le système nerveux est constitué par les ganglions cérébroïdes localisés dans la partie supérieure de la région antérieure (le prostomium), le collier péricésophagien et la chaîne nerveuse ventrale se poursuivant jusqu'à l'extrémité postérieure de l'animal. L'appareil circulatoire est de type clos, constitué d'espaces extracellulaires commodément désignés sous le terme de vaisseaux. Ce système est organisé en deux "vaisseaux" parcourant toute la longueur de l'animal en positions médio-dorsale et ventrale connectés entre-eux par un important réseau de "capillaires" anastomosés et contenant un pigment de type hémoglobine. L'élimination des déchets du métabolisme est assurée par des métanéphridies disposées en position ventrale le long de l'animal (1 paire/métamère). Les sexes sont séparés et la fécondation a lieu dans l'eau de mer. L'émission des gamètes, libres dans la cavité générale des animaux (coelome creusé dans le feuillet mésodermique), se fait par l'éclatement de la paroi du corps. Ces animaux vivent dans des galeries creusées dans la vase des estuaires et sont capables de supporter de grandes variations de salinité par une importante capacité d'osmorégulation (régulation hydrique et ionique).

I.2- Récolte et maintien des animaux

Les néréis ont été récoltées dans l'estuaire de l'Aa à Grand-Fort-Philippe (Nord) et ont été maintenues en laboratoire dans de l'eau de mer, renouvelée tous les 2 jours, à la température de 13°C. Une période de 3 jours minimum avant l'utilisation des animaux a été observée afin de permettre l'élimination du sédiment contenu dans leur tube digestif. La détermination de l'âge et du sexe des animaux par l'observation des produits génitaux obtenus lors d'une ponction de milieu coelomique a été effectuée au départ de notre étude. Cette pratique a ensuite été supprimée et des animaux de masse comprise entre 0,4 et 0,6 g ont été retenus pour les expériences.

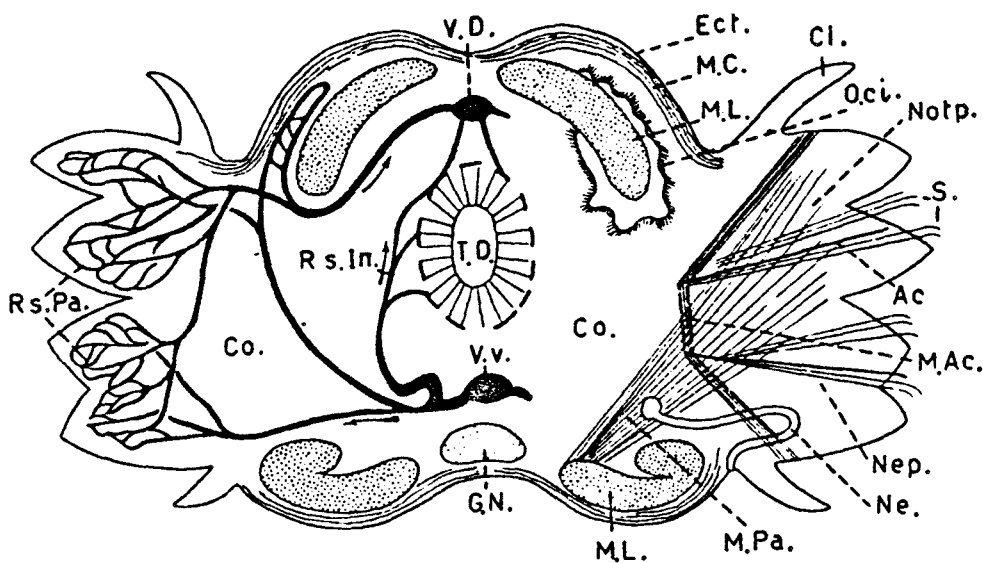


Figure 6 Coupe transversale schématique dans un segment de néréis (d'après Prenant, in Brien, 1961). *Ect.* : ectoderme ; *M.C.* : muscles circulaires sous-ectodermiques ; *M.L.* : champs musculaires, latéro-dorsaux et latéro-ventraux ; *Nep.* : neuropodes ; *Notp.* : notopodes ; *Ci.* : cirres ; *Ac.* : acicules ; *S.* : soies ; *M.Pa.* : muscles des parapodes ; *M.Ac.* : muscles des acicules ; *O.ci.* : organe cilio-phagocytaire ; *Ne.* : néphridie ; *T.D.* : tube digestif ; *V.D.* : vaisseau longitudinal dorsal ; *V.v.* : vaisseau longitudinal ventral ; *Rs.In.* : réseau sanguin intestinal ; *Rs.Pa.* : réseaux sanguins parapodiaux ; *Co.* : cœlome ; *G.N.* : ganglion nerveux.

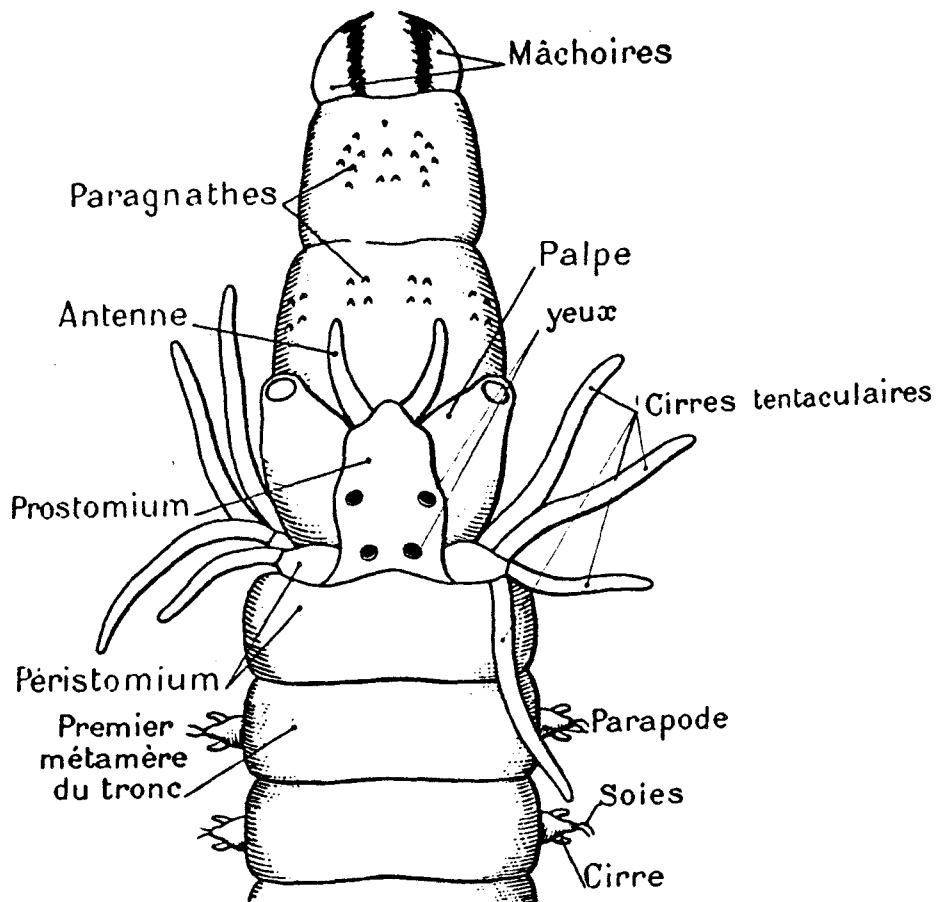


Figure 7 Région antérieure d'une néréis, vue dorsale ; la trompe est dévaginée. (D'après Boué et Chanton, 1957).

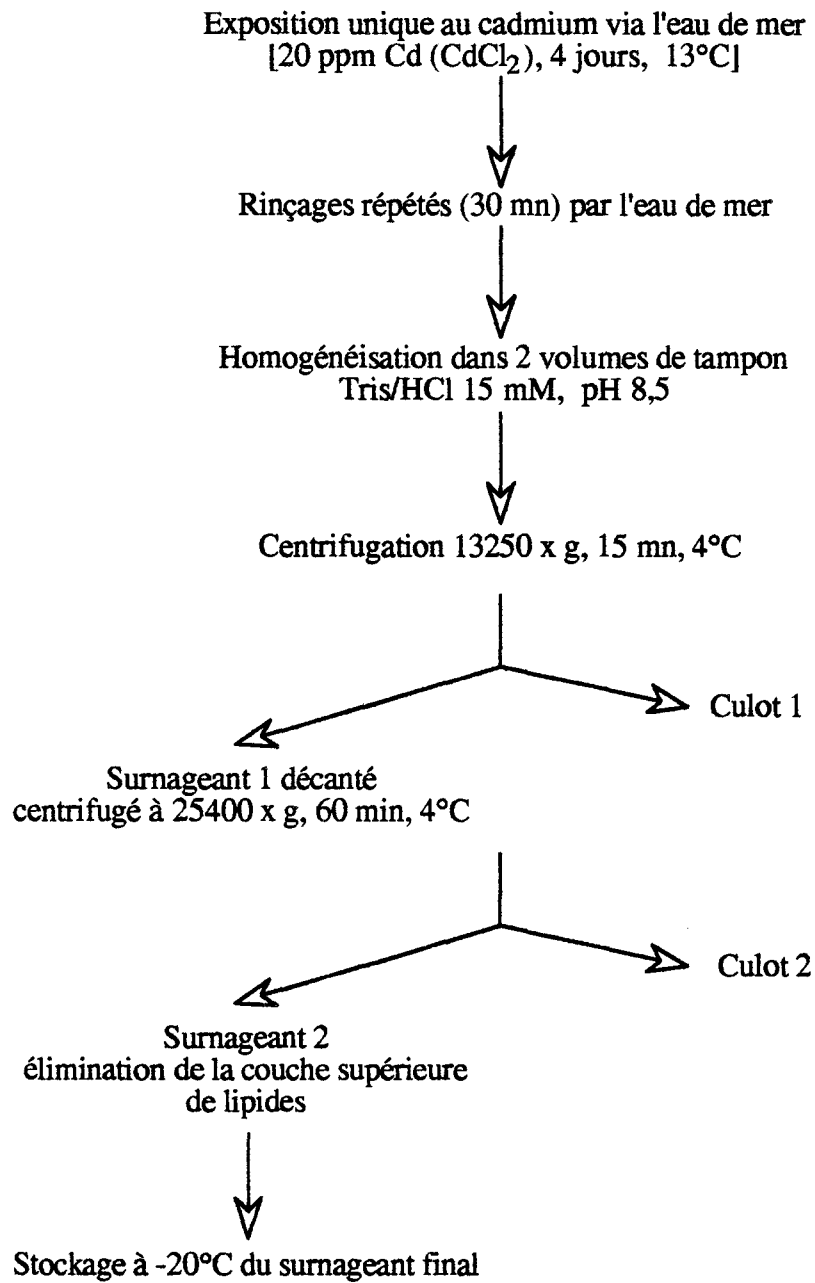


Schéma 1 - Principales étapes de préparation des extraits solubles d'animaux exposés au cadmium

II - Méthodes

II.1- Conditions d'exposition des néréis au cadmium

L'exposition des animaux au cadmium a été réalisée en les plaçant par groupes de 5 ou 6 individus dans 250 ml d'eau de mer contenant le cadmium (CdCl_2). Un morceau de papier filtre de dimensions déterminées (10 x10 cm) a été ajouté afin d'empêcher les animaux de s'enrouler sur eux-mêmes et de se segmenter. Pour l'étude des deux métalloprotéines MP I et MP II liant le cadmium, les animaux ont été exposés pendant 4 jours à une solution contenant 20 ppm (partie par million ou mg/l) de cadmium dans l'eau de mer à la température de 13°C.

Dans le cas de l'étude consacrée à la bioaccumulation du cadmium chez la néréis, la solution toxique a été renouvelée tous les 2 jours afin de conserver à l'eau une qualité comparable durant toute la durée de l'expérience (12 jours). Au cours de cette étude une gamme très large de doses (1,25 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 ; 40 et 80 ppm de Cd) et de durées (1 ; 3 ; 6 ; 9 ; 12 ; 24 heures ; 2 ; 3 ; 6 ; 9 ; et 12 jours) d'exposition a été envisagée. A la suite de l'exposition au cadmium, les animaux ont été rincés à trois reprises dans de l'eau de mer naturelle (durée totale 30 mn) afin d'éliminer le cadmium non fixé, c'est-à-dire ni adsorbé ni absorbé. Les animaux ont ensuite été séchés sur papier-filtre puis pesés.

II.2- Extraction tissulaire

Celle-ci a été réalisée à la fois pour l'étude des métalloprotéines liant le cadmium et pour l'étude de l'accumulation du cadmium dans les fractions solubles et insolubles des animaux exposés au métal.

Les animaux ont été homogénéisés à 4°C à l'aide d'un homogénéiseur Polytron dans 2 volumes de tampon Tris (Tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane) 15 mM ajusté à pH 8,5 par l'acide chlorhydrique (HCl).

L'homogénat obtenu a été centrifugé à 13250 x g pendant 15 mn à 4°C, le surnageant décanté puis centrifugé de nouveau à 25400 x g pendant 60 mn à 4°C. Ces centrifugations ont été réalisées dans une centrifugeuse Beckman J2-21 M/E équipée d'un rotor JA 20 (rav 70 mm). La phase supérieure de lipides a ensuite été éliminée et le surnageant final stocké à -20°C ou chromatographié immédiatement. Le schéma 1 résume les différentes étapes de la procédure.

II.3- Techniques chromatographiques pour l'étude des métalloprotéines liant le cadmium

II.3.1- Préparation de la métalloprotéine MP II

Deux procédures ont été utilisées successivement au cours de notre étude pour la préparation de la métalloprotéine MP II. Dans un premier temps nous avons suivi le

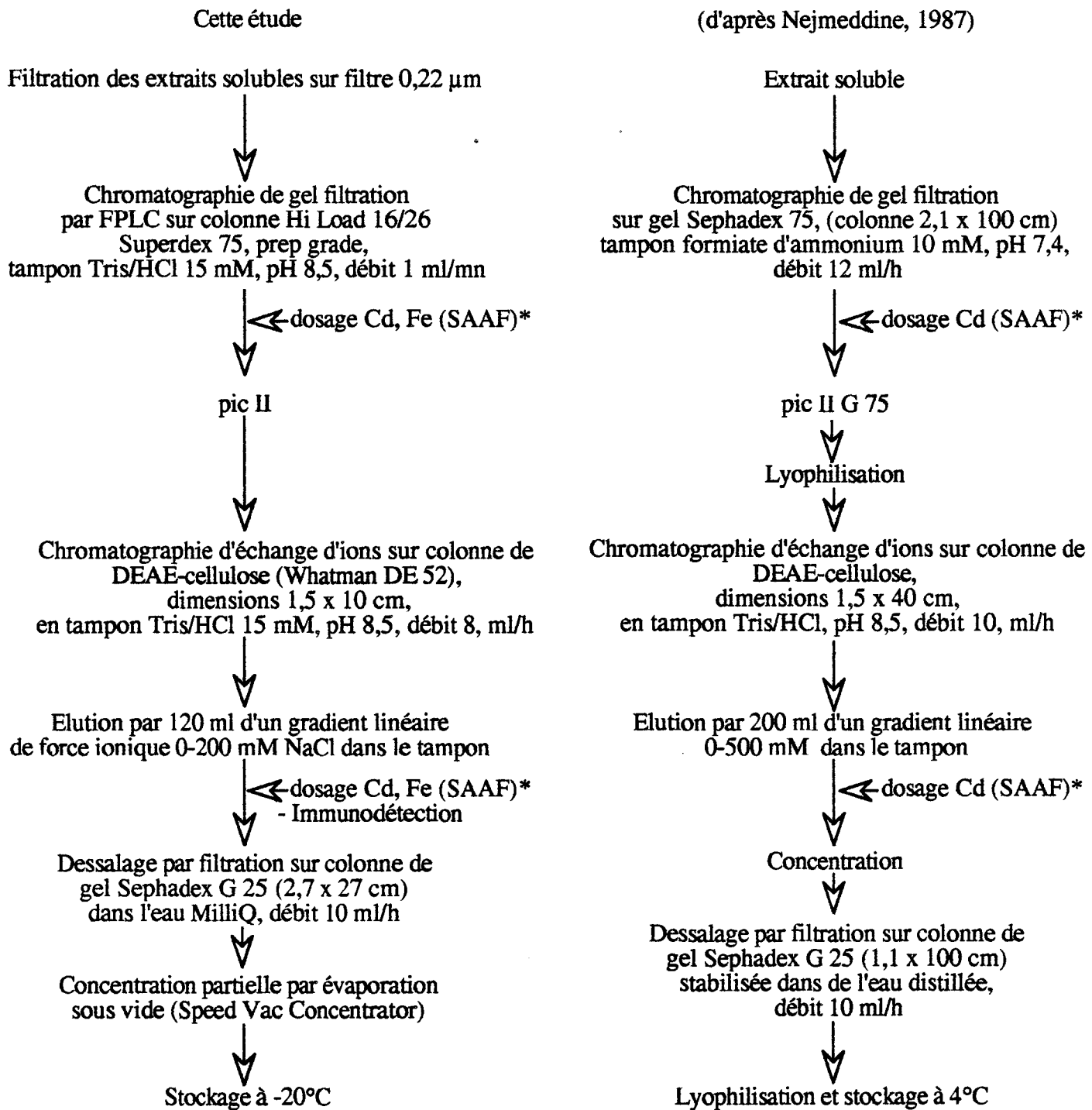


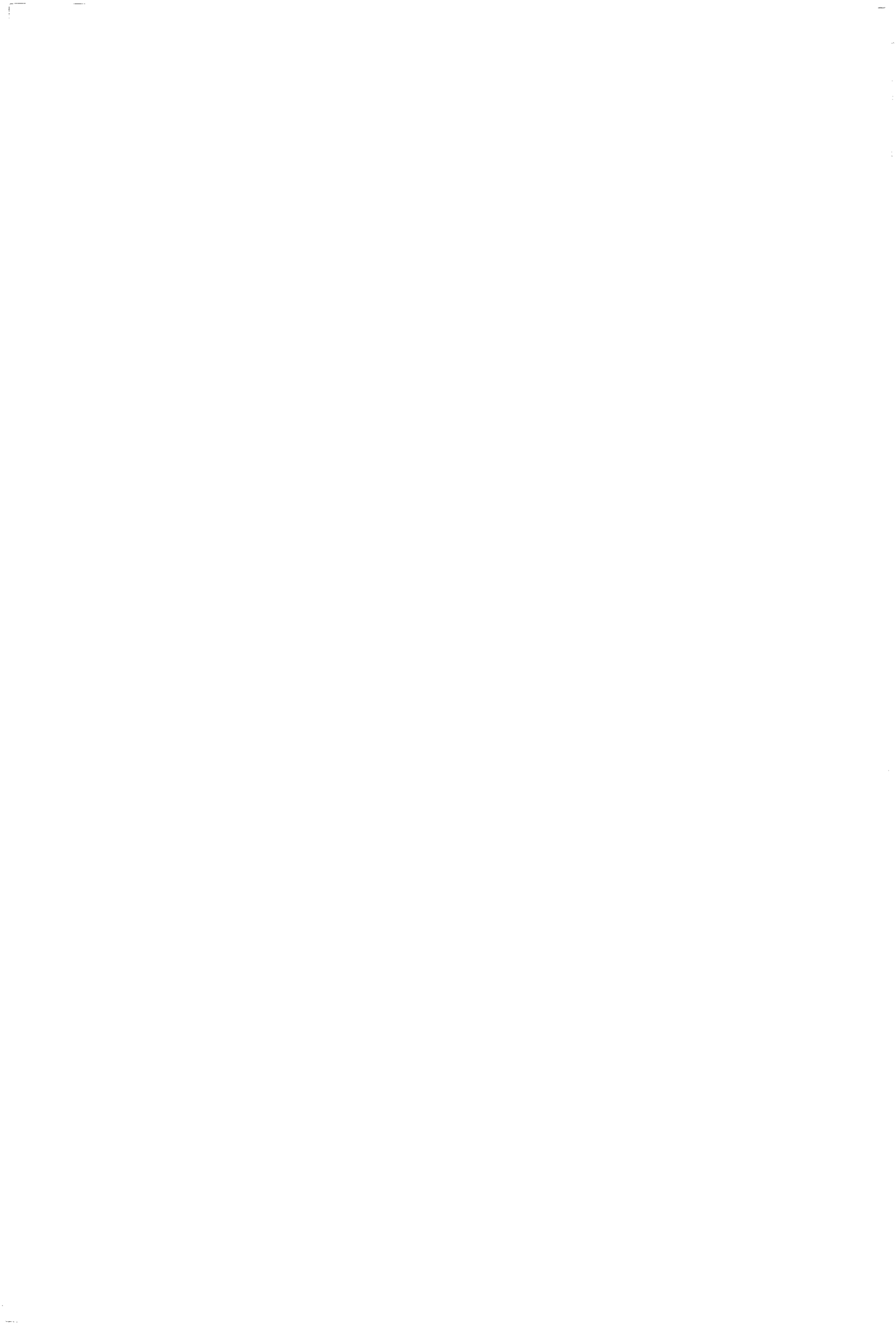
Schéma 2 - Principales étapes de préparation de la protéine MP II.

*: Dosage des métaux par absorption atomique.

protocole élaboré par Nejmeddine (1987) dont les étapes sont résumées dans le schéma 2. Certaines modifications ont ensuite été apportées afin d'accroître la pureté du produit préparé pour la détermination de sa séquence en acides aminés et de réduire les risques de dégradation. La première étape de préparation a consisté en une chromatographie de gel filtration de l'extrait soluble réalisée par FPLC (Fast Pressure Liquid Chromatography) sur une colonne Hi Load 16/26 Superdex 75 Prep Grade (Pharmacia) ayant un domaine de séparation des protéines globulaires équivalent à celui du gel Sephadex G 75 (70-3 kDa). L'extrait soluble (2 ml) filtré sur un support de porosité 0,22 μm a été déposé sur la colonne préalablement équilibrée dans le tampon Tris 15 mM, pH 8,5 et calibrée par des substances de masse moléculaire connue. L'élution a été effectuée au débit de 1 ml/mn et l'absorbance de l'éluat mesurée en continu au cours de la séparation à 280 nm. Des fractions de 2 ml ont été recueillies et les métaux Cd et Fe ont été dosés par spectrophotométrie d'absorption atomique en flamme (SAAF) (cf II.5.). Les fractions contenant la protéine MP II ont été regroupées et déposées sur une colonne (1,5 x 10 cm) de résine échangeuse d'anions de type DEAE-cellulose (Whatman DE 52) équilibrée au préalable par deux volumes de tampon Tris/HCl. L'élution a été réalisée par 120 ml d'un gradient linéaire de force ionique 0-200 mM NaCl dans le tampon au débit de 8 ml/h. L'absorbance a été mesurée à 280 nm et des fractions de 2 ml ont été recueillies. Celles-ci ont été soumises à différentes techniques analytiques : dosage de Cd et Fe, analyse électrophorétique en milieu dénaturant, électrofocalisation, immunodétection sur membrane à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-MP II n°11. Les fractions contenant la protéine MP II liant le cadmium ont été regroupées puis dessalées par filtration sur une colonne de gel Sephadex G25 montée dans de l'eau MilliQ (Millipore) puis partiellement concentrées par évaporation sous vide (Speed Vac Concentrator, Savant) et stockées à -20°C.

II.3.2- Etude de la métalloprotéine MP I

La nature du produit MP I liant le cadmium, de masse moléculaire élevée, et déjà mentionné par Nejmeddine (1987) a été recherchée. Les séparations ont été effectuées par chromatographie de gel filtration. Deux types de gel ayant des domaines de séparation différents ont été successivement utilisés. Le gel Sephacryl S300 permettant la séparation des protéines globulaires de masse moléculaire comprise entre $1,5 \cdot 10^6$ et $1 \cdot 10^4$ Da et le gel Sepharose 4B séparant entre $20 \cdot 10^6$ et $6 \cdot 10^4$ Da. Dans le premier cas, une colonne de dimension 2,1 x 70 cm a été utilisée et éluée par le tampon Tris/HCl 15 mM, pH8,5, au débit de 15 ml/h. Pour le second gel, la colonne (2,7 x 100 cm) a été éluée par le même tampon au débit de 23,5 ml/h. L'absorbance dans les deux cas a été lue à 280 nm. Une lecture a également été réalisée dans certains cas à 415 nm. La recherche du cadmium et du fer a été réalisée par SAAF dans les fractions d'élution.



II.4- Méthodes électrophorétiques

Plusieurs techniques électrophorétiques ont été utilisées au cours de notre étude à la fois en tant que moyen de contrôle au cours des différentes séparations chromatographiques et également pour la caractérisation des métalloprotéines MP I et MP II.

II.4.1- Electrophorèse monodimensionnelle en milieu dénaturant (SDS)

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (sodium dodecyl sulfate) a été effectuée selon la méthode de Laemmli (1970). Des gels de 0,75 mm d'épaisseur ont été utilisés. Le gel de séparation est constitué d'un gradient d'acrylamide 5-25 %. Avant le dépôt, les échantillons à analyser ont été traités pendant 3 mn à 100°C dans le tampon de reprise Tris/HCl 62,5 mM, pH 6,8 ; SDS 2 % (W/V) ; saccharose 10 % (W/V) ; et β -mercaptoéthanol 5 % (V/V), ce dernier permettant la rupture des ponts disulfures dans les molécules et ainsi la dissociation de molécules oligomériques en leurs sous-unités constitutives. Un mélange de protéines de masse moléculaire déterminée : 94 kDa (phosphorylase B), 67 kDa (albumine), 43 kDa (ovalbumine), 30 kDa (anhydrase carbonique), 20 kDa (trypsine inhibiteur) et 14,4 kDa (α -lactalbumine) a été analysé conjointement aux échantillons. La migration a été effectuée à 4-5 mA pendant 15-20 h ou à 15 mA pendant 5 h dans le tampon Tris-Glycine 25 mM, pH 8,3 ; SDS 0,1 % (W/V). Le gel a ensuite été coloré sous agitation par le bleu de Coomassie à 0,1 % dans le mélange isopropanol 25 %/acide acétique 10 %/eau 65 % pendant 1 h 30 puis décoloré par l'acide acétique à 10 %.

II.4.2- Electrophorèse bidimensionnelle

Après une première migration effectuée dans les conditions décrites dans le paragraphe précédent sur un gel en gradient d'acrylamide 5-25 % en milieu dénaturant (SDS), la piste contenant l'échantillon à analyser par la deuxième dimension (SDS-PAGE 5-25 %, β -mercaptoéthanol) a été équilibrée 20 mn dans le tampon Tris/HCl 125 mM, pH 6,8 ; SDS 2,2 % ; β -mercaptoéthanol 5 % ; glycérol 10 % puis déposée sur un gel en gradient d'acrylamide 5-25 % d'1 mm d'épaisseur et recouvert d'une gélose à 10 % (indubiose A37 Agarose) dans le tampon d'équilibration. La migration a ensuite été opérée comme décrit précédemment

II.4.3- Transfert électrophorétique des protéines

Après l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS, le gel a été équilibré pendant 30 mn dans le tampon Tris 25 mM, pH 8,3, Glycine 192 mM, méthanol 10 %. Les protéines ont ensuite été transférées dans une cuve de transfert (Biorad) contenant le même tampon sur une membrane d'Immobilon P (Millipore) activée pendant quelques secondes dans le méthanol puis lavée dans l'eau MilliQ (10 mn) et équilibrée dans le tampon (10 mn). Le

transfert a été opéré sous un courant constant de 250 mA pendant 4 h. La détection des protéines transférées a été effectuée par la coloration de la membrane par le mélange Noir-amide 0,1 %, méthanol 45 %, acide acétique 10 %, eau 45 % (V/V) utilisé au 1/100 dans le tampon TBS (Tris/HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM). Le colorant en excès a été éliminé par lavage dans de l'eau bidistillée.

II.4.4- Electrofocalisation

L'électrofocalisation a été réalisée en utilisant le "Phast Gel System" (Pharmacia) sur un "Phast Gel" IEF 3-9 permettant la séparation de constituants de point isoélectrique compris entre 3 et 9 unités pH. La migration des échantillons ainsi que les étapes de coloration et de décoloration du gel ont été effectuées selon les conditions opératoires décrites par la firme. Un mélange de protéines de point isoélectrique déterminé (3-9, Pharmacia) a été analysé conjointement aux échantillons.

II.5- Dosage des métaux par absorption atomique

II.5.1- Spectrophotométrie d'absorption atomique en flamme (SAAF)

Les différents dosages ont été effectués dans le laboratoire de Chimie Marine de Lille I dirigé par le Professeur Wartel. Les échantillons à doser (fractions de chromatographies exceptées) ont été préalablement lyophilisés pendant 24 h afin de déterminer la masse de matière sèche. Une fraction de 100 mg d'échantillon (fractions solubles et insolubles ; animaux entiers) a ensuite subi une prédigestion à froid pendant 12 h dans 1 ml d'acide nitrique suprapur puis chauffé progressivement à 120°C jusqu'à disparition des vapeurs nitreuses. Après refroidissement, 1 ml du mélange acide nitrique/acide sulfurique/acide perchlorique (10/2/3 V/V/V) a été ajouté à l'échantillon et amené progressivement à 180°C jusqu'à réduction du volume à approximativement 500 µl. L'échantillon a été complété au volume de 20 ml par de l'eau bidistillée. Le dosage des métaux a été réalisé dans un spectrophotomètre d'absorption atomique Perkin-Elmer 2380 équipé d'un brûleur air-acétylène. Le cadmium et le fer ont été recherchés dans les échantillons (longueurs d'ondes spécifiques respectives : 228,8 et 248,3 nm).

Les sensibilités de détection en flamme pour ces deux métaux sont pour 1 % d'absorption de 0,025 et 0,12 ppm (mg de métal par litre de solution) respectivement. Les résultats obtenus en ppm ont été retranscrits en µg/g de matière sèche et fraîche pour les dosages réalisés dans les fractions solubles et insolubles et dans les animaux entiers par la formule suivante :

$$x(\mu\text{g/g}) = \frac{\text{valeur obtenue } (\mu\text{g/ml}) \times 20 \text{ ml (volume de dilution)}}{\text{masse (g) d'échantillon minéralisé ou équivalent en matière fraîche}}$$

Afin d'estimer la distribution du métal entre la phase soluble et la phase insoluble des animaux, les quantités de métaux dans ces deux compartiments ainsi que dans les animaux entiers ont également été calculées.

Dans le cas de la phase soluble des animaux, l'extraction ayant été réalisée par 2 ml de tampon (cf II.2), une approximation de la masse fraîche de surnageant a été réalisée par $y = \text{masse de l'homogénat} - \text{masse du culot} - 2/3 \text{ masse de l'homogénat (part du tampon dans l'homogénat)}$.

Dans le cas des fractions provenant des différentes chromatographies, les résultats ont été rapportés au volume des fractions (μg de métal / fraction).

II.5.2. Torche à plasma d'argon

Cette technique a été utilisée au cours de notre étude pour apprécier le contenu métallique d'un échantillon de protéine MP II d'animaux provenant directement de l'environnement et purifié selon la protocole établi par Nejmeddine (1987). Cette expérience a été réalisée dans le laboratoire de Biochimie dirigé par le Professeur Crichton à l'Université de Louvain-la-Neuve (Belgique). La protéine (500 μg) a été diluée dans 1 ml d'eau distillée, puis 0,5 ml de cette solution a été complété à 10 ml avec HCl 0,1 M. Parallèlement, un témoin comportant le solvant de dilution seul a été réalisé. Afin d'éviter les contaminations, toutes les manipulations ont été effectuées dans un matériel en polyéthylène. Les éléments Ca, Fe, P, Mg, Mn, Zn, Cu, Al, B, K, Na, Mo, Ni, Cd, ont été dosés dans les différents échantillons et 3 mesures ont été effectuées par torche à plasma d'argon (Spectromètre ICP JY-28). Les résultats, obtenus en ppm, ont été retranscrits en atome gramme de métal par mole de protéine.

II.6- Spectrométrie de masse

Un échantillon de MP II pure a été analysé par spectrométrie de masse afin de déterminer la masse moléculaire de la protéine. Cette analyse a été effectuée par le laboratoire de Spectrométrie de masse et de Chimie Organique des Substances Naturelles (URA 31 CNRS) de l'Université de Strasbourg. Les spectres ont été réalisés en ESMS.

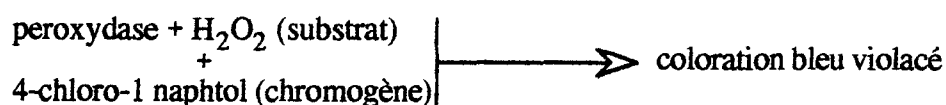
II.7- Méthodes immunologiques

Elles ont été effectuées avec les anticorps polyclonal et monoclonal 11 dirigés contre la MP II et produits antérieurement au laboratoire (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1987 ; Porchet-Henneré *et al.*, 1987).

II.7.1- Immunodétection des protéines après transfert électrophorétique

Après le transfert électrophorétique des protéines sur membrane d'Immobilon P (Millipore), une saturation des sites libres a été effectuée en incubant la membrane

pendant 1 h à température ambiante dans une solution de lait écrémé (lait en poudre Gloria) à 1 % (W/V) dans du tampon TBS-Tween [Tris/HCl 20 mM, pH 7,4 ; NaCl 150 mM ; Tween 20 0,05 % (W/V)]. La membrane est ensuite directement incubée pendant 2 h avec l'anticorps spécifique utilisé au 1/1000 (V/V) dans le tampon TBS-Tween. Après plusieurs lavages par le tampon, la membrane a été incubée pendant 2 h à température ambiante avec les anticorps de mouton anti-IgG de lapin (dans le cas du polyclonal) ou de lapin anti-IgG de souris (cas du monoclonal) marqués à la peroxydase et utilisés à la même dilution que l'anticorps primaire dans le tampon TBS-Tween. Après un rinçage dans le TBS-Tween puis le TBS seul, l'activité peroxydasique a été révélée en incubant la feuille de transfert dans un mélange de 50 ml de TBS, 3 ml de 4-chloro-1-naphtol à 0,3 % (W/V) dans le méthanol et 10 µl de H₂O₂ par :



L'arrêt de la réaction est effectué en lavant la membrane à l'eau. La membrane est ensuite séchée et conservée à l'obscurité.

II.7.2- "Slot-immunobinding assay"

Cette technique a été utilisée pour la recherche de la protéine MP II dans les fractions d'élution provenant de la chromatographie d'échange d'ions. 100 µl des différentes fractions ont été déposés sur une membrane d'Immobilon P (Millipore) préalablement activée pendant quelques secondes dans le méthanol, lavée à l'eau MilliQ (10 mn) puis équilibrée dans le tampon Tris/HCl 15 mM, pH 8,5 (10 mn). L'application des échantillons a été réalisée à l'aide du système "Milliblot transfer equipment" (Millipore) sur des surfaces déterminées de membrane en forme de fente ("Slot"). La membrane a ensuite été traitée de manière similaire à celle utilisée pour l'immunodétection après transfert électrophorétique. Une lecture par densitométrie à 525 nm a été réalisée pour apprécier la réaction.

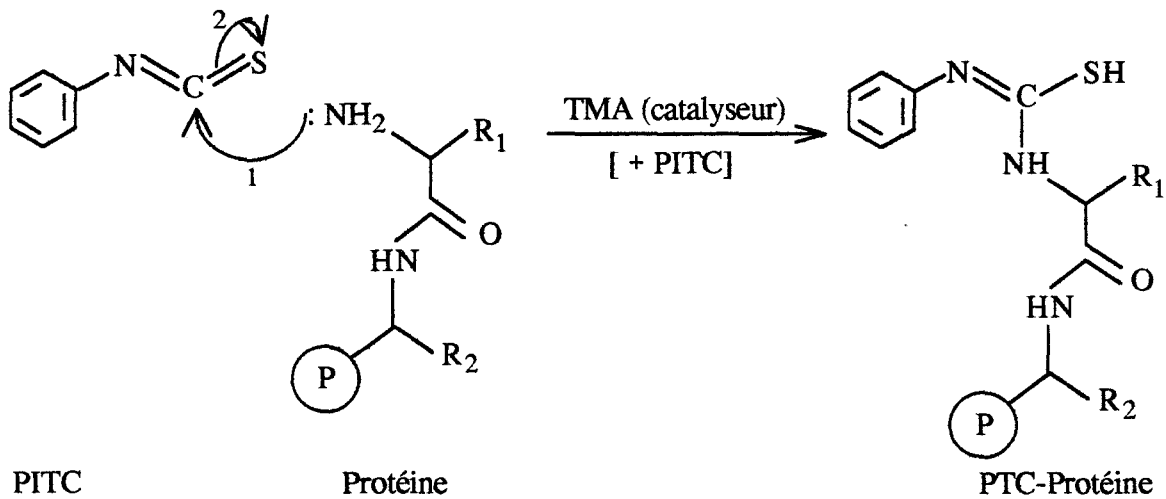
II.7.3- Immunocytochimie

Nous avons utilisé des réactions de type indirect (Coons, 1978) se déroulant en 2 étapes :

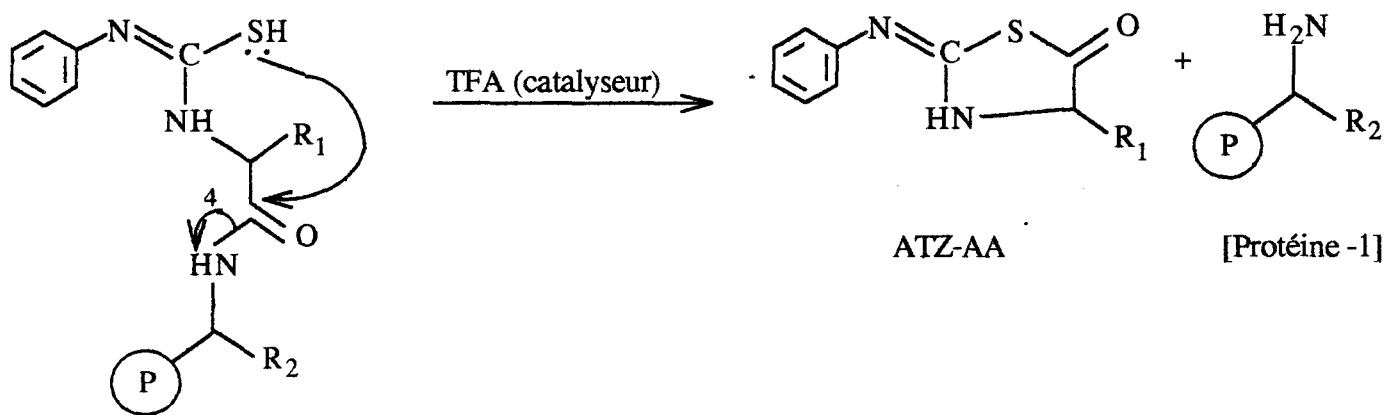
II.7.3.1- Incubation dans le sérum spécifique

Après fixation pendant 24 h à température ambiante dans le mélange de Bouin-Hollande additionné au moment de l'emploi de sublimé (HgCl₂ à saturation dans l'eau distillée) dans les proportions 9/1 (V/V), les pièces ont été déshydratées par les alcools de force croissante selon la procédure : eau distillée (3 x 5mn), éthanol 70° (30 mn), éthanol 96° (30 et 60 mn), éthanol absolu (60 et 120 mn), butanol (60 mn et 12 h).

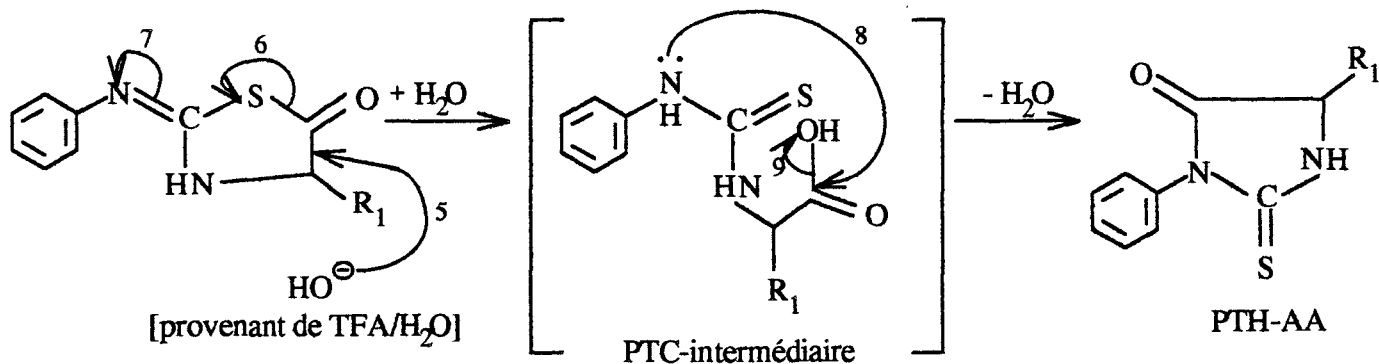
Les pièces ont ensuite été incluses dans de la cytoparaffine 58-60°C et les coupes (7 µm d'épaisseur) déparaffinées par le toluène (10 mn) et réhydratées



COUPLAGE



CLIVAGE



CONVERSION

Schéma 3 - Etapes de la dégradation d'Edman

(éthanol absolu, 10 mn ; éthanol 96°, 10 mn ; éthanol 70° iodé, 3 mn ; passage dans l'eau courante et l'eau distillée), ont été blanchies par un passage dans le métabisulfite de sodium à 2 % et rincées dans l'eau distillée. Les coupes ont été placées pendant 15 mn dans du tampon Coons (diéthyl-malonylurée sodée 10 mM ; NaCl 145 mM) pH 7,2 ajusté par HCl N en présence du sérum spécifique anti-MP II poly- ou monoclonal pendant 12 h à température ambiante et en chambre humide à la dilution 1/200 dans le tampon Coons.

II.3.7.2- Incubation dans le sérum marqué

Après l'incubation avec l'anticorps spécifique les coupes ont été rincées à 2 reprises dans le tampon Coons pendant 5 mn puis incubées 1 h 30 à température ambiante et en chambre humide avec le sérum marqué à la peroxydase dilué au 1/40 dans le même tampon. Ce sérum est constitué de sérum de mouton anti-IgG de lapin (pour les réactions effectuées avec l'anticorps polyclonal) ou de sérum de lapin anti-IgG de souris (dans le cas du monoclonal) couplé à la peroxydase de raifort (Biosys).

II.3.7.3- Révélation

Après un rinçage dans le tampon Coons puis un passage dans l'eau distillée, l'activité peroxydasique a été révélée par l'incubation des coupes dans le mélange Tris 0,1 M pH 7,6 (200 ml) ; 4-chloro-1-naphtol (80 mg dans 3 ml d'éthanol absolu) filtré puis additionné de 375 µl d'H₂O₂. La réaction a été arrêtée par un passage dans l'eau distillée et les coupes ont été montées entre lame et lamelle dans de la glycérine diluée par le Coons (9/1 V/V). Dans chaque cas, une lame témoin avec omission de l'anticorps spécifique a été réalisée en parallèle.

II.8- Séquençage en acides aminés de la protéine MP II de la néréis

II.8.1- Principe de la dégradation d'Edman

Cette technique élaborée par Edman (1950, 1956) ou méthode au PITC (phényl isothiocyanate) permet le décrochement récurrent des acides aminés à partir de l'extrémité NH₂-terminale des protéines et peptides. Chaque cycle de dégradation est composé de 3 étapes résumées dans le schéma 3. La première étape est le couplage du PITC au groupement amine du premier résidu N-terminal de la molécule. La seconde étape est le clivage de la phényl-thio-carbamyl-protéine (PTC-protéine) par une cyclisation en milieu acide (acide trifluoroacétique) donnant un dérivé thiazolinone-acide aminé (ATZ-AA) et la protéine diminuée de son premier acide aminé. La troisième étape consiste enfin en la conversion du dérivé thiazolinone instable en un dérivé plus stable le phényl-thiohydantoin-acide aminé (PTH-AA) qui est alors identifié. Dans le cas de la dégradation automatisée, l'identification de l'acide aminé est le plus couramment réalisée à l'aide d'un système de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplé au

séquenceur (passage sur une colonne de phase réverse C-18 et comparaison de son temps de rétention avec celui des 20 acides aminés courants d'un mélange traité de manière similaire à l'échantillon).

II.8.2- Séquençage N-terminal

La détermination de la séquence N-terminale de la protéine a été réalisée à 3 reprises par dégradation d'Edman automatisée, au laboratoire du Professeur Sautière (URA 409 CNRS) et au laboratoire de Microbiologie à l'Université Libre de Gand (Belgique) dirigé par le Professeur van Beeumen, à partir de protéine MP II purifiée selon le protocole élaboré par Nejmeddine (1987).

II.8.3- Clivage de la molécule et séparation des peptides par HPLC

La longueur de la molécule MP II étant trop importante pour permettre son séquençage complet à partir de la protéine native, des clivages chimiques et enzymatiques ont été réalisés.

La stratégie de coupure employée a été élaborée grâce aux données de la composition en acides aminés effectuée précédemment par Nejmeddine *et al.* (1988) ainsi qu'aux informations de ressemblance entre la MP II et d'autres métalloprotéines obtenues par l'interrogation d'une banque de données ("Swiss Protein Data Bank", chez le Professeur Tartar, Institut Pasteur de Lille) à l'aide du fragment NH₂-terminal de 33 acides aminés précédemment déterminé.

Les clivages et le séquençage complet de la molécule ont été réalisés dans le laboratoire de Biologie dirigé par le Professeur Joosse à l'Université Libre d'Amsterdam (Pays-Bas).

II.8.3.1- Coupure chimique par le bromure de cyanogène (CNBr)

La molécule MP II suspectée de ne contenir qu'un seul résidu de méthionine, le premier clivage a été réalisé par le bromure de cyanogène ; réactif chimique clivant les liaisons Met-X (où X est un acide aminé quelconque). La protéine MP II dessalée a été séchée par évaporation sous vide ("Speed Vac concentrator") et reprise par 30 µl d'eau bidistillée, 105 µl d'acide formique pur, 150 µl d'une solution à 5 % (W/V) de CNBr dans l'acide formique à 70 %.

L'incubation a été réalisée à température ambiante pendant 12 h à l'obscurité et sous atmosphère d'argon. La réaction a été ensuite arrêtée en évaporant à sec l'échantillon. Ce clivage a été réalisé à 2 reprises. Les peptides ont été séparés par HPLC (Waters, Millipore) sur colonne de phase réverse Nucléosil C-18 possédant les caractéristiques suivantes : diamètre des billes de la phase stationnaire 5 µm, diamètre des pores 300 Å, dimensions 4,6 x 250 mm (Hichrom Ltd, England). L'élution a été effectuée au débit de 1ml/mn en utilisant le

système de solvants suivant : tampon A : acide trifluoroacétique (TFA) 7 mM dans l'eau bidistillée (résistivité 16 M Ω) ; tampon B : acétonitrile 60 % (V/V) dans le tampon A. Les tampons ont été dégazés aux ultrasons pendant 20 mn avant utilisation. Lors de la première coupure réalisée, nous avons utilisé un gradient linéaire d'acétonitrile (0-100 % tampon B pendant 60 mn). Des fractions de 1 ml ont été recueillies et l'absorbance lue en continu à 280 nm. Afin d'obtenir une meilleure séparation des peptides les plus hydrophobes, un gradient plus lent a été effectué lors de la deuxième coupure : 0-40 % tampon B pendant 10 mn puis 40-80 % en 80 mn. De même, pour accroître la détection l'absorbance a été mesurée à 214 nm.

II.8.3.2- Clivages enzymatiques

* Par l'endoprotéinase Arg-C

Cette coupure a été réalisée sur l'un des peptides issus du clivage de la protéine MP II par le CNBr. Les fractions contenant ce peptide ont été regroupées et amenées à sec par évaporation sous vide. Elles ont ensuite été reprises par 40 μ l de tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M, pH 8,0 et 10 μ l d'une solution à 0,1 μ g/ μ l d'enzyme endoprotéinase Arg-C de glandes sous-maxillaires de souris (Mannheim, Boehringer) dans le tampon bicarbonate d'ammonium. Cette enzyme spécifique permet la coupure des liaisons Arg-X (X : acide aminé quelconque) dans les protéines et les peptides. L'incubation a été menée pendant 4 h dans un bain-marie à 37°C. L'échantillon a ensuite été évaporé à sec puis repris par 200 μ l de tampon A et déposé sur une colonne de phase réverse C 18. La séparation a été réalisée en utilisant un gradient d'acétonitrile 0-100 % tampon B pendant 60 mn au débit de 1 ml/mn. L'absorbance a été mesurée à 214 nm de manière continue au cours du fractionnement.

* Par l'endoprotéinase Lys-C

Approximativement 1 nmol de MP II a été évaporée puis reprise par 90 μ l de tampon de digestion Tris 25 mM, pH 8,5 (Sigma 7-9 Biochemical buffer); EDTA 1 mM (Tritriplex II, Merck). 0,5 μ g d'endoprotéinase Lys-C (Sequencing grade de *Lysobacter enzymogenes* ; Mannheim-Boehringer) en tampon Tris 50 mM, pH 8,0 ; EDTA 10 mM, a été ajouté à la protéine et l'incubation a été effectuée pendant une nuit à t° ambiante. La même quantité d'enzyme a ensuite été ajoutée et l'incubation poursuivie pendant 1 h à 37°C. L'échantillon a été complété à 200 μ l par le tampon de digestion avant d'être déposé sur la colonne de phase réverse C-18. Comme dans les cas précédents, un témoin a été réalisé. La séparation a été effectuée par un gradient lent d'acétonitrile (0-30 % de tampon B en 20 mn puis 30-80 % en 50 mn). L'absorbance dans les fractions a été mesurée à 214 nm.

Le séquençage des différents peptides issus de ces coupures a été effectué par dégradation d'Edman automatisée sur séquenceur "Applied Biosystems" modèle 473A couplé à un analyseur de PTH-AA modèle 610A. Les échantillons à analyser ont été repris

dans un volume de 60 μ l de TFA 7 mM dans de l'eau bidistillée et déposés sur un filtre en fibre de verre préalablement imbibé de polybrène (1,5-diméthyl-1,5 diazaundeca méthylène-polyméthobromide) utilisé pour mieux assurer la fixation des faibles quantités de protéines sur le filtre.

II.9- Techniques utilisées pour la mise en évidence des sites tissulaires d'accumulation du cadmium

II.9.1- Radioautographie

La radioautographie a été réalisée grâce à l'aide technique de F Bonet (ERS 20 CNRS) sur des coupes à la paraffine d'animaux exposés au cadmium radioactif Cd^{109} (Amersham). L'exposition des animaux a été effectuée par l'injection dans la cavité cœlomique des animaux de 10 μ l d'une solution à 10 μ Ci/ml dans l'eau de mer. Nous avons également administré le toxique en incubant des animaux de petite taille dans 20 ml d'une solution à 1 mCi/ml de Cd^{109} additionnée de $CdCl_2$ à la concentration de 5 μ g Cd/ml dans l'eau de mer. Suite à l'exposition (3, 12, 24 et 48 h dans le cas de l'injection, 5 et 10 jours dans le cas de l'incubation), les animaux ont été rincés 3 fois par de l'eau de mer (durée totale 30 mn) et des métamères de la région moyenne du corps ont été prélevés, fixés par le mélange de Bouin-Hollande puis traités selon la procédure décrite précédemment (cf II 7.3).

Les coupes (7 μ m d'épaisseur) déposées sur les lames gélatinées (gélatine 0,5 % (poids/volume) dans l'eau) ont été déparaffinées puis recouvertes par une émulsion photographique NTB2 (Kodak) diluée à 50 % dans l'eau distillée chauffée préalablement à 45°C. Après exposition à l'obscurité pendant 7 jours, les coupes ont été révélées (D19B, Kodak pendant 2,5 mn à 20°C), fixées par le thiosulfate de sodium à 30 % dans l'eau distillée (5 mn) et lavées à l'eau distillée (3 x 5 mn). Une coloration au rouge nucléaire et picroindigocarmin a ensuite été effectuée afin de mettre en évidence les structures tissulaires. L'observation des coupes a été réalisée au microscope photonique en lumière transmise et en contraste de phase.

II.9.2- Technique histochimique de détection des cations métalliques divalents

Parallèlement à l'utilisation du radioisotope Cd^{109} , nous avons également recherché les sites d'accumulation du cadmium en utilisant une technique histochimique de détection des cations divalents élaborée par Timm (1958) selon Danscher (1981) et selon Hacker *et al.* (1988).

II.9.2.1- Principe de la technique

Dans un premier temps, les éléments métalliques présents dans les tissus sont transformés en sulfures métalliques par la mise en contact avec une solution de

sulfure de sodium, d'ammonium ou saturée en sulfure d'hydrogène. Dans un second temps, les sulfures métalliques insolubles sont visualisés par la réduction d'un sel d'argent (acétate, lactate ou nitrate) à leur surface sous l'effet d'un agent réducteur, l'hydroquinone. Cette technique utilisée avec succès pour la mise en évidence d'accumulations de métaux tels que le zinc ou le cadmium ne permet pas la mise en évidence d'éléments très liés tels que le fer de l'hémoglobine et des cytochromes (Haug, 1973 ; Danscher, 1976).

II.9.2.2- Préparation des échantillons

Les métamères provenant d'animaux exposés au cadmium (80 mg Cd/l d'eau de mer ; 24, 48 et 72 h) ainsi que ceux provenant d'animaux témoins (non contaminés expérimentalement) ont été préfixés pendant 3 mn dans de la glutaraldéhyde à 3 % dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,4 puis incubés 10 mn dans une solution préparée extemporanément de Na₂S 0,1 % (W/V) dans le tampon phosphate. Parallèlement, un lot identique servant de témoin a été traité en absence de Na₂S. Pour faciliter le contact de l'ensemble des tissus avec le Na₂S, les parapodes ont été sectionnés sur l'un des côtés latéraux des métamères. Les pièces ont ensuite été fixées pendant 1 h par la glutaraldéhyde à 3 % puis rincées pendant 2 h dans le tampon phosphate. Après déshydratation par les alcools de force croissante, les métamères ont été placés pendant 24 h dans le toluène. L'inclusion a été effectuée dans de la cytoparaffine (58-60°C). Après déparaffinage et réhydratation, les coupes (7 µm d'épaisseur) déposées sur des lames gélatinées ont été recouvertes de nouveau par un film de gélatine de manière à empêcher les précipités autocatalytiques d'argent, qui se forment dans la solution de développement de la réaction, d'atteindre la surface des coupes.

II.9.2.3- Réaction

Le développement de la réaction a été réalisé en incubant les coupes pendant 60 mn à température ambiante et à l'obscurité dans le mélange 120 ml de gomme arabique à 50 % dans l'eau bidistillée ; 30 ml de solution d'hydroquinone à 5,76 % dans l'eau bidistillée ; 20 ml de tampon citrate de sodium/acide citrique pH 3,8 (23,5 g et 25,5 g respectivement dans 100 ml d'eau bidistillée) et 30 ml d'une solution de lactate d'argent à 0,74 % (W/V) dans l'eau bidistillée ajoutée au moment de la réaction. La couche de gélatine recouvrant les coupes a été ensuite enlevée en soumettant les lames à une circulation d'eau courante de faible débit à 40°C pendant 45 mn. Après 4 rinçages dans l'eau bidistillée les coupes ont été déshydratées puis montées entre lame et lamelle dans une résine synthétique (XAM).

II.9.2.4. En microscopie électronique

La radioautographie utilisant le Cd¹⁰⁹ ne pouvant être effectuée à l'échelle de la microscopie électronique par l'énergie trop importante des rayonnements émis par le radioisotope, la recherche des structures impliquées à l'échelle cellulaire dans la séquestration du cadmium a été réalisée par la technique de Timm selon Hacker *et al.* (1988). Pour cette expérience,



les animaux ont été exposés pendant 21 jours à 22 ppm de cadmium (CdCl_2). La réaction a été effectuée directement sur les métamères avant l'inclusion. La déshydratation a été effectuée par l'acétone et l'inclusion dans une résine synthétique : l'épon. Des coupes ultrafines (400Å) effectuées à l'ultramicrotome ont été déposées sur des grilles de cuivre et observées au microscope électronique à transmission (Jeol 120 CX).

II.10- Technique de coloration négative (microscopie électronique)

Cette technique a été utilisée pour observer en microscopie électronique les molécules MP I dont la masse moléculaire est élevée et qui lient le cadmium. La fraction la plus riche en cadmium du pic II obtenu par la chromatographie sur gel Sepharose 4B de la fraction soluble de néréis exposées au cadmium a été diluée au 1/100 avec le tampon Tris utilisé lors de la chromatographie. Une grille de cuivre recouverte préalablement par une membrane de Parlodion puis carbonée a été utilisée pour déposer l'échantillon à examiner. Celle-ci a été trempée dans une solution de chlorure de potassium (KCl) N/10 puis dans la solution d'échantillon (20 s). Après essorage par une mise en contact du bord de la grille avec un morceau de papier filtre, la grille a été séchée pendant 20 s puis colorée par trempage (2 mn) dans une solution d'acétate d'uranyle à 1 %, essorée puis séchée. Cette grille a ensuite été observée par transmission au microscope électronique (Jeol 120 CX).



RESULTATS

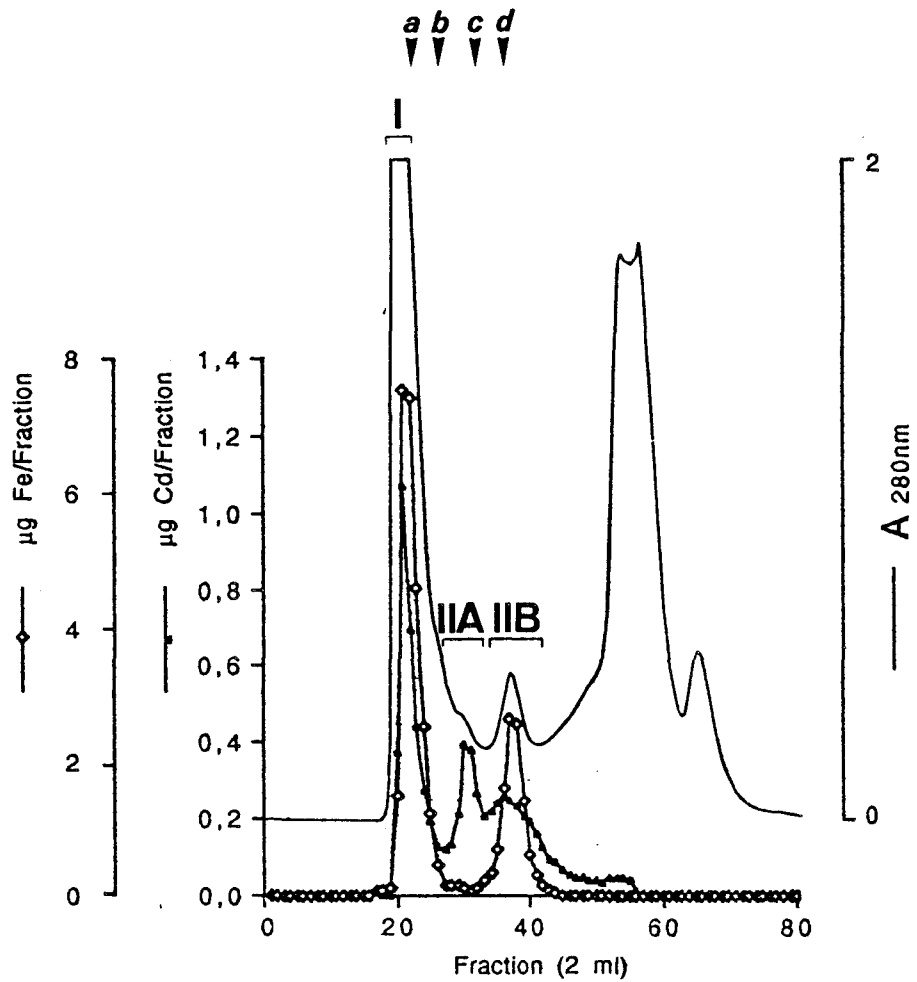


Figure 8 Chromatographie de gel filtration par FPLC de la fraction soluble de *Nereis diversicolor* exposées au cadmium (20 mg/l d'eau de mer ; 4 jours).
 Colonne utilisée : Superdex 75 (1,6 x 60 cm) ; tampon Tris/HCl 15 mM, pH 8,5 ; débit 1 ml/mn.
 A : absorbance ; flèches : position d'éluion de substances de masse moléculaire connue, exprimée en kDa. a : 67 ; b : 43 ; c : 25 et d : 13,7. I, IIA et IIB : correspondent aux 3 pics de cadmium.

RESULTATS

I - Etude de la protéine MP II liant le cadmium

Les travaux antérieurs réalisés par Nejmeddine (1987) et Nejmeddine *et al.* (1988) sur l'annélide polychète *Nereis diversicolor* ont montré qu'à la suite d'une exposition expérimentale par le cadmium [$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$] ajouté à l'eau de mer d'élevage, le métal s'accumulait chez l'animal de manière majeure au niveau de deux protéines de la fraction soluble, baptisées MP I (masse moléculaire > 70 kDa) et MP II (voisine de 20 kDa en conditions natives et inférieure à 14,4 kDa en conditions dénaturantes). Cette dernière a été isolée et purifiée (Nejmeddine *et al.*, 1988). Sur la base de sa composition en acides aminés, il a été montré qu'il ne s'agissait pas d'une métallothionéine (faible teneur en cystéine et présence d'acides aminés aromatiques). Afin d'achever la caractérisation de la molécule et de déterminer sa nature réelle, nous avons entrepris de déterminer sa structure primaire.

I.1- Préparation de la protéine MP II

Comme nous l'avons précisé dans le chapitre matériel et méthodes, la préparation de la protéine MP II a été réalisée au départ de notre étude en utilisant le protocole établi par Nejmeddine (1987). Grâce au matériel protéique ainsi préparé, nous avons pu déterminer l'enchaînement des 33 premiers acides aminés N-terminaux de cette molécule (cf ce chapitre I.2.1.). Cependant, nous avons été ensuite amené à modifier peu à peu ce dernier, les premiers essais de clivage de la molécule réalisés afin de compléter la séquence n'ayant pas abouti à des résultats positifs. Ceci est vraisemblablement dû à la persistance d'une hétérogénéité de l'échantillon analysé. Ces modifications, décrites dans le chapitre matériel et méthodes, ont eu pour objet de réduire le nombre et la durée des étapes de préparation de la protéine et d'en accroître la pureté. Grâce à celles-ci nous avons pu déterminer la séquence complète de la molécule et également confirmer les résultats du fragment N-terminal de la protéine. De ce fait, par un souci de clarté de l'exposé, nous ne présenterons dans ce paragraphe que les résultats obtenus à partir du protocole modifié.

I.1.1- Fractionnement de l'extrait soluble de néréis exposées au cadmium

Après extraction tissulaire des animaux exposés au cadmium via l'eau de mer (20 ppm Cd/l ; 4 jours ; 13°C), le surnageant obtenu par la double centrifugation et filtré sur support 0,22 μm a été soumis à une chromatographie de gel filtration sur une colonne de Superdex 75. Le résultat de cette séparation est illustré par la fig. 8. Le profil d'éluion des fractions chromatographiées à 280 nm révèle 3 pics majeurs. Le premier pic représente des composés de masse moléculaire élevée (supérieure à 67 kDa) qui correspond à la limite supérieure d'exclusion du gel utilisé. Le second pic est constitué de molécules de masse moléculaire comprise

Figure 9 Analyse électrophorétique (SDS-PAGGE, 5-25 %) des pics IIA et IIB contenant du cadmium obtenus après chromatographie de gel filtration sur colonne Superdex 75 (FPLC).
 1 : pic IIA, 2 : fraction soluble, 3 : pic IIB, 4 : MP II pure (pour comparaison).

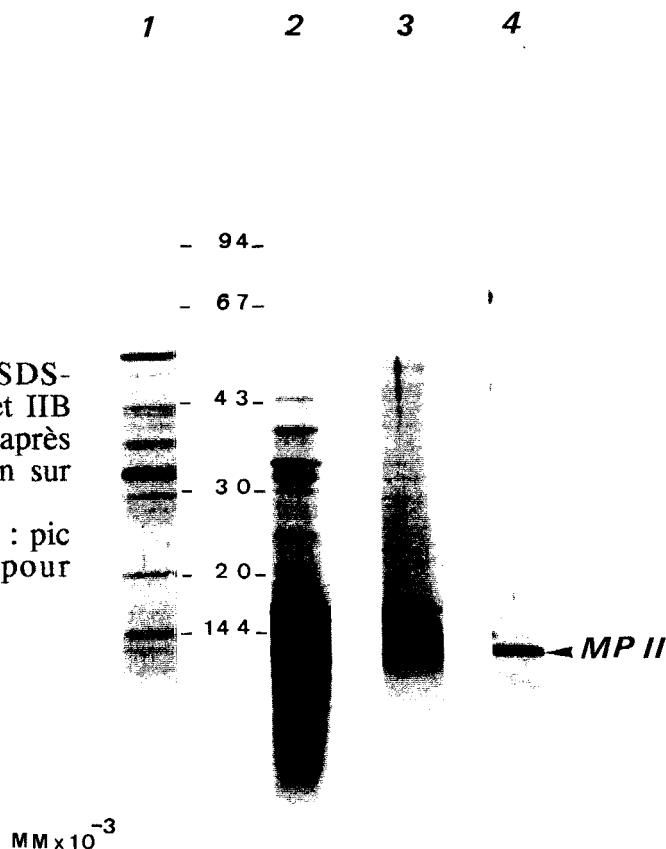
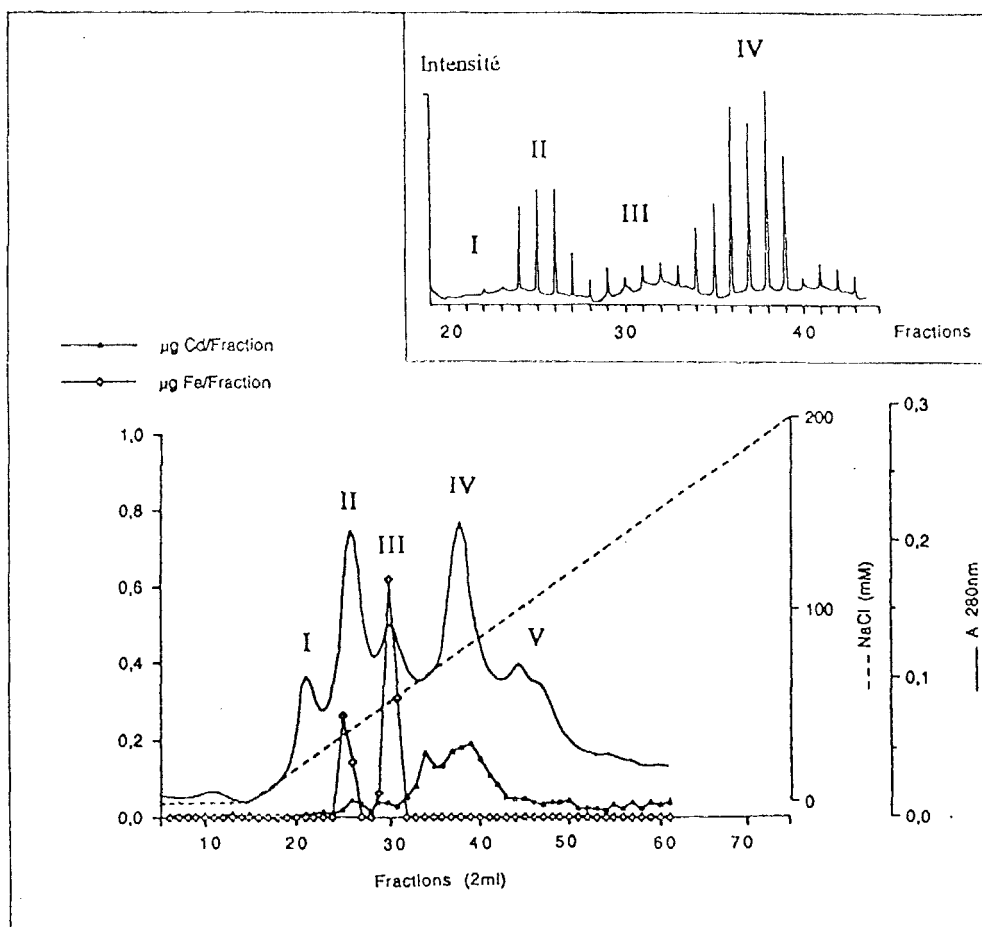


Figure 10 Chromatographie échangeuse d'ions des fractions contenant la MP II obtenues après la chromatographie de gel filtration.
 Les fractions 34-40 (pic II B, cf fig. 8) ont été rassemblées et chromatographiées sur une colonne de DEAE-cellulose (1,5 x 10 cm) équilibrée dans le tampon Tris/HCl 15 mM, pH 8,5. Les protéines ont été éluées par 120 ml d'un gradient linéaire de NaCl (0-200 mM) dans le tampon à 10 ml/h. A : absorbance.
Encart : Enregistrement densitométrique à 525 nm de l'immunodétection des protéines séparées par la chromatographie échangeuse d'ions, par l'anticorps monoclonal n°11 anti-MP II. 100 µl de chaque fraction ont été déposés sur membrane d'Immobilon-P en slot en utilisant le Milliblot Transfert Equipment (Millipore).



entre 25 et 13,7 kDa et le troisième de masse moléculaire très faible (inférieure à 8 kDa). Le dosage du cadmium par SAAF dans les fractions d'élution a montré la présence de 3 pics d'importances différentes. Le premier, noté I, coïncide avec le pic de composés de masse moléculaire élevée, le second pic, noté IIA, est présent dans la zone correspondant aux composés de masse moléculaire comprise entre 43 et 25 kDa. Enfin, un troisième pic, noté IIB, coïncide avec le second pic protéique. Au niveau de ce dernier, on constate que la valeur la plus élevée en cadmium concerne les fractions chromatographiques éluées dans un volume d'élution très voisin de celui du standard de 13,7 kDa utilisé pour la calibration de la colonne. Au niveau du troisième pic protéique nous n'avons pas observé la présence d'une quantité de cadmium significative. Un dosage de fer réalisé sur le même fractionnement révèle la présence de 2 pics importants superposés aux pics de cadmium I et IIB. Par contre, ce métal n'a pas été détecté au niveau du pic IIA ni au niveau des composés de masse moléculaire très faible.

I.1.2- Fractionnement du pic II B

Avant d'aborder la seconde étape de séparation en échange d'ions, nous avons effectué un contrôle électrophorétique des fractions des pics IIA et IIB afin de déterminer leur contenu protéique. Cette analyse a été réalisée sur un gel de polyacrylamide 5-25 % en présence de SDS et de β -mercaptoéthanol. Le résultat de cette analyse (fig. 9) montre que les fractions du pic IIB contiennent une bande majeure légèrement inférieure au standard de 14,4 kDa, profil électrophorétique analogue à celui observé par Nejmeddine (1987) pour un échantillon de pic II contenant la MP II après la chromatographie de gel filtration sur Sephadex G 75. Les fractions riches en Cd composant le pic IIA révèlent une importante hétérogénéité renfermant un grand nombre de constituants, la bande la plus intense migrant dans la région correspondant au composé de 30 kDa. Cet échantillon ne renferme pas de bande dans la zone de migration du gel correspondant à la MP II et ne constitue donc pas un produit de polymérisation de la MP II. Les fractions d'élution composant le pic IIB (volume d'élution compris entre 68 et 80 ml) ont été regroupées et déposées sur une colonne de DEAE-cellulose équilibrée dans le tampon des échantillons (Tris/HCl 15 mM ; pH 8,5). Pour cette chromatographie, 15 fractionnements issus de la première étape de séparation ont été réunis. La colonne a ensuite été éluée par un volume de tampon Tris puis par 120 ml d'un gradient linéaire 0-200 mM NaCl dans le tampon. Le résultat de cette séparation, illustré par la fig. 10, montre la présence de 5 pics majeurs nettement séparés dans ce gradient dont 2 (pics II et IV) présentent une absorbance plus importante à 280 nm.

Le dosage du cadmium réalisé dans les fractions chromatographiques montre que le métal est localisé au niveau des fractions composant le pic IV. Un dosage de fer, également réalisé sur le fractionnement en raison de la ressemblance de l'extrémité N-terminale de la MP II, séquencée antérieurement, avec des ferroprotéines, montre que seuls les pics II et III contiennent du fer.

Figure 11 Analyse électrophorétique (SDS-PAGGE 5-25 %) des fractions issues de la séparation par chromatographie d'échange d'ions du pic IIB contenant la MP II. I, II, III, IV, correspondent aux pics protéiques de la figure 10.

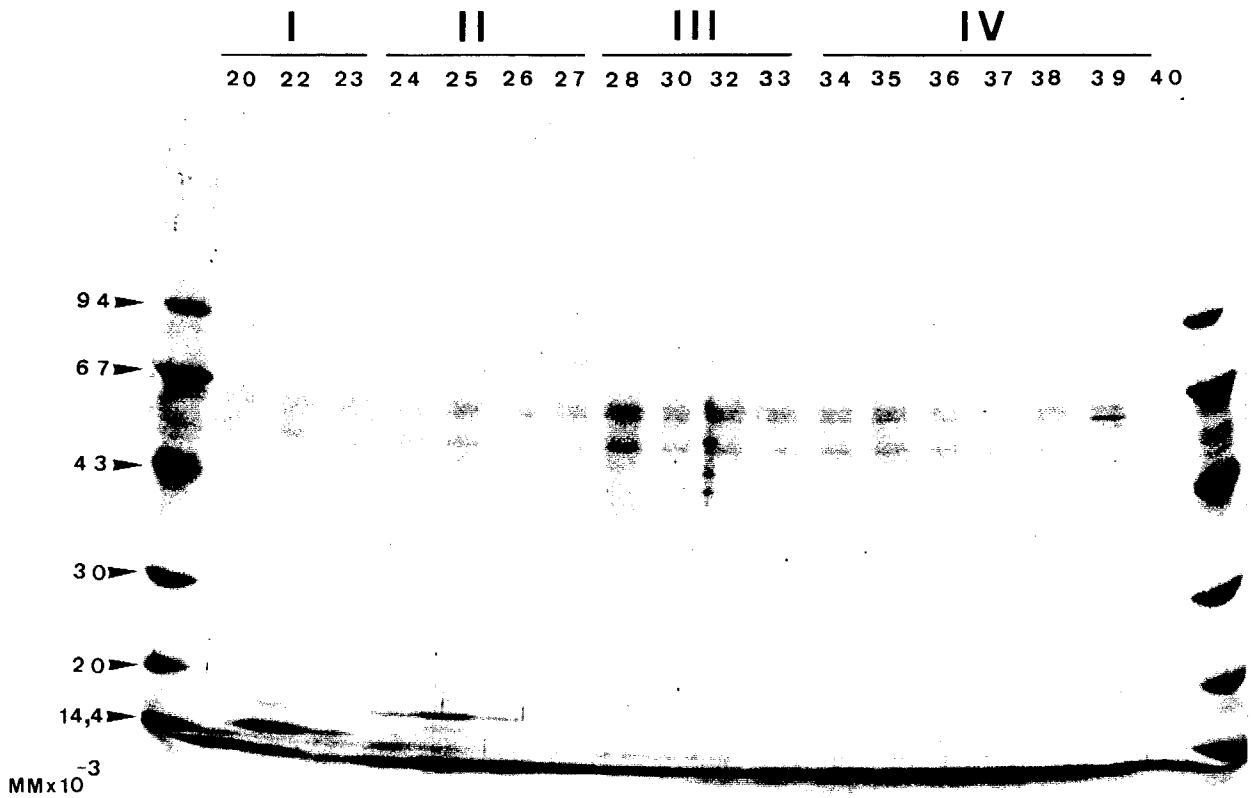


Figure 12

Electrofocalisation de la fraction majeure des pics (II et IV) immunoréactifs avec l'anticorps monoclonal n°11 anti-MP II provenant de la chromatographie échangeuse d'ions. Le gel (Phast-gel IEF 3-9) a été utilisé avec le Phast-gel System (Pharmacia) dans les conditions prescrites par la firme. Pistes 1 et 4 : substances de point isoélectrique (pI) déterminé ; Piste 2 : fraction 25 du pic II ; Piste 3 : fraction 37 du pic IV.

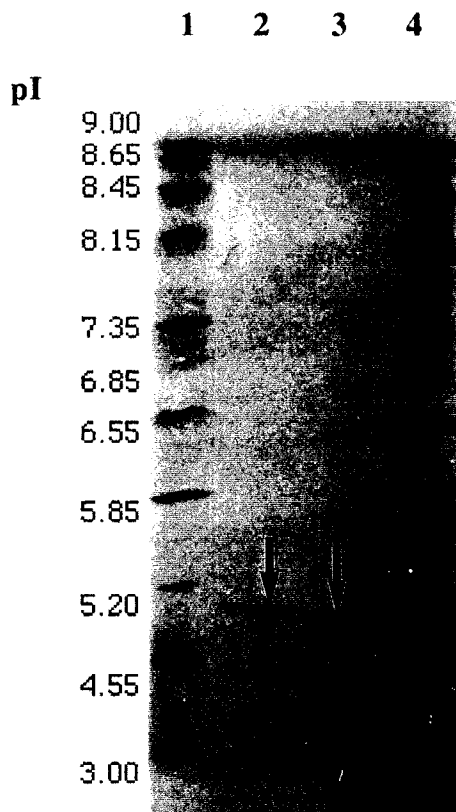
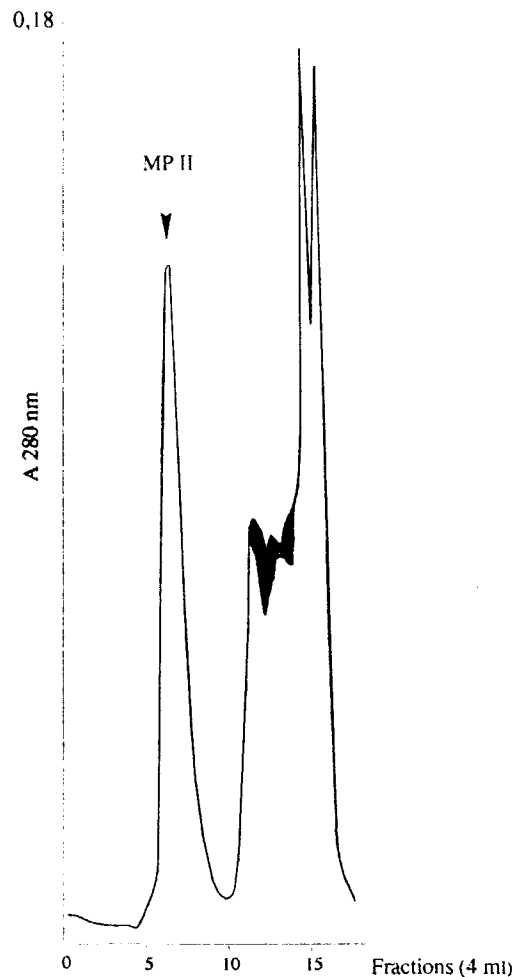


Figure 13

Dessalage des fractions contenant la MP II par chromatographie de gel filtration sur une colonne de gel Sephadex G 25. Débit : 10 ml/h dimensions de la colonne 2,7x27 cm, absorbance à 280 nm/



I.1.3- Recherche de la MP II dans les fractions obtenues après la chromatographie d'échange d'ions

La recherche de la protéine MP II dans ces fractions a été menée en utilisant un anticorps spécifique dirigé contre celle-ci (monoclonal n°11) et produit antérieurement au laboratoire (Porchet-Henneré *et al.*, 1987). Cette immunodétection a été réalisée sur membrane d'Immobilon P par "Slot immunobinding assay". L'ensemble des fractions correspondant aux 5 pics obtenus a ainsi été testé. La réaction a ensuite été appréciée par une lecture en densitométrie (cf fig. 10, encart). On constate au sein du fractionnement la présence de 2 zones immunoréactives qui se superposent aux pics II et IV contenant respectivement du fer et du cadmium et élués respectivement vers 49 et 76 mM NaCl. Les fractions correspondant au pic III contenant du fer ne sont, par contre, pas immunoréactives. Ce résultat suggère la présence de deux isoformes de la protéine MP II.

I.1.4- Analyse électrophorétique

Une analyse électrophorétique des différentes fractions chromatographiques a été réalisée à la suite de ce fractionnement sur un gel de polyacrylamide 5-25 % en présence de SDS et de β -mercaptoéthanol. Cette analyse (fig. 11) révèle la présence d'une bande intense de masse moléculaire inférieure à 14,4 kDa dans les fractions correspondant au pic IV contenant le cadmium. On remarque également qu'il existe une bande d'intensité comparable pour les échantillons correspondant aux fractions du pic II contenant du fer.

I.1.5- Electrofocalisation

Une électrofocalisation a été réalisée (fig. 12) pour les fractions 25 et 37 correspondant au sommet des 2 pics immunoréactifs observés précédemment. Cette analyse révèle pour les deux échantillons analysés l'existence d'une bande protéique ayant un point isoélectrique très similaire de l'ordre de $5 \pm 0,2$ suggérant une très importante ressemblance entre les 2 isoformes détectées.

I.1.6- Dessalage de la MP II

Les fractions du pic IV contenant du cadmium et présentant une immunoréactivité avec l'anticorps monoclonal 11 anti-MP II (fractions 34 à 39) ont été regroupées et dessalées par filtration sur une colonne de gel Sephadex G 25 (fig.13) montée dans de l'eau milliQ. Les fractions contenant la protéine ont été rassemblées puis concentrées partiellement par évaporation sous vide et conservées à -20°C avant d'être utilisées pour la détermination de la séquence en acides aminés.

10 20 30

1 G W E I P E P Y V W D E S F R V F Y E Q L D E E H K K I F R G I F

2 G F P I P D P Y V W D P S F R T F Y S I I D D E H K T L F N G I F

3 G F P I P D P Y G W D P S F R T F Y S I I D D E H K T L F N G I F

4 G F E I P E P Y K W D E S F Q V F Y E K L D E E H K Q I F N A I F

Figure 14 Homologies de structure entre la MP II et des protéines respiratoires de sipunculiens.

1: Myohémérythrine de *Themiste zostericola* § (Klippenstein et al., 1976).

2: Hémérythrine de *Phascolopsis gouldii* (Klippenstein, 1972).

3: Hémérythrine de *Themiste pyroides* (Ferrell et Kitto, 1971).

4: MP II de *Nereis diversicolor* (Demuyne et al., 1991).

(§) Selon Hendrickson et Ward (1977), l'espèce *T. pyroides* aurait été mal identifiée par les auteurs et correspondrait à *T. zostericola*.

I.2- Détermination de la structure primaire de la protéine MP II liant le cadmium

I.2.1- Détermination de la séquence N-terminale de la MP II*

Le séquençage de l'extrémité N-terminale de la molécule MP II a été réalisé par dégradation d'Edman automatisée sur séquenceur en phase liquide. Un échantillon de 2,5 nmol de protéine a été utilisé. La détermination a été réalisée à 3 reprises et les 33 premiers acides aminés ont été identifiés (Demuynck *et al.*, 1991). A l'aide de ce fragment nous avons interrogé, par l'intermédiaire du Professeur Tartar, une banque de données ("Swiss Protein data bank") afin de rechercher une identité de structure avec d'autres protéines. Cette recherche nous a permis de constater l'existence d'une très forte ressemblance entre la molécule MP II et deux types de protéines respiratoires contenant du fer non-héminique : les myohémérythrine et les hémérythrine. La comparaison des fragments N-terminaux de ces différentes molécules avec la MP II est illustrée par la fig. 14. On constate que l'identité de séquence la plus importante entre la MP II et ces molécules est de 79 % et concerne la myohémérythrine de *Themiste zostericola*§ (Klippenstein *et al.*, 1976). Cette protéine de nature monomérique, caractéristique que possède également la MP II, exerce un rôle de stockage de l'oxygène moléculaire dans les muscles. Elle a été mise en évidence chez certains représentants d'un phylum voisin de celui des annélides, les sipunculiens, dans les muscles rétracteurs de la trompe ou introvert. L'identité est plus faible (61 %) avec les hémérythrine de *Themiste pyroides* (Ferrell et Kitto, 1971), *Phascolopsis gouldii* (Klippenstein, 1972) et *Themiste dyscritum* (Loehr *et al.*, 1978), de nature oligomérique, mais dont les protomères présentent une structure primaire et tertiaire proche de celle des myohémérythrine (Ward *et al.*, 1975). Ces molécules ont été identifiées dans l'ensemble des sipunculiens et également rapportées chez les priapulien, les brachiopodes et chez une famille d'annélides polychètes les magelonidés (Manwell, 1964). Localisées dans des cellules circulantes, elles assurent le transport de l'oxygène moléculaire chez les sipunculiens. Il est à noter que l'importance de la ressemblance entre la MP II et ces molécules est renforcée par le fait que la MP II possède les acides aminés Tyr 8, Tyr 18 et His 25 impliqués dans la fixation du fer et/ou dans la capacité de fixer l'oxygène de ces protéines respiratoires (*in* Klippenstein *et al.*, 1976).

I.2.2- Séquence en acides aminés de l'isoforme de la protéine MP II liant le cadmium (cf fig. 15)

* MP II préparée selon le protocole élaboré par Nejmeddine (1987)

§ décrite comme étant *T. pyroides*. Cette espèce aurait été mal identifiée par les auteurs selon Hendrikson et Ward (1977).

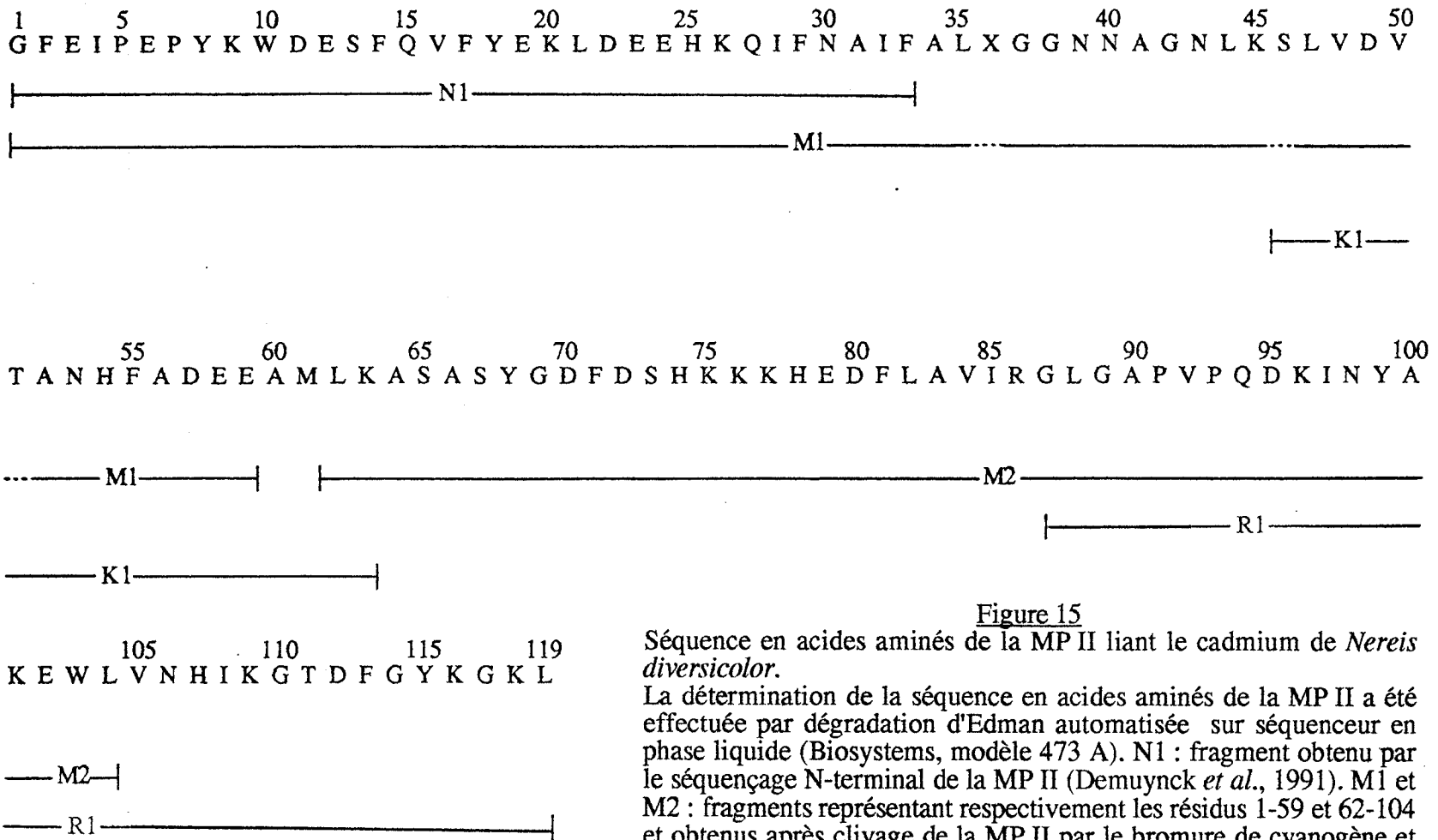
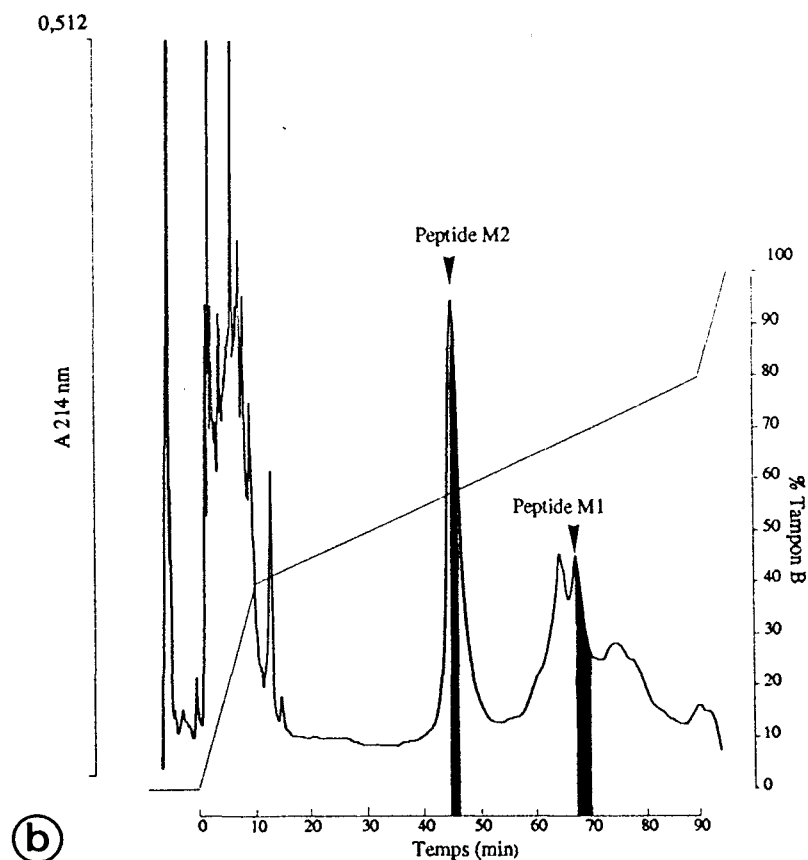
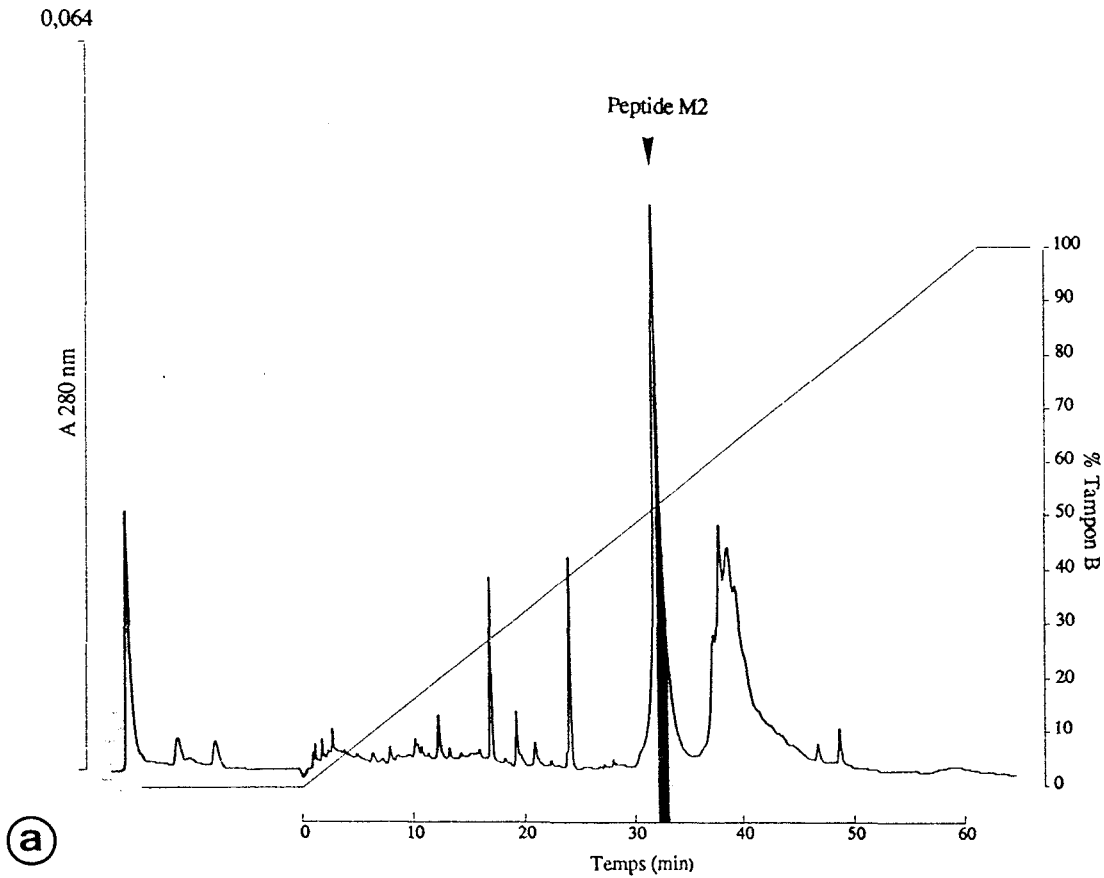


Figure 15

Séquence en acides aminés de la MP II liant le cadmium de *Nereis diversicolor*.

La détermination de la séquence en acides aminés de la MP II a été effectuée par dégradation d'Edman automatisée sur séquenceur en phase liquide (Biosystems, modèle 473 A). N1 : fragment obtenu par le séquençage N-terminal de la MP II (Demuynck *et al.*, 1991). M1 et M2 : fragments représentant respectivement les résidus 1-59 et 62-104 et obtenus après clivage de la MP II par le bromure de cyanogène et HPLC sur colonne de phase-réverse C-18. R1 : fragment représentant les résidus 87-119 issu de la coupure du fragment M2 par l'endoprotéinase Arg-C et séparé par HPLC sur colonne de phase-réverse C-18. K1 : fragment représentant les résidus 46-63 obtenu après clivage de la MP II par l'endoprotéinase Lys-C et séparation par HPLC sur colonne de phase-réverse C-18. (...) indique les PTH-AA non identifiés avec certitude.

Figure 16 Séparation par RP-HPLC sur colonne C-18 des peptides de coupure de la MP II par le bromure de cyanogène.
 Colonne utilisée : Nucleosil C-18 Wide pore (4,6 x 250 mm) ; tampon d'éluion A : TFA 7 mM, B : TFA 7 mM dans l'acétonitrile 60 %.
 a : gradient 0-100 % de tampon B en 60 mn ; débit 1 ml/mn.
 b : gradient 0-40 % de tampon B en 10 mn puis 40-80 % de tampon B en 80 mn ; débit 1 ml/mn.

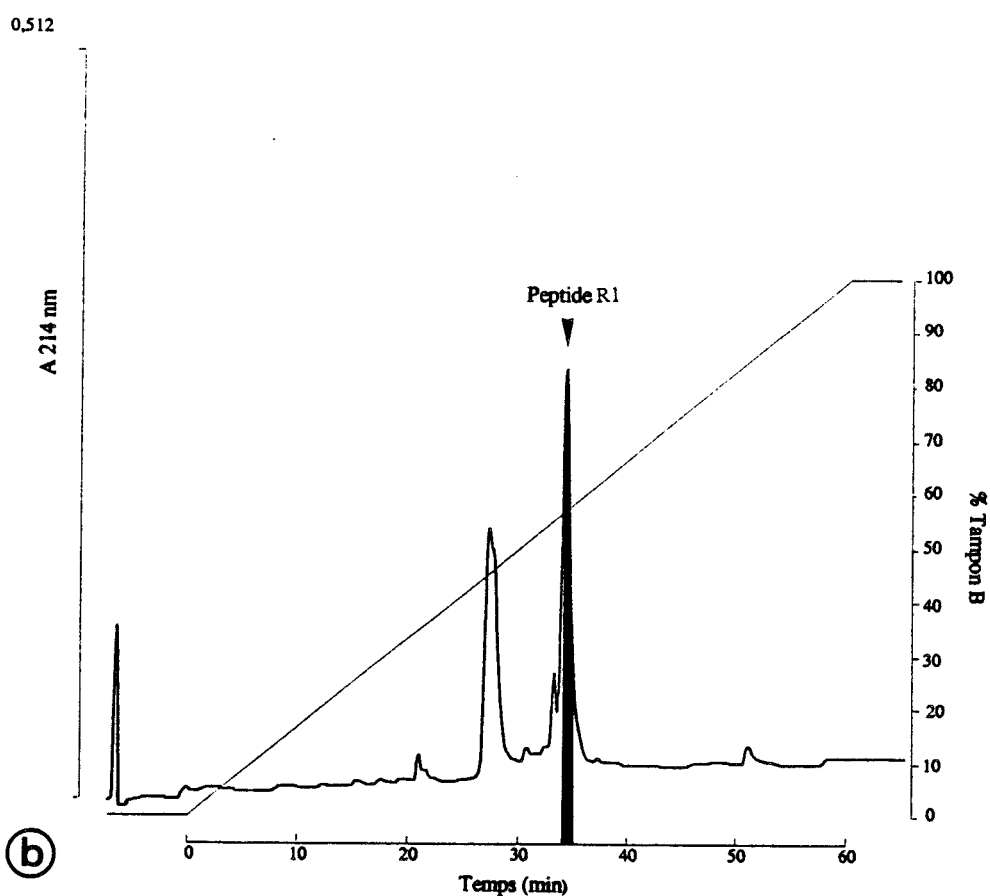
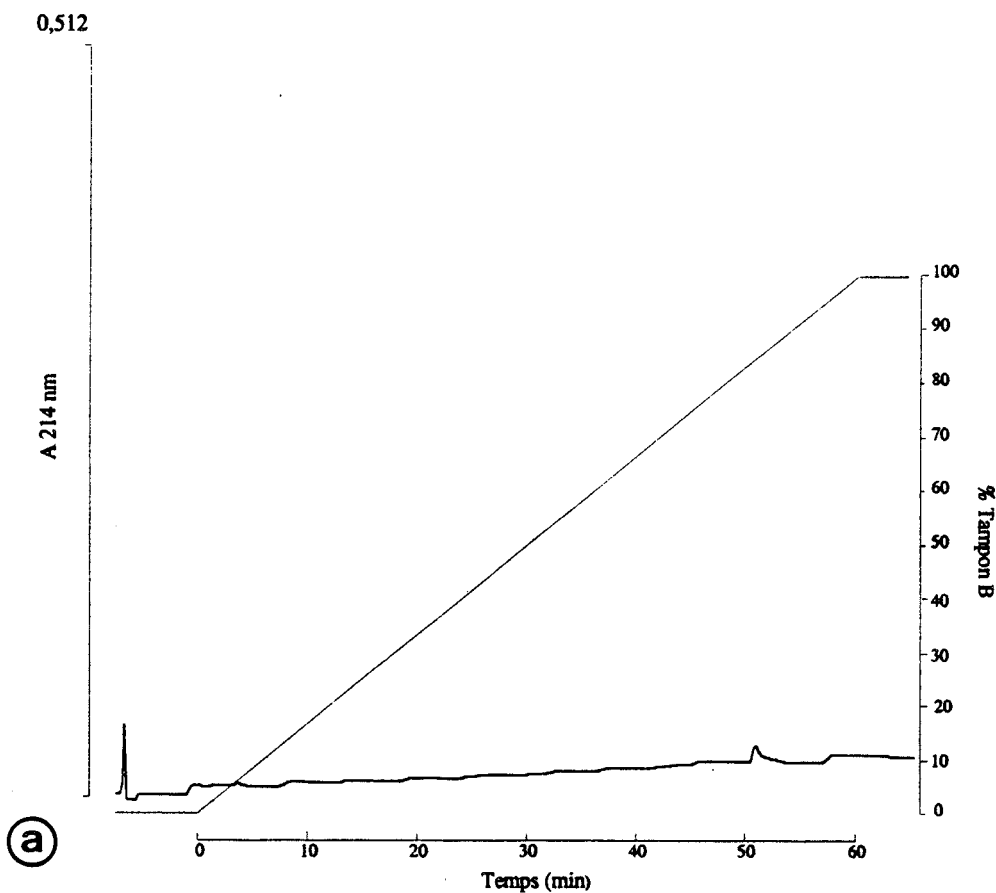


En raison de l'importance de l'homologie mise en évidence entre la partie N-terminale de la MP II et celle de la myohémérythrine de *T. zostericola* (Klippenstein *et al.*, 1976), nous nous sommes basés sur l'hypothèse d'une ressemblance étroite entre les séquences des deux molécules pour déterminer le choix du type de clivage à réaliser pour la MP II. Nous avons également utilisé les données de la composition en acides aminés effectuée antérieurement (Nejmeddine *et al.*, 1988). Le contenu en méthionine étant à la fois faible dans la myohémérythrine (2 résidus placés à la suite dans la zone centrale de la molécule) et la MP II (1,1 mole pour 100 moles d'acides aminés), le premier clivage a été réalisé en utilisant un réactif chimique, le bromure de cyanogène (CNBr). Ce dernier coupe spécifiquement du côté C-terminal des méthionines.

I.2.2.1- Clivage chimique par le CNBr

L'isoforme de la MP II liant le cadmium purifiée selon notre procédure a été incubée pendant 12 h à l'obscurité sous argon dans une solution d'acide formique à 70 % contenant le CNBr. La séparation des peptides de coupure, effectuée par HPLC sur une colonne de phase réverse C 18, révèle, à 280 nm, un profil d'élution composé de plusieurs pics (fig. 16a). L'un d'entre-eux, élué vers 55 % de tampon B correspondant à 33 % d'acétonitrile, est très nettement séparé dans le gradient utilisé (0-100 % de tampon B en 60 mn) et présente à la fois une absorbance importante et un aspect symétrique. La fraction 33 a été évaporée à sec, reprise par 100 µl de tampon TFA 7 mM dans l'eau bidistillée et 60 µl ont été soumis à l'analyse de la séquence en acides aminés. 43 cycles de dégradation ont été réalisés à partir de cet échantillon. Hormis les derniers cycles, les PTH-AA ont été identifiés avec certitude par la présence d'un signal unique pour chaque cycle de dégradation. Ce peptide M 2 (fig. 15) présente une très forte ressemblance avec une zone (AA 61-103) de la région C-terminale de la myohémérythrine de *Themiste zostericola* (Klippenstein *et al.*, 1976) et des différentes hémérythrines citées précédemment. Vraisemblablement plus long que la partie séquencée en raison de l'absence d'un résidu de méthionine à son extrémité C-terminale, ce peptide a été traité ultérieurement par l'enzyme endoprotéinase Arg-C(cf. I.2.2.2.), la séquence révélant la présence d'un résidu unique d'arginine en position 25 du peptide (fig. 15). Concernant les autres peptides issus du clivage de la protéine par le CNBr, une modification du gradient d'acétonitrile a été réalisée sur un autre échantillon de protéine traité par le CNBr. Dans ce cas, l'absorbance a été mesurée à 214 nm pour accroître la détection des peptides. Le profil chromatographique obtenu (fig. 16b), révèle un accroissement de séparation des peptides les plus hydrophobes. Parmi ceux-ci, on distingue deux pics étroits ayant une absorbance quasi équivalente. Les fractions 68-70 éluées vers 70 % de tampon B (42 % d'acétonitrile) et regroupées ont été évaporées à sec puis utilisées en totalité pour la détermination de la séquence en acides aminés. Cet échantillon renferme un peptide (M1) dont 59 acides aminés ont été déterminés (fig. 15). Celui-ci représente la partie N-terminale de la protéine, les 39 premiers acides aminés correspondant au fragment N-terminal déjà séquencé (Demuyne *et al.*, 1991). Au cours de cette détermination, l'identification du PTH-

Figure 17 Séparation par RP-HPLC sur colonne C-18 des peptides de coupure du fragment M2 (CNBr) par l'endoprotéinase Arg-C.
a : endoprotéinase Arg-C.
b : fragment M2 traité par l'endoprotéinase Arg-C.
Colonne et tampon d'éluion identiques à ceux de la figure 16. Gradient : 0-100 % de tampon B en 60 mn ; débit 1 ml/mn.



AA n'a pu être effectuée pour 3 cycles correspondant aux acides aminés 36, 46 et 51. Comme le peptide M2, M1 ne possède pas de résidu de méthionine à son extrémité C-terminale et, de ce fait, est probablement de taille plus importante.

I.2.2.2- Clivage enzymatique par l'endoprotéinase Arg-C du fragment M 2

Celui-ci a été réalisé sur les fractions 43-49 du pic élué à 57 % d'acétonitrile (fig. 16b), après séquençage des 6 premiers acides aminés de la fraction majeure du pic (fraction 46), pour vérifier qu'il s'agissait bien du peptide M2 séquencé préalablement. L'incubation avec 1 µg d'enzyme endoprotéinase Arg-C a été effectuée pendant 4 h à 37°C en tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M, pH 8,0. Les peptides ont ensuite été séparés par HPLC sur colonne C 18 avec un gradient linéaire 0-100 % de tampon B (60 % d'acétonitrile) pendant 60 mn. Le résultat de cette séparation (fig. 17b) montre 2 pics nettement séparés élués vers 56 et 66 % de tampon B (respectivement 33,6 et 39,6 % d'acétonitrile). Les fractions du pic le plus hydrophobe (fractions 34-36) ont été regroupées et analysées en séquence en acides aminés. Cette analyse a conduit à l'identification d'un peptide (R 1, fig. 15) de 33 acides aminés ; les 16 premiers correspondant à ceux déterminés à la suite du résidu d'arginine dans le peptide initial M2. Cette constatation confirme la position C-terminale de ce peptide. Lors de la détermination de ce peptide, les acides aminés du peptide M2 (Trp-Ser) en position 101-102 se sont révélés être en réalité Glu-Trp. L'absence d'un résidu d'arginine à l'extrémité C-terminale du peptide séquencé indique que celui-ci représente le fragment C-terminal de la molécule.

I.2.2.3- Clivage de la protéine par une endoprotéinase Lys-C spécifique

La protéine a été incubée pendant 12 h à température ambiante puis 1 h à 37°C avec 1 µg d'endoprotéinase Lys-C hautement purifiée (cf. chapitre matériel et méthodes). En raison du nombre élevé de peptides de tailles voisines attendu (par comparaison avec la distribution régulière des résidus de lysine dans la myohémérythrine de *T. zostericola*), la séparation a été réalisée par HPLC sur une colonne de phase reverse C-18 avec un gradient d'acétonitrile 0-30 % de tampon B pendant 20 mn puis 30-80 % pendant 50 mn. Afin de localiser les pics correspondant à l'enzyme et éventuellement à la protéine non clivée, une HPLC a été réalisée pour ces deux échantillons dans des conditions d'élution identiques. Les profils d'élution de ces trois séparations sont illustrés par les figures 18a, b et c. L'examen de ceux-ci révèle que le clivage de la protéine a eu lieu de manière totale pour l'échantillon de MP II traitée par l'enzyme. Par l'hydrophobicité apparemment importante du peptide recherché (estimation faite sur la base de la séquence de la myohémérythrine de *T. zostericola*), nous avons réalisé l'analyse en séquence des deux pics les plus hydrophobes (fractions 47 et 44-45, fig. 18c). Dans ces deux cas, les trois premiers cycles de dégradation ont révélé l'enchaînement Gly-Phe-Glu correspondant à l'extrémité N-terminale de la molécule. La fraction 34 a ensuite été séquencée. L'analyse a révélé un peptide (K1, fig. 15) composé de 18 acides aminés prenant place à la suite du résidu Lys 45. En effet, sur les 14 premiers acides aminés, 12 correspondent à ceux déterminés à l'extrémité

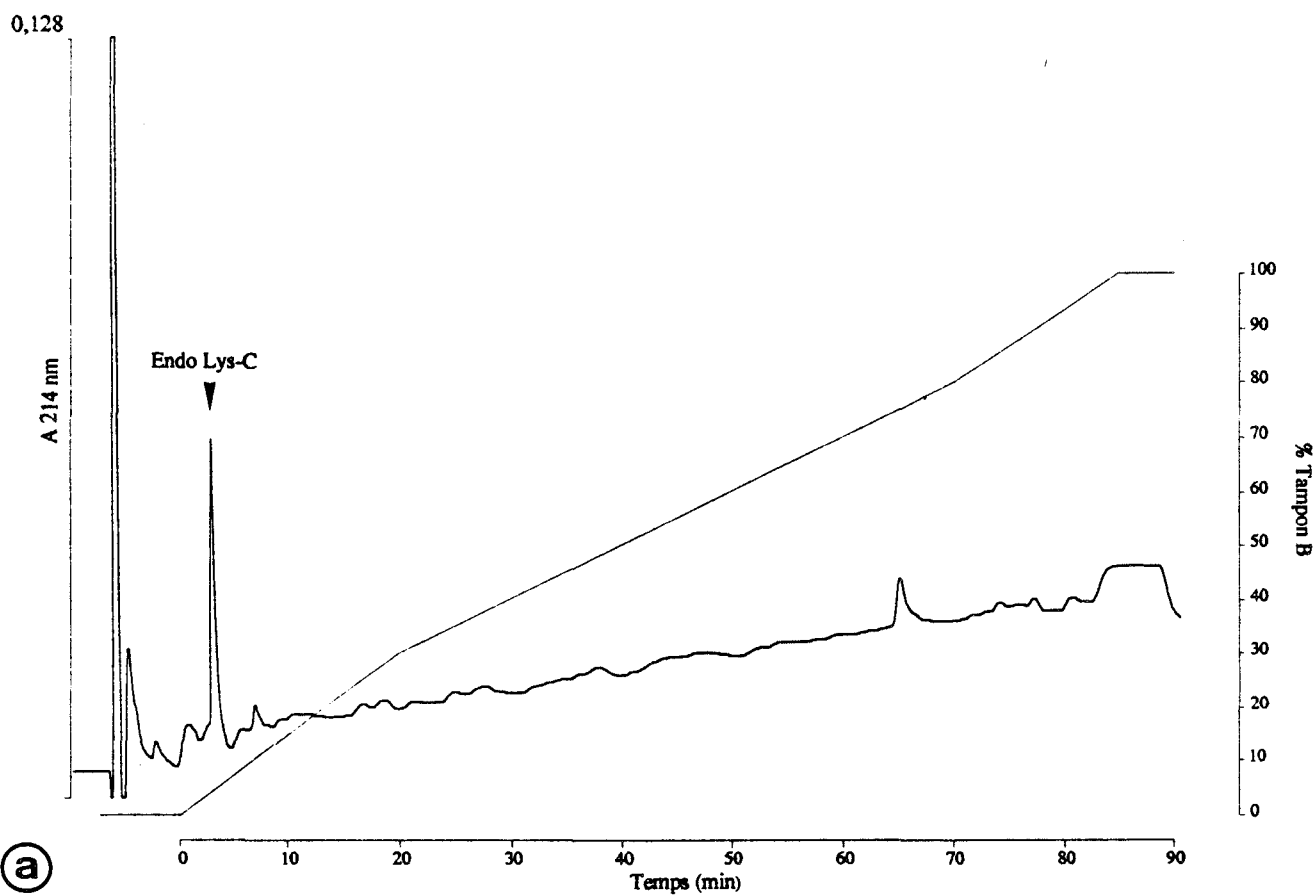
Figure 18 Séparation par RP-HPLC des peptides de coupure de la MP II par d'endoprotéinase Lys-C.

a : endoprotéinase Lys-C.

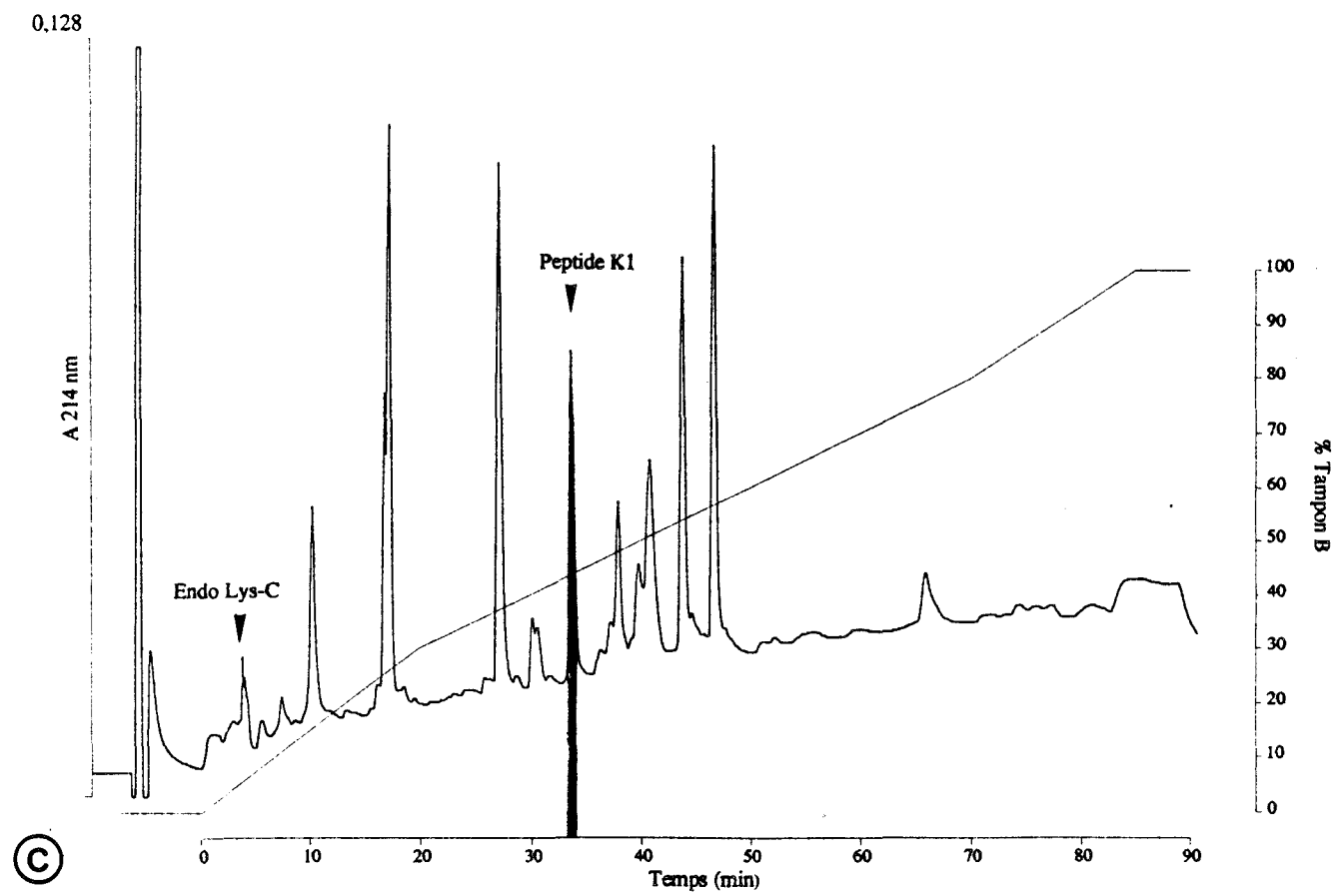
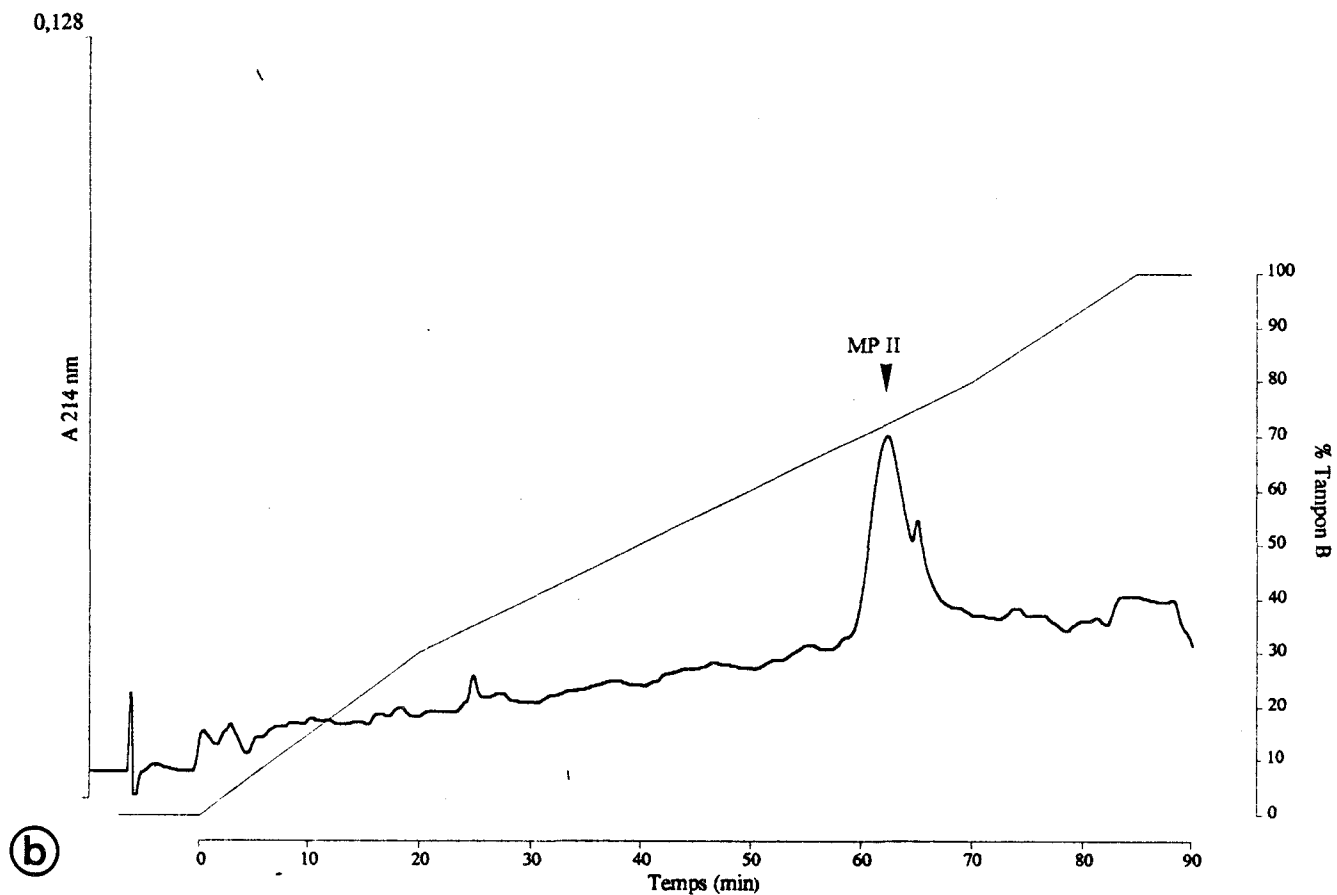
b : MP II.

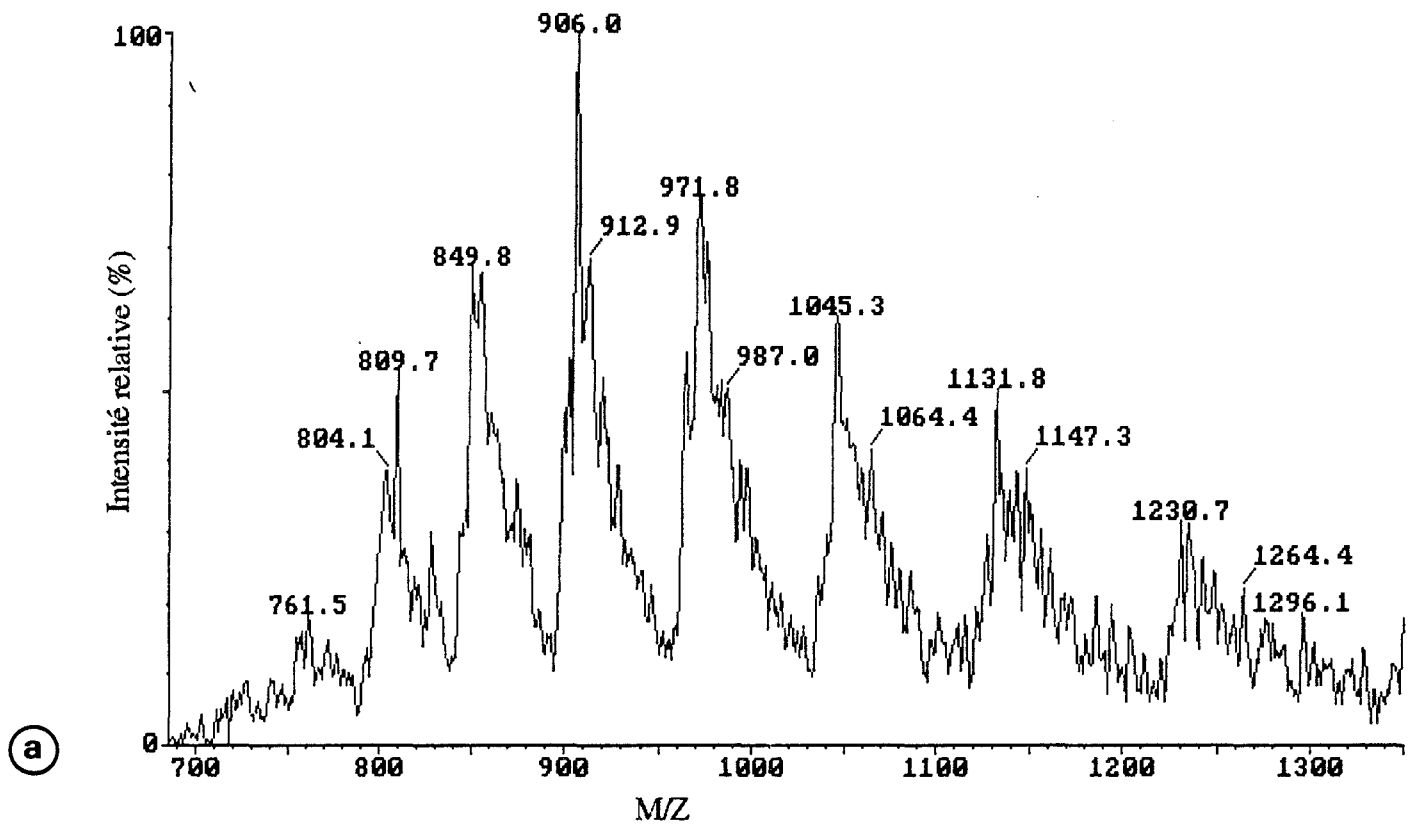
c : MP II traitée par l'endoprotéinase Ly-C.

Colonne utilisée : Nucleosil C-18 Wide pore (4,6 x 250 mm) ; tampon d'élution A : TFA 7 mM, B : TFA 7 mM dans l'acétonitrile 60 % ; gradient : 0-30 % de tampon B en 20 mn puis 30-80 % B en 50 mn; débit utilisé : 1 ml/mn.



(a)





Intensité relative (%)	M/Z	Charges	Masse moléculaire
31.22	1234.75	11	13571.15
50.37	1131.83	12	13569.82
60.42	1045.25	13	13575.17
71.72	970.80	14	13577.10
100.00	905.96	15	13574.31
67.13	849.76	16	13579.98

Moyenne :			13574.59 +/- 3.75 (n = 6)

26.32	1242.22	11	13653.32
35.70	1138.44	12	13649.18
45.82	1050.82	13	13647.61
70.64	976.07	14	13650.80
66.57	911.47	15	13656.97
66.59	854.78	16	13660.29
38.67	804.14	17	13653.30

Moyenne :			13653.07 +/- 4.43 (n = 7)

(a) Figure 19 Analyse par spectrométrie de masse (ESMS) d'un échantillon de MP II purifiée selon la procédure de Nejmeddine (1987).
 a: Spectre de masse des composés présents dans l'échantillon ionisé par +11 à +17 charges. M/Z, masse moléculaire du composé/charge d'ionisation en fonction de l'intensité relative du composé.
 b: Masse moléculaire des deux composés majeurs de l'échantillon. Valeur moyenne sur les valeurs de M/Z obtenues pour des charges d'ionisation de +11 à +17.

C-terminale du peptide M1 (CNBr). Les 2 acides aminés non identifiés lors du séquençage du peptide M1 en position 46 et 51 sont respectivement une sérine et une thréonine ; acides aminés dont la détection est très difficile au delà d'un grand nombre de cycles de dégradation. L'extrémité C-terminale de ce peptide est constituée par l'enchaînement Ala-Met-Leu-Lys dont les deux derniers acides aminés correspondent à ceux de l'extrémité N-terminale du second peptide (M2) issu du clivage de la molécule par le CNBr. Ceci se confirme par la présence d'une méthionine précédant l'enchaînement Leu-Lys dans le peptide K1.

Par le séquençage des différents peptides M1 et M2 (CNBr), R2 (endoprotéinase Arg-C), K1 (endoprotéinase Lys-C) et le séquençage du fragment N-terminal N1, il s'avère que la protéine est composée de 119 acides aminés (cf fig. 15). Un acide aminé (position 36) n'a cependant pas été identifié lors de cette étude. Nous n'avons, en effet, noté aucun des signaux correspondant aux différents PTH-AAAs lors de ce cycle de dégradation, contrairement aux cas des acides aminés en position 46 et 51 dans le même fragment M1 où des signaux ont été détectés mais n'ont pas pu être interprétés avec certitude. Cet acide aminé nous a semblé pouvoir correspondre à un résidu de cystéine par le fait que celui-ci n'est pas détectable par la méthode au PITC ; la composition en acides aminés de la MP II a en effet révélé l'existence d'une quantité faible de cet acide aminé (Nejmeddine *et al.*, 1988). La confirmation de cette hypothèse a été obtenue grâce à la séquence déduite du fragment de cDNA correspondant, déterminée par Salzet-Raveillon (*in* Dhainaut-Courtois *et al.*, 1991).

I.3- Masse moléculaire de la MP II

La masse moléculaire de la MP II a été précisée par spectrométrie de masse en utilisant la protéine préparée selon la procédure de Nejmeddine (1987). L'analyse du spectre réalisé (figs 19a, b) révèle une hétérogénéité de l'échantillon. Cependant, celui-ci renferme majoritairement deux composés de 13574 et 13653 Da. Ce résultat est en accord avec la masse moléculaire apparente de la MP II en chromatographie de gel filtration sur colonne Superdex 75 et également en électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (voir fig. 20). Par ailleurs, cette dernière donnée démontre que la protéine est de nature monomérique. D'après la séquence en acides aminés, la MP II possède une masse moléculaire de 13450 Da.

I.4- Contenu métallique

Une analyse du contenu en métal de la protéine MP II a été réalisée à partir d'un échantillon de protéine purifiée selon la procédure établie par Nejmeddine (1987). Les résultats des dosages par torche à plasma d'argon à partir de 500 µg de protéine sont présentés dans la fig. 21. Les données, obtenues en parties par million, ont été transcrites en atome-gramme de métal par mole de protéine sur la base de la masse suspectée de 10 kDa et de la masse réelle calculée à partir des données de la séquence en acides aminés. Chacune des valeurs de dosage est le résultat d'une moyenne de trois mesures auxquelles ont été soustraites les valeurs obtenues pour les seuls réactifs utilisés pour hydrolyser la protéine. Les éléments minéraux les plus abondants sont Ca, P,

Chromatographie de gel filtration Colonne FPLC Superose 12	≈ 20 kDa	Nejmeddine <i>et al.</i> , 1988
Electrophorèse SDS-PAGGE	≈ 10 kDa	Nejmeddine <i>et al.</i> , 1988
Chromatographie de gel filtration Colonne FPLC Superdex 75	> 13,7 kDa	Ce travail
Spectrométrie de masse (ESMS)	13574,59 ± 3,75 Da majeur	Ce travail
	13653,07 ± 4,43 Da mineur	
Calcul d'après les données de la séquence en acides aminés	13450 Da	Ce travail

Figure 20 Masse moléculaire de la protéine MP II.

	MM _{app} 10 kDa	MM _{calc} 13450 Da
Ca	4,46	6,00
Fe	1,33	<u>1,79</u>
P	1,52	2,04
Mg	0,55	0,75
Mn	0	0
Zn	1,07	<u>1,44</u>
Cu	0,15	<u>0,21</u>
Al	0,19	0,25
B	0,58	0,79
Mo	0	0
Ni	0,15	0,21
Cd	0	0

Figure 21 Contenu métallique de la protéine MP II (préparée selon la procédure de Nejmeddine, 1987) de *Nereis diversicolor* (valeur en at.g/mol de protéine).

Fe et Zn. Pour ces deux derniers éléments, les valeurs trouvées sont respectivement de 1,79 et 1,44 moles par mole de MP II de masse moléculaire de 13,450 kDa. Outre ces éléments, Mg, B, Al, Ni et Cu ont été détectés mais en quantité moindre. Le Cd ainsi que le Mn sont par contre absents de la protéine préparée à partir d'animaux provenant directement de l'environnement. Cependant, comme nous l'avons cité précédemment, la modification de la procédure de préparation de la MP II a permis de mettre en évidence l'existence de deux formes de la molécule, dont l'une seulement porte du fer. De ce fait, il est vraisemblable que dans l'échantillon analysé les teneurs métalliques mises en évidence ne concernent pas la totalité des molécules. En ce sens, la détermination de la masse moléculaire de la MP II réalisée par spectrométrie de masse sur un échantillon analogue a révélé l'existence de deux composés majeurs de masse moléculaire très proche pouvant résulter d'un contenu métallique différent.

II - Relations entre la MP II de la néréis, les myohémérythrine et les hémérythrine céloïques

II.1- Comparaison des séquences en acides aminés

La détermination de la séquence complète de la MP II confirme l'importante ressemblance structurale de cette protéine avec les protéines respiratoires myohémérythrine et hémérythrine constatée antérieurement pour l'extrémité N-terminale (fragment N1, fig. 15) (Demuyneck *et al.*, 1991). Dans la figure 22 sont mises en rapport avec la MP II les séquences des monomères d'hémérythrine des sipunculien *Themiste pyroïdes* (Ferrell et Kitto, 1971), *Phascolopsis gouldii* (Klippenstein, 1972) et *Themiste dyscritum* (Loehr *et al.*, 1978), de la myohémérythrine de *Themiste zostericola* (Klippenstein *et al.*, 1976) et de la molécule considérée comme étant une myohémérythrine chez *Nereis diversicolor* (Takagi et Cox, 1991). La longueur des molécules étant différente, des ajustements ont été effectués (espacements introduits) afin d'accroître l'identité de séquence entre la MP II et ces molécules. Par son nombre total d'acides aminés (119), la MP II apparaît plus proche des myohémérythrine de la néréis (120 AA) et de *T. zostericola* (118 AA) que des monomères d'hémérythrine (113 AA). L'acide aminé supplémentaire dans la MP II par rapport à la myohémérythrine du sipunculien semble être une sérine en position 65 de la molécule. Cet acide aminé est également considéré par Takagi et Cox (1991) comme l'un des deux acides aminés supplémentaires de la myohémérythrine de la néréis, le second étant une lysine (insertion entre les résidus 67 et 68 dans la myohémérythrine du sipunculien).

En terme d'identité stricte (acides aminés semblables occupant la même position dans les molécules comparées) (fig. 23), la comparaison des séquences révèle que la MP II est plus proche des myohémérythrine que des monomères d'hémérythrine. Ainsi, la MP II partage 97 acides aminés communs (81,5 %) avec la myohémérythrine de *Nereis diversicolor* et 76 avec celle de *T. zostericola* (64,4 %) contre seulement 56 avec les hémérythrine de *T. pyroïdes* et *P. gouldii* (49,6 %) et 53 avec celle de *T. dyscritum* (46,9 %). L'importance des homologues de

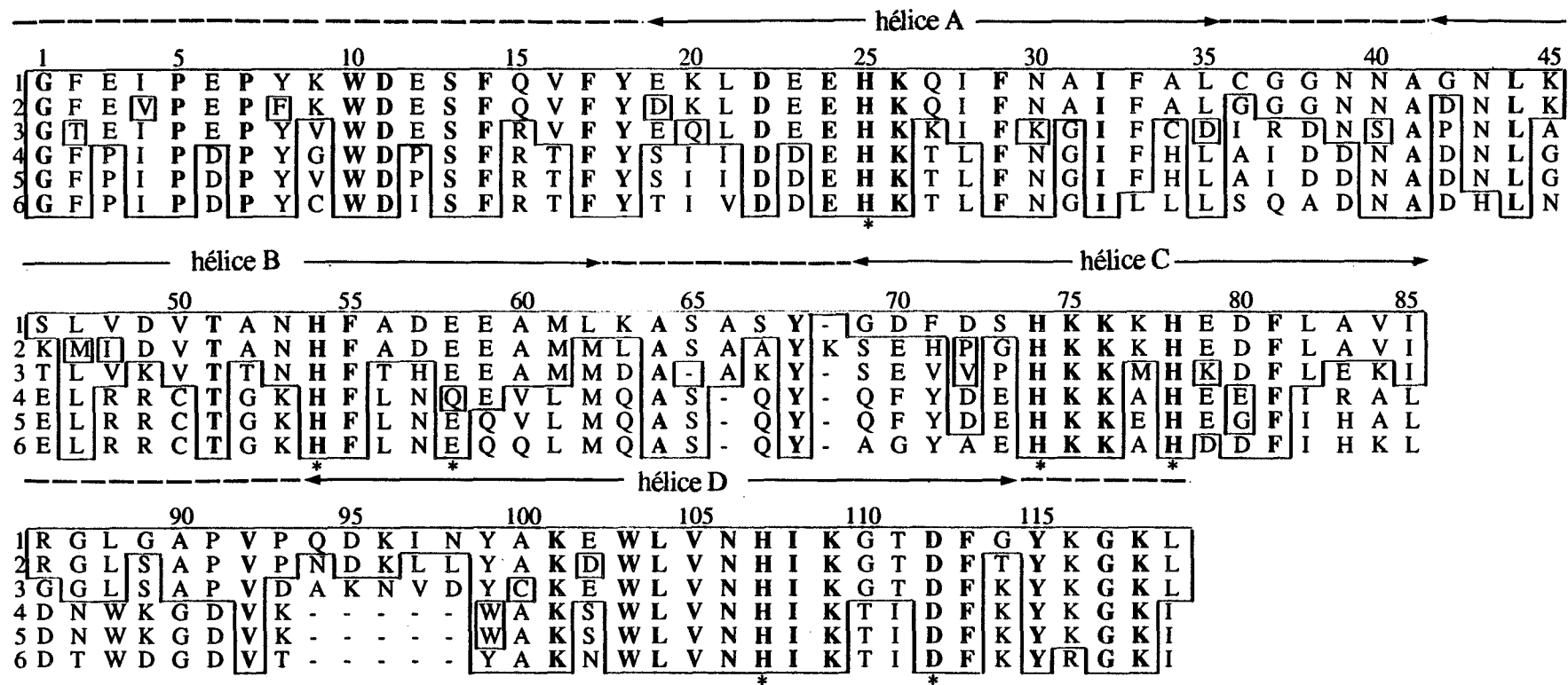


Figure 22 Comparaison des séquences de la MP II de *Nereis diversicolor*, des myohémérythrines et des hémérythrines coelomiques.
 1: MP II liant le cadmium (cette étude).
 2 et 3: myohémérythrines de *Nereis diversicolor* (Takagi et Cox, 1991) et *Themiste zostericola* (Klippenstein *et al.*, 1976).
 4, 5 et 6: sous-unités des hémérythrines de *Themiste pyroides* (Ferrellet Kitto, 1971), *Phascolopsis gouldii* (Klippenstein, 1972) et *Themiste dyscritum* (Loehr *et al.*, 1978). La numérotation est basée sur la séquence de la MP II. Les acides aminés ayant une position identique dans toutes les séquences sont écrits en caractères gras. * représente les ligands du fer démontrés pour la myohémérythrine de *T. zostericola* (Sheriff *et al.*, 1987) et pour les monomères de l'hémérythrine de *T. dyscritum* (Stenkamp *et al.*, 1984). - représente des espacements introduits dans les séquences pour permettre un meilleur ajustement de celles-ci avec la MP II. Les positions identiques des acides aminés entre les séquences et la MP II sont entourées.
 La structure secondaire représentée correspond à celle de la myohémérythrine de *T. zostericola* (Hendrickson *et al.*, 1982).
 ← hélice →, segments en hélice α , --- segments en structure β -turn.

	MP II <i>N. diversicolor</i>	MyoHr <i>N. diversicolor</i> /119 AA	MyoHr <i>T. zostericola</i> /118 AA	Hr <i>T. pyroïdes</i> /113 AA	Hr <i>P. gouldii</i> /113 AA	Hr <i>T. dyscritum</i> /113 AA
MP II		97 (81,5 %)	76 (64,4 %)	56 (49,6 %)	56 (49,6 %)	53 (49,6 %)
MyoHr <i>N. diversicolor</i>			74 (62,7 %)	54 (47,8 %)	54 (47,8 %)	52 (46,0 %)
MyoHr <i>T. zostericola</i>				53 (46,9 %)	54 (47,8 %)	52 (46,0 %)
Hr <i>T. pyroïdes</i>					107 (94,7 %)	86 (76,1 %)
Hr <i>P. gouldii</i>						88 (77,9 %)

Figure 23 Identité de séquence entre la MP II, les myohémérythrines (MyoHr) et les hémérythrines (Hr) (identité stricte).
Le résultat de chaque comparaison est exprimé en nombre d'acides aminés en se basant sur le nombre total d'acides aminés de la séquence la plus courte.
MP II *N. diversicolor* (ce travail).
MyoHr *N. diversicolor* (Takagi et Cox, 1991).
MyoHr *T. zostericola* (Klippenstein *et al.*, 1976).
Hr *T. pyroïdes* (Ferrell et Kitto, 1971).
Hr *P. gouldii* (Klippenstein, 1972).
Hr *T. dyscritum* (Loehr *et al.*, 1978).

MP II <i>Nereis diversicolor</i>	Myohémérythrine <i>Nereis diversicolor</i>	Myohémérythrine <i>Themiste zostericola</i>	Hémérythrine <i>Themiste pyroïdes</i>	Hémérythrine <i>Phascolopsis gouldii</i>	Hémérythrine <i>Themiste dyscritum</i>
Zone [1-18]	16/18 (88,9)	15/18 (83,3)	12/18 (66,7)	12/18 (66,7)	12/18 (66,7)
Zone [19-35] hélice A	16/17 (94,1)	11/17 (64,7)	9/17 (52,9)	9/17 (52,9)	8/17 (47,0)
Zone [36-41]	5/6 (83,3)	2/6 (33,3)	2/6 (33,3)	2/6 (33,3)	2/6 (33,3)
Zone [42-62] hélice B	16/21 (76,2)	13/21 (61,9)	7/21 (33,3)	7/21 (33,3)	6/21 (28,6)
Zone [63-68]	4/7 (57,1)	3/7 (42,9)	3/7 (42,9)	3/7 (42,9)	3/7 (42,9)
Zone [69-85] hélice C	12/17 (70,6)	8/17 (47,0)	7/17 (41,2)	7/17 (41,2)	6/17 (35,3)
Zone [86-93]	7/8 (87,5)	5/8 (62,5)	1/8 (12,5)	1/8 (12,5)	1/8 (12,5)
Zone [94-114] hélice D	16/21 (76,2)	14/21 (66,7)	11/21 (52,4)	11/21 (52,4)	12/21 (57,1)
Zone [115-119]	5/5 (100,0)	5/5 (100,0)	4/5 (80,0)	4/5 (80,0)	3/5 (60,0)

Figure 24 Identité de séquence des différentes régions de la MP II avec les myohémérythrines et les hémérythrines (identité stricte).
Pour chaque comparaison, les résultats sont exprimés en nombre d'acides aminés similaires occupant une position identique rapporté au nombre total d'acides aminés des zones comparées et également en pourcentage d'identité (valeurs entre parenthèses). Les zones entourées correspondent à celles où l'homologie est inférieure à 50 %. Le découpage en zones a été effectué sur la base de la structure secondaire de la myohémérythrine de *T. zostericola* (Hendrickson *et al.*, 1982) (cf fig. 22). Chaque délétion ou insertion d'acide aminé est considérée comme une position d'acide aminé dans la séquence.

la MP II avec ces molécules est très comparable à celles que l'on observe pour les deux myohémérythrine. Cependant, on peut remarquer que la MP II est légèrement plus proche de la myohémérythrine du sipunculien que ne l'est la myohémérythrine de la néréis (76 contre 74 résidus communs). De même, pour la comparaison avec les différentes hémérythrine, l'identité est légèrement plus élevée avec la MP II qu'elle ne l'est avec les deux myohémérythrine. Dans ce cas cependant, l'homologie reste inférieure à celle des hémérythrine entre elles.

En prenant pour référence la structure secondaire de la myohémérythrine de *T. zostericola* (Hendrickson *et al.*, 1982) (voir fig. 22), nous avons effectué le découpage de la séquence de la MP II afin de comparer le degré d'homologie des différentes régions de la molécule avec les myo-hémérythrine et les hémérythrine (cf. fig. 24). On constate que les zones de la MP II présentant les homologies (identité stricte) les plus élevées avec l'ensemble des molécules comparées sont essentiellement localisées dans les régions N-terminale (zones 1-18 et 19-35) et C-terminale (zones 94-114 et 115-119). Cette situation est par ailleurs comparable à celle que l'on observe en comparant la myohémérythrine de la néréis (fig. 25) ou du sipunculien *T. zostericola* (fig. 26) aux différentes hémérythrine. La région centrale de la MP II présente également des homologies importantes avec les myohémérythrine et plus particulièrement celle de la néréis avec laquelle l'ensemble des zones montre plus de 50 % d'homologie. L'homologie plus faible de la MP II avec la myohémérythrine de *T. zostericola* est cependant comparable à celle existant entre les deux myohémérythrine (fig. 25). On peut également noter que l'homologie entre la MP II et les différentes protéines de sipunculien pour la zone N-terminale 1-18 est légèrement supérieure à celle existant entre la myohémérythrine de la néréis et ces mêmes protéines. En ce sens, la MP II semble plus proche de la myohémérythrine du sipunculien que la myohémérythrine de néréis, les valeurs observées entre la myohémérythrine du sipunculien et les différentes hémérythrine étant très comparables à celles obtenues pour la MP II. Il convient cependant de préciser que ces différences sont souvent le fait de remplacements conservatifs.

Parmi les acides aminés conservés, il est à noter que la MP II possède l'ensemble des résidus servant de ligands pour les deux atomes de fer dans la myohémérythrine de *T. zostericola* (Sheriff *et al.*, 1987) et dans les monomères de l'hémérythrine de *T. dyscritum* (Stenkamp *et al.*, 1984) ainsi que les acides aminés situés à proximité immédiate de ces derniers.

En terme d'identité prenant en compte les remplacements conservatifs (identité au sens large) (fig. 27), on constate que l'homologie entre les séquences s'accroît de manière importante. Ainsi, 111 acides aminés (93,2 %) de nature équivalente occupent une position identique entre la MP II et la myohémérythrine de la néréis. De la même manière, le pourcentage d'homologie entre la MP II et la myohémérythrine du sipunculien passe de 64,4 % à 72 %.

Parmi les différences entre la MP II et les deux myohémérythrine, il est à noter que, contrairement à la myohémérythrine de la néréis, la MP II et la myohémérythrine du sipunculien possèdent un résidu de cystéine localisé dans la même région de la molécule (positions 35 et 33 respectivement). De même, ces deux molécules ne possèdent pas de méthionine en

Myohémérythrine <i>N. diversicolor</i>	Myohémérythrine <i>T. zostericola</i>	Hémérythrine <i>T. pyroïdes</i>	Hémérythrine <i>P. gouldii</i>	Hémérythrine <i>T. dyscritum</i>
1-18	13/18 (72,2)	10/18 (55,6)	10/18 (55,6)	10/18 (55,6)
19-35	10/17 (58,8)	9/17 (52,9)	9/17 (52,9)	8/17 (47,1)
36-41	2/6 (33,3)	2/6 (33,3)	2/6 (33,3)	2/6 (33,3)
42-62	12/21 (57,1)	8/21 (38,1)	8/21 (38,1)	7/21 (33,3)
63-69	3/7 (42,9)	3/7 (42,9)	3/7 (42,9)	3/7 (42,9)
70-86	10/17 (58,8)	6/17 (35,3)	6/17 (35,3)	6/17 (35,3)
87-94	6/8 (75,0)	1/8 (12,5)	1/8 (12,5)	1/8 (12,5)
95-115	13/21 (61,9)	11/21 (52,4)	11/21 (52,4)	12/21 (57,1)
116-120	5/5 (100,0)	4/5 (80,0)	4/5 (80,0)	3/5 (60,0)

Figure 25 Identité de séquence des différentes régions de la myohémérythrine de *N. diversicolor* avec les hémérythrines et la myohémérythrine de sipunculiens (comparaisons réalisées comme pour la figure 24).

Myohémérythrine <i>T. zostericola</i>	Hémérythrine <i>T. pyroïdes</i>	Hémérythrine <i>P. gouldii</i>	Hémérythrine <i>T. dyscritum</i>
1-18	12/18 (66,7)	13/18 (72,2)	12/18 (66,7)
19-35	8/17 (47,1)	8/17 (47,1)	7/17 (41,2)
36-41	2/6 (33,3)	2/6 (33,3)	1/6 (16,7)
42-62	8/21 (38,1)	8/21 (38,1)	7/21 (33,3)
63-67	2/5 (40,0)	2/5 (40,0)	2/5 (40,0)
68-84	5/17 (29,4)	5/17 (29,4)	7/17 (41,2)
85-92	1/8 (12,5)	1/8 (12,5)	1/8 (12,5)
93-113	11/21 (52,4)	11/21 (52,4)	12/21 (57,1)
114-118	4/5 (80,0)	4/5 (80,0)	3/5 (60,0)

Figure 26 Identité de séquence des différentes régions de la myohémérythrine de *T. zostericola* avec les hémérythrines de sipunculiens (comparaisons réalisées comme pour la figure 24).

	MP II <i>N. diversicolor</i>	MyoHr <i>N. diversicolor</i> /119 AA	MyoHr <i>T. zostericola</i> /118 AA	Hr <i>T. pyroïdes</i> /113 AA	Hr <i>P. gouldii</i> /113 AA	Hr <i>T. dyscritum</i> /113 AA
MP II		111 (93,2 %)	85 (72,0 %)	75 (66,4 %)	74 (65,5 %)	75 (66,4 %)
MyoHr <i>N. diversicolor</i>			85 (70,3 %)	73 (64,6 %)	72 (63,7 %)	74 (66,5 %)
MyoHr <i>T. zostericola</i>				73 (64,6 %)	71 (62,8 %)	71 (62,8 %)
Hr <i>T. pyroïdes</i>					108 (95,6 %)	98 (86,7 %)
Hr <i>P. gouldii</i>						97 (85,8 %)

Figure 27 Identité de séquence entre la MP II, les myohémérythrines et les hémérythrines (identité au sens large).

Les comparaisons sont effectuées en tenant compte des remplacements conservatifs des acides aminés (acides aminés de nature équivalente occupant une position identique dans les séquences). Les résultats sont exprimés en nombre d'acides aminés et en pourcentage en se basant sur le nombre total d'acides aminés de la séquence la plus courte.

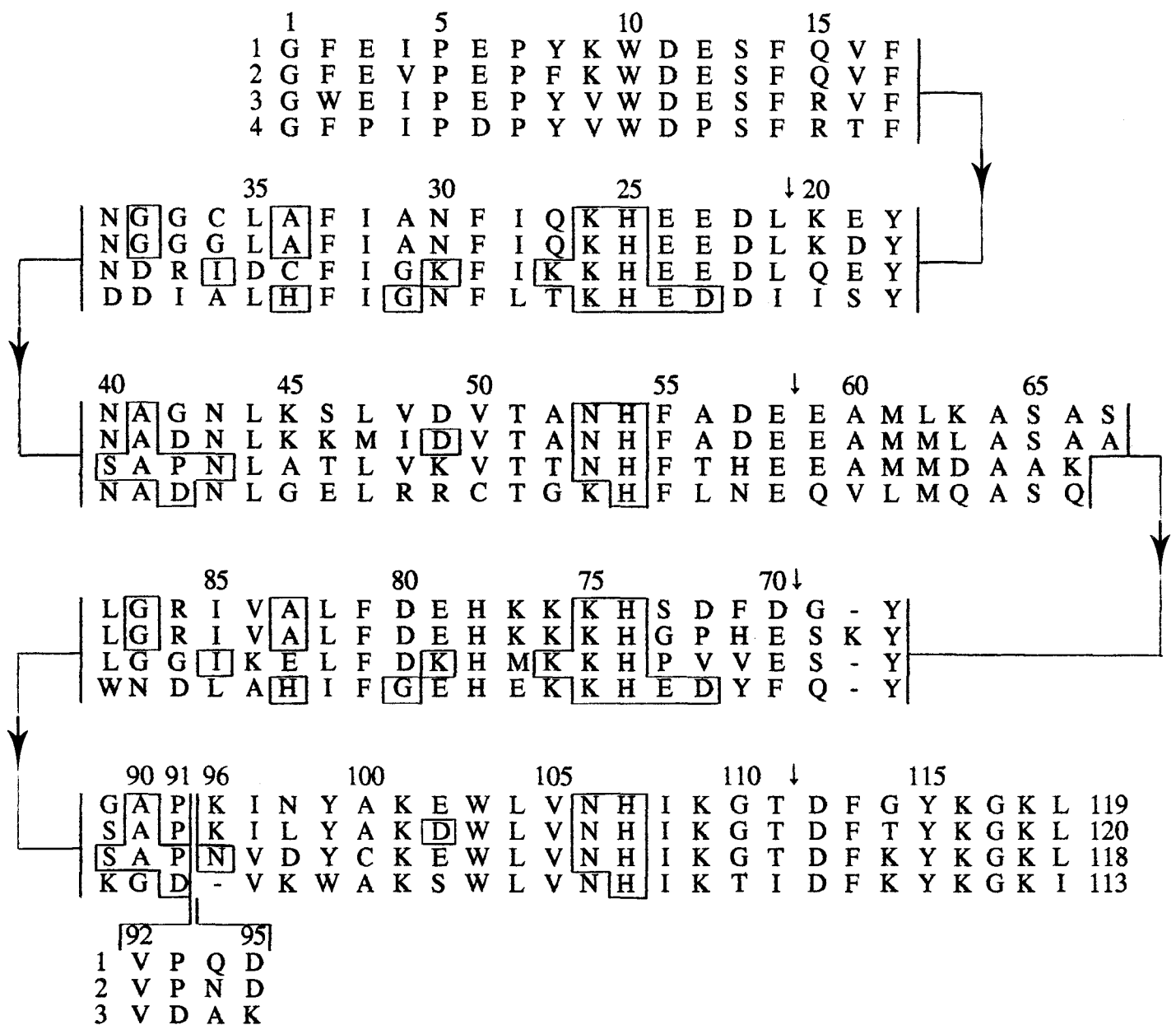


Figure 28 Pseudosymétrie de la MP II, des myohémérythrines et des hémérythrines.

- 1 MP II *N. diversicolor* (ce travail).
- 2 Myohémérythrine *N. diversicolor* (Takagi et Cox, 1991).
- 3 Myohémérythrine *T. zostericola* (Klippenstein *et al*, 1976).
- 4 Hémérythrine (monomère) *P. gouldii* (Klippenstein, 1972).

La numérotation est basée sur la séquence de la MP II. Pour la MP II et les myohémérythrines, 4 acides aminés (92-95 dans le cas de la MP II) ont été représentés à part pour permettre la correspondance de l'extrémité C-terminale de l'ensemble des molécules. De même les acides aminés se répétant dans chacune des séquences sont entourés. Les tirets représentent des espacements introduits dans les séquences. Les flèches correspondent au début et à la fin des zones comparées pour chacune des séquences.

position 47, contrairement à la myohémérythrine de la néréis. Par contre, la MP II ne présente pas l'enchaînement Met-Met en position 61-62 dans les deux myohémérythrines.

En raison de l'importance des homologies entre la MP II et ces protéines respiratoires, nous avons recherché l'existence de séquences répétitives dans la MP II, celles-ci ayant été observées à la fois dans la myohémérythrine de *T. zostericola* et la sous-unité de l'hémérythrine de *P. gouldii* (Hendrickson et Ward, 1977). La comparaison des régions 21-58 et 70-111, en ignorant les 4 acides aminés 92-95, révèle (fig. 28) 17,9 % d'homologie pour la MP II contre 28,2 % dans le cas de la myohémérythrine de *T. zostericola* et 21 % dans le cas de l'hémérythrine de *P. gouldii*. Les zones comparées correspondent à l'extension minimale des structures en hélice α des molécules selon Hendrickson et Ward (1975). Il est à noter que cette pseudosymétrie n'est retrouvée que partiellement dans la myohémérythrine de la néréis (20,5 %).

II.2- Identité immunologique

Afin de renforcer les données relatives à l'homologie de structure observée entre la MP II, les myohémérythrines et les hémérythrines, nous avons testé les différents tissus ainsi que les cellules libres du sipunculien *Sipunculus nudus* à l'aide des anticorps poly- et monoclonal n°11 dirigés contre la MP II par voie immunocytochimique sur coupes à la paraffine. Les résultats sont illustrés par les planches I et II. Concernant les réactions effectuées avec l'anticorps polyclonal, une très importante immunoréactivité a été observée (Pl. Ia) dans une catégorie de cellules cœlomiques présentant les caractéristiques des hémérythrocytes : grande taille, forme sphérique, noyau volumineux et présence de vacuoles dans le cytoplasme. Cette réaction est présente dans le cytoplasme des cellules, localisation présumée de l'hémérythrine (Terwilliger *et al.*, 1985). Par comparaison, les cellules non traitées par l'anticorps spécifique ne présentent pas cette réaction (Pl. Ib, d). En utilisant l'anticorps monoclonal n°11, une réaction positive au niveau de ces cellules a également été observée (Pl. Ic). Des coupes de métamère de *Nereis diversicolor* servant de témoins positifs de la réaction et traitées avec l'anticorps polyclonal ou monoclonal n°11 révèlent, en accord avec les résultats antérieurs (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1987 ; Porchet-Henneré *et al.*, 1987), une immunoréactivité au niveau des granulocytes de type I (Pl. Ie, f). Parmi les organes et tissus testés, nous avons également constaté une immunoréactivité à la fois avec l'anticorps polyclonal et l'anticorps monoclonal au niveau de cellules présentes dans le tissu conjonctif sous-jacent à l'épithélium intestinal (Pl. IIa, b, c, d). A ce propos, chez les sipunculien, la présence d'hémérythrine a non seulement été rapportée dans les hémérythrocytes, mais aussi dans la chaîne nerveuse et les zones présentant une coloration rougeâtre de la paroi du tube digestif chez les sipunculien. Il est à noter de plus qu'une immunoréactivité avec l'anticorps polyclonal au niveau de cellules adhérant à la paroi cœlomique et pourvues de nombreux cils à leur extrémité apicale a également été observée. Cependant, l'utilisation de l'anticorps monoclonal n'a pas confirmé cette immunoréactivité (Pl. IIe, f). Par ailleurs, nous n'avons décelé d'immunoréactivité ni avec l'anticorps polyclonal ni avec le monoclonal n°11 dans les muscles

PLANCHE I

- a : Milieu cœlomique de *S. nudus* traité par l'anticorps polyclonal anti-MP II de *N. diversicolor*. Immunoréactivité importante visible au niveau des hémérythrocytes (flèches) caractéristiques par leur forme sphérique, leur noyau volumineux et leurs vacuoles. (G x 370).
- b : Préparation témoin par omission de l'anticorps primaire. (G x 370).
- c : Réaction immunocytochimique avec l'anticorps monoclonal n°11 anti-MP II. Immunoréactivité des hémérythrocytes (flèches). (G x 370).
- d : Préparation témoin par omission de l'anticorps primaire. (G x 370).
- e : Coupe au niveau du cœlome de *Nereis diversicolor* traitée par l'anticorps polyclonal anti-MP II. Les granulocytes I sont immunoréactifs (flèches). V : vaisseau sanguin. (G x 370).
- f : Coupe au niveau du cœlome de *Nereis diversicolor* traitée par l'anticorps monoclonal n° 11 anti-MP II. Les granulocytes I sont immunoréactifs (flèches). Ov : ovocyte. (G x 370).

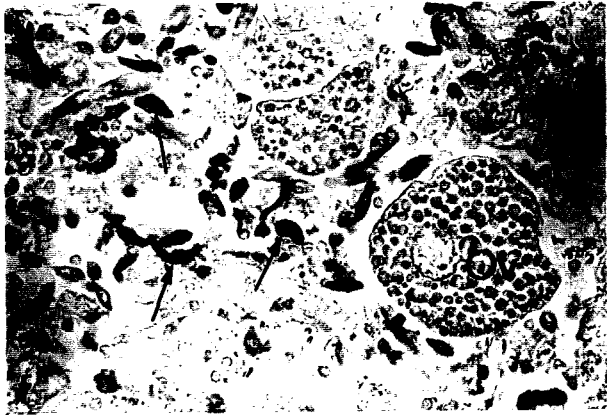
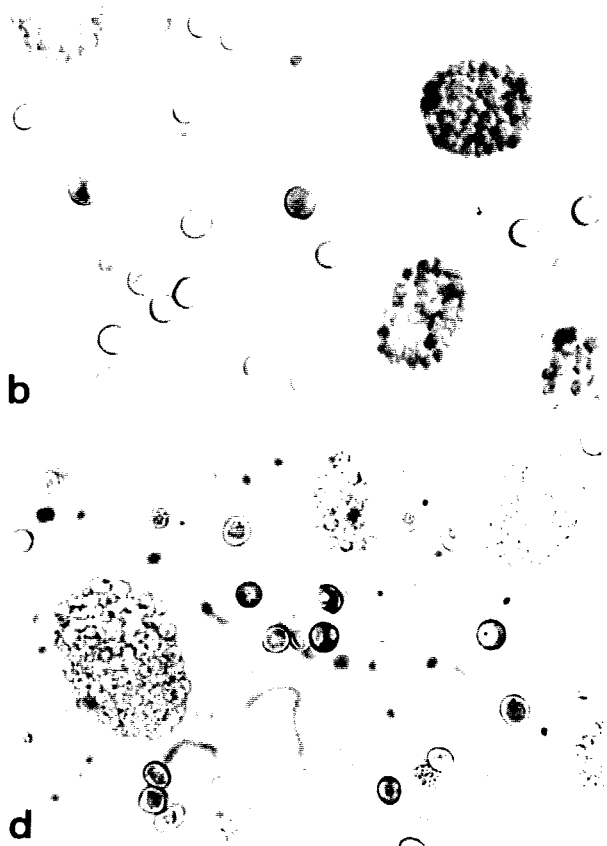
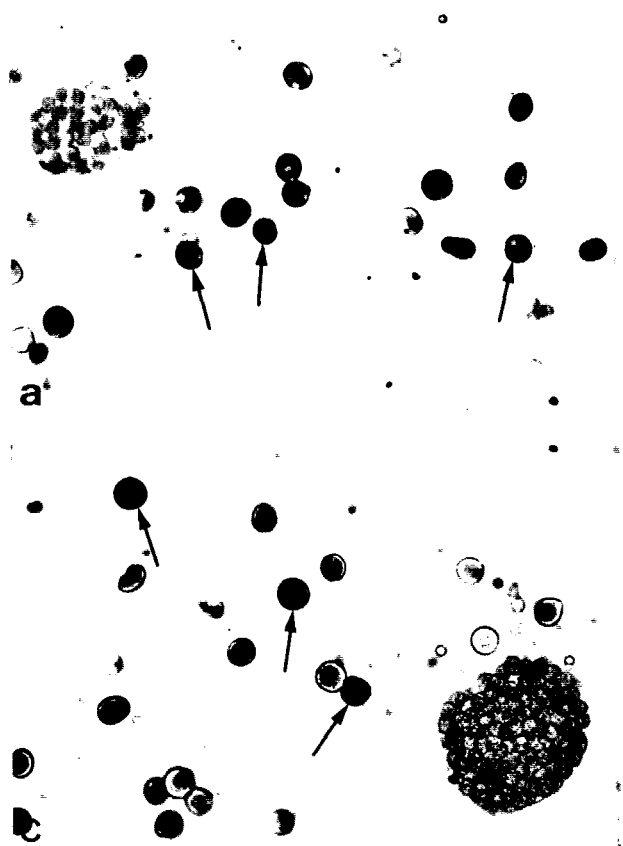
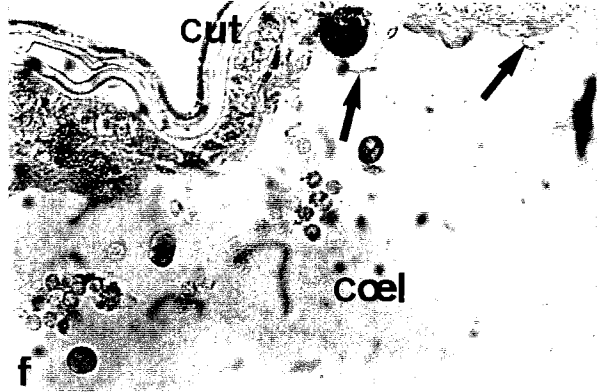
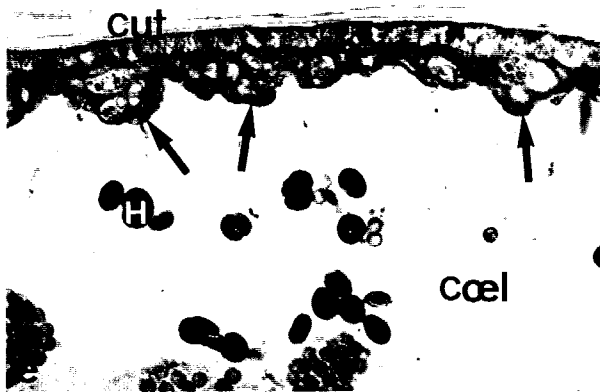
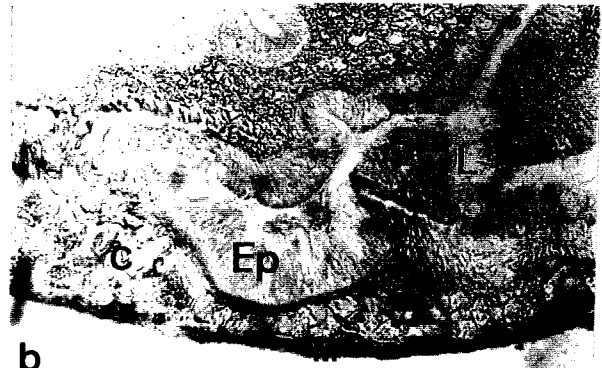
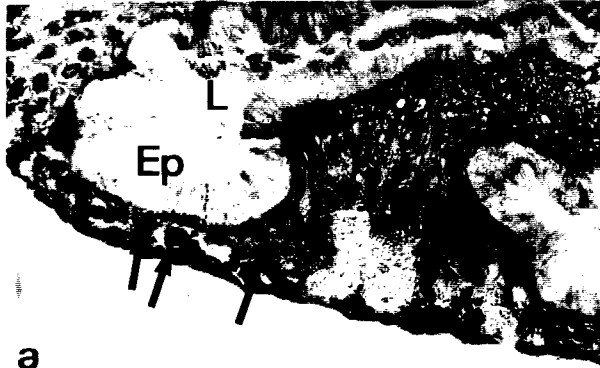


PLANCHE II

- a : Coupe à la paraffine d'intestin (branche descendante) de *S. nudus* traitée par l'anticorps polyclonal anti-MP II. Immunoréactivité de certaines cellules du tissu conjonctif sous-jacent à l'épithélium (flèches). (G x 230).
- b : Coupe à la paraffine d'intestin de *S. nudus*. Préparation témoin par omission de l'anticorps primaire. (G x 230).
- c : Coupe à la paraffine d'intestin de *S. nudus* traitée par l'anticorps monoclonal n°11 anti-MP II. Une immunoréactivité est visible dans certaines cellules du tissu conjonctif sous-jacent à l'épithélium. (G x 230).
- d : Préparation témoin par omission de l'anticorps spécifique. (G x 230).
- e : Coupe à la paraffine de la paroi du corps de *S. nudus* traitée par l'anticorps polyclonal anti-MP II. Une immunoréactivité est visible dans des cellules ciliées tapissant la cavité cœlomique (flèches). (G x 370).
- f : Préparation témoin par omission de l'anticorps spécifique. (G x 370).

C : tissu conjonctif, Coel : cœlome, Cut : cuticule, Ep : épithélium, H : hémérythrocyte, L : lumière intestinale, M: muscles.



rétracteurs de la trompe (ou introvert) correspondant à la localisation de la myohémérythrine chez les sipunculien (Klippenstein *et al.*, 1976).

En parallèle à l'immunocytochimie, une immunodétection des protéines sur membrane d'Immobilon a été réalisée après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant et réducteur et transfert électrophorétique pour un extrait de néréis, d'hémérythrocytes et de muscles rétracteurs de *S. nudus*. A la fois avec l'anticorps polyclonal et l'anticorps monoclonal, on constate (fig. 29) une immunoréactivité pour l'extrait d'hémérythrocytes. Celle-ci est portée par une bande migrant dans la même zone que la MP II. Dans le cas du polyclonal, la réaction la plus intense est localisée dans la partie inférieure de cette bande alors que l'inverse est observé en utilisant l'anticorps monoclonal.

Concernant l'échantillon de muscles rétracteurs, seul l'anticorps polyclonal montre une réaction positive. Celle-ci s'observe au niveau d'une bande ayant un comportement électrophorétique analogue à celui de la MP II et de l'hémérythrine. Dans ce cas, l'intensité de la réaction est supérieure à celle obtenue pour l'hémérythrine et ne semble pas être liée à une quantité plus importante de protéine analysée. En effet, un répliquat des échantillons, coloré par le bleu de Coomassie révèle que l'intensité de la bande associée au produit immunorévéle dans le cas de l'extrait d'hémérythrocytes est très nettement supérieure à celle de l'échantillon des muscles rétracteurs. Ce résultat confirme l'homologie de structure de la MP II avec les deux protéines respiratoires (myohémérythrine et hémérythrine).

DISCUSSION

Après chromatographie de gel filtration de la fraction soluble extraite d'animaux exposés au cadmium via l'eau de mer (20 mg/l pendant 4 jours), le métal recherché par SAAF dans les fractions d'élution a été observé associé à au moins trois composés différant par leur masse moléculaire. La majorité du cadmium est lié aux protéines de masse moléculaire élevée (> 70 kDa), résultat similaire à ceux obtenus antérieurement (Dennaï *et al.*, 1986 ; Nejmeddine *et al.*, 1988 ; Demuynck, 1988). Le cadmium est également associé à des composés de masse moléculaire comprise entre 43 et 25 kDa et légèrement inférieure à 13,7 kDa. Ce dernier composé correspond à la protéine MP II isolée par Nejmeddine *et al.* (1988) dont la masse avait été évaluée à 20 kDa sous sa forme native. C'est à ce niveau que nous avons observé la quantité la plus faible de cadmium. Cependant, il n'est pas impossible qu'une part de la quantité de cadmium, décelée antérieurement au niveau du pic contenant la MP II (Nejmeddine, 1987 ; Nejmeddine *et al.*, 1988), corresponde au métal lié au niveau des composés de masse comprise entre 43 et 25 kDa. Cette hypothèse est appuyée par le fait que l'analyse électrophorétique, sur gel de polyacrylamide -SDS, des fractions contenant la MP II issues de la chromatographie de gel filtration sur colonne de Sephadex G75, a révélé la présence de composés de masse moléculaire comprise entre 40 et 10 kDa (Nejmeddine *et al.*, 1988) alors que nous n'avons observé, pour le pic IIB contenant la MP II, que des composés ayant une masse inférieure à 20 kDa. La MP II correspondant à la

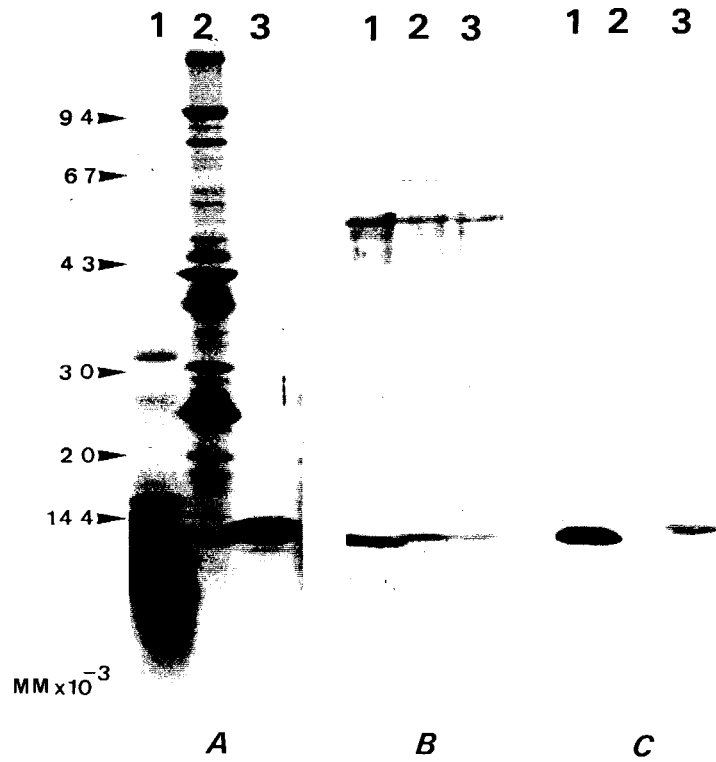


Figure 29 Immunodétection des protéines transférées sur membrane d'Immobilon P après électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGGE 5-25 % ; β -mercapto-éthanol).

1 : Fraction soluble de *Nereis diversicolor*, 2 et 3 : Extraits de muscles rétracteurs et d'hémérythrocytes de *Sipunculus nudus* respectivement.

A : Gel coloré par le bleu de Coomassie.

B : Immunodétection avec l'anticorps polyclonal anti-MP II.

C : Immunodétection avec l'anticorps monoclonal n°11 anti-MP II.

bande la plus intense migrant en deça du standard de 14,4 kDa en électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant et réducteur et ayant une masse moléculaire comparable en condition native (chromatographie de gel filtration, analyse par spectrométrie de masse) a permis de déterminer qu'elle possédait une structure monomérique. En utilisant un gradient de force ionique plus lent que celui utilisé précédemment (Nejmeddine *et al.*, 1988 ; Demuynck *et al.*, 1991) pour la seconde étape de préparation de la MP II par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-cellulose, nous avons pu séparer deux molécules immunoréactives avec l'anticorps monoclonal n°11 anti-MP II. Cependant, nous n'avons constaté la présence de cadmium que sur l'une de ces deux isoformes, la seconde portant du fer. Par électrofocalisation, nous avons constaté que ces deux isoformes étaient très proches, possédant toutes deux un pHi très voisin de 5. Ce résultat a également été renforcé par le fait que la séquence N-terminale que nous avons obtenue à partir de MP II préparée selon la procédure élaborée par Nejmeddine (1987), et contenant les isoformes en mélange, s'est révélée identique à celle de l'isoforme liant le cadmium. Le séquençage complet de cette dernière a révélé qu'elle présentait une grande ressemblance avec des protéines respiratoires à fer non-hémérique : la myohémérythrine et l'hémérythrine. La première représente une forme de stockage de l'oxygène moléculaire localisée dans les muscles rétracteurs de la trompe chez certaines espèces de sipunculiens et récemment découverte chez *Nereis diversicolor* (Takagi et Cox, 1991). La seconde assure le transport de l'oxygène et est présente dans le cytoplasme de cellules libres (hémérythrocytes) chez l'ensemble des sipunculiens, mais aussi chez les brachiopodes, les priapulien et chez les annélides de la famille des magelonidés. L'identité la plus élevée a été constatée avec la myohémérythrine qui possède une masse moléculaire proche de celle de la MP II et également une nature monomérique.

La ressemblance de la MP II avec les deux types de protéines respiratoires est accrue par le fait que la MP II comporte l'ensemble des acides aminés liant le fer dans ces molécules. De plus, il existe une pseudosymétrie dans la structure primaire de la MP II correspondant partiellement à celle décrite pour la myohémérythrine et les monomères d'hémérythrines. La ressemblance de la MP II avec les hémérythrines est plus faible d'un point de vue structure primaire mais également par le fait que ces dernières sont toutes oligomériques. En utilisant les anticorps poly- et monoclonal n°11 dirigés contre la MP II sur les muscles rétracteurs et les hémérythrocytes du sipunculien *Sipunculus nudus*, nous avons confirmé la ressemblance de la MP II avec ces molécules. Dans le cas du polyclonal, l'immunodétection sur membrane a révélé, pour un extrait de muscles rétracteurs, une immunoréactivité plus importante que celle des hémérythrocytes. Cependant, ce résultat n'a pas été confirmé en utilisant l'anticorps anti-MP II monoclonal. De la même manière, en immunocytochimie, nous n'avons pas constaté de réaction positive dans les muscles alors que celle-ci est importante avec les deux anticorps au niveau des hémérythrocytes. Bien que structurellement plus proche de la myohémérythrine que de l'hémérythrine, nous n'avons pas observé de marquage important des structures musculaires chez la néréis. Par contre, en accord avec les résultats antérieurs (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1987 ; Porchet-Henneré *et al.*, 1987) nous avons constaté avec les anticorps poly- et monoclonal n°11 le

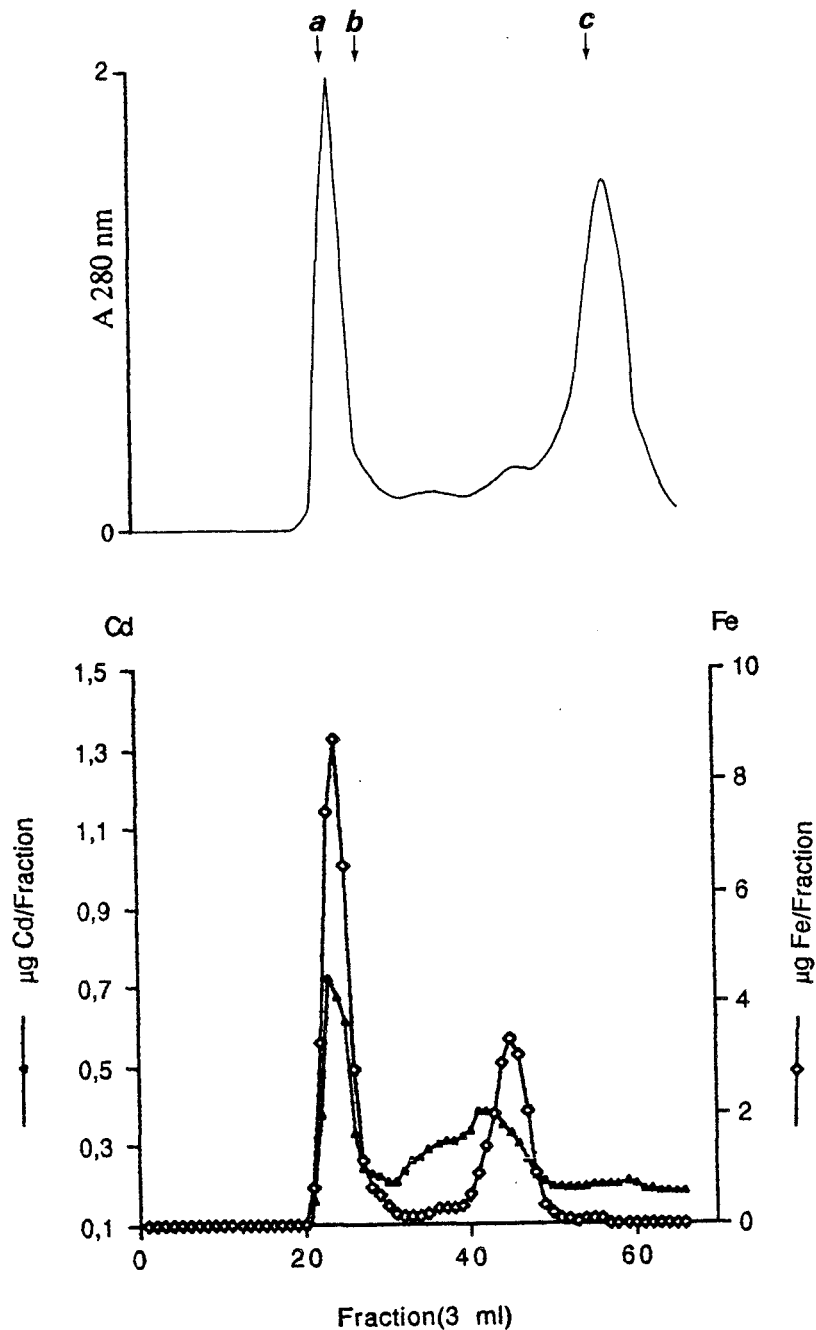


Figure 30 Chromatographie de gel filtration de la fraction soluble de *Nereis diversicolor* exposées au cadmium (20 mg Cd/l d'eau de mer ; 4 jours). Colonne utilisée : Sephacryl S300 (2,1 x 70 cm) ; tampon d'élution : Tris/HCl 15 mM, pH 8,5 ; débit 15 ml/h.

A : absorbance ; flèches : position d'élution de substances de masse moléculaire déterminée. a : bleu dextran 2000 ($2 \cdot 10^6$ Da) ; b : ferritine (440 kDa) ; c : cytochrome C (13 kDa).

marquage des granulocytes de type I décrits par Dhainaut (1984) représentant une des catégories de cellules libres (cœlomocytes) du milieu intérieur de la néréis. Par sa localisation, la MP II apparaît alors plus proche des hémérythrine. Il convient toutefois d'insister sur le fait que les granulocytes diffèrent fortement des hémérythrocytes à la fois par leur capacité d'adhérence et de dégranulation dans le milieu. Ainsi, concernant la MP II, Dhainaut-Courtois *et al.* (1987) ; Nejmeddine (1987) et Porchet-Henneré *et al.* (1987) ont observé qu'elle était libérée dans le milieu intérieur à la suite de l'introduction de particules étrangères dans l'organisme et également en réponse à l'exposition des animaux au cadmium. Comme l'a suggéré Nejmeddine (1987), il est possible que la fixation du cadmium sur la molécule s'effectue après libération de celle-ci dans le milieu cœlomique. La molécule MP II étant, dans les conditions expérimentales utilisées, dépourvue de fer (bien que ses caractéristiques structurales suggèrent fortement une capacité à lier ce métal), on peut se demander si le cadmium accumulé en quantité importante dans l'animal à la suite de l'exposition n'entre pas en compétition avec le fer présent en concentration physiologique pour les sites de fixation sur la molécule ou si, tout au moins, en se fixant sur la molécule il ne gêne pas la fixation ultérieure du fer. En comparant la séquence de la myohémérythrine de *Nereis diversicolor* avec celle de la MP II, nous avons constaté que ces deux molécules ne sont pas rigoureusement identiques. De ce fait, ces molécules représentent deux isoformes proches. Bien que ne disposant pas de la séquence en acides aminés de l'isoforme portant le fer, détectée au cours de notre étude, on peut émettre l'hypothèse que ce dernier composé corresponde à la myohémérythrine rapportée chez cette espèce (Takagi et Cox, 1991). La présence de ce type de pigment respiratoire chez la néréis apparaît toutefois surprenante. En effet, cette espèce possède une hémoglobine extracellulaire géante (Suzuki *et al.*, 1983). Cependant Nejmeddine (1992) chez *Allolobophora caliginosa* (annélide, oligochète) et Britel (1992) chez *Theromyzon tessulatum* (annélide, achète) ont isolé deux protéines dont l'extrémité N-terminale présente d'importantes homologies avec la MP II, la myohémérythrine et l'hémérythrine.

III - Etude de la métalloprotéine MP I de *Nereis diversicolor*

En plus de la MP II structurellement apparentée à la myohémérythrine (cette étude), les travaux antérieurs (Dennaï, 1984 ; Nejmeddine, 1987) ont montré que, chez les néréis exposées expérimentalement au cadmium, ce métal est également lié à une protéine de masse moléculaire très élevée, baptisée MP I (métalloprotéine I) parce qu'elle apparaît dans le premier pic protéique lors d'une chromatographie de gel filtration sur gel Sephadex G75. Celle-ci persiste dans le premier pic protéique lors d'une chromatographie sur une colonne de gel Ultrogel ACA 34 (domaine de séparation 350-20 KDa) (Nejmeddine, 1987). Comme elle fixe la majorité du cadmium accumulé dans la fraction soluble, nous avons entrepris son étude afin d'en préciser la nature.

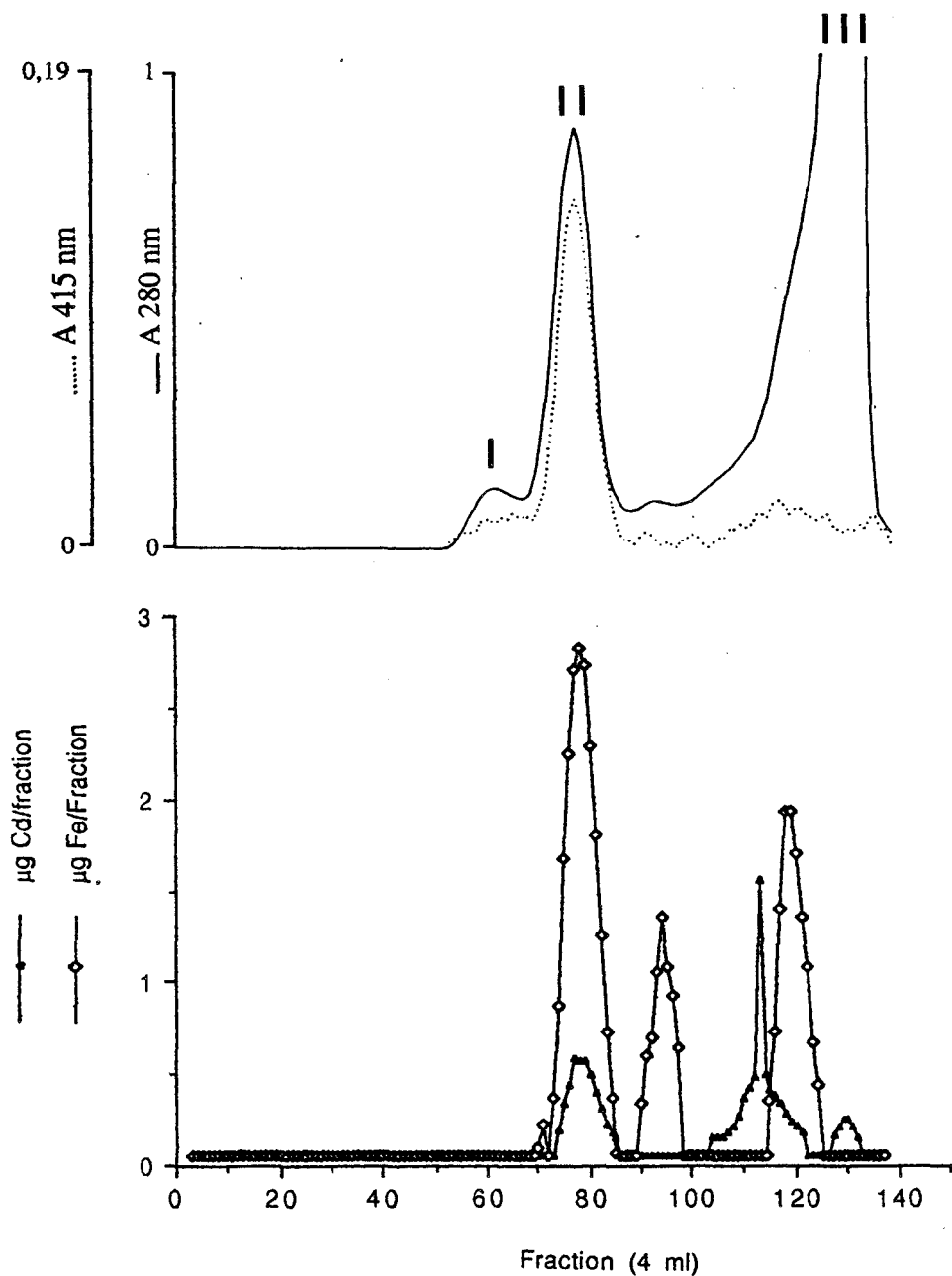


Figure 31 Chromatographie de gel filtration de la fraction soluble de *Nereis diversicolor* exposées au cadmium (20 mg Cd/l d'eau de mer ; 4 jours).
 Colonne utilisée : Sepharose 4B (2,7 x100 cm) ; échantillon déposé : 4 ml ;
 tampon d'éluion : Tris/HCl 15 mM, pH 8,5 ; débit : 23,5 ml/h.
 A : absorbance.
 Les pics sont notés I, II et III selon leur ordre d'éluion.

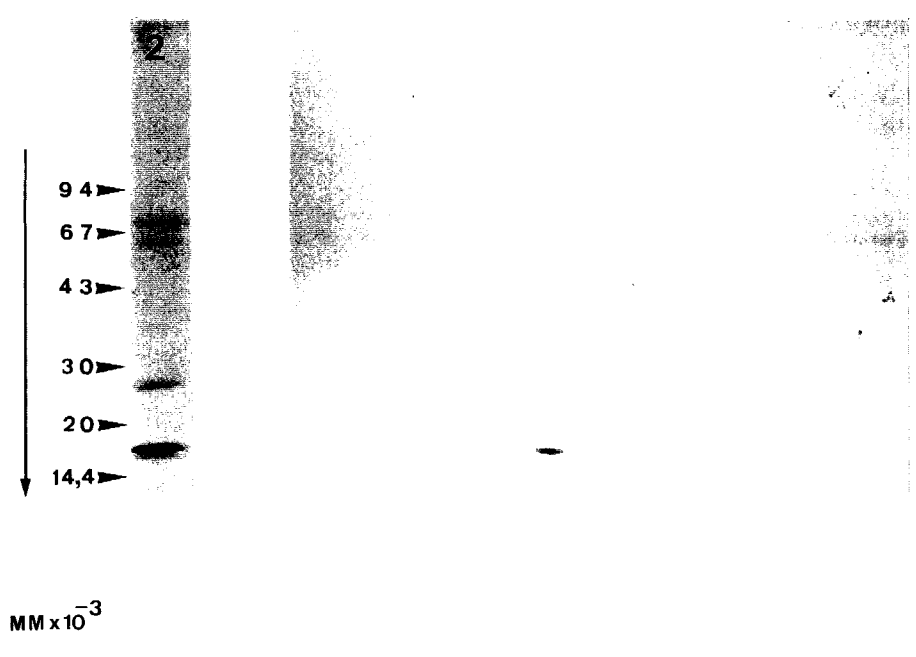
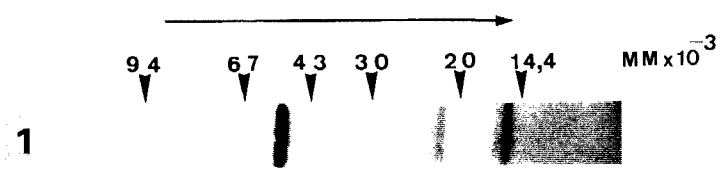
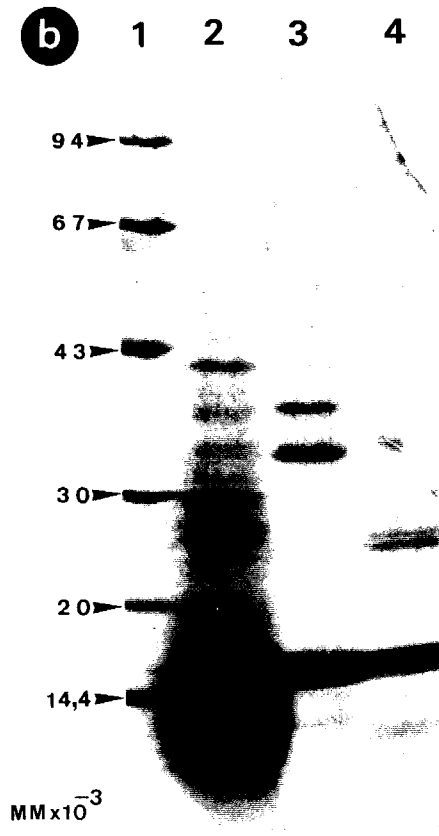
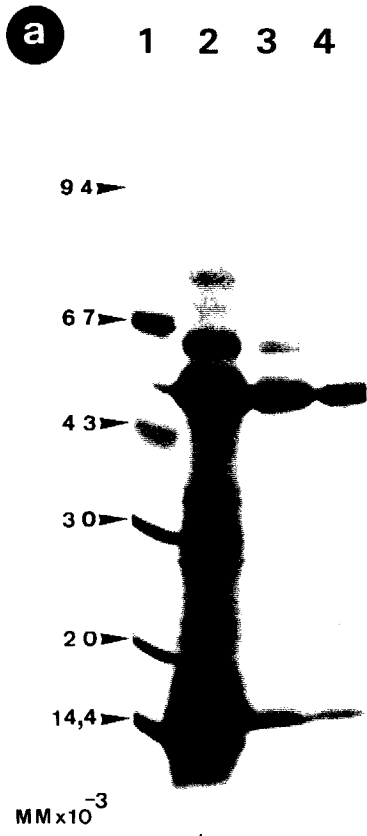
III.1- Identification de la métalloprotéine MP I

Les gels utilisés précédemment n'ayant pas permis de séparer efficacement la MP I, celle-ci étant dans les deux cas éluée dans un volume correspondant à la limite supérieure d'exclusion de ces gels, la fraction soluble d'animaux exposés au cadmium (20 ppm, 4 jours) a été soumise à une chromatographie de gel filtration sur une colonne de gel Sephacryl S300 permettant de séparer les constituants jusqu'à $1,5 \cdot 10^6$ Da. Le résultat de cette chromatographie est illustré par son profil d'élution à 280 nm (fig. 30). Le dosage du cadmium dans les fractions d'élution révèle, comme dans le cas de la chromatographie sur gel Superdex 75 (fig. 8), un important pic de Cd associé aux composés de masse moléculaire très élevée. En effet, le composé liant le cadmium sort dans un volume d'élution supérieur à celui du bleu Dextran 2000 ($2 \cdot 10^6$ Da) utilisé pour la calibration de la colonne. Comme dans le cas de la chromatographie sur Superdex 75, nous avons constaté la présence d'un important pic de Fe coïncidant avec celui du cadmium. Afin d'accroître la séparation, la fraction soluble d'animaux exposés au cadmium a été soumise à une chromatographie de gel filtration sur une colonne de gel Sépharose 4B dont la limite supérieure d'exclusion pour les protéines globulaires est de $20 \cdot 10^6$ kDa. Dans ce cas (fig. 31), on constate que le profil d'élution à 280 nm est constitué de 3 pics majeurs. Le premier, correspondant à l'exclusion, est suivi très rapidement par un second pic d'allure symétrique absorbant fortement à cette longueur d'onde. Le dosage du cadmium dans les fractions de chromatographie révèle que le métal est associé à ce second pic (pic II). De manière similaire aux résultats précédents, le fer se superpose parfaitement au cadmium au niveau de ce pic. Comme dans le cas des chromatographies réalisées sur gel Superdex 75 et Sephacryl S300, une coloration rougeâtre s'observe dans les fractions d'élution contenant la MP I (pic II), le sommet du pic correspondant aux fractions les plus colorées. Une lecture effectuée à 415 nm, longueur d'onde où absorbent les groupements héminiques, a montré une importante absorbance des fractions contenant la MP II.

A l'issue des différents fractionnements réalisés, les fractions les plus riches en cadmium ont été analysées par électrophorèse en milieu dénaturant sur gel de polyacrylamide en gradient 5-25 % (SDS-PAGE). Le résultat (fig. 32a) montre qu'à l'issue de la chromatographie sur Sépharose 4B l'échantillon renferme des constituants de nature protéique (colorables par le bleu de Coomassie) possédant des masses moléculaires très différentes. Par la comparaison avec des standards de masse moléculaire connue, on constate que la majorité de la fraction est représentée par deux composés de masse moléculaire proche de 57 et 15 kDa respectivement. Il existe de plus trois autres composés d'approximativement 20 kDa très faiblement représentés. L'analyse des mêmes fractions en milieu dénaturant (SDS) et réducteur (β -mercaptoéthanol) montre (fig. 32b) la disparition de la bande de 57 kDa et l'apparition d'une bande supplémentaire vers 16 kDa. Par une électrophorèse bidimensionnelle (SDS/SDS, β -mercaptoéthanol), on constate (fig. 33) que le constituant de 16 kDa, observé en conditions réductrices, provient du composé de 57 kDa. Les bandes observées lors de la première dimension aux alentours de

Figure 32 Electrophorèse en gel de polyacrylamide en gradient d'acrylamide 5-25 % (PAGGE).
a: conditions dénaturantes (SDS) ; b: conditions dénaturantes (SDS) et réductrices (β -mercaptoéthanol). Piste 1 : substances de masse moléculaire connue (exprimée en kDa), piste 2 : fraction soluble d'animaux, piste 3 : pic I contenant le cadmium issu de la chromatographie sur gel Sephacryl S300 (cf fig.30), piste 4 : pic II provenant de la séparation sur gel Sepharose 4B.

Figure 33 Electrophorèse bidimensionnelle du pic II provenant de la chromatographie de gel filtration sur Sepharose 4B d'animaux exposés au cadmium.
1: Electrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide SDS.
2: Electrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide SDS en présence de β -mercaptoéthanol.



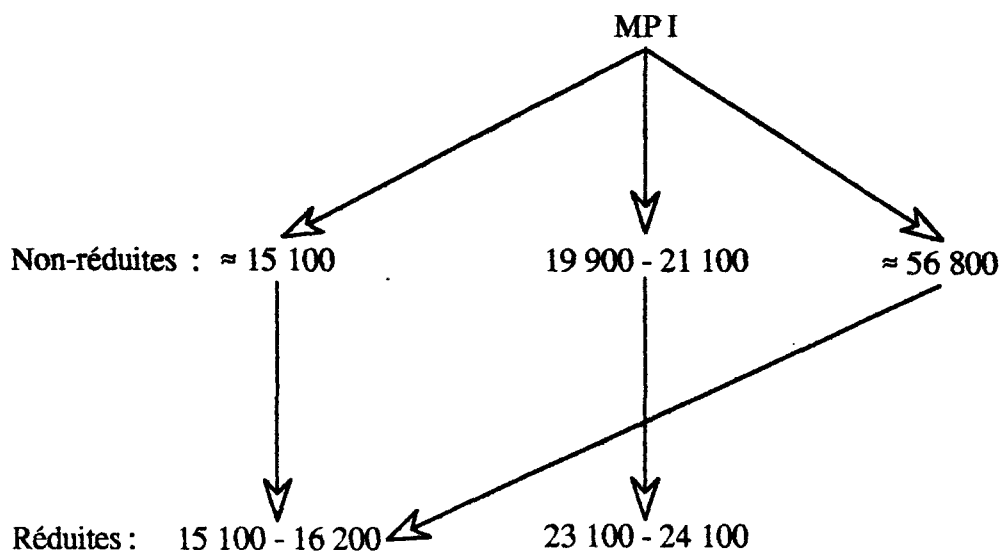
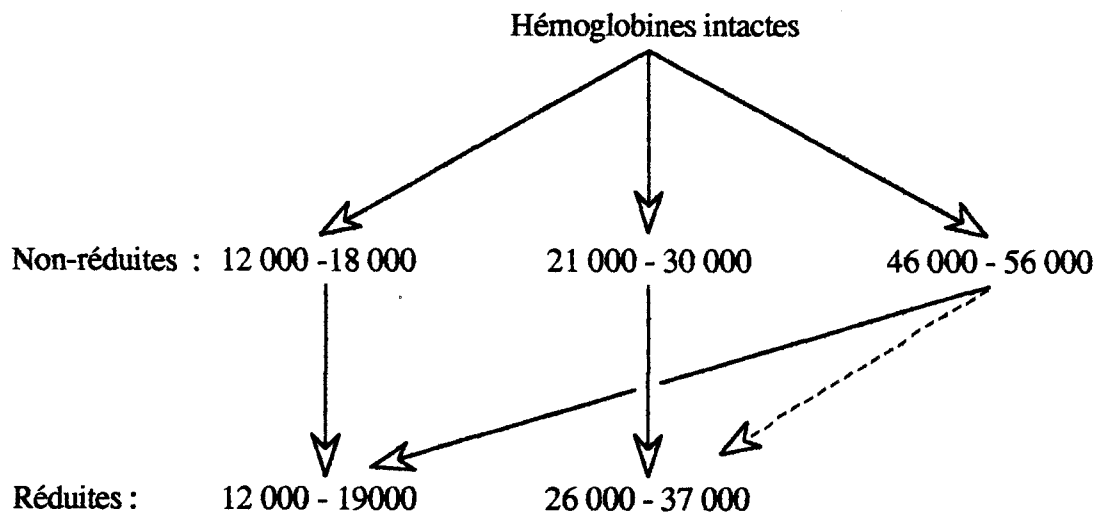


Figure 34 Comparaison de la dissociation de la MPI de *Nereis diversicolor* par le SDS et le β -mercaptoéthanol avec les sous-unités des hémoglobines extracellulaires d'oligochètes et de polychètes dissociées par le SDS (Vinogradov *et al.*, 1982) (Valeurs en daltons)

20 kDa, de même que la bande majeure à 15 kDa, restent par contre inchangées en présence de β -mercaptoéthanol. Ce type de profil électrophorétique ressemble fortement à celui décrit dans le cas des hémoglobines géantes d'annélides (fig. 34) à la fois par la masse moléculaire des sous-unités mais également par leur importance relative les unes par rapport aux autres (Vinogradov *et al.*, 1982). Par ailleurs, ces hémoglobines possèdent une masse moléculaire native très élevée ($3,8-4 \cdot 10^6$ Da), en accord avec la position du pic II lors de la chromatographie sur gel Sepharose 4B.

Afin de renforcer l'hypothèse d'une nature d'hémoglobine pour la protéine MP I liant le cadmium, nous avons effectué la chromatographie sur gel Sepharose 4B d'un échantillon de "sang" de *Nereis diversicolor*. Celui-ci a été prélevé en pratiquant une petite incision à l'aide de ciseaux de Pascheff dans la région moyenne du corps au niveau médio-ventral et en laissant ensuite l'animal se vider de son sang dans un petit volume de tampon Tris/HCl 15 mM, pH 8,5 glacé. L'échantillon a ensuite été centrifugé avant son dépôt sur la colonne. Le profil obtenu est illustré par la figure 35 et comporte majoritairement un pic sortant dans un volume d'élution comparable à celui du pic contenant la MP I. Dans ce cas, on note l'absence du premier pic observé précédemment. Le dosage du cadmium et du fer dans les fractions confirme également les observations antérieures.

III.2- Structure de la MP I en microscopie électronique

La MP I présentant des ressemblances avec les hémoglobines extracellulaires d'annélides, nous avons tenté de confirmer celles-ci par l'examen de la molécule en microscopie électronique. En effet, ces hémoglobines géantes possèdent une structure bihexagonale caractéristique (Vinogradov, 1985). Les fractions les plus riches en cadmium du pic II issues de la chromatographie sur Sepharose 4B ont été regroupées. Cet échantillon a ensuite été dilué au 1/100 à l'aide du tampon utilisé pour la chromatographie et une goutte a été déposée sur une grille de cuivre préalablement recouverte d'une membrane de Parlodion puis carbonée. La grille a ensuite été traitée par la technique de la coloration négative avant son observation au microscope électronique à transmission. On constate (Pl. IIIb, c) que l'échantillon renferme deux types de structures : l'une se compose de 6 unités assemblées en hexagone, l'autre est visiblement formée de 4 unités. La comparaison avec des images d'hémoglobines extracellulaires (Pl III d, e) révèle que ces deux formes correspondent respectivement aux vues de face et de profil de ces molécules à structure bihexagonale.

DISCUSSION

D'après les résultats de notre étude, il semble que la métalloprotéine MP I, capable de lier le cadmium, observée par Dennaï (1984) puis Nejmeddine (1987) corresponde à de l'hémoglobine. En effet, à la fois la masse moléculaire très élevée (entre $20 \cdot 10^6$ et $1,5 \cdot 10^6$ Da), la présence de fer en quantité importante, l'absorbance à 415 nm (longueur d'onde où absorbent les groupements héminiques), le profil électrophorétique en conditions dénaturantes et réductrices

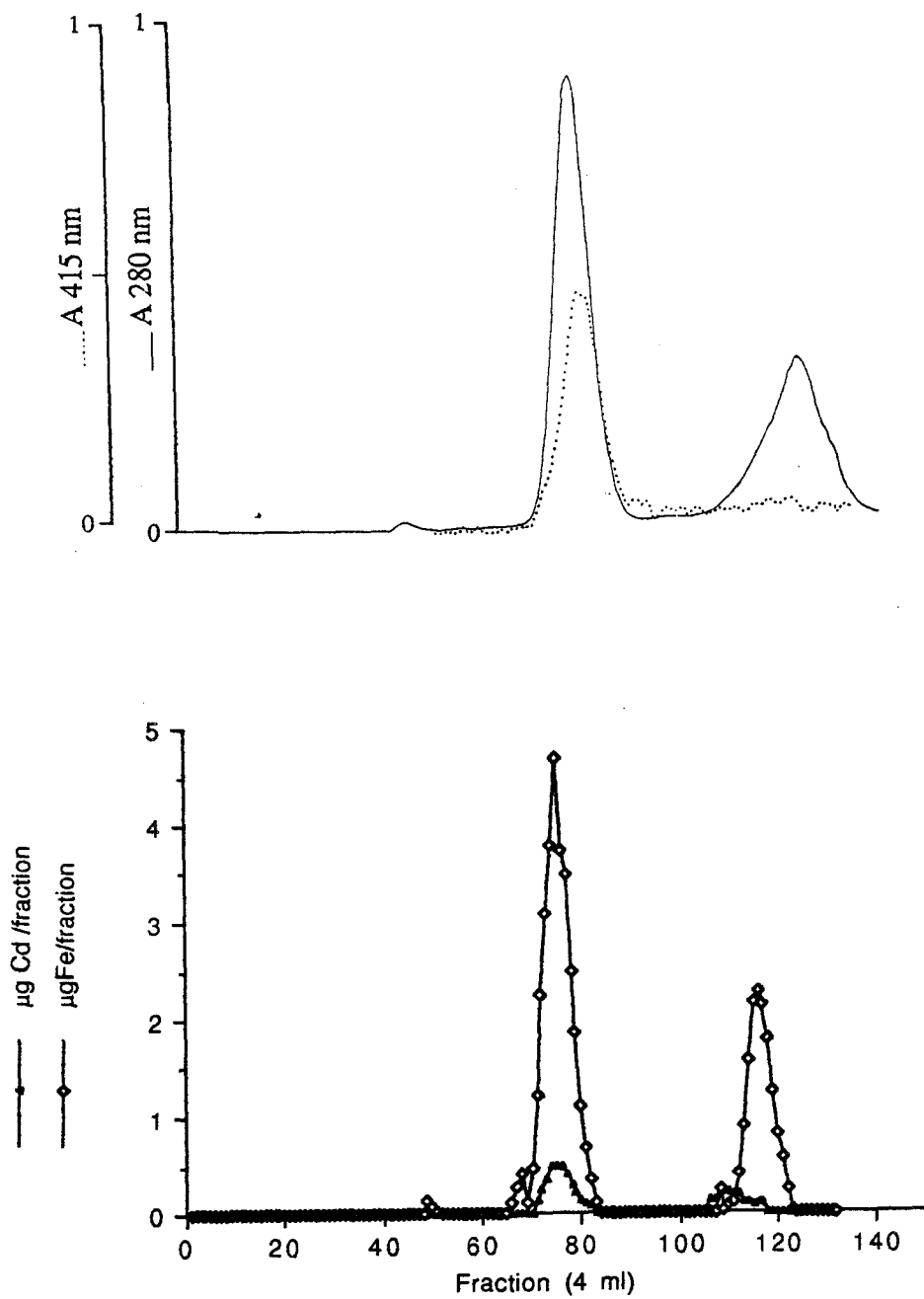


Figure 35 Chromatographie de gel filtration de "sang" de *Nereis diversicolor* exposées au cadmium (20mgCd/l d'eau de mer ; 4 jours). Conditions identiques à la figure 31.

PLANCHE III

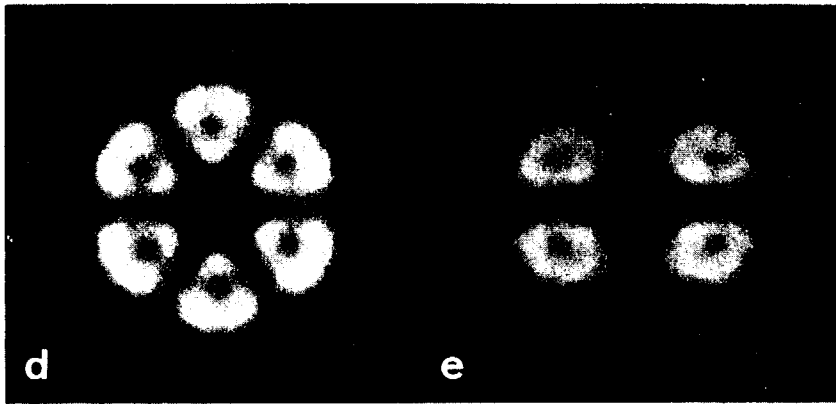
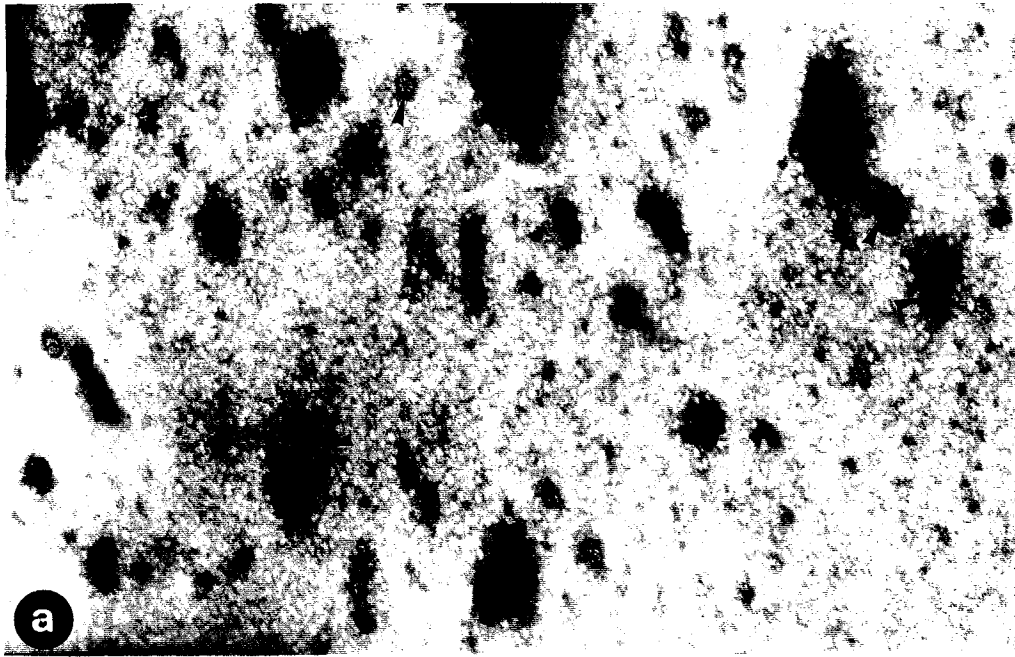
Observation en microscopie électronique à transmission d'une fraction aliquote du pic II, issu de la chromatographie de gel filtration sur colonne de Sepharose 4B, contenant la métalloprotéine MP I liant le cadmium. Coloration négative des molécules.

a : Molécules présentes dans l'échantillon colorées négativement (flèches).(G x 62 350).

b : Détail de la figure a. L'échantillon renferme des structures hexagonales (flèches). (G x 212 000).

c : Détail de la figure a. On observe des structures composées de quatre unités (flèches). (G x 212 000)

d et e : Hémoglobine d'*Amphitrite ornata* en coloration négative. Vues de dessus (d) et de côté (e) [Images de microscopie électronique à transmission par balayage (STEM) traitées par ordinateur].(D'après Vinogradov, 1985)



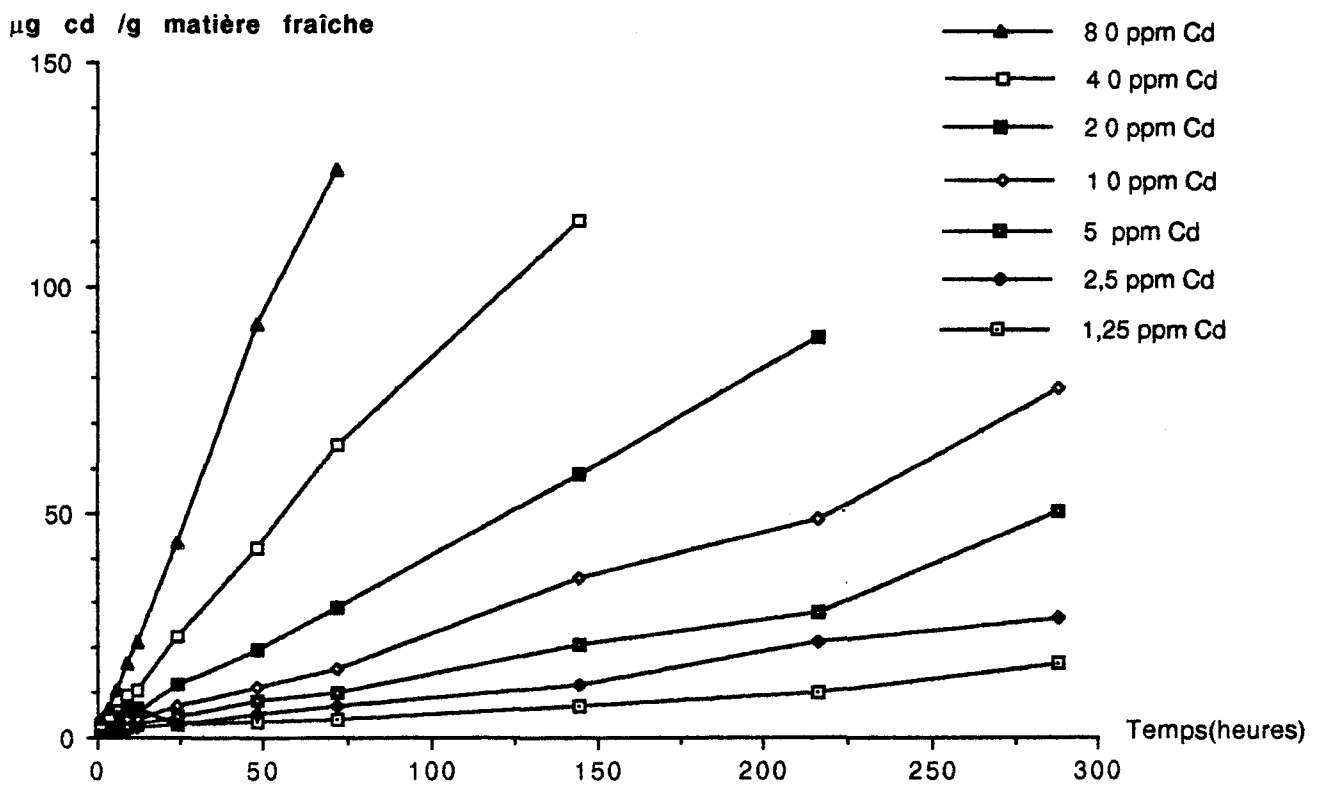


Figure 36 Concentrations de Cd dans les néréis exposées au cadmium (CdCl_2) via l'eau de mer. Doses d'exposition : 1,25 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 ; 40 et 80 mg/l. Durées d'exposition : 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 144, 216 et 288 heures.

ainsi que l'allure en microscopie électronique, correspondent parfaitement aux données de la littérature concernant les hémoglobines extracellulaires géantes caractéristiques des annélides (Vinogradov *et al.*, 1982). De plus, dans le cas de *Nereis diversicolor*, cette molécule a été mise en évidence par Suzuki *et al.* (1983). La fixation de cadmium sur cette molécule n'est pas très surprenante. En effet, chez une autre annélide polychète (*Glycera dibranchiata*), Rice et Chien (1979) ont montré qu'après exposition des animaux par une injection de cadmium radioactif dans la cavité coelomique, celui-ci est rapidement retrouvé lié à l'hémoglobine. Cette fixation entraînerait, selon les auteurs, un turn-over plus rapide des molécules. De même, chez le crustacé *Callinectes sapidus* (Brouwer *et al.*, 1982), des expériences menées *in vitro* ont permis d'observer la fixation de cadmium, de cuivre, de zinc et de mercure sur l'hémocyanine, pigment respiratoire de masse moléculaire élevée contenant du cuivre. Chez cette espèce, la fixation du cadmium et du zinc augmente l'affinité de la molécule pour l'oxygène tandis que le mercure et le cuivre ont un effet inverse. Brouwer *et al.* (1983) ont suggéré que le cadmium et le zinc pourraient se substituer au calcium présent sur la molécule et qui, selon Van Holde et Brenowitz (1982) servirait au maintien de la structure quaternaire. Cette compétition entre le cadmium et le calcium a également été observée pour une variété de protéines fixant le calcium, telles que les calmodulines (Fulmer *et al.*, 1985). Par des expériences de substitutions menées *in vitro*, Chao *et al.* (1984) ont montré que les ions cadmium, qui ont un rayon ionique (0,97 Å) très proche de celui du calcium (0,9 Å), étaient capables de déplacer approximativement deux tiers des ions calcium liés à la calmoduline. La présence de calcium a également été rapportée pour ces hémoglobines extracellulaires. Ainsi, chez *Tylorrhynchus heterochaetus* (polychète), il permettrait le maintien de la structure bihexagonale des molécules (Standley *et al.* 1988). Chez cette même espèce, il a également été observé la présence de zinc et de cuivre dans l'hémoglobine mais le rôle de ces derniers est incertain.

IV - Etude de l'accumulation du cadmium chez *Nereis diversicolor*

En parallèle à l'étude des metalloprotéines de la néréis, nous avons également réalisé une étude de l'accumulation du cadmium chez cet organisme en conditions expérimentales. Cette approche a été menée essentiellement dans le but de mieux cerner l'intervention des metalloprotéines dans l'accumulation du cadmium.

IV.1- Dans les animaux entiers

Des lots de 6 animaux de masses comprises entre 0,4-0,6 g ont été exposés à 20°C au cadmium (CdCl₂) par l'intermédiaire de 250 ml de solution de cadmium dans de l'eau de mer renouvelés toutes les 48 heures. Une gamme très large de doses d'exposition a été réalisée (1 ; 25 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 ; 40 et 80 mg Cd/l) eau de mer ou ppm de Cd). Les animaux ont été suivis pendant les durées de 1, 3, 6, 9, 12 et 24 heures et 2, 3, 6, 9, 12 jours selon leur résistance aux doses administrées. A la suite de l'exposition, les animaux ont été rincés plusieurs

Facteurs de concentration

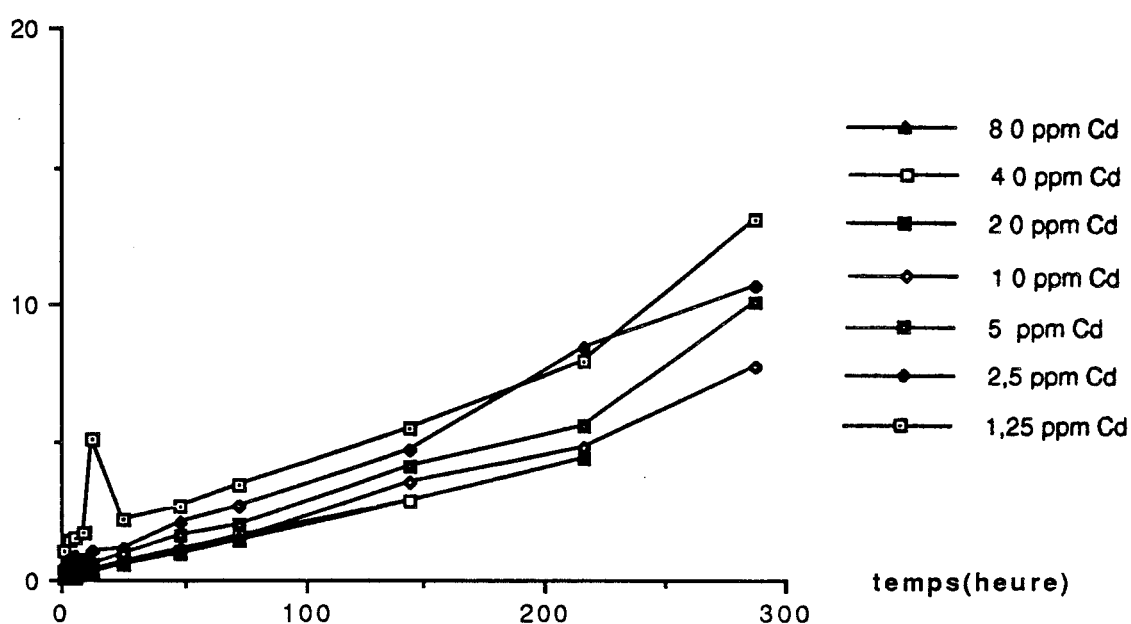


Figure 37 Evolution du facteur de concentration (quantité de cadmium dans les animaux/ quantité de cadmium dans l'eau de mer) en fonction de la dose d'exposition. Les doses et durées d'exposition correspondent à celle de la figure 36.

fois par de l'eau de mer naturelle puis minéralisés selon la technique décrite au chapitre matériel et méthodes. Pour le dosage du cadmium par SAAF, 3 mesures (3 secondes d'aspiration de l'échantillon) ont été effectuées. Les résultats exprimés en $\mu\text{g Cd/g}$ (ppm) de matière fraîche sont illustrés par la fig. 36. Quelle que soit la dose utilisée, nous avons constaté que l'accumulation du cadmium s'effectue de manière quasi linéaire avec la durée de l'exposition. Nous avons également constaté que la concentration en cadmium dans les animaux dépasse très rapidement (avant 48 h d'exposition) celle du milieu pour toutes les doses utilisées et atteint des valeurs très élevées dans le cas des doses fortes ($126 \mu\text{g Cd/g}$ après 3 jours d'exposition à 80 ppm de Cd). Concernant la survie des animaux aux doses d'exposition choisies, nous avons constaté que les doses de 20, 40 et 80 ppm de Cd entraînaient la mort des individus avant le terme de l'expérience (12 jours) à la température de 20°C . De plus, cette mortalité survient d'autant plus rapidement que la charge métallique des animaux est élevée. En effectuant le calcul des facteurs de concentration (concentration en cadmium dans les animaux rapportée à la concentration du milieu), on constate (fig. 37) qu'au cours du temps, l'évolution est globalement la même pour l'ensemble des doses d'exposition utilisées, ce qui traduit une certaine proportionalité entre la charge accumulée par les animaux et la concentration en métal de leur milieu d'élevage. On note toutefois que ces facteurs de concentration sont plus faibles pour les doses d'exposition les plus élevées.

IV.2- Dans les fractions soluble et insoluble

Afin d'apprécier la manière dont est distribué le cadmium entre les fractions soluble et insoluble, les animaux ont été contaminés par la dose de 80 ppm de cadmium. Cette dose a été retenue en raison des très nettes différences d'accumulation de cadmium constatées chez les animaux entiers en fonction de la durée de l'exposition. De plus, celle-ci nous a semblé être la plus susceptible d'apporter des informations sur les différentes étapes menant à la mort des animaux, la mortalité étant totale au-delà de 4 jours. Les animaux ont été suivis pendant les durées de 1, 3, 6, 9, 12, 24 heures, 2, 3 et 4 jours. A la suite de l'exposition au cadmium et du lavage dans l'eau de mer, les animaux ont été homogénéisés dans deux volumes de tampon Tris/HCl 15 mM, pH 8,5 et centrifugés dans les conditions utilisées pour la préparation de la protéine MP II. Le résultat du dosage du cadmium dans les fractions solubles et insolubles des animaux est illustré par les figures 38 et 39. En raisonnant en terme de concentration en Cd par unité de matière fraîche (fig. 38) on constate que la teneur en cadmium augmente à la fois dans les fractions soluble et insoluble des animaux et ceci jusqu'au terme de l'exposition. Quelle que soit la durée de l'exposition (exceptée 1 et 3 h), la concentration est plus élevée dans le surnageant que dans la fraction insoluble. Dans les deux compartiments la plus forte accumulation de cadmium a lieu entre 24 et 48 h d'exposition. Dans la fraction soluble, la concentration en cadmium dépasse la valeur du milieu avant 48 h d'exposition comme nous l'avons observé dans les animaux entiers. Après 48 h d'exposition, il semblerait qu'une saturation se produise au niveau des deux fractions, les concentrations en cadmium augmentant plus faiblement entre 48 et 72 h. Le rapport entre la fraction soluble et la fraction insoluble dans les animaux n'est pas identique tout au long de

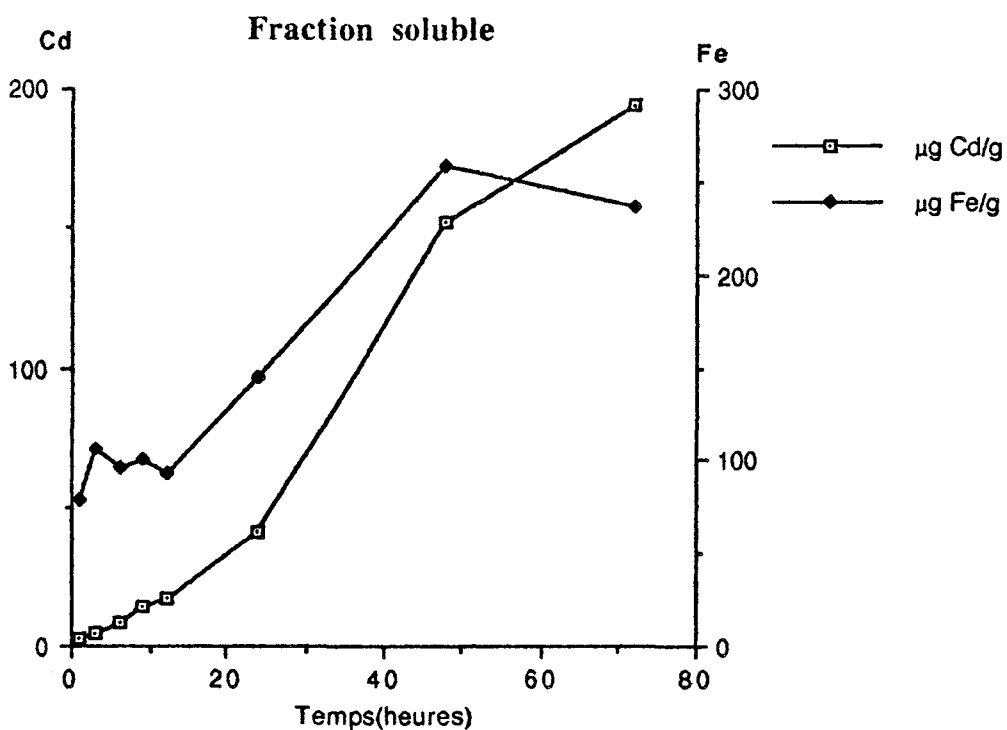
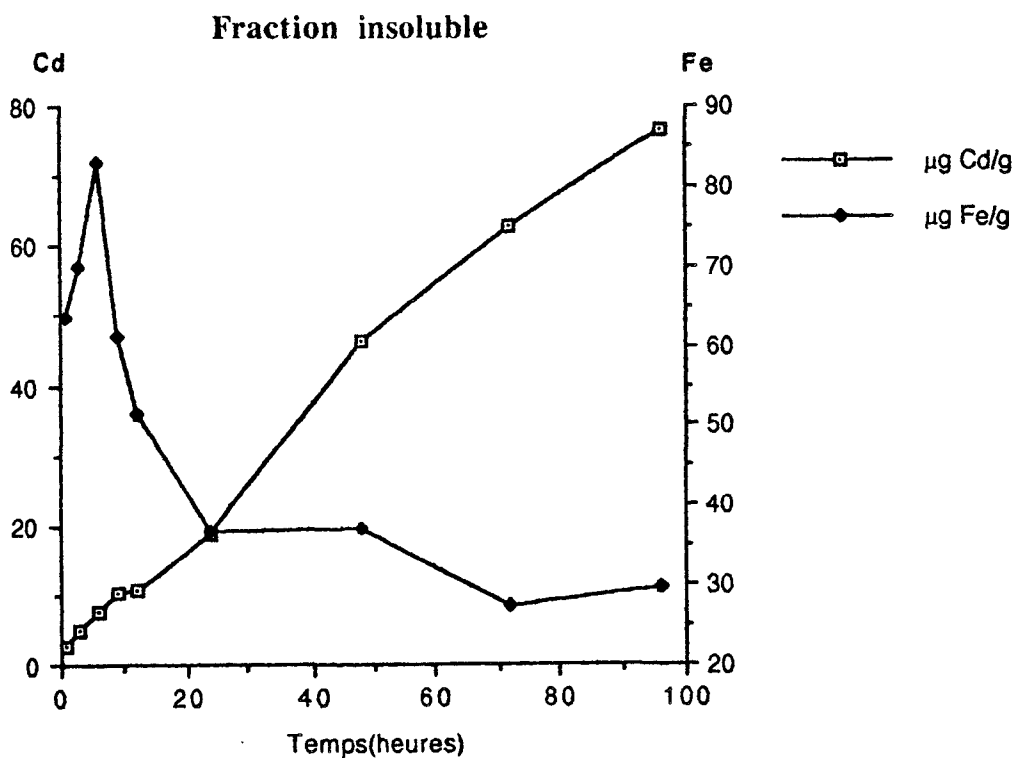


Figure 38 Concentration en Cd et Fe ($\mu\text{g/g}$ de matière fraîche) dans la fraction insoluble et soluble de néréis exposées au cadmium (CdCl_2) via l'eau de mer (80 mg Cd/l) pendant les durées de 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 et 96 heures.

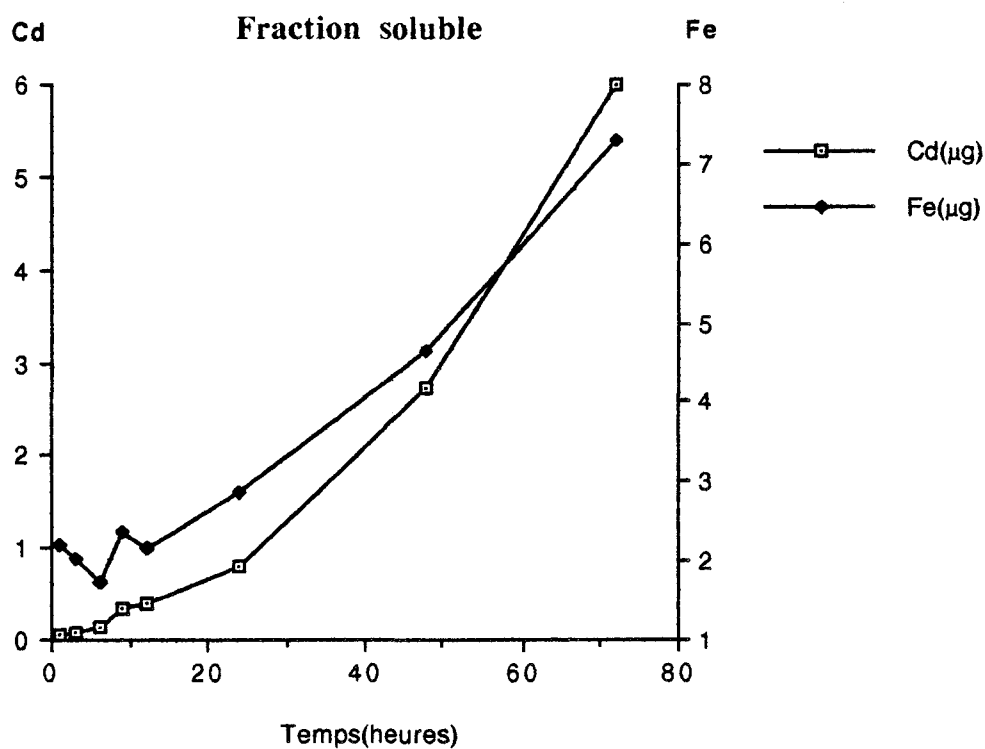
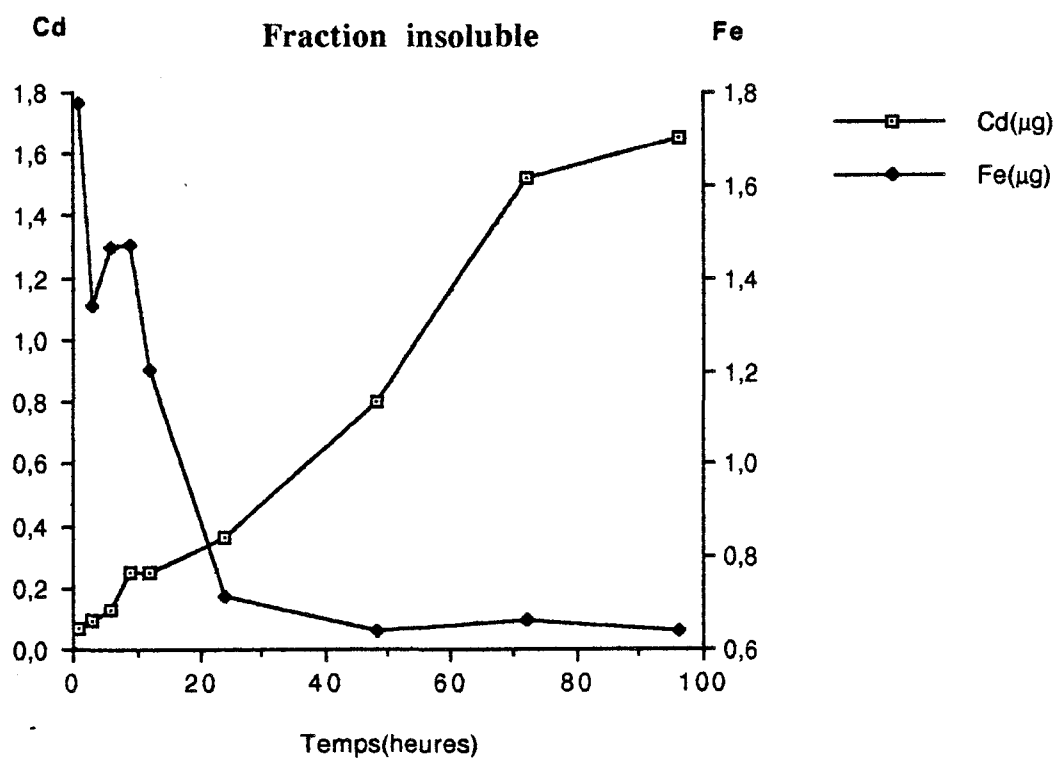


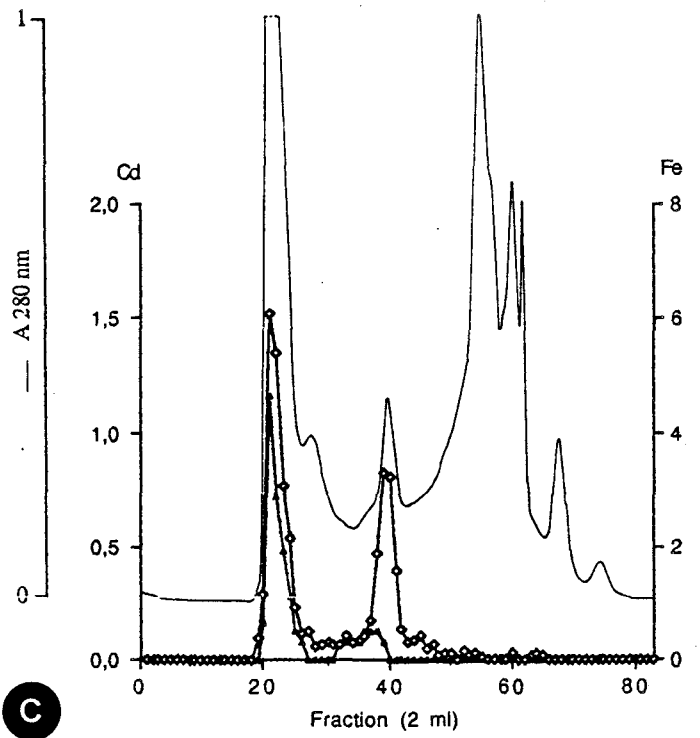
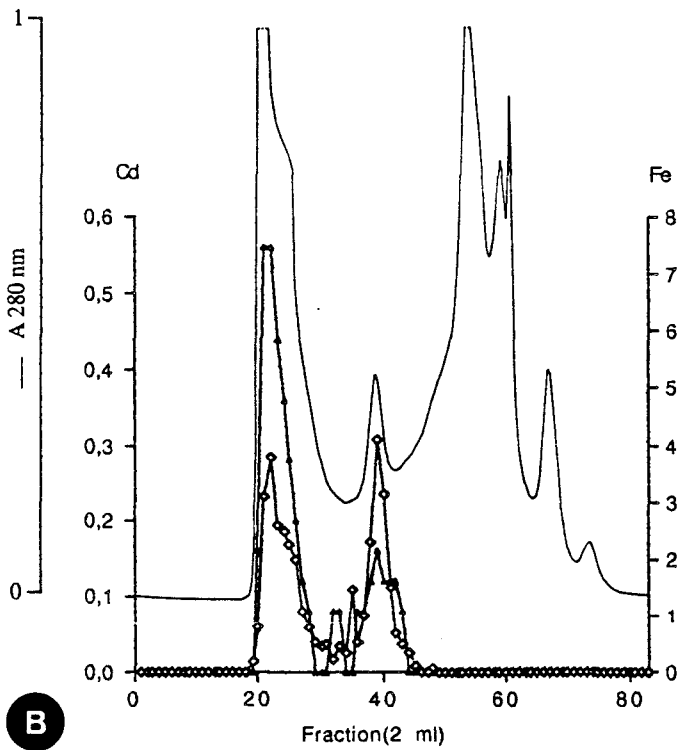
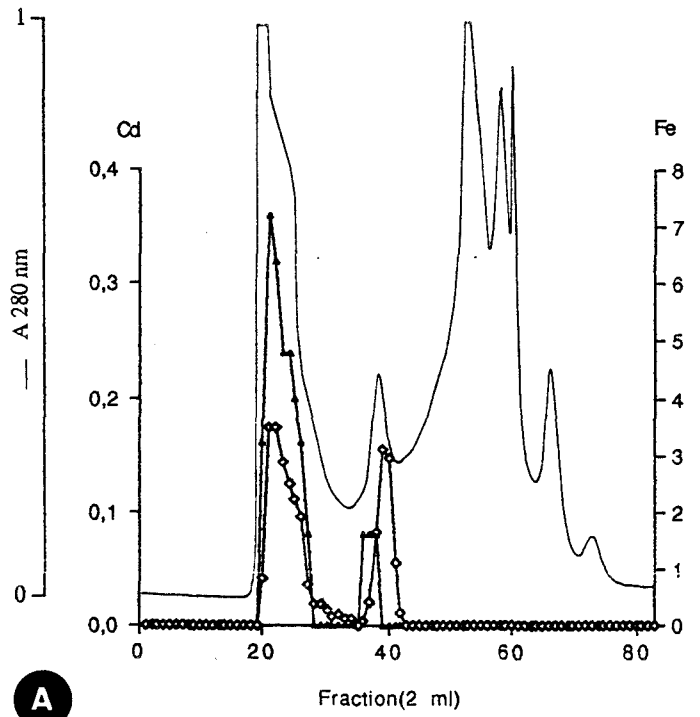
Figure 39 Quantité de Cd et Fe (1 % de la fraction analysée) dans les fractions insoluble et soluble des néréis exposées au cadmium (CdCl_2) via l'eau de mer (80 mg Cd/l) pendant les durées de 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 et 96 heures.

l'expérience mais au contraire diminue de manière importante avec la durée de l'exposition. Nous avons déterminé pour chaque durée d'exposition la quantité de métal accumulée dans les deux fractions rapportée à la part qu'elles représentent dans les animaux entiers. Dans ce cas (fig. 39) on constate que l'allure des courbes reste très comparable. Cependant, il semble que la saturation n'ait lieu dans la fraction insoluble des animaux qu'à partir de 72 h d'exposition. La plus importante augmentation de cadmium dans les deux compartiments s'observe dans ce cas entre 48 et 72 h. Le dosage du fer dans les mêmes échantillons révèle globalement une diminution du métal dans la fraction insoluble pendant les premières 24 h puis une stabilisation et, au contraire, une augmentation importante dans la fraction soluble entre 12 et 72 h.

IV.3- Distribution du cadmium entre les protéines de la fraction soluble des animaux

Une chromatographie de gel filtration sur colonne Superdex 75 (FPLC) a été réalisée pour la fraction soluble d'animaux exposés par 80 ppm de cadmium pendant les mêmes durées que précédemment. Un volume identique de 2 ml de surnageant a été appliqué à l'aide d'une boucle d'échantillon pour chaque échantillon permettant la comparaison des différents fractionnements et la colonne a été éluée à un débit de 1 ml/mn par le tampon Tris/HCl 15 mM, pH 8,5, 50 mM NaCl. Des fractions de 2 ml ont été recueillies et l'absorbance a été mesurée à 280 nm. Le cadmium et le fer ont été dosés dans les fractions diluées à 50 % avec le tampon et les résultats obtenus en ppm ont été rapportés au volume des fractions. Les profils chromatographiques des différentes séparations sont illustrés par la figure 40. Du point de vue qualitatif, la principale constatation est que le cadmium est presque exclusivement distribué entre les deux composés MP I et MP II de masse moléculaire respectivement supérieure à 70 kDa et de l'ordre de 13,7 kDa (par comparaison avec des substances de masse moléculaire connue, cf fig. 8). Pour les durées d'exposition les plus élevées, on note toutefois l'apparition de cadmium en très faible quantité au niveau de composés de très faible masse moléculaire (inférieure à 8 kDa) et de masse moléculaire comprise entre 43 et 25 kDa. Concernant les variations de distribution du cadmium en fonction de la durée d'exposition, dès 6 h d'exposition à 80 ppm de Cd on note un net pic de métal localisé dans les fractions contenant la MP I. Le pic de cadmium augmente ensuite jusqu'à 72 h d'exposition. Entre 72 et 96 h, il semble se produire un phénomène de saturation, le pic de cadmium diminuant légèrement en comparaison de celui de la durée précédente. Cette situation est analogue à celle que nous avons observée dans la fraction soluble pour la concentration de cadmium. Comme c'est le cas pour la fraction soluble, la plus forte augmentation de la teneur en cadmium pour le pic I semble s'effectuer entre 24 et 48 h d'exposition. Ce n'est qu'à partir de 48 h d'exposition que l'on constate un réel pic de cadmium au niveau du pic de MP II. Celui-ci est beaucoup plus faible que celui du pic I quelle que soit la durée d'exposition considérée. Concernant la répartition du fer dans ces fractionnements et son importance, nous avons observé pour toutes les durées d'exposition deux importants pics de fer. Le premier, situé au niveau du pic protéique contenant la MP I, coïncide parfaitement avec le pic de cadmium

—●— $\mu\text{g Cd/Fraction}$
 —○— $\mu\text{g Fe/Fraction}$



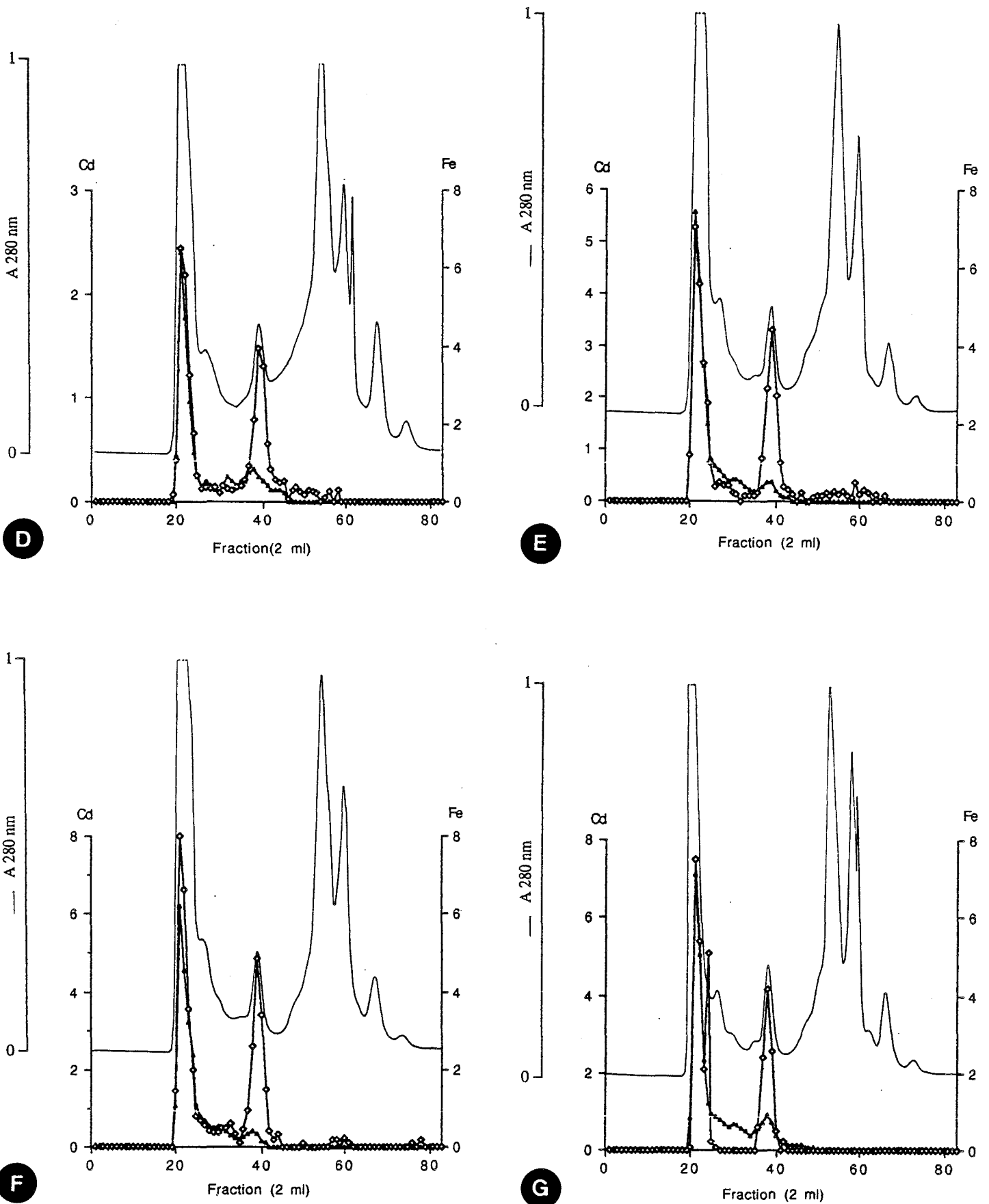


Figure 40

Chromatographies de gel filtration en FPLC de la fraction soluble de *Nereis diversicolor* exposées au cadmium (80 mg Cd/l d'eau de mer) pendant des durées variées.

A : 6 heures ; B : 9 heures ; C : 12 heures ; D : 24 heures ; E : 48 heures ; F : 72 heures ; G : 96 heures .

Colonne utilisée : Superdex 75 (HiLoad 16/60) ; tampon d'élution : Tris/HCl 15 mM, pH 8,5, 50 mM NaCl ; échantillon déposé : 2 ml ; débit : 1 ml/mn.



observé à ce niveau. Le second pic de fer, d'importance plus faible, est quasi superposé au pic de cadmium qui est associé au composé MP II. Globalement, la teneur en fer du pic I augmente avec l'exposition comme nous l'avons observé pour la fraction soluble.

V - Sites d'accumulation du cadmium

V.1- Distribution tissulaire du cadmium

V.1.1- Détection histochimique

La recherche au niveau tissulaire des sites d'accumulation du cadmium a été réalisée à l'aide de la technique de détection des cations métalliques dérivée de la technique de Timm (1958), modifiée par Danscher (1981), dont le principe est détaillé au chapitre matériel et méthodes. Elle a été effectuée à la fois sur des animaux exposés à 80 ppm de cadmium pendant 24 et 48 h et sur des animaux non exposés au cadmium servant de témoins négatifs. Afin de distinguer la part du marquage liée à la présence de cadmium dans les coupes, nous avons effectué la réaction sur des métamères traités et non traités par le sulfure de sodium (Na_2S), ce sel étant nécessaire pour la détection des cations métalliques divalents transformés *in situ* en sulfures. Chez les animaux témoins, en présence de Na_2S (Pl. IVa, b), on observe une réaction positive au niveau de l'épithélium digestif. Celle-ci apparaît sous la forme de fines granulations localisées dans le tiers supérieur des entérocytes. Ce marquage a également été observé chez les témoins non traités par le Na_2S (non illustré). De plus, il existe un marquage important sous forme d'une couche continue située immédiatement sous les entérocytes et séparée de la cavité coelomique par une fine couche de fibres musculaires (Pl. IVb). Il est à noter que la périphérie des lacunes sanguines associées au tube digestif est marquée, alors que leur contenu n'est pas réactif. Chez les animaux exposés au cadmium on constate, en absence de Na_2S (Pl. IVc), que le marquage du tube digestif est plus important que chez les animaux témoins. Ce résultat semble indiquer que du cadmium est présent sous la forme d'un composé soufré autre que celui formé par l'adjonction de Na_2S . Comme précédemment, le contenu des lacunes sanguines n'est pas marqué. En présence de Na_2S , le marquage des entérocytes est particulièrement important (Pl. IVd, f) et on constate également dans ce cas (Pl. IVd, e, f) que les vaisseaux sanguins sont marqués à la fois en périphérie du tube digestif et dans le reste du corps de l'animal (réseau vasculaire des parapodes et sinus sous-cuticulaire). Un autre site fortement marqué est la cuticule des animaux (Pl. IVd, e).

V.1.2- Radioautographie (Cd^{109})

La technique de Timm (1958) n'étant pas spécifique du cadmium, la technique de la radioautographie, utilisant du Cd^{109} , a également été effectuée sur des coupes à la paraffine. Deux voies d'administration du toxique ont été envisagées. La première voie a été l'injection d'une solution de Cd^{109} dans de l'eau de mer ($10 \mu\text{l}$ d'une solution à $10 \mu\text{Ci/ml}$) dans la cavité coelomique des animaux. Ceux-ci ont ensuite été placés dans de l'eau de mer naturelle

pendant les durées de 3, 12, 24 et 48 h avant d'être sacrifiés. La seconde voie d'administration, plus naturelle, a consisté à incuber les animaux dans 20 ml d'une solution de Cd^{109} à $1 \mu\text{Ci/ml}$ dans l'eau de mer contenant 5 ppm de cadmium froid (CdCl_2). L'exposition a été menée pendant 5 et 10 jours. Les principales observations sont illustrées par les planches V à VII

Dans le cas des animaux ayant reçu l'injection du radioisotope, dès la durée de 3 h d'exposition, des marquages significatifs ont été observés. Ceux-ci sont localisés au niveau des cellules épithéliales tégumentaires dans les zones latéro-dorsales, latéro-ventrales, au niveau des extrémités parapodiales et également au niveau des jonctions entre les métamères et les expansions parapodiales (Pl. Va, b, c). Le marquage le plus important est observé au niveau des néphridies, à la périphérie des tubules (Pl. Vd). Pour la durée de 12 h, en plus de ces sites (Pl. VIa, b), la présence de cadmium a également été observée au niveau de l'épithélium digestif dans le tiers supérieur des entérocytes (Pl. VIc) et au niveau des lacunes sanguines (Pl. VIId). Pour les durées d'exposition les plus élevées (24 et 48 h), le marquage augmente au niveau du tube digestif (Pl. VIa, b). On peut également noter que le marquage est plus important et plus localisé en périphérie des tubules néphridiens (Pl. VIIc) que dans le cas de la durée de 3 h.

Dans le cas de l'incubation des animaux dans la solution contenant le radioisotope, pour la durée de 5 jours d'exposition, les zones marquées sont semblables à celles observées dans le cas de l'injection. Il existe cependant une différence concernant le marquage de l'épithélium intestinal. En effet, alors que celui-ci est faible et principalement localisé au niveau des replis du tube digestif dans le cas de l'injection, il apparaît de manière beaucoup plus dense et localisé à l'extrémité apicale des entérocytes dans le cas présent (Pl. VIIId). Pour la durée de 10 jours d'exposition au radioisotope, nous avons constaté que le marquage ne présente plus de localisation stricte mais au contraire est présent de manière très diffuse sur l'ensemble des tissus de la coupe (non illustré).

V.2- Sites intracellulaires de stockage du cadmium

Cette recherche a été menée en utilisant la technique histochimique de Timm (1958) modifiée par Hacker *et al.* (1988) sur des métamères de néréis exposées à 22 ppm de cadmium pendant 21 jours à 13°C . L'observation des coupes ultrafines en microscopie électronique a révélé un important marquage au niveau du tégument des animaux. Celui-ci est visible à la jonction entre la cuticule et l'épithélium tégumentaire (Pl. VIIIa) et du côté externe de la cuticule (Pl. VIIIb). Dans ces cellules, un marquage très dense a été observé au niveau de granules situés dans la partie apicale des cellules et ayant, dans certains cas, un contenu très hétérogène (Pl. VIIIb). Par leur aspect et leur taille, ces granules sont à rapprocher des lysosomes, les plus grands pouvant représenter des lysosomes tertiaires ou phagolysosomes. A ce titre, il convient de rappeler qu'il a été observé un accroissement du nombre des lysosomes dans le tégument chez des néréis exposées au cadmium (Nejmeddine, 1987). Concernant les autres sites de fixation du cadmium, nous avons observé un léger marquage au niveau des sphérocristaux présents dans l'intestin des animaux contaminés par le cadmium. Celui-ci est présent dans les couches denses aux électrons sous la

forme de très fines granulations (Pl. IXb). En comparaison, des animaux non exposés au cadmium ne présentent pas ce marquage (Pl. IXa). Comme nous l'avons observé à l'échelle de la microscopie optique par la technique de la radioautographie (Demuynck, 1988 ; Septier *et al.*, 1991), un marquage est également visible en microscopie électronique dans certains granules d'une catégorie de cellules libres intervenant dans l'épuration du milieu intérieur, les éléocytes (Pl. IXc).

PLANCHE IV

Détection histochimique du cadmium chez *Nereis diversicolor* par la technique de Timm (1958) modifiée par Danscher (1981).

a et b : Coupe à la paraffine de *Nereis diversicolor* non exposée au cadmium. La réaction histochimique a été effectuée en présence de sulfure de sodium. On note la présence d'un marquage dans la partie apicale et à la base de l'épithélium intestinal (flèches) (a : G x 92. b : G x 230).

c et d : Coupe à la paraffine de *Nereis diversicolor* exposée à 80 ppm cadmium. La réaction histochimique effectuée en présence de sulfure de sodium (d) révèle un marquage des vaisseaux sanguins (flèches) non observé en absence de sulfure de sodium (c). On note également un marquage au niveau de la cuticule et un accroissement de la réaction dans l'épithélium intestinal (flèches). (C x 92).

e et f : Détails de la photographie d. (G x 230).

Cut : cuticule, Ep : épithélium intestinal, L : lumière intestinale, Ov : ovocyte, V : vaisseau sanguin.

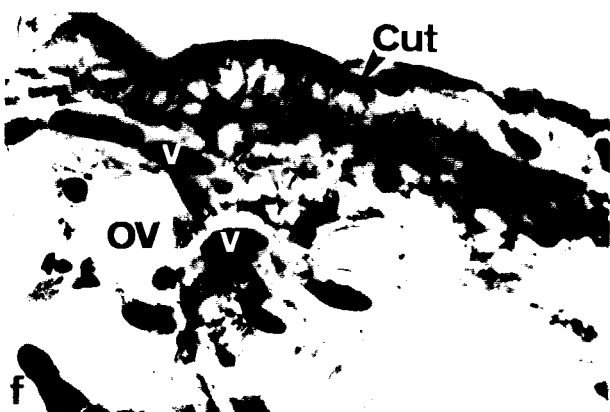
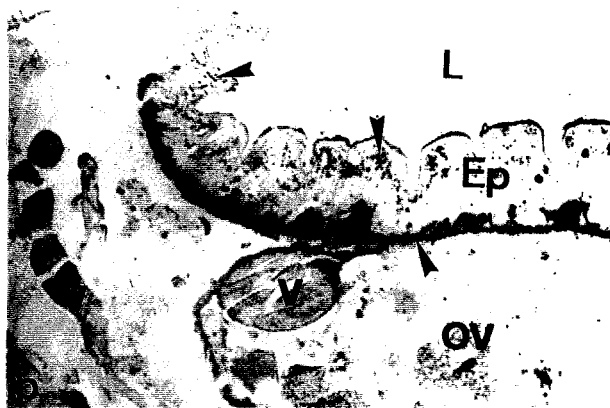


PLANCHE V

Radioautographie sur coupes à la paraffine de *Nereis diversicolor* après 3 heures d'exposition au Cd^{109} administré par injection dans la cavité cœlomique de 10 μ l d'une solution à 10 μ Ci/ml dans de l'eau de mer.

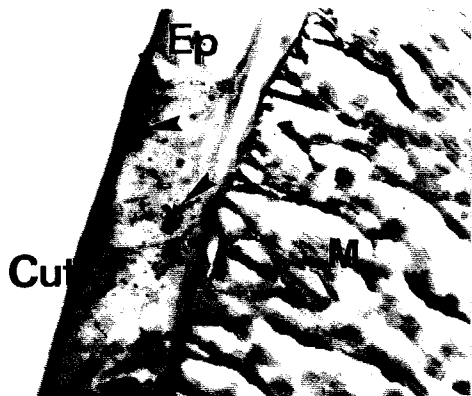
a : Zone latéro-dorsale d'un métamère de néréis en coupe transversale. Le marquage est localisé dans l'épithélium tégumentaire (flèches. (G x 370).

b : Parapode de néréis. Le marquage est très important à l'extrémité du parapode (flèches). (G x 370)

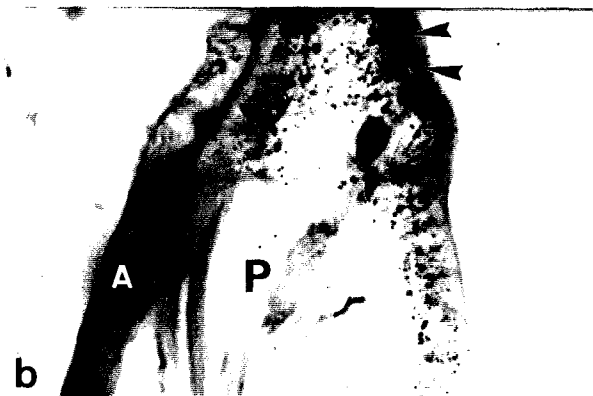
c : Zone de jonction entre le parapode et le corps de l'animal. Un marquage important est présent dans l'épithélium au niveau de cette zone (flèches). (G x 370).

d : Néphridie. Le marquage est présent dans le tissu néphridien autour des tubules néphridiens (flèches). (G x 370).

A : acicule, Cut : cuticule, Ep : épithélium, M : muscle, P : parapode, S : soies, TN : tubules néphridiens, V : vaisseau sanguin.



a



b



c



d

PLANCHE VI

Radioautographie sur coupes à la paraffine de *Nereis diversicolor* après 12 heures d'exposition au Cd^{109} administré par injection dans la cavité coelomique de 10 μ l d'une solution à 10 μ Ci/ml dans de l'eau de mer.

a : Zone latéro-dorsale d'un métamère de néréis en coupe transversale. Le marquage est localisé dans la partie apicale de certaines cellules épithéliales du tégument (flèches) (G x 920).

b : Néphridie. Le marquage est situé en bordure des tubules néphridiens (flèches). (G x 370).

c : Epithélium digestif. Le marquage est localisé dans le tiers supérieur de l'épithélium (flèches). (G : 920).

d : Parapode. On observe un marquage dans les vaisseaux sanguins (flèches). (G x 370)

Cut : cuticule, Ep : épithélium, L : lumière du tube digestif, LB : lame basale, M : muscle, TN : tubule néphridien, V : vaisseau sanguin.

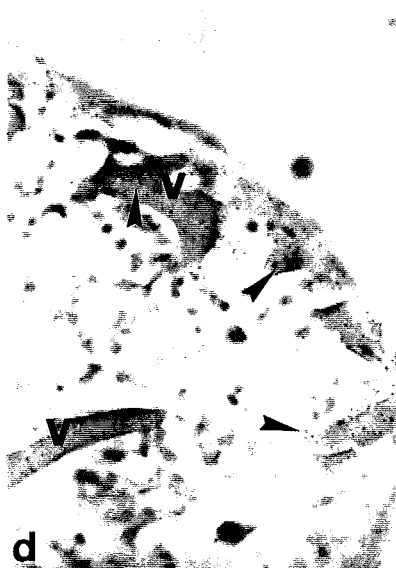
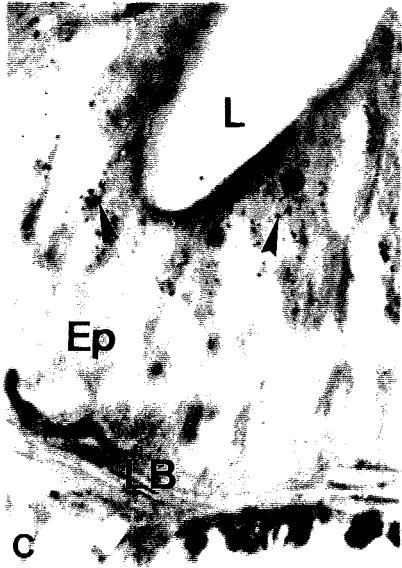


PLANCHE VII

Radioautographie sur coupes à la paraffine de *Nereis diversicolor* exposées pendant 24 h (a) et 48 h (b, c) au Cd^{109} administré par injection dans la cavité cœlomique (10 μ l d'une solution à 10 μ Ci/ml dans de l'eau de mer) et après 5 jours d'incubation dans une solution de Cd^{109} (1 μ Ci/ml) dans de l'eau de mer contenant 5 ppm de cadmium froid ($CdCl_2$) (d).

a : Epithélium digestif Le marquage est localisé au niveau apical des entérocytes (flèches) (G x 920).

b : Epithélium digestif Le marquage est plus important (flèches). (G x 920).

c : Néphridie. Le marquage est plus important que celui des durées précédentes et beaucoup plus localisé en périphérie des tubules néphridiens (flèches). (G : 370)

d : Epithélium digestif. Le marquage est très régulier et concentré à l'apex des entérocytes (flèches). (G x 920)

Ep : épithélium digestif, L : lumière intestinale, LB : lame basale, TN : tubule néphridien.

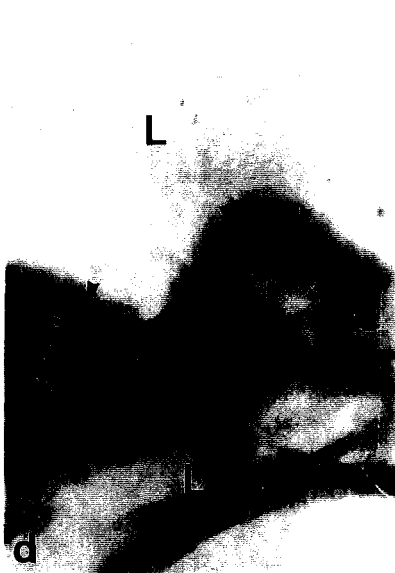
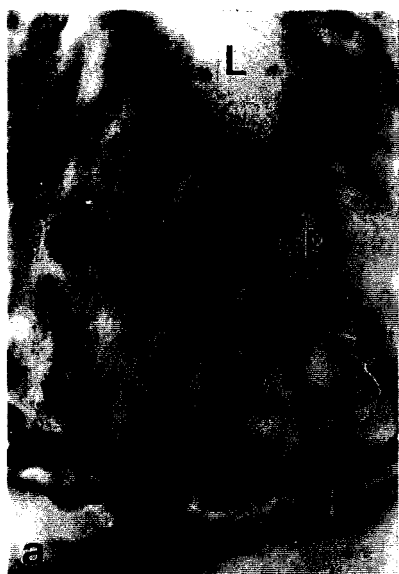


PLANCHE VIII

Mise en évidence en microscopie électronique, par la technique de Timm (1958) modifiée par Hacker *et al.* (1988), des sites intracellulaires de stockage du cadmium chez *Nereis diversicolor*.

a : Tégument de *N. diversicolor* exposée à 22 ppm de cadmium pendant 21 jours. Un marquage important est observé à la jonction entre la cuticule et le tissu épithélial (flèches) (G x 60 000).

b : Autre zone du tégument. Le marquage est observé au niveau de gros granules à contenu hétérogène (1) localisés dans les cellules épithéliales et sur le côté externe de la cuticule (2) (flèches). (G x 12 000).

Cut : cuticule, Ep : épithélium, m : mitochondrie,.

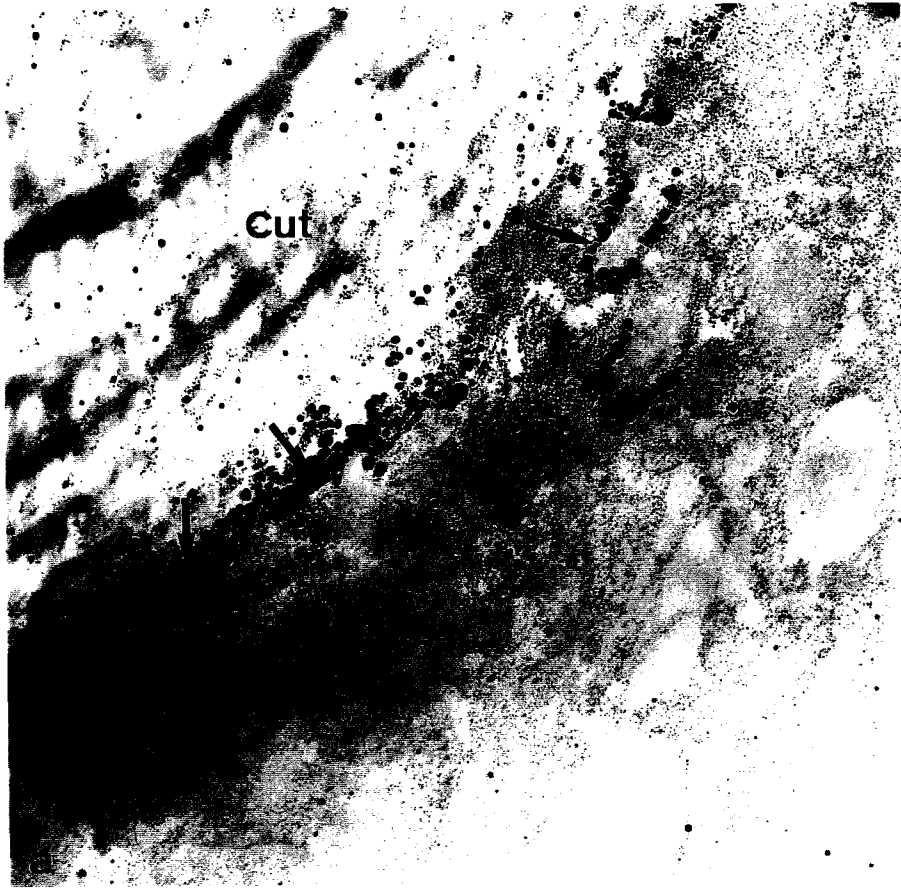


PLANCHE IX

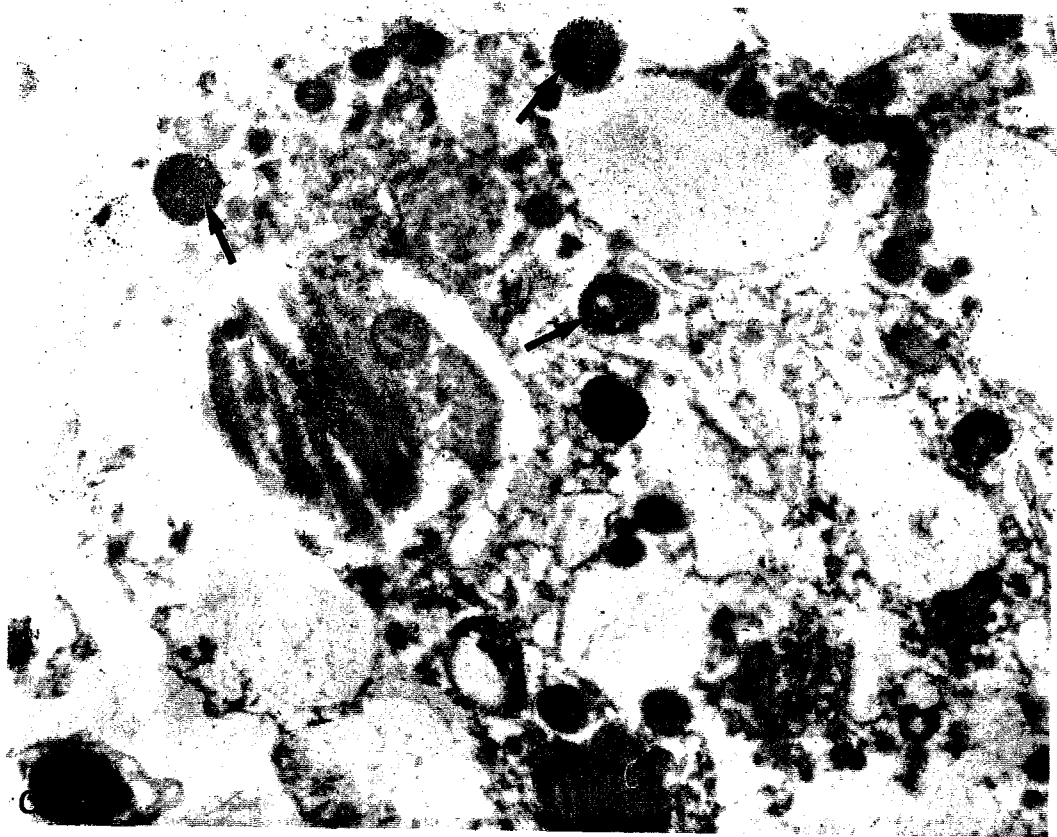
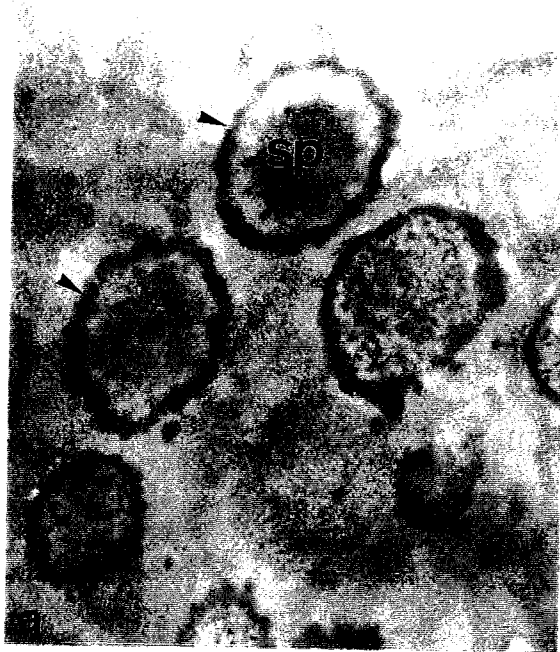
Détection cytochimique du cadmium par la technique de Timm (1958) modifiée par Hacker *et al.* (1988).

a : Intestin de *N. diversicolor* non exposée au cadmium. La réaction a été réalisée en présence de sulfure de sodium. On note que les sphérocristaux ne sont pas marqués (flèches) (G x 27 300).

b : Intestin de *N. diversicolor* exposée à 22 ppm de cadmium pendant 21 jours. La réaction réalisée en présence de sulfure de sodium révèle un léger marquage de la couche externe des sphérocristaux (flèches). (G x 29 200).

c : Eléocytes de *N. diversicolor* exposée à 22 ppm de cadmium pendant 21 jours. On observe un marquage dans certains granules (flèches). (G x 14 800)

m : mitochondrie, S : sarcofite, Sp : sphérocrystal.



**DISCUSSION GENERALE
ET CONCLUSIONS**

Discussion générale et conclusions

Au cours de notre étude, nous avons mis en évidence les principales étapes de l'accumulation du cadmium en conditions expérimentales chez l'annélide polychète estuarienne: *Nereis diversicolor*.

La nature de deux protéines fixant le cadmium de la fraction soluble des animaux ainsi que les principaux sites tissulaires de stockage du cadmium ont été précisés.

Malgré certains points qui demandent à être éclaircis, nous pouvons d'ores et déjà présenter un schéma général de la cinétique du cadmium chez la néréis (schéma 4).

Chez *Nereis diversicolor* l'accumulation du cadmium, ajoutée expérimentalement sous une forme soluble dans l'eau de mer, semble s'effectuer par un phénomène de diffusion passive à travers les surfaces perméables de l'animal. En effet, à la fois pour des doses faibles (1,25 ; 2,5 ; 5 ; et 10 ppm de Cd) ou fortes (20 ; 40 et 80 ppm de Cd), nous avons constaté que la teneur en cadmium des animaux augmente de manière quasi linéaire avec la dose et la durée d'exposition. De telles relations ont été mentionnées chez de nombreux invertébrés à la suite d'intoxications par le cadmium (*in* Ray, 1984). L'accumulation s'effectue dans la fraction insoluble et la fraction soluble des animaux. Dans cette dernière, les teneurs en cadmium sont les plus élevées lorsque les animaux sont soumis à une intoxication aiguë (80 ppm de Cd). Ce résultat montre l'importance des protéines cytosoliques dans l'accumulation du cadmium chez cette espèce. A ce titre, chez la majorité des invertébrés marins, les métalloprotéines exercent un rôle essentiel dans la fixation du cadmium. Deux voies de pénétration du cadmium sont à considérer. Ainsi, par la technique de la radioautographie et par histochimie, nous avons montré qu'à la fois la surface externe (tégument) et également la surface interne (tube digestif) participent à la pénétration du cadmium présent sous une forme dissoute dans l'eau de mer. Ces deux voies constituent également des sites de stockage pour une partie du cadmium absorbé. Les structures intracellulaires ont été observées en microscopie électronique et correspondent à celles généralement décrites chez les invertébrés dans le stockage des métaux lourds : sphérocristaux (Simkiss, 1979 ; Martoja et Martoja, 1984) et formations lysosomiales (George, 1983 ; Ballan-Dufrançais *et al.*, 1982).

Concernant le transport du cadmium à l'intérieur de la néréis, celui-ci est assuré par sa fixation à une métalloprotéine de masse moléculaire très élevée baptisée MP I dont l'existence a été rapportée antérieurement (Dennaï, 1984 ; Nejmeddine, 1987) et que nous avons clairement identifiée comme étant l'hémoglobine extracellulaire de cette annélide.

En conditions d'intoxication aiguë (40 et 80 ppm de Cd) ou subaiguë (20 ppm de Cd), cette molécule apparaît comme l'un des déterminants majeurs de la bioaccumulation du cadmium. Elle contribue en effet pour une part très importante dans les teneurs en cadmium de la fraction soluble des animaux et par voie de conséquence des animaux entiers. Son intervention est rapide (dès 6 heures lors d'une intoxication aiguë). Sa charge en cadmium augmente de manière très importante

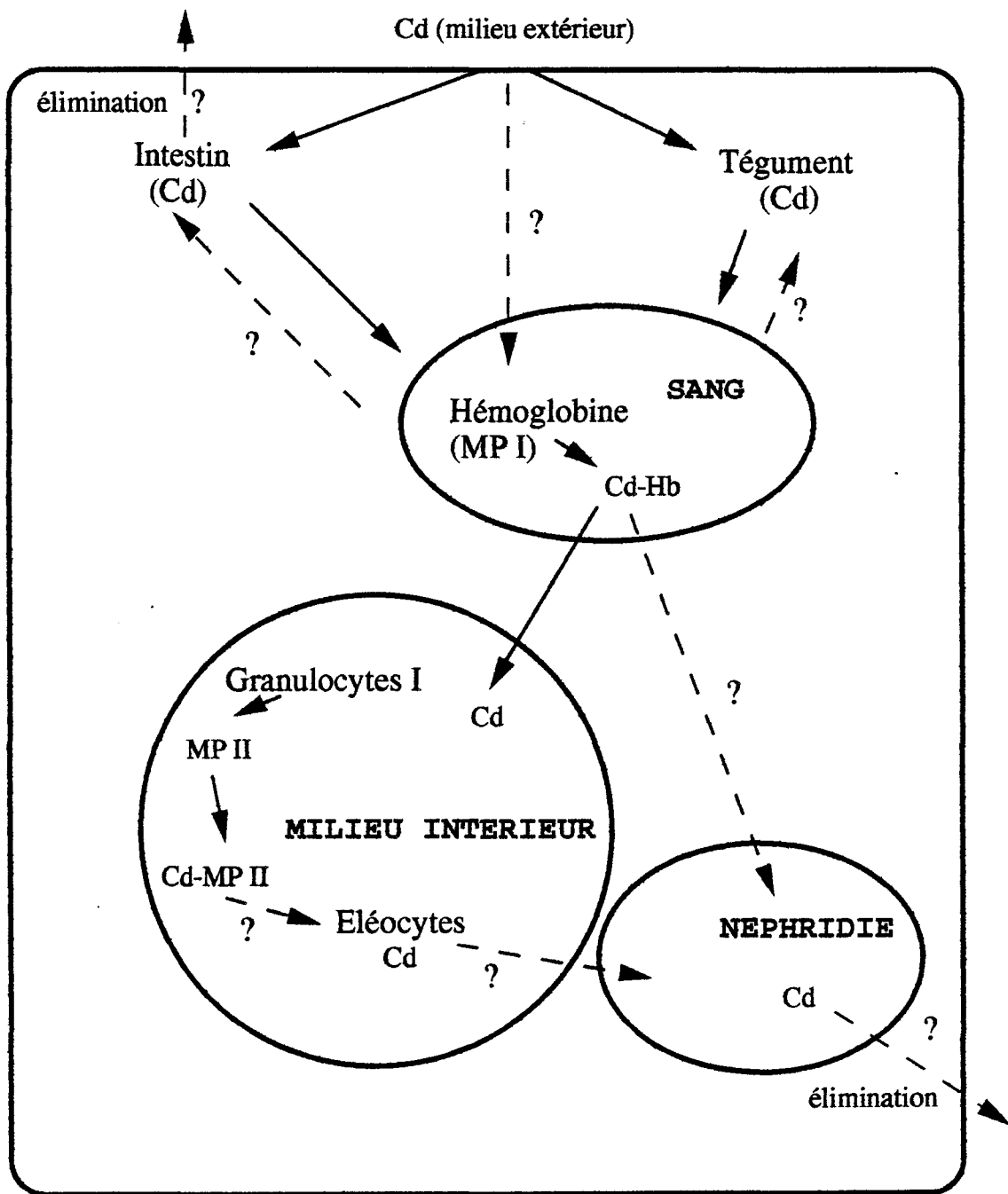


Schéma 4 - Principaux sites d'accumulation du cadmium et possibles relations entre les différents compartiments

avec la durée de l'exposition. Il est très vraisemblable que la mort des animaux en cas d'intoxication aiguë soit liée à cette fixation. Ainsi, chez les poissons marins, les effets majeurs des intoxications aiguës sont des atteintes sanguines et respiratoires (Cossa et Lassus, 1989). Chez la néréis, la fixation du cadmium sur cette molécule pourrait entraîner un accroissement de sa synthèse. Cette hypothèse est étayée par le fait qu'en relation avec l'accumulation du cadmium, nous avons constaté l'existence d'une redistribution du fer de la fraction insoluble vers la fraction soluble des animaux. De même, une augmentation importante de la teneur en fer a été observée au niveau du pic protéique contenant l'hémoglobine au cours de l'exposition des animaux au cadmium. Nous rappellerons aussi que chez l'annélide polychète *Glycera dibranchiata*, il a été démontré que l'exposition au cadmium entraînait une synthèse accélérée de l'hémoglobine (Rice et Chien, 1979).

Distribuée dans l'ensemble de l'organisme, l'hémoglobine est certainement, au moins partiellement, responsable de la fixation du cadmium dans les différents compartiments tissulaires de l'animal. Ainsi, le passage du cadmium dans la cavité coelomique est vraisemblablement à relier à la filtration du sang au niveau de la paroi des vaisseaux.

Par la technique de la radioautographie un marquage des néphridies, organes excréteurs de ce ver, a été observé. Celui-ci suggère qu'une part du cadmium pénétrant dans le milieu coelomique pourrait être éliminée à ce niveau. Cependant, Septier (1989) n'a pas observé en condition expérimentale de baisse significative de la teneur en cadmium des animaux après une exposition pendant 7 jours à 22 ppm de cadmium dissous dans l'eau de mer suivi d'un transfert dans de l'eau de mer renouvelée régulièrement pendant la même durée. Ce résultat est logique si l'on considère les propriétés essentiellement cumulatives de ce toxique. Ainsi, le marquage constaté dans les néphridies et localisé dans la paroi des tubules néphridiens pourrait plutôt représenter un site de stockage du métal chez cette espèce. Il convient de mentionner que le rein est l'organe cible principal de l'accumulation du cadmium chez les vertébrés et chez de nombreux invertébrés. La manière dont le cadmium est acheminé à ce niveau n'est pas actuellement complètement comprise.

Dans la cavité coelomique, la fixation du cadmium fait intervenir deux catégories des cellules libres : les éléocytes et les granulocytes de type I caractérisés par Dhainaut (1984). Ces deux types cellulaires agissent de manière différente. Les éléocytes connus pour leur capacité importante de phagocytose incorporent le cadmium. Ainsi, un marquage de certains granules a été mis en évidence par histochimie en microscopie électronique. Ce résultat confirme des données précédemment acquises en microscopie photonique par la technique de la radioautographie avec le Cd^{109} (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1991; Septier *et al.*, 1991). Concernant les granulocytes I, leur intervention s'effectue par l'émission dans le milieu coelomique d'une protéine de faible masse moléculaire qui fixe le cadmium. (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1987). Sa composition en acides aminés a montré qu'il ne s'agissait pas d'une métallothionéine en raison d'une teneur très faible de cystéine et la présence d'une quantité importante d'acides aminés aromatiques (Nejmeddine *et al.*,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

1988). Des protéines analogues ont été rapportées également chez d'autres invertébrés tels que la moule (Roesijadi et Hall, 1981) ou le buccin (Dohi *et al.*, 1983) mais également chez les vertébrés tels que le singe (Waalkes *et al.*, 1988) ou l'espèce humaine (Chow *et al.*, 1987). Cependant, leur nature n'a pas été déterminée. Chez *Nereis diversicolor*, la nature du composé MP II a été recherchée. Sa séquence en acides aminés a révélé qu'il s'agissait d'une protéine structurellement apparentée à la myohémérythrine, pigment respiratoire mis en évidence chez les sipunculien (Demuynck *et al.*, 1991; cette étude) et plus récemment rapportée chez la néréis (Takagi et Cox, 1991). Certaines différences notables ont été constatées entre la séquence de la MP II et celle de cette myohémérythrine. Une autre différence importante est l'apparente absence de fer sur la MP II bien qu'elle possède les acides aminés permettant sa fixation dans la myohémérythrine. Par ces différences, il apparaît que la MP II ne correspond pas à cette molécule mais représente une isoforme. Le rôle exact qu'elle exerce n'a pas été déterminé dans le cadre de notre étude. Par sa structure, on ne peut exclure un rôle respiratoire.

Toutefois, il convient de rappeler qu'en plus de l'absence de fer, la MP II diffère de la myohémérythrine de manière au moins aussi profonde par sa localisation et son métabolisme. Ainsi, le fait qu'elle soit émise dans le milieu coelomique ne correspond à aucune des données de la littérature concernant les pigments respiratoires. On peut également rappeler que cette protéine possède des propriétés bactériostatiques (Dhainaut *et al.*, 1989).

Cependant, l'analyse de la séquence en acides aminés de la MP II montre que les acides aminés impliqués dans la fixation du fer sont conservés. On peut envisager que c'est sur ces sites que se fixe le cadmium, vraisemblablement par une compétition avec les atomes de fer.

En conclusion, trois points méritent d'être soulignés : la mise en évidence des zones de transfert du cadmium, la découverte d'une myohémérythrine dans l'embranchement des annélides et la démonstration que deux molécules, connues par ailleurs pour avoir une fonction respiratoire, peuvent complexer le cadmium.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Amacher D.E. and Ewing K.L., 1975. A soluble cadmium-binding component in rat and dog spleen. *Arch. Environ. Hlth.*, **30**, 510-513.
- Amiard J.C., Amiard-Triquet C., Metayer C. et Ferre R., 1983. Etude du transfert de quelques oligoéléments métalliques entre le milieu sédentaire estuarien et les poissons plats "mangeurs de sédiments". *Mar. Environ. Res.*, **10**, 159-171.
- Andersen R.A., Eriksen K.D.H. and Bakke T., 1989. Evidence of presence of a low molecular weight, non-metallothionein-like metal-binding protein in the marine gastropod *Nassarius reticulatus* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, **94B**, 285-291.
- Ando M., Sayato Y. and Osawa T., 1978. Studies on the disposition of calcium in bones of rats after continuous oral administration of cadmium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **46**, 625-632.
- Ballan-Dufrançais C., Jeantet A.Y. et Halpern S., 1982. Localisation intracellulaire par microanalyse de métaux et de métalloïdes dans la glande digestive d'un mollusque bivalve (*Pecten maximus*). Implication des processus de digestion. *C. R. Acad. Sci.*, **284**, 673-678.
- Bauer-Hilty A., Dallinger R. and Berger B., 1989. Isolation and partial characterization of a cadmium-binding protein from *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta, Annelida). *Comp. Biochem. Physiol.*, **94C**, 373-379.
- Becker G.L., Chen C.-H., Greenawalt J.W. and Lehninger A.L., 1974. Calcium phosphate granules in the hepatopancreas of the blue crab *Callinectes sapidus*. *J. Cell. Biol.*, **61**, 316-326.
- Bjerregaard P. and Depledge M.H., 1988. Effect of salinity and calcium concentration on cadmium uptake in *Littorina littorea*. (L.). In : Collected abstracts of 1st European Conference on Ecotoxicology, Copenhagen, Denmark, 17-19th October 1988, 68 p.
- Boilly B. et Richard A., 1978. Accumulation du fer chez une Annélide Polychète : *Magelona papillicornis* O.F. Müller. *C. R. Acad. Sci.*, **198**, 1005-1008.
- Boué H. et Chanton R., 1957. Zoologie. I. Invertébrés. Doin G. et Cie. Eds, Paris, 510 p.
- Bouquegneau J.M. et Noël-Lambot F., 1978. Les métallothionéines : structure, fonctions et incidence dans les milieux marins pollués par les métaux lourds. Colloque Gabim, pp. 219-232. CNEXO, Actes Coll.
- Bremner I. and Young B.W., 1976. Isolation of (copper, zinc)-thioneins from the livers of copper-injected rats. *Biochem. J.*, **157**, 517-520.
- Britel M., 1992. Vitellogénine et ovohémérythrine, protéines majeures impliquées dans la vitellogenèse chez la sangsue *Theromyzon tessulatum*. Thèse Univ Lille I, 150 p.

- Brouwer M., Bonaventura C. and Bonaventura J., 1982.** Heavy metal ion interactions with *Callinectes sapidus* hemocyanin : Structural and functional changes induced by a variety of heavy metal ions. *Biochemistry*, **21**, 2529-2538.
- Brouwer M., Bonaventura C. and Bonaventura J., 1983.** Metal-ion interactions with *Limulus polyphemus* and *Callinectes sapidus* hemocyanins : Stoichiometry and structural and functional consequences of calcium (II), cadmium (II), zinc (II) and mercury (II) binding. *Biochemistry*, **22**, 4713-4723.
- Brouwer M., Winge D.R. and Gray W.R., 1989.** Structural and functional diversity of copper-metallothioneins from the American Lobster. *J. inorg. Biochem.*, **35**, 289-303.
- Bryan G.W., 1976.** Heavy metal contamination in the sea. In : Marine Pollution, Johnston R., Ed., pp. 185-302, Acad. Press, New York.
- 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.
- Bryan G.W., Potts G.W. and Forster G.R., 1977.** Heavy metals in gastropod mollusc *Haliotis tuberculata* (L.). *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, **57**, 379-390.
- Carmichael N.G., Squibb K.S., Engel D.W. and Fowler B.A., 1980.** Metals in the molluscan kidney : uptake and subcellular distribution of ¹⁰⁹Cd, ⁵⁴Mn and ⁶⁵Zn by the clam, *Mercenaria mercenaria*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **65A**, 203-206.
- Carmichael N.G., Squibb K.S. and Fowler B.A., 1979.** Metals in the molluscan kidney : a comparison of two closely related bivalve species (*Argopecten*), using X-ray microanalysis and atomic absorption spectroscopy. *J. Fish. Res. Board Can.*, **36**, 1149-1155.
- Chao S.H., Suzuki Y., Zysk J.R. and Cheung W.Y., 1984.** Activation of calmodulin by various metal ions as a function of ionic radii. *Mol. Pharmacol.*, **26**, 75-82.
- Chen R.W., Whanger P.D. and Weswig P.H., 1975.** Biological function of metallothioneins from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**, 920-926.
- Chow S.-N., Chien C.-H., Chen Y.-P. and Ouyany P.-C., 1987.** Purification and characterization of metal-binding proteins and the corresponding mRNA from human placentas. *Biol. Res. Pregnancy*, **8**, 65-72.
- Coombs T.L. and George S.G., 1978.** Mechanisms of immobilization and detoxication of metals in marine organisms. In : *Physiology and Behaviour of Marine Organisms*, pp. 179-187. Pergamon Press, Oxford.
- Cossa D. et Lassus P., 1989.** Le cadmium en milieu marin. Biogéochimie et écotoxicologie. *Rapports scientifiques et techniques de l'IFREMER*, **16**, 108 p.
- Cossa D., 1989.** In Cossa D. et Lassus P. (1989).

- Dalla Via G.J., Dallinger R. and Carpené E., 1989.** Effects of cadmium on *Murex trunculus* from the Adriatic sea. II. Oxygen consumption and acclimation effects. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **18**, 562-567.
- Dallinger R., Berger B. and Bauer-Hilty A., 1989a.** Purification of cadmium-binding proteins from related species of terrestrial helicidae (Gastropoda, Mollusca): a comparative study. *Mol. Cell. Biochem.*, **85**, 135-145.
- Dallinger R., Carpené E., Dalla Via G.J. and Cortesi P., 1989b.** Effects of Cadmium on *Murex trunculus* from the Adriatic Sea. I. Accumulation of metal and binding to a metallothionein-like protein. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **18**, 554-561.
- Dallinger R., Janssen H.H., Bauer-Hilty A. and Berger B., 1989c.** Characterization of an inducible cadmium-binding protein from hepatopancreas of metal-exposed slugs (Arionidae, Mollusca). *Comp. Biochem. Physiol.*, **92C**, 355-360.
- Danscher G., 1976.** In Danscher G. (1981).
- Danscher G., 1981.** Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulfide silver method suitable for both light and electronmicroscopy. *Histochemistry.* , **71**, 1-16.
- Davies I.M., Topping G., Graham W.C., Falconer C.R., McIntosh A.D. and Seward D., 1981.** Fields and experimental studies on cadmium in the edible crab *Cancer pagurus*. *Mar. Biol.* , **64**, 291-297.
- Delval C., 1984.** Réactions du flet vis-à-vis des pollutions par les métaux lourds (Cu, Zn, Cd et Pb) sur le littoral de la mer du Nord : détoxification, métallothionéines Thèse 3ème cycle, Univ Lille I. 172 p.
- Demuyneck S., 1988.** Contribution à l'étude de la pollution par les métaux lourds du littoral Nord/Pas-de-Calais. Effets biologiques du cadmium et métalloprotéines complexant le métal chez quatre espèces d'invertébrés benthiques. DEA de Toxicologie de l'Environnement, Univ Lille II. 68 p.
- Demuyneck S., Sautière P., van Beeumen J. et Dhainaut-Courtois N., 1991.** Homologies entre les hémérythrine des sipunculien et une métalloprotéine complexant le cadmium (MP II) d'une annélide polychète, *Nereis diversicolor*. *C. R. Acad. Sci.*, **312**, 317-322.
- Dennaï 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.
- Dennaï 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. Sci.*, **302**, 489-494.
- Depledge M.H. and Rainbow P.S., 1990.** Models of regulation and accumulation of trace metals in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, **97C**, 1-7.
- Dethlefsen V., 1977.** In Cossa D. et Lassus P. (1989).

- Dhainaut A., 1984. Aspects cytophysiologiques des cœlomocytes des Néréidiens (Annélides Polychètes). *Arch. Anat. microsc Morph. exp.*, **73**, 133-150.
- Dhainaut A., Raveillon B., M'Béri M., Porchet-Henneré E. and Demuynck S., 1989. Purification of an antibacterial protein in the cœlomic fluid of *Nereis diversicolor* (Annelida Polychaeta). Similitude with a cadmium-binding protein. *Comp. Biochem. Physiol.*, **94C**, 555-560.
- Dhainaut-Courtois N., Arrouijal F.-Z. et Demuynck S., 1988. Effets biologiques de trois métaux lourds (chrome, nickel et plomb) sur *Nereis diversicolor* (Annélide polychète). *Océanis.*, **14**, 423-433.
- Dhainaut-Courtois N., Demuynck S. et Salzet-Raveillon B., 1991. Mécanismes de détoxification chez les poissons et invertébrés marins. *Océanis.*, **17**, 403-419.
- 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. Sci.*, **305**, 237-241.
- Dohi Y., Ohba K. and 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.
- Donker M.H., Koevoets P., Verkleij J.A.C. and Van Straalen N.M., Metal binding compounds in hepatopancreas and haemolymph of *Porcellio scaber* (isopoda) from contaminated and reference areas. *Comp. Biochem. Physiol.*, **97C**, 119-126.
- Dyrssen D. and Wedborg M., 1973. Equilibrium calculations of the speciation of elements in sea water. In : The Sea, Vol. 5 : Marine Chemistry, pp. 181-195. Goldberg E.D. Ed, Wiley-Interscience, New York.
- Edman P., 1950. In Han K.-K. *et al.* (1985).
- Edman P., 1956. In Han K.-K. *et al.* (1985).
- Eisler R., Zarogian G.E. and Hennekey R.H., 1972. Cadmium uptake by marine organisms. *J. Fish. Res. Board Can.*, **29**, 1367-1369.
- Elinder C.G., Kjellstrom T. and Lind B. 1978. Cadmium concentrations in human liver, blood and bile : a comparison with a metabolic model. *Environ. Res.*, **17**, 236-241.
- Engel D.W. and Fowler B.A., 1979. Factors influencing cadmium accumulation and its toxicity to marine organisms. *Environ. Hlth Perspect.*, **28**, 81-88.
- Engel D.W., Brouwer M. and Thurberg F.P., 1985. Comparison of metal metabolism and metal-binding proteins in the blue crab and the american lobster. *Proc. Symp. on Physiology and pollution of marine organisms.*, Mystic, 1-3 Nov. 1983.
- Evtushenko Z.S., Belcheva N.N. and 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.

- FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 1972. Evaluation of certain food additives and the contaminants mercury, lead and cadmium. *WHO Tech. Rep.*, Ser 505, 20-24, 32.
- Ferrell R.E. and Kitto G.B., 1971. In Klippenstein *et al.* (1976)..
- Flamant P., 1985. Les métaux traces associés aux aérosols atmosphériques : apports au milieu marin du littoral Nord-Pas-de-Calais. Thèse de 3ème cycle. Univ Lille I, 187 p.
- Fowler B.A., Hildebrand C.E., Kojima Y. and Webb M., 1987. Nomenclature of metallothionein. *Experientia*, suppl., 52, 19-22.
- Frankenne F., Noël-Lambot F. and Distèche 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. and Kägi 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., Piscator M., Nordberg G.F. and Kjellstrom T., 1974. Cadmium in the environment. *CRC Press*, Cleveland.
- Fullmer C.S., Edelstein S. and Wasserman R.H., 1985. In Pounds J.G. and Rosen J.F. (1988).
- George S.G. and Pirie B.J.S., 1979. The occurrence of cadmium in sub-cellular particles in the kidney of the marine mussel, *Mytilus edulis*, exposed to cadmium. *Biochim. Biophys. Acta.*, 580, 234-244.
- George S.G., 1983. Heavy metal detoxication in *Mytilus* kidney. An *in vitro* study of Cd- and Zn-binding to isolated tertiary lysosomes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 76C, 59-65.
- George S.G., Carpené E., Coombs T.L., Overnell J. and Youngson A., 1979. Characterization of cadmium-binding proteins from mussels, *Mytilus edulis* (L.), exposed to cadmium. *Biochim. Biophys. Acta.*, 580, 225-233.
- GESAMP (IMO/FAO/UNESCO/WMO/IAEA/UN/UNEP), 1985. Review of potentially harmful substances : Cadmium, Lead and Tin. *Reports and Studies.*, 22, 14 p.
- Glauser S.C., Bello C.T. and Glauser E.M., 1976. Blood cadmium levels in normotensive and untreated hypertensive humans. *Lancet.*, 1, 717-718.
- Gould E., Greig R.A., Rusanowsky D. and Marks B.C., 1985. In Cossa D. et Lassus P. (1989).
- Greig R.A. and Wenzloff D.R., 1978. Metal accumulation and depuration by the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Bull. environ. Contam. Toxicol.*, 20, 499-504.
- Guary J.C. and Négrel R., 1981. Calcium phosphate granules : a trap for transuranics and iron in crab hepatopancreas. *Comp. Biochem. Physiol.*, 68A, 423-427.

- Hacker G.W., Gromelius L., Danscher G., Bernatzky G., Muss W., Adam H. and Thurner J., 1988.** Silver acetate autometallography : an alternative enhancement technique for immunogold-silver staining (IGSS) and silver amplification of gold, silver, mercury and zinc in tissues. *J. Histotechnol.*, **11**, 213-221.
- Haguenoer J.M. et Furon D., 1981.** Toxicologie et hygiène industrielles. Tome 1. Les dérivés minéraux. pp. 213-238. *Edition Technique et documentation.*, Paris.
- Han K.-K., Belaiche D., Moreau O. and Briand G., 1985.** Review Current developments in stepwise edman degradation of peptides and proteins. *Int. J. Biochem.*, **17**, 429-445.
- Haug F.-M.S., 1973.** In Danscher G. (1981).
- Hendrickson W.A. and Ward K.B., 1975.** In Hendrickson W. A. and Ward K. B. (1977).
- Hendrickson W.A. and Ward K.B., 1977.** Pseudosymmetry in the structure of myohemerythrin. *J. biol. Chem.*, **252**, 3012-3018.
- Hendrickson W.A., Sung Co M., Smith J.L., Hodgson K.O. and Klippenstein G.L., 1982.** In Takagi T. and Cox J. A. (1991).
- Hutcheson M.S., 1974.** The effect of temperature and salinity on cadmium uptake by the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Chesapeake Sci.*, **15**, 237-241.
- Jacobs E.E., Jacobs M., Sanadi D.R. and Bradley L.B., 1956.** Uncoupling of oxidative phosphorylation by cadmium ion. *J. biol. Chem.*, **223**, 147-156.
- Jenkins K.D. and Sanders B.M., 1986.** Relationships between free cadmium ion activity in seawater, cadmium accumulation and subcellular distribution, and growth in polychaetes. *Environ. Hlth Perspect.*, **65**, 205-210.
- Jennings J.R. and Rainbow P.S., 1979.** Studies on the uptake of cadmium by the crab *Carcinus maenas* in the laboratory I. Accumulation from seawater and a food source. *Mar. Biol.*, **50**, 131-139.
- Kägi J.H.R. and Kojima Y., 1987.** Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Experientia*, suppl., **52**, 25-61.
- Kägi J.H.R. and Schäffer A., 1988.** Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry.*, **27**, 8509-8515.
- Kay J., Cryer A., Darke B.M., Kille P., Lees W.E., Norey C.G. and Stark J.M., 1991.** Minireview. Naturally occurring and recombinant metallothioneins : structure, immunoreactivity and metal-binding functions. *Int. J. Biochem.*, **23**, 1-5.
- Kench J.E. and Sutherland E.M., 1967.** Tryptophan content of the serum albumin of normal and cadmium poisoned monkeys. *Brit. J. Industr. Med.*, **24**, 326-329.
- Kissling M.M. and Kägi J.H.R., 1977.** Primary structure of human hepatic metallothionein. *FEBS Lett.*, **82**, 247-250.
- Klippenstein G. L., 1972.** In Klippenstein G.L. *et al.* (1976).
- Klippenstein G.L., Cote J.L. and Ludlam S.E., 1976.** The primary structure of myohemerythrin. *Biochem.*, **15**, 1128-1136.

- Köhler K. and Riisgard H.U.**, 1982. Formation of metallothioneins in relation to accumulation of cadmium in the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, **66**, 53-58.
- Laemmlli U.K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage TH. *Nature.*, **227**, 680-685.
- Langston W.J. and Zhou M.**, 1986. Evaluation of the significance of metal-binding proteins in the gastropod *Littorina littorea*. *Mar. Biol.*, **92**, 505-515.
- Lauwerys R.R.**, 1983. Biomedical monitoring of exposure to inorganic and organometallic substances. In "Toxicology and biological monitoring of metals in humans. pp. 51-58. Carson, Ellis, Mc Cann, Lewis Publishers Inc., (1986).
- Lerch K., Ammer D. and Olafson R.W.**, 1982. Crab metallothionein. Primary structures of crab metallothionein 1 and 2. *J. biol. Chem.*, **257**, 2420-2426.
- Loehr J., Lammers P., Brimhall B. and Hermodson M.**, 1978. Amino acid sequence of hemerythrin from *Themiste dyscritum*. *J. biol. Chem.*, **253**, 5726-5731.
- Lucis O.J., Lynk M.E. and Lucis R.**, 1969. Turnover of cadmium¹⁰⁹ in rats. *Arch. environ. Hlth.*, **18**, 307-312.
- Luten J.B., Bouquet W., Burggraaf M.M. and Rus J.**, 1986. Accumulation, elimination and speciation of cadmium and zinc in mussels, *Mytilus edulis* in the natural environment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **37**, 579-586.
- Mac Carter J.A. and Roch M.**, 1983. Hepatic metallothionein and resistance to copper in juvenile Coho Salmon. *Comp. Biochem. Physiol.*, **74C**, 133-137.
- Mac Cormick C.C., Fulmer C.S. and Garvey J.S.**, 1988. Amino acid sequence and comparative antigenicity of chicken metallothionein. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **85**, 309-313.
- Mackay E.A., Overnell J., Dunbar B., Hunziker P.E. Kagi J.H.R. and Fothergill J.E.**, 1990. In Kay *et al.* (1991).
- Magos**, 1974. In Haguenoer J. M. et Furon D. (1981).
- Manwell**, 1964. In Terwilliger *et al.* (1985).
- Margoshes M. and Vallee B.L.**, 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4813-4814.
- Martin L.J.M., Van Wormhoudt A. and Ceccaldi H.J.**, 1977. Zinc-hemocyanin binding in the hemolymph of *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **58A**, 193-195.
- Martoja M. et Martoja R.**, 1984. La bioaccumulation de métaux, processus physiologique normal et conséquence de la pollution. *Courrier du CNRS.*, **54**, 32-37.
- Martoja R., Bouquegneau J.M. and Verthe C.**, 1983. Toxicological effects and storage of cadmium and mercury in an insect *Locusta migratoria* (Orthoptera). *J. Invert. Pathol.*, **42**, 17-32.
- Mason A.Z. and Jenkins K.D.**, 1991. Effects of cadmium bioavailability on the cytoplasmic distribution of cadmium in *Neanthes arenaceodentata*. *Bull. Mar. Sci.*, **48**, 524-529.

- Morgan J.E., Norey C.G., Morgan A.J. and Kay J., 1989. A comparison of the cadmium-binding proteins isolated from the posterior alimentary canal of the earthworms *Dendrodrilus rubidus* and *Lumbricus rubellus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 92C, 15-21.
- Muskett C.J., Roberts L.H. and Page B.J., 1979. Cadmium and lead pollution from secondary metal refinery operations. *Sci. Total Environ.*, 11, 73-87.
- Nejmeddine A., 1987. Effets biologiques du cadmium sur un invertébré marin (*Nereis diversicolor*.) Isolement et caractérisation d'une métalloprotéine intervenant dans les processus de détoxication. Thèse 3ème cycle, Univ Lille I, 111 p.
- Nejmeddine A., 1992. Etude des protéines fixant le cadmium chez deux espèces d'Annélides, *Nereis diversicolor* (Annélide, polychète) et *allolobophora caliginosa* (Annélide, oligochète). Thèse de doctorat d'état, Univ Marrakech, Maroc, 106 p.
- Nejmeddine A., Dhainaut-Courtois N., Baert J.-L., Sautière P., Fournet B. and Boulenguer P., 1988. Purification and characterization of a cadmium-binding protein from *Nereis diversicolor* (Annelida Polychaeta). *Comp. Biochem. Physiol.*, 89C, 321-326.
- Nemer M., Wilkinson D.G., Travaglini E.C., Sternberg E.J. and Butt T.R., 1985. Sea urchin metallothionein sequence : Key to an evolutionary diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 82, 4992-4994.
- Nimmo D.W.R., Lightner D.V. and Bahner L.H., 1977. Effects of cadmium on shrimps, *Panaeus duorarum*, *Palaemonetes pugio* et *Palaemonetes vulgaris*. In : Physiological responses of marine biota to pollutants, pp. 131-183. Vernberg F.J., Calabrese A., Thurberg F.P. and Vernberg W.B. Eds, Acad. Press, New York.
- Noël-Lambot F., Bouquegneau J.M., Frankenne F. and Distèche A., 1980. Cadmium, zinc and copper accumulation in limpets (*Patella vulgata*) from the Bristol Channel with special reference to metallothioneins. *Mar. Ecol. Progr.*, Ser 2, 81-89.
- Nolan C.V. and Duke E.J., 1983. Cadmium accumulation and toxicity in *Mytilus edulis* : involvement of metallothioneins and heavy molecular weight protein. *Aquat. Toxicol.*, 4, 153-163.
- Nordberg G.F., 1971. Effects of acute and chronic cadmium exposure on the testis of mice with special reference to protective effects of metallothionein. *Environ. Physiol.*, 1, 171-177.
- Nordberg G.F., 1972. Cadmium metabolism and toxicity. *Environ. Physiol. Biochem.*, 2, 7-36.
- Nordberg G.F., Piscator M. and Lind B., 1971. Distribution of cadmium among protein fractions of mouse liver. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 29, 456.
- Nordberg M. and Nordberg G.F., 1975. Distribution of metallothionein-bound cadmium and cadmium chloride in mice : preliminary studies. *Environ. Hlth Perspect.*, 12, 103-108.

- Nordberg M. and Nordberg G.F., 1987. *Experientia*. Suppl., 52, 669-675.
- Nriagu J.O., 1980. Production, uses, and properties of cadmium. In : Cadmium in the environment, pp. 35-70, Nriagu J.O. Ed., Wiley-Interscience, New York.
- Ohtake H., Suyemitsu T. and Koga M., 1983. Sea urchin (*Anthocidaris crassispina*) egg zinc-binding protein. *Biochem. J.*, 211, 109-118.
- Overnell J., 1986. Occurrence of cadmium in crabs (*Cancer pagurus*) and the isolation and properties of cadmium metallothionein. *Environ. Hlth Perspect.*, 65, 101-105.
- Pasteels J.J., 1968. Pinocytose et athrocytose par l'épithélium branchial de *Mytilus edulis* L. *Z. Zellforsch.*, 92, 339-352.
- Piscator M., 1964. Cadmium in the kidneys of normal beings and the isolation of metallothionein from liver of rabbits exposed to cadmium. *Nord. Hyg. Tidskr.*, 45, 76-82.
- Poirier L. et Cossa D., 1981. Distribution tissulaire du cadmium chez *Meganyctiphanes norvegica* (Euphausiacée) : état naturel et accumulation expérimentale de formes solubles. *Can. J. Fish. Aq. Sci.*, 38, 1449-1453.
- Porchet-Henneré E., Nejmeddine A., Baert J.-L. and Dhainaut-Courtois N., 1987. Selective immunostaining of type 1 granulocytes of the Polychaete Annelid *Nereis diversicolor* by a monoclonal antibody against a cadmium-binding protein (MP II). *Biol. Cell.*, 60, 259-261.
- Pounds J.G. and Rosen J.F., 1988. Contemporary issues in toxicology. Cellular Ca²⁺ homeostasis and Ca²⁺-mediated processes as critical targets for toxicant action : conceptual and methodological pitfalls. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 94, 331-341.
- Prenant., In Brien P. (1961) *Eléments de zoologie. Notion d'anatomie comparée. Tome II : célomates invertébrés.* Desoer Ed., Liège. 714 p.
- Probst G.S., Bousquet W.G. and Miya T.S., 1977. Kinetics of cadmium-induced hepatic and renal metallothionein synthesis in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 39, 51-60.
- Pulido P., Kägi J.H.R. and Vallee B.L., 1966. Isolation and some properties of human metallothionein. *Biochemistry.*, 5, 1768-1777.
- Ragaini R.C., Ralston H.R. and Roberts N., 1977. Environmental trace metal contamination in Kellogg, Idaho, near a lead smelting complex. *Environ. Sci. Technol.*, 11, 773-781.
- Ray S., 1984. Bioaccumulation of cadmium in marine organisms. *Experientia.*, 40, 14-23.
- Ray S., Mac Leese D.W. and Burrige L.E., 1981. Cadmium in tissues of lobsters captured near a lead smelter. *Mar. Pollut. Bull.*, 12, 383-386.
- Ray S., Mac Leese D.W. and Pezzack D., 1980. Accumulation of cadmium by *Nereis virens*. *Archs. environ. Contam. Toxicol.*, 9, 1-8.
- Rice M.A. and Chien P.K., 1979. Uptake, binding and clearance of divalent cadmium in *Glycera dibranchiata* (Annelida : polychaeta). *Mar. Biol.*, 53, 33-39.

- Robinson N.J. and Jackson P.J., 1986. In Kägi J.H.R. and Schäffer A. (1988).
- Robinson W.E., Morse M.P., Penney B.A., Kakareka J.P. and Meyhoefer E.U., 1985. In Cossa D. et Lassus P. (1989).
- Roels H., Lauwerys R., Buchet J.P., Bernard A., Chettle D.R., Harvey T.C. and Al-Haddad I.K., 1981. *In vivo* measurement of liver and kidney cadmium in workers exposed to this metal. Its significance with respect to cadmium in blood and urine. *Environ. Res.*, 26, 217-240.
- Roesijadi G. and Hall R.E. 1981. Characterization of mercury-binding proteins from the gills of marine mussels exposed to mercury. *Comp. Biochem. Physiol.*, 70C, 59-64.
- Roesijadi G., 1981. The significance of low molecular weight metallothionein-like protein in marine invertebrates : current status. *Mar. Environ. Res.*, 4, 167-179.
- Roesijadi G., Kielland S. and Klerks P., 1989. Purification and properties of novel molluscan metallothioneins. *Archs. Biochem. Biophys.*, 273, 403-413.
- Scholz N., 1980. Accumulation, loss and molecular distribution of cadmium in *Mytilus edulis*. *Helgoländer Wiss. Meeresunters.*, 33, 68-78.
- Septier F., 1989. Etude préliminaire des facteurs conditionnant la bioaccumulation et la toxicité de divers métaux lourds chez quelques invertébrés benthiques du littoral Nord/Pas-de-Calais. DEA de Toxicologie de l'Environnement. Univ Metz, 120 p.
- Septier F., Demuyneck S., Thomas P. et Dhainaut-Courtois N., 1991. Bioconcentration de métaux lourds chez une annélide polychète estuarienne : *Nereis diversicolor*. *Oceanologica Acta.*, sp 11, 263-274.
- Shaikh Z.A. and Smith J.C., 1977. The mechanisms of hepatic and renal metallothionein biosynthesis in cadmium-exposed rats. *Chim. Biol. Inter.*, 19, 161-171.
- Sharma R.P. and Shupe J.L., 1977, Lead, cadmium and arsenic residues in animal tissues in relation to those in their surrounding habitat. *Sci. Total Environ.*, 7, 53-62.
- Sheriff S., Hendrickson W.A. and Smith J.L., 1987. In Zhang J.-H. and Kurtz Jr M. (1991).
- Simkiss K., 1976. Intracellular and extracellular routes in biomineralization. In : Calcium in Biological Systems. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 30, pp. 423-444, University Press, Cambridge.
- Simkiss K., 1977. Biomineralisation and detoxification. *Calcif. Tissue. Res.*, 44, 199-200.
- Simkiss K., 1979. Metal ions in cells. *Endeavor New Series.*, 3, 2-6.
- Slice L.W., Freedman J.H. and Rubin C. S., 1990. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel metallothionein-like protein from *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.*, 265, 256-263.
- Snyder W.S., Cook M.J., Nasset E.S., Karhausen L.R., Howells G.P. and Tipton I.H., 1975. International Commission on Radiological Protection. Report of the task group on reference man, New York, *ICRP publ.*, 23.

- Squibb K.S., Cousins R.J., Silbon B.L. and Levin S., 1976. Liver and intestinal metallothionein : function in acute cadmium toxicity. *Exp. mol. Pathol.*, **25**, 163-171.
- Standley P.R., Mainwaring M.G., Gotoh T. and Vinogradov S.N., 1988. The calcium, copper, and zinc content of some annelid extracellular haemoglobins. *Biochem. J.*, **249**, 915-916.
- Stenkamp R.E. and Jensen L.H., 1981. In Zhang J.-H. and Kurtz Jr M. (1991).
- Stokinger H.E., 1981. In "Toxicology and biological monitoring of metals in humans. pp. 51-58. Carson, Ellis, Mc Cann, Lewis Publishers Inc., (1986).
- Stone H.C. and Overnell J., 1985. Non-metallothionein cadmium binding proteins. *Comp. Biochem. Physiol.*, **80C**, 9-14.
- Suzuki K.T., Yamamura M. and Mori T., 1980. Cadmium-binding proteins induced in the earthworm. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **9**, 415-424.
- Suzuki T., Takagi T., Furukohri T. and Gotoh T., 1983. Separation of constituent polypeptide chains containing heme from extracellular hemoglobin of the polychaete *Perinereis brevicirris* (Grube). *Comp. Biochem. Physiol.*, **75B**, 567-570.
- Suzuki Y. and Yoshikawa H., 1974. Role of metallothionein in the liver and protection against Cd toxicity. *Ind. Hlth.*, **12**, 141-151.
- Takagi T. and Cox J.A., 1991. Primary structure of myohemerythrin from the annelid *Nereis diversicolor*. *FEBS Lett.*, **285**, 25-27.
- Tanaka K. and 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.
- Terwilliger N.B., Terwilliger R.C. and Schabtach E., 1985. Intracellular respiratory proteins of sipuncula, echiura, and annelida. In : Blood cells of marine invertebrates: Experimental systems in Cell. Biology and Comparative Physiology. pp. 193-225. Alan R. Liss, Inc.
- Timm F., 1958. In Danscher G. (1981).
- Toda N., 1973. Influence of cadmium ions on contractile response of isolated aortas to stimulatory agents. *Amer. J. Physiol.*, **225**, 350-355.
- Tsuchiya K., 1978. Cadmium studies in Japan. A review. Kodansha Ltd, Tokyo and Elsevier North Holland Biomed. Press, Amsterdam, New York, Oxford.
- U.S.E.P.A., 1980. Environmental Protection Agency. Ambient water quality criteria for cadmium. In "Toxicology and biological monitoring of metals in humans. pp. 51-58. Carson, Ellis, Mc Cann, Lewis Publishers Inc., (1986).
- Ueda T., Nakamura R. and Suzuki Y., 1976. Comparison of 115m Cd accumulation from sediments and sea water by the polychaete worms. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.*, **42**, 299-306.

- Valberg L.S., Haist J., Cherian M.G., Delaquerriere-Richardson L. and Goyer R., 1977.** Cadmium-induced enteropathy, comparative toxicity of cadmium chloride and cadmium-thionein. *J. Toxicol. Environ. Hlth.*, **2**, 963-975.
- Van Holde and Brénowitz ., 1982.** In Donker *et al.* (1990).
- Vigliani E.C., Pernis B. et Luisa A., 1966.** Etudes biochimiques et immunologiques sur la nature de la protéinurie cadmique. *Med. Lavoro.*, **57**, 321-330.
- Vinogradov S. N., Kapp O. H. and Ohtsuki M., 1982.** The extracellular haemoglobins and chlorocruorins of annelids. *In : Electron Microscopy of Proteins*, Vol 3, pp. 135-164. Harris J.R.. Ed, Academic Press, London.
- Vinogradov S.N., 1985.** Review. The structure of invertebrate extracellular hemoglobins (erythrocrorins and chlorocruorins). *Comp. Biochem. Physiol.*, **82B**, 1-15.
- Waalkes *et al.* 1988.** In Nejmeddine A. (1992).
- Ward K.B., Hendrickson W.A. and Klippenstein G.L., 1975.** In Hendrickson W.A. and Ward K.B.,(1977).
- Webb J., Macey D.J. and Talbot V., 1985.** Identification of ferritin as a major high molecular weight zinc-binding protein in the tropical rock oyster, *Saccostrea cucullata*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **14**, 403-407.
- Webb M., 1972.** Binding of cadmium ions by rat liver and kidney. *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 2751-2765.
- Weser U., Donay F. and Rupp H., 1973.** Cadmium-induced synthesis of hepatic metallothionein in chicken and rats. *FEBS Lett.*, **32**, 171-173.
- Weser U., Rupp H., Donay F., Linnemann F., Voelter W., Voetsch W.W. and Jung G., 1973.** Characterization of Cd, Zn-thionein (metallothionein) isolated from rat and chicken liver. *Eur. J. Biochem.*, **39**, 127-140.
- Yamagushi M. and Yamamoto T., 1976.** Interaction of cadmium, lead and zinc on calcium concentration in femur of rats. *J. Hyg. chim.*, **22**, 190-195.
- Yamamura M., Mori T. and Suzuki K.T., 1981.** Metallothionein induced in the earthworm. *Expérientia.*, **37** 1187-1189.
- Zaroogian G.E., 1979.** Studies on the depuration of cadmium and copper by the American oyster *Crassostrea virginica*. *Bull. environ. Contam. Toxicol.*, **23**, 117-122.
- Zhang J.-H. and Kurtz Jr M., 1991.** Two distinct subunits of hemerythrin from the brachiopod *Lingula reevii* : an apparent requirement for cooperativity in O₂ binding. *Biochem.*, **30**, 9121-9125.



RESUME

Cette thèse a été effectuée dans le laboratoire d'écotoxicologie étudiant les phénomènes physico-chimiques et biologiques qui conditionnent la bioaccumulation de micropolluants dans les chaînes alimentaires. Le modèle choisi est un ver estuarien endobenthique (*Nereis diversicolor*) bien connu pour sa résistance à divers types de pollution et chez lequel la cinétique et les effets du cadmium ont été étudiés par les voies chimique, biochimique, immunologique, cytochimique, radioautographique et de microscopie électronique. Nous avons démontré que le tégument et l'intestin sont à la fois des voies de pénétration et des sites potentiels de piégeage. Le cadmium ayant pu pénétrer dans le ver est complexé, au moins partiellement, à des protéines de la fraction soluble : les métalloprotéines MPI et MPIO (masse moléculaire respectivement > à 70 kDa et # 13,5 kDa). La MPI correspondrait à l'hémoglobine extracellulaire présente dans les vaisseaux sanguins. La MPIO est présente notamment dans des cellules cœlomiques, les granulocytes I, qui la libèrent lors d'un stress. La séquence de cette molécule de 119 acides aminés a été analysée et montre que la molécule appartient à la famille des hémérythrine et myohémérythrine, pigments respiratoires dont la présence est ainsi démontrée dans l'embranchement des Annélides. Les voies de stockage et d'élimination du cadmium (intestin, néphridies) ont également été précisées.

