

N° d'ordre : 2989

THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE

"Sciences du vivant, Géosciences et Sciences de l'Environnement"

par **Véronique MARIE**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : ECOTOXICOLOGIE

**Etude de la réponse des métallothionéines chez les bivalves,
Corbicula fluminea, *Dreissena polymorpha* et *Crassostrea gigas*,
après exposition au cadmium et au zinc
- Approches *in situ* et expérimentales -**

Soutenue le : 22 juin 2005

Après avis de :

Mme J. Garnier-Laplace	Directeur du Laboratoire Radioécologie expérimentale, IRSN/DPRE/SERLAB	Rapporteur
M. D. Cossa	Directeur de recherche, IFREMER (BE/CM)	Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

M. P. Chardy	Professeur, UMR CNRS 5805, Univ. Bordeaux 1	Président
M. D. Moraga	Maître de conférence, UMR CNRS 6539, IUEM, Univ. Bretagne Occidentale	Examineur
M. A. Boudou	Professeur, UMR CNRS 5805, Univ. Bordeaux 1	Examineur
Mlle M. Baudrimont	Maître de conférence, UMR CNRS 5805, Univ. Bordeaux1	Examineur

Je dédie cette thèse à mes parents.

Remerciements

La thèse est une expérience passionnante et marquante. Grâce aux personnes que j'ai côtoyées toutes ces années elle a été agréable, vivante, et attachante. Qu'il s'agisse de science ou d'états d'âme, nous avons beaucoup partagé : joies, traversées du désert, excitation des résultats, petits riens. Je tiens à remercier ici toutes les personnes qui ont accompagné la réalisation de ce travail de recherche mais également tous ceux qui m'ont entourée durant cette période.

Je remercie l'ensemble des membres du jury pour leurs conseils avisés et leurs corrections : Jacqueline Garnier-Laplace (Directrice du Laboratoire de Radioécologie expérimentale de l'Institut de Radioprotection et Sécurité Nucléaire) et Daniel Cossa (Chef du Laboratoire de Biogéochimie des Contaminants Métalliques, IFREMER), Pierre Chardy (Professeur de l'Université Bordeaux 1) et Dario Moraga (Maître de conférence à l'Université de Bretagne Occidentale). Un merci tout particulier à ce dernier pour m'avoir également offert l'opportunité d'explorer l'aspect génétique de mes travaux de recherche dans son laboratoire. Merci pour ce soutien et cette main tendue Dario.

Je souhaite remercier Alain Boudou (Professeur de l'Université Bordeaux 1 et directeur du LEESA) pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et guidée dans la problématique de recherche. Son dynamisme et ses conseils m'ont beaucoup encouragée et permise de progresser. Merci également à Magalie Baudrimont pour m'avoir confiée la réalisation de cette thèse, pour son enthousiasme et sa confiance dans la réalisation de ce rapport final. Toutes ces années à son contact ont contribué à me construire non seulement scientifiquement mais aussi humainement.

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance à Patrice Gonzalez pour sa collaboration précieuse en génétique ainsi que Jean-Paul Bourdineaud et Jean-Charles Massabuau pour le partage de leurs idées et de leurs intuitions.

Un grand merci à Régine Maury-Brachet pour son humeur joyeuse et chacun de ses bons conseils techniques qui font le petit plus. Merci aussi pour cette disponibilité à me soutenir tout au long de ces années. Je pense aussi à son binôme, Agnès Feurtet-Mazel, sa gentillesse et ses conseils éclairés. Merci, également à Henri Bouillard, Véronique Duflo, Pascal Lebleu et Bruno Etcheverria pour leur précieuse assistance sur le terrain comme au laboratoire. Mes pensées vont aussi pour Pierre Ciret et sa gentillesse, Nathalie Mesmer-Dudons, Alexia Legeay, Gilles Durrieu, Cathy Charlot et Florence Daniel pour leur complicité de tous les instants.

Un grand merci à Jean-Pierre Brindamour pour son esprit avisé et son regard paternel posé parfois sur nous, les leesardes.

Laure Corbari, la complice des bons moments et des déboires de toutes ces années : je te remercie Laure pour cette amitié constante et sincère au-delà des murs du laboratoire et pour ton soutien moral inestimable. Merci à Caroline Gold, la grande sœur douée qui a su me sortir la tête hors de l'eau dans les moments un peu flous.

La réalisation de ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien moral et affectif d'êtres chers. Mes derniers remerciements s'adressent donc à ma famille dont mes parents, pour leur appui et leur confiance qui m'ont été si précieux durant toutes ces années universitaires et Xavier, pour sa patience et ses encouragements à l'aboutissement de ce travail.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
--------------------	---

CHAPITRE 1 – ETAT DES CONNAISSANCES	7
--	----------

1-1. CONTAMINATION PAR LES METAUX LOURDS DU SYSTEME HYDROGRAPHIQUE "LOT – GARONNE – GIRONDE"	8
1-1.1 Présentation du continuum "Lot – Garonne – Gironde"	8
1-1.2. Origine et étendue de la pollution métallique	9
A- La source de la pollution : l'Usine "Vieille Montagne" et le Riou-Mort	9
B- Le transport particulaire et le stockage des métaux le long du continuum "Lot / Garonne"	12
C- La remobilisation des métaux dans l'estuaire de la Gironde	14
1-2. LES MECANISMES DE BIOACCUMULATION DES METAUX LOURDS PAR LES ANIMAUX AQUATIQUES	16
1-2.1. Biodisponibilité et transfert des métaux vers les animaux aquatiques	16
A- Notion de spéciation chimique des métaux dans la fraction dissoute de la colonne d'eau	17
B- Les processus de transfert des métaux du milieu extérieur vers le milieu intérieur	18
1-2.2. Mécanismes de transport et de séquestration intracellulaire et/ou tissulaires des métaux chez les organismes aquatiques – Processus d'élimination.....	23
A- La fixation des métaux sur des ligands intracellulaires	24
B-- La séquestration des métaux dans des structures compartimentées	24
C- Mécanismes d'élimination des métaux	27
1-3.- LES METALLOTHIONEINES	28
1-3.1. Structure et caractéristiques biochimiques des métallothionéines	28
1-3.2. Régulation transcriptionnelle de la synthèse des métallothionéines	31
A- Induction à partir des éléments de réponse aux métaux (MREs)	32
B- Activation via USF/ARE	35
C- La transcription des gènes de MTs induite par d'autres composants ou conditions.....	36
1-3.3. Rôles des métallothionéines	37

A- Homéostasie et répartition intracellulaire des métaux essentiels et rôle de protéines chaperones.....	38
B- Rôle de protection et de détoxification vis-à-vis des métaux toxiques ou essentiels.....	42
C- Rôle dans la protection contre le stress oxydant	44

CHAPITRE 2 – BASES METHODOLOGIQUES

46

2-1. INTERET DES BIVALVES DANS L'ETUDE DE LA CONTAMINATION DES SYSTEMES AQUATIQUES PAR LES METAUX LOURDS	47
2-2. MODELES BIOLOGIQUES	49
2-2.1. Systématique et principales caractéristiques écologiques	49
2-2.2. Origine et répartition géographique.....	50
2-2.3. Elément de biologie des bivalves.....	52
A- La coquille	52
B- Le corps mou.....	53
2-2.4. Ecologie de <i>C. fluminea</i> , <i>D. polymorpha</i> et <i>C. gigas</i>	56
A- <i>Corbicula fluminea</i>	56
B- <i>Dreissena polymorpha</i>	57
C- <i>Crassostrea gigas</i>	57
2-3. BASES METHODOLOGIQUES SUR LE TERRAIN ET EN CONDITIONS CONTROLEES DE LABORATOIRE.....	59
2-3.1. Méthodologie d'étude sur le terrain	59
A- La technique de transplantation.....	59
B- La composante biologique et l'échantillonnage	60
2-3.2. Méthodologie d'étude en conditions contrôlées de laboratoire : supports expérimentaux.....	61
A- Structure des systèmes expérimentaux.....	62
B- Régulation des paramètres physico-chimiques.....	65
C- Les plans d'expérience élaborés	65
D- Méthode de contamination des unités expérimentales	65
E- Le prélèvement et la conservation des échantillons biologiques.....	67
2-4. NIVEAUX ET CRITERES D'ANALYSE POUR LES ETUDES MENEES <i>IN SITU</i> ET EN LABORATOIRE.....	68
2-5. TECHNIQUES D'ANALYSE DES METAUX.....	69
2-5.1. Dosage du cadmium.....	69
2-5.2. Dosage du zinc et du cuivre.....	70

2-5.3. Dosage du mercure total	70
--------------------------------------	----

2-6. TECHNIQUES DE QUANTIFICATION DES METALLOTHIONEINES ET DE L'EXPRESSION DE LEURS GENES 72

2-6.1. La quantification des métallothionéines par la méthode de saturation au mercure froid.....	72
---	----

A- Principales méthodes existantes	72
--	----

B- Les techniques de saturation	72
---------------------------------------	----

2-6.2. Approche génétique de l'induction des métallothionéines par RT-PCR quantitative en temps réel.....	77
---	----

A- Purification des ARN totaux.....	78
-------------------------------------	----

B- La réaction de transcription inverse (Reverse transcription)	79
---	----

C- La réaction quantitative de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel.....	79
--	----

CHAPITRE 3 – REPONSE DES METALLOTHIONEINES CHEZ DEUX BIVALVES D'EAU DOUCE, *CORBICULA FLUMINEA* ET *DREISSENA POLYMORPHA* APRES EXPOSITION AU CADMIUM ET AU ZINC - ETUDES IN SITU ET EN LABORATOIRE

82

3-1. ANALYSE COMPARATIVE DU POTENTIEL DE REPONSE DES METALLOTHIONEINES CHEZ *Corbicula fluminea* ET *Dreissena polymorpha* APRES TRANSPLANTATION LE LONG D'UN GRADIENT POLYMETALLIQUE (SITE-ATELIER LOT) 84

3-1.1. Etude à l'échelle de l'organisme entier.....	86
---	----

Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (Corbicula fluminea and Dreissena polymorpha) transplanted along a polymetallic gradient ⁽¹⁾

3-1.2 Analyse de la bioaccumulation du cadmium et du zinc à l'échelle des tissus. Comparaison entre <i>D. polymorpha</i> et <i>C. fluminea</i>	100
--	-----

A- Bioaccumulation du cadmium.....	101
------------------------------------	-----

B- Bioaccumulation du zinc	102
----------------------------------	-----

C- Conclusion	103
---------------------	-----

3-2. CARACTERISATION DE LA REPONSE DES METALLOTHIONEINES CHEZ *Corbicula fluminea* ET *Dreissena polymorpha* APRES EXPOSITION AU CADMIUM ET/OU AU ZINC - ETUDE EXPERIMENTALE 104

Metallothionein response to cadmium and zinc exposures compared in two freshwater bivalves, Dreissena polymorpha and Corbicula fluminea ⁽²⁾..... 105

⁽¹⁾ Article accepté pour publication dans *Chemosphere*

⁽²⁾ Article accepté pour publication dans *Biomaterials*

3-3. SYNTHÈSE DES ÉTUDES MENEES EN EAU DOUCE SUR <i>Corbicula fluminea</i> ET <i>Dreissena polymorpha</i>.....	121
---	------------

CHAPITRE 4 – REPONSE DES METALLOTHIONEINES CHEZ UN BIVALVE MARIN, L’HUITRE CREUSE <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> - ETUDE IN SITU ET EN LABORATOIRE

124

4-1. CARACTERISATION DE LA CONTAMINATION DES HUITRES AU NIVEAU DE L’ESTUAIRE DE LA GIRONDE	127
4-1.1. Introduction.....	127
4-1.2. Bases méthodologiques.....	128
A- Première campagne de transplantation - Etude de la bioaccumulation des métaux dans des huîtres adultes transplantées dans l’estuaire de la Gironde et dans le Bassin d’Arcachon : (Programme Liteau, 2002).....	128
B- Deuxième campagne de transplantation - Etude comparative de la bioaccumulation des métaux dans des huîtres juvéniles dans l’estuaire de la Gironde et dans les marais adjacents du Nord Médoc (Programme GIS-ECOBAG, 2002a et b)	130
C- Critères et niveaux d’analyse	131
4-1.3. Résultats des campagnes de transplantation	132
A- Première campagne : Huîtres adultes transplantées dans l’estuaire de la Gironde et dans le Bassin d’Arcachon.....	132
B- Etude comparative de la bioaccumulation des métaux dans des huîtres juvéniles transplantées dans l’estuaire de la Gironde et dans les marais adjacents du Nord Médoc	136
4-1.4. Discussion	140
4-2. ANALYSE COMPARATIVE <i>IN SITU</i> DU POTENTIEL DE REPONSE DES METALLOTHIONEINES CHEZ DES HUITRES DIPLOÏDES ET TRIPLOÏDES <i>Crassostrea gigas</i> - ETUDE DE TRANSPLANTATION DANS UN MARAIS DU NORD MEDOC.....	144
<i>Comparative analysis of seasonal variations in metallothionein concentrations in triploid and diploid Pacific oysters, <i>Crassostrea gigas</i>, under field metal exposure</i> ⁽³⁾	148
4-3. CARACTERISATION DE LA REPONSE DES METALLOTHIONEINES CHEZ LES HUITRES JUVENILES TRIPLOÏDES ET DIPLOÏDES <i>Crassostrea gigas</i> APRES EXPOSITION AU CADMIUM ET/OU AU ZINC - ETUDE EXPERIMENTALE	166
<i>Metallothionein gene expression and protein levels in triploid and diploid oysters <i>Crassostrea gigas</i> after exposure to cadmium and zinc</i> ⁽⁴⁾	168

⁽³⁾ Article soumis pour publication à *Marine Environmental Research*

⁽⁴⁾ Article accepté pour publication dans *Environmental Toxicology and Chemistry*

4-4. SYNTHÈSE DES ÉTUDES EN MILIEU ESTUARIEN SUR L'HUITRE <i>Crassostrea gigas</i> – ANALYSE COMPARATIVE DIPLOÏDES ET TRIPLOÏDES	177
---	-----

CHAPITRE 5 – CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE	180
--	------------

5-1. CONCLUSION	181
-----------------------	-----

5-2. PERSPECTIVES DE RECHERCHE	184
--------------------------------------	-----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	186
------------------------------------	------------

ANNEXES	202
----------------	------------

ANNEXE 1 : Composition partielle du sel de mer Instant Ocean® (Aquarium Systems, Mentor, OH, USA) pour la confection d'eau de mer synthétique.

ANNEXE 2 : Composition du "milieu Dauta" pour la culture des algues *Scenedesmus subspicatus*.

ANNEXE 3 : Composition du milieu "f/2" pour la culture des algues *Isochrysis galbana*.

ANNEXE 4 : Protocole de préparation de l'hémolysat de sang frais de rat ou de porc pour le dosage des métallothionéines par la méthode de saturation au mercure froid.

ANNEXE 5 : Baudrimont M, Schafer J, Marie V, Maury-Brachet R, Bossy C, Boudou A and Blanc G (2005). Geochemical survey and metal bioaccumulation of three bivalve species (*Crassostrea gigas*, *Cerastoderma edule* and *Ruditapes philippinarum*) in the Nord Medoc salt marshes (Gironde estuary, France). *Sci. Total Envir.*, 337, 265-280.

ANNEXE 6 : Achard-Joris M, Gonzalez P, Marie V, Baudrimont M, Bourdineaud JP. Cytochrome c oxydase subunit I gene is up-regulated by cadmium in freshwater and marine bivalves. (accepté pour publication dans *Biometals*)

LISTE DES ABREVIATIONS DANS LE TEXTE :

^{203}Hg : Isotope radioactif 203 du mercure
2n : 2 jeux de chromosomes (diploïde)
3n : 3 jeux de chromosomes (triploïde)
ADN : Acide déoxyribonucléique
ADNc : Acide déoxyribonucléique complémentaire
Ag : Argent
ARE : "Antioxydant Response Element"
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ATP : Adénine triphosphate
Bi : Bismuth
BI : Bouillac I
BII : Bouillac II
BLM : "Biomolecular Lipid Membrane"
BP : Boisse-Penchot
Ca : Calcium
CB : Cytochalasine
Cd : Cadmium
CE : Communauté Européenne
CEMAGREF : Institut de recherche pour l'ingénierie de l'agriculture et de l'environnement
CH₃- : Groupement méthyl
CNC : Comité National de la Conchyculture
CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
Co : Cobalt
COD : Carbone organique dissous
Cu : Cuivre
Cys : Cystéine
DGO : Département de Géologie et d'Océanographie
DIREN : Direction régionale de l'environnement
DMAP : Diméthylaminopurine
EPA : "Environmental Pollution Agency"
ESM ou SEM : Erreur standard à la moyenne
Fe : Fer
FIAM : Free Ion Activity Model
 γGCS : Gamma-glutamulcystéine synthétase
GRE : "Glucocorticoid Regulatory Element"
GSH : Glutathion réduit
GSSG : Glutathion disulfure
H₂O₂ : Péroxyde d'hydrogène
Hb : Hémoglobine
HCl : Acide chlorhydrique
Hg : Mercure
Hg⁰ : Mercure élémentaire
His : Histidine
HNO₃ : Acide nitrique
IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

INRS-ETE : Institut National de la Recherche Scientifique 'Eau Terre Environnement' –
Université du Québec

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

Kow : Coefficient de partage octanol / eau

LEESA : Laboratoire d'Ecotoxicologie et Ecophysiologie des Systèmes Aquatiques

M²⁺ : Métal divalent sous sa forme d'ion libre

MES : Matière en suspension

Mg : Magnésium

MI : Forme inorganique du métal M monovalent

MII : Forme inorganique du métal M divalent

MRE : "Metal Responsive Element"

mt : Gène codant pour les métallothionéines

MTF-1 : "Metal Transcription Factor-1"

mtf1 : Gène codant pour "Metal Transcription Factor-1"

MTs : Métallothionéines

NFI : Facteur nucléaire I

Ni : Nickel

O²⁻ : Anion superoxyde

O₂ : Dioxygène

OH· : Radical hydroxyle

part. : particulaire

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

Pd : Palladium

pds : Poids

pf : Poids frais

PI3K : Phosphoinositol- 3 kinase

PKC : Protéine kinase C

ps : Poids sec

REMI : Réseau de contrôle Microbiologique d'IFREMER

RM : Riou-Mort

RNO : Réseau National d'Observation d'IFREMER

ROS : "Reactive Oxygen Species"

SAA : Spectrophotométrie d'Absorption Atomique

Se : Sélénium

SH : Groupement thiol

SnCl₂ : Chlorure stanneux

SOD : Super-Oxyde Dismutase

SOMLIT : Service d'Observation en Milieu Littoral

T : Thionéine

TCA : Acide trichloracétique

TGM : Traceurs Géochimiques et Minéralogiques

USF : "Upstream Stimulatory Factor"

Zn : Zinc

ZnT1 : Transporteur membranaire 1 du zinc

INTRODUCTION

Avec l'essor industriel, agricole et urbain des pays développés, les polluants issus des activités anthropiques exercent une pression croissante sur l'environnement, et notamment sur les écosystèmes aquatiques. Face à la multiplication des cas de pollution et la nécessité d'évaluer les influences néfastes engendrées, de nombreuses études ont été développées afin d'estimer l'ampleur des atteintes structurales et fonctionnelles. Concernant l'évaluation des impacts des contaminants sur la composante biocénotique aquatique, les études, menées le plus souvent en étroite complémentarité avec des approches géochimiques, ont permis de mettre en évidence des modifications biochimiques, physiologiques et comportementales, mais aussi des mécanismes de résistance et de protection développés par les organismes, leur permettant de se maintenir dans leur habitat. Plusieurs de ces mécanismes, activés à différents niveaux d'intégration biologique et induits plus ou moins spécifiquement en réponse à certains polluants, ont été retenus comme biomarqueurs d'exposition ou/et d'effet, et rapidement intégrés dans les programmes de surveillance de la qualité des écosystèmes aquatiques (NRCC, 1985 ; IFREMER, 1994 ; Godefroy et al., 1996). Toutefois, les connaissances sur les mécanismes mis en jeu et sur les relations entre les conditions d'exposition des organismes *in situ*, les réponses de type "biomarqueurs" et les atteintes toxicologiques, sont très inégales, selon l'espèce considérée et les grandes familles de contaminants incriminées (métaux, polluants organiques).

Parmi les contaminants métalliques, le cadmium (Cd – 64^{ème} rang d'abondance dans la croûte terrestre) constitue un polluant "majeur" des systèmes aquatiques. Dans le sud-ouest de la France, il est à l'origine, avec le zinc (Zn – 24^{ème} rang d'abondance dans la croûte terrestre), d'une contamination importante au niveau du *continuum* hydrographique "Lot / Garonne / Gironde". Cette pollution métallique a été mise en évidence à la fin des années 70, dans le cadre de la surveillance de la qualité du milieu littoral français par le "Réseau National d'Observation" (RNO, IFREMER – Boutier, 1981). Ce suivi, au niveau de trois stations RNO situées sur la zone aval de l'estuaire de la Gironde (La Fosse, Pontailac et Bonne Anse –

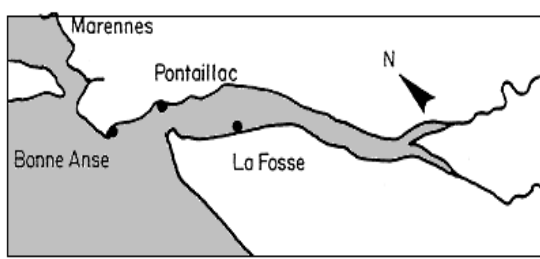
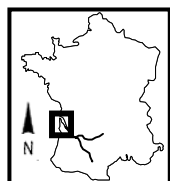
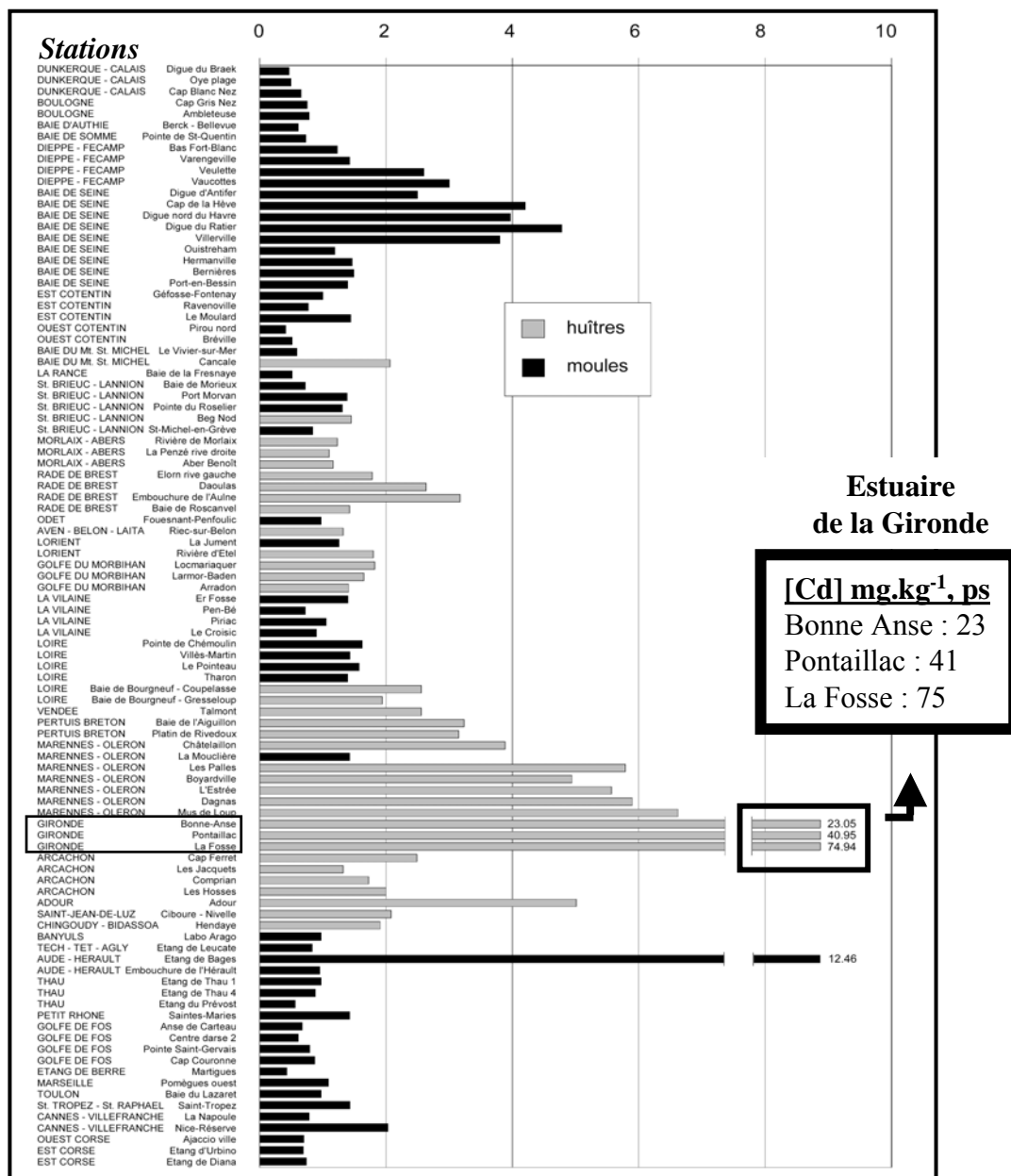


Figure 1 : Concentrations moyennes en cadmium (mg.kg⁻¹, poids sec) mesurées entre 1979 et 1993 dans les huîtres et les moules (corps mou entier) collectées tous les trois mois au niveau de l'ensemble des stations côtières de France, notamment l'estuaire de la Gironde (données RNO ; IFREMER 1995).

Figure 1) a révélé un problème aigu de contamination des huîtres "sauvages", se traduisant par des concentrations de Cd extrêmement élevées dans les tissus mous. Les valeurs maximales dépassaient ponctuellement les $100 \mu\text{g Cd.g}^{-1}$ de poids sec (ps), alors que le niveau moyen dans les huîtres des autres stations côtières françaises était proche de $2 \mu\text{g Cd.g}^{-1}$, ps (Boutier *et al.*, 1989). Ces valeurs étaient très largement supérieures à la norme française pour la consommation humaine, fixée, à cette époque, à $10 \mu\text{g Cd.g}^{-1}$ (ps). Ce constat a eu un impact économique important, conduisant depuis 1996 au classement des eaux de l'estuaire de la Gironde en zone "D", avec interdiction de reparcage, purification et ramassage des coquillages (huîtres, coques, palourdes, ...). Depuis les premières mesures RNO effectuées en 1979, une tendance à la diminution progressive des concentrations mesurées dans les huîtres est observée, mais les valeurs moyennes demeurent encore élevées, autour de $40 \mu\text{g Cd.g}^{-1}$ (ps) à la Station de La Fosse en 2001 ($\sim 1 \mu\text{g Cd.g}^{-1}$ ps pour les huîtres dans le Bassin d'Arcachon – IFREMER, 2002) alors que la norme européenne de consommation a baissé d'un facteur 2 en 2001 ($5 \mu\text{g Cd.g}^{-1}$, ps - CE N°466/2001).

La source principale de cadmium dans cet estuaire a été identifiée grâce à différentes campagnes de collecte et d'analyse de sédiments au niveau des bassins versants de la Dordogne et de la Garonne (Latouche, 1988 ; Boutier *et al.*, 1989). Il s'agit de rejets miniers associés à l'activité minière de la région de Decazeville-Viviez (département de l'Aveyron), situés à plus de 400 km en amont de l'estuaire, sur un petit affluent de la rivière Lot, le Riou-Mort (**Figure 2**) (Bourg, 1992 ; Jouanneau *et al.*, 1993 ; Lapaquellerie *et al.*, 1995). Cette pollution provient des crassiers de l'usine "Vieille Montagne", appartenant actuellement au groupe Umicore : les activités de retraitement du minerai de zinc ont conduit pendant plus d'un siècle à la contamination polymétallique du réseau fluvial, le long du *continuum* "Riou-Mort / Lot / Garonne / Gironde", mais également de la zone côtière au Nord de l'estuaire, au niveau de laquelle se trouve le premier bassin ostréicole d'Europe, le Bassin de Marennes-Oléron.

D'un point de vue écotoxicologique, les atteintes structurales et fonctionnelles engendrées par les métaux lourds sur la composante biologique des hydrosystèmes et sur les différents niveaux d'intégration qui la composent, sont la résultante de mécanismes complexes et fortement interactifs. Le devenir des métaux au sein des biotopes aquatiques résulte des réactions de complexation avec les ligands inorganiques et organiques présents dans les phases dissoute et particulaire de la colonne d'eau et des sédiments. Ces réactions de

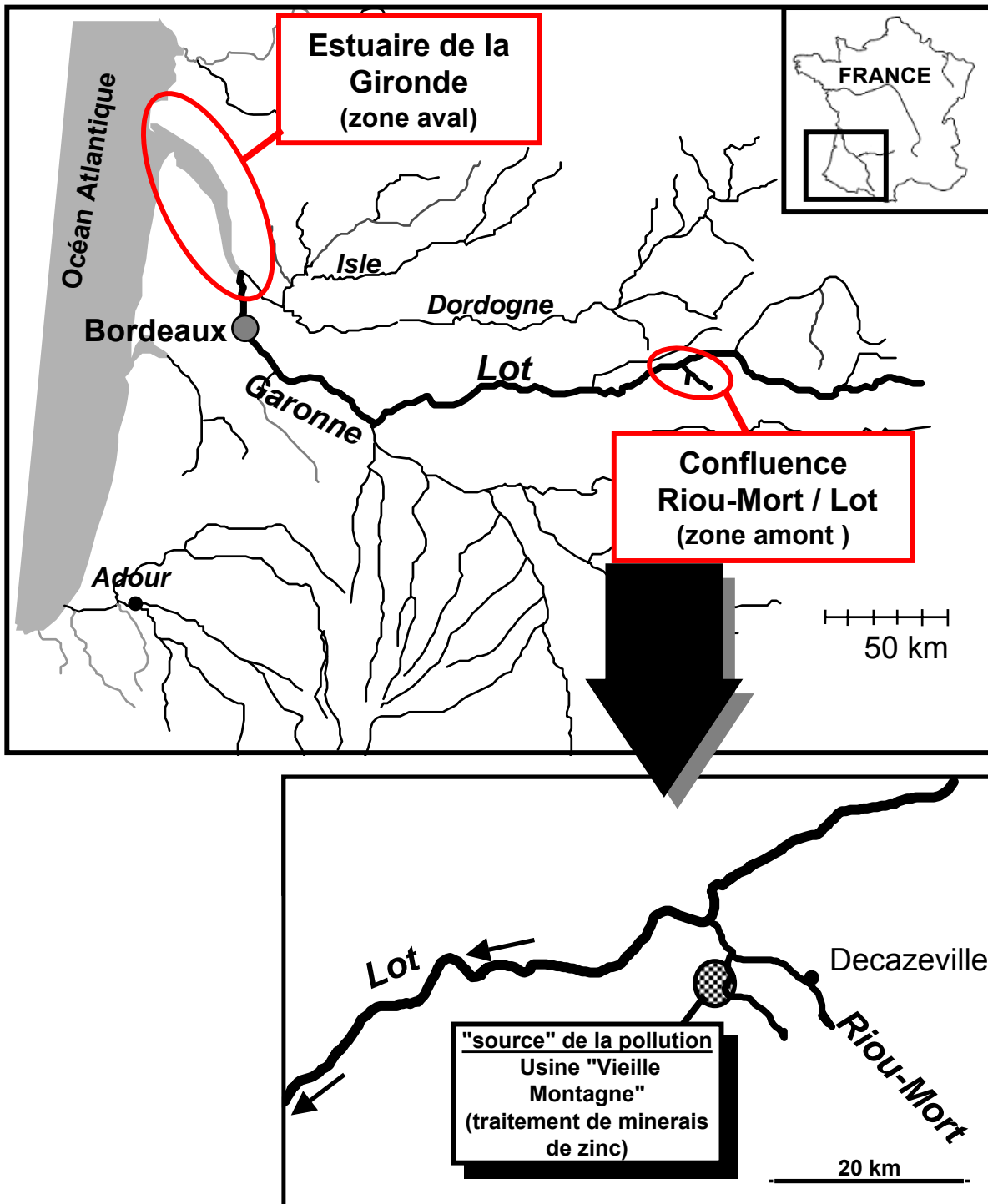


Figure 2 : Situation géographique du *continuum* fluvio-estuarien "Lot / Garonne / estuaire de la Gironde" et de la source de pollution dans le sud-ouest de la France.

Les encadrés rouges indiquent les deux zones d'étude pour nos recherches.

spéciation chimique conditionnent en grande partie leur biodisponibilité. Les concentrations de Cd et Zn dans la colonne d'eau sont importantes dans la zone amont, à proximité de la source de pollution ($[Cd]_{\text{dissous}}$ du Riou-Mort sont 2000 fois plus fortes que la moyenne mondiale de Martin et Windom (1990) - Audry *et al.*, 2004a), et diminuent rapidement à la faveur d'un transport principalement sous forme particulaire (taille $> 0,45 \mu\text{m}$) et de dépôts au niveau des nombreux barrages et retenues sur la rivière Lot. Dans l'estuaire de la Gironde, sous l'influence des gradients physico-chimiques, notamment de salinité, la remobilisation des métaux induit un accroissement des concentrations dans la fraction dissoute. Il faut également mentionner que dans la zone estuarienne, le cuivre (Cu) est également, les apports se faisant principalement à partir des bassins versants de la Dordogne et de la Garonne, fortement influencés par la culture de la vigne et les traitements phytosanitaires associés (traitements fongicides : "bouillie bordelaise"). Ainsi, dans la zone aval du *continuum* fluvio-estuarien, plusieurs métaux présentent une importante biodisponibilité à l'égard des organismes aquatiques et en particulier des bivalves filtreurs, qui, par leur activité de ventilation, établissent des relations étroites avec la colonne d'eau à des fins respiratoire et nutritionnelle (régime microphagique). Ces caractéristiques physiologiques, le plus souvent couplées à une bonne capacité de résistance à la toxicité des éléments métalliques, conduisent à de très fortes capacités de bioaccumulation des métaux dans leur corps mou ; ils sont ainsi utilisés comme espèces bioindicatrices de la présence et de la biodisponibilité des contaminants (ex. des huîtres du RNO mentionné précédemment).

Nos recherches, menées dans le contexte de la pollution polymétallique du *continuum* fluvio-estuarien "Lot / Garonne / Gironde", ont été orientées vers l'étude des relations entre les capacités de bioaccumulation des métaux par les bivalves et les réactions adaptatives qui peuvent en résulter, *via* la production de métallothionéines, un mécanisme de séquestration et de détoxification à l'échelle cellulaire et tissulaire. Deux métaux, le cadmium (métal toxique) et le zinc (métal essentiel) ont été particulièrement étudiés ainsi que les effets résultant de leur présence simultanée dans les milieux aquatiques. Les études ont été conduites au niveau des zones amont (Riou-Mort / Lot) et aval (estuaire de la Gironde) du *continuum* hydrographique.

Trois espèces de bivalves largement répandues dans les écosystèmes aquatiques considérés ont été retenues : en eau douce, *Corbicula fluminea* et *Dreissena polymorpha*, qui occupent deux niches écologiques complémentaires, à l'interface eau / sédiment et dans la colonne d'eau, respectivement ; en eau saumâtre, *Crassostrea gigas*, l'huître creuse, qui présente un intérêt écologique et économique majeur. De plus, le développement récent de la

culture d'huîtres triploïdes en France nous a conduit à analyser les modifications induites par la présence d'un jeu de chromosomes supplémentaire sur les processus écotoxicologiques développés en réponse aux contaminations par les métaux lourds.

Plusieurs processus d'adaptation ou de défense peuvent être activés chez les bivalves en réponse à la contamination par les éléments métalliques. Parmi eux, les métallothionéines (MTs), protéines de faible poids moléculaire et ubiquistes dans le règne animal, possèdent de fortes potentialités de fixation, basées sur les propriétés thiolooprives des métaux (forte affinité pour les groupements thiols – SH). Leur biosynthèse est inductible en réponse aux métaux essentiels (zinc et cuivre), dans un rôle premier de régulation homéostatique, et à la bioaccumulation des métaux toxiques (cadmium, argent, mercure, ...), limitant ainsi les atteintes toxicologiques (Roesijadi, 1992). D'autres facteurs (stress oxydant, réponse immunitaire, hormones, interféron, agents cytotoxiques, conditions de stress, ...) sont également impliqués dans la régulation de la transcription des gènes des MTs (Vallee, 1995 ; Nordberg, 1998 ; Andrews, 2000).

Nous avons analysé la réponse des MTs à l'égard des contaminations métalliques par deux approches complémentaires : d'une part, la quantification de la concentration des protéines présentes dans la fraction soluble, à l'échelle du corps mou entier des bivalves ou des principaux organes ; d'autre part, l'étude de l'expression des gènes codant pour leur biosynthèse. L'approche génétique a été menée chez les deux espèces pour lesquelles les séquences des gènes *mt* ou de l'ADN complémentaire (ADNc) sont disponibles : *D. polymorpha*, une séquence d'ADNc ayant été clonée (Engelken et Hildebrandt, 1999) ; *C. gigas*, deux gènes et un ADNc étant actuellement connus (Tanguy et Moraga, 2001 ; Tanguy *et al.*, 2001).

Notre approche a reposé sur un couplage systématique entre des études de terrain et des études expérimentales, à l'échelle du laboratoire. Les études *in situ* ont été réalisées à partir de populations transplantées sur les différents sites dans les zones amont et aval du *continuum* ; les études expérimentales ont permis de quantifier les rôles directs et indirects de plusieurs facteurs écotoxicologiques et notamment d'appréhender, pour chacun des bivalves, la bioaccumulation et la réponse spécifique des MTs au Cd et au Zn, à partir de contaminations réalisées isolément ou en mélange. Le **Tableau 1** résume les objectifs recherchés et la technique utilisée pour chaque étude menée.

MILIEU DULCICICOLE		MILIEU ESTUARIEN		
<i>Espèces</i>	<i>Crassostrea gigas</i>			
<i>Etude</i>	<i>In situ</i>	<i>In situ</i>	<i>En laboratoire</i>	
Objectifs	<p>évaluer comparativement le potentiel de bioaccumulation du Cd et du Zn et de réponse associée des MTs dans le gradient polymétallique "amont".</p>	<p>caractériser la bioaccumulation du Cd, du Zn et Cu dans la zone aval de la pollution et l'influence de plusieurs facteurs (âge, saison, cycle de reproduction) + valider la technique de transplantation à long terme dans les marais adjacents à l'estuaire</p>	<p>étudier l'influence d'un troisième jeu de chromosomes et du cycle de reproduction sur les capacités (i) de bioaccumulation du Cd, du Zn et Cu et (ii) de production des MTs d'huîtres adultes dans la zone aval de la pollution</p>	<p>caractériser, chez des huîtres juvéniles, l'influence d'un troisième jeu de chromosomes sur la réponse protéique des MTs et l'expression différentielle de leurs gènes (<i>CgMT1</i>, <i>CgMT2</i> et <i>CgMT3</i>) après contamination par le Cd et/ou le Zn</p>
Technique	<p>transplantation à la confluence Riou-Mort / Lot (4 stations d'étude sur le gradient)</p>	<p>2 études⁽¹⁾ de transplantation d'huîtres - adultes dans l'estuaire de la Gironde / Bassin d'Arcachon - juvéniles dans l'estuaire de la Gironde / bassins aquacoles (marais) adjacents</p>	<p>transplantation d'huîtres adultes diploïdes et triploïdes dans les bassins aquacoles (marais) adjacents à l'estuaire de la Gironde</p>	<p>exposition seule et combinée au Cd et au Zn d'huîtres juvéniles diploïdes et triploïdes (pression de contamination proche de celle du Riou-Mort)</p>

⁽¹⁾ Résultats intégrés dans les Programmes de recherche :

- Programme LITEAU Gironde, 2002

- Programme G.I.S.-ECOBAG (Groupement d'Intérêt Scientifique Ecologie et Economie du Bassin Adour-Garonne) / Agence de l'eau Adour Garonne, 2002a et b.

Tableau 1 : Résumé des objectifs recherchés et des techniques utilisées pour les différentes études *in situ* et en laboratoire menées en milieu dulcicicole et estuarien.

La première partie de ce mémoire sera consacrée à une présentation du système fluvio-estuarien "Lot / Garonne / Gironde" et de la pollution métallique qui le caractérise. Un état des connaissances sera fait sur les concepts de base relatifs à la bioaccumulation des métaux par les organismes aquatiques et aux mécanismes de séquestration mis en place aux niveaux tissulaire et cellulaire. Une synthèse bibliographique sera plus particulièrement développée sur les métallothionéines, afin de préciser leurs caractéristiques physico-chimiques et leurs propriétés à l'égard des métaux, les mécanismes d'induction transcriptionnelle de leurs gènes et leurs rôles physiologiques et toxicologiques.

La deuxième partie présentera les trois modèles biologiques utilisés (répartition géographique, anatomie, physiologie et écologie) et les différentes bases méthodologiques mises en oeuvre pour les études menées sur le terrain et en laboratoire.

La troisième partie développera les approches développées sur la zone amont du système hydrographique, visant à analyser conjointement les processus de bioaccumulation du Cd et du Zn et la réponse des MTs chez les deux espèces de bivalves d'eau douce *C. fluminea* et *D. polymorpha*. Les études réalisées au niveau de ce gradient de pollution "amont" ont reposé sur la technique de transplantation de populations au niveau de différents sites localisés à proximité de la confluence Riou-Mort / Lot. Nous présenterons également les recherches conduites en conditions contrôlées de laboratoire, qui nous ont permis de caractériser la réponse protéique spécifique des MTs en réponse à une contamination par le cadmium et/ou par le zinc pour les deux espèces de bivalves d'eau douce, avec en plus, pour *D. polymorpha*, l'étude de l'expression du gène *DpMT*.

Au terme de ces travaux de recherche menés en milieu dulçaquicole, une synthèse de la réponse des MTs à l'égard de la bioaccumulation du cadmium et du zinc pour chacun des deux modèles biologiques sera développée à partir de la confrontation des résultats obtenus *in situ* et en laboratoire.

La quatrième partie abordera les deux approches que nous avons menées sur le terrain et au laboratoire avec l'huître creuse *C. gigas*. Pour ce modèle biologique, l'influence de plusieurs facteurs sur la bioaccumulation et la réponse associée des MTs ont été étudiés.

Dans un premier temps, *in situ*, dans la zone aval de l'estuaire de la Gironde, deux études préliminaires nous ont permis d'établir, en fonction de l'âge des individus (adultes et juvéniles) et de la saison, les potentialités et les cinétiques de bioaccumulation de trois métaux

- Cd, Zn et Cu – au cours de transplantations sur la rive sud de l'estuaire et dans des bassins aquacoles adjacents ("Marais du Nord Médoc"). Ces études ont été dirigées par deux programmes de recherche (Programme Liteau, 2002 ; Programme G.I.S.-ECOBAG, 2002a et b).

Une troisième étude a ensuite été réalisée à partir de la transplantation de populations d'huîtres adultes diploïdes (2n) et triploïdes (3n), visant à analyser comparativement l'influence d'un troisième jeu de chromosomes sur les capacités de bioaccumulation des métaux et de production des MTs. Les individus triploïdes, pour lesquels les phénomènes de reproduction sont en grande partie inhibés comparativement aux huîtres diploïdes, ont notamment servi de "témoins négatifs" pour le cycle de reproduction.

Enfin, la réponse des MTs face à la bioaccumulation combinée ou non du Cd et du Zn pour les deux statuts de ploïdie de *C. gigas* (2n et 3n) a été analysée de manière plus approfondie, lors d'une étude expérimentale menée sur des huîtres juvéniles, affranchies du cycle de reproduction, à partir d'une quantification de la bioaccumulation des métaux (Cd et Zn), de la réponse protéique des MTs et, conjointement, de l'expression différentielle des gènes (*CgMT1*, *CgMT2* et *CgMT3*).

La cinquième partie du mémoire sera consacrée à une conclusion générale des principaux résultats issus de l'ensemble de nos recherches. Nous aborderons également dans cette partie les perspectives de recherche qui se dégagent de notre travail.

CHAPITRE 1

ETAT DES CONNAISSANCES

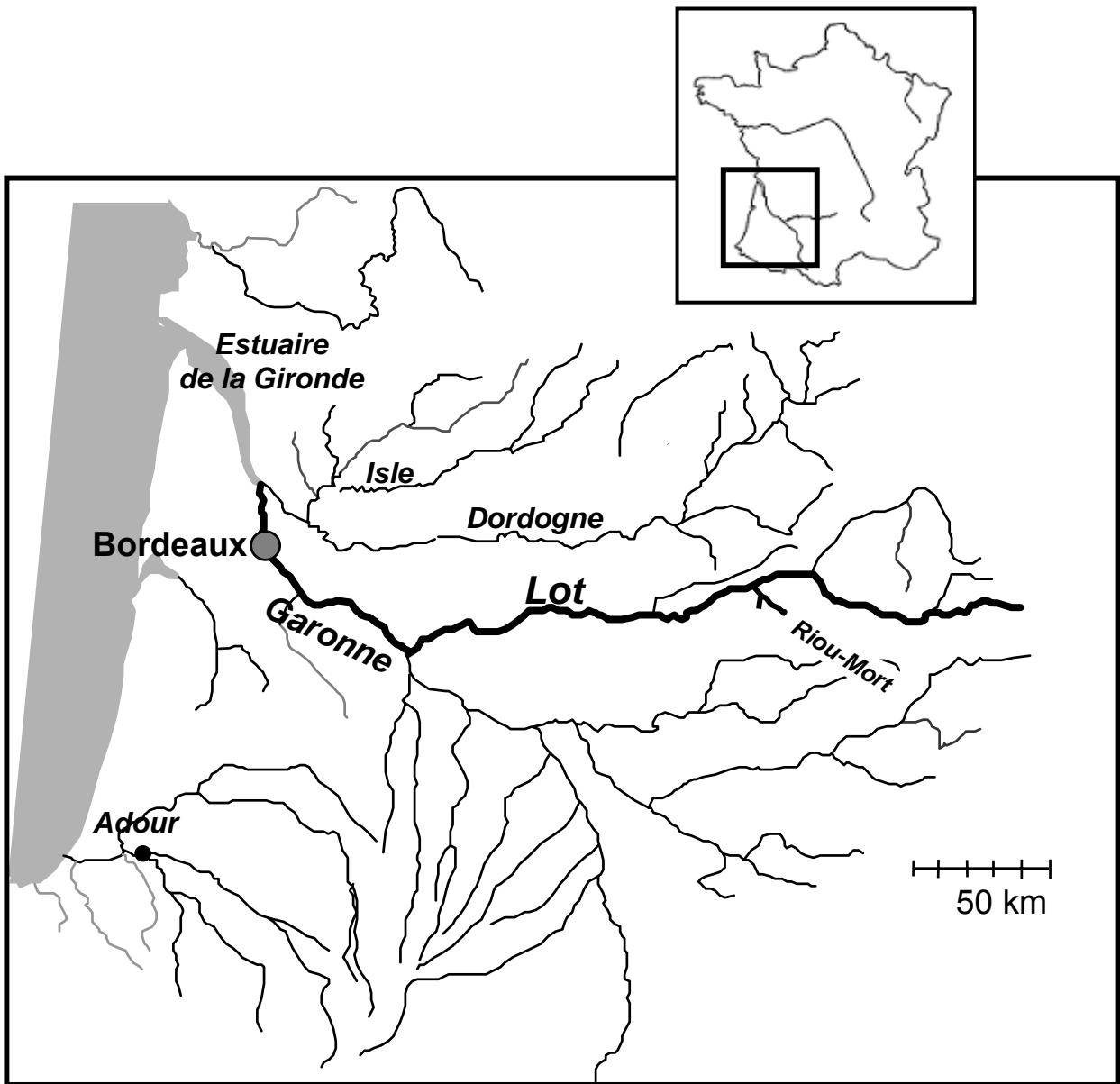


Figure 3 : Le *continuum* fluvio-estuarien "Lot / Garonne / estuaire de la Gironde", situation géographique.

1-1. CONTAMINATION PAR LES METAUX LOURDS DU SYSTEME HYDROGRAPHIQUE "LOT – GARONNE – GIRONDE"

La région Aquitaine se situe à l'aval de quatre bassins hydrographiques importants : le Lot, la Dordogne, la Garonne et l'Adour (**Figure 3**). La qualité chimique des principales rivières est étroitement liée aux apports en provenance des zones situées en amont, *via* les processus naturels mais surtout les rejets directs et indirects liés aux activités anthropiques (agriculture, industries, zones urbaines), sur un vaste bassin versant d'environ 70 000 km². Le *continuum* fluvio-estuarien d'intérêt pour nos recherches est le système hydrographique " Lot / Garonne / Gironde ".

1-1.1 PRESENTATION DU CONTINUUM "LOT – GARONNE – GIRONDE"

La principale source des apports métalliques dans le Lot et le système hydrographique provient d'un petit affluent se trouvant dans la partie médiane du Lot, le Riou-Mort (**Figure 3**). Il draine un bassin versant d'environ 180 km² et se caractérise par un régime torrentiel, avec de fortes variations journalières du débit dont la valeur moyenne était 2,6 m³.s⁻¹ entre 1999 et 2000 (Audry *et al.*, 2004a).

La rivière Lot est un affluent de la Garonne. Long de 480 km, il draine un bassin-versant très vaste (11840 km²). Dans sa partie comprise entre le Riou-Mort et la confluence avec la Garonne, il est caractérisé par un régime pluvio-nival très irrégulier, avec une zone amont sous influence méditerranéenne (fortes pluies en automne), et un bassin aval dépendant des précipitations océaniques hivernales (hautes eaux en février-mars et novembre ; période d'étiage en août). Il subit par ailleurs une forte pression anthropique liée à la gestion de l'eau, conduisant à la présence d'une soixantaine de seuils artificiels et barrages au fil de l'eau (barrages EDF) (Capblancq et Tourenq, 1978 ; Tourenq *et al.*, 1978). Ces aménagements ont entraîné une

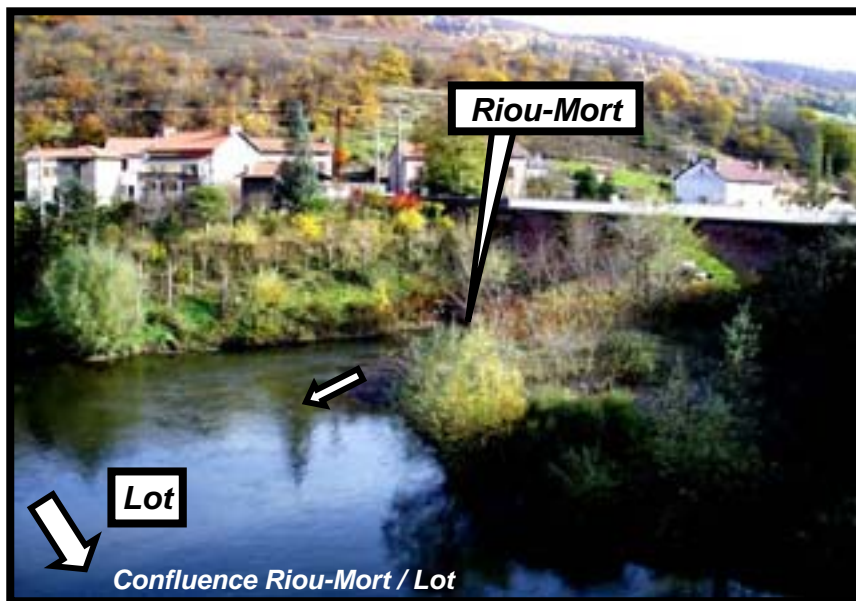
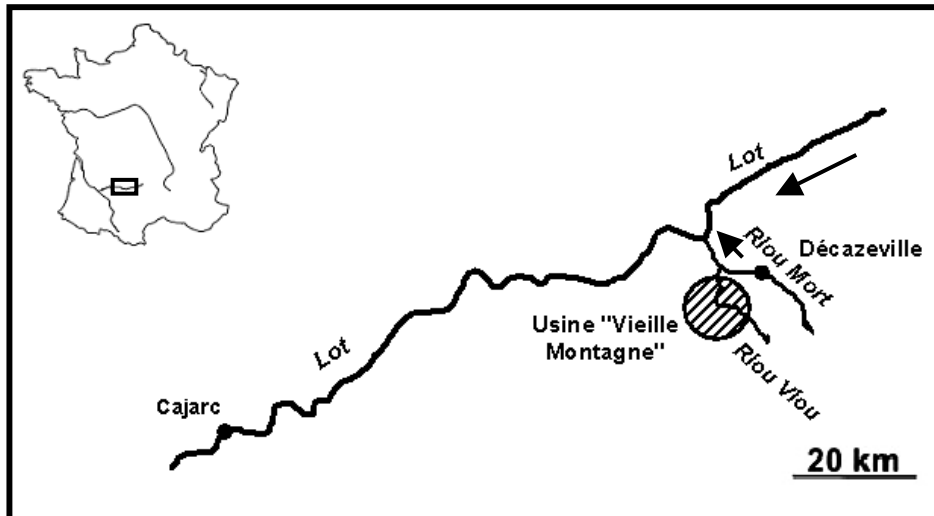


Figure 4 : Localisation de la source de pollution métallique du système hydrographique Lot / Garonne / Gironde.

L'usine minière en Aveyron installée depuis plus d'un siècle sur le Riou-Viou, un affluent du Riou-Mort est à l'origine de la contamination essentiellement par le cadmium et le zinc du système fluvio-estuarien aval.

régularisation du régime du fleuve et un écrêtement des ondes de crues. Le débit moyen annuel du Lot, calculé sur la période 1973-2000 à Villeneuve/Lot est de $164 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ (DIREN, Midi Pyrénées). Cette succession de réservoirs de taille et de profondeur variables a également favorisé l'accumulation de stocks importants de sédiments et de polluants en amont de chaque retenue. Pour le cadmium, les estimations effectuées en 1995 par Lapaquellerie *et al.* (1995) indiquent que plus de 200 tonnes sont stockées dans ces réservoirs sédimentaires.

Longue de 596 km, la Garonne est l'axe fluvial majeur du sud-ouest de la France. Elle draine un vaste bassin versant d'une superficie totale de $57\,500 \text{ km}^2$ (près de la moitié de la superficie de l'Aquitaine). Troisième fleuve français par ses débits après le Rhône et la Loire, les valeurs moyennes annuelles varient fortement selon les années (étiages comme crues) et sont la résultante des apports d'eau en provenance du versant pyrénéen d'une part, et des contreforts du Massif Central d'autre part. Le Lot participe à ces derniers et se jette dans la Garonne à Aiguillon (rive droite), propageant la pollution par les métaux lourds dans l'axe fluvial de la Garonne. Le débit moyen annuel calculé sur la période 1990-1999 est de $649 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ (Schäfer *et al.*, 2002).

Au Bec d'Ambès, en aval de Bordeaux, la Garonne rejoint la Dordogne (débit moyen annuel $285 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) pour former le plus grand estuaire macrotidal d'Europe : l'estuaire de la Gironde (625 km^2 à marée haute ; 150 km de long). Les débits sont fortement influencés par les saisons, avec en période de crue (janvier-février) des valeurs entre 1 000 et 2 000 $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ et en période d'étiage (août-septembre) de l'ordre de 200 à 300 $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$. Le temps moyen de résidence des eaux dans l'estuaire varie entre 20 et 90 jours ; celui des particules en suspension est très long, de l'ordre de 5 ans (Kraepiel *et al.*, 1997). Cet estuaire est le plus turbide d'Europe, avec une concentration excessive de particules en suspension formant notamment un bouchon vaseux. Dans cet estuaire, la limite de la marée de salinité correspond à peu près à la confluence des deux rivières (Garonne et Dordogne).

1-1.2. ORIGINE ET ETENDUE DE LA POLLUTION METALLIQUE

A- La source de la pollution : l'Usine "Vieille Montagne", à partir du Riou-Mort

La contamination par les métaux lourds, et notamment par le cadmium (Cd) et le zinc (Zn), de ce réseau fluvial est la résultante des différents apports métalliques directs/ponctuels et indirects/chroniques subis par le Riou-Mort, à partir de l'installation minière implantée sur un petit affluent du Riou-Mort, le Riou-Viou (**Figure 4**).

Le bassin houiller de Decazeville-Viviez (Aveyron), situé en bordure du Massif Central, s'est développé industriellement à la fin du 19^{ème} siècle. Profitant de l'essor des techniques associées à l'extraction du zinc (procédé thermique utilisant le charbon), c'est en 1871 que s'est installée à proximité de Decazeville, la Société des Mines et des Fonderies de la Vieille Montagne (actuellement "Union Minière"). Implantée de part et d'autre du Riou-Viou, elle s'est initialement spécialisée dans la fonderie et le laminage du zinc issu de minerais silicatés ou sulfurés (la calamine : $Zn_2SiO_3(OH)_2$, ou la blende : ZnS) extraits localement et ensuite importés des pays méditerranéens. Durant un siècle, différents procédés ont été utilisés pour l'extraction et la purification du zinc à partir de ces minerais, composés en moyenne de 50% de zinc, associé à d'autres éléments : cadmium (jusqu'à 5% dans la blende), cuivre, plomb, argent et soufre (30% environ). Le procédé d'extraction et de purification du zinc par électrolyse a ainsi conduit à la production de 3 kg de Cd en moyenne par tonne de Zn produite. De grandes quantités de boues contenant des résidus métalliques ont été stockées sur le site au niveau de crassiers. Pour l'ensemble de la période d'exploitation minière, les estimations indiquent que 3,4 millions de tonnes de zinc auraient été extraites, entraînant la production de plus de 10 000 tonnes de cadmium par le procédé d'électrolyse (Jozereau, 1997). Bien que le traitement secondaire des boues ait permis de récupérer environ 50% du Cd produit, des quantités très importantes ont rejoint le bassin versant et le Riou-Mort, à l'occasion de phénomènes d'infiltrations, de lessivages et d'érosion des crassiers.

Ainsi, les problèmes de pollution décelés au niveau de l'estuaire de la Gironde à la fin des années 70 ont une origine qui se situe 400 km en amont, sur le réseau hydrographique de la Garonne, laissant envisager une extension insidieuse de la pollution. Avant 1986, les flux de Cd arrivant dans le Lot par l'intermédiaire du Riou-Mort étaient estimés, par l'usine elle-même, à 40 kg Cd.j⁻¹. En juillet 1986, ce sont des déversements accidentels de plusieurs milliers de m³ de rejets liquides riches en métaux (200 kg de Cd, 20 t de Zn, 20 kg de Pb) et en acides, qui aboutirent dans le Riou-Mort, suite à la rupture d'une canalisation conduisant l'eau des crassiers vers l'atelier de recyclage. Avec des concentrations dans l'eau atteignant 100 mg Cd.l⁻¹ et 10 g Zn.l⁻¹, des mortalités spectaculaires de poissons sont apparues, jusque dans des zones situées 80 km en aval (Cahors). Suite à cet incident, des efforts importants ont été consacrés, entre 1986 et 1996, à la réduction des transferts métalliques vers les nappes phréatiques et à un meilleur isolement des crassiers. D'autre part, le site de "Vieille Montagne" a arrêté la production de zinc en 1987, et se contente aujourd'hui, sous l'appellation "Umicore", de laminier le zinc à partir de lingots provenant d'autres sites d'exploitation. Les analyses effectuées par le Département de Géologie et Océanographie (DGO – UMR CNRS EPOC 5805 – Université Bordeaux 1) sur des

échantillons d'eau collectés au niveau de la zone aval du Riou-Mort, indiquent des flux en nette diminution, mais qui demeurent relativement élevés : 6,4 t Cd.an⁻¹ et 319 t Zn.an⁻¹ en moyenne pour la période 1999 - 2000 (Audry *et al.*, 2004a). Ils sont fortement influencés par les variations de débit des cours d'eau (orages par exemple) et, conjointement, par les phénomènes de ruissellement de surface au niveau du bassin-versant.

La répartition des métaux est d'autre part très inégale entre les phases dissoute et particulaire (>0,45 µm) de la colonne d'eau, conditionnant la biodisponibilité de ces éléments vis-à-vis des êtres vivants (voir le paragraphe 1-2.1. "*Biodisponibilité et transfert des métaux vers les animaux aquatiques*", page 16). Des études récentes ont permis une estimation des flux annuels de Cd dissous et particulaire dans le Riou-Mort, correspondant à 1,4 t.an⁻¹ et 4,9 t.an⁻¹ respectivement (Audry *et al.*, 2004a). La contribution du flux particulaire par rapport au flux total de Cd a d'abord été estimée à 20% (Blanc *et al.*, 1999), mais les études récentes (Audry *et al.*, 2004a) indiquent une sous-estimation du flux particulaire qui interviendrait à hauteur de 77% en 2000 (79% pour le Zn - Audry *et al.*, 2004a). Les concentrations moyennes correspondant à ces flux et mesurées dans la fraction dissoute de la colonne d'eau du Riou-Mort restent élevées : 16,7 µg Cd.l⁻¹ et 1,3 mg Zn.l⁻¹ en moyenne (Audry *et al.*, 2004a), valeurs très nettement supérieures aux concentrations établies à Boisse-Penchat, une station en amont de la confluence avec le Lot (x 580 pour le Cd, x 380 pour le Zn) et aux valeurs maximales fixées par l'Agence de Protection de l'Environnement (E.P.A.) aux USA pour la protection de la vie aquatique (2 µg Cd.l⁻¹ et 0,12 mg Zn.l⁻¹ en eau douce – valeurs de l'"E.P.A." : <http://epa.gov/waterscience/standards/wqcriteria.html>). Notons qu'en France, il existe un Système d'Evaluation de la Qualité des eaux (S.E.Q.) d'un point de vue physico-chimique (S.E.Q. Eau), physique (S.E.Q. Physique) et biologique (S.E.Q. Bio) permettant de définir des classes de qualité des eaux à partir de grilles de seuils par usage, fonction et potentialité biologique. Ce système, utilisé par les Agences de l'Eau, reconnaît, comme l'E.P.A. aux Etats-Unis, une altération du milieu aquatique en présence des métaux lourds (exemple de valeurs seuils pour une "qualité mauvaise" des eaux brutes avec [CaCO₃] > 200 mg.l⁻¹ : 3 µg Cd.l⁻¹ ; 330 µg Zn.l⁻¹ ; 40 µg Cu.l⁻¹) (Agence De L'eau Adour Garonne, 2005).

Les particules en suspension dans l'eau, de nature inorganique (oxydes et hydroxydes de fer ou de manganèse, argiles, silice, ...) ou organique (matières détritiques), offrent de fortes capacités de complexation à l'égard des métaux traces, *via* une vaste surface d'échange et la présence de nombreux sites de fixation (liaisons électrostatiques, covalentes, ioniques, ...). Ainsi, les concentrations moyennes particulaires mesurées ont atteint, en 2000, 145 mg Cd.kg⁻¹ et 8 180 mg Zn.kg⁻¹ de matière sèche (Audry *et al.*, 2004a).

		Cd			Zn			Cu		Références
		diss (ng.l ⁻¹)	part (mg.kg ⁻¹)	sédiments (2001) (mg.kg ⁻¹)	diss (ng.l ⁻¹)	part (mg.kg ⁻¹)	sédiments (2001) (mg.kg ⁻¹)	diss (ng.l ⁻¹)	part (mg.kg ⁻¹)	
Riou Mort		16 700	145		1 300 000	8 180				Audry <i>et al.</i> , 2004a
	km depuis la confluence									
Lot	- 2 km Boisse-Penchot	29	3	1	3 440	590	125	1 080	96	Audry <i>et al.</i> , 2004a
	300 m Bouillac	1 025	26							Blanc <i>et al.</i> , 1999
	25 km Cajarc	180	23	65	12 000	1 400	2 750	900	40	Audry, 2003
	55 km Le Temple	80	18	53	8 200	1 273	2 260	1 250	109	Audry <i>et al.</i> , 2004a

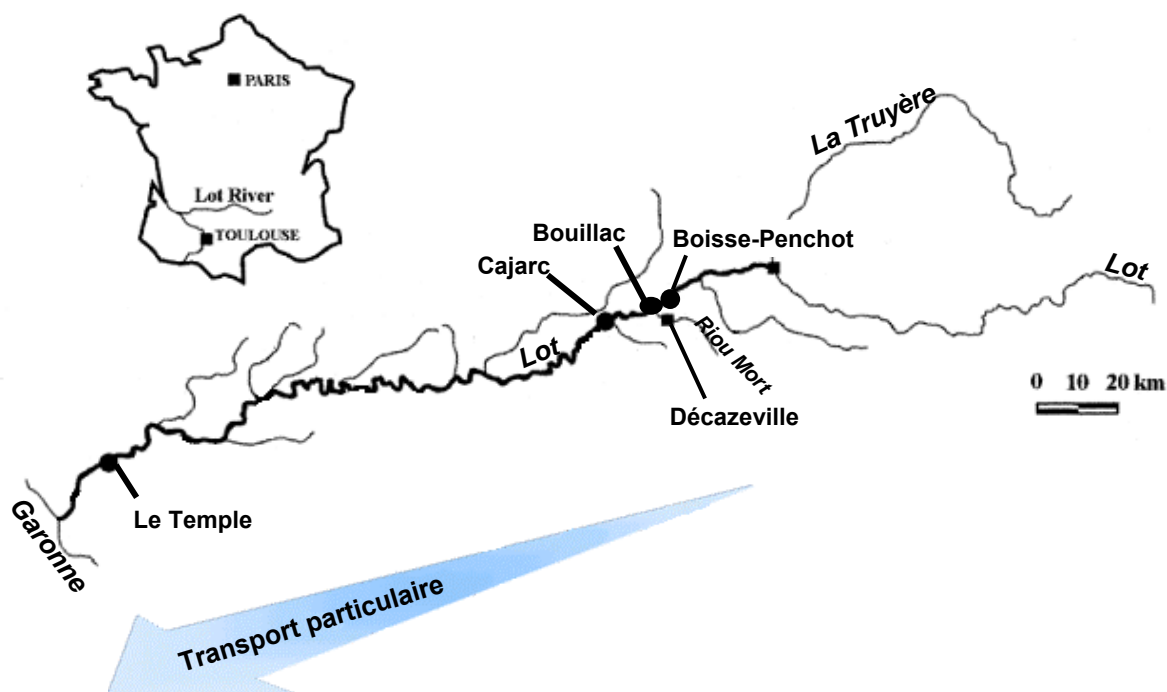


Figure 5 : Concentrations dans les phases dissoutes (diss, <0,45 µm), particulaires (part, >0,45 µm) et sédimentaires pour le cadmium, le zinc et le cuivre le long de la rivière Lot.

Les concentrations métalliques dans les fractions dissoute et particulaire diminuent progressivement le long du Lot. Les métaux sont transportés sous la forme particulaire depuis la confluence du Lot - Riou Mort et rejoignent le compartiment sédimentaire, où ils se concentrent notamment en amont des barrages et retenues au fil de l'eau.

B- Le transport particulaire et le stockage des métaux le long du continuum "Lot / Garonne"

a. Le transport des métaux par la phase particulaire

Dans le Lot, les flux entrant de métaux proviennent essentiellement du Riou-Mort, les apports se faisant essentiellement sous forme particulaire (Audry *et al.*, 2004a). Typiquement, les concentrations de Cd dissous décroissent progressivement le long du Lot depuis sa confluence avec le Riou-Mort jusque dans sa partie aval au Temple (55 km), se traduisant par des valeurs 200 et 160 fois plus faibles pour le Cd et le Zn respectivement, par rapport à celles mesurées dans le Riou-Mort (**Figure 5**). Ceci résulte des phénomènes de dilution avec les eaux du Lot et de ses affluents en aval et des phénomènes d'adsorption sur la phase particulaire. Les concentrations en Cd particulaire diminuent également au fur et à mesure (dépôt dans le compartiment sédimentaire) mais elles demeurent fortement dépendantes des flux de particules en suspension dans la rivière (augmentation des flux en période de crues). Notons qu'au Cd et au Zn transportés depuis l'amont, s'ajoutent des apports de Cu dans le Lot inférieur et la Garonne, en relation avec le drainage à partir du bassin versant soumis aux activités viticoles et notamment aux traitements par le CuSO_4 (Schäfer et Blanc, 2002 - cf. concentrations **Figure 5**).

Les phénomènes de complexation jouent un rôle majeur dans le transport et la dispersion des métaux le long du réseau fluvial. Le flux de Cd au Temple vers la Garonne est caractéristique de ce transport des métaux : 90% du flux total se produit sous forme particulaire ($5,48 \text{ t Cd}_{\text{part}}.\text{an}^{-1}$; $0,66 \text{ t Cd}_{\text{diss}}.\text{an}^{-1}$) et contribue à hauteur d'environ 60% en moyenne par rapport au flux annuel total de Cd dans la Garonne (valeurs moyennes entre 1990 et 1998 - Blanc *et al.*, 1999 ; Audry *et al.*, 2004b). Pour le Zn, le Lot est responsable de 30% des apports dans la Garonne. Notons néanmoins que la relation entre ces flux annuels dissous et particulaire dépend des concentrations des matières en suspension, principalement contrôlées par la succession des crues et des étiages, et que la contribution du Lot au flux de Cd total dans la Garonne (La Réole) varie beaucoup d'une année à l'autre, en fonction de l'hydrologie (contribution en année humide : ~76% dont ~92% particulaire ; année sèche : ~52% dont 58% particulaire - Audry *et al.*, 2004b).

Dans la Garonne, des données récentes permettent d'apprécier le niveau de contamination de la colonne d'eau et rapportent les variations inter-annuelles et la tendance générale observée au cours des années (Schäfer *et al.*, 2002 ; Audry *et al.*, 2004a ; Audry *et al.*, 2004b). En 1998, donc plus de 10 ans après l'arrêt des activités minières (1987), les concentrations de Cd dissous et particulaire marquent une forte diminution : -70 et -50% respectivement. Toutefois, le site

Rivière	Cd		Zn		Cu	
	dissous (ng.L ⁻¹)	particulaire (mg.kg ⁻¹)	dissous (ng.L ⁻¹)	particulaire (mg.kg ⁻¹)	dissous (ng.L ⁻¹)	particulaire (mg.kg ⁻¹)
Rhône (Elbaz-Poulichet <i>et al.</i> , 1996)	30,3	1,1			2 224	45,7
Seine (Idlafkih <i>et al.</i> , 1995)	27	4,9	9 200	611	1 700	174
Rhin (Qu and Kelderman, 2001)		2,3		515		83
Moyenne mondiale (Martin and Windom, 1990)	10,1	1,2			1 462	99,8
Garonne						
1999	90	6,6	15 080	883	2 000	101
2000	42	5,2	9 670	643	1 400	78
(Audry <i>et al.</i> , 2004a)						
Riou-Mort (Audry <i>et al.</i> , 2004a)	16 700	145	1 300 000	8 180		
Lot (Temple) (Audry <i>et al.</i> , 2004a)	80	18	8200	1273	1250	109

Tableau 2 : Comparaison entre les concentrations moyennes de métaux dissous et particulaire (cadmium, zinc et cuivre) mesurées en 2000 dans la Garonne, le Lot, le Riou-Mort et d'autres rivières françaises.

industriel, *via* les apports par le Riou-Mort, compte encore pour au moins 47% du Cd, ~20% du Zn et ~4% du Cu par rapport aux métaux transportés par la Garonne. Les concentrations en Cd, Zn et Cu total sont plus faibles que pour le Lot (facteur 2 pour le dissous ; 2,5 pour le particulaire pour l'année 1999). Cependant, le mélange des eaux ne modifie pratiquement pas la répartition des métaux entre les différentes phases ; ils restent majoritairement présents au sein de la phase particulaire dans la Garonne (80 à 95% du Cd, 70 à 90% du Zn et 97 à 99% du Cu - Audry *et al.*, 2004a ; Audry *et al.*, 2004b). Il est important de souligner que les concentrations en Cd dissous dans la Garonne, s'élevant en moyenne à 91 ng Cd.l⁻¹ (valeur 1999 égale à la valeur moyenne sur 9 ans 1992-1998), demeurent bien supérieures à celles mesurées dans les autres rivières françaises (**Tableau 2**). Pour le Cd, elles sont 9 fois plus fortes que la concentration moyenne mondiale établie par Martin et Windom (1990). Cependant, la concentration moyenne particulaire établie à 3,28 mg Cd.kg⁻¹ entre 1992-1998 (5,9 mg Cd.kg⁻¹ pour 1999-2000), se révèle proche de celles du Rhin et de la Seine (Idlafkih *et al.*, 1995 ; Qu et Kelderman, 2001 ; Audry *et al.*, 2004b).

b. Le stockage des métaux dans le compartiment sédimentaire du réseau fluvial

La complexation des métaux avec la phase particulaire contribue à leur transfert vers les sédiments, à la faveur de conditions hydrodynamiques appropriées, notamment en amont des barrages hydroélectriques sur le Lot (Lapaquellerie *et al.*, 1995 ; Steiger et Gurnell, 2003). Les sédiments accumulés sur l'ensemble du réseau fluvial aval (de la confluence Riou-Mort / Lot à la Garonne) constituent ainsi un compartiment privilégié de stockage des métaux, *via* le dépôt des matières en suspension, véritables pièges pour la complexation des métaux présents au sein de la colonne d'eau ou/et par diffusion directe depuis la colonne d'eau. La diagenèse précoce des sédiments, leur remaniement (ex. par bioturbation) ou leur expulsion (lâchers des barrages, par exemple) font d'eux une source endogène de contamination, qui entretient le caractère chronique de la pollution du *continuum* "Lot / Garonne / Gironde". Ainsi, des variations de pH, de conditions redox et d'oxygénation des strates superficielles des sédiments peuvent conduire à la remise en solution des métaux. De même, la neutralisation des fonctions acides des sulfures et la dissolution des oxydes de fer induisent une libération du Cd (Tessier *et al.*, 1993). Les communautés microbiennes, responsables de modifications locales des conditions physico-chimiques, jouent ainsi un rôle important sur les flux de métaux à l'interface eau-sédiment. Mais les facteurs mécaniques (brassages mécaniques des sédiments) naturels ou anthropiques ou les phénomènes de bioturbation peuvent également favoriser les échanges avec la colonne d'eau (Ciutat, 2003).

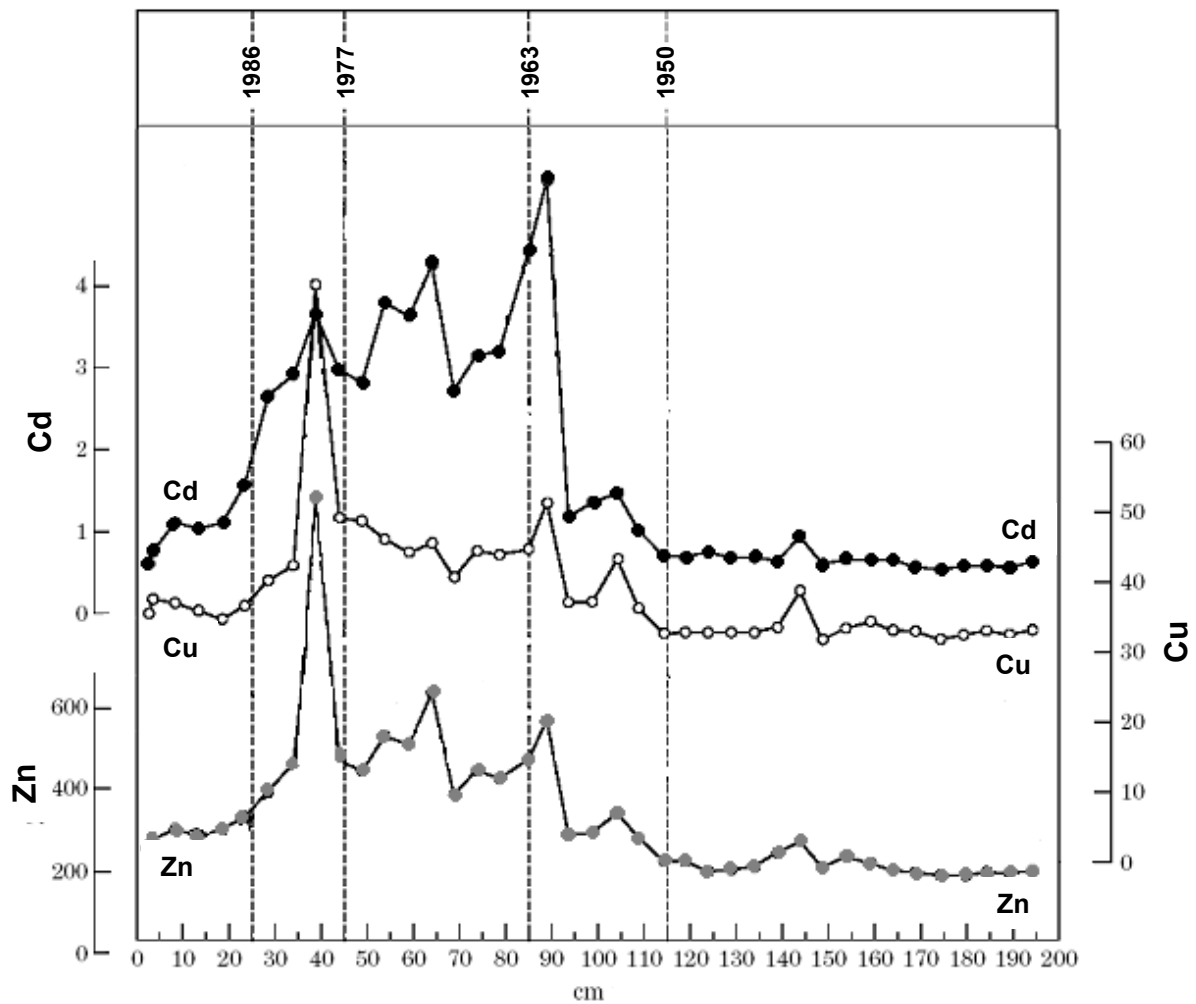


Figure 6 : Distribution verticale du cadmium, du zinc et du cuivre dans la fraction "échangeable" des sédiments (unité : $\mu\text{g.g}^{-1}$) d'un bassin à flot de Bacalan près de Bordeaux (enregistrement de 1997). Les sédiments résultent du dépôt des matières en suspension contenues dans l'eau renouvelée 2 fois par jour durant 2 heures à marée haute par pompage d'eau dans la Garonne. La datation des couches sédimentaires est basée sur un profil de césium¹³⁷ (d'après Grousset *et al.*, 1999).

En 1992, le stock des métaux dans les strates superficielles des sédiments du Lot (principalement vases et vases sableuses), en amont des chaussées et barrages hydroélectriques, était estimé à près de 200 tonnes de Cd et 21 000 tonnes de Zn (Lapaquellerie *et al.*, 1995). En 1996, environ 130 tonnes de Cd étaient encore présentes, de même qu'une dizaine de milliers de tonnes de Zn (Audry *et al.*, 2004c). Cette diminution est corrélée tout d'abord au remplacement et/ou à la dilution par les apports sédimentaires en provenance des parties non polluées du bassin versant, mais également à la réduction des apports à la source, suite aux efforts d'isolement des crassiers. La masse sédimentaire des deux rivières (Garonne et Lot) enregistre l'évolution temporelle de la pollution et des entrées métalliques dans le système hydrographique amont, au niveau du Riou-Mort (Grousset *et al.*, 1999 ; Audry *et al.*, 2004c). Grousset *et al.* (1999), qui ont reconstruit 70 ans de l'histoire de la contamination de la Garonne à partir de l'enregistrement sédimentaire, ont confirmé une réduction d'un facteur 5 de la contamination des sédiments dans ce fleuve depuis 1980 (**Figure 6**).

C- La remobilisation des métaux dans l'estuaire de la Gironde

Les flux des métaux en provenance du Lot *via* la Garonne représentent la majeure partie des flux bruts entrant dans l'estuaire de la Gironde (74-96% du Cd, ~60% du Zn, ~50-60% du Cu), la contribution de la Dordogne restant faible (**Figure 7** - Audry *et al.*, 2004a). Pour le Cd, un flux total moyen a été estimé sur la période de 1990 à 2000 à ~12,5 t Cd.an⁻¹, ~1 390 t Zn.an⁻¹ et ~170 t Cu.an⁻¹ (Schäfer *et al.*, 2002 ; Audry *et al.*, 2004a). Rappelons que ces métaux sont principalement associés à la phase particulaire lorsqu'ils entrent dans l'estuaire (Blanc *et al.*, 1999). Ensuite, une partie importante du Cd, et dans une moindre mesure du Zn, est transférée vers la fraction dissoute dans l'estuaire lui-même, le flux net vers l'océan se faisant principalement sous cette forme. (Elbaz-Poulichet *et al.*, 1982 ; Elbaz-Poulichet *et al.*, 1987 ; Jouanneau *et al.*, 1990 ; Turner, 1996 ; Kraepiel *et al.*, 1997). Ce phénomène est commun à d'autres estuaires, comme la Loire, la Seine, le Rhône ou encore les estuaires chinois ou hollandais (Elbaz-Poulichet *et al.*, 1987 ; Boutier *et al.*, 1993 ; Chiffoleau *et al.*, 1994 ; Elbaz-Poulichet *et al.*, 1996 ; Turner, 1996 ; Zwolsman *et al.*, 1997). Cette augmentation des concentrations en métaux dissous dans les estuaires est habituellement attribuée à une intense remobilisation de ces éléments à partir de la phase particulaire, en raison de l'augmentation de la salinité et de la complexation croissante et compétitive avec les ions chlorures (Cl⁻) au fur et à mesure que les eaux continentales se mélangent à l'eau de mer (Turner, 1996). Pour exemple, en

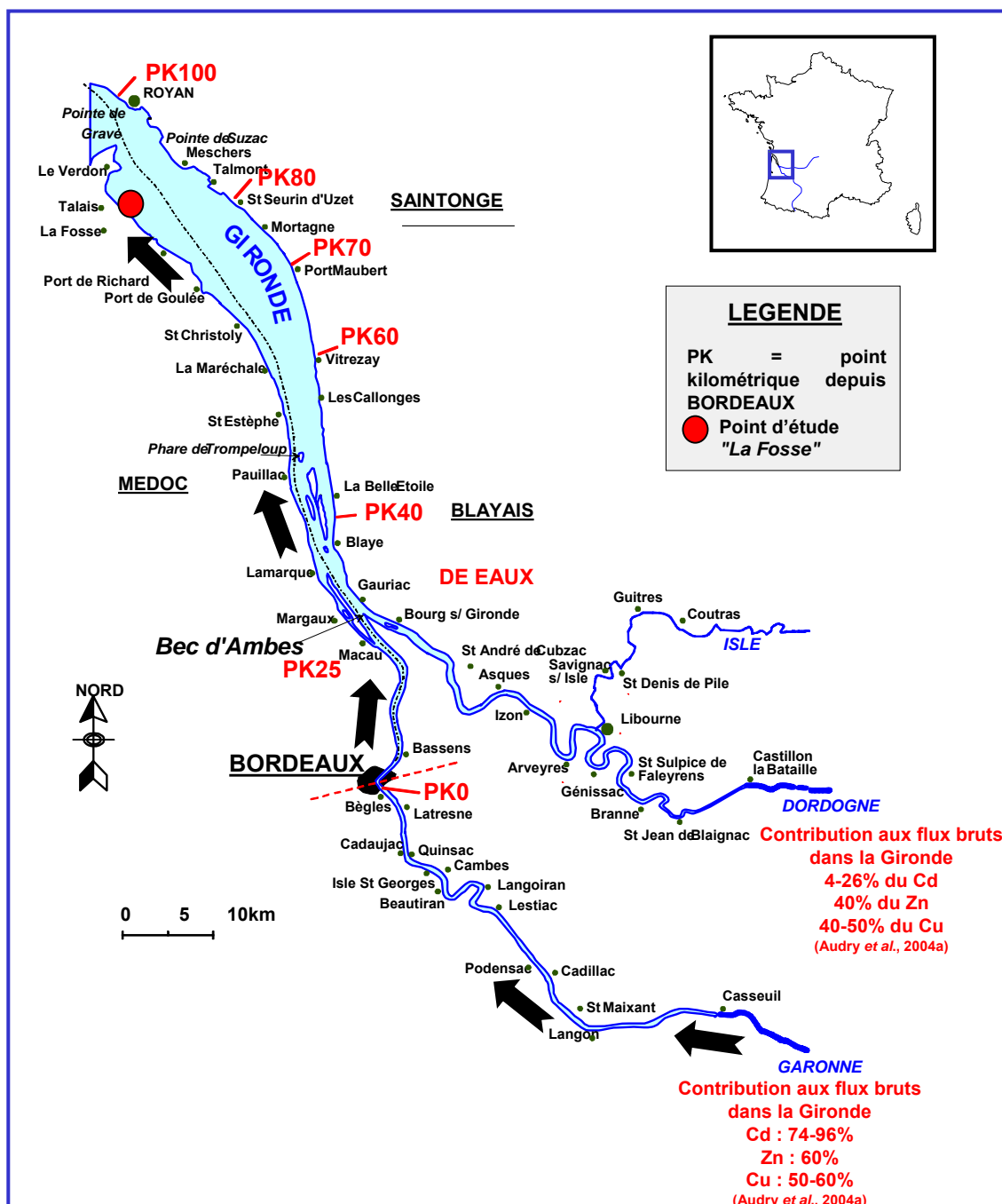


Figure 7 : En aval du réseau hydrographique, l'estuaire de la Gironde subit les apports de métaux *via* la Garonne (d'après Audry et al., 2004a).

1991, la concentration de Cd dissous le long du gradient de salinité de l'estuaire de la Gironde passe ainsi de 31,5 ng Cd.l⁻¹ (station de mesure avec salinité de 0,2‰) à 207 ng Cd.l⁻¹ (station de mesure avec salinité de 18‰ - Boutier *et al.*, 2000). Ce processus de désorption des métaux associés aux particules sous l'action de la salinité a été étayé au cours de différentes expériences de laboratoire (Edmond *et al.*, 1985 ; Comans et Van Dijk, 1988). Néanmoins, d'autres processus biogéochimiques complexes entretiennent également ce phénomène comme l'oxydo-réduction, le pH, la température, etc. (Robert *et al.*, 2004). Ainsi, un maximum de concentration en Cd dans la fraction dissoute est observé pour les conditions de salinité moyenne dans l'estuaire, autour de 15‰ (Kraepiel *et al.*, 1997 ; Boutier *et al.*, 2000). A plus forte salinité, les concentrations décroissent fortement, notamment sous l'influence de la dilution avec les entrées maritimes (Kraepiel *et al.*, 1997). Les flux nets de Cd et de Zn dissous dans l'estuaire de la Gironde ont cependant nettement diminué depuis les années 80, mais restent au-dessus de ceux de l'estuaire de la Loire ou de la Seine pour le Cd et les variations saisonnières apparaissent faibles, alors qu'elles sont marquées pour le Cu (augmentation en hiver) (Michel *et al.*, 2000).

Ainsi, les métaux, qui contaminent le bassin hydrographique de la Garonne (essentiellement le Cd et le Zn), montrent de fortes concentrations dans la phase dissoute des eaux du Riou-Mort (source principale de la pollution) et de la zone en aval de l'estuaire de la Gironde. D'un point de vue écotoxicologique, ces formes dissoutes sont plus biodisponibles à l'égard des organismes aquatiques. Nos études de terrain ont été focalisées essentiellement sur ces deux zones du *continuum* de pollution polymétallique, à partir de l'utilisation de mollusques bivalves filtreurs en tant que modèles à très fortes potentialités de bioaccumulation, en relation étroite avec la biodisponibilité des éléments au sein de la colonne d'eau ou à l'interface "eau / sédiment".

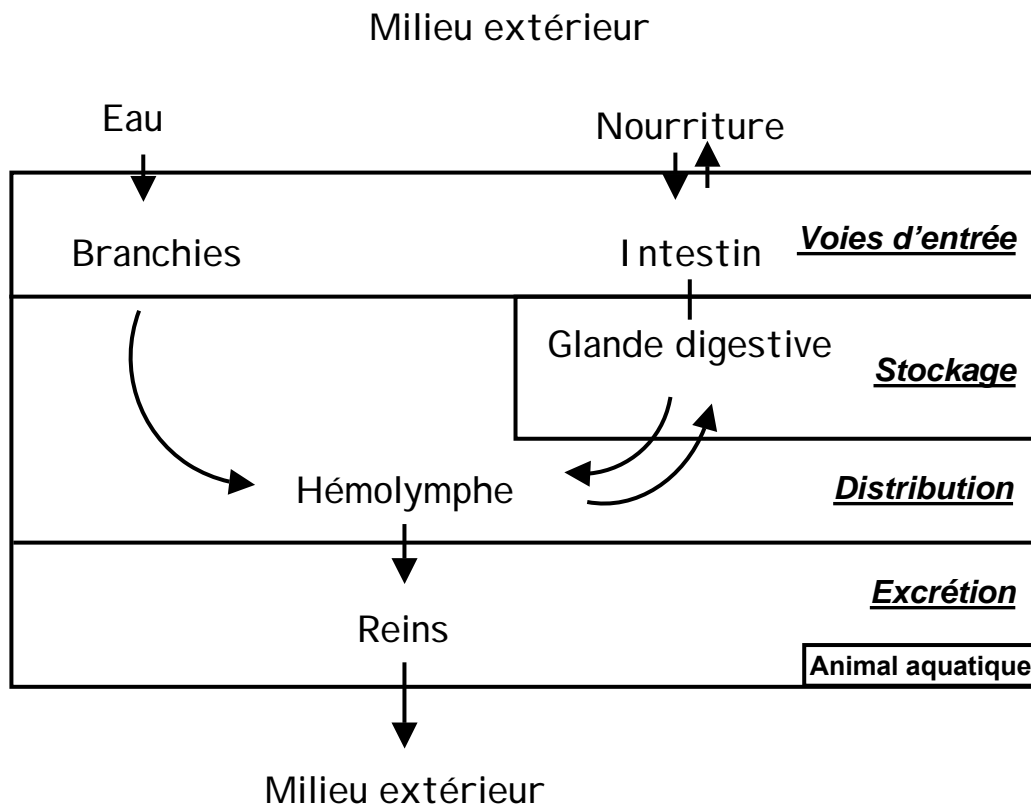


Figure 8 : Schéma synthétique indiquant les voies d'entrée, de transport, de stockage et d'élimination des métaux dans un animal aquatique (adapté de Roesijadi, 1992).

Les métaux en solution dans l'eau pénètrent directement au niveau des branchies tandis que l'intestin est la voie d'entrée des métaux associés à la fraction alimentaire. Chez de nombreuses espèces aquatiques, la glande digestive possède à la fois des fonctions intestinales et hépatiques et peut servir à la fois d'organe de transfert et de stockage. L'élimination des métaux accumulés se fait principalement par excrétion par la voie urinaire et l'élimination de la matière fécale.

1-2. LES MECANISMES DE BIOACCUMULATION DES METAUX LOURDS PAR LES ANIMAUX AQUATIQUES

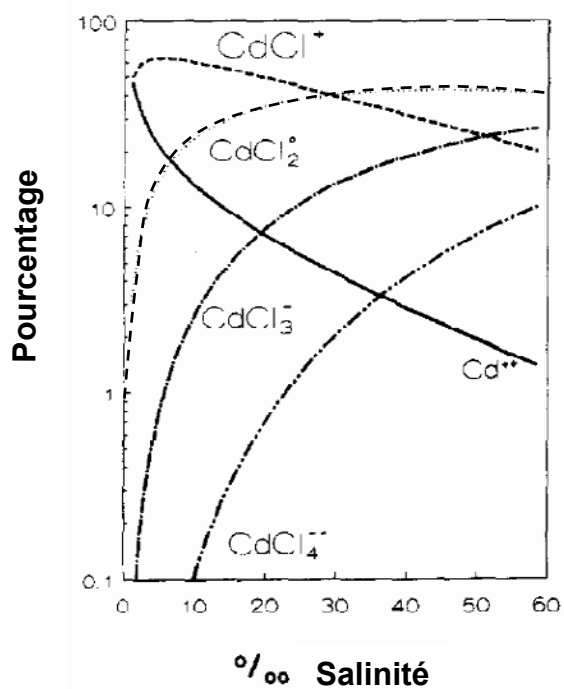
La bioaccumulation des métaux est la résultante de trois phénomènes (**Figure 8**) : l'accessibilité et le transfert de ces éléments vers les organismes aquatiques, au niveau des barrières biologiques qui séparent les individus de leur milieu environnant ; la distribution et séquestration tissulaire et intracellulaire ; les processus d'élimination/excrétion.

1-2.1. BIODISPONIBILITE ET TRANSFERT DES METAUX VERS LES ANIMAUX AQUATIQUES

La première phase d'accumulation des métaux est donc basée sur des phénomènes d'accessibilité, d'interaction et de traversée des barrières biologiques (structures épithéliales, membrane plasmique) en contact direct avec l'environnement. Certaines d'entre elles sont caractérisées par de vastes surfaces d'échanges, à des fins respiratoires ou nutritionnelles. Pour les animaux aquatiques, il s'agit de l'épithélium branchial, de la paroi du tractus digestif et du revêtement tégumentaire.

L'accumulation excessive des métaux dans les bivalves filtreurs est le résultat de deux voies d'exposition : les voies directe et trophique de contamination, mettant plus ou moins à contribution ces différentes barrières selon la forme sous laquelle se trouvent les métaux dans le milieu considéré. Le devenir des éléments métalliques le long du *continuum* allant du Riou-Mort / Lot jusqu'à l'estuaire de la Gironde va étroitement conditionner la capacité de ces derniers à interagir et traverser ces interfaces biologiques, définissant la notion de biodisponibilité des métaux à l'égard des organismes aquatiques. Elle dépend essentiellement des interactions entre les facteurs de contamination (nature et propriétés du métal), les facteurs biotiques (nature de la

Cadmium



Zinc

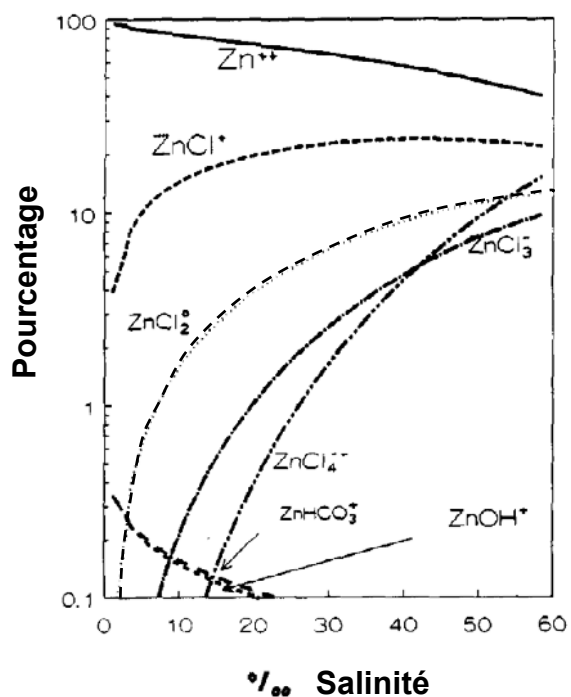


Figure 9 : Diagramme de spéciation chimique du cadmium et du zinc en solution dans l'eau en fonction de la salinité et en présence uniquement de complexant inorganiques (Rainbow, 1995a).

En ordonnée est reporté le pourcentage de distribution des espèces majeures du cadmium et du zinc en fonction de la salinité du milieu, pour un pH de 6,8.

barrière biologique) et les facteurs abiotiques qui caractérisent la colonne d'eau et les sédiments et conditionnent les réactions de spéciation chimique.

Dans ce paragraphe, nous aborderons la notion de spéciation chimique des métaux dans la fraction dissoute de la colonne d'eau et les différentes étapes qui définissent les processus de transfert des métaux du milieu extérieur vers le milieu intérieur. L'ensemble de ces éléments doit être pris en compte pour une évaluation de la biodisponibilité d'un métal.

A- Notion de spéciation chimique des métaux dans la fraction dissoute de la colonne d'eau

Les différentes formes physiques des métaux se distinguent par la distribution entre les formes particulières, colloïdales ou dissoutes ; les formes chimiques, par le degré d'oxydation des éléments métalliques (Templeton *et al.*, 2000). Ainsi, pour le Cd, les principales formes chimiques rencontrées correspondent à deux états d'oxydation : Cd⁰ (métal), et une forme inorganique CdII susceptible de former une variété de composés inorganiques, généralement très hydrosolubles. Le Zn existe également sous deux formes : Zn⁰ (métal) et ZnII qui constitue facilement des complexes avec les ions chargés négativement (Thunus et Lejeune, 1994). Les différentes espèces chimiques de ces éléments correspondent aux complexes transitoires formés avec les nombreux ligands présents en solution dans les milieux (Templeton *et al.*, 2000). L'abondance de ces espèces dépend des caractéristiques physico-chimiques des eaux et notamment des concentrations en ions (influençant la salinité, le pH, la dureté de l'eau, ...) ou en éléments organiques. La présence des différentes espèces est dépendante des constantes de complexation dans les réactions entre le métal et les ligands. Ces réactions de spéciation chimique gouvernent ainsi les interactions entre les facteurs de contamination (nature et propriétés du métal) et les facteurs abiotiques des milieux aquatiques. La **Figure 9** fournit un exemple de diagramme de spéciation chimique du Cd et du Zn en solution, en fonction de la salinité et en présence uniquement de complexant inorganiques (pH = 6,8) (Rainbow, 1995a). Il est cependant nécessaire de préciser que l'abondance relative de ces différentes espèces chimiques est déterminée sur la base de calculs thermodynamiques (estimation par des programmes informatiques du type MINEQL⁺) à partir d'un hypothétique équilibre, ce qui implique que les conditions physico-chimiques soient stables. Or, c'est rarement le cas en milieu

naturel, où ces facteurs (comme la présence de ligands particuliers) varient en permanence à la faveur d'interactions avec les facteurs biotiques notamment : ces calculs se heurtent ainsi à la complexité des biotopes et sont donc limités dans leur extrapolation aux systèmes aquatiques. Ils permettent néanmoins d'appréhender la toxicité des polluants en établissant la présence éventuelle d'espèces chimiques biodisponibles dans le milieu étudié.

Ainsi, en eau douce, de nombreux complexes sont susceptibles de coexister en solution (exemple sur la **Figure 9** pour un pH = 6,8 et une salinité proche de 0‰). Leur présence varie en fonction du pH et de l'oxydation des métaux et des ligands. Cependant, les espèces chimiques prépondérantes à très faible salinité et en absence de ligands organiques sont les "ions libres" (Cd^{2+} et Zn^{2+}), à l'exception faite de CdCl^+ (Bernhard *et al.*, 1986).

En comparaison, en milieu estuarien où la salinité s'accroît progressivement vers l'embouchure jusqu'à 35‰, seulement 3% du Cd inorganique est présent sous forme d'ion libre, contre 46% pour le Zn (Turner *et al.*, 1981). L'abondance des complexes en solution va dépendre de leur solubilité respective en fonction notamment du pH. Les espèces majoritaires sont les complexes chlorés : CdCl^+ , CdCl_2 , CdCl_3^- , CdCl_4^{2-} - ZnCl^+ , ZnCl_2 . Les espèces carbonatées, moins solubles que les chlorures, peuvent quant à elles précipiter pour des concentrations proches de $10 \mu\text{g.l}^{-1}$.

Ainsi, pour chaque métal et environnement aquatique considéré, une multitude d'espèces chimiques peuvent coexister en solution dans l'eau, leur prépondérance dépendant fortement des facteurs abiotiques (et notamment de la matière organique) et de leurs variations. Les différentes propriétés de ces espèces en relation notamment avec leurs charges électriques, leur encombrement moléculaire et leur solubilité vont fortement modifier la biodisponibilité des métaux de la phase dissoute.

B- Les processus de transfert des métaux du milieu extérieur vers le milieu intérieur.

a. L'advection ou la diffusion

L'advection est la première étape dans les processus de transfert des métaux du milieu externe vers le milieu interne des animaux aquatiques (**Figure 10**). C'est l'étape de diffusion du métal (et de ces complexes) de la solution vers la surface de biologique. Elle est fonction de la

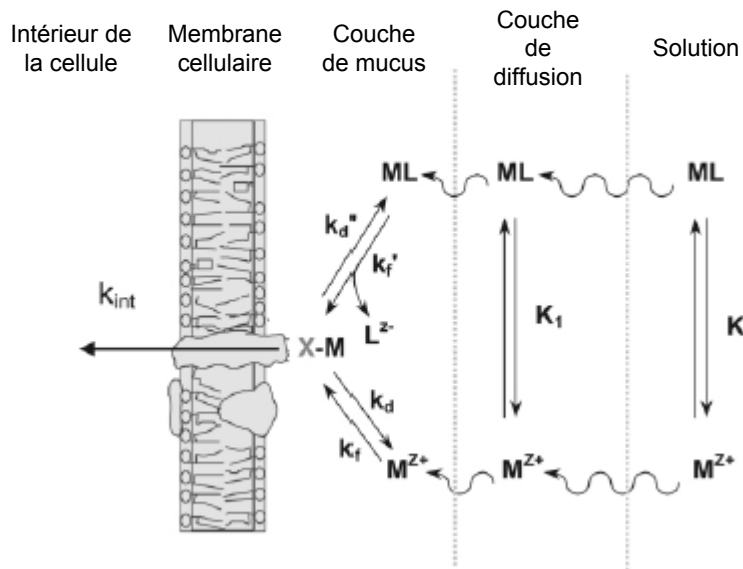


Figure 10 : Modèle conceptuel des interactions entre les métaux et les organismes aquatique (Campbell et Couillard, 2004).

M^{Z+} : ion métallique libre

ML, complexe métallique en solution

K_1 , constant d'équilibre 1 pour la formation de ML

M–X-membrane, complexe métallique de surface

k_f , k_f' , taux constants pour la formation de complexes de surface

k_d , k_d' , taux constants pour la dissociation de complexes de surface

k_{int} , taux constant pour l'internalisation ou le transport du métal au travers de la membrane biologique.

Les charges sur le complexe ne sont pas données pour simplifier (Modifié de Campbell, 1995.)

concentration du métal en solution et de la chimie des équilibres qui s'établissent à l'interface entre l'organisme et son milieu (Campbell et Couillard, 2004).

b. La complexation aux sites de surface membranaires

La complexation du métal au niveau de sites à la surface des barrières biologiques repose sur une forte électropositivité des métaux en solution (**Figure 10**). Le Cd et le Zn vont ainsi interagir au niveau des membranes avec les têtes polaires des phospholipides par liaisons électrostatiques, avec les groupements sulfhydriles, les ponts disulfures des protéines (protéines de structure, enzymes, récepteurs, canaux ioniques, ...), mais également avec les amines et les phosphates, en modifiant la stabilité des bicouches (Girault *et al.*, 1998). Mentionnons que l'affinité du Zn pour les groupements SH est plus faible que celle du Cd, mais au contraire plus forte pour les lipides anioniques (Girault, 1996). Mentionnons, de plus, l'existence de phénomènes d'adsorption sur des revêtements externes comme les couches de mucus ou la coquille des mollusques (Davies et Cliffe, 2000 ; Huanxin *et al.*, 2000). Des programmes de calcul ont été récemment développés pour modéliser la fixation du métal au niveau des "ligands biotiques" (sites de fixation des métaux sur les organismes vivants). Ces modèles dits "Biotic Ligand Model" (BLM) ont été mis au point, pour quelques espèces aquatiques et quelques métaux, afin d'estimer la biodisponibilité de ces derniers en fonction des conditions physico-chimiques d'un milieu donné (Campbell *et al.*, 2002 ; Grosell *et al.*, 2002 ; Paquin *et al.*, 2002). Ces modèles représentent la synthèse d'un grand nombre de concepts issus de disciplines scientifiques variées (chimie, physiologie, écotoxicologie).

c. La traversée des membranes biologiques

La traversée en elle-même des barrières biologiques par les métaux met en jeu des mécanismes dont la nature exacte n'est que partiellement connue, notamment chez les bivalves. Deux voies majeures sont considérées : le transport trans-membranaire et l'endocytose.

▪ ***Le transport trans-membranaire à partir des formes dissoutes biodisponibles des métaux***

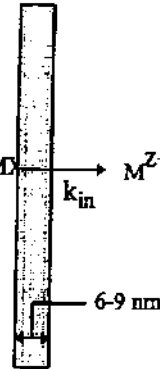
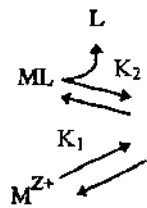
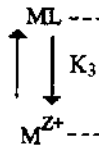
Chez les organismes aquatiques, l'épithélium branchial constitue l'interface clé pour les mécanismes de transport trans-membranaire des métaux à partir des formes dissoutes. Ces phénomènes peuvent jouer un rôle majeur dans les eaux du Riou-Mort et dans l'estuaire de la Gironde où les concentrations de métal dissous sont élevées. A partir de cette fraction, la proportion de métal potentiellement assimilable par les organismes va principalement dépendre

MILIEU SOLUBLE

MEMBRANE PLASMATIQUE

CELLULE

COMPLEXES HYDROPHOBES LABILES



MODELE DE L'ION LIBRE

Figure 11 : Modèle conceptuel de l'ion libre (Morel, 1983 – d'après Campbell, 1995).

M^{Z+} : ion métallique libre

ML : complexe du métal en solution (hydrophobe, labile)

MX : complexe du métal à la surface membranaire

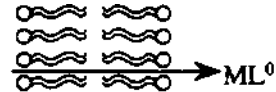
K1 et K2 : constantes à l'équilibre pour la formation des complexes de surface

k_{in} : constante de cinétique pour l'internalisation ou le transport au travers de la membrane biologique

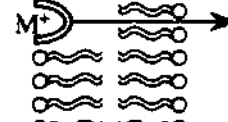
K3 : constante de la réaction en solution ($M+L > ML$)

Diffusion passive transmembranaire

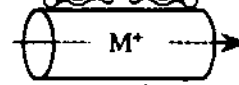
Complexe



Protéine de transport



Canaux ioniques



Système d'échange d'ions



Endocytose
(phagocytose, pinocytose)

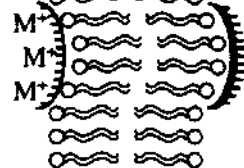


Figure 12 : Mécanismes membranaires permettant l'entrée des ions métalliques (M^+) dans la cellule (Simkiss et Taylor, 1989, modifié).

de la forme et de l'espèce chimique sous laquelle ils existent (voir paragraphe 1-2.1. "A- Notion de spéciation chimique des métaux dans la fraction dissoute de la colonne d'eau", page 17).

D'après les données disponibles dans la littérature, les deux cations Cd^{2+} et Zn^{2+} constituent les espèces chimiques de ces métaux les plus biodisponibles chez les mollusques en raison de leurs capacités élevées à traverser la barrière branchiale (voie "directe" de contamination) (Simkiss et Taylor, 1989 ; Roesijadi et Robinson, 1994). La concentration de ces ions est connue pour constituer le meilleur prédicateur de la toxicité par les métaux (Campbell, 1995). Ceci repose sur la théorie du modèle de l'ion libre (Free Ion Activity Model ou FIAM - Morel, 1983 - **Figure 11**) indiquant que tout ligand présent dans le milieu, capable de complexer l'espèce M^{z+} et de réduire son activité en solution, est susceptible de diminuer ses capacités de bioaccumulation, *via* un phénomène de compétition avec les sites de fixation au niveau de la barrière épithéliale. De nombreux auteurs ont, par la suite, vérifié ce modèle, notamment avec le Cd (Tessier *et al.*, 1993 ; Wright, 1995 ; Hare et Tessier, 1996). Ainsi, dans les eaux douces du Riou-Mort où les concentrations de métal dissous sont importantes, la présence des deux cations Cd^{2+} et Zn^{2+} laisse préjuger d'une capacité importante de bioaccumulation dans cette partie amont du système fluvial.

Il existe cependant plusieurs exceptions à ce modèle, favorisant également l'entrée du métal dans les cellules. Il s'agit de la diffusion passive, pour un complexe métallique neutre lipophile ; la diffusion facilitée, dans le sens du gradient de concentration par l'intermédiaire d'un transporteur ; et le transport actif, contre le gradient de concentration, sollicitant de l'énergie (ATP). La **Figure 12** résume l'ensemble des mécanismes susceptibles d'intervenir dans le transfert des métaux du milieu extérieur vers le milieu intracellulaire. Le passage des formes dissoutes à travers la membrane apicale dépend des espèces chimiques des métaux, mais aussi de la physiologie des animaux, en relation avec leur efficacité d'assimilation et leur milieu de vie (eau douce hypotonique ou milieu salé hypertonique) (Wang, 2001 ; Batley *et al.*, 2004). Si ces mécanismes de transport ont été révélés pour la plupart chez les cellules de mammifères (Zalups et Ahmad, 2003), ils restent peu décrits chez les vertébrés et invertébrés aquatiques (Simkiss et Taylor, 1989 ; Wright, 1995 ; Paquin *et al.*, 2002 ; Bury *et al.*, 2003 ; Van Leeuwen et Köster, 2004). L'absorption du Zn, en relation avec le caractère essentiel à la vie de ce métal, fait intervenir, la plupart du temps, des voies spécifiques liées aux besoins métaboliques de l'organisme, notamment par l'intervention de protéines transporteurs ou perméases (Roesijadi et Robinson, 1994). Il apparaît que les mécanismes de transport trans-membranaire pour ce métal

sont aujourd'hui, dans leur ensemble, assez mal connus, état de fait relativement contradictoire avec le caractère essentiel de ce métal.

Pour le Cd, des expériences menées sur des modèles de membranes lipidiques ("Bimolecular Lipid Membrane") et sur des organismes aquatiques ont montré que la fixation du Cd sur des ligands organiques (xanthates) ou inorganiques (Cl^-), donne des complexes liposolubles et neutres susceptibles de traverser les barrières hydrophobes par simple diffusion : à titre d'exemple, le K_{ow} pour CdCl_2 est de 0,21 et de 0,001 pour Cd^{2+} (Block et Glynn, 1992 ; Mason et Jenkins, 1995). Ce transport jouerait un rôle non négligeable chez les espèces marines (Daskalakis, 1996).

L'intervention d'un co-transport a été démontrée, en relation avec la complexation du Cd ou du Zn avec de petites molécules hydrophiles, notamment les acides aminés ou leurs précurseurs, le transport se faisant par les voies spécifiques d'entrée de ces molécules dans les cellules. Ainsi, par exemple, l'entrée du Zn dans la cellule intestinale est accrue en présence de cystéine (Viarengo, 1989 ; Glover *et al.*, 2003).

Par ailleurs, plusieurs études font état de l'utilisation par le cadmium des canaux calciques voltage-dépendants (exemple de diffusion facilitée) induisant une compétition entre les ions Cd^{2+} et Ca^{2+} du fait de l'homologie de l'encombrement moléculaire (rayon atomique de 0,97 et 0,99 Å respectivement). L'action d'un mécanisme Ca-dépendant dans la traversée des membranes biologiques par l'ion libre Zn^{2+} interviendrait dans les branchies. Cette entrée du Cd et/ou du Zn par une voie spécifique du Ca^{2+} est envisagée chez *Crassostrea virginica*, *Donax rugosus* et *Mytilus edulis* et ce, dans différents compartiments tissulaires. Elle semble impliquer les canaux calciques, sauf pour *Macoma balthica*, mais l'existence d'autres voies sont également suspectées (Roesijadi et Unger, 1993 ; Pedersen et Bjerregaard, 1995 ; Sidoumou *et al.*, 1997 ; Vercauteren et Blust, 1999 ; Wang et Fisher, 1999). Pour ce transport, notons que les processus physiologiques, comme par exemple l'osmorégulation, modulent également l'entrée des métaux et pour les organismes d'eau douce, la susceptibilité est accrue par la nécessité de concentrer le calcium dans un milieu hypotonique pour la calcification de la coquille, ce qui implique une activité intense des pompes à Ca^{2+} (Rainbow et Dallinger, 1993). Ainsi, si *Dreissena polymorpha* (moule zébrée d'eau douce) accumule de grandes quantités de métal dans les branchies, ce n'est pas le cas pour *Littorinea littorea* (bigorneau marin) (Herwig *et al.*, 1989 ; Soto *et al.*, 1998).

L'existence d'un transporteur protéique membranaire saturable pour le Cd a également été mise en évidence sur des cellules en culture par vidéo-microscopie de fluorescence (Gutknecht, 1983 ; Glover *et al.*, 2003). Simkiss et Taylor (1995) rapportent notamment la présence d'un processus de transport rapide et saturable, dans les conditions physiologiques dites normales, qui

serait inhibé par le Cd et le manganèse, alors que d'autres cations divalents tels que le Co^{2+} , Cu^{2+} ou Ni^{2+} seraient inactifs.

Pour le Cu, une diffusion passive a été mise en évidence au niveau de l'épithélium intestinal ; une Cu-ATPase, un co-transport $\text{Cu}^{2+}/\text{Cl}^-$ et la participation de canaux sodium dans le transport du cuivre ont été mis en évidence chez les poissons, mais les mécanismes permettant la traversée des barrières biologiques par ce métal chez les invertébrés restent encore indéterminés (Grosell *et al.*, 2002 ; Grosell et Wood, 2002 ; Bury *et al.*, 2003).

▪ *L'endocytose*

L'endocytose (phagocytose et pinocytose) joue un rôle important dans le transfert des métaux chez les organismes aquatiques (mollusques filtreurs, organismes fouisseurs, déposivores) susceptibles d'ingérer des matières en suspension associées aux contaminants (colloïdes, particules sédimentaires, algues, ...). L'internalisation des métaux complexés à partir de ce mécanisme a été décrite au niveau des branchies et de l'épithélium du manteau et semble être la voie majeure de transfert des métaux au niveau de la barrière intestinale (Depledge et Rainbow, 1990). Dans ce cas, elle survient après solubilisation (digestion extracellulaire et pinocytose), désorption (Fan et Wang, 2001) ou non (phagocytose et digestion intracellulaire) des particules nutritives ingérées (Roesijadi et Robinson, 1994 ; Ke et Wang, 2001). Ces mécanismes peuvent jouer un rôle important dans des milieux comme celui du Lot et de la Garonne, où les métaux sont majoritairement transportés sous forme particulaire, associés aux matières en suspension (Audry, 2003 ; Audry *et al.*, 2004a). Les éléments métalliques pénétrant par endocytose seront incorporés aux lysosomes puis relargués dans le cytosol. Cependant, l'efficacité de ces processus dépend de la nature des particules ou la composition des algues ingérées pour les filtreurs, en relation notamment avec le coefficient d'adsorption à la surface de ces éléments, induisant des capacités de transfert au travers de la barrière intestinale différentes selon le métal considéré (Davies *et al.*, 1997 ; Blackmore et Wang, 2004). Ainsi, pour le Cd, même si les capacités à traverser l'épithélium varient fortement en fonction des particules alimentaires, le transfert de ce métal reste globalement modéré par cette voie (Ettajani *et al.*, 2001), ce qui limite le phénomène de bioamplification le long des réseaux trophiques en milieu continental ou marin, contrairement au mercure, plus précisément sa forme mono-méthylée (Simon et Boudou, 2001 ; Peakall et Burger, 2003). Néanmoins, dans les premiers maillons à la base des réseaux trophiques, les bivalves montrent une certaine efficacité d'assimilation des

métaux à partir du phytoplancton au niveau duquel le métal est adsorbé ou absorbé (Ettajani *et al.*, 2001 ; Wang, 2002 ; Blackmore et Wang, 2004).

Mentionnons que la présence de mucus à la surface des organes en contact direct avec le milieu environnant (branchies, manteau chez les mollusques, épiderme chez les poissons, ...) peut constituer une barrière efficace à l'égard de l'accessibilité des métaux à la membrane plasmique, notamment par la présence d'acides sialiques (monosaccharide carboxylé) chargés négativement (Mason et Jenkins, 1995). Cependant, certaines espèces aquatiques sécrètent et ingèrent des particules enrobées de mucus à des fins nutritionnelles (mollusques filtreurs) ; d'autres absorbent du mucus par endocytose, provoquant, dans ce cas, une augmentation de l'incorporation du métal. L'absorption de Cd par ce procédé a été démontrée par Engel et Fowler en 1979, par microanalyse aux rayons X, au niveau du manteau de l'huître *Crassostrea gigas*.

1-2.2. MECANISMES DE TRANSPORT ET DE SEQUESTRATION INTRACELLULAIRE ET/OU TISSULAIRES DES METAUX CHEZ LES ANIMAUX AQUATIQUES – PROCESSUS D'ELIMINATION

La membrane apicale des cellules épithéliales franchie, les métaux sont pris en charge par deux systèmes principaux : (i) en premier lieu, ils peuvent traverser la cellule, le plus souvent associés aux ligands intracellulaires, et accéder ainsi à la membrane baso-latérale, où ils seront libérés dans le milieu circulant (sang ou hémolymphe) ou vers les cellules adjacentes. Ces mécanismes d'efflux vers le milieu circulant ou les cellules internes sont encore mal connus et mettraient en cause les transporteurs du calcium, contribuant ainsi au maintien du gradient de concentration de part et d'autre de la membrane apicale. A l'intérieur du milieu circulant, la fixation du Cd et Zn sur des protéines plasmatiques constituent une des formes de transport de ces métaux vers les organes des organismes aquatiques. Par exemple, chez le crabe *Carcinus maenas*, le Cd, comme le Zn, se fixe sur l'hémocyanine, le pigment respiratoire, mais se retrouve également associé à des molécules de faible taille ou sous forme d'ion libre dans les premiers temps d'exposition (Martin et Rainbow, 1998a ; Martin et Rainbow, 1998b) ; (ii) dans d'autres circonstances, les métaux peuvent subir une séquestration intracellulaire, interagissant avec des composants structuraux des membranes des organites et avec des composés cytosoliques. La **Figure 13** schématise l'ensemble de ces interactions apparaissant lors de l'accession d'un métal

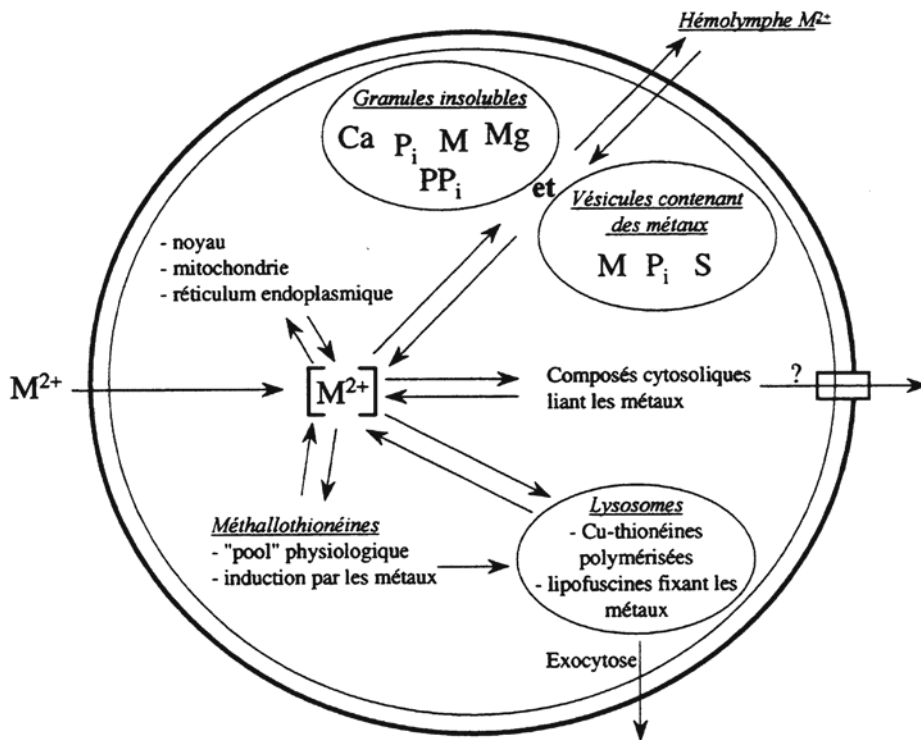


Figure 13 : Représentation schématique illustrant les interactions possibles des métaux avec les structures intracellulaires (d'après Viarengo, 1989).

M²⁺ au milieu intracellulaire. La contribution des différents compartiments à la séquestration intracellulaire est dépendante du niveau et du temps d'exposition, du type cellulaire, de l'espèce et du cycle de vie des organismes (Fowler, 1987 ; Wallace *et al.*, 2003 ; Shi et Wang, 2004).

A- La fixation des métaux sur des ligands intracellulaires

Au sein du cytosol, l'ensemble très diversifié de ligands susceptibles de complexer le Cd et le Zn, se caractérise essentiellement par la présence de groupements thiols. Ils sont portés par des acides aminés "libres" (cystéine), des peptides (glutathion) et des protéines dont les métallothionéines (MTs). Les métaux peuvent également se fixer sur les acides nucléiques au niveau de leurs groupements amines et exercer leur toxicité au travers de la perturbation structurale et fonctionnelle des chromosomes et de l'ADN (Viarengo, 1989).

Les métallothionéines constituent des ligands intracellulaires majeurs, dont le mécanisme de séquestration cellulaire est actuellement très étudié (Nordberg, 1998). Ce sont des protéines de faible poids moléculaire (6 à 7 kD) intervenant dans la régulation homéostatique des métaux essentiels, comme le Cu et le Zn. Elles exerceraient également une action protectrice vis-à-vis des métaux toxiques, par leurs capacités à fixer les métaux au niveau de résidus de cystéines regroupés au sein de "clusters" globulaires. Mentionnons que nous développerons plus en détails les propriétés structurales et fonctionnelles de ces protéines, leurs rôles biologiques et leur mécanisme d'induction dans le paragraphe 1-3. "*Les métallothionéines*" de ce chapitre (page 28).

B- La séquestration des métaux dans des structures compartimentées

A l'ensemble des complexes intracellulaires formés avec des ligands cytosoliques, s'ajoute la séquestration des métaux absorbés dans des structures compartimentées. Elle met à contribution le système lysosomal ou la précipitation sous forme de granules ou concrétions insolubles, limitant de ce fait la dispersion du métal au sein de la cellule et favorisant son élimination.

a. La séquestration des métaux dans les lysosomes

La séquestration des métaux dans les lysosomes constitue une voie majeure de stockage et de détoxification non spécifique à l'égard des métaux. Deux mécanismes permettent

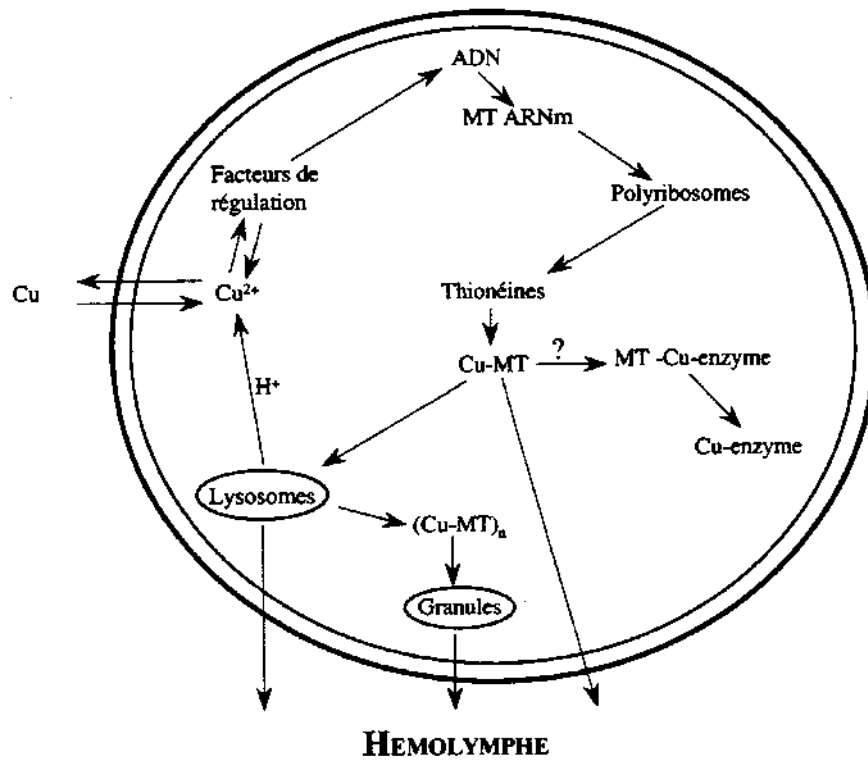


Figure 14 : Rôle des métallothionéines (MTs) dans la régulation cellulaire du cuivre (d'après Bremmer, 1987).

l'accumulation des métaux dans les lysosomes : la fixation par les MTs et l'association à la lipofuscine, issue de la digestion des macromolécules cellulaires dont la peroxydation des lipides (George, 1988 ; Viarengo, 1989). La compartimentation dans les lysosomes à partir du complexe métal-MT, particulièrement stable à l'égard de la protéolyse en comparaison avec l'apoprotéine (Klaassen *et al.*, 1994), est connue pour le Cu dans les cellules de la glande digestive des bivalves (**Figure 14** – Bremmer 1987). A partir du complexe Cu-MT incorporé, des phénomènes d'oxydation et de polymérisation créent un polymère insoluble formé par l'élaboration de ponts disulfures, qui constitue une forme de stockage pour le Cu, induisant l'accumulation du métal dans le système lysosomal (Bremmer, 1987 ; Viarengo *et al.*, 1989). Pour le Zn, le pH acide régnant dans ces organites (pH 5) déstabilise le complexe Zn-MT et libère le métal, facilitant l'hydrolyse de la protéine par les cathepsines, des protéases fonctionnant à pH acide (Viarengo *et al.*, 1989 ; Klaassen *et al.*, 1994). Dans la lumière des lysosomes, notamment tertiaires, le pigment lipoprotéique insoluble que constitue la lipofuscine, forme des granules insolubles, notamment dans les reins (**Figure 15** – George, 1983) et la glande digestive des moules (Domouhssidou et Dimitriadis, 2000). Cette complexation limite ainsi la dispersion des métaux dans la cellule, les rendant indisponibles, sous une forme moins toxique. Notons que la quantité de granules de lipofuscine dans la glande digestive des invertébrés marins augmente avec l'exposition aux polluants et avec l'âge (Viarengo et Nott, 1993). Une excrétion des corps résiduels élimine ensuite les granules formés par la polymérisation des complexes métal-MT et les agrégats de lipofuscine du système vacuolaire lysosomal (Viarengo *et al.*, 1981).

Ces mécanismes de séquestration lysosomale sont susceptibles de concerner l'ensemble des métaux fixés sur des colloïdes de la fraction dissoute de la colonne d'eau (taille < 0,45 µm) ou des particules absorbées par endocytose (taille > 0,45 µm) par les cellules épithéliales des invertébrés aquatiques (branchies, manteau, épithélium intestinal), et ceci après fusion des vésicules endocytiques avec les lysosomes (Soto *et al.*, 1998 ; Marigomez *et al.*, 2002). Par l'intermédiaire du carbone organique dissous, cette voie d'accumulation est non négligeable pour le Cd chez les bivalves d'eau douce comme *D. polymorpha* ou les huîtres (Roditi *et al.*, 2000 ; Guo L *et al.*, 2001). La déstabilisation des membranes des lysosomes en réponse à différents stress, dont l'exposition aux métaux, est un marqueur aujourd'hui largement utilisé chez les bivalves (Marigomez *et al.*, 1996 ; Ringwood *et al.*, 1998 ; Lekube *et al.*, 2000 ; Domouhssidou *et al.*, 2004).

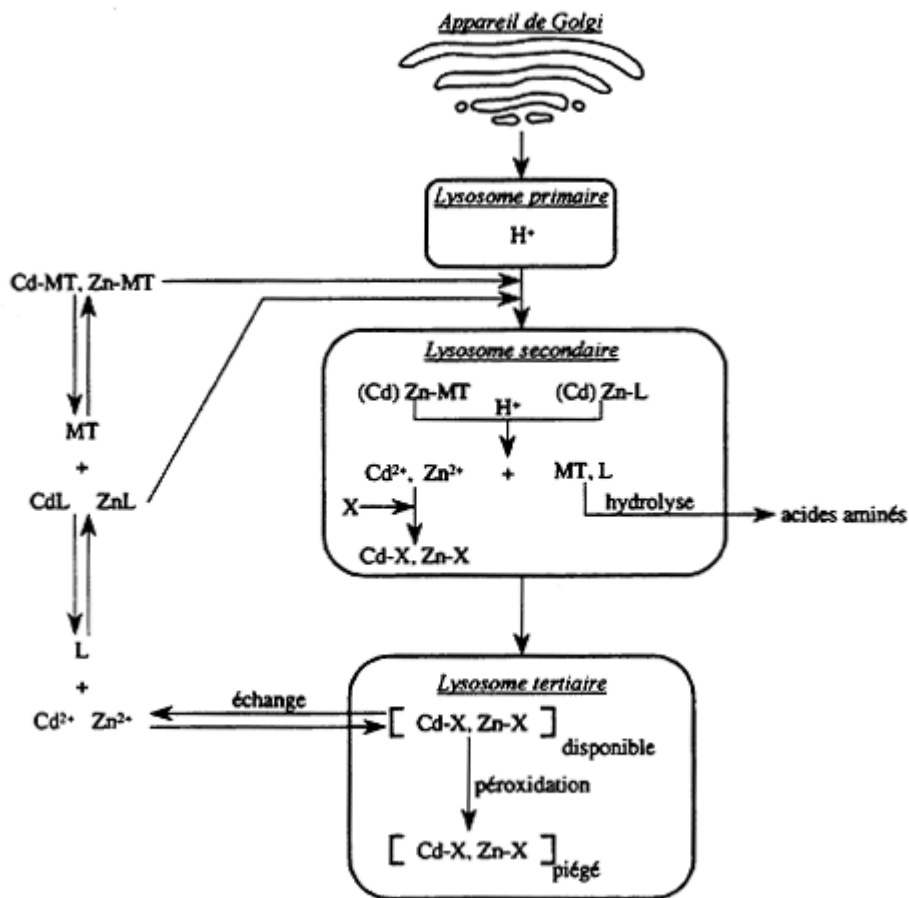


Figure 15 : Voie métabolique du cadmium et du zinc dans les cellules rénales de *Mytilus edulis* (George, 1983).

L'accumulation du métal est contrôlée par la concentration en ligands disponibles, MT (méthallothionéines), et L (acides aminés, protéines, ...). Les lysosomes primaires absorbent les complexes métalliques et forment les lysosomes secondaires. Le métal est relargué sous l'action du pH (conditions acides), les protéines sont hydrolysées et le contenu vacuolaire devient neutre. Les métaux se lient au ligand X. Dans les lysosomes tertiaires, certains métaux peuvent être échangés avec des ligands X et cytoplasmiques, disponibles. Le reste est physiquement piégé par peroxydation lipidique pour former des granules de lipofuscine.

b. La séquestration des métaux dans les granules ou concrétions insolubles (sphéro-cristaux)

Parallèlement à cette séquestration lysosomale, une partie des métaux absorbés est précipitée sous forme de granules ou concrétions minérales insolubles dans le cytosol. Généralement associés aux tissus digestif et excréteur chez les invertébrés (intestin moyen, glande digestive, hépatopancréas, reins), ces précipités minéraux, d'un diamètre de 0,2 à 3 µm, sont majoritairement composés de carbonates et phosphates de calcium (George, 1982 ; Viarengo et Nott, 1993). Les granules de carbonates de Ca constituent surtout un stock remobilisable de calcium. Les phosphates de Ca joueraient un rôle important dans la détoxification des métaux, dans des proportions plus faibles pour le Cd que pour le Zn (Mason et Jenkins, 1995). L'induction de ces structures granuleuses n'est pas, à ce jour, élucidée ; néanmoins, le système lysosomal serait impliqué dans leur formation (George, 1982). Dans les granules de phosphates de Ca formés par ce système, le Cd et le Zn se lient faiblement et de manière réversible à la lipofuscine par un processus passif d'adsorption (George, 1983).

Ces structures participent à la détoxification des métaux intracellulaires. Elles jouent notamment un rôle important dans la séquestration du Cd, du Zn et du Cu chez les bivalves d'eau douce tels que *Hydriella depressa* ou *Pyganodon grandis* (Adams *et al.*, 1997 ; Bonneris *et al.*, 2005).

c. Les hémocytes

Mentionnons de plus chez les invertébrés, l'existence des hémocytes (cellules amiboïdes), circulant à l'intérieur ou à l'extérieur des tissus ou dans l'hémolymphe, capables de séquestrer et transporter les métaux (Robinson *et al.*, 1997). Ils phagocytent des corps étrangers, des cellules mortes et des protéines dénaturées, et concentrent ainsi les métaux dans leurs lysosomes sous forme de produits non digestibles (George, 1988 ; Marigomez *et al.*, 2002). Le Cd et Zn rejoignent ainsi les organes de stockage et de détoxification comme la glande digestive, les reins et certaines de leurs cellules cibles (cellules digestives, cellules brunes) très étudiées en histochimie et techniques micro-analytiques associées pour la localisation et la quantification des métaux (Soto *et al.*, 1997 ; Marigomez *et al.*, 2002). Cependant, la fixation des métaux sur les protéines circulantes représenterait le mécanisme de transport majeur vers les organes par analogie avec le Ca transféré vers le manteau pour la formation de la coquille (Mason et Jenkins, 1995).

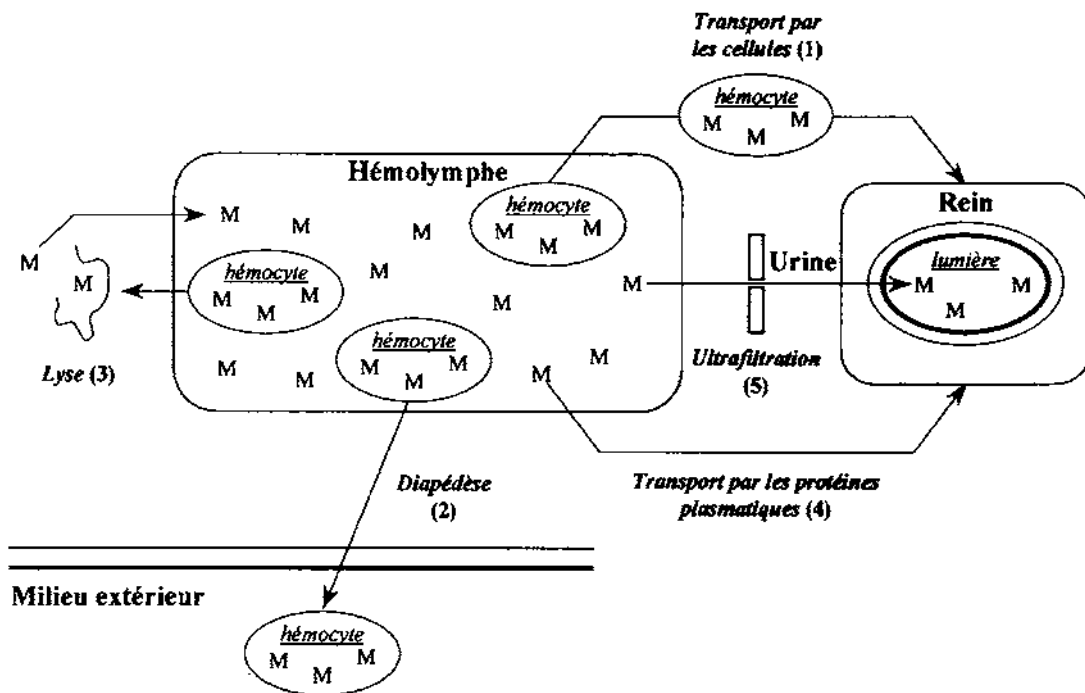


Figure 16 : Différentes voies d'élimination des métaux chez les bivalves (d'après Roesijadi et Robinson, 1994).

Les métaux (M) sont présents dans les hémocytes et le plasma. La voie (1) suggère que les hémocytes les transportent dans des vacuoles intra-cellulaires vers le rein ou d'autres tissus. Le transfert à ces tissus se fait selon des mécanismes encore inconnus. Les hémocytes réduisent également les quantités métalliques par le processus de diapédèse (2). Mais les métaux peuvent demeurer simplement séquestrés dans un hémocyte. Ils sont relargués vers le plasma suite à la lyse cellulaire (3). Le plasma sanguin joue un rôle important dans le transport des métaux (4). Enfin, l'urine primaire produite par ultrafiltration (5) transporte une faible proportion des métaux contenus dans le plasma, susceptibles d'être ensuite absorbés par les cellules rénales.

C- Mécanismes d'élimination des métaux

L'élimination des métaux se fait par les voies rénales et digestives (Roesijadi et Robinson, 1994). La **Figure 16** illustre les diverses voies d'élimination des métaux chez les bivalves.

Ainsi, le Cd et le Zn utilisent la voie rénale d'élimination chez les mammifères et les poissons. Chez les bivalves, des sites potentiels d'ultrafiltration ont été identifiés, comme les glandes péricardiques chez *D. polymorpha* (Giamberini et Pihan, 1996). Cependant, l'ultrafiltration ne permettrait pas l'excrétion de molécules de taille inférieure à 45 kD, alors que la grande majorité des métaux est fixée aux protéines plasmatiques plus petites (Roesijadi et Robinson, 1994).

La voie des pseudofèces, chez les invertébrés aquatiques, correspond au relargage des corps résiduels du tissu digestif, par exocytose au niveau des cellules de la glande digestive, durant la dernière phase du cycle digestif normal (Morton, 1983).

Quant aux métaux séquestrés à l'intérieur des hémocytes des mollusques, ils sont éliminés par migration depuis les tissus intestinaux, à travers la barrière épithéliale, vers la lumière du tube digestif ou vers l'eau environnante par le mécanisme de diapédèse (Roesijadi et Robinson, 1994).

Mentionnons également les phénomènes de mues dans "l'excrétion des métaux" chez les organismes aquatiques possédant un exosquelette ou une exocuticule, ainsi que l'élimination des métaux par la coquille des mollusques, la dentition et la sécrétion du byssus (Mason et Jenkins, 1995).

La **Figure 17** résume, à partir de l'exemple de la moule marine *Mytilus galloprovincialis*, l'ensemble des mécanismes impliqués dans l'absorption, les transferts, la séquestration et l'excrétion des métaux (Cd et Zn).

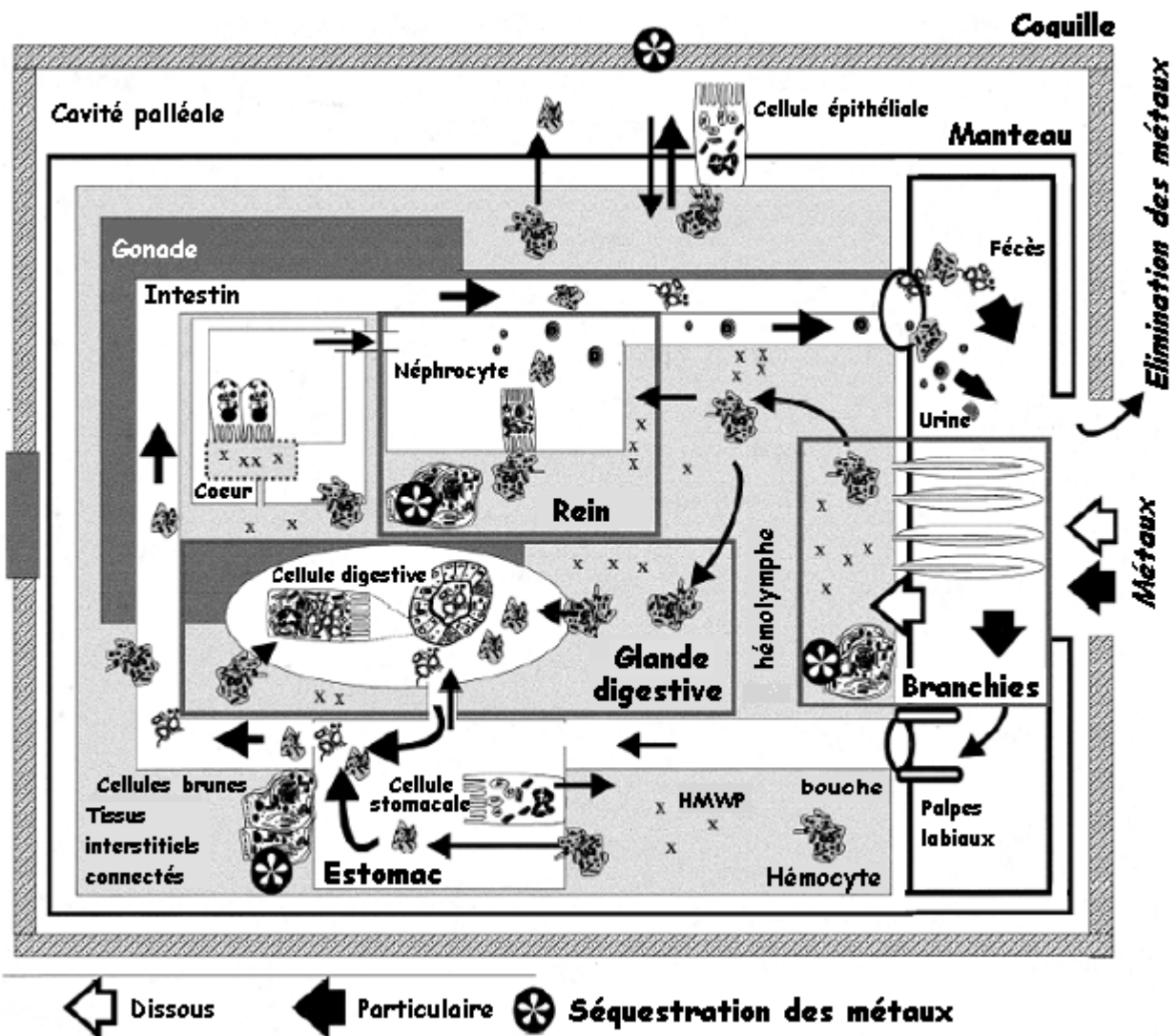


Figure 17 : Schéma illustrant les voies utilisées par le Cd et le Zn au travers des tissus des moules (*Mytilus galloprovincialis*), avec l'indication des tissus et des cellules impliqués dans l'entrée, le stockage et l'excrétion des métaux (Marigomez et al., 2002, modifié).

Le Cd et le Zn dissous pénètrent par les branchies, tandis que les formes particulaires de ces éléments entrent par l'intestin. Dans les branchies, le manteau, le pied, et l'estomac, les métaux sont directement incorporés à partir des hémocytes et des cellules brunes ou des ligands du plasma sanguin (par exemple, HMWP, protéines de haut poids moléculaire) qui peuvent être à nouveau incorporés aux cellules brunes. Une majeure partie des métaux particulaires associés à la nourriture passe vers l'intestin ou sont traités dans les cellules digestives. De plus, des métaux sont transportés par l'intermédiaire des hémocytes, des cellules de pore, et du plasma sanguin vers le rein et la glande digestive et transférés aux néphrocytes et aux cellules digestives. De plus, les métaux liés à HMWP peuvent atteindre le rein après ultrafiltration au niveau du cœur. Les métaux sont ensuite éliminés selon trois voies complémentaires : 1) en même temps que les concrétions excrétoires des néphrocytes comme composants d'urine ; 2) en même temps que le contenu des lysosomes digestifs excrétés comme composants des fécès ; et 3) à la fois dans l'urine et les fécès en raison de la diapédèse des hémocytes et des cellules brunes à travers l'épithélium de la glande digestive, de l'intestin, et du rein. Le Cd est en grande partie accumulé dans l'intestin et le rein. En revanche, le Zn présent dans les branchies et l'intestin est rapidement transporté probablement vers le rein, tandis que le Zn associé au manteau reste séquestré dans les hémocytes pendant une longue période. L'itinéraire excrétoire principal pour le Zn se fait par l'intermédiaire de l'urine, sous forme particulaire. Un mécanisme additionnel est la séquestration des métaux dans les cellules brunes au niveau de grands faisceaux à l'intérieur du tissu connectif interstitiel dans le pied, l'estomac, l'intestin, et le tissu de la glande digestive. Des métaux peuvent être incorporés à la coquille par des interactions entre les hémocytes et les cellules épithéliales du manteau aussi bien que par la diapédèse des hémocytes vers la cavité palléale.

1-3. LES METALLOTHIONEINES

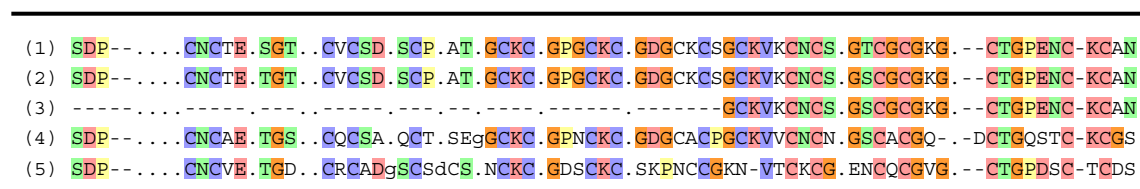
Isolées pour la première fois en 1957 par Margoshes et Vallee, à partir du cortex de rein de cheval, les métallothionéines (MTs) ont été d'abord décrites comme des protéines responsables de l'accumulation du Cd dans les reins de mammifères, en tant que ligands spécifiques de ce métal ("Cd-binding proteins"). Leur rôle prépondérant dans le métabolisme cellulaire des métaux essentiels ne fut révélé que bien plus tard, au terme de nombreux travaux (Kägi, 1991). Elles interviennent en effet, au niveau cellulaire, dans la détoxification des éléments essentiels revêtant un caractère toxique lorsqu'ils sont présents en excès (Zn, Cu), et de par leurs propriétés thiolooprives non spécifiques, dans celle des métaux toxiques à caractère non-essentiel (Cd, Hg, Ag,...). Elles assureraient ainsi une tolérance aux métaux lourds chez certaines populations d'organismes aquatiques, vivant dans un environnement faiblement contaminé. Ubiquistes à l'échelle du règne animal, ces protéines ont été identifiées chez les vertébrés et les invertébrés, mais également chez les végétaux, les champignons, les microorganismes eucaryotes et chez quelques procaryotes (Kägi, 1991 ; Roesijadi, 1992).

1-3.1. STRUCTURE ET CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES DES METALLOTHIONEINES

La structure des MTs est à ce jour connue et reconnue (Hamer, 1986 ; Maroni, 1990). Sa détermination a fait l'objet de nombreuses études utilisant l'ensemble des techniques complémentaires disponibles permettant l'analyse de la protéine elle-même (spectroscopie UV, résonance magnétique nucléaire ou RMN, séquençage des acides aminés, protéolyses partielles, cristallographie aux rayons X - Stillman, 1995) ou par déduction à partir des ADN complémentaires (ADNc) de MT ou des ARN messagers (ARNm).

ECHINODERMES	<i>Paracentrotus lividus</i>	Oursin	Scudiero et al., 1995	
	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Oursin	Nemer et al., 1985	
			Wang et al., 1994	
			Riek et al., 1999	
CRUSTACES	<i>Callinectes sapidus</i>	Crâbe bleu	Brower et al., 1995	
			Narula et al., 1995	
	<i>Carcinus maenas</i>	Crâbe vert	Pedersen et al., 1994	
	<i>Homarus americanus</i>	Homard	Brower et al., 1989	
BIVALVES	<i>Dreissena polymorpha</i>		Sczekan et al., 1996	
	<i>Crassostrea gigas</i>	Huître du Pacifique	Tanguy et al., 2001	
			Tanguy et al., 2002	
	<i>Mytilus edulis</i>	Moule	Mackay et al., 1993	
			Barsyste et al., 1999	
			Ceratto, 2002	
	<i>Perna viridis</i>	Moule verte tropicale	Khoo and Patel, 1999	
	<i>Ruditapes decussatus</i>	Palourde	Simes et al., 2003	
	<i>Crassostrea virginica</i>	Huître	Roesijadi et al., 1989	
Unger et al., 1991				
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Moule	Pavicic et al., 1991	classe II	
		Ceratto, 2002		
<i>Macoma Balthica</i>	Telline	Rigaa, 1998	classe II	
GASTEROPODES	<i>Littorina littorea</i>	Bigorneau	English et Storey, 2003	
	<i>Littorina brevicula</i>	Bigorneau	Park et al., 2002	classe II
		Ryuet al., 2003		

Tableau 3 : Principales références des métallothionéines séquencées parmi les espèces d'invertébrés aquatiques.



- (1) Cg MT1 (2-67)
(2) Cg MT2 (2-67)
(3) #Cg MT2 (72-99) } Cg MT2 : 2 clusters β
(4) Cg MT3 (2-68)
(5) Dp MT (2-68)

Figure 18 : Comparaison entre les séquences d'acides aminés des métallothionéines de *Crassostrea gigas* (Cg) et de *Dreissena polymorpha* (Dp).

Les nombres entre parenthèses indiquent la position des acides-aminés.
A-Ala ; R-Arg ; N-Asn ; D-Asp ; C-Cys ; Q-Gln ; E-Glu ; G-Gly ; H-His ; I-Ile ; L-Leu ; K-Lys ; M-Met ; F-Phe ; P-Pro ; S-Ser ; T-Thr ; W-Trp ; Y-Tyr ; V-Val ; B-Asx ; Z-Glx ; X-Xaa.

Les principales propriétés biochimiques des MTs découlent de différentes caractéristiques structurales observées principalement chez les mammifères. Ce sont des protéines cytosoliques de faible poids moléculaire, allant de 6 à 7 kD (61 à 62 acides aminés). Elles présentent un pourcentage élevé en résidus "cystéine" (Cys- acide aminé soufré), compris entre 30 et 35%, avec une absence d'acides aminés aromatiques, leur conférant une absorption UV spécifique et maximale à 254 nm et nulle pour une longueur d'onde de 280 nm. L'ensemble de ces résidus "cystéine" se répartit sous forme de motifs récurrents et invariants au sein de séquences peptidiques relativement spécifiques : Cys-X-Cys, Cys-X-X-Cys, Cys-X-Y-Cys et Cys-Cys, où X et Y représentent des acides aminés (Hamer, 1986 ; Maroni, 1990 ; Roesijadi, 1992). Chez la plupart des organismes, les MTs sont soumises à un polymorphisme génétique induisant de multiples isoformes, différenciées par leur séquence en acides aminés (position et nombre de résidus Cys), mais sans réelles divergences fonctionnelles (Winge et Thrower, 1988 ; Waalkes et Goering, 1990). Le contenu cellulaire de chacune d'elles varie chez les mammifères (Hamer, 1986) ; cependant deux isoformes majeures se distinguent, généralement appelées MT1 et MT2.

Les MTs sont, de plus, subdivisées en trois classes, selon certaines de leurs caractéristiques structurales, notamment leur composition en acides aminés (Fowler *et al.*, 1987 ; Kojima, 1991):

Classe I ("MTs" proprement dites) : polypeptides dont la structure primaire et la localisation des résidus Cys est très proche de celle de la MT de rein de cheval (mammifères, poissons, crustacés, mollusques) ;

Classe II ("MTs-like") : protéines dont la teneur relative et la position des résidus Cys diffèrent de celle de la MT de rein de cheval (échinodermes, levures) ;

Classe III : polypeptides atypiques, possédant des liaisons métal-thiol, mais dont la synthèse est non transcriptionnelle, telles la cadystine, les phytochélatines, les phytochélatines et les homophytochélatines (Mason et Jenkins, 1995).

Pour les invertébrés aquatiques, les séquences des MTs apparaissent très similaires à celles de plusieurs espèces de mammifères (Maroni, 1990). A notre connaissance, plusieurs séquences d'acides aminés ont été caractérisées chez des espèces marines et dulçaquicoles et montrent des homologies (**Tableau 3 et Figure 18**). Chez les crustacés, mollusques et échinodermes, elles appartiennent aux classes I et II.

Les analyses de séquençage indiquent que les MTs, par leur constitution en acides aminés, développent une forte capacité de fixation des métaux (propriétés thiolooprives), au

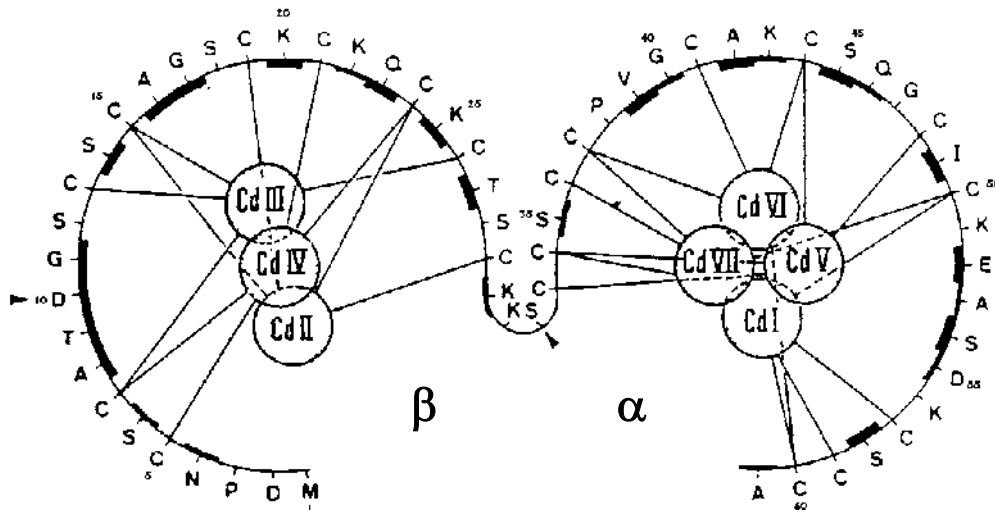


Figure 19 : Représentation schématique en deux dimensions des clusters β et α de la métallothionéine 2 de rat, liant 3 et 4 atomes de Cd respectivement, en coordination tétraédrique avec les cystéines (Maroni, 1990).

Les portions en trait fin représentent les acides aminés invariants des MTs de vertébrés ; les plus épaisses indiquent les régions variables. Les flèches mentionnent la position des deux introns du gène correspondant. A-Ala ; N-Asn ; D-Asp ; C-Cys ; Q-Gln ; E-Glu ; G-Gly ; I-Ile ; K-Lys ; M-Met ; S-Ser ; T-Thr ; V-Val ; Y-Tyr

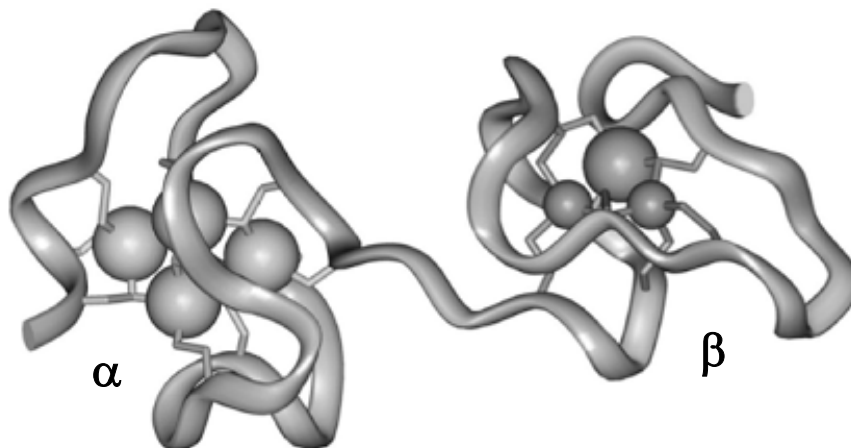


Figure 20 : Structure cristalline d'une Cd5Zn2-MT2 de foie de rat. Les résidus 1 à 30 forment un cluster Cd1Zn2Cys9 dans le domaine N-terminal β et les résidus 31 à 61 un cluster α en position C-terminale contenant Cd4Cys11 (Robbins, 1991; Romero-Isart et Vasak, 2002).

niveau de domaines de liaison de structure globulaire et indépendants : "clusters" β (résidus 1-30, terminaison aminée) et α (résidus 31-61, terminaison carboxylée) (**Figure 19**). La structure classique des MTs est une structure β - α . L'étude de la structure tridimensionnelle de la protéine, par des techniques de RMN et par diffraction aux rayons X pour un nombre relativement limité d'espèces, a montré que les ions métalliques au niveau de ces domaines de liaison sont relativement bien isolés du milieu extérieur par la chaîne peptidique flexible, à l'exception de deux profondes ouvertures (**Figure 20**), qui permettent un accès direct aux structures "métal-thiol" de chaque domaine (Kägi, 1993 ; Couillard, 1997).

Une molécule de MT de mammifère, dite "saturée", peut fixer ainsi un maximum de 7 atomes de Cd(II) ou de Zn(II) en coordination tétraédrique par liaison covalente avec les groupements thiols (-SH) des résidus Cys. Des fixations polymétalliques peuvent également survenir. D'un encombrement moléculaire moindre, le Cu(I) peut être fixé à raison de 11 à 12 atomes ; 12, 17 voire 18 atomes pour l'Ag(I). Le nombre exact d'atomes de Hg(II) susceptibles d'être séquestrés par ces molécules a longtemps fait l'objet d'une controverse dans la littérature, les chiffres allant de 7 à 10, voire 12, selon les auteurs ; cependant, le nombre de 7 semble être le plus probable (Vasák, 1991). Le cluster α , à terminaison carboxylée, peut lier 4 atomes de Cd, Zn ou Hg, ou 5 à 6 atomes de Cu au niveau des 11 Cys. Le cluster β , à terminaison aminée et contenant 9 Cys, peut fixer 3 atomes de Cd, Zn ou Hg, ou 6 atomes de Cu (Hamer, 1986 ; Maroni, 1990 ; Roesijadi, 1992).

Si l'homologie de la structure protéique des MTs entre les invertébrés aquatiques et les mammifères est évidente pour la plupart des espèces, certaines différences néanmoins apparaissent avec par exemple : (i) l'inversion de l'ordre de la séquence par rapport aux mammifères est assez récurrente chez les invertébrés donnant un domaine α en position N-terminale et un domaine β en position C-terminale (Nemer *et al.*, 1985). Cette modification n'altère cependant pas l'affinité du Cd pour les sites ou l'arrangement de la chaîne polypeptidique autour des atomes métalliques (Riek *et al.*, 1999) ; (ii) chez *Callinectes sapidus*, le crabe bleu, seulement 6 atomes de Cd sont fixés au niveau de 18 Cys (3 atomes de Cd par cluster) contre 7 chez les mammifères pour 20 Cys (Narula *et al.*, 1995) ; (iii) chez l'huître *C. gigas*, le séquençage de l'isoforme CgMT2 a révélé une duplication d'exon (**Figure 18**), conférant un troisième domaine de liaison (un second cluster β) et une capacité supérieure de fixation des métaux (Tanguy et Moraga, 2001). De même, certaines isoformes de MTs chez *C. virginica* possèdent uniquement 1 à 4 clusters α (Jenny *et al.*, 2004).

Cependant, dans la configuration classique à deux domaines β - α , 8 groupements thiols sont liés chacun à deux ions métalliques pour le Cd, formant des ponts entre deux atomes voisins, alors

Induction *in vitro*

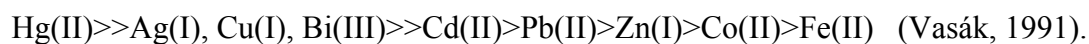
metals: Cd, Zn, Mg, Cu, etc.
acetaminophen
alkylating agents
azacytidine
butyric acid
carbon tetrachloride
carrageenan
chloroform
dextran
bis(ethylhexyl)phthalate
endotoxin
estradiol
ethanol
ethionine
formaldehyde
2-propanol
glucocorticoids
catecholamines
interleukin 1
interferon

Induction *in vivo*

- ▶ Metal ions
Cd, Zn, Cu, Hg, Au, Ag, Co, Ni, Bi
- ▶ Hormones and second messengers
Glucocorticoids
Progesterone
Estrogen
Catecholamines
Glucagon
Angiotensin II
Arg-Vasopressin
Adenosine
cAMP
Diacylglycerol
Ca
- ▶ Growth factors
Serum factors
Insulin
IGF-1
EGF
- ▶ Inflammatory agents and cytokines
Lipopolysaccharide (LPS)
Carrageenan
Dextran
Endotoxin
Interleukin-1
Interleukin-6
Interferon- α
Interferon- γ
Tumor necrosis factor
- ▶ Tumor promoters and oncogenes
Phorbol esters
ras
- ▶ Vitamins
Ascorbic acid
Retinoate
1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃
- ▶ Antibiotics
Streptozotocin
Cycloheximide
Mitomycin
- ▶ Cytotoxic agents
Hydrocarbons
Ethanol
Isopropanol
Formaldehyde
Fatty acids
Butyrate
Chloroform
Carbon tetrachloride
Bromobenzene
Iodoacetate
Urethane
Ethionine
Di(2-ethylhexyl)phthalate
 α -Mercapto- β -(2-furyl)acrylate
6-Mercaptopurine
Diethylthiocarbamate
Penicillamine
2,3-Dimercaptopropanol
2,3-Dimercaptosuccinate
EDTA
5-Azacytidine
Acetaminophen
Indomethacin
- ▶ Stress-producing conditions
Starvation
Infection
Inflammation
Laparotomy
Physical stress
X-irradiation
High O₂ tension
Ultraviolet radiation

Tableau 4 : Liste des substances capables d'induire la synthèse des métallothionéines, après traitement *in vitro* de cellules en culture (Waalkes et Goering, 1990) ou *in vivo* (Kägi, 1991).

que les 12 thiols restants jouent le rôle de ligands terminaux, avec des liaisons de coordination simples. Il en résulte des constantes d'association entre les atomes et les MTs très élevées. Une échelle d'affinité a été ainsi établie *in vitro* :



La complexation avec un métal donné n'est donc pas statique, et elle peut être modifiée en présence d'un autre métal ayant une affinité plus élevée. A titre d'exemple, les constantes d'affinité du Cd et du Zn, déterminées par titration spectroscopique, sont respectivement de 10^{22} et 10^{18} (Mason et Jenkins, 1995). Les constantes de dissociation entre les métaux et la molécule de MT sont faibles. Ainsi, les échanges de métaux entre différentes MTs ou au sein d'une même molécule, peuvent être très rapides (Vallee et Falchuk, 1993 ; Couillard, 1997). Mentionnons que les métaux peuvent être décrochés de la molécule sous l'action du pH, mais pour un niveau d'acidification généralement élevé ($\text{pH} \leq 2,5$), laissant libre l'apoprotéine ("free metal protein"), qui résiste à un pH proche de 1, sans dénaturation (Riordan et Vallee, 1991). Notons que dans sa structure tertiaire, l'apoprotéine est une chaîne linéaire.

Mentionnons que ces protéines sont également thermostables, capables de résister à des températures de l'ordre de 95 à 100°C, pendant environ 5 minutes.

1-3.2. REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE LA SYNTHÈSE DES METALLOTHIONEINES

L'accumulation cellulaire des MTs dépend à la fois de l'expression des gènes *mt*, de la traduction de leurs ARN messagers et de la dégradation de la protéine.

La régulation de la synthèse répond à une induction de type transcriptionnelle. La biosynthèse des MTs en réponse aux métaux lourds fut décrite pour la première fois en 1964 par Piscator (Hamer, 1986). Depuis, cette forme de régulation a été reconnue chez toutes les espèces capables de synthétiser des MTs et dans de nombreux tissus et types cellulaires différents, en réponse à diverses substances autres que les métaux (**Tableau 4**).

De nombreuses recherches ont ensuite révélé la multiplicité des facteurs intervenant dans la régulation transcriptionnelle des gènes *mt*, incluant notamment les hormones, les glucocorticoïdes, l'interféron, les cytokines, les agents cytotoxiques et les conditions de stress,

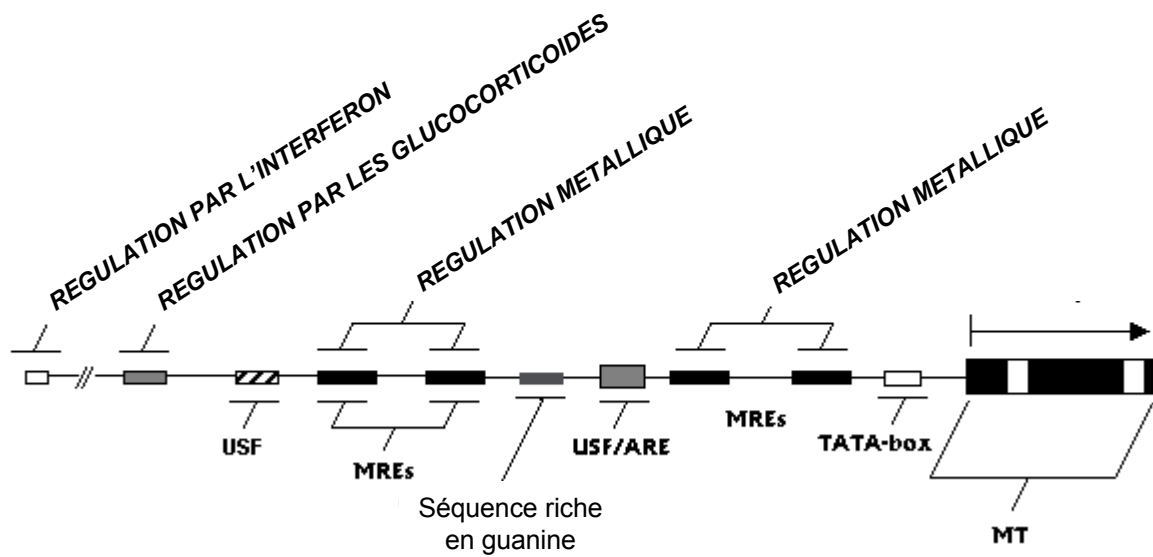


Figure 21 : Construction classique d'un gène codant pour une métallothionéine de mammifère (Hamer, 1986 ; Roesijadi, 1992 ; modifié selon Daniels et Andrews, 2003).

USF : "Upstream Stimulatory Factor"

MRE : "Metal Responsive Element"

USF/ARE : séquence composite "Upstream Stimulatory Factor / Antioxidant Response Element"

TATA-box : site de fixation d'une sous-unité de l'ARN polymérase

dont le stress oxydant, *in vivo* (**Tableau 4**). L'expression des gènes *mt* est modulée par ces médiateurs, physiologiques ou non, à partir de plusieurs éléments de réponse présents dans le promoteur des gènes, potentiellement activés par plusieurs facteurs : les éléments de réponse aux métaux ("Metal Responsive Elements", MREs), les éléments de réponse antioxydante ("Antioxydant Response Elements", ARE), aux glucocorticoïdes ("Glucocorticoid Regulatory Elements", GREs). La **Figure 21** montre la constitution classique d'un gène codant pour une MT de mammifère et la **Figure 22** les voies possibles pour la transcription induite des gènes *mt* par le cadmium et le zinc.

A- Induction à partir des éléments de réponse aux métaux (MREs)

a. Les éléments de réponse aux métaux (MREs)

La région promotrice des gènes *mt* possède, dans les premières 150 paires de bases (pb), un à plusieurs éléments (6 au maximum chez la souris - Haq *et al.*, 2003) de réponse aux métaux (MREs) en amont de la boîte TATA (Stuart *et al.*, 1985 ; Andrews, 2000). La séquence de la région centrale de ces éléments est relativement bien conservée (TGCRNC avec R = G ou A et N = G, A, T ou C), tandis qu'elle diffère quelque peu aux extrémités. Les multiples copies de MRE dans un promoteur peuvent agir coopérativement (Imbert *et al.*, 1990). La caractérisation des gènes *mt* chez les bivalves a permis de mettre en évidence la présence de ces séquences consensuelles dans les promoteurs, au nombre d'une copie, comme par exemple dans le promoteur du gène *CgMT2* de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, ou bien de plusieurs copies, comme pour *CgMT1* (2 MREs). Les MREs constituent des sites de fixation pour un facteur de transcription appelé MTF-1 chez les mammifères ("MRE-binding transcription factor-1" ou "Metal Transcription Factor-1") (Radtke *et al.*, 1993 ; Heuchel *et al.*, 1994 ; Jiang H *et al.*, 2003).

b. Le facteur de transcription MTF-1

Le facteur de transcription MTF-1 est une protéine contenant 6 domaines de fixation à doigts de zinc de type Cys₂-His₂ et hautement conservés, des insectes aux mammifères (drosophile, poisson ballon, poisson zèbre, souris, homme). Le facteur homologue chez les bivalves n'a pas encore été isolé (Dalton *et al.*, 2000 ; Andrews, 2001). Les mécanismes de translocation de ce facteur vers le noyau sont encore mal connus (Andrews, 2001). Seuls les trois doigts de Zn sont impliqués dans la fixation à l'ADN (Bittel *et al.*, 2000). Notons que l'existence de répresseurs a également été proposée pour réguler la transcription de ces gènes (Haq *et al.*,

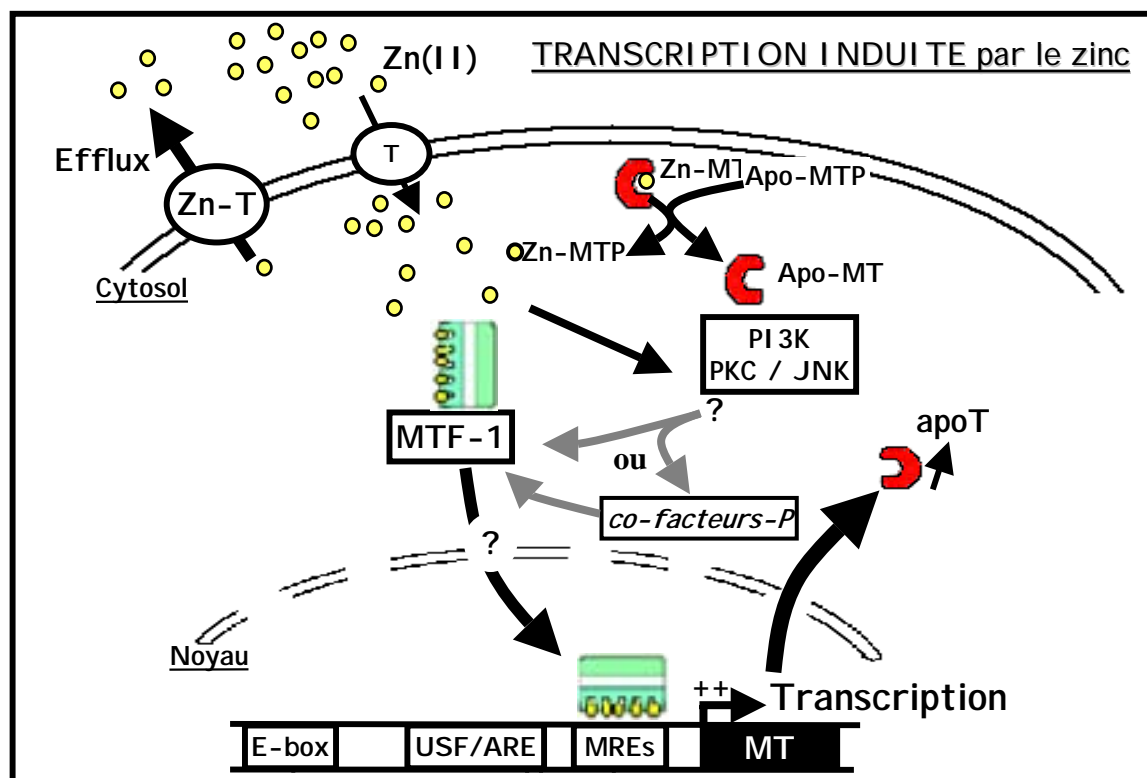
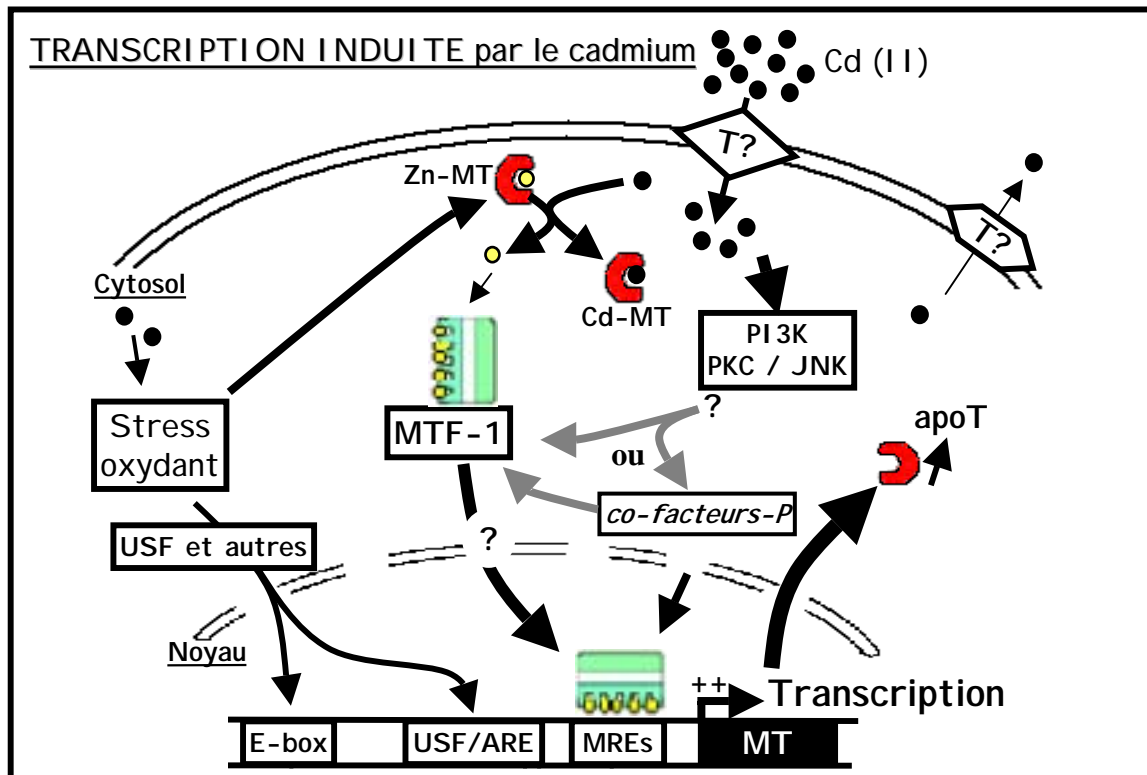


Figure 22 : Modèle pour l'induction de l'expression des gènes de métallothionéines par le cadmium et le zinc chez les mammifères.

T : transporteur

co-facteurs-P : co-facteurs phosphorylés

PKC : protéine kinase C

JNK : c-Jun N-terminal kinase

MREs : Metal Responsive Elements

USF/ARE : "Upstream Stimulatory Factor / Antioxidant Response Element "

PI3K : phosphoinositol- 3 kinase

MTF-1 : Metal Transcription Factor-1

USF : Upstream Stimulatory Factor

apoT : apothionéine

2003), tels que le facteur nucléaire (NFI) dans l'expression basale chez la souris. Il exercerait une régulation négative de la transcription des gènes *mt* ou de celle des gènes *mtf-1* (Majumder *et al.*, 2001).

Cependant, MTF-1 n'est pas un facteur de transcription spécifique des MTs, les MREs étant présents dans le promoteur d'autres gènes. Ainsi, MTF-1 contrôle la transcription de gènes induits par différents agents de stress (hypoxie, stress oxydant) (Dalton *et al.*, 1996a ; Murphy *et al.*, 1999 ; Andrews, 2000) ou intervenant dans l'homéostasie du Zn tel que ZnT1, un transporteur transmembranaire de Zn chez la souris (Palmiter et Findley, 1995 ; Langmade *et al.*, 2000 ; Lichtlen et Schaffner, 2001). Il intervient aussi dans l'induction d'une sous-unité ("γGCS_{hc} heavy chain") de la gamma-glutamylcystéine synthétase (γGCS) en réponse aux métaux, une métallo-enzyme à Zn majeure dans la biosynthèse du glutathion et des phytochélatines (Günes *et al.*, 1998 ; Soltaninassab *et al.*, 2000). Enfin, notons que MTF-1 est considérablement surexprimé dans une lignée cervicale de cellules de carcinome résistante à la radio-thérapie (Acharya *et al.*, 2000), expliquant peut-être l'expression accrue des MTs et mettant en évidence son rôle crucial dans la résistance à la thérapie de certaines tumeurs.

c. Activation de l'induction des métallothionéines via MTF-1 et les MREs

▪ **La régulation à partir du Zn cellulaire**

Les MREs sont classiquement requis pour l'induction par les métaux toxiques ou essentiels en excès, mais il a été également montré qu'ils sont nécessaires pour l'expression basale des MTs et qu'ils peuvent participer à la réponse au stress oxydant induit par le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (Dalton *et al.*, 1994 ; Palmiter, 1994 ; Samson et Gedamu, 1998). Notons que des embryons de mutants de souris n'exprimant pas MTF-1 (MTF-1^{-/-}) ne sont pas viables (Günes *et al.*, 1998), indiquant l'importance de ce facteur de transcription pour de nombreux gènes chez les mammifères. Par contre, chez *Drosophila melanogaster*, cette expérimentation génétique à partir d'homologues MTF-1 ne conduit pas à la mort des organismes (Zhang *et al.*, 2001 ; Egli *et al.*, 2003). Mais, dans les deux cas (fibroblastes primaires d'embryons de souris MTF-1^{-/-} et larves de drosophile MTF-1^{-/-}), une sensibilité notable vis-à-vis de la toxicité aux métaux tels que le Cd, le Cu ou le Zn, est apparue, se caractérisant par une abolition de l'expression basale des MTs et de celle induite par ces métaux (Günes *et al.*, 1998 ; Zhang *et al.*, 2001 ; Egli *et al.*, 2003). Ces résultats confirment l'importance de MTF-1 dans la régulation des gènes de MTs en condition normale de développement et lors de contamination par les métaux

lourds chez les mammifères, comme chez les invertébrés. Cependant, chez la souris, l'activation de cette voie de transcription par le Zn, le Cd ou encore l' H_2O_2 , n'implique pas une élévation significative du niveau de transcrits de MTF-1 (Auf Der Maur *et al.*, 2000), mais plutôt une simple translocation de ce facteur dans le noyau, comme lors d'un stress thermique (Smirnova *et al.*, 2000 ; Saydam *et al.*, 2001 ; Jiang H *et al.*, 2003). Ces résultats indiquent que MTF-1 est exprimé de manière constitutive dans les cellules et que son activation est d'origine post-transcriptionnelle. Or, des métaux tels que le Cd, Bi, Ni, Ag, Cu et Co, ne peuvent pas remplacer de manière fonctionnelle le Zn sur les sites de fixation de ce facteur afin de favoriser son activation (Heuchel *et al.*, 1994 ; Bittel *et al.*, 1998 ; Andrews, 2000 ; Zhang *et al.*, 2001). Un scénario impliquant l'augmentation des concentrations en Zn libre cellulaire a donc été proposé dans un premier temps. Il suggère le recrutement du Zn cellulaire à partir de son remplacement par ces autres métaux, dans la cellule et sur les protéines de stockage du Zn comme les MTs (Palmiter, 1994 ; Lichtlen et Schaffner, 2001). La fixation du facteur à l'ADN se ferait ensuite par régulation allostérique *via* la fixation réversible d'atomes de Zn au facteur de transcription lui-même (Radtke *et al.*, 1993 ; Heuchel *et al.*, 1994 ; Dalton *et al.*, 1997). La coopération entre les MTs et MTF-1 pour le Zn demeurerait non vérifiée jusqu'à ce que, récemment, le groupe de Schaffner développe un nouveau système de transcription hors de la cellule (à partir d'extraits protéiques nucléaires), qui reproduit exactement l'activation des promoteurs des gènes *mt* (Zhang *et al.*, 2003). Les auteurs ont constaté que tandis que l'induction transcriptionnelle par le Zn peut être réalisée à partir de concentrations élevées de Zn seul dans la cellule (50 et 100 μM), l'induction des gènes *mt* par le Cd, le Cu, et l' H_2O_2 devient possible en présence de MTs saturées en Zn. Ceci est expliqué par la fixation préférentielle du Cd ou du Cu sur les MTs (Vasák, 1991) ou leur oxydation par l' H_2O_2 et le déplacement concomitant du Zn (voir plus loin), menant à une activation de MTF-1 modulée par les MTs elles-mêmes.

L'existence de ce modèle pour lequel le "pool" intracellulaire de Zn est la clé de l'activation du facteur MTF-1, reste néanmoins fortement controversée. Parmi les arguments avancés, citons la faible valeur de la constante de dissociation (forte affinité) de MTF-1 pour le Zn (31 ± 14 pM). Le contenu cellulaire en Zn serait donc en lien direct avec la transcription des gènes *mt*. Or, une étude récente indique que les affinités pour les ions métalliques des domaines en doigts de zinc de MTF-1 ne sont pas plus basses que pour d'autres protéines de ce type. Elles seraient, en tout cas, certainement pas assez basses pour répondre aux changements des concentrations de Zn libre dans la gamme du micro-molaire (Guerrero et Berg, 2004). Même si des différences apparaissent intrinsèquement entre les domaines, ceux révélant les plus faibles

affinités (domaines aux extrémités aminée et carboxylique) ont de plus été décrits comme n'intervenant pas dans la fixation du facteur de transcription à l'ADN (Bittel *et al.*, 2000 ; Guerrero et Berg, 2004). L'activation de MTF-1 semble donc être plus complexe et doit faire intervenir un plus grand nombre de facteurs, isolément ou en interaction.

▪ **Phosphorylation de MTF-1**

Selon des mécanismes indépendants du Zn, une autre voie potentielle d'activation de MTF-1 a été décrite à partir du Cd et du Zn. Elle impliquerait la phosphorylation de ce facteur à partir d'une cascade de signaux de transduction *via* les protéines kinases, telles que la protéine kinase C (PKC), la phosphoinositol- 3 kinase (PI3K), la c-Jun N-terminal kinase (JNK) et une kinase spécifique de la tyrosine (Larochelle *et al.*, 2001 ; Adams *et al.*, 2002 ; Saydam *et al.*, 2002). Cette voie ne serait cependant pas nécessaire pour stimuler l'expression basale des gènes *mt*, sûrement en raison d'un maintien d'une quantité suffisante de protéines MTF-1 sous forme phosphorylée fixant de manière réversible le Zn (Larochelle *et al.*, 2001). Récemment, une étude de Jiang H. *et al.* (2004) réfute cette approche, en considérant que les protéines kinases exerceraient des effets interdépendants sur l'expression induite des gènes *mt*. Le Cd et Zn utiliseraient un mécanisme commun dépendant du Zn selon le premier modèle établi et les protéines kinases agiraient plutôt sur des co-facteurs en interaction avec MTF-1, que sur le facteur de transcription lui même (Jiang H *et al.*, 2004).

B- Activation *via* USF/ARE

Chez la souris et le hamster, une autre voie d'activation de la transcription des gènes *mt* a été mise en évidence (Andrews *et al.*, 2001). Elle utilise une séquence servant de site de fixation pour l'"adenovirus major late transcription factor" encore appelé "Upstream Stimulatory Factor" (USF). Dans le gène *MT-1* des deux espèces, cette séquence se superpose à la séquence d'un élément de réponse antioxydante (ARE : "Antioxidant Response Element", encore appelé "Electrophile Response Element") pour former une séquence combinée USF/ARE (Dalton *et al.*, 1994 ; Datta et Jacob, 1997 ; Li *et al.*, 1998a). L'élément composite USF/ARE participe à la régulation de l'expression basale du gène, à la réponse au Cd et au stress oxydant provoqué par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), mais pas par le Zn ni les quinones (Dalton *et al.*, 1994 ; Datta et Jacob, 1997 ; Li *et al.*, 1998a ; Andrews, 2000 ; Andrews *et al.*, 2001). En condition normale, cette voie pourrait correspondre à la réponse aux sources endogènes de production d'espèces

réactives de l'oxygène (ROS : "Reactive Oxygen Species"), tels que les mitochondries, les péroxisomes, les cytochromes P450, la NADPH oxydase, ... (Finkel et Holbrook, 2000). Chez les mollusques, une séquence correspondant au motif USF a été reconnue dans le promoteur du gène *MT-Ia2* chez *Perna viridis*, mais aucune séquence USF/ARE ou ARE seule n'a été à ce jour identifiée, alors que des séquences homologues à ARE ont été révélées chez certains invertébrés, tels que le ver *Caenorhabditis elegans* ou la mouche *Drosophila melanogaster* (Dalton *et al.*, 1994 ; Andrews, 2000). Cependant, l'induction, même transitoire, de la transcription des gènes *mt* en réponse à l'H₂O₂ a récemment été mise en évidence chez la moule méditerranéenne, *Mytilus galloprovincialis* (Cavaletto *et al.*, 2002). Il reste à vérifier l'existence, dans le promoteur des gènes *mt*, d'éléments de réponse anti-oxydante fonctionnellement homologues à ARE chez les mammifères. Notons que, malgré la multiplicité des facteurs d'induction de l'expression des gènes *mt* démontrée pour cette espèce, les exemples d'activation en réponse aux métaux révèlent les plus fortes capacités d'induction, en comparaison par exemple à une exposition à l'H₂O₂ (Cavaletto *et al.*, 2002).

Cette voie commune d'activation pour le Cd ou le Cu et les ROS de la transcription des gènes *mt* via USF/ARE peut s'expliquer par l'induction commune d'un stress oxydant. Il a en effet été démontré que ces métaux pouvaient générer des ROS dans les hémocytes des huîtres *Crassostrea virginica* exposés *in vitro* à du Cd et au niveau des branchies des palourdes (*Ruditapes decussatus*) en ce qui concerne le Cu, mais la contribution spécifique du métal et des ROS dans l'induction des gènes *mt* n'a pas été discernée (Roesijadi *et al.*, 1997a ; Geret *et al.*, 2002 ; Geret et Bebianno, 2004). Dans ce contexte, l'implication des MTs dans la résistance au stress oxydant a été évoquée (Kiningham et Kasarskis, 1998 ; Chimienti *et al.*, 2001).

Ainsi, chez la souris, l'induction par le Cd et les espèces réactives de l'oxygène dont l'H₂O₂, ont en commun l'activation de deux éléments distincts dans la région promotrice des gènes *mt* (MREs et USF/ARE), tandis que l'induction par le Zn (un métal peu réactif d'un point de vue redox) et les quinones dépendrait seulement des séquences MREs.

C- La transcription des gènes de MTs induite par d'autres composants ou conditions

Les gènes *mt*, en plus d'être transcriptionnellement induits par le stress oxydant, sont également activés par les hormones stéroïdes, les interleukines, les esters de phorbol et les

interférons (Kägi, 1991), mais les voies d'activation de la transcription restent pour la plupart indéterminées. Le stress peut également induire les gènes *mt* sans intervention d'agents extérieurs chez les mammifères. Cette induction semble protéger les cellules contre les radicaux libres induits par les cytokines lors de la réaction pré-inflammation causée par le stress. Cette réponse apparaît associée à la réponse aux glucocorticoïdes *via* une voie d'activation spécifique et différente de MTF-1 ou USF/ARE et utilisant le récepteur des corticoïdes connu pour se fixer à un élément de réponse spécifique aux glucocorticoïdes dans la région amont des gènes de MTs chez la souris (Ghoshal *et al.*, 1998). Deux sites pour les récepteurs aux glucocorticoïdes ont également été reportés dans le promoteur du gène *MT-1a1* de la moule *P. viridis* (Khoo et Patel, 1999). Dans un contexte proche, le froid et l'anoxie se sont avérés capables d'induire la synthèse des MTs chez *Littorina littorea*, mais les modalités de l'activation de la transcription des gènes restent à découvrir (English et Storey, 2003).

1-3.3. ROLES DES METALLOTHIONEINES

Cinquante ans après leur découverte, la signification fonctionnelle des MTs est toujours sujette à controverse. Très étudiée, notamment chez la souris, l'ambiguïté dans la détermination d'un rôle biologique spécifique réside dans le fait qu'un grand nombre de facteurs sont susceptibles d'induire la synthèse de ces protéines. Cependant, l'hypothèse selon laquelle elles auraient principalement une fonction de protection non spécifique a longtemps prédominé. Cette fonction se traduit par la complexation des ions métalliques réactifs qui ont atteint le compartiment intra-cellulaire, limitant ainsi leur fixation sur d'autres structures sensibles aux impacts nocifs de ces derniers. Cependant, plusieurs arguments permettent de suspecter un rôle des MTs dans d'autres fonctions cellulaires : c'est d'abord la conservation de la structure de ces molécules au cours de l'évolution, leur caractère ubiquiste et la redondance des gènes, mais aussi les inductions métaboliques de synthèse des MTs au cours du développement, de la régénération et de la reproduction.

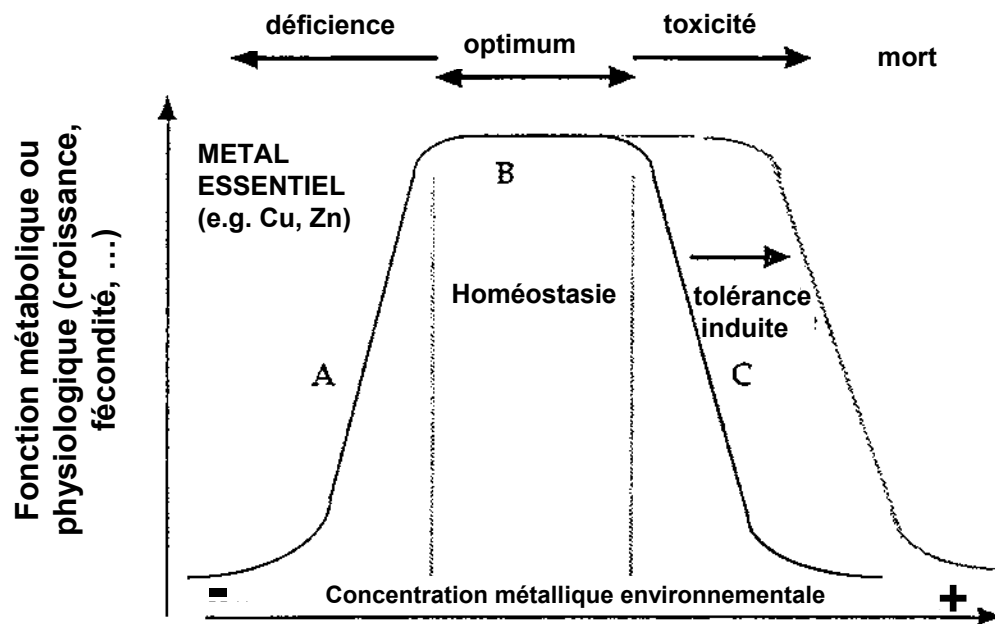


Figure 23 : Mécanisme de régulation homéostatique des métaux essentiels (Cu et Zn) à l'échelle cellulaire en fonction des concentrations croissantes de ces métaux dans le milieu extérieur (d'après George et Langston, 1994).

A : Cas de déficience, courbe dose-réponse ; B : optimum, courbe horizontale ; C : exposition toxique, réponse décroissante entraînant la mort.

A- Homéostasie et répartition intracellulaire des métaux essentiels et rôle de protéines chaperones

Les métaux essentiels, tels que le Zn et le Cu, jouent un rôle crucial dans le développement, le fonctionnement, la prolifération et la différenciation cellulaire. Des découvertes récentes ont mis en évidence, chez les mammifères et avec certaines homologues chez les invertébrés, un système élaboré régulant la concentration cytosolique, le stockage et la distribution cellulaire de ces éléments. Pour le Zn ou le Cu, ce système implique la coordination dynamique de protéines, dont les MTs, interagissant avec le métal pour son transport et son maintien sous la forme d'un "pool" labile dans le cytoplasme, mais aussi dans les organites des cellules (compartimentation).

La **Figure 23** résume le fonctionnement homéostatique dans lequel sont impliquées ces protéines thioloprives à l'intérieur des cellules (George et Langston, 1994). Quand les quantités de métaux essentiels, à l'échelle cellulaire ou tissulaire, sont limitées (carence métabolique aux effets néfastes), une augmentation des apports et de la biodisponibilité du métal engendre une courbe "dose-réponse" positive (**Figure 23, courbe A**). Lorsque les apports métalliques augmentent, la cellule est capable de réguler et de "tamponner" les concentrations intracellulaires du Cu et du Zn libres, en maintenant un stock limité de ces éléments, sous forme de complexes "MT-métal" ; ainsi, à partir de concentrations intracellulaires en métaux essentiels supérieures aux besoins métaboliques, ces deux métaux sont séquestrés par les MTs, conduisant à un plateau, traduisant un état homéostatique (**Figure 23, courbe B**). Par contre, quand ces apports métalliques deviennent trop importants, dépassant la capacité de complexation des MTs (situation de "spill-over", voir le paragraphe 1-3.3. "*B- Rôle de protection et de détoxification vis-à-vis des métaux toxiques ou essentiels*", page 42), les processus métaboliques essentiels sont inhibés et la toxicité entre en jeu (effets néfastes), pouvant conduire à la mort des organismes (**Figure 23, courbe C**).

Ce rôle des MTs dans la régulation homéostatique mais aussi dans la répartition cellulaire des métaux essentiels, justifie l'existence d'un "pool" basal dit constitutif de MTs, augmentant à l'occasion d'événements cellulaires nécessitant des besoins en métaux, tels que la prolifération et la différenciation cellulaire ou lors de carences en Zn (Vasák et Hasler, 2000 ; Coyle *et al.*, 2002). Dans les cellules, les MTs existent non seulement sous la forme fixant du Zn ou du Cu (MT-métal), mais également sous forme libre d'apoprotéines (thionéine = T) avec des ratios MT-métal/T variables (Yang *et al.*, 2001 ; Maret, 2003). La forme "thionéine" constitue un agent

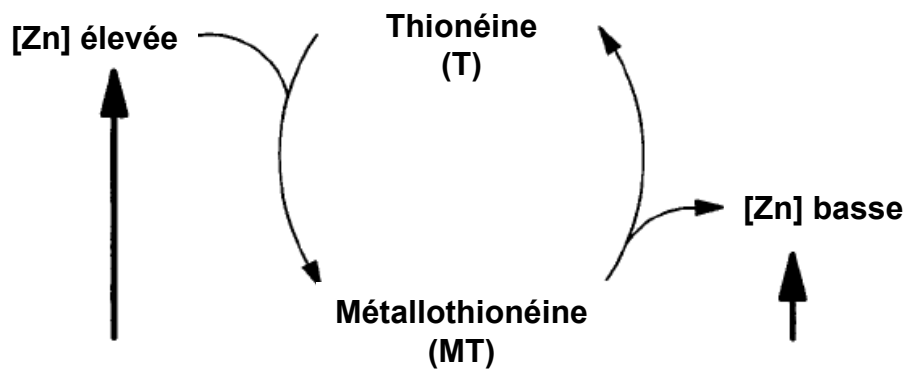


Figure 24 : Fonctionnement du couple MT/T dans l'homéostasie du zinc (d'après Maret, 2000).

A gauche : une augmentation de la quantité de Zn disponible intracellulaire induit la synthèse de thionéine (T) sous l'action du Zn sur les facteur de transcription Zn-dépendant, conduisant à la formation de métallothionéines (MT).

A droite : Si la quantité de Zn disponible est faible, alors que des besoins apparaissent, celui-ci est relargué par les MTs.

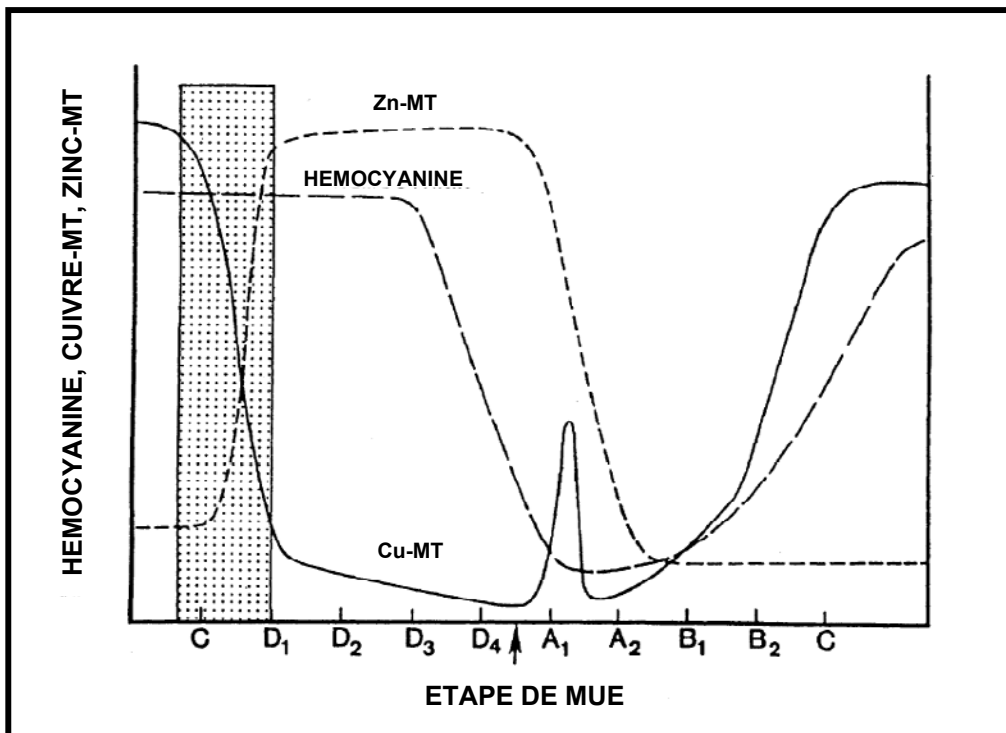


Figure 25 : Variation des concentrations en hémocyanine, Cu- et Zn-MTs durant le cycle de mue chez le crabe bleu *Callinectes sapidus* (d'après Engel et Brouwer, 1987).

L'aire ombrée représente la période au cours de laquelle le changement s'opère, remplaçant les Cu-MTs par des Zn-MTs. Les étapes du cycle de mue correspondant à : C, l'intermue ; D1-D4, la pré-mue ; A1-A2, le crabe mou ; B1-B2, le crabe à carapace de papier. La flèche sur l'axe des abscisses indique la phase d'ecdysie.

chélateur endogène efficace. La régulation des MTs à l'échelle du ligand protéique (Jiang LJ *et al.*, 1998a) et à l'échelle du gène par de multiples inducteurs laisse à penser qu'il existe un contrôle du Zn disponible par ajustement de la quantité de MTs et du rapport "MT-métal/T" dans le cytosol, mais aussi dans les organites cellulaires (**Figure 24**). Des fonctions biologiques de la forme MT-Zn et de la forme T en tant que respectivement donneur et accepteur de Zn, ont par exemple été observées dans les mitochondries du foie de rat (Ye *et al.*, 2001). Celles-ci importent les MTs depuis leur espace inter-membranaire, où le Zn, libéré, inhibe la respiration mitochondriale en synergie avec le calcium, par des interactions avec des complexes de la chaîne de transport des électrons (Simpkins *et al.*, 1998 ; Ye *et al.*, 2001). A l'inverse, la thionéine active la respiration en fixant le Zn. La translocation des MTs se produit également depuis le cytosol vers le noyau (Cherian et Apostolova, 2000 ; Ogra et Suzuki, 2000). La présence des MTs dans le noyau lors de la prolifération cellulaire rapide demeure encore inexplicée, mais une protection de l'ADN vis-à-vis des dommages oxydants ou la fourniture en Zn pour des enzymes ou facteurs de transcription impliqués dans la division cellulaire, est une hypothèse à ce jour avancée. Ces expériences démontrent que les MTs sont transférées dans la cellule pour compartimenter le Zn et le rendre disponible à des quantités différentes dans les compartiments cellulaires. Cette présence dans les organites laisse notamment en suspens certaines questions concernant l'énergie, les signaux et les mécanismes qui contrôlent leur translocation sub-cellulaire, ainsi que les caractéristiques des ces pools de Zn.

Les MTs séquestrent les métaux, mais peuvent également fonctionner comme chaperones pour la synthèse de métalloprotéines. Elles servent de transporteurs et de réservoirs de métaux essentiels, en échangeant de manière réversible leurs atomes de Zn avec des apo-métalloprotéines (pendant ou après leur synthèse). Ainsi, les MTs peuvent moduler les activités de protéines dépendantes du Zn ou du Cu, dont des enzymes et des facteurs de transcription à doigts de Zn tels que Sp1, l'anhydrase carbonique, la phosphatase alcaline et la superoxyde dismutase, le récepteur à l'œstrogène, la protéine p53, ... (Zeng *et al.*, 1991a ; Zeng *et al.*, 1991b ; Cano-Gauci et Sarkar, 1996 ; Roesijadi *et al.*, 1998 ; Maret *et al.*, 1999 ; Liu *et al.*, 2000 ; Meplan *et al.*, 2000). Ces rôles pourraient expliquer les niveaux élevés de MTs dans le noyau de cellules de souris en phase de prolifération ou de différenciation cellulaire (Cherian et Apostolova, 2000 ; Roesijadi, 2000). Plusieurs travaux mettent en évidence le degré d'implication des MTs dans le métabolisme des métaux essentiels. Par exemple, il a été montré qu'une isoforme de MT spécifique serait impliquée dans l'homéostasie du Cu associée à la fois à la synthèse ou à la dégradation de l'hémocyanine, pendant le processus de mue, chez les crustacés décapodes (**Figure 25** - Engel et Brouwer, 1987 ; Brouwer *et al.*, 2002) : au cours des

Métal inerte d'un point de vue redox

Ligand réactif d'un point de vue redox

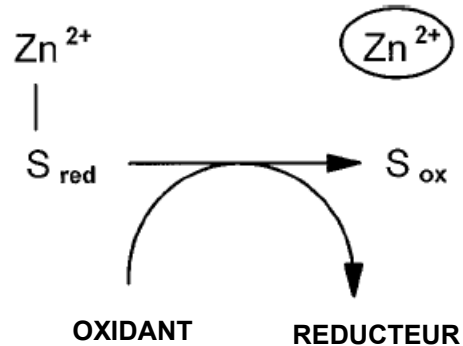


Figure 26 : La liaison zinc/soufre comme unité redox (d'après Maret, 2000).

Le relargage du zinc biologiquement inerte du point de vue redox est effectué selon une réaction d'activation redox des cystéines liant le métal en présence d'un oxydant. Ce mécanisme moléculaire serait la base liant le zinc cellulaire et le statut redox.

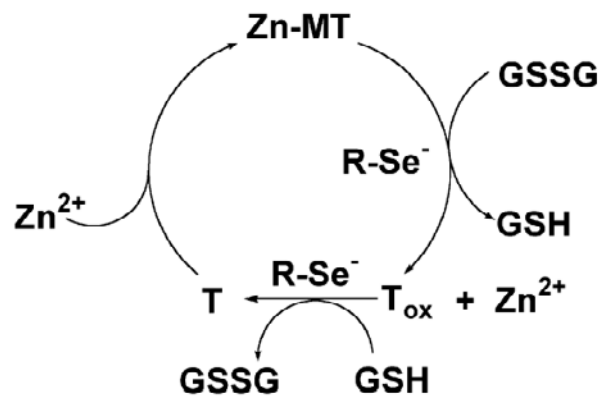


Figure 27 : Le couplage métallothionéine/thionéine et glutathion oxydé/glutathion réduit en présence de composés de sélénium (d'après Chen et Maret, 2001).

T : thionéine ; GSSG : glutathion oxydé; GSH : glutathion réduit ; $R-Se^-$: séléinol

stades de pré-mue chez le crabe bleu, les MTs séquestreeraient du Cu en provenance du catabolisme de l'hémocyanine (pigment respiratoire riche en Cu), qu'elles libéreraient par la suite pour la synthèse de ce pigment, lors de la régénération des tissus.

Des expériences *in vitro* montrent que les réactions de transfert du Zn à partir des MTs vers d'autres éléments sont possibles (Cano-Gauci et Sarkar, 1996 ; Maret *et al.*, 1997 ; Roesijadi *et al.*, 1998), et que le glutathion facilite de telles interactions, selon des modalités encore inconnues (Maret, 1994 ; Jiang LJ *et al.*, 1998b). Ces échanges ont par ailleurs été décrits comme réversibles et partiels, ne concernant que quelques atomes sur les 7 fixés à la MT (Jacob *et al.*, 1998). Le processus proposé à ce jour pour expliquer le relargage du métal essentiel à partir des MTs vers d'autres protéines est l'oxydation des résidus "cystéine" liant le Zn sur les MTs. En effet, Maret et Vallee (1998) ont montré, *in vitro*, l'oxydation des "clusters" renfermant du Zn par des disulfures, tels que le glutathion oxydé, et la libération du Zn par les MTs concomitantes, tandis que le glutathion réduit la thionéine oxydée qui fixe alors le Zn libre (**Figure 26**). Les auteurs ont alors proposé, lors de la fixation du Zn, la formation d'un environnement oxydo-réducteur au niveau des clusters soufrés des MTs de mammifères. Cet environnement serait à un potentiel redox tellement bas que la stabilité du Zn sur les clusters pourrait être altérée en présence de certains oxydants cellulaires "doux", tels que des disulfures, provoquant le relargage du Zn. Notons que le cluster β serait plus propice à participer à ces réactions d'échanges, le cluster α assurant plutôt la stabilité de la structure protéique (Jiang LJ *et al.*, 1998b ; Jiang LJ *et al.*, 2000). Récemment, un accroissement de l'efficacité du couplage GSSG/GSH et MT/T dans le relargage du Zn par les MTs a été obtenu en présence de composés aromatiques de sélénium (séléniols, R-Se), qui catalysent l'oxydation des MTs (**Figure 27** - Jacob *et al.*, 1999 ; Chen et Maret, 2001). Selon Maret et Vallee (1998), (i) la chimie des clusters soufrés ayant fixé du Zn serait sensible à des changements de l'état redox de la cellule et des conditions oxydantes induiraient le transfert du Zn des sites de fixation des MTs vers ceux de plus basse affinité sur d'autres protéines, selon des gradients thermodynamiques ; (ii) ces propriétés redox spécifiques des MTs existeraient uniquement dans le but de contrôler sélectivement le relargage et l'augmentation du Zn libre, plutôt que de constituer un antioxydant non spécifique qui libérerait le métal de manière aléatoire et sporadique. Cependant, la démonstration de ces réactions *in vivo* demeure difficile, d'autant que l'oxydation des résidus cystéines induit généralement la formation de ponts dissulfures intra- et intermoléculaires peu propices à la fixation des ions Cd^{2+} par les MTs (résultats obtenus chez *Anodonta grandis* - Tessier et Blais, 1996). Certaines observations malgré tout confortent ce mécanisme, comme par exemple l'utilisation du

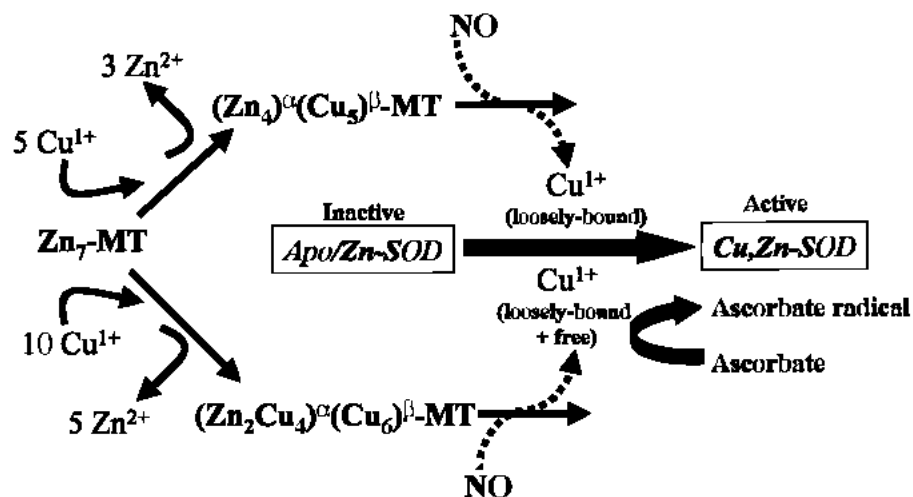


Figure 28 : Un exemple de transfert de métal des MTs vers d'autres molécules en présence d'oxydants. Le transfert du cuivre des MTs à l'apo-superoxyde dismutase en présence de monoxyde d'azote (Liu *et al.*, 2000).

Sur la base des données de la littérature, chaque molécule de MT lie sept atomes de Zn dans deux domaines. En présence du Cu, qui a une affinité beaucoup plus élevée pour la MT que le Zn, le Cu occupe le domaine β et forme un complexe mixte Cu/Zn-MT. Comme montré ici, $(Zn_4)^\alpha(Cu_5)^\beta$ -MT et $(Zn_2Cu_4)^\alpha(Cu_6)^\beta$ -MT sont susceptibles d'être formés en présence de 5 et 10 moles de Cu⁺/mol de MT, respectivement. L'incubation de $(Zn_4)^\alpha(Cu_5)^\beta$ -MT et apo/Zn-SOD en présence du donneur NO induit dans la MT la fixation lâche du Cu qui devient disponible pour apo/Zn-SOD, mais qui n'est pas accompagné d'une activité de cycle redox discernable de Cu. L'exposition de $(Zn_2Cu_4)^\alpha(Cu_6)^\beta$ -MT et de l'apo/Zn-SOD à du NO et du Cu faiblement lié aux MTs libère ce dernier. Dans ces conditions, l'activité du cycle redox du Cu est significative et a pu être détectée par oxydation d'un électron au radical d'ascorbate.

glutathion en tant que ligand intermédiaire lors des échanges entre le Cu et le Zn sur les MTs pendant la mue du crabe bleu (Engel, 1987). La **Figure 28** montre un exemple de transfert du Cu des MTs vers la Cu-Zn Superoxyde dismutase (Cu-Zn SOD) en présence de monoxyde d'azote (NO) (Liu *et al.*, 2000). Notons que la séquence d'un ADNc partiellement isolé encodant pour la Cu-Zn SOD a récemment été identifiée pour trois espèces de mollusques aquatiques : *Ruditapes decussatus* (palourde marine), *D. polymorpha* (moule zébrée) et *Bathymodiolus azoricus* (moule de source hydrothermale) (Geret *et al.*, 2004). La conservation d'une séquence proche, notamment au niveau de la géométrie du site actif par rapport aux mammifères, pourrait suggérer de possibles interactions entre les MTs et cette métalloenzyme du stress oxydant. L'interaction de l'ATP avec les MTs et le changement conformationnel de la protéine accroît, à la fois, le transfert du Zn et la réactivité des groupements thiols des cystéines avec les disulfures (Jiang LJ *et al.*, 1998a ; Maret *et al.*, 2002). Ceci pourrait être à l'origine de la rétention des MTs dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie pour la régulation de la respiration mitochondriale. Cependant, la fixation de l'ATP aux MTs n'a pas encore été démontrée (Zangger *et al.*, 2000).

Bien que les exemples de l'intervention des MTs dans des fonctions biologiques majeures soient aujourd'hui nombreux, des expériences génétiques ont montré que le transfert du Cu ou Zn à partir des MTs n'est pas essentiel et que des cultures de cellules de bactéries ou de mammifères conditionnées pour ne pas synthétiser de MTs (MT^{-/-}), sont viables et poussent en conditions normales aussi bien que des cellules aptes à cette fonction. Ce résultat suggère, par exemple, que les métalloprotéines peuvent être synthétisées sans l'aide des MTs chaperonnes (Hamer, 1986 ; Palmiter, 1987). La preuve la plus indéniable d'un rôle modéré des MTs dans ces réactions de transfert de Zn est l'absence de l'altération du développement et de la reproduction chez des souris mutantes, dont la capacité à produire des MTs a volontairement été bloquée en condition normale d'élevage (Michalska et Choo, 1993 ; Masters *et al.*, 1994). Cependant, si les MTs peuvent ne pas être essentielles à la croissance, des études sur le développement foetal ont néanmoins prouvé qu'elles constituent un réservoir de métaux essentiels mobilisé dans des conditions où les quantités de Zn sont limitées, notamment lors de carences alimentaires (Dalton *et al.*, 1996b ; Kelly *et al.*, 1996 ; Palmiter, 1998 ; Andrews et Geiser, 1999). Des ARNm de MTs maternelles sont par ailleurs présents dans les œufs des huîtres *Crassostrea virginica* et traduits en protéines dès la fécondation (Roesijadi *et al.*, 1996).

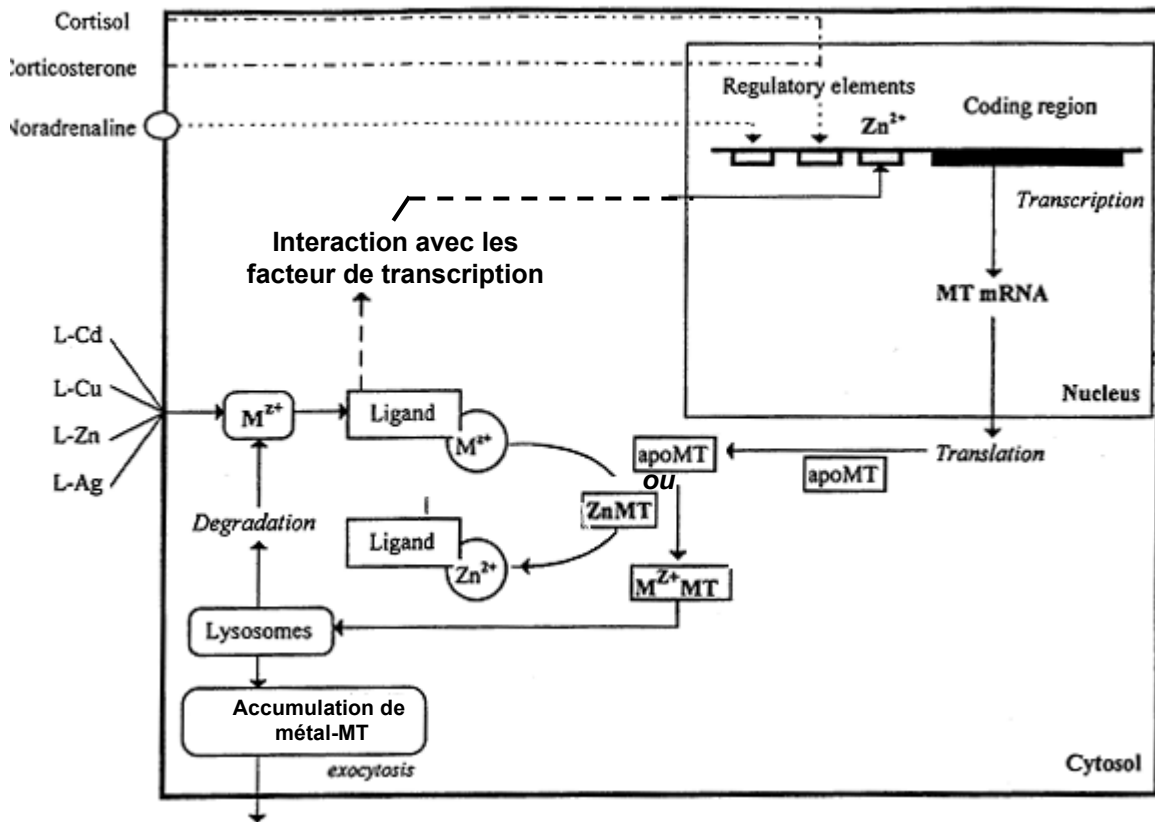


Figure 29 : Modèle pour la synthèse et la dégradation des métallothionéines à l'échelle cellulaire induisant la détoxication des métaux (adapté de Couillard, 1997).

Le métal extra-cellulaire est supposé être associé à un ligand transporteur (L). La synthèse des MTs est induite par les métaux par l'intermédiaire de facteurs de régulation (MRFs) et d'éléments de régulation appropriés sur le gène. La transcription de l'ARNm de MTs est ainsi enclenchée. Les complexes ligand-métal formés initialement et pouvant présenter des interactions toxiques sont susceptibles de transférer les métaux vers les MTs (en échange ou non avec un métal d'affinité moindre pour les MTs comme par exemple le Zn). L'excès de métal-MTs peut s'accumuler dans les lysosomes pour être excrété par exocytose.

Ainsi, si chez les mammifères les MTs ne seraient pas essentielles pour la séquestration et le transfert des métaux lors de la croissance et du développement cellulaire en condition normale, leur rôle dans la protection contre la toxicité des métaux essentiels en excès ou toxiques est considéré comme majeur.

B- Rôle de protection et de détoxification vis-à-vis des métaux toxiques ou essentiels

Le fort pouvoir thiolooprive des métaux est à l'origine de l'importante capacité de séquestration de ces éléments par les MTs et de l'induction de leur biosynthèse. A travers ce fonctionnement, les MTs sont associées à un rôle de protection à l'égard de la toxicité des éléments métalliques, en limitant leur accessibilité à d'autres sites cellulaires et en participant à leur détoxification (voir le paragraphe 1-2.2. " *C- Mécanismes d'élimination des métaux*", page 27). La **Figure 29** illustre un modèle résumant les processus de protection à l'échelle cellulaire : face à une pression de contamination métallique, le transfert des métaux se fait directement ou à partir de ligands cellulaires sur les sites de fixation "libres" des MTs ou par déplacement des métaux fixés à l'origine sur celles-ci et possédant une affinité plus faible que l'élément considéré (déplacement du Zn par le Cd par exemple) (Kägi et Kojima, 1987). La détoxification peut ensuite se faire par transfert des complexes MTs-métaux vers les lysosomes, puis l'exocytose.

Plusieurs études de pré-exposition de diverses espèces aquatiques – poissons, crustacés et mollusques – au Cd, Hg, Cu ou Zn, à des concentrations faibles mais suffisantes pour induire la synthèse des MTs, ont ainsi conclu à une plus grande tolérance vis-à-vis de la toxicité de ces métaux, lors d'expositions ultérieures à de plus fortes concentrations (Roesijadi, 1992 ; Mason et Jenkins, 1995 ; Couillard, 1997). La **Figure 30** traduit schématiquement ce phénomène (George et Langston, 1994). Les processus impliqués dans la tolérance acquise pourraient être liés soit à l'augmentation du "pool" pré-existant de MTs dans le cytosol, immédiatement disponible pour la séquestration des métaux lors de la deuxième exposition, soit à la mobilisation de l'ensemble des mécanismes de synthèse des MTs et de détoxification ou les deux phénomènes en même temps (Unger et Roesijadi, 1996). Les exemples de tolérance induite après double exposition sont nombreux et découlent des observations directes de la protéine ou de la quantification de l'induction des gènes par l'analyse des ARNm (Unger et Roesijadi, 1996 ; Roesijadi *et al.*, 1997b). L'évidence de ce rôle des MTs est à ce jour renforcée par les résultats obtenus lors de manipulations génétiques rendant non fonctionnel les gènes de MTs chez les bactéries et la souris

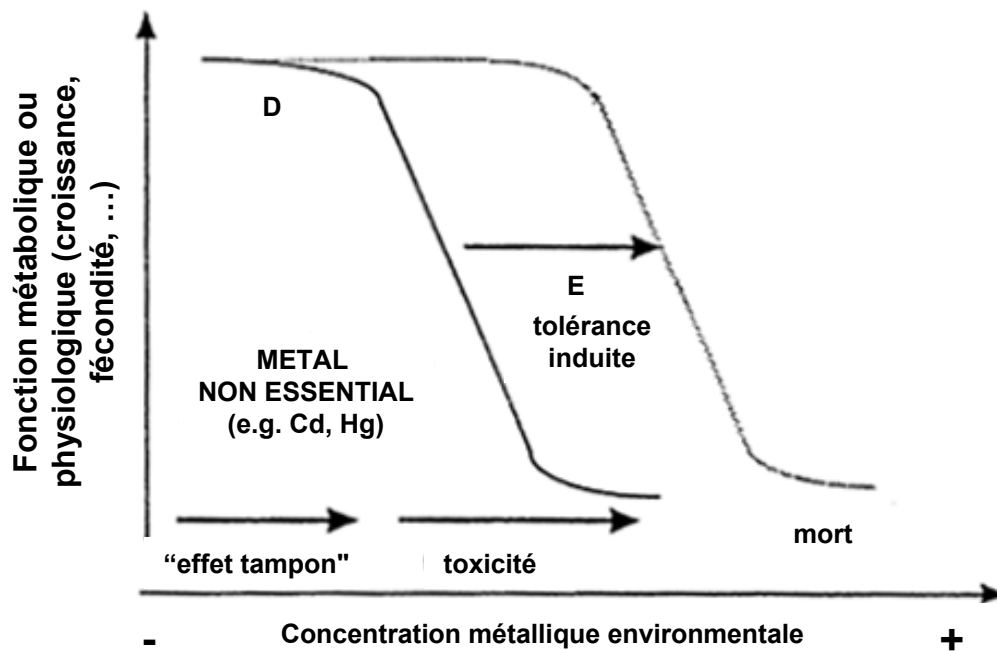


Figure 30 : Influence de l'accroissement de la concentration d'un métal toxique (Cd, Hg,...) dans l'environnement sur la tolérance des organismes à l'égard de celui-ci (d'après George et Langston, 1994).

D: tolérance normale au métal, effet "tampon" ; E : tolérance induite au métal avec un retardement de l'effet toxique.

(Roesijadi, 1996). Il est important de souligner que l'induction des MTs par l'un des métaux, comme le Zn ou le Cd, peut augmenter la tolérance à un autre métal chez certaines espèces (Klaverkamp et Duncan, 1987). L'existence de certaines isoformes de MT spécifiques à un ou plusieurs métaux chez *Mytilus edulis*, *Callinectes sapidus* ou *Littorinea brevicula* nécessite des études complémentaires pour appréhender la tolérance induite par ces dernières lors d'une exposition supplémentaire à un autre métal que celui qui les a induit en première exposition (Brouwer *et al.*, 1992 ; Syring *et al.*, 2000 ; Ryu *et al.*, 2003). Des exemples de tolérance accrue aux métaux, chez des embryons et des larves de moules exposés à plusieurs métaux en mélange, laisse envisager des effets de synergie dans l'induction des MTs et éventuellement supposer la présence combinée de plusieurs isoformes (Pavicic *et al.*, 1994a ; Pavicic *et al.*, 1994b). Mentionnons cependant que chez certaines espèces, il peut exister des exceptions à la tolérance induite par les MTs lors d'une pré-exposition métallique, en relation avec l'absence d'induction de ces dernières en première exposition, comme par exemple chez *C. fluminea* avec le Hg, alors qu'une pré-exposition chez *Mytilus edulis* valide le phénomène après une seconde exposition à des concentrations plus élevées de ce même métal (Roesijadi *et al.*, 1982 ; Baudrimont *et al.*, 1997a). Dans d'autres cas, le défaut de tolérance induite a lieu lors de contaminations successives par deux métaux qui ne permettent pas un déplacement du premier élément en faveur du second, en relation avec l'affinité spécifique de chaque métal pour les MTs. A l'opposé, une augmentation des concentrations du Cu cytosolique chez des organismes pré-exposés au Cd peut conduire à un déplacement du Cd fixé sur les MTs, permettant de ce fait au métal toxique de se lier non spécifiquement à d'autres cibles moléculaires (protéines membranaires, enzymes, ...) et d'exprimer ainsi sa toxicité (atteintes structurales et fonctionnelles plus ou moins sévères).

Un autre mécanisme peut être à la base d'une plus grande tolérance à la toxicité des métaux : il résulte dans l'amplification des gènes *mt*. Cependant, ce processus n'a pu être mis en évidence que sur des lignées cellulaires ou organismes vivants non aquatiques (lignées cellulaires de mammifères - Haq *et al.*, 2003). La contribution du phénomène d'amplification des gènes *mt* dans la résistance aux métaux reste à établir pour les organismes aquatiques (Roesijadi, 1992).

La fixation des métaux sur les MTs, en plus d'initier les processus de détoxification, contribue à limiter les interactions toxiques avec des ligands directement impliqués dans les activités métaboliques ou avec des constituants assurant le maintien de la structure cellulaire. Cependant, face à une forte pression de contamination induisant des entrées massives d'ions métalliques dans les cellules, les taux de synthèse des MTs et les capacités de fixation des

métaux sur ces protéines peuvent atteindre des limites. Ces phénomènes sont illustrés par la théorie du débordement ou "spill-over" (Mason et Jenkins, 1995) : il survient dans des conditions de contamination pour lesquelles les flux d'entrée des métaux sont supérieurs aux capacités de biosynthèse des MTs. Une fois l'ensemble des MTs présentes dans le cytosol saturées par les métaux, les éléments métalliques vont se fixer sur d'autres cibles cellulaires et exercer leur toxicité (Roesijadi, 1992). Ce phénomène, abolissant le rôle de protection des MTs à l'échelle cellulaire, a déjà été observé chez *C. fluminea*, *Pyganodon grandis* ou *C. virginica* (Baudrimont *et al.*, 1999 ; Butler et Roesijadi, 2000 ; Butler et Roesijadi, 2001a ; Giguere *et al.*, 2003). Les métaux peuvent alors devenir toxiques en induisant l'apoptose, en produisant des espèces réactives de l'oxygène ou encore en provoquant des altérations de la molécule d'ADN (cassures, mutations, anomalies chromosomiques) et en induisant des effets tératogènes (Hamilton et Mehrle, 1986 ; Bolognesi *et al.*, 1999 ; Le Penneec et Le Penneec, 2001 ; Giguere *et al.*, 2003). De plus, la substitution des métaux essentiels comme le Cu ou le Zn sur les métalloenzymes par des métaux hautement toxiques comme le Cd ou le Hg, par le même processus que celui décrit pour les MTs, induit un changement de conformation de ces molécules, qui empêche la fixation de substrats sur leurs sites catalytiques.

Enfin, bien que les MTs soient impliquées, dans la limite de leur capacité de biosynthèse, dans la protection et la détoxification des métaux à l'échelle cellulaire et tissulaire, la fixation de ces éléments sous cette forme soluble dans le cytosol peut conduire à un transfert trophique facilité des métaux vers les organismes supérieurs, contrairement à la fraction métallique séquestrée sous forme de concrétions ou granules insolubles (Wallace et Luoma, 2003).

C- Rôle dans la protection contre le stress oxydant

La mise en évidence de l'activation des gènes *mt* par des composés oxydants est en relation avec la participation possible des MTs dans le système de défense cellulaire anti-oxydante (Kinningham et Kasarskis, 1998). Plusieurs résultats vont dans ce sens : (i) les MTs montrent *in vitro* une remarquable activité de séquestration des différentes espèces de radicaux libres, tels l'ion hydroxyle (OH·) et l'anion superoxyde (O²⁻) (Thornalley et Vasak, 1985) ; (ii) le niveau cellulaire de MTs peut être augmenté par différents composés oxydants (Bauman *et al.*, 1991 ; Andrews, 2000) ; (iii) les cellules en culture qui surexpriment les MTs après une pré-exposition aux métaux résistent mieux au stress oxydant ; la démonstration a notamment été

réalisée chez la truite et la carpe (Schwarz *et al.*, 1994 ; Kling *et al.*, 1996 ; Wright *et al.*, 2000), tandis que les cellules rendues déficientes en MTs sont plus sensibles (Lazo *et al.*, 1995) ; (iv) les MTs semblent capables d'empêcher les dommages aux structures biologiques induits par les radicaux libres *in vitro* et *in vivo* (Viarengo *et al.*, 1999) et notamment, chez le rat, le complexe Zn-MT possède une grande capacité anti-oxidante contre les dommages à l'ADN induits par radiations *in vitro* (Cai *et al.*, 1999 ; Cai et Cherian, 2003).

Chez les invertébrés aquatiques, les études évaluant le rôle des MTs dans la protection contre le stress oxydant sont moins nombreuses que pour les mammifères. Cependant, la comparaison du potentiel de séquestration de l'H₂O₂ par les MTs entre les hémocytes de l'huître (*C. virginica*) et le rat indique des capacités similaires de neutralisation de cette espèce réactive de l'oxygène (Anderson *et al.*, 1999). Le rôle antioxydant des MTs en réponse aux dommages oxydants induits par un traitement au fer a été démontré chez la moule méditerranéenne *M. galloprovincialis* (Viarengo *et al.*, 1999). En effet, dans cette étude, le pré-traitement des moules au Cd a provoqué un fort accroissement des concentrations de MTs, sans variation significative dans les niveaux de glutathion réduit ou des enzymes antioxydantes majeures. Suite à ce pré-traitement, une abolition caractéristique de la production de radicaux libres et du niveau de malonedialdéhyde (résultat de la peroxydation lipidique) a pu être observée lors d'une exposition ultérieure au fer.

CHAPITRE 2

BASES METHODOLOGIQUES

2-1. INTERET DES BIVALVES DANS L'ETUDE DE LA CONTAMINATION SES SYSTEMES AQUATIQUES PAR LES METAUX LOURDS

Les mollusques filtreurs, notamment les bivalves, constituent d'excellents modèles biologiques pour analyser d'une part, la biodisponibilité et les capacités de bioaccumulation des éléments métalliques présents au sein des hydrosystèmes, et, d'autre part, le rôle des métallothionéines en tant que processus de séquestration des métaux et, conjointement, de protection des organismes face aux effets toxiques qu'ils peuvent engendrer.

L'intérêt des bivalves dans l'étude de la contamination des systèmes aquatiques par les métaux lourds repose avant tout sur les capacités de ces organismes à interagir avec leur environnement aquatique et à concentrer les polluants, en relation avec une forte tolérance (Boening, 1999 ; Beeby, 2001). Ils possèdent en effet de très fortes capacités de bioaccumulation, en relation étroite avec leur taux élevé de filtration de la colonne d'eau à des fins nutritionnelle et respiratoire. Les modalités de contamination des bivalves sont relativement bien caractérisées à travers la bibliographie : elles impliquent simultanément les deux voies d'exposition, directe (par contact avec la colonne d'eau et les flux vers la cavité palléale ou le sédiment *via* le pied) et trophique (par la nourriture ingérée), déterminées par l'habitat et les préférences nutritionnelles des espèces. Souvent décrites comme des espèces sentinelles, elles rendent compte de la biodisponibilité des contaminants dans la niche écologique qu'elles occupent au niveau de la zone d'échange entre la colonne d'eau et les réservoirs sédimentaires ou à l'intérieur de la colonne d'eau. Leurs déplacements étant réduits, ces espèces donnent ainsi une "image" de la contamination locale, tout en s'intégrant dans les réseaux trophiques aquatiques (Boening, 1999). Avec des durées de vie de plusieurs années, un suivi à long terme peut être envisagé. Leur taille moyenne autorise la dissection et l'analyse des métaux dans plusieurs organes ou ensembles tissulaires, tout en permettant leur stockage, leur transplantation (mise en cage) et l'expérimentation en laboratoire.

Ces espèces sont connues d'un point de vue physiologique et écologique. La répartition géographique des bivalves est assez large et souvent en relation avec leurs tolérances à l'égard des paramètres physico-chimiques des milieux. L'importance de leur dispersion, parfois issue d'une dynamique invasive ou en relation avec un intérêt commercial, font d'eux d'excellents modèles représentatifs des écosystèmes aquatiques, qu'ils occupent avec des densités de population suffisantes pour assurer un approvisionnement facile et en quantité tout au long de l'année (lots homogènes aisément constitués). La large dispersion des espèces permet l'obtention de niveaux de référence par rapport aux critères d'analyse étudiés et l'évaluation des modifications engendrées sur les sites contaminés : c'est un élément fondamental du dispositif, mais c'est aussi le plus difficile à définir, car les animaux témoins doivent être non exposés ou du moins présenter un niveau d'exposition suffisamment bas pour être considéré comme acceptable. Cette référence facilite aussi le suivi à long terme et la confrontation de données provenant de différentes zones géographiques. Les capacités d'acclimatation des bivalves facilitent, quant à elles, la mise en œuvre d'études conjointes en laboratoire et sur le terrain. De plus, l'existence d'espèces pour les environnements continentaux et les milieux estuariens ou marins côtiers permet des études comparatives, parfois à partir d'un même taxon (Rainbow, 1995b).

Corbicula fluminea ***Dreissena polymorpha*** ***Crassostrea gigas***
 (Müller, 1774) (Pallas, 1771) (Thunberg, 1793)



Embranchement	Mollusca		
Classe	Bivalvia		
Ordre	Eulamellibranchiata		Filibranchia
sous Ordre	Heterodonta		Anisomyaria
Super famille	<i>Sphaerioidea</i>	<i>Dreissenoidea</i>	<i>Ostreoidea</i>
Famille	<i>Corbiculidae</i>	<i>Dreissenidae</i>	<i>Ostreidae</i>
Genre	<i>Corbicula</i>	<i>Dreissena</i>	<i>Crassostrea</i>
Espèce	<i>fluminea</i>	<i>polymorpha</i>	<i>gigas</i>
Nom commun	Palourde asiatique	Moule zébrée	Huître creuse japonaise

Tableau 5 : Systématique de *Corbicula fluminea*, *Dreissena polymorpha* et *Crassostrea gigas* (d'après Zadhin, 1965 ; McMahon et Williams, 1986 ; Dubois, 1995 ; His, 1991).

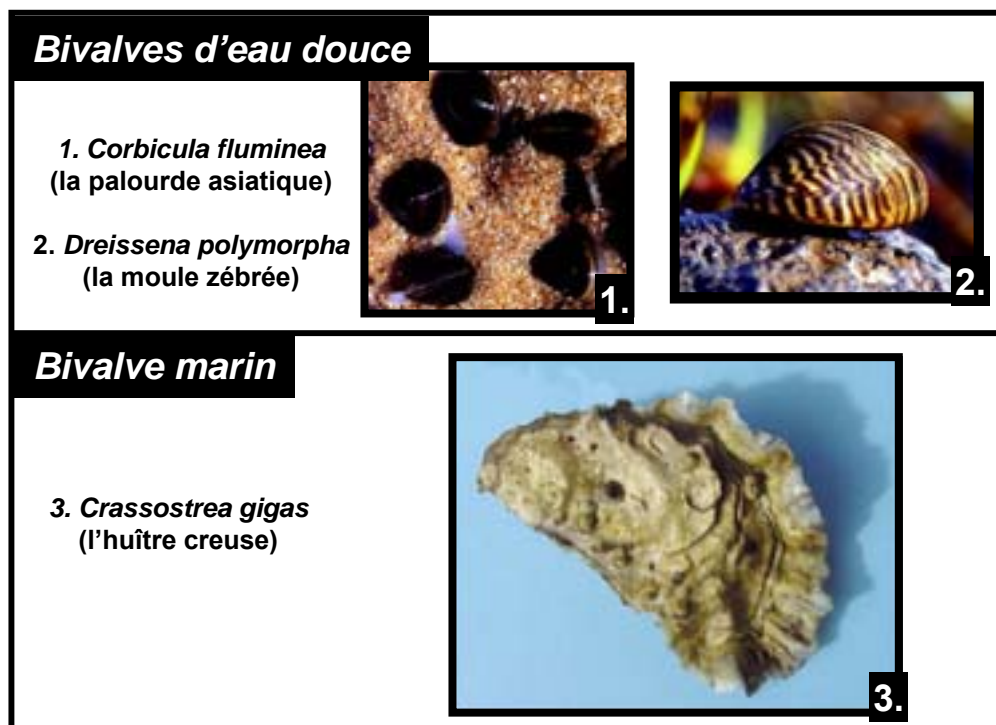


Figure 31 : Morphologie externe de *Corbicula fluminea*, *Dreissena polymorpha* et *Crassostrea gigas*.

2-2. MODELES BIOLOGIQUES

2-2.1. SYSTEMATIQUE ET PRINCIPALES CARACTERISTIQUES ECOLOGIQUES

Corbicula fluminea et *Dreissena polymorpha* sont des mollusques bivalves d'eau douce eulamellibranches (lamelles branchiales reliées par des ponts tissulaires et vasculaires) hétérodontes (la charnière de la coquille est constituée de différentes dents). L'huître creuse *Crassostrea gigas* appartient à l'ordre des Filibranches (filaments branchiaux repliés et réunis entre eux par des cils raides). La systématique complète de ces bivalves est reportée dans le **Tableau 5**.

Communément appelé "Asiatic clam" (palourde asiatique), *Corbicula fluminea* est un bivalve épi-benthique ou encore fouisseur, situé à l'interface entre le substrat de fond et la colonne d'eau des biotopes aquatiques continentaux. Cette position en interaction avec deux compartiments susceptibles de constituer des sources de contamination par les métaux lourds lui confère un intérêt écotoxicologique tout à fait particulier (**Figure 31**). *C. fluminea*, décrite par Müller en 1774, est une espèce exclusivement dulçaquicole (*C. fluviatilis* en est le synonyme, alors que *C. fluminalis* est une espèce estuarienne).

Les populations de *Dreissena polymorpha* (moule zébrée) furent décrites pour la première fois par Pallas en 1769. Ce bivalve présente essentiellement des caractères mytiliformes. Taylor *et al.* (1973) ont montré que la morphologie de cette espèce devait dériver d'espèces très proches de la super-famille des *Corbiculoidea*, dont *C. fluminea*. L'évolution de la forme passe par une réduction de la partie antérieure de la coquille, accompagnée d'une extension de sa partie postérieure et du ligament (**Figure 31**). Chez *D. polymorpha*, la présence d'un faisceau de filaments, le byssus, à l'état larvaire et adulte, facilite le maintien de ce bivalve à l'intérieur de la colonne d'eau (près du fond), fixé à divers substrats durs submergés et même sur d'autres moules zébrées (Morton, 1993).

	<i>Corbicula fluminea</i>	<i>Dreissena polymorpha</i>	<i>Crassostrea gigas</i>
COQUILLE	Forme ovoïde et striée, verte à noire. Longueur : entre 30 et 50 mm	Forme triangulaire, lisse à bandes noires. Longueur maximale : 50 mm	Forme allongée et asymétrique, coquille claire avec nervures radiales sombres. Longueur entre 80 et 300 mm
DUREE DE VIE	2-4 ans	5 ans	10 ans
BIOTOPES	Biotopes aquatiques continentaux (cours d'eau, lacs)	Biotopes aquatiques continentaux (cours d'eau, lacs)	Biotopes marins côtiers, estuariens
REPRODUCTION	Espèce hermaphrodite protandre, incubation des œufs dans la cavité suprabranchiale et larves véligères	Espèce gonochorique, larves véligères	Espèce hermaphrodite protandre successive, larves véligères
PERIODE DE PONTE	2 périodes de ponte possibles (en saison chaude)	1 période de ponte débutant en avril et pouvant durer 2 à 8 mois	1 période de ponte s'étalant de juin à mi-septembre (Bassin d'Arcachon)

Tableau 6 : Principales caractéristiques morphologiques, physiologiques et écologiques des espèces *Corbicula fluminea*, *Dreissena polymorpha* et *Crassostrea gigas* (d'après Zadhin, 1965 ; McMahon et Williams, 1986 ; Dubois, 1995 ; His, 1991).

Crassostrea gigas est l'huître japonaise originaire d'Asie. Son mode de vie est sédentaire, accolée au substrat. Elle se développe à l'état sauvage sous forme de "crassats" ou amoncellements de coquilles sur lesquelles de nouveaux juvéniles viennent se fixer chaque année.

Les principales caractéristiques morphologiques, physiologiques et écologiques des bivalves et leur habitat sont reportées dans le **Tableau 6**.

2-2.2. ORIGINE ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE

C. fluminea est une espèce endémique des zones tropicales et subtropicales des continents asiatique, africain, australien et de la Nouvelle Guinée (Zadhin, 1965). Au cours du 20^{ème} siècle, l'aire de répartition de ce bivalve benthique s'étend. Les activités humaines (importation en même temps que les huîtres, ou pour l'alimentation par des immigrants chinois) et le transport des larves lors des migrations d'oiseaux ou de poissons sont en grande partie responsables de la dispersion trans-continentale de *C. fluminea* (Counts, 1986). L'espèce est recensée pour la première fois en Amérique du Nord en 1938 (Counts, 1986). En raison de sa tolérance aux variations de la plupart des facteurs environnementaux, *C. fluminea* s'impose rapidement pour devenir l'espèce la plus représentée parmi les bivalves d'eau douce des cours d'eau américains (Britton et Morton, 1982). Avec une dynamique d'expansion invasive, ce bivalve envahit les cours d'eau, les canaux, les lacs et les retenues d'eau, avec des densités supérieures à 10 000 voire 100 000 individus/m² (Eng, 1979 ; Marsh, 1985).

A ce jour, la colonisation de l'Europe par *C. fluminea* est amorcée par la façade ouest et l'espèce est en pleine phase d'expansion sur tout le continent. Sa présence a été mentionnée pour la première fois en 1981 par Mouthon, dans la partie fluvio-estuarienne de la Gironde en France, mais aussi au Portugal. Depuis, la dispersion s'est accentuée : elle a été observée dans la Garonne vers 1985 (Vincent et Brancotte, 2002), le Canal du Midi (Girardi, 1989-1990), dans la Loire (Gruet, 1992), dans le canal latéral de la Garonne en 1993 (Vincent et Brancotte, 2002), dans la Seine en 1997, dans le Rhône (Mouthon, 2000), et dans la majorité des rivières du Sud-Ouest, comme l'Adour, la Dordogne, le Lot, l'Aude et le Tarn (Vincent et Brancotte, 2000).

D. polymorpha est originaire des Balkans, de Pologne et de l'ancienne Union Soviétique (Herbert et al., 1989). Avant le 19^{ème} siècle, l'aire de répartition de ces moules se limitait à la région de la Mer Noire et de la Mer Caspienne (Stanczykowska, 1978). Entre 1800 et 1900, les populations ont plus que doublé leur expansion en Europe. Les activités anthropiques (canaux navigables, bateaux, activités de pêche, hydravions, équipements de loisirs nautiques, ...) sont probablement responsables de la rapidité avec laquelle l'espèce s'est dispersée. Elle a atteint en quelques décennies, la France et les îles britanniques (Khalanski, 1996). Dans le nord de l'Amérique, *D. polymorpha* est identifiée pour la première fois dans les eaux canadiennes du Lac St. Clair, près de Détroit en 1988 (Herbert et al., 1989). Le déversement des eaux de ballast des navires transatlantiques est probablement à l'origine de l'introduction accidentelle en Amérique et notamment dans les Grands Lacs du Nord (1986). Son importante fécondité, la dispersion passive des larves véligères et ses capacités de fixation par le byssus sur des surfaces telles que la coque des navires, les filets, les bouées et autres débris flottants, ont facilité par la suite l'extension de son aire de répartition à l'ensemble des rivières et lacs des Etats-Unis, ainsi qu'aux provinces canadiennes de l'Ontario et du Québec (Ram et McMahon, 1996).

Ce bivalve se retrouve maintenant à travers la majeure partie de l'Europe du Sud, de la Scandinavie jusqu'en Grèce, et de l'Ouest, de la Russie jusqu'en Grande-Bretagne (Khalanski, 1996). *D. polymorpha* est aujourd'hui présente dans tous les bassins hydrographiques français. Son implantation dans les grands fleuves et rivières de l'Est (Rhin, Rhône, Moselle, Meuse) est importante alors qu'elle est comparativement peu abondante dans les bassins de la Loire et de la Garonne. Les densités de population sont comprises entre 100 et 1 000 individus au m², mais des valeurs allant jusqu'à 750 000 individus/m² ont déjà été observées (Kovalak et al., 1993).

L'espèce *C. gigas* est native d'Asie du Nord-Est (Japon y compris), mais a largement été transférée et disséminée dans beaucoup de pays (Royaume-Uni, France, Etats-Unis, Canada, Corée, Chine et Nouvelle Zélande). L'ostréiculture est à l'origine de la plupart de ses introductions, faisant des huîtres japonaises l'espèce de bivalves la plus cultivée dans le monde. *C. gigas* est présente sur la côte atlantique en France, en Espagne, au Portugal et au Maroc. En Méditerranée, elle a été importée dans l'Etang de Thau (Raimbault, 1964) et dans les lagunes adriatiques (Venise, Grado, Varano, Foggia) dans les années 60. Successivement recensée à Malte (Agius et al., 1978), en Espagne (Poutiers, 1987), en Tunisie et en Mer Ionienne (Minelli et al., 1995), elle est maintenant largement établie dans le Nord de l'Adriatique (De Min et Vio, 1997) et sa présence est suspectée en Grèce (Çevik et al., 2001).

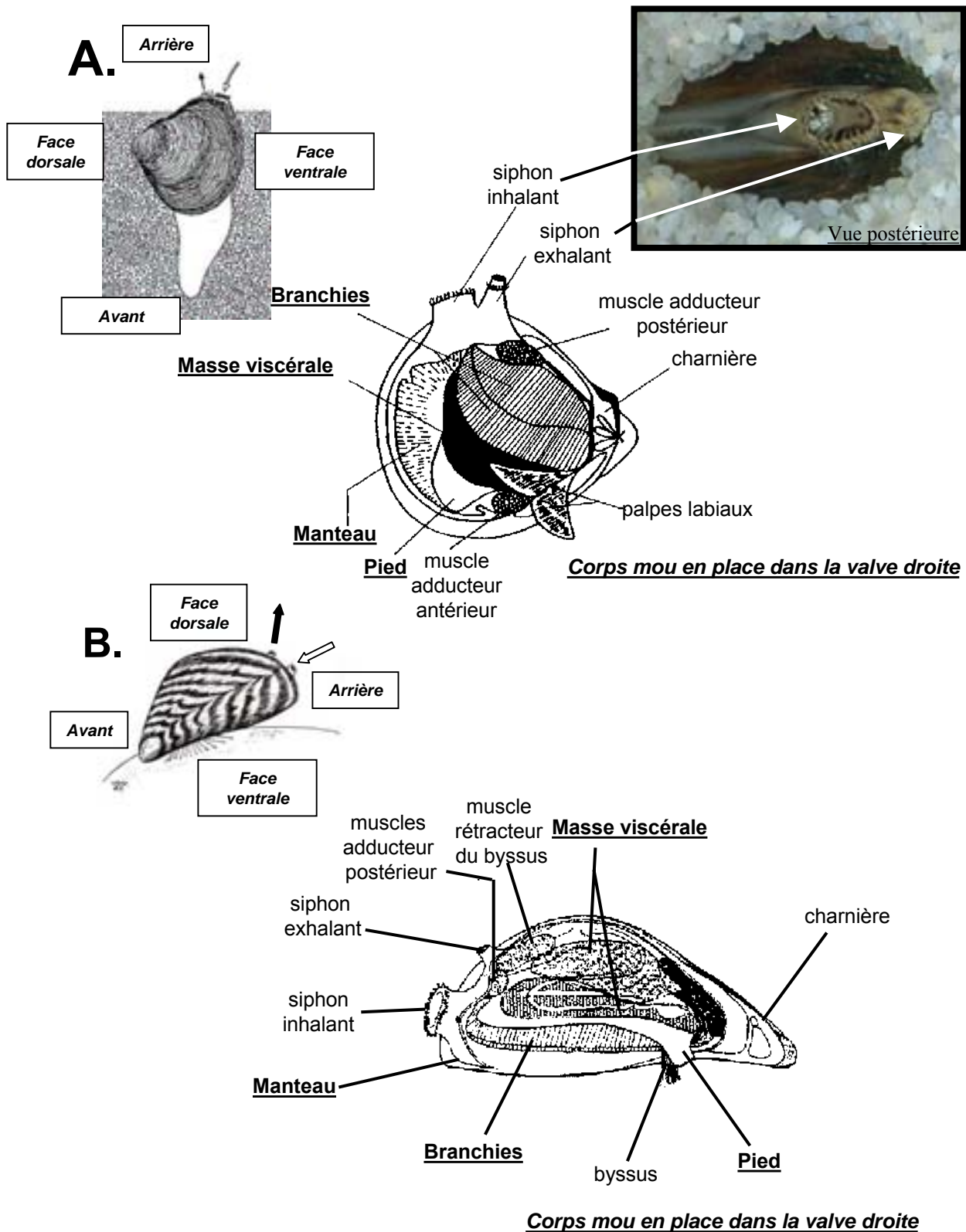


Figure 32 : Anatomie de *Corbicula fluminea* (A.) et *Dreissena polymorpha* (B.).

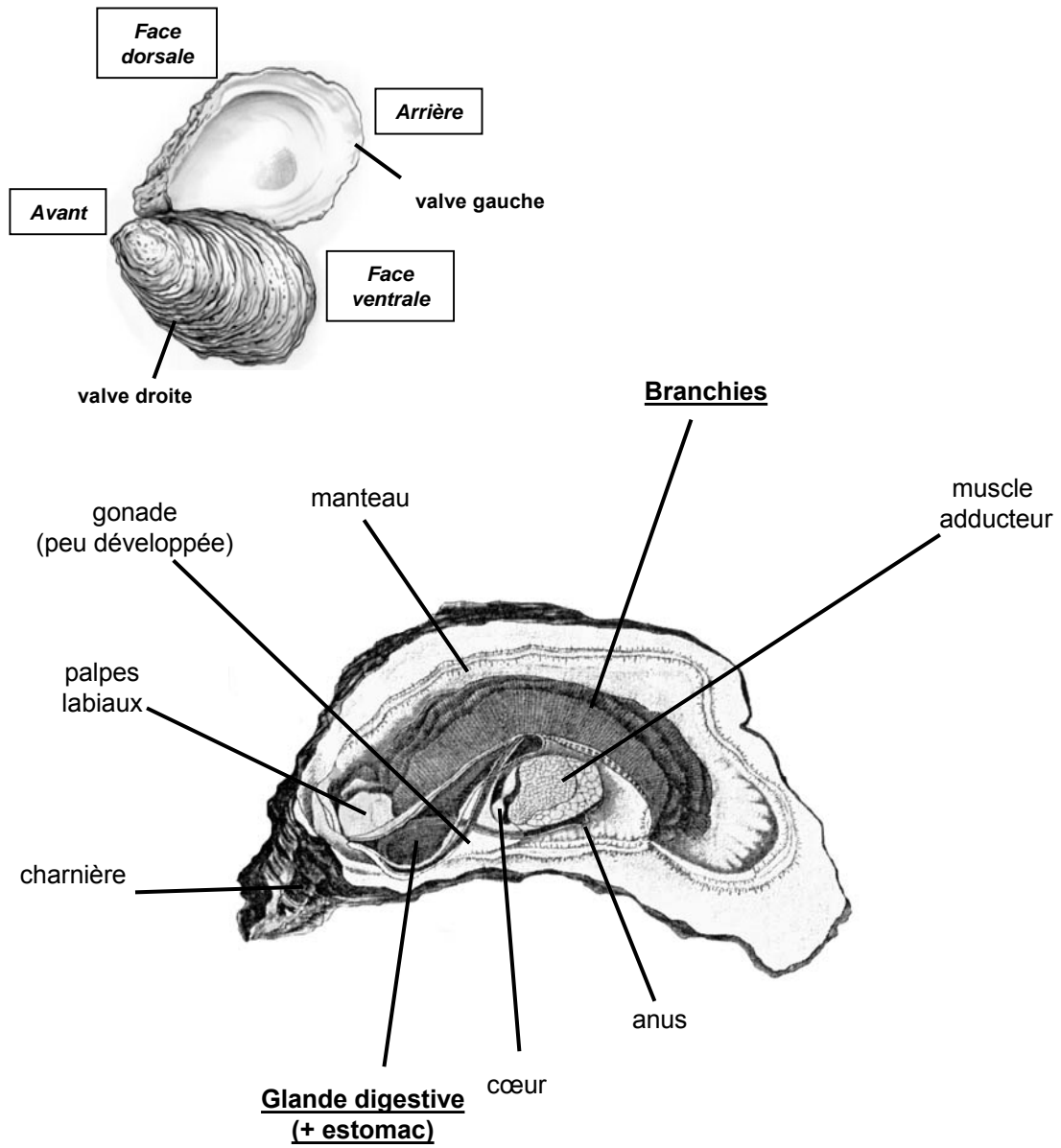
Les importations directes à partir du Japon ont démarré en France vers la fin des années 60, après qu'une maladie ait décimé les huîtres d'origine portugaise, *Crassostrea angulata* (Zibrowius, 1992). L'ostréiculture est à l'origine d'un maintien des populations à des densités élevées. La production française commercialisée en 1999 est estimée à 90 300 tonnes d'huîtres creuses (*C. gigas*) et plates (*Ostrea edulis*). Les huîtres sont principalement commercialisées à partir de six régions : Basse-Normandie (13% de la production), Bretagne (21%), Pays de la Loire (9%), Poitou-Charentes (44%), Aquitaine (7%), Languedoc-Roussillon (6%). Le bassin de Marennes-Oléron représente à lui seul 39% de la commercialisation des huîtres (Ministère De L'agriculture De L'alimentation De La Pêche Et Des Affaires Rurales, 2004).

2-2.3. ELEMENTS DE BIOLOGIE DES BIVALVES

A- La coquille

La coquille calcaire des bivalves enferme dans la cavité palléale le corps mou. Elle est composée de deux valves identiques de forme équilatérale et ovoïde pour *C. fluminea*, triangulaire ovale (mytiliforme) pour *D. polymorpha* (**Figure 32**). Les valves allongées sont asymétriques chez *C. gigas* : la valve gauche (valve inférieure) est creuse et la droite (valve supérieure), aplatie formant un couvercle (**Figure 33**).

Les couleurs de coquille rencontrées chez les corbicules vont du vert-olive à noirâtre chez les individus les plus âgés. Elle est ornementée de stries sombres concentriques, représentant les différentes phases de croissance. Le nom spécifique "*polymorpha*" des dreissènes découle des nombreuses variations de couleurs, de dessins et de formes des coquilles. L'alternance de bandes claires (blanches à jaunes) avec des bandes sombres (marrons à noires) dessinant des "zigzags" sur la surface externe de la coquille lui confère le nom de moule zébrée. La coquille est beaucoup plus fine que pour *C. fluminea*. La surface extérieure est généralement lisse, sans stries. *C. gigas* a une coquille plus ou moins épaisse de couleur claire, ornementée de taches sombres. Des nervures radiales sur les valves se démarquent à partir de la charnière.



corps mou en place dans la valve gauche

Figure 33 : Anatomie de *Crassostrea gigas*.

B. Le corps mou

L'organisation interne du corps mou des trois espèces de bivalves ne comporte pas de différences majeures, excepté la présence d'organes impliqués dans la formation et l'utilisation du byssus chez *D. polymorpha*. Quatre ensembles tissulaires principaux définissent le plan d'organisation commun (**Figure 32 et 33**) : le manteau, les branchies, la masse viscérale et la masse musculaire.

a. Les organes directement en contact avec le milieu environnant

Les branchies lamelleuses (cténidies) logées dans la cavité palléale assurent une fonction respiratoire et nutritionnelle, ainsi que l'incubation des œufs fécondés et des stades larvaires chez *C. fluminea*. Elles sont formées par une paire d'hémibranchies interne et externe, réparties de part et d'autre de la masse viscérale. Les filaments branchiaux portent des cils vibratiles à l'origine de l'activité ventilatoire et de l'acheminement des particules alimentaires agglutinées vers la bouche.

Le manteau est composé de deux lobes délimitant une cavité palléale. Il sécrète la coquille par ces bords et forme dans la région postérieure deux siphons courts et rétractables (inhalant et exhalant) par lesquels se font les échanges avec le milieu extérieur et l'expulsion des (pseudo)féces (exemple de *C. fluminea*, **Figure 32**). Les siphons sont couronnés d'un grand nombre de cils sensoriels avec des mécanorécepteurs, des photorécepteurs et chémorécepteurs sensibles à certaines variations du milieu environnant. La surface interne de l'épithélium des deux lobes du manteau est recouverte de nombreux cils qui transportent les particules engluées dans du mucus, éliminées comme les pseudofécès par le siphon inhalant lors de vives contractions des muscles adducteurs. La troisième ouverture ventrale est la fente pédale (Morton, 1993) par laquelle émerge le pied chez *C. fluminea* et essentiellement le byssus chez *D. polymorpha*. *C. gigas* ne possède pas quant à elle de siphons individualisés.

b. Les organes internes

La masse viscérale rassemble les systèmes digestif, circulatoire, excréteur et reproducteur, avec la présence plus marquée, chez *D. polymorpha*, d'une glande impliquée dans la formation et l'utilisation du byssus.

Le système digestif est composé d'une bouche entourée de 4 palpes labiaux, d'un œsophage court auquel fait suite l'estomac équipé d'un stylet cristallin (condensé d'enzymes digestives) participant à la digestion. Cet estomac est criblé d'une multitude de trous qui

constituent les orifices des diverticules digestifs, se ramifiant pour terminer en *caeca* par des *acini* glandulaires. L'ensemble constitue la glande digestive (hépatopancréas pour certains auteurs). L'assimilation des nutriments se fait à partir des tubules digestifs assurant la digestion intracellulaire et extracellulaire (Morton, 1993 ; Martoja, 1995). L'intestin, plus ou moins circonvolutionné, s'ouvre au-dessus du muscle adducteur postérieur (anus).

Le système circulatoire est semi-ouvert (présence de vaisseaux et de lacunes). Le cœur, inclus dans un péricarde, comprend un ventricule et deux oreillettes et n'est traversé que par du sang artériel propulsé vers les organes par des aortes. Le sang collecté au niveau d'un sinus ventral est filtré par les reins puis pénètre dans les branchies par des veines afférentes. Oxygéné, il regagne finalement le cœur par des veines branchiales efférentes. Ce sang contient des cellules mobiles ou améboocytes, des hémocytes et un pigment respiratoire à base de cuivre, l'hémocyanine.

L'appareil excréteur comprend les reins spongieux non différenciés entourant le péricarde (Herwig *et al.*, 1989). Ils communiquent avec celui-ci au travers du canal péricardique (la branche proximale) à l'origine de l'ultrafiltration et de l'élaboration de l'urine primaire. Un autre mode d'excrétion se superpose à celui-ci, libérant des éléments solides par exocytose, sous forme de granules insolubles et diapédèse des hémocytes (Giamberini et Pihan, 1996).

L'appareil reproducteur occupe la majeure partie de la masse viscérale pendant la période de reproduction. Les spermatozoïdes des corbicules, émis dans l'eau par le siphon exhalant d'un individu voisin, sont inhalés individuellement ou en amas dans la chambre infra-branchiale et migrent à travers le filtre des cténidies pour féconder les œufs présents dans l'hémibranchie interne, où ils sont incubés jusqu'au stade pédivéligère (mêmes caractéristiques que l'adulte - 220 µm de long en moyenne). L'inhalation des spermatozoïdes serait capable de stimuler la libération des ovocytes par la femelle. Cependant, il ne s'agit pas réellement d'une fécondation interne. (Britton et Morton, 1982). *C. fluminea* peut atteindre une maturité sexuelle en moins d'un an (Mouthon, 2001). C'est une espèce hermaphrodite saisonnière. Son cycle de reproduction a souvent été décrit comme bivoltin, présentant deux périodes d'incubation au cours de l'année, s'étalant de mi-mai à mi-octobre, notamment dans le canal latéral de la Garonne (Dubois, 1995). Cependant, des études menées au niveau du lac de Cazaux-Sanguinet (Aquitaine) et dans la Saône, ont montré que certaines populations ne présentent qu'une seule phase de reproduction au cours de l'année, au mois de mai (Baudrimont *et al.*, 1997b ; Mouthon, 2001).

D. polymorpha atteint la maturité sexuelle après 1 à 2 ans (Mackie et Schloesser, 1996). Elle possède une fécondation externe. Dans les climats tempérés, les pontes peuvent avoir lieu durant l'été, s'étalant alors sur 2 à 8 mois selon les facteurs abiotiques et biotiques, dont la

Espèce Muscles	<i>Corbicula fluminea</i>	<i>Dreissena polymorpha</i>	<i>Crassostrea gigas</i>
<i>muscle adducteur</i>	muscles antérieur et postérieur	muscles antérieur et postérieur atrophiés	1 muscle postérieur développé (valve gauche fixée au substrat)
<i>ped</i>	puissant	atrophié (mode de vie sédentaire)	absent
<i>muscles rétracteurs du pied</i>	antérieur et postérieur insérés en avant des muscles adducteurs	atrophiés	absents
<i>muscles rétracteurs du byssus</i>	absents	conservés, accolés au muscle rétracteur postérieur du pied	absents

Tableau 7 : Les différents compartiments de la masse musculaire chez *Corbicula fluminea*, *Dreissena polymorpha* et *Crassostrea gigas*.

température et la disponibilité en nourriture qui contrôlent l'intensité de la reproduction (quantité de gamètes produits) (Mackie et Schloesser, 1996). Après la saison de reproduction, les gonades commencent à se réorganiser lorsque la température descend en dessous de 10°C. Une augmentation progressive de la taille des organes reproducteurs se produit entre janvier et avril et, selon la population considérée, la première cohorte de gamètes matures est expulsée lorsque la température atteint 12 à 16°C (Stanczykowska, 1978 ; Borcharding, 1995).

Les huîtres sont mûres après 1 an. Leur reproduction obéit à une stratégie de type "r" avec un cycle de développement court et un fort potentiel de reproduction (Lubet et Mathieu, 1999). Sous nos latitudes, les premiers stades de la gamétogenèse chez *C. gigas* apparaissent au cours des processus printaniers en mars et avril (Gouletquer, 1997), mais également sous l'influence de facteurs internes, tels que les hormones. La maturité sexuelle est à son maximum au cours de la période mai-juillet, avec atteinte de la "phase instable" définie par Galtsoff (1964) au cours de laquelle les huîtres sont sensibles aux *stimuli* qui peuvent déclencher le frai, tels la température (25 à 28°C - His *et al.*, 1989), la salinité, etc. La maturité est suivie de l'émission des gamètes qui peut être partielle ou totale du mois de juin à la mi-septembre (His, 1991). Le frai est un phénomène collectif affectant la majorité des individus pour une population d'huîtres donnée. Les pontes les plus importantes se produisent avant la fin du mois de juillet. Dans le Bassin d'Arcachon, le suivi de l'activité valvaire a permis de déterminer un nombre de 4 à 9 frais au cours d'une même saison de reproduction (His, 1991). Ensuite, la gonade est le siège de phénomènes de restauration partielle qui précèdent les nouvelles périodes de frai pendant la saison estivale. A l'automne, les huîtres entrent en phase de repos sexuel.

La masse musculaire, relativement réduite chez les bivalves, est adaptée au mode de vie de l'espèce considérée (**Tableau 7**).

La musculature de *C. fluminea* est bien développée et symétrique, contrairement à celle de *D. polymorpha*. Les muscles adducteurs, au nombre de deux (antérieur et postérieur), permettent les mouvements de la coquille. Impair chez *C. gigas*, ce muscle intervient également dans l'expulsion des excréments ou des produits génitaux femelles, grâce à ses contractions. Le pied, lorsqu'il est présent et non atrophié, joue un rôle dans la locomotion (reptation), l'enfouissement et l'alimentation. Les mouvements du pied sont assurés par des muscles protracteur et rétracteur, pairs, antérieurs et postérieurs. L'enfouissement dans le sédiment de *C. fluminea* se réalise par des phénomènes de turgescence gonflant le pied d'hémolymphe et par des mouvements successifs de fermetures et d'ouvertures brusques des valves, occasionnant un enfouissement à partir de l'avant dans le sédiment. Dans cette position, le pied peut également

<i>Corbicula fluminea</i> <i>Dreissena polymorpha</i> <i>Crassostrea gigas</i>			
HABITAT	Systèmes lotiques et lenthiques (sables, graviers, argiles fines, vases)	Eaux stagnantes et secteur potamique des rivières (substrats durs immergés)	Systèmes côtiers et estuaires (rochers, fonds coquilliers, vases et sables)
TEMPERATURE	2 - 34 °C	2 - 31 °C	4 - 35 °C
	Seuil thermique pour la croissance ⁽¹⁾ : 10 - 15 °C	Seuil thermique pour la croissance : 8 °C	
	Optimum thermique pour la croissance ⁽²⁾ : 20 - 25 °C	Optimum thermique pour la croissance ⁽³⁾ : 17 - 25 °C	
SALINITE	Espèce mixohaline 0 - 8 ‰	Espèce sténohaline 0 - 2 ‰	Espèce euryhaline 2 - 42 ‰
FACTEURS LIMITANTS	Oxygène	Calcium, pH	Oxygène
REGIME ALIMENTAIRE	Filtreur microphage sélectif et déposivore	Filtreur microphage sélectif	Filtreur microphage sélectif

Tableau 8 : Données écologiques pour *Corbicula fluminea*, *Dreissena polymorpha* et *Crassostrea gigas*.

Références

(1) McMahon et Williams, 1986

(2) Foe et Knight, 1986; Mattice et Wright, 1986

(3) Sprung, 1989

aider à la nutrition ("pedal feeding"), sa ciliature transportant des particules alimentaires prélevées dans le sédiment ou à sa surface, jusqu'aux branchies et aux palpes labiaux (Way *et al.*, 1990 ; Reid *et al.*, 1992).

Chez la moule zébrée, le muscle rétracteur du byssus est conservé ainsi que la glande qui le sécrète, annexée à la musculature du pied atrophié. Le byssus, permettant la fixation aux substrats durs, se compose d'un tronc principal, traversant le corps mou, et de filaments constitués d'une matrice protéique et de disques adhésifs à leur extrémité.

2-2.4. ECOLOGIE DE *C. FLUMINEA*, *D. POLYMORPHA* ET *C. GIGAS*

Le comportement, l'habitat et les tolérances vis-à-vis des facteurs environnementaux de *C. fluminea*, *D. polymorpha* et *Crassostrea gigas* sont des paramètres importants qui ont orienté le choix de ces trois modèles biologiques (**Tableau 8**).

A- *Corbicula fluminea*

Corbicula fluminea colonise aussi bien les systèmes lotiques que lentiques (lacs et réservoirs). Opportuniste, il semble préférer des substrats composés de sables ou de graviers, mais il s'accommode de substrats mous comme les argiles fines des fonds vaseux. Dans sa position épibenthique, ne laissant dépasser à la surface des sédiments que ses deux siphons en contact permanent avec la colonne d'eau, il s'assure une protection à l'égard des agressions extérieures.

C. fluminea possède de fortes capacités d'adaptation, qui lui valent l'attribution d'un large spectre de tolérance vis-à-vis des facteurs environnementaux. Même si cette espèce est capable de coloniser des milieux dont les températures extrêmes sont comprises entre 2 et 34 C° (Sickel, 1986), elle ne supporte pas de sévères conditions hivernales, limitant ainsi son aire de répartition dans l'hémisphère nord en dessous du 40^{ème} parallèle, la température ayant une forte influence sur son développement. C'est également une espèce mixohaline qui supporte des salinités allant de 0 à 8 ‰ mais qui reste moins tolérante à l'augmentation de salinité que *C. fluminalis*. Des travaux récents ont montré l'existence, chez ce bivalve, de capacités adaptatives pour des expositions de durée moyenne (jusqu'à quelques semaines) à de faibles teneurs en oxygène dans

l'eau (2 kPa soit environ 1 mg.l⁻¹), correspondant à une saturation à l'air ne dépassant pas 10% (Tran, 2001).

Filtreur microphage sélectif, *C. fluminea* se nourrit préférentiellement d'algues, de microzooplancton et de détritiques organiques (4 à 20 µm) et même de bactéries d'une taille proche de 0,5 µm (Allan, 1995 ; Silverman *et al.*, 1996). Dans un milieu riche en matière organique, où les particules en suspension sont inadéquates à la filtration, elle peut devenir dépositivore (Reid *et al.*, 1992).

B- *Dreissena polymorpha*

Par son mode de vie fixé sur des substrats solides immergés dans la colonne d'eau, *D. polymorpha* est plus exposée aux prédateurs (écrevisses, poissons, canards, ...). Toutefois, cette espèce est capable de coloniser des sédiments meubles (Lacs Erié et Ontario - Hebert *et al.*, 1991). Elle affectionne tout particulièrement les eaux stagnantes des lacs et des canaux et le secteur potamique des rivières, à des profondeurs comprises entre 2 et 7 m (Kinzelbach, 1992).

La tolérance thermique (2 à 31°C selon Claudi et Mackie, 1993) de cette espèce est proche de celle de *C. fluminea*. Cependant, les *optima* pour la croissance diffèrent quelque peu (**Tableau 8**). La moule zébrée est une espèce sténohaline supportant une salinité de 0 à 2‰, avec cependant une certaine sensibilité à de rapides fluctuations de ce facteur dans les aires sous l'influence des marées. Cette espèce présente une sensibilité à l'égard de la concentration en calcium dans l'eau et ne se développe pas en dessous de 25 mg.l⁻¹ et au-dessus de 30 mg.l⁻¹ (Sprung, 1987). De plus, les moules zébrées se retrouvent rarement dans des eaux de pH inférieur à 7,4 ou supérieur à 8,5. Par contre, contrairement à *C. fluminea*, ce bivalve est peu oxyphile et connu pour résister relativement bien aux mauvaises conditions d'oxygénation (Morton, 1993). Les moules consomment aussi bien des algues planctoniques que des détritiques organobactériens (filtreur microphage). La sélectivité de filtration des particules est comprise entre 15 et 45 µm, avec une sélection maximale centrée autour de 20–25 µm, correspondant aux taxons phytoplanctoniques (Khalanski, 1996).

C- *Crassostrea gigas*

Ces huîtres sont très répandues au niveau de l'estran, dans la zone intertidale peu profonde (1,5 à 3 m) découvrant à chaque marée. Elles préfèrent les eaux saumâtres des estuaires

abrités. Les huîtres sont caractérisées par une forte capacité d'adaptation aux variations de la température de l'eau, allant de 4 à 35°C (Mann *et al.*, 1991). Des cas de mortalités ont cependant été rencontrés à 30°C (Shpigel *et al.*, 1992). Leur spectre de tolérance vis-à-vis de la salinité est large allant de 10 à 42‰ (espèce euryhaline - Coleman, 1996 ; Shatkin *et al.*, 1997) et elles résistent à des variations de fréquence élevée et de forte amplitude. Pour l'oxygène, en dehors d'une échelle allant de 2,9 à 10,6 mg/l, des mortalités peuvent être rencontrées (Cheney *et al.*, 2000). *C. gigas* se nourrit de phytoplancton et de protistes (Dupuy *et al.*, 1999).

MILIEU DULCICOLE		MILIEU ESTUARIEN	
Etudes comparatives entre <i>Corbicula fluminea</i> et <i>Dreissena polymorpha</i>		<i>Crassostrea gigas</i>	
Espèces			
Etude	In situ	In situ	
		En laboratoire	En laboratoire
Objectifs	évaluer comparativement le potentiel de bioaccumulation du Cd et du Zn et de réponse associée des MTs dans le gradient polymétallique "amont".	caractériser la bioaccumulation du Cd, du Zn et Cu dans la zone aval de la pollution et l'influence de plusieurs facteurs (âge, saison, cycle de reproduction) + valider la technique de transplantation à long terme dans les marais adjacents à l'estuaire	caractériser, chez des huîtres juvéniles, l'influence d'un troisième jeu de chromosomes sur la réponse protéique des MTs et l'expression différentielle de leurs gènes (<i>CgMT1</i> , <i>CgMT2</i> et <i>CgMT3</i>) après contamination par le Cd et/ou le Zn
Technique	transplantation à la confluence Riou-Mort / Lot (4 stations d'étude sur le gradient)	2 études ⁽¹⁾ de transplantation d'huîtres - adultes dans l'estuaire de la Gironde / Bassin d'Arcachon - juvéniles dans l'estuaire de la Gironde / bassins aquacoles (marais) adjacents	exposition seule et combinée au Cd et au Zn d'huîtres juvéniles diploïdes et triploïdes dans les bassins aquacoles (marais) adjacents à l'estuaire de la Gironde
Durée de l'étude	10 semaines	1 année et 9 mois	2 semaines
Cinétiques d'échantillonnage	2, 8 h, 1, 3, 10, 24, 48, et 72 j	tous les 40 jours environ (9 et 7 temps)	10 mois 6 temps
Niveaux d'analyse	Organisme entier et tissus (branchies, masse viscérale, reste du corps)	Organisme entier et tissus pour les adultes (branchies, glande digestive, reste du corps)	Organisme entier et tissus (branchies, glande digestive, reste du corps)
Période de collecte des organismes	fin février	Adultes : fin septembre - Juvéniles : fin mars	début novembre
Temps d'acclimatation	3 jours	10 jours	7 jours
Caractéristiques physico-chimiques	Paramètres mesurés à chaque échantillonnage : concentrations de métal total et dissous - température, pH, O ₂	Eau du réseau + sable pur - 20°C - pH 8,5 - 9,5 mg O ₂ .l ⁻¹ - photopériode 12h - ~10 ⁵ algues <i>Scenedesmus suspicatus</i> .ml ⁻¹ tous les deux jours - 15 µg Cd.l ⁻¹ et 1 mg Zn.l ⁻¹	Eau de mer synthétique 25‰ - 20°C - pH 8,5 - 9,5 mg O ₂ .l ⁻¹ - photopériode 12h - ~0,05 g algues <i>Isochrysis galbana</i> tous les deux jours - 15 µg Cd.l ⁻¹ et 1 mg Zn.l ⁻¹

⁽¹⁾ Résultats intégrés dans les Programmes de recherche : Programme LIITEAU Gironde et Programme G.I.S.-ECOBAG / Agence de l'eau Adour Garonne.

Tableau 9 : Méthode utilisée pour chacune des études menées en milieu dulcicole et estuarien (les objectifs de recherche et la technique employée sont rappelés).

2-3. BASES METHODOLOGIQUES SUR LE TERRAIN ET EN CONDITIONS CONTROLEES DE LABORATOIRE

Les études menées pour caractériser les mécanismes de réponse des métallothionéines (MTs) chez les bivalves, en amont et en aval du *continuum* fluvio-estuarien, ont consisté à développer des approches complémentaires de terrain et de laboratoire. Le **Tableau 9** résume la méthode utilisée pour chacune des études menées sur le terrain et en laboratoire.

2-3.1. METHODOLOGIE D'ETUDE SUR LE TERRAIN

A- La technique de transplantation

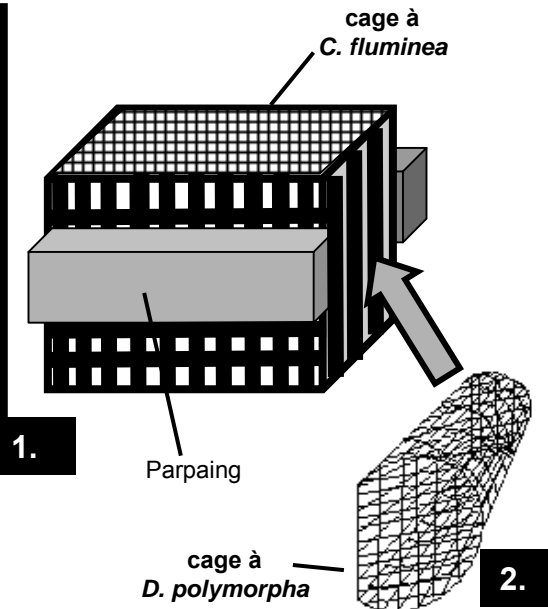
In situ, l'approche écotoxicologique a consisté à suivre, au cours de cinétiques courtes (quelques heures) et longues (plusieurs mois), l'évolution des concentrations des métaux dans les corps mous entiers ou les organes des bivalves et la réponse conjointe des MTs, tout en mesurant les caractéristiques et variations des paramètres physico-chimiques caractérisant chacun des sites. Dans cet objectif, la technique de transplantation des populations a été retenue le long du gradient de pollution polymétallique amont du Lot pour *C. fluminea* et *D. polymorpha*, dans l'estuaire de la Gironde et un marais adjacent, parallèlement au Bassin d'Arcachon, pour *C. gigas*. Cette procédure a pour avantage de permettre un suivi de l'évolution des processus (croissance, bioaccumulation métallique, réponse des MTs) au cours des saisons sur différents sites simultanément et cela, à partir d'une même population d'individus. En comparaison, la collecte d'organismes indigènes se heurte à des problèmes de répartition des espèces pas toujours présentes sur tous les sites d'études (impossibilité d'implantation, pression trop forte de contamination, présence de prédateurs, difficulté à trouver un site de référence, etc.) et à

DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX DE TERRAIN

Dispositif de transplantation à la confluence Riou-Mort / Lot



Cages perforées pour *Corbicula fluminea*



Dispositif de transplantation dans l'estuaire de la Gironde



Poches d'huîtres adultes fixées sur une table ostréicole

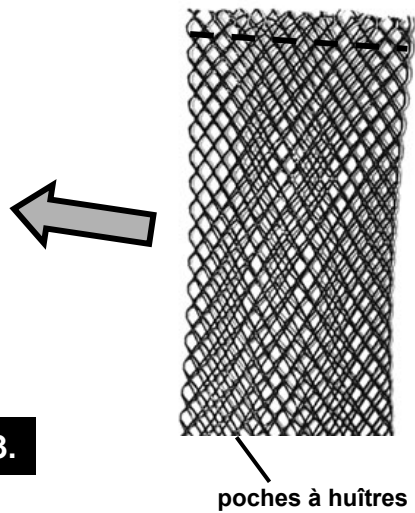


Figure 34 : Les dispositifs expérimentaux employés pour la transplantation de *Corbicula fluminea* (1), *Dreissena polymorpha* (2) et *Crassostrea gigas* (3).

l'historique des événements subis par les populations en terme d'âge, de croissance, de capacité de reproduction.

La méthode adoptée repose sur l'implantation simultanée dans l'eau d'organismes "de référence" au niveau de différentes stations d'étude. Les bivalves sont maintenus dans des cages perforées, à l'intérieur de la colonne d'eau pour les moules et les huîtres, et posées sur le fond pour *C. fluminea*. Ces précautions ont pour objectif de respecter au mieux les conditions de vie de chaque espèce et de permettre un échange permanent avec le milieu environnant (en terme d'hydrologie, de conditions abiotiques, biotiques et de contamination).

Les cages utilisées pour *C. fluminea* correspondent à des "containers" en polyéthylène - 55 x 39 x 29 cm (La Bovida, norme alimentaire) - aux parois largement perforées (**Figure 34**). Les couvercles sont constitués d'un filet rigide à grosses mailles (3 mm), fixé à l'aide de colliers en plastique. Les cages sont lestées au moyen de deux parpaings (poids total : 15 kg), fixés latéralement et assurant la stabilité de la structure sur le fond, voire l'enfouissement dans les strates superficielles des sédiments. Les cages utilisées pour la transplantation de *D. polymorpha* correspondent à des demi-tubes de grillage placés latéralement sur les cages contenant les corbicules, pour une position à l'intérieur de la colonne d'eau. Ces ensembles implantés sur différentes stations au niveau de la confluence du Riou-Mort et du Lot sont reliés à la berge par des cordes, permettant leur remontée lors des campagnes d'échantillonnage.

Pour les huîtres, des poches en plastique perforées, correspondant aux standards professionnels, ont été utilisées. Pour les adultes, la maille est de 2 cm ; pour les juvéniles, 0,5 cm (**Figure 34**). Les poches scellées et identifiées ont été implantées sur les différents sites pour les études dans la partie aval du *continuum* fluvio-estuarien, fixées horizontalement sur des tables ostréicoles, de façon à les maintenir dans la colonne d'eau. Notons que ces marais ne subissent pas les variations du niveau d'eau des marées.

B- La composante biologique et l'échantillonnage

Pour ces études, des lots homogènes d'organismes ont été constitués à partir d'un critère de taille défini en fonction de la longueur antéro-postérieure maximale de la coquille des bivalves. Cette précaution a eu pour objectif de limiter la dispersion des critères d'analyse sous l'influence de facteurs pondéraux.

a. Origine des populations de bivalves

Les individus de l'espèce *C. fluminea* ont été collectés dans le Lac de Cazaux-Sanguinet. Les populations de *D. polymorpha* ont été prélevées sur une digue au fil de l'eau de la Garonne, à hauteur de Golfech. Les huîtres adultes (18 mois) de l'espèce *C. gigas* ont été fournies par des ostréiculteurs du Bassin d'Arcachon et les juvéniles âgés de 2 mois ont été obtenus par captage au niveau de l'Ile de Ré.

b. Echantillonnage des bivalves

Les échantillons prélevés à chaque temps des cinétiques (voir **Tableau 9**) ont été conditionnés dans des sachets de polyéthylène (Whirl-Pak) scellés et placés dans des glacières contenant de la carboglace en batonnets. Arrivés au laboratoire, les sachets ont été remplis d'azote gazeux et placés à -80°C dans l'attente de leur analyse. La congélation anoxique s'est avérée primordiale afin d'empêcher l'oxydation des MTs, susceptible de provoquer la polymérisation des molécules et d'interférer avec la procédure d'isolement et de quantification (Lobel et Payne, 1987 ; Couillard *et al.*, 1993)

La technique de transplantation permet une bonne caractérisation des processus survenant *in situ*. Néanmoins, ces études se heurtent à la complexité des facteurs présents et dont l'impact sur les critères d'analyses retenus ne peut être caractérisé qu'à partir d'approches réalisées en conditions contrôlées de laboratoire. Ainsi, parallèlement à chaque étude menée sur le terrain, des études expérimentales ont été développées. Elles ont permis d'approfondir l'analyse des processus écotoxicologiques, biochimiques et génétiques.

2-3.2. METHODOLOGIE D'ETUDE EN CONDITIONS CONTROLEES DE LABORATOIRE : SUPPORTS EXPERIMENTAUX

Les protocoles mis en oeuvre lors des expériences réalisées en laboratoire ont permis d'analyser comparativement la capacité de synthèse des métallothionéines et d'induction de certains de leur gènes, en relation avec la bioaccumulation des métaux par *Corbicula fluminea*, *Dreissena polymorpha* et *Crassostrea gigas* exposés aux cadmium et au zinc, isolément et en mélange.

DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX DE LABORATOIRE

Unités expérimentales

Dispositif expérimental d'étude en eau douce

Composante biologique



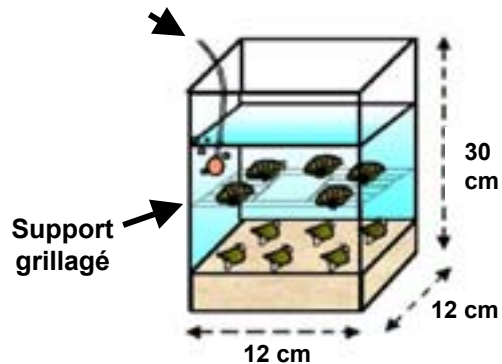
Corbicula fluminea



Dreissena polymorpha

+ Apports d'algues 2 fois par semaine
(*Scenedesmus subspicatus*)

Aération du système



Biotope mixte

Colonne d'eau : 3 l d'eau douce déchlorée

Substrat de fond : Sable pur

Dispositif expérimental d'étude en eau saumâtre

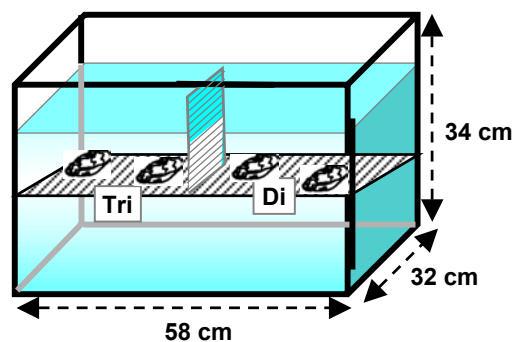
Composante biologique

Crassostrea gigas

Di diploïde

Tri triploïde

+ Apports d'algues 2 fois par semaine
(*Isochrysis galbana*)



Biotope

Colonne d'eau : 60 l d'eau de mer synthétique déchlorée à salinité 25‰

Figure 35 : Structure des unités expérimentales.

A- Structure des systèmes expérimentaux

Le dispositif expérimental de base utilisé est un aquarium en verre collé de petite taille (12x12x30 cm) pour les bivalves d'eau douce ou un bac plastique (58x34x32 cm) pour les huîtres, dont les parois internes sont recouvertes d'un film plastique en polyéthylène (Plastiluz, norme alimentaire) (**Figure 35**). Cette procédure évite la contamination des enceintes et limite la fixation des métaux, en comparaison avec un contact direct sur les parois en verre ou en plastique.

a. Le biotope

Chaque unité expérimentale est un microcosme dans lequel le biotope reproduit au mieux la niche écologique qu'occupe chaque espèce de bivalve étudiée. Ainsi, pour *C. fluminea*, le biotope est mixte, composé de deux compartiments : le substrat (sédiment pour permettre l'enfouissement des organismes) et la colonne d'eau. Pour *D. polymorpha* et *C. gigas*, les bivalves sont maintenus sur des grilles en suspension à l'intérieur de la colonne d'eau.

• Nature du substrat de fond dans les unités expérimentales pour les études en eau douce :

Le substrat utilisé se compose de sable ultra-pur (98% de silice – granulométrie 0,8 à 1,4 mm – SILAQ), placé directement dans les unités expérimentales (800 g/unité – épaisseur : 3 cm). L'utilisation d'un tel substrat s'est imposée par la volonté de privilégier la voie de contamination directe à partir de la source eau, en limitant la fixation des métaux sur la fraction particulaire du substrat, et ceci en relation avec les conditions observées *in situ* dans le Riou-Mort (niveaux de contamination retenus équivalents aux concentrations de métal dissous). D'autre part, ce substrat permet de s'affranchir de la présence de facteurs concomitants qui pourraient influencer ou modifier la réponse des MTs, comme par exemple la présence d'autres contaminants (métaux, hydrocarbures, ...).

• Caractéristiques de la colonne d'eau des unités expérimentales :

Les unités expérimentales en verre collé ont été remplies avec 3 litres d'eau du réseau déchlorée par aération, en provenance de nappes phréatiques profondes. Dans les bacs en plastique, 60 litres d'eau de mer artificielle à $25 \pm 0,5\%$, 20°C ont été ajoutés, préparés 2 jours avant l'introduction des organismes à partir de sels Instant Ocean® (Aquarium Systems, Mentor, OH, USA) et d'eau du réseau déchlorée.

Le niveau de l'eau dans chaque unité expérimentale a été réajusté quotidiennement au cours des expériences afin de compenser les pertes liées à l'évaporation ou encore aux prélèvements d'échantillons pour le suivi de la pression de contamination dans ce compartiment. Un système de bullage, constitué d'un diffuseur relié à une pompe (Ren 301) et placé à proximité de la surface, assure une saturation du milieu en oxygène dissous, pendant toute la durée des expériences (Oxymètre Labo-Moderne OXI 91).

b. La composante biologique

La composante biologique est représentée par les trois espèces de mollusques étudiées, collectées en grand nombre sur différents sites de référence. La collecte des individus a été effectuée durant la phase de repos sexuel des organismes, de façon à éviter les phénomènes d'induction des MTs liés à la production hormonale, comme mis en évidence chez *C. fluminea* (Kägi, 1991 ; Baudrimont *et al.*, 1997b).

• Origine des populations de bivalves

Les individus de l'espèce *C. fluminea* utilisés ont été collectés dans un canal d'approvisionnement d'une pisciculture expérimentale du CEMAGREF implantée sur la rivière Isle (St Seurin sur l'Isle en Gironde). Les représentants de l'espèce *D. polymorpha* ont été prélevés à la hauteur de Golfech dans la Garonne. Les individus juvéniles (12 mois) de l'espèce *C. gigas* sont originaires quant à eux du Bassin d'Arcachon.

• Echantillonnage des bivalves

C. fluminea et *D. polymorpha* ont été transportés depuis leur site d'approvisionnement vers le laboratoire dans de l'eau prélevée sur place, maintenue à température constante (environ 10°C) et aérée par un système de bullage. Cette procédure a permis de limiter les stress physiques et/ou chimiques susceptibles d'influer sur la biosynthèse des MTs. Les huîtres *C. gigas*, soumises au balancement des marées, et donc moins sujettes au stress de l'émersion, ont été ramenées à sec au laboratoire.

Les organismes ont été ensuite placés dans des bacs de stabulation installés dans des bains-maries afin d'obtenir une température de l'eau identique à celle du site, au moment du prélèvement. Ce facteur a ensuite été progressivement amené à 15°C, sur une période de 15 jours d'acclimatation pour les bivalves d'eau douce et à 20°C sur 7 jours pour les huîtres. Notons que les moules zébrées ont été disposées, dès leur arrivée, sur les supports grillagés destinés aux unités expérimentales afin de faciliter leur fixation et les corbicules sur un substrat identique à

celui des unités expérimentales, leur permettant de s'enfouir. Trois jours avant le temps zéro des expériences, correspondant à l'ajout de la concentration nominale de Cd et/ou de Zn, les bivalves ont été introduits dans les unités expérimentales. Pour cette étape, des lots homogènes d'organismes ont été constitués à partir d'un critère de taille défini en fonction de la longueur antéro-postérieure maximale de la coquille et précisé pour chaque étude. Ce critère morphométrique présente une bonne corrélation avec le poids frais des corps mous ; les faibles écarts de taille ont conduit à des biomasses totales similaires dans les unités expérimentales.

Au cours des phases d'acclimatation et de contamination, les organismes ont été nourris par des apports réguliers (2 fois par semaine) à partir de culture d'algues phytoplanctoniques d'eau douce ou marine. Pour *C. fluminea* et *D. polymorpha*, la quantification des apports ($3 \cdot 10^5$ algues/ml de l'espèce *Scenedesmus subspicatus*) a reposé sur l'évaluation des taux de filtration des deux modèles biologiques à 15°C et en normoxie, réalisée au sein du Laboratoire par D. Tran à partir des mesures de la décroissance des concentrations d'algues dans le milieu ($26,2 \pm 4,3$ ml.h⁻¹.g⁻¹ pour *C. fluminea* et $55,9 \pm 8,7$ ml.h⁻¹.g⁻¹ pour *D. polymorpha*) (Tran, 2001). Pour les huîtres, une quantité approximative de 0,05 g d'algues (*Isochrysis galbana*) remises en suspension a été apportée par individu (Butler et Roesijadi, 2001b). Ces apports modérés ont permis de limiter la présence à long terme d'algues en suspension, susceptibles de constituer des sites de fixation des métaux (Sorrentino, 1979) et de modifier la biodisponibilité de ces éléments au sein de la colonne d'eau. Au vu de l'activité de filtration des mollusques, les quantités d'algues phytoplanctoniques ajoutées dans les unités ont été rapidement ingérées, limitant ainsi la voie trophique de contamination. Les informations disponibles dans la littérature indiquent qu'un apport de plusieurs espèces d'algues en mélange est favorable à la croissance des bivalves ; néanmoins, les accroissements pondéraux obtenus en laboratoire sur des cinétiques à plus ou moins long terme s'avèrent toujours inférieurs à ceux observés en milieu naturel (Foe et Knight, 1986). La production intensive de ces algues est effectuée dans des ballons de 3 litres, dans des milieux de culture enrichis en nitrate, phosphate et vitamines et pour lesquels l'agent chélateur EDTA n'a pas été ajouté. La composition des milieux "Dauta" pour *S. subspicatus* ou "f/2" sans silice pour *I. galbana* (Guillard et Ryther, 1962) est reportée dans les **Annexes 1 et 2**.

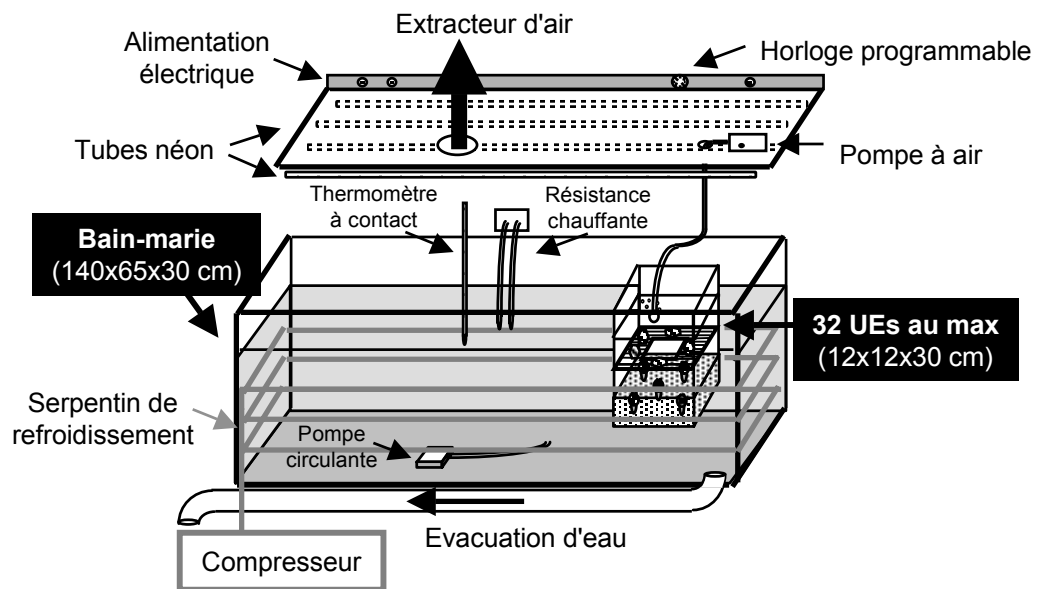


Figure 36 : Dispositifs mis en place pour la régulation des facteurs abiotiques à l'échelle de l'unité expérimentale (UE).

B- Régulation des paramètres physico-chimiques

Au cours des expériences, la température a été maintenue constante ($15 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ pour les bivalves d'eau douce et $20 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ pour les huîtres) par l'intermédiaire de bains-maries (140x65x30 cm) équipés d'un système mixte autonome de chauffage (résistances) et de refroidissement (serpentins de cuivre reliés à un compresseur), dont le fonctionnement est déclenché à partir des mesures effectuées par des thermomètres de contact (**Figure 36**). L'homogénéité de ce facteur a été assurée par brassage permanent de l'eau (pompe immergée).

La photopériode a été fixée à 12 h d'éclairage par jour à partir d'horloges programmées et de sources de lumière artificielle (4 tubes néon, Sylvania F36, Groslux, placés à 45 cm de la surface des unités) assurant un éclairage à l'interface eau/air d'une intensité moyenne de $40 \mu\text{moles de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (LI189, Li-cor, inc., USA).

Précisons que la régulation du pH au cours des expériences s'avère inutile, la valeur de ce facteur variant très peu au cours du temps ($\text{pH} = 7,8 \pm 0,3$).

C- Les plans d'expérience élaborés

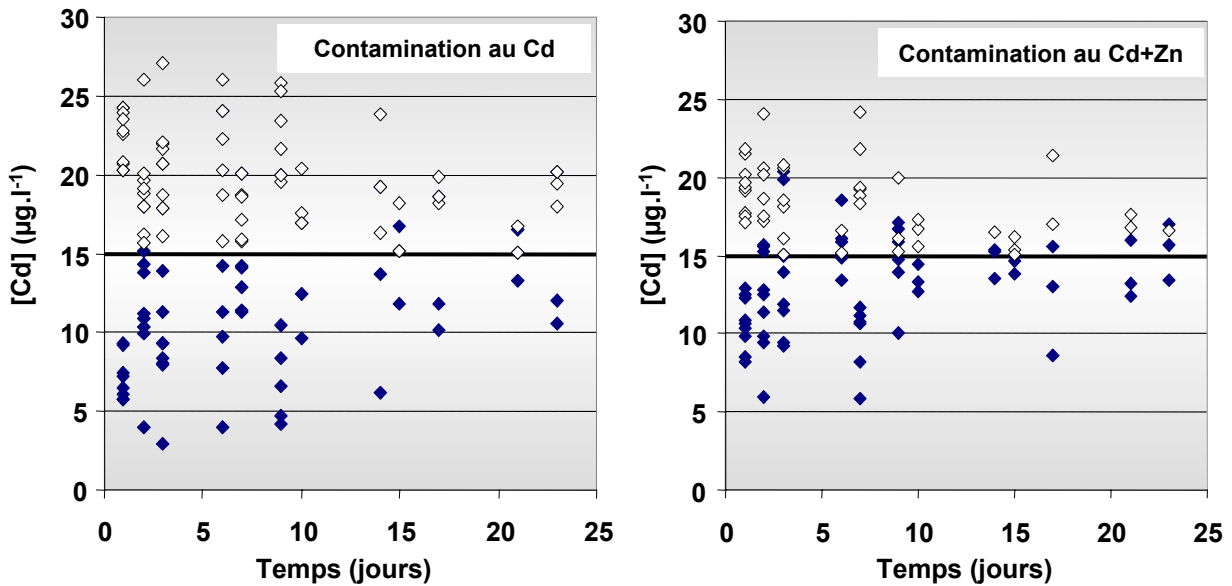
Les protocoles établis pour les études expérimentales ont reposé sur la réalisation de plans factoriels complets, permettant la prise en compte simultanée de plusieurs facteurs contrôlés. Ces facteurs peuvent être liés à la nature du métal présent dans le biotope ou encore à la durée d'exposition. Notons que l'attribution de ces différentes conditions par unité expérimentale a été réalisée par randomisation, afin de minimiser l'influence éventuelle de facteurs non contrôlés et concomitants durant l'expérience (conditions d'éclairage des unités expérimentales dans le bain-marie, par exemple).

La description précise de ces protocoles sera donnée dans chaque partie concernant les études expérimentales associées à chaque espèce de bivalve.

D- Méthode de contamination des unités expérimentales

Pour chacune des études menées en laboratoire, la voie directe de contamination des bivalves par les métaux a été retenue, c'est-à-dire à partir de l'introduction des contaminants dans la colonne d'eau des unités expérimentales.

Exposition au cadmium



Exposition au zinc

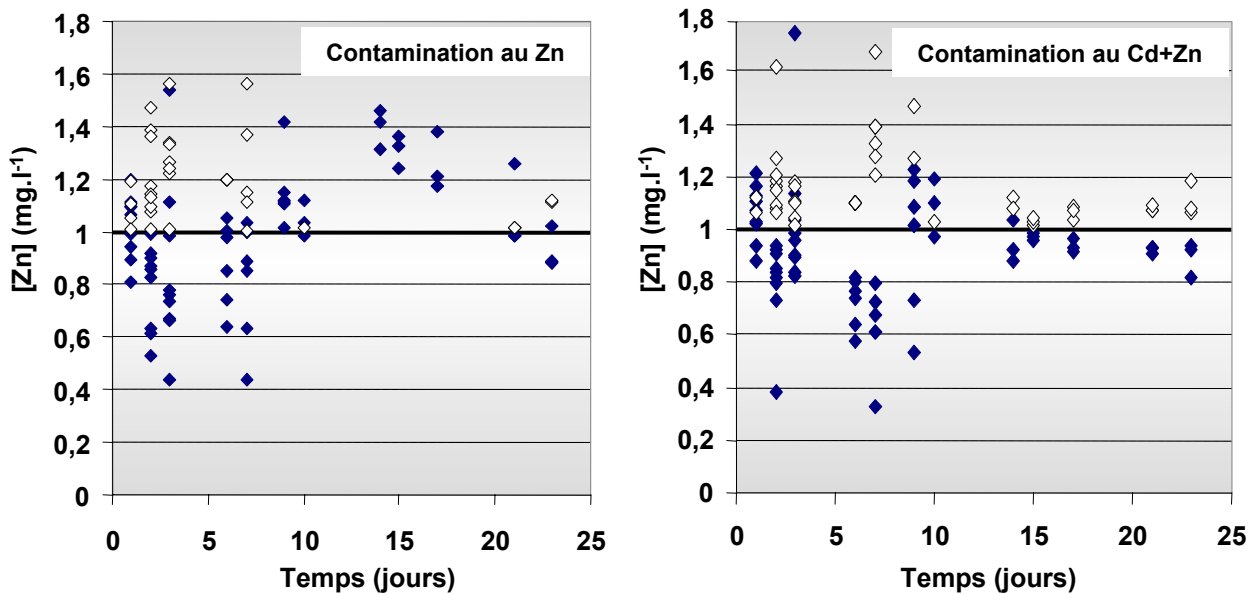


Figure 37 : Exemple des ajustements de la pression de contamination réalisés pour l'étude expérimentale en eau douce (Chapitre 3) dans les aquariums contaminés au Cd, Zn ou Cd+Zn : évolution des concentrations de cadmium et de zinc dans la colonne d'eau des aquariums pour chaque condition de contamination, le maintien de la pression de contamination étant assuré par la méthode des ajouts compensés lors de décroissances avérées après dosage.

Les losanges foncés représentent les valeurs mesurées en fin de cycle (24 h) et les blancs, les valeurs théoriques après ajout.

L'analyse comparative de plusieurs conditions d'exposition aux métaux seuls ou en mélange a imposé un contrôle rigoureux des conditions et des modalités de contamination. Une surveillance régulière des concentrations métalliques dans la colonne d'eau des unités a été indispensable tout au long de la durée des expériences, dans la mesure où de nombreux facteurs contribuent à les faire décroître (adsorption sur les parois, volatilisation, transferts à l'interface eau/sédiment ou vers les bivalves, ...). Un ajout initial apportant la quantité nécessaire de métal pour l'obtention de la concentration nominale souhaitée au temps zéro de contamination a été réalisé. Par la suite, pour l'étude expérimentale en milieu salin, des changements d'eau aux concentrations nominales ont été effectués tous les deux jours ; pour l'étude expérimentale en eau douce, des ajouts quotidiens à partir de solutions aqueuses concentrées (CdCl_2 , ZnCl_2 , Merck) ont permis de compenser les pertes au jour le jour. Ces ajouts ont été ajustés en fonction de la décroissance déterminée à partir des mesures effectuées sur les échantillons d'eau (10 ml) collectés à la fin de chaque cycle de 24 huîtres (**Figure 37** : ex. des ajustements réalisés pour l'étude expérimentale d'eau douce décrite au Chapitre 3). Cet ajustement, opéré dans chaque unité expérimentale, correspond à un apport de métal deux fois supérieur à la différence mesurée entre la valeur nominale de la concentration désirée et celle mesurée en fin de cycle dans l'unité expérimentale ($([\text{Métal}_{\text{nominale}}] - [\text{Métal}_{\text{mesurée}}]) \times 2$). Mentionnons que les prélèvements ont été effectués quotidiennement, voire bi-quotidiennement, au cours des 3 premiers jours de l'expérience dans l'ensemble des unités expérimentales, afin d'ajuster efficacement le volume des ajouts pour chaque condition. La décroissance des concentrations métalliques dans la colonne d'eau se stabilisant progressivement, nous n'avons effectué ensuite les dosages que 3 fois par semaine, puis 2 fois, un ajout quotidien constant étant réalisé entre chaque point de mesure. Cette procédure, qui a nécessité un grand nombre de dosages, a permis une maîtrise rigoureuse des conditions d'exposition des organismes, dont la caractérisation est primordiale pour l'analyse interprétative des résultats.

En parallèle, des dosages sur des prélèvements d'eau filtrée à $0,45 \mu\text{m}$ (filtres Autotop Whatman en polycarbonate – Whatman International, Angleterre), pour chaque condition, ont permis de vérifier indirectement la part négligeable de fixation des métaux sur la fraction particulaire de la colonne d'eau, temporairement enrichie par l'apport nutritif d'algues dans le milieu. Par exemple, le Cd dissous représente en moyenne 97 à 99% du Cd total, dans nos conditions expérimentales ; pour le Zn, la totalité du métal est retrouvé dans la fraction dissoute.

E– Le prélèvement et la conservation des échantillons biologiques

A la fin de chaque durée d'exposition, les mollusques ont été prélevés et séchés sur une feuille de papier absorbant. Les échantillons destinés à l'étude de la bioaccumulation des métaux et à la quantification des MTs ont été placés par espèce dans des sachets de polyéthylène (Whirl-Pak) remplis d'azote gazeux afin de limiter la polymérisation des molécules de MTs et scellés. Les échantillons ont ensuite été congelés à -80°C dans l'attente de leur analyse. Les organismes utilisés pour les études en biologie moléculaire ont été congelés soit à l'azote liquide après ouverture de la coquille (*D. polymorpha*), soit à -80°C après analyse de la ploïdie pour les huîtres.

2-4. NIVEAUX ET CRITERES D'ANALYSE POUR LES ETUDES MENEES *IN SITU* ET EN LABORATOIRE

Le suivi de la bioaccumulation des métaux et la quantification des MTs sur les échantillons congelés de *C. fluminea*, *D. polymorpha* ou *C. gigas* collectés au cours des différentes études *in situ* et en laboratoire ont été réalisées, soit sur l'organisme entier (corps mou), soit sur trois ensembles tissulaires : pour *C. fluminea* et *D. polymorpha*, les branchies, la masse viscérale (palpes labiaux, tractus digestif et glandes annexes, gonades, reins, cœur) et le reste (manteau, pied pour *C. fluminea* et muscles adducteurs) ; pour *C. gigas*, les branchies, la glande digestive (incluant l'estomac) et le reste des tissus (manteau, muscles, gonades, cœur, reins, palpes labiaux...). Pour chaque individu décongelé, le corps mou a été retiré de sa coquille, disséqué ou non, puis égoutté sur papier absorbant et pesé avant analyse.

La croissance des organismes au cours des expériences, notamment celles réalisées sur le terrain, a été évaluée à partir de deux critères complémentaires : la mesure de l'axe antéro-postérieur ou longueur de la coquille et le poids sec des corps mous entiers. De même, les différentes phases du cycle de reproduction des bivalves ont été caractérisées par l'évolution des données pondérales des tissus contenant l'appareil reproducteur ou gonades avec une observation directe de l'état de maturité sexuelle des organismes (présence et abondance de la laitance).

L'étude de l'expression des gènes de MTs dans les études expérimentales menées en conditions contrôlées de laboratoire n'a concerné que deux espèces de bivalves (*D. polymorpha* et *C. gigas*), pour lesquels les séquences génétiques de MTs sont disponibles dans la littérature. Pour ces échantillons, seules les branchies ou portions de celles-ci ont été prélevées après décongélation et traitées pour l'extraction des ARN totaux. Cet organe a volontairement été retenu car il est susceptible de fournir une réponse génétique rapide, eu égard à son contact direct avec les métaux présents dans la colonne d'eau.

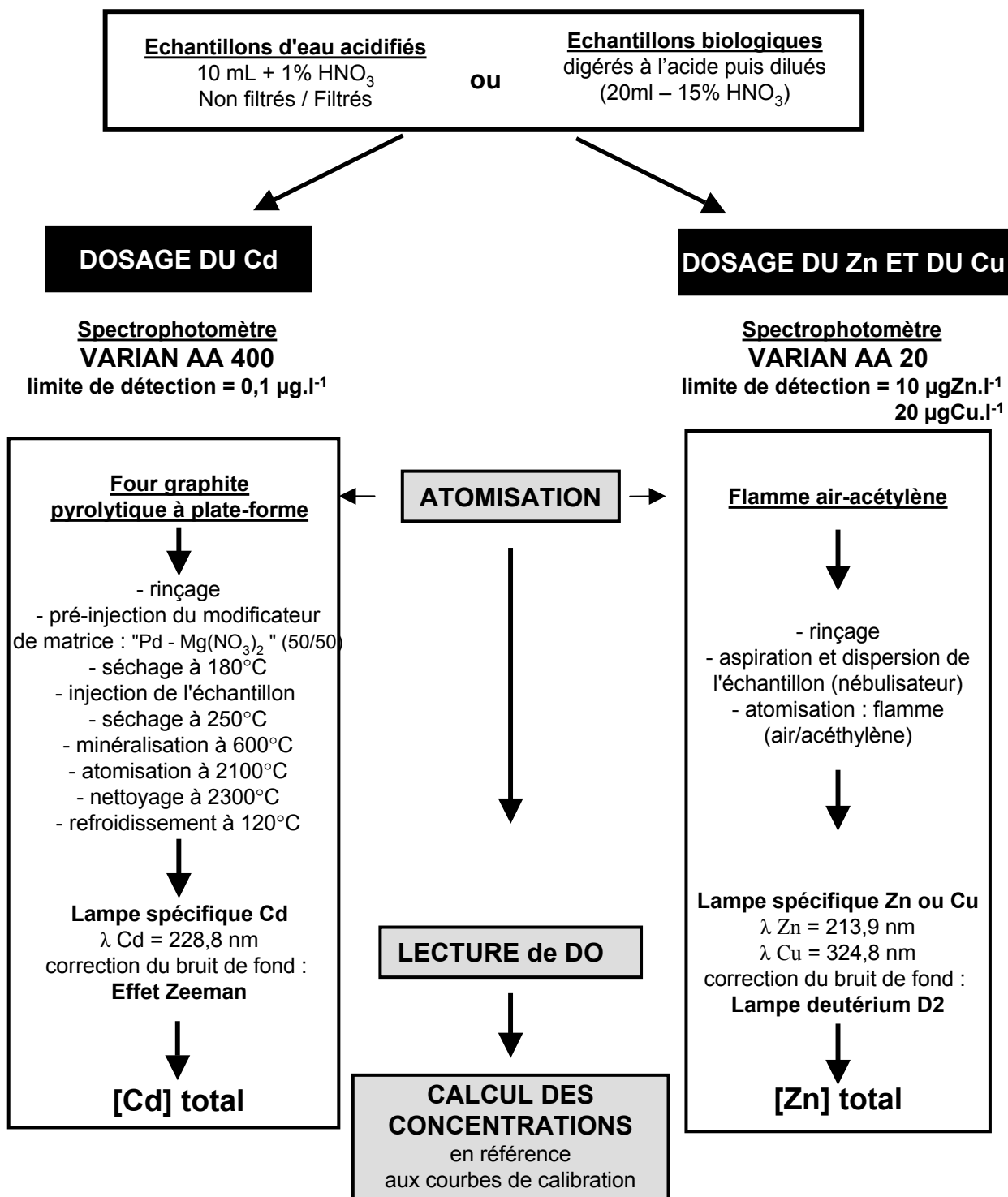


Figure 38 : Principales étapes du dosage du cadmium, du zinc et du cuivre par spectrophotométrie d'absorption atomique (four graphite pyrolytique ou flamme) pour les échantillons biologiques et les prélèvements d'eau.

2-5. TECHNIQUES D'ANALYSE DES METAUX

La technique utilisée pour la détermination des concentrations métalliques en Cd, Cu, Zn ou Hg est la spectrométrie d'absorption atomique après atomisation de l'élément (soit par la chaleur, soit par réduction chimique).

Avant le dosage proprement dit, les échantillons biologiques subissent une digestion par attaque à l'acide nitrique (3 ml d' HNO_3 pur pour 0,050 à 1 g d'échantillon humide) dans des tubes de verre borosilicatés et en milieu pressurisé et à 100°C , pendant 3 heures. Les digestats sont ensuite ramenés à un volume de 20 ml à l'aide d'eau ultra-pure (MilliQ plus). Pour les échantillons de plus d'1 g de poids frais, une homogénéisation des tissus par broyage mécanique (Ultra-Turrax T-25 - Sigma) a été nécessaire avant l'étape de digestion.

Pour les échantillons d'eau prélevés au cours des campagnes d'échantillonnage sur le terrain ou au sein des unités expérimentales, filtrés à $0,45\ \mu\text{m}$ (métaux associés à la phase dissoute) ou non filtrés (concentrations totales), les éléments métalliques ont été dosés après une simple acidification (ajout de 1% d' HNO_3 pur).

2-5.1. DOSAGE DU CADMIUM

Les concentrations en cadmium ont été déterminées par spectrophotométrie d'absorption atomique électrothermique (SAAE), avec un passeur automatique d'échantillons (Varian AA 400, Victoria, Australie), l'atomisation du métal se faisant dans un four graphite pyrolytique (modèle GTA96). Le principe général de la méthode est présenté sur la **Figure 38**. Des volumes de $10\ \mu\text{l}$ d'échantillons sont prélevés pour chaque analyse et mélangés à $4\ \mu\text{l}$ de modificateur " $50\% \text{Pd} + 50\% \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ " avant atomisation, de manière à minimiser les effets de matrice, conjointement à une correction du bruit de fond par effet Zeeman.

La limite de détection est de $0,1\ \mu\text{g Cg.l}^{-1}$ (3 x écart-type de 10 "blancs").

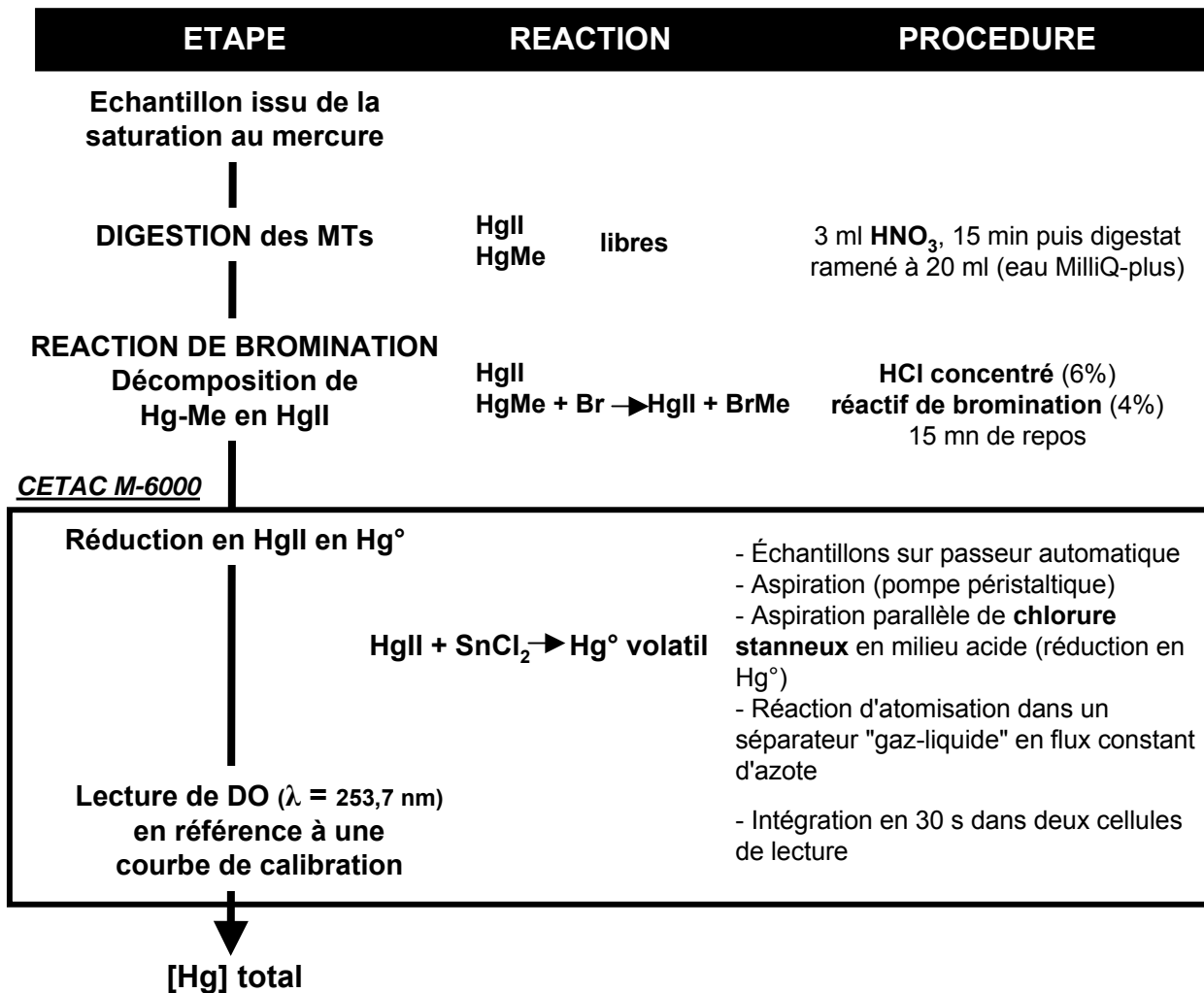


Figure 39 : Les différentes étapes du dosage du mercure par spectrophotométrie d'absorption atomique (CETAC M-6000) en vapeur froide, pour la détermination des métallothionéines par la méthode de saturation au mercure inorganique.

HgII = mercure inorganique ; HgMe = mercure organique ; MTs = métallothionéines ; Br = réactif de bromination ; SnCl₂ = chlorure stanneux

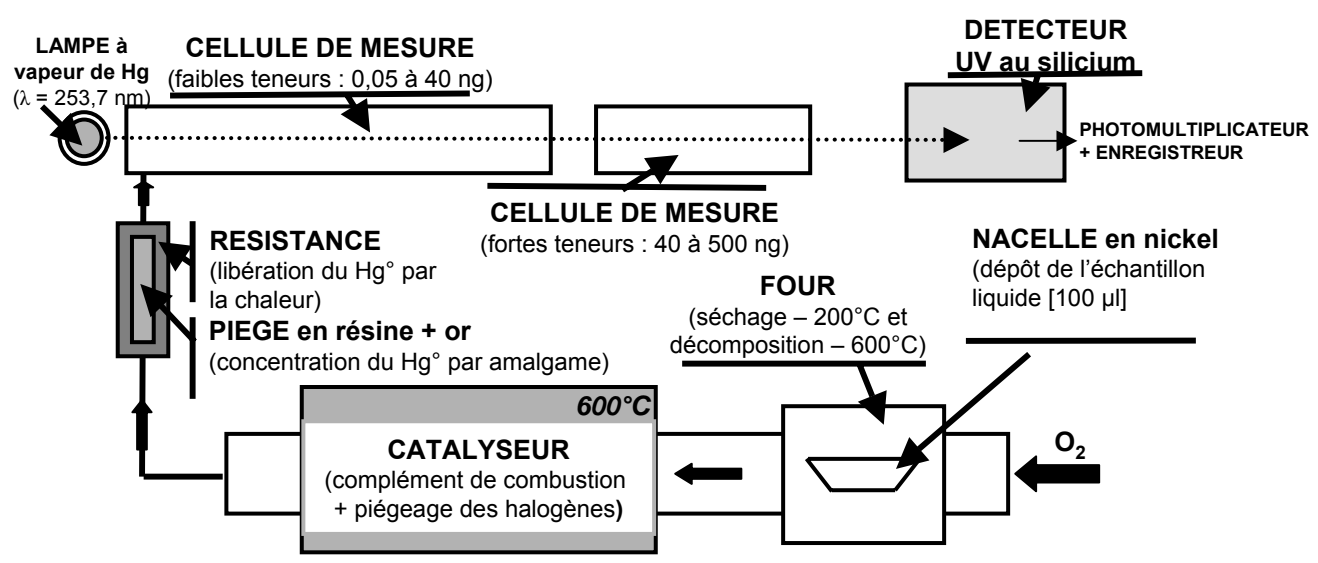


Figure 40 : Les différentes étapes du dosage du mercure total par traitement thermique et flux d'oxygène (LECO AMA 254), pour la détermination des métallothionéines par la méthode de saturation avec le mercure inorganique.

2-5.2. DOSAGE DU ZINC ET DU CUIVRE

La détermination des concentrations en Zn et Cu a été effectuée par spectrophotométrie d'absorption atomique avec flamme (SAAF, flamme : air-acétylène, Varian AA20, Victoria, Australie - **Figure 38**). La correction du bruit de fond spectral pour les longueurs d'onde spécifiques (λ Zn = 213,9 nm et λ Cu = 324,8 nm) s'opère grâce à une lampe de deutérium. Les limites de détection sont de 10 $\mu\text{g Zn.l}^{-1}$ pour Zn et 20 $\mu\text{g Cu.l}^{-1}$ (3 x écart-type de 10 "blancs").

2-5.3. DOSAGE DU MERCURE TOTAL

La technique d'analyse quantitative des métallothionéines (paragraphe suivant) repose sur la détermination du Hg total dans les échantillons traités par la méthode de saturation par le mercure inorganique. Les dosages du métal ont été réalisés par spectrophotométrie d'absorption atomique soit en vapeur froide (Varian CETAC M-6000 Mercury Analyser) soit par traitement thermique sous flux d'oxygène (LECO AMA 254, Altec, Prague, République Tchèque). La principale différence entre ces deux méthodes repose sur le principe d'atomisation de l'élément. Le principe analytique pour le dosage en vapeur froide (**Figure 39**) nécessite la dégradation des protéines MTs saturées de mercure par l'acide nitrique et l'application d'un traitement avec un réactif de bromination à tous les échantillons en fin de saturation, afin de transformer les formes organiques du mercure en Hg inorganique (Farey *et al.*, 1978). La réaction de réduction du HgII en Hg élémentaire (Hg°) volatil se fait ensuite par l'addition de chlorure stanneux en milieu acide (SnCl_2 , HCl). Le calcul de la concentration en Hg total dans l'échantillon se fait à partir d'une courbe de calibration (DO en fonction de $[\text{Hg}^{\circ}]$) établie à partir de densités optiques mesurées ($\lambda = 253,7$ nm) pour des concentrations connues en HgII. La limite de détection pour cette technique de dosage est de 0,01 $\mu\text{g Hg.l}^{-1}$ (3 x écart-type de 10 "blancs").

Les dosages avec le LECO AMA-254 (**Figure 40**) ne nécessitent pas d'étape préliminaire de digestion des échantillons et de bromination. La réduction en Hg° des formes organiques et inorganiques s'opère par chauffage à 600°C sous un flux d'oxygène. Le métal volatil Hg° est ensuite piégé par formation d'un amalgame avec une résine recouverte d'une micro-couche d'or permettant de concentrer le métal, et d'abaisser en conséquence les limites de détection à 0,01 ng ou 10 ng.l^{-1} .

TRACE ELEMENTS (milligrams/kilogram)			
DOLT-2		TORT-2	
Aluminum	25.2 ± 2.4	Arsenic	21.6 ± 1.8
Arsenic	16.6 ± 1.1	Cadmium	26.7 ± 0.6
Cadmium	20.8 ± 0.5	Chromium	0.77 ± 0.15
Cobalt	0.24 ± 0.05	Cobalt	0.51 ± 0.09
Chromium	0.37 ± 0.08	Copper	106 ± 10
Copper	25.8 ± 1.1	Iron	105 ± 13
Iron	1103 ± 47	Lead	0.35 ± 0.13
Lead	0.22 ± 0.02	Manganese	13.6 ± 1.2
Manganese	6.88 ± 0.56	Mercury	0.27 ± 0.06
Mercury	2.14 ± 0.28	Molybdenum	0.95 ± 0.10
Nickel	0.20 ± 0.02	Nickel	2.50 ± 0.19
Selenium	6.06 ± 0.49	Selenium	5.63 ± 0.67
Silver	0.608 ± 0.032	Strontium	45.2 ± 1.9
Thallium		Tin	0.04*
Tin	(0.13)*	Vanadium	1.64 ± 0.19
Zinc	85.8 ± 2.5	Zinc	180 ± 6
Methylmercury (as Hg)	0.693 ± 0.053	Methylmercury (as Hg)	0.152 ± 0.013
* information value only		* information value only	

Figure 41 : Concentrations de référence pour les métaux traces dans les échantillons certifiés lyophilisés DOLT-2 (foie de requin) et TORT-2 (hépatopancreas d'homard) – NRC/CNRC (Ottawa, Canada).

Les valeurs encadrées correspondent aux valeurs de références prises en compte pour chaque élément en fonction de la limite de détection des appareils de dosage.

La fiabilité de ces différentes méthodes de dosage et la reproductibilité des mesures ont été vérifiées régulièrement par l'analyse d'échantillons certifiés lyophilisés (Tort-2 : hépatopancréas de homard et/ou Dolt 2 : foie de requin ; CNRC, Ottawa, Canada) pour le dosage des échantillons biologiques et une solution certifiée pour le dosage des échantillons d'eau (Astasol-Mix M005 ; Analytica-Ltd, Prague, République Tchèque). Les valeurs obtenues pour le Cd, Zn, Cu et Hg ont toujours été comprises dans les "fourchettes" de concentrations indiquées par les fournisseurs (**Figure 41**).

	TECHNIQUES D'ETUDE DES MTs	PROPRIETE EXPLOITEE
ETUDE DE LA PROTEINE	Techniques de pré-traitement	
	Homogénéisation	
	Centrifugation	
	Techniques d'isolement et de purification des protéines totales ou isoformes	
	Electrophorèse dénaturante ou non	taille des protéines
	Méthodes chromatographiques	
	Chromatographie échangeuse d'ions, chromatographie liquide haute performance (HPLC) chromatographie d'exclusion (IEC) .../...	propriétés biochimiques (taille, affinité pour les ions métalliques, .../...)
	Traitements à l'acide	propriétés acidophiles des MTs
	Traitements à la chaleur	thermo-stabilité des MTs
	Traitements par un solvant	
ETUDE DU GENE	Techniques de quantification et de détection	
	<u>Méthodes directes</u>	
	Méthode électrochimique	propriétés redox des complexes formés par les groupements thiols avec les métaux dans la protéine
	<u>Méthodes indirectes</u>	
	Méthodes colorimétriques (Western Blot)	propriétés colorimétrique de différents produits en association avec des mercaptans
	Méthodes immunologiques (RIA, ELISA)	immunoréactivité avec des anticorps (épitopes des protéines)
	Méthodes de spectroscopie (spectrofluorimétrie, spectrométrie de masse) polarographie, UV	Groupements thiols
	Méthodes de saturation + spectrophotométrie d'absorption atomique ou spectrophotométrie gamma (saturation au Hg, Cd ou Ag "froids" ou radioactifs)	capacité de saturation des MTs et affinité différentielle pour les métaux
	Techniques de quantification de l'expression des gènes <i>mt</i> (quantification des ARNm)	
	NorthernBlot (RT)-PCR quantitative ou semi-quantitative	hybridation spécifique de séquences
.../...		

Tableau 10 : Principales techniques d'études pour la quantification des métallothionéines et de l'expression de leurs gènes.

2-6. TECHNIQUES DE QUANTIFICATION DES METALLOTHIONEINES ET DE L'EXPRESSION DE LEURS GENES

2-6.1. LA QUANTIFICATION DES METALLOTHIONEINES PAR LA METHODE DE SATURATION AU MERCURE FROID

A- Principales méthodes existantes

Pour l'analyse quantitative de ces protéines, un large éventail de techniques sont disponibles reposant sur des méthodes biochimiques, électrochimiques et immunologiques couplées à des techniques de pré-traitement des échantillons biologiques, d'isolement et de purification des MTs. Elles ont été développées à partir de matrices biologiques complexes et de différentes natures (tissus, fluides biologiques, cultures cellulaires, ...). La majorité d'entre elles exploitent les principales caractéristiques des MTs : leur capacité à lier les métaux, leur contenu en groupements thiols et leurs propriétés antigéniques. Le **Tableau 10** donne une liste non exhaustive des méthodes d'étude.

Le pré-traitement des échantillons permet d'isoler le compartiment cytosolique qui renferme les MTs. La séparation des MTs des autres protéines et notamment de celles de haut poids moléculaire, utilise ensuite certaines propriétés des MTs, comme leur résistance à la chaleur ou à l'acide. La quantification des MTs ou leur simple détection peut ensuite se faire selon des méthodes directes ou indirectes.

B- Les techniques de saturation

La technique de quantification que nous avons retenue utilise la saturation par les métaux. Elle est basée sur la très forte capacité des MTs à fixer ces éléments au niveau de leurs

"clusters", sur l'affinité différentielle des métaux pour les MTs et sur la stœchiométrie parfois connue entre la protéine et le métal.

Trois métaux sont généralement utilisés : le mercure, le cadmium et l'argent. Le dosage du métal se fait par spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) ou par spectrométrie γ si un isotope radioactif du métal est utilisé. Le principe repose sur la détermination des MTs par le déplacement des métaux fixés originellement sur leurs résidus cystéines à l'aide d'un métal à haute affinité, ajouté en excès. Rappelons que la séquence d'affinité des métaux pour les sites thiols des MTs est la suivante :

Hg(II)>>Cu(I), Ag(I), Bi(III)>>Cd(II)>Pb(II)>Zn(I)>Co(II)>Fe(II) (Vasák, 1991).

Après séparation des autres protéines et du reste de métal en excès, la concentration des MTs est estimée par quantification du métal, en considérant que celui-ci soit lié uniquement aux MTs. Les concentrations de MTs peuvent être déterminées lorsque la stœchiométrie "MT-métal" est connue.

a. Intérêt de la technique de saturation par le mercure inorganique

Afin d'analyser le rôle des MTs à l'égard de la bioaccumulation des métaux par les organismes aquatiques, notre Laboratoire a opté pour la méthode de saturation par le mercure inorganique, adaptée de celle décrite par Dutton *et al.* (1993) et Couillard *et al.* (1993) (modifié par Baudrimont, 1997 ; Baudrimont *et al.*, 1997b). Ce choix s'est fait en fonction des objectifs et des supports méthodologiques disponibles. Un des inconvénients majeur de la méthode de saturation par le Cd est qu'elle n'est pas applicable à des organismes préalablement exposés au cuivre ou au mercure, du fait de leur affinité supérieure sur les sites thiols des MTs. Dans le cas de la saturation à l'Ag, à pH 8,5, l'ion Ag^+ déplacerait aisément le Cu, le Cd et le Zn de la MT ; toutefois, la précipitation incomplète du complexe hémoglobine-Ag, chargé de récupérer l'Ag en excès ou fixé non spécifiquement aux MTs, peut être une source potentielle de variabilité (Couillard, 1997) ; la sensibilité de la méthode est donc moindre. Tout ceci a conforté l'intérêt apporté à l'utilisation du mercure, composé de plus forte affinité de liaison sur les sites thiols de ces molécules, et dont la méthode de détermination par SAA est particulièrement sensible.

Cette méthode a été mise au point à l'origine par Dutton *et al.* (1993), utilisant l'isotope 203 du mercure (émetteur γ), l'objectif étant le dosage des MTs biosynthétisées chez les poissons. Elle a été reprise et adaptée par Couillard *et al.* (1993) à l'INRS-ETE, Université du Québec (Ste Foy, Canada), afin d'étudier la réponse des MTs chez un mollusque bivalve d'eau

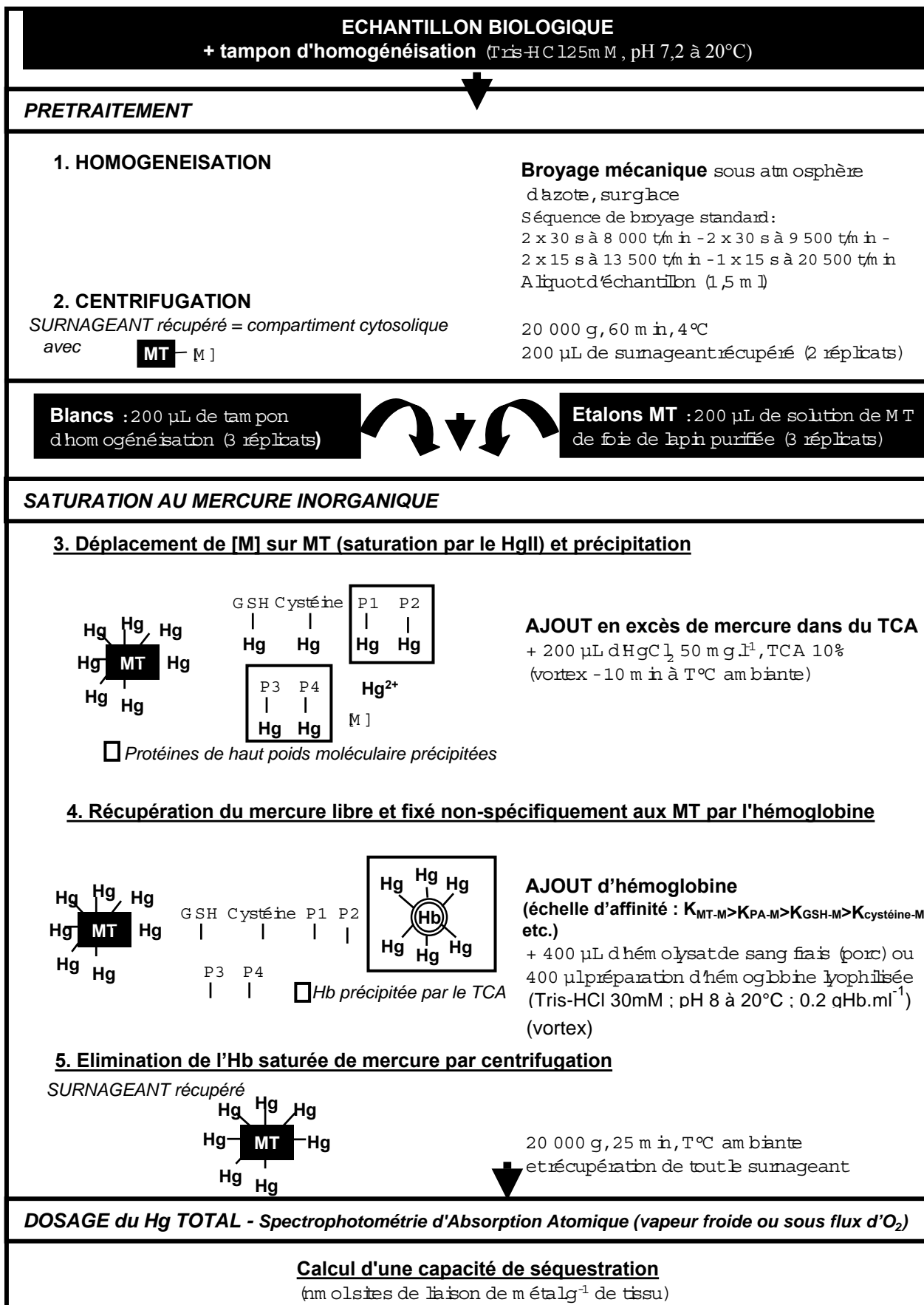


Figure 42 : Le principe général et les différentes étapes pour la quantification des métallothionéines par la méthode de saturation au mercure inorganique.

MT = métallothionéines ; [M] = métal ; TCA = acide trichloroacétique ; GSH = glutathion ; P1 à P4 = autres ligands cytosoliques ; Hb = hémoglobine

douce, l'anodonte : *Pyganodon grandis*. Mise en place et modifiée dans notre Laboratoire par M. Baudrimont, l'adaptation la plus importante a été le remplacement du mercure radioactif par du Hg froid, permettant le dosage de ce métal par SAA à vapeur froide (Baudrimont, 1997). Hormis la suppression des problèmes liés à l'utilisation d'un radioélément, cette modification avait pour objectif de permettre le dosage éventuel des MTs sur des échantillons biologiques préalablement contaminés par le mercure (Baudrimont *et al.*, 1997a). En effet, la méthode basée sur l'utilisation du ^{203}Hg repose sur le déplacement des autres métaux fixés sur les MTs¹, mais elle ne prend pas en compte nécessairement les atomes de mercure déjà présents au niveau des "clusters", l'efficacité de déplacement du Hg froid par le composé radioactif n'étant pas connue (Lobel et Payne, 1987). Par l'emploi du Hg froid sous forme inorganique², une estimation complète des sites peut être réalisée.

b. Principe de la méthode de saturation par le mercure inorganique

Le principe général de cette technique et les différentes étapes réalisées sont décrits sur la **Figure 42**.

L'isolement des MTs débute par une homogénéisation tissulaire dans des tubes de polypropylène de 20 ml, à l'aide d'un broyeur (Ultra-Turrax T-25) dans du tampon Tris-HCl 25 mM (Sigma, pH 7,2 à 20°C) ajouté à chaque échantillon dans des proportions sur la base "poids-poids" (avec un minimum de 2,5 ml de tampon par tube, et un maximum de 1 g d'échantillon, poids frais, pour 3 ml de tampon). Cette première étape est réalisée sous atmosphère d'azote à l'intérieur d'une "tente" de polyéthylène étanche munie de gants internes (Atmosbag, Aldrich Chemical Co) et remplie d'azote, afin d'éviter l'oxydation des protéines (formation de ponts disulfures conduisant à des polymérisations et modifiant la complexation avec les métaux). Le maintien des tubes sur glace pendant l'étape d'homogénéisation permet d'inhiber l'action des protéases. Après homogénéisation, un échantillon correspondant à un aliquot de 1,5 ml de chaque homogénat est récupéré et centrifugé à 4°C pendant 1 heure à 20 000 g (Sigma 3K12, rotor 12154).

Après centrifugation, 200 µl de surnageant (faction cytosolique) sont prélevés et incubés pendant 10 mn avec 200 µl d'une solution de Hg inorganique et d'acide trichloracétique (TCA) (HgCl_2 50 mg.l⁻¹– TCA à 10%). Le mercure, ainsi ajouté en excès, va se substituer aux autres éléments métalliques présents originellement sur les protéines, compte tenu de son affinité pour

¹ $\text{Hg(II)} \gg \text{Ag(I)}, \text{Cu(I)}, \text{Bi(III)} \gg \text{Cd(II)} > \text{Pb(II)} > \text{Zn(I)} > \text{Co(II)} > \text{Fe(II)}$ Vasák M. (1991).

² Notons que la forme organique du mercure (CH_3HgX) ne peut être utilisée, car son affinité chimique pour les MTs est très limitée en raison de la présence du groupement méthyl.

les sites thiols, et saturer l'ensemble des sites accessibles au sein du cytosol. Le mercure étant préparé dans une solution d'acide trichloracétique, les protéines de haut poids moléculaire précipitent lors de l'abaissement du pH de l'échantillon ($\leq 2,0$), alors que les MTs restent en solution. Le métal lié non spécifiquement aux autres protéines qui demeurent en solution ou non complexé est récupéré en ajoutant une protéine accessoire (hémoglobine de rat ou de porc, Hb) en excès (400 μ l de sang frais hémolysé – voir procédure de préparation dans l'Annexe 3). L'affinité de cette protéine pour le métal est inférieure à celle de la MT, mais supérieure à celle de tous les autres sites thiols présents dans le cytosol. Le complexe Hb-Hg est alors précipité par les conditions acides du milieu et rapidement séparé par centrifugation à 20 000 g pendant 20 min, empêchant ainsi la décomplexation éventuelle du Hg fixé sur les MTs. Les surnageants finaux récupérés pour l'étape de dosage du mercure total, ne contiennent alors plus que le chélate MT-Hg, qui sera dissocié par l'ajout de 3 ml d' HNO_3 pur (étape de digestion) avant le dosage par SAA en vapeur froide (voir le paragraphe 2-5.3. "Dosage du mercure total", page 70). Mentionnons que le sang de porc utilisé dans un premier temps (voir plus loin), nous a été fourni régulièrement et en quantités suffisantes par les abattoirs municipaux de Bazas. La validité de l'utilisation de cette hémoglobine a été vérifiée et ne démontre pas de différences majeures avec celle de rat (Baudrimont, 1997).

Parallèlement à la procédure de traitement des échantillons biologiques, 3 échantillons de référence (200 μ l de tampon, 200 μ l de solution de Hg et 400 μ l de solution d'hémoglobine) ont été systématiquement préparés pour contrôler l'efficacité de la complexation du mercure non-lié aux MTs par l'hémoglobine et de sa précipitation. Le surnageant après centrifugation ne doit renfermer qu'un très faible bruit de fond de mercure : les dosages réalisés par absorption atomique indiquent une teneur moyenne de $12,4 \pm 6,3$ ng Hg par le dosage au LECO AMA 254 (voir le paragraphe 2-5.3. "Dosage du mercure total", page 70), soit 0,12% de la quantité totale de métal ajoutée par échantillon. Ces résultats prouvent l'efficacité de la complexation du Hg par cette protéine sérique et également de celle de la méthode de dosage au Hg "froid". La moyenne des 3 valeurs de ces échantillons de référence est soustraite aux quantités de Hg mesurées dans les échantillons.

Afin de contrôler systématiquement l'efficacité des différentes étapes de la méthode de saturation, un "pourcentage de récupération", à partir d'une métallothionéine purifiée de mammifère, est calculé parallèlement au dosage des MTs. La solution "étalon" de MT est préparée à partir d'un lyophilisat de MT de foie de lapin (Sigma M-7641), dilué dans le tampon

d'homogénéisation à raison de $10 \mu\text{g MT}\cdot\text{ml}^{-1}$. Elle est ensuite stockée sous forme d'échantillons aliquote de 1,5 ml, sous atmosphère d'azote et à -80°C . Ce "standard interne" permet de déterminer le rapport entre les sites de liaison mesurés après saturation au Hg et les sites de fixation potentiels indiqués par le fournisseur et préalablement estimés par le dosage du Cd et du Zn sur la solution de MT purifiée. Notons que sur des lots employés récemment, des teneurs en Cu et en Pb non mentionnées par le fournisseur ont dû être quantifiées et prises en compte. Dans ces conditions, le pourcentage de récupération obtenu permettant de valider le dosage doit rester dans la gamme 80-120%, quelle que soit l'hémoglobine utilisée. Cette "fourchette" doit être prise en considération, dans la mesure où les capacités de séquestration de différents métaux sur une MT ne sont pas forcément identiques à celles du Hg (encombrements stériques différents). De plus, certains sites de la protéine de la solution "étalon" peuvent être libres (MT non complètement saturée). Mentionnons que dans les cas où le pourcentage de récupération dépasse les 120% ou se trouve en dessous des 80%, le dosage n'est pas pris en compte.

Il est à noter qu'une hétérogénéité des pourcentages de récupération dépassant les 120% nous est apparue au cours des dosages sur les premières campagnes d'étude, nous imposant de modifier l'origine de l'Hb par rapport à celle préconisée au départ. Ces pourcentages au-delà des valeurs de référence apparaissaient après seulement 4 jours d'utilisation de l'hémolysat de sang de porc ou même dès le 1^{er} jour, alors que celui-ci a normalement une validité de 15 jours. Ces occurrences étaient généralement associées à des concentrations en Hg de plus en plus fortes au niveau des "MTs étalons". Plusieurs questions se sont alors posées quant à la conservation de l'intégrité de la structure de l'hémoglobine de sang frais de porc. Après avoir multiplié les précautions de prélèvement du sang de porc à l'abattage des animaux (sans succès sur les observations), des analyses au CRTS (Centre Régional de Transfusion Sanguine) de Bordeaux nous ont alors certifié des concentrations en Hb intactes et identiques ($0,046 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$) entre une préparation de sang récente (2 jours) et une plus ancienne (15 jours) pour laquelle la validité des dosages était contestée. Afin de pallier à ces phénomènes nouveaux mettant en cause l'hétérogénéité des individus abattus ou bien la présence d'un développement inconnu dans notre solution d'Hb (bactéries ?), des tests de saturation ont été réalisés à partir d'une hémoglobine de porc purifiée et lyophilisée (Sigma, H-4131). L'utilisation de cette Hb (en solution dans du Tris HCl 30 mM, pH 8 à 20°C , $0,2 \text{ g Hb}\cdot\text{ml}^{-1}$) pour des dosages de MTs s'est révélée pertinente. Les tests ont en effet donné des pourcentages beaucoup plus récurrents autour de $100 \pm 10\%$ alors qu'en parallèle, $100 \pm 20\%$ étaient obtenus avec une préparation de sang frais de porc. De plus, l'obtention de blancs aux concentrations en Hg très faibles (de l'ordre de 1 à 5 ng de Hg contre

12,4 ± 6,3 ng avec le sang frais) permet de confirmer la performance de cette Hb dans la récupération du mercure, tout en standardisant la méthode de saturation qui voit s'annuler les facteurs externes d'hétérogénéité des sangs collectés. D'autre part, les solutions d'Hb préparées à partir d'Hb lyophilisée peuvent être renouvelées fréquemment (tous les 2-3 jours), permettant de s'affranchir d'une conservation hasardeuse sur 15 jours, ce qui était nécessaire auparavant étant donné la lourdeur d'échantillonnage du sang aux abattoirs.

Les résultats des dosages du mercure, en fin de quantification des MTs, permettent de calculer une "capacité de séquestration tissulaire"¹ ; la concentration en MTs des échantillons biologiques est en effet exprimée en nanomoles de sites de liaison du mercure par gramme de poids frais :

$$[(\text{ng Hg dans l'échantillon})/(\text{ml de surnageant}) \times [(\text{dilution des tissus})/(\text{masse molaire du Hg})].$$

La limite de détection, établie à partir de la solution "étalon" de MT de foie de lapin, est de 4 µg MT.g⁻¹, pf.

2-6.2. APPROCHE GENETIQUE DE L'INDUCTION DES METALLOTHIONEINES PAR RT-PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL

L'approche génétique conduite pour *D. polymorpha* et *C. gigas* a eu pour objectif de quantifier l'expression du ou des gène(s) de MTs obtenue en réponse aux contaminations métalliques (Cd et Zn), réalisées en laboratoire, isolément ou en mélange. La technique retenue pour cette étude a été la RT-PCR.

Elle se déroule en deux phases : la première correspond, après extraction et purification, à la copie des ARN totaux des branchies en ADN complémentaire (ADNc) ; la seconde correspond à une réaction de polymérisation en chaîne classique mais quantitative en temps réel sur les ADNc synthétisés.

¹ La quantité exacte de sites de fixation des métaux par molécule de MT n'étant pas connue chez les bivalves étudiés, la concentration ne peut être exprimée directement en nombre de moles de MTs par gramme de poids frais.

A- Purification des ARN totaux

La difficulté de l'obtention d'ARN totaux à partir de tissus de bivalves réside dans le fait qu'il faut éviter toute contamination par des RNAses. Ainsi, tout le matériel utilisé lors de la purification de ces ARN doit être au préalable décontaminé (RNase away, Molecular BioProducts, San Diego, Californie), puis autoclavé.

Les ARNs totaux des branchies de *C. gigas* et *D. polymorpha* ont été extraits à l'aide du kit "Absolutely RNA RT-PCR miniprep kit" (Stratagene) selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, 40 mg de tissus sont prélevés et déposés dans un microtube de 1,5 ml, avant d'être broyés à l'aide d'un potter en plastique dans 600 µl de tampon de lyse (contenant du thiocyanate de guanidine) additionné de 4,5 µl de β-mercaptoéthanol. Lors de cette étape, la présence de β-mercaptoéthanol et de thiocyanate de guanidine permet d'inhiber les éventuelles RNAses pouvant subsister dans l'échantillon. Afin d'éliminer les principaux débris membranaires, le lysat est déposé sur une colonne et centrifugé à 12 000 g pendant 5 min à 25°C. Le filtrat obtenu est additionné d'un volume d'éthanol 70%, homogénéisé au vortex, puis déposé sur une colonne d'affinité ne retenant que les acides nucléiques. Cette colonne est centrifugée à 12 000 g pendant 1 min à 25°C. Le filtrat est éliminé et la colonne lavée par centrifugation (12 000 g, 1 min, 25°C) avec 600 µl d'une solution de lavage faiblement concentrée en sels. Le filtrat est éliminé et une nouvelle centrifugation de 2 min est appliquée afin d'éliminer complètement la solution de lavage. Un traitement à la DNase I est alors effectué afin d'éliminer toute trace d'ADN : 55 µl d'une solution de DNase (Tampon d'activité + DNase I à 1 unité.µl⁻¹) sont déposés au sommet de la colonne, puis celle-ci est incubée à 37°C, pendant 15 min. Par la suite, deux lavages successifs sont réalisés avec 600 µl d'une solution fortement concentrée en sels, puis 300 µl d'une solution de lavage faiblement concentrée. Lors de chacun de ces lavages, une centrifugation à 12 000 g pendant 1 min à 25°C est appliquée. A la fin de l'extraction, la colonne est placée dans un nouveau microtube de 1,5 ml et 30 µl de tampon d'élution sont déposés à son sommet. L'ensemble est incubé 2 min à température ambiante, puis les ARNs purifiés sont récupérés par centrifugation (12 000 g, 1 min, 25°C). Les ARNs totaux ainsi obtenus peuvent être conservés à - 80°C ou utilisés lors de réactions de transcription inverse.

B- La réaction de transcription inverse (Reverse transcription)

Les ARNs totaux sont quantifiés par mesure de leur absorbance à 260 nm au spectrophotomètre (UV-1601, Shimadzu, Tokyo, Japon), sachant que 1 de $DO_{260} = 40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ d'ARN. Par la suite, 5 μg d'ARN totaux sont prélevés et rétro-transcrits en ADNc à l'aide du kit "Stratascript first strand synthesis system" (Stratagene). Les échantillons d'ARN sont ajustés à un volume final de 38 μl avec de l'eau traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC). Puis, 2 μl d'oligodT et 1 μl d'hexanucléotides sont ajoutés. Ces amorces permettront l'initiation de la réaction. Le mélange obtenu est placé à 65°C pendant 5 min dans un thermocycleur (Mastercycler, Eppendorf, Hambourg, Allemagne) puis laissé à refroidir jusqu'à une température de 35°C. Cette étape a pour objectif de fixer les amorces sur les ARN totaux. Ensuite, 1 μl de RNase inhibitor (40 unités), 1 μl de Stratascript reverse-transcriptase (50 unités), 2 μl de 100 mM dNTPs et 5 μl de tampon 10x sont additionnés. Le tout est alors placé pendant 1h au thermocycleur à 42°C. Lors de cette étape, la transcriptase inverse (ou rétrotranscriptase) synthétise un brin complémentaire d'ADN à partir de chaque matrice ARN présente dans le milieu. Les ADNc ainsi obtenus peuvent être conservés à -20°C ou utilisés comme matrice lors des réaction de PCR quantitative en temps réel.

C- La réaction quantitative de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel

a. Le principe de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Cette technique, décrite en 1985 par K. Mullis et ses collaborateurs, permet d'amplifier des séquences d'ADN de manière spécifique et d'augmenter de manière considérable la quantité d'ADN disponible initialement. Dans notre cas, il s'agit d'ADN complémentaire des ARN totaux extraits des branchies des bivalves après contamination. Cette technique nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent l'ADNc à amplifier, celle codant pour les MTs. Ces séquences servent à synthétiser des amorces oligonucléotidiques complémentaires (de longueur de 20 à 30 nucléotides en général) qui délimitent la portion d'ADNc *mt* à amplifier. L'ADN polymérase les utilisera comme amorces. La PCR se base sur les potentialités de la *taq* polymérase comme ADN polymérase extraite de la bactérie *Thermus aquaticus* des sources d'eau chaude. Cette ADN polymérase possède (i) la capacité à synthétiser de façon fidèle un brin complémentaire à partir d'une matrice ADN monocaténaire, (ii) une vitesse élevée de polymérisation de l'ADN (progressivité de 100 paires de bases toutes les 4s), (iii) la nécessité d'un groupement 3'OH libre pour initier la synthèse du brin complémentaire (fourni par les

CgMT1 *TCGGTTATGTTTT-CTATCTTATATTTGGATTTAATTTTCAGAAACATCAAGACTAAGAAA*
CgMT2 *CTGGTTATGTTTTTCTATCTTATATTTTGATTTGATTTTCAGAAACATCAAGACTAAGAAA*

MT1a

CgMT1 **ATG**TCTGATCCATGTAAC**TG**CACTGAGAGTGGAA**CA**TGTGTCTGCTCTGATTCGTGTCCA
CgMT2 **ATG**TCTGATCCATGTAAC**TG**CACTGAGACTGGA**AC**ATGTGTCTGCTCTGATTCGTGTCCA

CgMT1 GCAACAGGATGTA**AA**TGTGGACCCGGATGTA**AA**TGTGGTGACGGATGTA**AA**TGTT**CAG**GC
CgMT2 GCTACAGGATGTA**AA**TGTGGACCCGGATGTA**AA**TGTGGTGACGGGTGTA**AA**TGTT**CAG**GC
** *****

CgMT1 TGCAAAGTCAAGTGTAACTGCAGCGG**TACT**TGTGGTTGTGGCAAAGGGTGC**ACTGG**ACCG
CgMT2 TGCAAAGTCAAGTGTAACTGCAGCGG**TACT**TGTGGTTGTGGTAAAGGATGC**ACTGG**ACCG

CgMT1 GAA**AA**CTGCAAATGCGCAAACGATTC**CGG**ATGTGGA **MT2a**
CgMT2 GAA**AA**CTGCAAATGCGCAAACGATTC**CGG**ATGTG**GC**TGCAAAGTCAAGTGC**AA**CTGCAGC

CgMT1 -----
CgMT2 GGATCTTGTGGTTGTGGTAAAGGATGC**ACTGG**ACCGAA**AA**CTGCAAATGCGCAAACGAT

MT2b

CgMT1 -----TGTAAG**AAATGAGT**GCGT-----CAAAGGACCGATGGCGGACGC**ACTTT**
CgMT2 TCCGGATGTGGCTGTAAG**AAATGAGT**GCGTAA**CA**AGGACCTAAGCGGACGC**ACTTT**

CgMT1 *ATTGTTTTATTTTGTCTCTCTGGATGTA-TTCTAAAGTTATTGTTAGCATAAATAAAATA*
CgMT2 *ATTGTTTTATATTGTTTCTACTTGATGTAATTCTAAAGTTATTGTTAGCATAAATAAAATA*

Figure 43 : Alignement des séquences nucléotidiques des ADNc de CgMT1 et CgMT2 de C. gigas.

La position des amorces MT1a, MT2a et MT2b sont encadrées. La séquence des domaines β de CgMT2 est indiquée en gris. Le codon d'initiation et le codon de terminaison sont en gras. Les régions 5' et 3' non codantes sont en italique. Les étoiles représentent les nucléotides ayant la même position dans les deux séquences.

CgMT3a

ATG TCT GAT CCA TGT AAC TGT GCT GAA ACT GGA AGC TGT CAG TGC TCT GCT CAA 54

TGT ACT AGC CAA GGT GGC TGC AAA TGT GGA CCA AAC TGC AAG TGT GGT GAC GGA 108

TGC GCT TGT CCC GGT TGT AAA GTC GTC TGT AAC TGT AAT GGT TCA TGT GCC TGT 162

GGA CAA GAC TGC ACT GGA CAA AGC ACG TGC AAA TGT GGT AGT GAT TGC TCA TGC 216

CgMT3b

AAA AAG **TGA** TGG GGT GAT GTC ACG TGG TTT CAA CGA TTT GTG TGG ACT TGG ATC 270

CTA ATT TCA TGT AAC CAC TTG CCA AGA TTT CCC ATA CAC CGC TGC AAA TCC TCA 324

GAT CAG AGA TGG TGG TC CAT AAT TTC CAC CAA ATA ACA TTT CAA AAA GAC ACA 378

TGT CTT TAC TTA AAT CTC GAA ACC GCC GTG ACA TAT TAA AAT TGT TCG AAT AAC 432

ATT TAT ATT CGT TAT CAG CCT TCA GAA TAA ATA TCA ATT ATG AAT CAT AAA AAA 486

AA 488

Figure 44 : Alignement de la séquence d'ADNc CgMT3 de C. gigas et positionnement des amorces utilisées (CgMT3a et CgMT3b).

La position des amorces sont encadrées. Le codon d'initiation et le codon de terminaison sont en gras. La régions 3' non codante est en italique.

amorces) et (iv) une importante thermostabilité. Les réactions de polymérisation en chaîne se déroulent en trois étapes successives, répétées une cinquantaine de fois : une étape de dénaturation de l'ADN par la chaleur (95°C), une étape d'hybridation des amorces sur la matrice ADN simple brin à amplifier (température dépendante de la "température de fusion" ou T_m des amorces) et enfin, une étape d'élongation par l'ADN polymérase à partir des amorces (72°C). Chaque cycle permettant de doubler le nombre de copies de la séquence à amplifier, au bout de n cycles il y a présence dans le mélange réactionnel de 2^n exemplaires de cette séquence. Cette méthode permet donc d'amplifier l'ADN entre les deux amorces d'un facteur de 10^5 à 10^6 .

Le caractère quantitatif de la PCR utilisé a permis d'estimer le nombre de copies présent dans la séquence cible d'ADNc pour chaque condition de contamination au Cd et/ou au Zn.

b. Le choix des amorces et la préparation des échantillons

Les gènes *CgMT1* et *CgMT2* des deux premières isoformes de MTs de l'huître creuse *C. gigas* possèdent des séquences nucléotidiques très proches au niveau de leur séquence codante, mais aussi au niveau de leur région 3' et 5' non codantes, la seule différence notable étant la présence d'une séquence supplémentaire codant pour un second domaine β chez *CgMT2*. Afin de déterminer des amorces permettant de différencier ces deux gènes *mt* de *C. gigas*, leurs séquences nucléotidiques respectives ont été alignées (**Figure 43**). De cet alignement, trois amorces ont été déterminées dont les extrémités 3-prime pointent les unes vers l'autre. Deux communes (MT1a et MT2b) situées au début de la région codante et de la région 5' non codante de ces deux gènes, et une spécifique (MT2a) de *CgMT2* située à la jonction des deux domaines β de cette MT. La spécificité de ces amorces a été vérifiée par amplification PCR classique et analyse en gel d'agarose 1%. Le couple MT1a-MT2b donne deux amplifiats de 149 et 245 paires de base (pb), correspondant respectivement à *CgMT1* et *CgMT2*. Le couple MT2a-MT2b ne donne qu'une amplification de 139 pb spécifique de *CgMT2*. Lors de nos quantifications, la quantité de *CgMT2* est obtenue par retranchement de la valeur obtenue avec le couple MT1a-MT2b à celle obtenue avec le couple MT2a-MT2b.

Les amorces utilisées lors de la quantification de *CgMT3* (**Figure 44**) et de la MT de *D. polymorpha* (*DpMT* – **Figure 45**) ont été choisies en 3' au début des régions codantes de ces gènes et en 5', dans la région codante pour *DpMT* et dans la région non codante pour *CgMT3* à l'aide du logiciel "LightCycler probe design" (version 1.0, Roche). Les amorces utilisées pour l'ensemble de nos études sont reportées dans la **Figure 46**.

TCC GTA ACC TCG TGA AGA GGC CAG TAG GAC CTG TAA ATA AAC TCT GAA ACA CAC	54
ACA CGT GTG TAA TAC CAG AGC GAT TTT GCT AAT CGA ATA CTT TAC ATC TAC GTC	108
CAG ACT CCG ACA ACC TGA CTT TAC GCA TTC AAC ATG AGT GAT CCA TGC AAC TGC	162
GTT GAA ACC GGT GAT TGC CGT TGC GCC GAT GGG AGC TGC AGC GAC TGT TCC AAC	216
TGC AAG TGT GGC GAC AGC TGT AAG TGC AGC AAA CCC AAC TGT TGT GGC AAG AAT	270
GTG ACA TGC AAA TGT GGA GAA AAC TGT CAG TGC GGC GTG GGA TGC ACT GGG CCA	324
GAT TCG TGC ACA TGT GAC AGC GGC TGC TCT TGC AAG TGA TGG GAT GGT GTC ACA	378
CAG TTA CAG CGG CAA ATG TCA ACA CTG ATG ATG ATG TCA TTT GTT GAT ATT CC A	432
CGT TAT ACA ATC CGC CGC TGC ATT TCT TCA GAT TTT CGT TGG TGG TTC AGG AAT	486
ATT CAG AAA TAT ACC TAC TAA GGG CAC TGT CCT GAT TTG TTT AGT ATT GTT CTT	540
CAT TAT TGC CCA ATA TTT ATG AGT TAC TTG AGT TTA TAA TTA TTT CTC TGA ATA	594
AAT ACA TGT TAA ACT AAT GCA AAA TAG AAT ATA AAC AAG AAT TTT ATT TTC ATA	648
TAT TTG AAA ACA ATT ATT ATT GTA GTA GTT TAA TAA CAT CTG TTA TCT CTA AGC	702
ATT TAT TTT ATA ACA ATC AGT CAA AGC AAT ACG TGA AAT TTA TTT TGA AAC TCT	756
TGA TTA GAT TTA CCA TGC TAG GTC ATT TCT ATT TTG ACA ATG AAT TTC TGT GCT	810
GTG TAG CTG TGT GAC TTA AAA AAT ATC ACT TTG TCA CTT GAT TTT TTT ATA ATT	864
TTA TGT TGT TTT TTT TAG CAT TAT TAG GTT CTG ATG TAC AAA ATA AAA CAA AGA	918
AAC TAA AAA AAA AA	

Figure 45 : Alignement de la séquence nucléotidique *DpMT* de *D. polymorpha*.

La position des amorces DpMT1a et DpMT1b sont encadrées. Le codon d'initiation et le codon de terminaison sont en gras. Les régions 5' et 3' non codantes sont grisées.

MT1a	5'-TGTCTGCTCTGATTCGTGTCC -3'
MT2a	5'-TCCGGATGTGGCTGCAAAGTCAAG -3'
MT2b	5'-GGTCCTTTGTTACACGCACTCATT -3'
MT3a	5'-GCTCTGCTCAATGTACTAGCG -3'
MT3b	5'-GTCCACACAAATCGTTGAAACC -3'
DpMT1a	5'-GCCATGCAACTGCGTTGAAA -3'
DpMT1b	5'-GCACGAATCTGGCCCAGTGCA -3'

Figure 46 : Amorces utilisées en PCR quantitative en temps réel pour *C. gigas* et *D. polymorpha*.

L'appareil utilisé pour automatiser les différents cycles de la PCR est un thermocycleur fonctionnant à l'air pulsé pour chauffer ou refroidir les échantillons, le LightCycler (Roche). Il permet un suivi en temps réel de la réaction de polymérisation en chaîne grâce à l'ajout d'un agent intercalant appelé SYBRGreen dans le milieu réactionnel (20 µl) contenu dans des capillaires de verre facilitant les échanges thermiques (**Tableau 11**). Le SYBRGreen s'intercale de façon aléatoire dans les fragments d'ADN double brin et devient alors fluorescent. Cette fluorescence est détectée à 530 nm par un spectrophotomètre intégré à l'appareil. Le protocole de la réaction retenu pour les analyses a été le suivant :

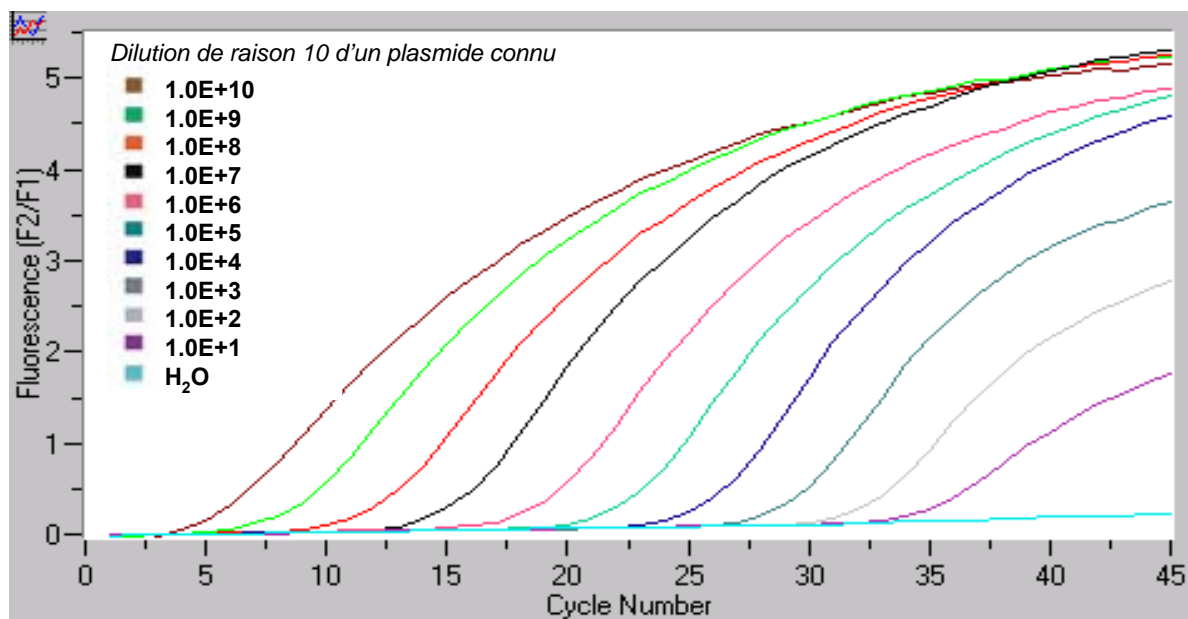
- une étape d'activation de l'enzyme (95°C 10 min)
- 50 cycles de PCR : 95°C 5s ; 60°C 5s et 72°C 20s. La mesure de fluorescence est réalisée à la fin de chaque élongation.
- une analyse par courbe de fusion : augmentation progressive de la température de 60°C à 95°C, la fluorescence étant mesurée après chaque transition de température.

L'analyse dure au total 30 min. La quantité de fluorescence mesurée est directement en relation avec la quantité de produits d'amplification obtenus. La quantification d'échantillon inconnu se fait par comparaison de leur quantité de fluorescence avec celle d'une gamme obtenue par amplification de quantités connues d'un plasmide contenant le gène *CgMT2* (**Figure 47**). En fin de réaction, la spécificité de la PCR est analysée après réalisation d'une courbe de fusion. En effet, chaque produit d'amplification est caractérisé par une température de fusion qui lui est propre et dépendant notamment de sa contenance en base GC. Le LightCycler détermine cette T_m par analyse de la décroissance de la fluorescence au cours d'un cycle allant progressivement de 60 à 95°C.

Préparation	µl
ADNc (100 ng.µl ⁻¹)	2
Mix (Tp + SybrGreen + Taq)	1
MgCl ₂ (25 mM)	3,2
Mix d'amorces (3 µM chacune)	2
H2O	11,8

Tableau 11 : Préparation des échantillons pour la PCR quantitative en temps réel de *C. gigas* et *D. polymorpha*

A. Amplification de la gamme de dilution



B. Détermination de la droite de régression

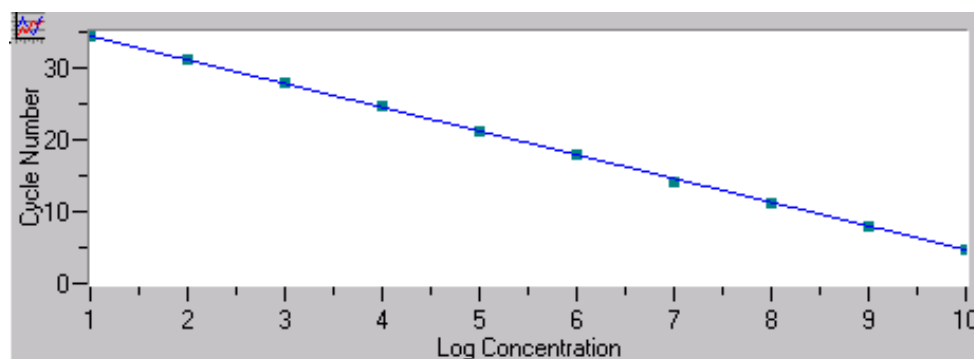


Figure 47 : Principe de la quantification lors de la PCR quantitative en temps réel.

Une gamme de dilution de raison 10 d'un plasmide dont les quantités sont connues est réalisée puis amplifiée (A). Une droite de régression montrant le cycle de sortie en fonction du log de la concentration est déterminée à partir de cette gamme (B). Cette droite de régression est ensuite utilisée par le logiciel pour déterminer la quantité d'amplifiat obtenue lors de l'amplification d'un échantillon inconnu.

CHAPITRE 3

**REPONSE DES METALLOTHIONEINES CHEZ DEUX
BIVALVES D'EAU DOUCE,
CORBICULA FLUMINEA ET *DREISSENA POLYMORPHA* APRES
EXPOSITION AU CADMIUM ET AU ZINC.
ETUDES *IN SITU* ET EN LABORATOIRE**

L'objectif de cette première phase de nos recherches est de caractériser les capacités de réponse des métallothionéines (MTs) à l'égard de la bioaccumulation du Cd et du Zn chez deux bivalves d'eau douce, *C. fluminea* et *D. polymorpha*, dans le contexte de la pollution métallique au niveau de la zone amont du *continuum* "Lot / Garonne / Gironde". L'étude comparative de ces deux espèces repose sur la nécessité d'appréhender les différences interspécifiques chez les bivalves en milieu dulçaquicole.

Deux approches complémentaires de terrain et de laboratoire ont été développées.

(i) Dans un premier temps, une étude de transplantation *in situ* a été mise en place afin d'évaluer comparativement chez *C. fluminea* et *D. polymorpha*, le potentiel de réponse des MTs dans le gradient polymétallique à la confluence Riou-Mort / Lot. *C. fluminea* et *D. polymorpha* ont été introduits au niveau de quatre stations, pendant une période de 10 semaines. La bioaccumulation du Cd et du Zn et les concentrations en MTs ont été analysées à l'échelle du corps mou entier. En parallèle, la bioaccumulation des métaux a été analysée dans les tissus des deux espèces de bivalves.

(ii) Dans un second temps, afin de préciser les effets spécifiques et combinés des expositions au Cd et au Zn sur la réponse des métallothionéines chez *C. fluminea* et *D. polymorpha*, une étude expérimentale a été réalisée, pour des concentrations de métal dissous dans l'eau comparables à celles de la station sur le Riou-Mort. La bioaccumulation métallique et la réponse protéique des MTs ont été conjointement analysées au niveau des corps mous entiers. Dans l'optique d'approfondir l'analyse de la réponse protéique chez la moule zébrée, l'expression du gène *mt* pour cette espèce a parallèlement été quantifiée dans les branchies, première interface en contact avec l'environnement aquatique, pour chaque exposition au Cd et Zn, introduits isolément ou en mélange dans la colonne d'eau des unités expérimentales.

3-1. ANALYSE COMPARATIVE DU POTENTIEL DE REPONSE DES METALLOTHIONEINES CHEZ *Corbicula fluminea* ET *Dreissena polymorpha* APRES TRANSPLANTATION LE LONG D'UN GRADIENT POLYMETALLIQUE (SITE ATELIER LOT)

L'utilisation des bivalves en tant qu'espèces sentinelles pour appréhender la biodisponibilité des métaux dans les écosystèmes aquatiques repose en partie sur leur importante tolérance à ces contaminants (voir le paragraphe 2-1. "*Intérêt des bivalves dans l'étude de la contamination des systèmes aquatiques par les métaux lourds*", page 47). Cependant, la multitude des facteurs externes (environnementaux) et endogènes (écologiques, physiologiques, biochimiques et génétiques) modulant les processus de bioaccumulation des métaux lourds est à l'origine de grandes variations de la réponse biologique entre les espèces. Ainsi, l'accumulation dépend à la fois de la biodisponibilité des métaux dans l'eau en interaction avec les paramètres physico-chimiques, de l'habitat occupé, des stratégies comportementales et alimentaires, et des caractéristiques biologiques et métaboliques impliquant la prise en charge des métaux, leur détoxification intracellulaire et leur élimination (voir le paragraphe 1-2.2. "*Mécanismes de transport et de séquestration intracellulaires et/ou tissulaires des métaux chez les animaux aquatiques – Processus d'élimination*", page 23). A l'échelle cellulaire, la réponse du mécanisme de défense par la modulation de la quantité de MTs, activée consécutivement à la présence cytosolique des métaux, est également fortement dépendante de ces facteurs ce qui engendre diverses capacités réactives (sensibilités) et diverses tolérances interspécifiques. De ce constat émane la nécessité de comparer la capacité de réponse des MTs de plusieurs espèces face à une pollution donnée. Pour les environnements aquatiques continentaux, tels que la zone amont de la pollution définie dans le cadre de notre recherche, *C. fluminea* et *D. polymorpha* constituent deux bons candidats pour une étude comparative de la réponse des MTs chez les bivalves. Typiquement représentatifs de ces environnements, ils occupent deux niches écologiques distinctes (voir le paragraphe 2-2.4.

"*Ecologie de C. fluminea et D. polymorpha*", page 56) : à l'interface eau/sédiment pour le bivalve épi-benthique *C. fluminea* et dans la colonne d'eau elle-même pour la moule zébrée *D. polymorpha*. Nous avons donc choisi d'évaluer comparativement la bioaccumulation du Cd et du Zn et le potentiel de réponse des MTs chez ces deux espèces transplantées dans le gradient de pollution métallique à la confluence du Riou-Mort (source des apports dans le *continuum* fluvio-estuarien) avec le Lot. L'étude a été menée sur 4 stations de transplantation caractérisant le gradient environnemental de pollution en Cd et en Zn, en relation avec la dilution engendrée par le mélange des eaux fortement polluées du Riou-Mort avec celles du Lot. Le suivi de l'évolution des concentrations de Cd, de Zn et de MTs a été réalisé sur une période de 10 semaines à l'échelle de l'organisme entier. Ces travaux et les résultats obtenus sont présentés dans l'article accepté pour publication dans "*Chemosphere*" et intitulé "*Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (Corbicula fluminea and Dreissena polymorpha) transplanted along a polymetallic gradient*". Les résultats de bioaccumulation du Cd et du Zn dans les branchies, la masse viscérale et le reste du corps pour les deux espèces de bivalves retenues sont présentés et analysés en seconde partie de ce chapitre (section 3-1.2. "*Analyse de la bioaccumulation du cadmium et du zinc à l'échelle des tissus. Comparaison entre C. fluminea et D. polymorpha*", page 100).

3-1.1. ETUDE A L'ECHELLE DE L'ORGANISME ENTIER

*Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response
in two freshwater bivalves (Corbicula fluminea and Dreissena
polymorpha) transplanted along a polymetallic gradient¹*

Marie Véronique, Baudrimont Magalie, Boudou Alain

Laboratoire d'Ecophysiologie et d'Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques (LEESA), UMR CNRS 5805,
Université Bordeaux 1, Place du Dr. Peyneau, 33120 Arcachon, France

KEYWORDS

Metallothionein - Cadmium - Zinc - Freshwater bivalves - Field transplantation

¹ Article accepté pour publication dans *Chemosphere*

ABSTRACT

This study was designed to compare the metallothionein (MT) response capacity of two freshwater bivalves, *Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*, along an environmental gradient of polymetallic pollution. The bivalves were transplanted into 4 stations in southwestern France, with a cadmium and zinc pollution gradient. MT and metal concentrations were measured in the soft bodies of the clams and mussels over 2.5 months. In the zebra mussels, variations in MT concentrations were strictly correlated to progressive Cd and Zn bioaccumulation. In contrast, the faster response in the clams appeared positively correlated to Cd accumulation only, with the activation of efficient detoxification mechanisms which limited Cd bioaccumulation and reduced Zn concentrations over time. Nevertheless, despite stronger metal accumulation factors in *D. polymorpha*, *C. fluminea* revealed higher sensitivity of MT response along the pollution gradient.

INTRODUCTION

In aquatic environments, bivalves are widely used to assess contamination levels, particularly of heavy metals. As a result of their large water filtration capacities and their sedentary life, they are known to provide a space- and time-integrated measure of bioavailable metal fractions which is of direct ecotoxicological relevance (Rainbow and Phillips, 1993). Due to the biological reactivity of metallothioneins (MT) in response to metal bioaccumulation, it has been suggested that these soluble proteins are suitable molecular indicators of metal pollution *via* their interactions with metals in a dose-dependent manner, notably in bivalves (Kägi, 1991; Langston *et al.*, 1998; Vasseur and Cossu-Leguille, 2003). A large proportion of cysteine residues characterizes these cytosolic, low-molecular weight proteins that have been widely conserved during evolution. They are involved in the metabolic cellular regulation of essential elements (such as copper and zinc) and in cell protection by binding and detoxifying metal ions (i.e. excess cadmium, mercury, silver, copper, zinc, etc.). Nevertheless, MTs have other important functions as free radical scavengers or as an intermediary in the immune response (Kägi, 1991 ; Nordberg, 1998 ; Viarengo *et al.*, 2000). Many metals are able to induce MT synthesis by a transcriptional activation system (e.g. Cd, Zn, Cu, Hg, - Viarengo *et al.*, 2000 ; Haq *et al.*, 2003), however, among factors affecting trace metal bioaccumulation and MT response, numerous biological, ecological and genetic factors lead to considerable interspecific variability in filter-feeding bivalves. For example, in *Pyganodon grandis* and *Mytilus edulis*, MT protein levels are clearly related to accumulated Cd and Cu concentrations in the soft bodies but not to Zn (Couillard *et al.*, 1993 ; George and Langston, 1994). In contrast, MT contents in *Mytilus galloprovincialis* are strongly correlated to environmental Zn pollution, but Cu exposure does not change MT concentrations in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Irato *et al.*, 2003 ; Lecoœur *et al.*, 2004). In the monitoring of freshwater ecosystem quality, *Corbicula fluminea* or *Dreissena polymorpha* are two bivalve species currently used for assessing metal pollution *via* the analysis of variations in MT concentrations (Baudrimont *et al.*, 1999 ; De Lafontaine *et al.*, 2000 ; Kwan *et al.*, 2003). They occupy the same habitat but different spatial locations: the water/sediment interface for *C. fluminea*, buried in the upper sediment layer, and the water column itself for *D. polymorpha* attached to hard substrates. However, they have the same nutritive route by filtration of suspended matters from the water column. The widespread distribution of the Asiatic clam and the zebra mussel in European waters as well as in North America is a great advantage for geographical comparisons. Nevertheless, to our knowledge, the sensitivity of MT response to polymetallic pollution in *D. polymorpha* and *C. fluminea* has never to date been compared in a field situation.

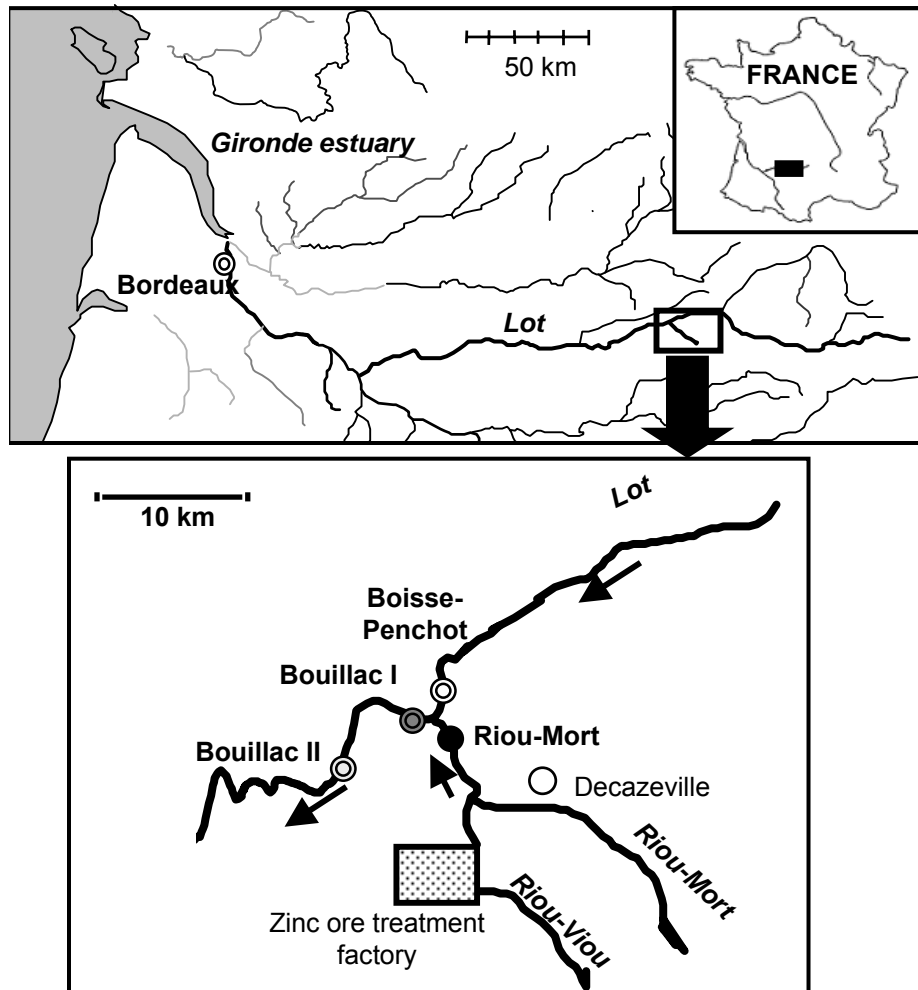


Figure 48: Location of the transplantation station displaying polymetallic gradient surrounding the confluence between the Riou-Mort and Lot rivers, near Decazeville (Midi-Pyrénées region southwestern France).

Metal discharge originates from a zinc ore treatment factory.

The aim of this study was to carry out a comparative investigation into the potential metallothionein (MT) response in two freshwater bivalves, *C. fluminea* and *D. polymorpha* transplanted along a polymetallic gradient. Metal discharge, essentially zinc (Zn) and cadmium (Cd), results from mining effluents from a zinc ore treatment factory into a small river, the Riou-Mort, a tributary of the Lot River in southwestern France (Jouanneau *et al.*, 1993 ; Audry *et al.*, 2004b). Uncontaminated populations were caged for 2.5 months in four stations displaying the pollution gradient. Cd and Zn bioaccumulation kinetics and MT levels were simultaneously measured at the whole soft body level in the two species.

MATERIALS and METHODS

Caging procedure

Two thousand adult *C. fluminea* were collected from a reference location on the banks of the Cazaux-Sanguinet freshwater Lake (Aquitaine, France). For *D. polymorpha*, around one thousand adult specimens were collected from the Garonne River, near Golfech (Aquitaine, France). An initial selection was made in the field; the bivalves were then transported to our laboratory in cool boxes filled with lake or river water and constantly aerated. After 3 days of stabilization, homogeneous batches were made up, selection being based on the maximum antero-posterior length of the shell, between 1.5 and 2.0 cm. The bivalves were then taken to the transplantation sites.

The cages for the *C. fluminea* specimens consisted of plastic containers (polyethylene), highly perforated on the sides in order to ensure constant exchanges between the inside and the surrounding medium (55x39x29 cm; La Bovida, Bordeaux, France). The upper part was covered over by a rigid, plastic net (mesh: 3 mm). Two cement blocks (2x 5 kg) were used for ballast to weigh the cages down in the river bed, where they could be partly buried. The *D. polymorpha* cages consisted of two tubes of plastic net (mesh: 10 mm) fixed on each side of the *C. fluminea* cages, in order to ensure the correct positioning of the zebra mussels in the water column. Three hundred *C. fluminea* and one hundred and fifty *D. polymorpha* were placed into each cage; two cages were immersed at each station.

Study sites and sampling procedure for analyses

Four stations displaying a polymetallic pollution gradient were selected (**Figure 48**). The Boisse-Penchat station (BP) is located on the Lot river above the confluence with the Riou-Mort, and was selected as the reference site because of the relatively low metal concentrations in the water column and sediment compartments (Audry *et al.*, 2004a). The

means of the basic physico-chemical parameters measured during transplantation at BP were 9.6°C, pH 7.9 and 10.1 mg.l⁻¹ of dissolved O₂. The Riou-Mort station (RM - 15.4°C, pH 7.9, 9.6 mg O₂.l⁻¹) is located on the lower section of the Riou-Mort, just before its confluence with the Lot River. The majority of metal inputs into this tributary are discharged from the mining site. The Bouillac I station (BI - 10.7°C, pH 7.9, 10.7 mg O₂.l⁻¹) is located on the river Lot, about 300 m downstream from the confluence with the Riou-Mort. The Bouillac II station (BII - 11.6°C, pH 7.9, 9.7 mg O₂.l⁻¹) is located around 5 km downstream from the Bouillac I site. Here, the waters from the Riou-Mort and the Lot are considered to be totally mixed.

The sampling strategy was adapted to the pollution gradient, with different kinetics developed for each station, from March to June 1998. At the Boisse-Penhot and Riou-Mort stations, 8 sampling times were defined: 2 hours, 8 h, 1 day, 3 d, 10 d, 24 d, 48 d and 72 d. For Bouillac I and Bouillac II stations, sampling began after 1 d and 24 d respectively. At each sampling time, 20 *C. fluminea* individuals and 10 *D. polymorpha* were collected from each cage for metal bioaccumulation and metallothionein determination. The bivalves were transported to the laboratory in carbonic ice and frozen (-80°C) under nitrogen atmosphere in polyethylene bags (Whirl-Pak) while awaiting analysis. This procedure is necessary to ensure constant anoxic conditions in order to avoid MT oxidation and molecular polymerisation (Lobel et Payne, 1987).

Analyses were conducted at the whole organism level; after thawing, the soft bodies were dried on absorbent paper and weighed (fresh weight, fw). Four organisms (two pooled groups of 2) were analyzed for each sampling time to determine MT or metal concentrations (independent samples) for each species.

A 50 ml water sample was collected in the field at each sampling time, 20 cm below the surface, using polyethylene bottles. Metal analyses were conducted on filtered (dissolved metal concentration - polycarbonate Nuclepore filters - 0.45 µm) and unfiltered (total metal concentration) samples, after acidification (HNO₃ 1%) and storage in a freezer (+4°C). Cadmium and zinc determination in water samples were conducted as for biological samples described below.

Metal determination

Biological samples were first digested with nitric acid (3 ml of pure HNO₃, Merck, Darmstadt, Germany) in a pressurized medium (borosilicate glass tubes) at 95°C for 3 h, then digestates were diluted up to 20 ml with ultra pure water (MilliQ plus). Cd concentrations in tissue and water samples were measured by atomic absorption spectrophotometry (Varian AA 400) equipped with a model GTA 96 graphite tube atomizer and autosampler. Sub-samples of

10 μL were taken for the determination and mixed before atomization with 4 μL of a "50% Pd + 50% $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ " solution. The detection limit was 0.1 $\mu\text{g Cd.l}^{-1}$ (DL: mean + 3 SD of 10 reagent blanks). Zn determinations were carried out by flame atomic absorption spectrophotometry (Varian AA 20) on the same digestates or water samples. The detection limit was 10 $\mu\text{g Zn.l}^{-1}$. Total Hg determination at the end of the mercury-saturation assay was carried out by flameless atomic absorption spectrometry (CETAC M-6000 Mercury Analyzer, Varian) after dilution of the digestates up to 20 ml with ultra-pure water. A bromine salt treatment was applied before the addition of stannous chloride (Farey *et al.*, 1978). The detection limit was 0.01 $\mu\text{g Hg.l}^{-1}$.

The accuracy of the analytical methods was checked periodically by means of two certified reference materials (TORT-2, lobster hepatopancreas and DOLT-2, dogfish liver from NRCC-CNRC) and of one standard solution (Astasol-Mix M005 from Analytica-Ltd). Values for Cd and Zn were consistently within the certified ranges for each element and each standard reference (data not shown). Note that field blanks were obtained with deionized water samples for which metal determinations were systematically below the detection limits.

Metallothionein determination by mercury-saturation assay

MT concentrations were determined using the mercury-saturation assay, as described in Baudrimont *et al.* (1999). This technique was modified slightly as the fresh pig blood hemolysate was replaced by a purified and lyophilized pig hemoglobin (Sigma, H-4131) prepared in a Tris-HCl 30mM (pH 8.2 at 20°C) buffer. This modification enabled us to obtain better recovery percentages calculated by the ratio between the binding sites measured after Hg-saturation on an "internal standard" of purified rabbit liver MT (Sigma M-7641, 10 $\mu\text{g MT.ml}^{-1}$ in Tris-HCl 25 mM, pH 7.2 at 20°C) and the potential binding sites indicated by the supplier and previously verified by Cd, Zn, Cu and Pb determinations. The values were systematically within the range of $100 \pm 10\%$. Hg determination was obtained by cold vapor and atomic absorption spectrometry (CETAC M 6000, Varian, Victoria, Australia) with detection limit at 0.01 $\mu\text{g Hg.l}^{-1}$. MT concentrations in tissue samples were expressed as nanomoles of Hg-binding sites per gram (fw): $[(\text{ng Hg in sample})/(\text{ml of supernatant})] \times [(\text{tissue dilution})/(\text{Hg molar mass})]$. Owing to the fact that the exact quantity of Hg binding sites per MT molecule is unknown for these species, MT concentrations cannot be expressed directly in moles of MT per gram.

	Boisse-Penchat (BP)	Riou-Mort (RM)	Bouillac I (BI)	Bouillac II (BII)
Total [Cd]	<DL	13 (7.5-32.9)	1.7 (0.96-2.17)	0.5 (0.17-1.12)
Dissolved [Cd]	<DL 0.037*	10 (5.5-28.4)	1.4 (0.53-1.90)	0.22 (0.18-0.31)
Total [Zn]	<DL	896 (382-1905)	118 (69-160)	< DL
Dissolved [Zn]	<DL 4.56*	751 (378-1695)	100 (47-136)	< DL

Table 12: Total and dissolved concentrations of cadmium and zinc in the water column at Boisse-Penchat, Riou-Mort, Bouillac I and Bouillac II stations.

Data are mean values in $\mu\text{g.l}^{-1}$ for overall transplantation duration. Minimum and maximum values are given between brackets.

< DL indicates values below detection limit.

Concentrations with an asterisk correspond to values determined in 1999 by Audry *et al.*, 2004a.

Statistical analysis

The significant contribution of ‘time’ and ‘station’ factors for each criterion, the fresh weight of the soft bodies and the Cd, Zn and MT concentrations for each bivalve species, were checked using a non parametric Kruskal Wallis test. The single effect of ‘time’ factor was investigated afterwards for each station and mean comparisons between the stations were conducted with the Mann and Whitney U test. Finally, in order to reveal the effect of ‘species’ factor on each criterion, a global Kruskal Wallis test was performed using all the data.

The relations between metal bioaccumulation and MT concentrations for each species were also investigated using Spearman correlations. All the statistical results were obtained using Statistica 5.1 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA), with a probability of $p < 0.05$ considered significant.

RESULTS

Metal concentrations in the water column

The mean and extreme values of total and dissolved Cd and Zn concentrations measured for the four stations during the transplantation phase are presented in **Table 12**. The Boisse-Penchat station (BP), considered as reference site, was characterised by values under the detection limit of our methods. Nevertheless, Audry *et al.* (2004a) indicated values close to geochemical background levels in this site: $0.037 \mu\text{g Cd.l}^{-1}$ and $4.56 \mu\text{g Zn.l}^{-1}$. In the Riou-Mort (RM), Cd and Zn concentrations were measured close to 13 and $896 \mu\text{g.l}^{-1}$ respectively. Analysis of the filtered water samples determined that the majority of both metals was distributed in the dissolved phase: 77% of Cd and 84% of Zn. At the Bouillac I station (BI), average metal concentrations measured in the Lot River were markedly lower (factor 8 compared to RM): $1.7 \mu\text{g Cd.l}^{-1}$ and $118 \mu\text{g Zn.l}^{-1}$. Both metals were still clearly predominantly distributed in the dissolved fraction of the water column: 83% for Cd and 85% for Zn. For the Bouillac II station (BII), total metal concentrations were markedly lower compared to BI, with $0.5 \mu\text{g.l}^{-1}$ (factor 3.5) for Cd, and below the detection limit for Zn.

Metal bioaccumulation in the soft bodies

Cd bioaccumulation

For *C. fluminea* (**Figure 49A**), Cd accumulation was significantly dependent on the stations and the duration of transplantation, except for the Boisse-Penchat (BP) reference site, where values remained very low and stable throughout the 72 days ($0.2 \mu\text{g.g}^{-1}$, fw). The highest accumulations were measured in the organisms transplanted into the Riou-Mort (RM), with a

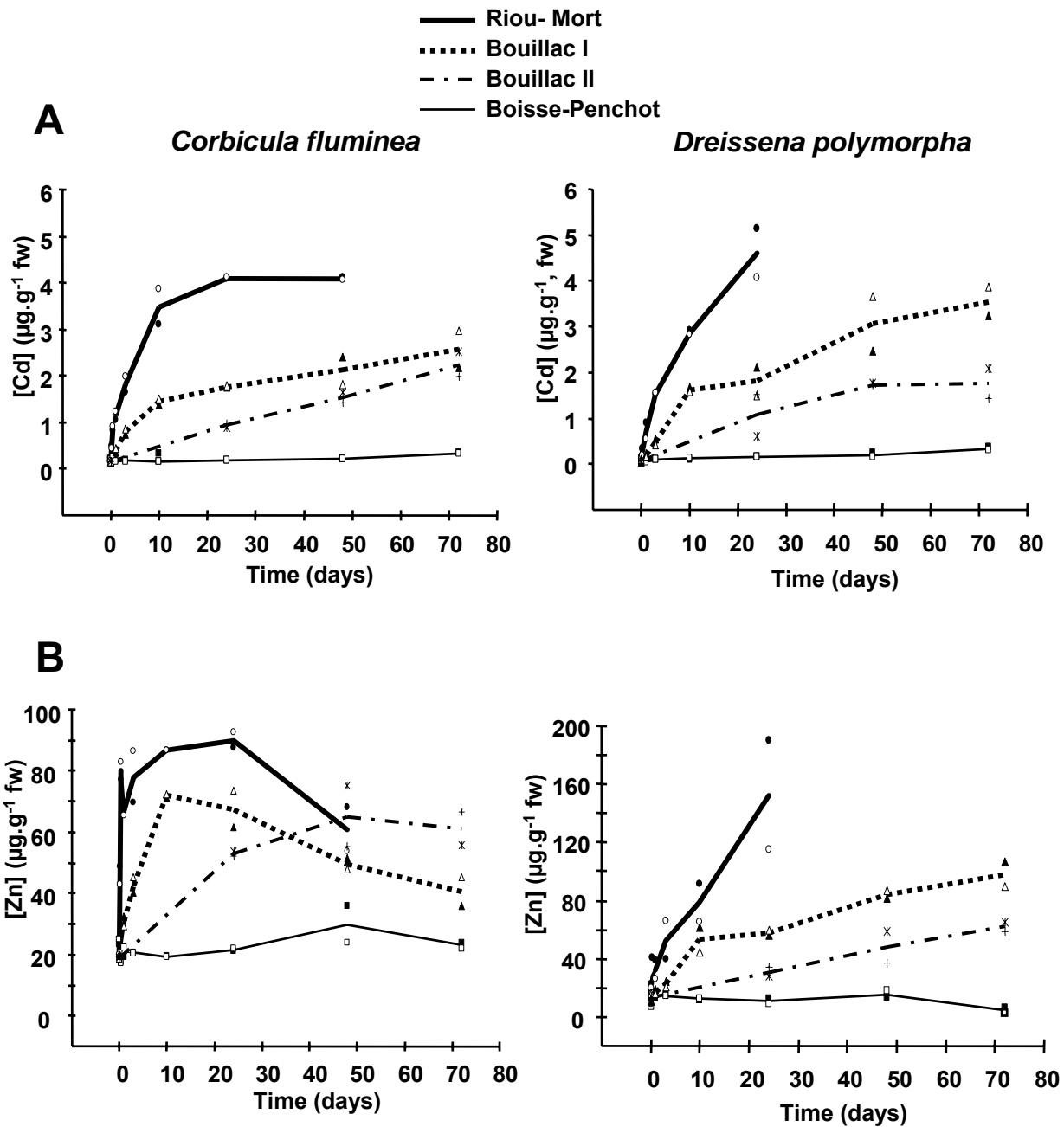


Figure 49: Total cadmium (A) and zinc (B) concentrations ($\mu\text{g.g}^{-1}$, fresh weight) measured in the whole soft bodies of *C. fluminea* and *D. polymorpha* transplanted to four transplantation stations, Boisse-Penchat (reference), Riou-Mort, Bouillac I and Bouillac II displaying the environmental polymetallic gradient.

Line refers to mean values of the two replicates (symbols).

very rapid and quasi-linear increase until 10 days, thereafter reaching maximum values of around $4 \mu\text{g.g}^{-1}$ (x20 compared to BP). No data were available after 48 days due to the total mortality of the bivalves at this site. For the other two polluted stations (Bouillac I and II), Cd bioaccumulation was more gradual according to time, with higher metal concentrations for BI except at day 72, when similar maximum concentrations were measured (around $2 \mu\text{g.g}^{-1}$, $p > 0.05$). Note that a slight growth inhibition was observed for organisms transplanted at BI compared to BII and BP, however weight values were not significantly different (data not shown).

As in the clams, Cd bioaccumulation in the mussels was dependent on the station and time, according to the pollution gradient (**Figure 49A**). Concentrations in the organisms transplanted at the reference site (BP) increased during the transplantation period, with nevertheless very low mean values ($0.15 \mu\text{g Cd.g}^{-1}$, fw after 72 d). At the RM station, Cd accumulation was more gradual than in *C. fluminea* ($2.9 \mu\text{g Cd.g}^{-1}$ measured after 10 days compared to $3.5 \mu\text{g.g}^{-1}$ for the clams) and without any plateau trend. However, as in clams, total Cd values measured after 24 days in mussels were around $4.2 \mu\text{g.g}^{-1}$ (x30 compared to BP). Total mortality for the mussels from RM occurred sooner than for *C. fluminea*, between 24 and 48 days. *D. polymorpha* transplanted to BI accumulated Cd progressively with maximum values obtained after 72 d ($3.5 \mu\text{g.g}^{-1}$, factor 10 compared to BP). The Cd accumulation at the BII station reached around $1.8 \mu\text{g.g}^{-1}$ at the end of the transplantation phase, *i.e.* a 2-fold decrease compared with BI. Note that no mortality was observed for this species during the 72 days of transplantation at BP, BI and BII, and no significant influence of 'time' and 'station' factors appeared on the soft body weight of this bivalve species (data not shown).

Zn bioaccumulation

Zn accumulation in the whole soft body of *C. fluminea* was influenced by duration and station (**Figure 49B**). Background levels varied between 20 and $29 \mu\text{g Zn.g}^{-1}$ (fw). At the most polluted station (RM), significant increases in Zn concentrations rapidly started. Maximum levels at this station were reached after 10 and 24 days, around $90 \mu\text{g Zn.g}^{-1}$ in the soft body of clams (factor 4.5 compared to BP at the same time). Thereafter, Zn kinetic in clams was marked by a decrease of around 30% for Zn at 48 days, before the death of individuals. The same accumulation pattern was observed for clams at BI with nevertheless significantly lower levels (factor 1.5 compared with concentrations at RM) and no mortality. Maximum levels reached $70 \mu\text{g Zn.g}^{-1}$ after 10 and 24 days of transplantation (factor 3.5 compared with BP). At the end of the transplantation, Zn bioaccumulation was only 1.8 times higher than in clams at

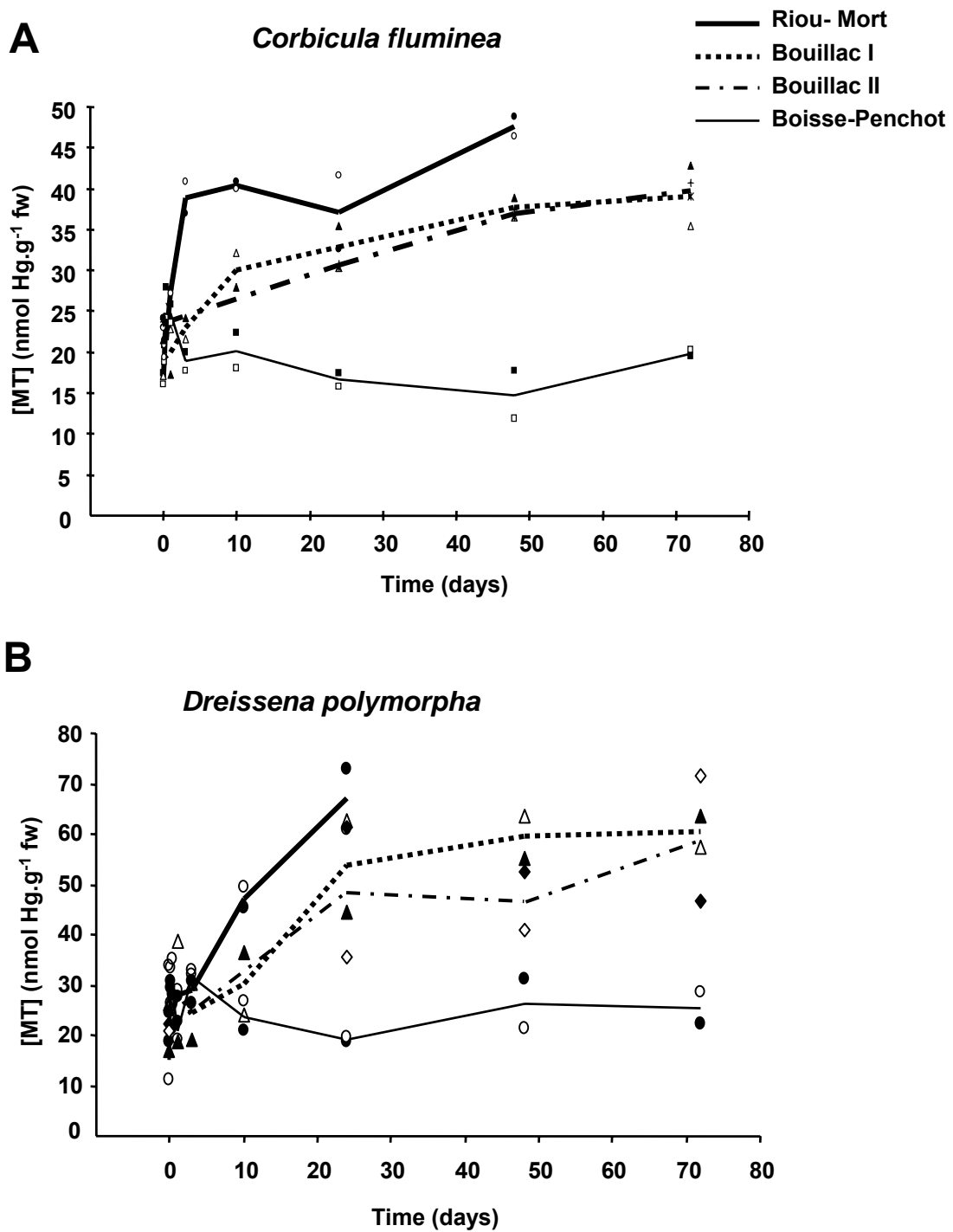


Figure 50: Metallothionein concentrations (nmol sites Hg.g^{-1} , fresh weight) measured in the whole soft bodies of *C. fluminea* (A) and *D. polymorpha* (B) transplanted to four transplantation stations, Boisse-Penchot (reference), Riou-Mort, Bouillac I and Bouillac II displaying the environmental polymetallic gradient.

Line refers to mean values of the two replicates (symbols).

BP ($37 \mu\text{g Zn.g}^{-1}$). At BII, Zn accumulation was more gradual than at RM and BI. After 48 days, concentrations reached a plateau at the same maximum values as those observed at BI (around $65 \mu\text{g Zn.g}^{-1}$). After 72 days, Zn concentrations remained higher than those at BI (59 compared with $37 \mu\text{g Zn.g}^{-1}$).

For *D. polymorpha* (**Figure 49B**), background levels measured at BP were significantly lower than those for clams with an average value of $12 \mu\text{g Zn.g}^{-1}$ (fw) over the whole transplantation period. In contrast to the clams, the Zn bioaccumulation trend in *D. polymorpha* at the other stations was similar to that observed for Cd, without any decrease in Zn concentrations over time. Gradual accumulation occurred in the whole soft tissues with a significant 'station' influence. The highest concentrations were reached at RM ($152 \mu\text{g Zn.g}^{-1}$, 24 days) > BI ($98 \mu\text{g Zn.g}^{-1}$, 72 days) > BII ($62 \mu\text{g Zn.g}^{-1}$, 72 days) *i.e.* respectively, factor $13 > 8 > 5$ with average concentrations measured at BP. These levels were higher than maximum levels measured in clams at RM and BI (factor 1.7 and factor 1.4 respectively).

Metallothionein response

MT concentrations measured at BP gave a range of values between 15 and 26 nmol Hg.g^{-1} (fw), with a pronounced fluctuation at the early sampling times after which values decreased (**Figure 50A**). At RM, MT concentrations in clams increased significantly during the initial phase after transplantation. After 3 days, values were 2 times higher than in *C. fluminea* from BP ($38 \text{ nmol Hg.g}^{-1}$). Concentrations remained stable thereafter and reached a maximum at $47 \text{ nmol Hg.g}^{-1}$ after 48 days, *i.e.* around 3.5 times the concentrations at BP. MT concentrations measured in clams at BI and BII increased more gradually and were similar over time. MT levels reached maxima after 48 days with values around 2 times higher than for BP (around $40 \text{ nmol Hg.g}^{-1}$).

MT concentrations in the zebra mussels from BP varied from 20 to $33 \text{ nmol Hg.g}^{-1}$ (**Figure 50B**). In contrast to the clams, the transplantation of mussels into the heavily metal-soiled stream (RM) triggered a constant rise with time in MT concentrations in tissues. This increase was nevertheless slower than for *C. fluminea*. The reference values at BP were multiplied by a factor of 2 only after 10 days of exposure as opposed to 3 days in clams. Finally, maximum-MT increase compared to the BP station corresponded to mean concentrations 3.5 times higher than at BP after 24 days ($67 \text{ nmol Hg.g}^{-1}$) before the death of specimens. Variations in MT levels at the BI and BII stations throughout the transplantation period were similar, with a gradual increase. Maxima measured after 72 days were not significantly different from those measured at RM (around $60 \text{ nmol Hg.g}^{-1}$ after 24 days, factor 2.4 compared to BP).

DISCUSSION

The results from this field study are based on the transplantation of two freshwater bivalves (*C. fluminea* and *D. polymorpha*) into stations with a Cd and Zn pollution gradient: RM > BI > BII > BP. The pollution levels measured correspond to concentrations in the water that were reported during previous geochemical studies (Audry *et al.*, 2004a).

Overall, Cd accumulations in the whole soft body of the two bivalves are a strong reflection of the contamination gradient (RM > BI > BII), nevertheless, the differences in bioaccumulation between stations are less than the differences in concentrations in the water. The maxima measured in the clams and the mussels at each station were not statistically different ($p > 0.005$). However, at RM, accumulation factors compared with BP were higher in the mussels than in the clams (factor 30 compared with 20).

For Zn, the two bivalves showed different responses. In *D. polymorpha* accumulation in the soft body was constant, whereas in *C. fluminea*, concentrations accumulated very rapidly at RM and BI then decreased over time. These results are in accordance with the status of Zn as an essential element and with the existence of a certain form of homeostatic regulation of this metal, relatively effective in *C. fluminea* (Viarengo and Nott, 1993). This ability has been also observed in *Littorina littorea* or *Pynagodon grandis*, with variations of Zn concentrations in the soft body not related to environmental fluctuations (Langston and Zhou, 1986 ; Couillard *et al.*, 1993). For *D. polymorpha*, earlier experiments have nevertheless reported the existence of mechanisms leading to Zn regulation for short term exposures (24-48 h) (Kraak *et al.*, 1994a ; Kraak *et al.*, 1994b ; Klerks and Fraleigh, 1997). Results confirmed that the Zn regulation capacity of freshwater bivalves depends to a great extent on the species, but also on the level and duration of exposure in the same species. Thus, only *D. polymorpha* showed accumulations of Zn compared with the environmental pollution gradient for this metal.

For both metals, the accumulations observed in the clams transplanted into the Riou-Mort proved to be less ($\sim 4 \mu\text{g Cd.g}^{-1}$, fw after 48 days) than levels measured after a transplantation carried out two years earlier ($6.3 \mu\text{g Cd.g}^{-1}$, fw after 49 days - Andres *et al.*, 1999). This result is related to the reduction in metal inputs into the waters of the Riou-Mort reported earlier (Lapaquellerie *et al.*, 1995 ; Audry *et al.*, 2004a). Contamination levels nevertheless still remained too high to ensure the survival of populations of transplanted bivalves in this river. The mortality could be correlated to the rapid and strong accumulations of Cd and Zn. The later death of *C. fluminea* compared with *D. polymorpha* could be attributed to the differences observed in terms of accumulation kinetics at RM, based on a stabilisation of Cd concentrations and a reduction in Zn concentrations, while the accumulation of these metals

in the zebra mussels is constant and leads to higher maximal Zn values ($152 \mu\text{g Zn.g}^{-1}$ against 90 after 24 days - **Figure 49**).

Analysis of MT concentrations in the mussels and the clams showed a significant influence of the metal exposure on the protein response, compared with BP. Nevertheless, temporary increases in MT concentrations were observed at the first sampling times of the transplantation at the reference station. These may be the result of the immediate stress conditions caused by transplantation (Baudrimont *et al.*, 1999). The variations in concentrations observed in response to these stress factors are, however, less than those induced by the metals accumulated in the bivalves at the polluted stations.

For both species, the greatest increases in MT concentrations were measured in bivalves at RM. In direct relation to the bioaccumulation kinetics of Cd and Zn, the significant increase in MT concentrations at this station occurred more rapidly in the clams than in the mussels (after 3 days in the clams compared with 10 days in the mussels). Moreover, the plateau trend in MT concentrations in *C. fluminea* correlates with Cd accumulation, whereas the Zn concentrations decrease. These results would seem to suggest the existence of more efficient detoxification processes to eliminate the metals in the clams than in *D. polymorpha*. Among these processes, efflux mechanisms through the cell membranes could play a part. Indeed, in *C. fluminea*, an increase in the number of transmembrane proteins of the ABC (ATP-binding cassette) transporter family has been shown after exposure to Cd or Zn (Achard *et al.*, 2004). Specific Zn transporters could also be the cause of the regulation of this metal in *C. fluminea* (Viarengo and Nott, 1993). For *C. fluminea*, MT concentrations were only correlated to Cd accumulation ($p < 0.01$). Nevertheless, an experimental study conducted with close metal levels of contamination in RM ($15 \mu\text{g Cd.l}^{-1}$ or 1 mg Zn.l^{-1} during 14 d) revealed that the two metals are able to induce MT biosynthesis in clams (Marie *et al.*, in press). In contrast, in *D. polymorpha*, where the Cd and Zn accumulations were constant, positive correlations were observed for both metals at RM ($p < 0.01$). However, it has been shown a lack of MT gene induction in zebra mussels after experimental exposure to Zn alone at similar concentration level that in RM (Marie *et al.*, in press).

Thus, under a high contamination pressure, *C. fluminea* developed a more efficient adaptative response than *D. polymorpha* with regard to Cd and Zn accumulation, which can in part account for its later mortality compared with *D. polymorpha*.

The kinetics of MT concentrations established for the less polluted stations (BI and BII) were at lower levels than at the RM station. Nevertheless, no difference was observed between the two stations for the two bivalve species, despite the differences in environmental

concentrations of Cd and Zn (factor 3.5 and 12 between the stations for [Cd] total and [Zn] total in the water). Yet the relevance of MTs as a biomarker for metal exposure is based on a dose-dependent response. In *C. fluminea*, this similar MT response at BI and BII is however coherent with the comparable total quantities of Cd and Zn measured in the soft body at 24 days at BI and 48 days at BII (1 and 1.05 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively). These results lead to positive correlations between MT concentrations and Cd concentrations at BI and BII ($p < 0.01$) but not with Zn concentrations. On the other hand, in *D. polymorpha*, the differences in Cd and Zn accumulations at the two stations are constant and cannot account for this similarity in the MT response (positive correlations for both metals $p < 0.05$). This result reveals the limitations of the discriminating ability of MTs in *D. polymorpha* within a low metal contamination gradient (BI – BII).

Lastly, despite differences observed in the MT response between the two species, maximum increase factors were fairly similar in both (factor 3.5, 2 and 2.5 at RM, BI and BII) compared with the reference station (BP), while metal accumulation factors were higher in *D. polymorpha* at BI and RM. These results show a greater MT response sensitivity in *C. fluminea* for the pollution gradient studied.

CONCLUSION

This study revealed notable differences in the MT response potential in *C. fluminea* and *D. polymorpha*, when transplanted into a polymetallic pollution gradient. Because efficient Cd and Zn detoxification mechanisms were activated in *C. fluminea*, the zebra mussel revealed higher accumulation levels, especially of Zn in correlation with the environmental contamination pressure. Jointly, the MT response occurred more quickly in *C. fluminea* than in *D. polymorpha*. In the zebra mussel, the similarity between the kinetics of metal bioaccumulation and the MT response did not provide better protection against toxicity from these major pollutants, since mortality of this species at RM was earlier than for *C. fluminea*. Nevertheless, we cannot rule on the preponderance of one metal over another in MT response under these field contamination conditions.

Acknowledgements

The authors would like to thank Henry Bouillard for his helpful assistance during bivalve transplantation and collection. Véronique Marie was supported by a grant from the Aquitaine Region.

REFERENCES

- Achard, M., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.P., 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquat. Toxicol.* 67, 347-357.
- Andres, S., Baudrimont, M., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France): I. Geochemical characteristics of the sampling sites and cadmium and zinc bioaccumulation kinetics. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2462-2471.
- Audry, S., Schäfer, J., Blanc, G., Bossy, C., Lavaux, G., 2004a. Anthropogenic components of heavy metal (Cd, Zn, Cu, Pb) budgets in the Lot-Garonne fluvial system (France). *Appl. Geochem.* 19, 769-786.
- Audry, S., Blanc, G., Schäfer, J., 2004b. Cadmium transport in the Lot-Garonne River system (France) - temporal variability and a model for flux estimation. *Sci. Total Envir.* 319, 197-213.
- Baudrimont, M., Andres, S., Metivaud, J., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C., Boudou, A., 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France): II. Metallothionein response to metal exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2472-2477.
- Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Tessier, A., 1993. Response of metallothionein concentrations in a freshwater bivalve (*Anodonta grandis*) along an environmental cadmium gradient. *Limnol. Oceanogr.* 38, 299-313.
- de Lafontaine, Y., Gagne, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P., Chan, H.M., 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquat. Toxicol.* 50, 51-71.
- Farey, B.J., Nelson, L.A., Rolph, M.G., 1978. Rapid technique for the breakdown of organic mercury compounds in natural waters and effluents. *The Analyst* 103, 656.
- George, S.G., Langston, W.J., 1994. Metallothionein as an indicator of water quality: assessment of the bioavailability of cadmium, copper, mercury and zinc in aquatic animals at the cellular level. In: Sutcliffe, D.W. (Ed). *Water Quality And Stress Indicators In Marine And Freshwater Ecosystems: Linking Levels Of Organisation (Individuals, Populations, Communities)*, The Freshwater Biological Association, Ambleside, pp. 138-153.
- Haq, F., Mahoney, M., Koropatnick, J., 2003. Signaling events for metallothionein induction. *Mutat. Res.* 533, 211-226.
- Irato, P., Santovito, G., Cassini, A., Piccinni, E., Albergoni, V., 2003. Metal accumulation and binding protein induction in *Mytilus galloprovincialis*, *Scapharca inaequivalvis*, and *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44, 476-484.
- Jouanneau, J.M., Lapaquellerie, Y., Latouche, C., 1993. Origin and pathways of Cd contamination in the Gironde estuary, Garonne river and tributaries. In: Vernet, J.P. (Ed.). *Environment Contamination*, Elsevier, Amsterdam, pp. 373-389.

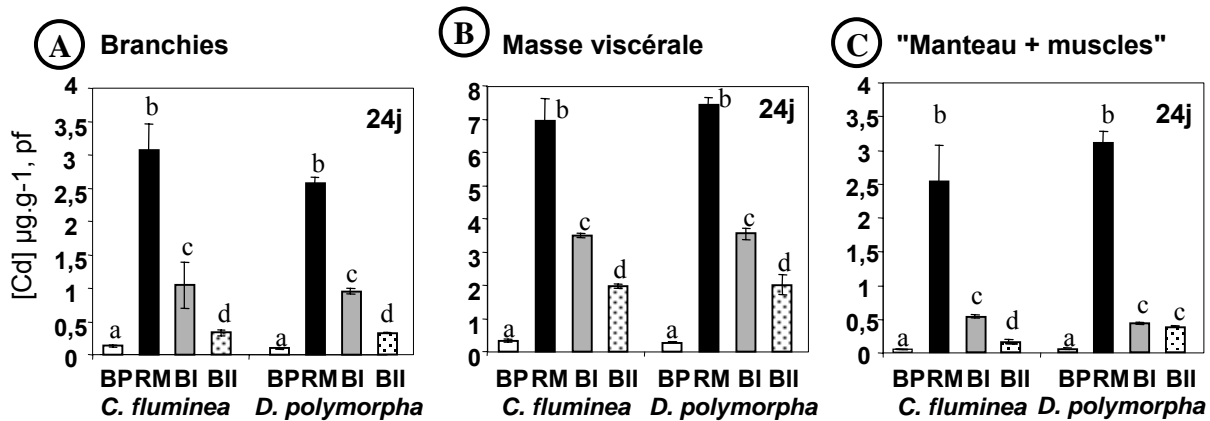
- Kägi, J.H.R., 1991. Overview of metallothionein. *Methods Enzymol.* 205, 613-626.
- Klerks, P.L., Fraleigh, P.C., 1997. Uptake of nickel and zinc by the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 32, 191-197.
- Kraak, M.H., Toussaint, M., Lavy, D., Davids, C., 1994a. Short-term effects of metals on the filtration rate of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Environ. Pollut.* 84, 139-143.
- Kraak, M.H.S., Wink, Y.A., Stuijzand, S.C., Buckert-de Jong, M.C., de Groot, C.J., Admiraal, W., 1994b. Chronic ecotoxicity of Zn and Pb to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Aquat. Toxicol.* 30, 77-89.
- Kwan, K.H.M., Chan, H.M., de Lafontaine, Y., 2003. Metal contamination in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) along the St. Lawrence River. *Environ. Monit. Assess.* 88, 193-219.
- Langston, W.J., Bebianno, M.J., Burt, J.R., 1998. Metal handling strategies in molluscs. In: Langston, W.J., Bebianno, M.J. (Eds.). *Metal Metabolism In Aquatic Environments*, Chapman and Hall, London, pp. 219–283.
- Langston, W.J., Zhou, M., 1986. Evaluation of the significance of metal-binding proteins in the gastropod *Littorina littorea*. *Mar. Biol.* 92, 505-515.
- Lapaquellerie, Y., Jouanneau, J.M., Maillet, N., Latouche, C., 1995. Cadmium pollution in sediments of the Lot river (France). Estimate of the mass of cadmium. *Envir Techn.* 16, 1145-1154.
- Lecoeur, S., Videmann, B., Berny, P., 2004. Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*. *Environ. Res.* 94, 184-191.
- Lobel, P.B., Payne, J.F., 1987. The mercury-203 method for evaluating metallothioneins: interference by copper, mercury, oxygen, silver and selenium. *Comp. Biochem. Physiol. C* 86, 37-39.
- Marie, V., Gonzalez, P., Baudrimont, M., Bourdineaud, J.-P., and Boudou, A., in press. Metallothionein response to cadmium and zinc exposures compared in two freshwater bivalves, *Dreissena polymorpha* and *Corbicula fluminea*. *Biometals*
- Nordberg, M., 1998. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta* 46, 243-253.
- Rainbow, P.S., Phillips, D.J.H., 1993. Cosmopolitan biomonitors of trace metals. *Mar. Pollut. Bull.* 26, 593-601.
- Vasseur, P., Cossu-Leguille, C., 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environ. Int.* 28, 711-717.
- Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfoli, I., 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell. Mol. Biol.* 46, 407-417.
- Viarengo, A., Nott, J.A., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C* 104, 355-372.

CONCLUSION DE L'ETUDE DE TRANSPLANTATION A LA CONFLUENCE RIOU-MORT/LOT

Cette étude a mis en évidence des différences notables dans le potentiel de réponse des MTs chez *C. fluminea* et *D. polymorpha* transplantés le long d'un gradient de pollution polymétallique. Nos résultats montrent que la bioaccumulation de ces deux métaux chez *C. fluminea* est moins importante que chez la moule zébrée (*D. polymorpha*), notamment pour le Zn. Ceci pourrait-être en relation avec d'une plus grande efficacité des mécanismes de détoxification des métaux chez *C. fluminea* ou d'assimilation branchiale en relation par exemple avec le temps d'ouverture des valves, le taux de filtration, etc. Chez *D. polymorpha*, les concentrations mesurées dans le corps mou sont corrélées à la pression de contamination environnementale. Le potentiel de réponse des MTs à l'égard des accumulations métalliques est plus rapide chez *C. fluminea* que chez *D. polymorpha*. Pour la moule zébrée, l'analogie entre les cinétiques d'accumulation des deux métaux et des MTs ne permet cependant pas une meilleure protection contre la toxicité de ces métaux, une mortalité plus précoce de ces organismes par rapport à *C. fluminea* (24 jours/ 48 jours) étant apparue à la station RM. De plus, la prépondérance d'un métal par rapport à l'autre sur la réponse des MTs ne peut être élucidée à partir des résultats que nous avons obtenus *in situ*. Ainsi, des études complémentaires en conditions contrôlées de laboratoire devront être réalisées, afin d'analyser comparativement la réponse associée au Cd et au Zn, considérés isolément, pour chacune des deux espèces de bivalves.

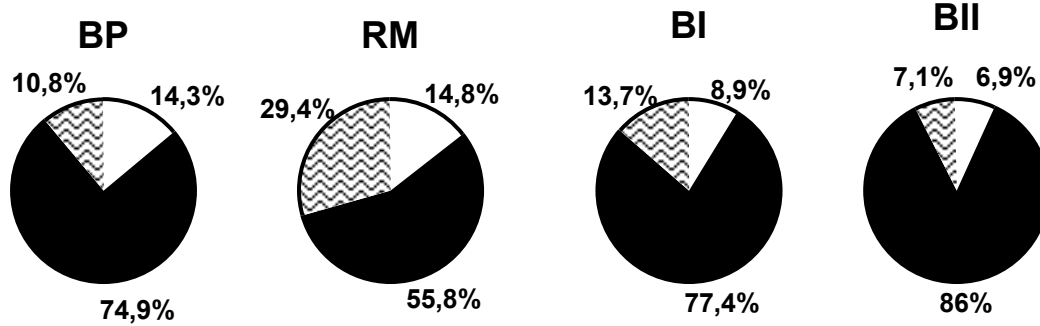
3-1.2. ANALYSE DE LA BIOACCUMULATION DU CADMIUM ET DU ZINC A L'ECHELLE DES TISSUS. COMPARAISON ENTRE *C. fluminea* ET *D. polymorpha*

Les résultats de bioaccumulation précédemment reportés pour l'organisme entier (corps mou) de *C. fluminea* et *D. polymorpha* transplantés dans le gradient de pollution de la zone amont du *continuum* ont été déterminés à partir du dosage des concentrations métalliques dans trois organes ou ensembles tissulaires : les branchies, la masse viscérale (palpes labiaux, tractus digestif et glandes annexes, gonades, reins, cœur) et le "manteau + muscles" dont le pied pour *C. fluminea*. Le byssus de *D. polymorpha*, capable de fixer d'importantes quantités de métaux, notamment essentiels (Zn et Cu), a été retiré de l'analyse (Gundacker, 1999). La technique

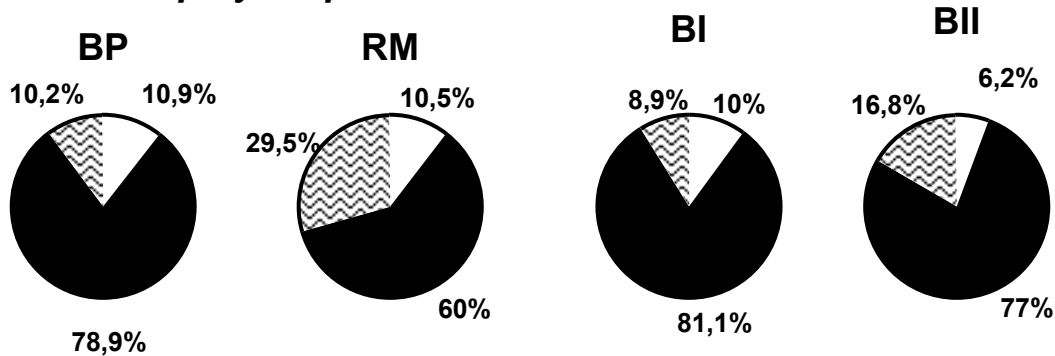


(D)

Corbicula fluminea



Dreissena polymorpha



□ Branchies ■ Masse viscérale ▨ Reste

Figure 51 : Concentrations moyennes ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, poids frais \pm ESM) de cadmium dans (A-) les branchies, (B-) la masse viscérale et (C-) "le manteau + muscles" de *Corbicula fluminea* et *Dreissena polymorpha*, et (D-) teneurs relatives pour ce métal dans ces différents compartiments tissulaires après 24 jours de transplantation à Boisse-Penhot (BP), Bouillac I (BI), Bouillac II (BII) et Riou-Mort (RM).

Les valeurs des concentrations possédant la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0.05$, test U de Mann-Whitney).

utilisée pour le dosage des métaux dans ces différents compartiments tissulaires est décrite dans le paragraphe 2.5 "Technique d'analyse des métaux", page 69.

Les cinétiques de bioaccumulation du Cd et du Zn établies pour chaque ensemble tissulaire montrent des accumulations significatives dans tous les compartiments tissulaires de *C. fluminea* et *D. polymorpha* transplantés sur les sites pollués (RM, BI et BII). Les tendances sont relativement proches de celles observées dans le corps mou entier : pour le Cd, les vitesses d'accumulation diffèrent d'une espèce à l'autre, mais les niveaux maxima atteints sont équivalents ; le Zn s'accumule progressivement dans les tissus de *D. polymorpha*, alors que chez *C. fluminea*, les concentrations augmentent très rapidement, avec ensuite une diminution au cours du temps. Cependant, afin de clarifier les différences observées entre les deux espèces de bivalves pour chaque métal étudié, nous avons choisi de présenter les concentrations de Cd et de Zn mesurées dans les différents compartiments tissulaires et leur répartition entre ces derniers (teneurs ou quantités relatives de métal accumulé) après 24 jours de transplantation. Ce temps a été choisi car il est commun à chaque cinétique d'échantillonnage, sur les quatre stations du gradient de contamination : Boisse-Penchot (BP), Riou-Mort (RM), Bouillac I (BI) et Bouillac II (BII).

A- Bioaccumulation du cadmium

Comme pour le corps mou entier, les niveaux accumulés dans les différents tissus de *C. fluminea* et *D. polymorpha* après 24 jours de transplantation reflètent globalement le gradient environnemental de pollution : RM > BI > BII > BP (**Figure 51 A, B et C**). Ils sont relativement proches pour les deux espèces avec cependant des facteurs d'accumulation par rapport au site de référence (BP) dans les branchies et la masse viscérale de la moule zébrée plus importants que pour *C. fluminea*. Les plus fortes concentrations sont classiquement mesurées dans la masse viscérale des bivalves. A partir de la voie directe de contamination, ce résultat indique un rapide transfert du Cd des branchies vers les organes internes de stockage et d'excrétion contenus dans ce compartiment tissulaire (glande digestive et reins, notamment) (Baudrimont, 1997 ; Andres *et al.*, 1999 ; Fraysse *et al.*, 2000). La contribution de la contamination par voie trophique participe également à cette répartition (Andres *et al.*, 1999). Les concentrations du "manteau et muscles" sont les plus faibles, mais révèlent les plus fortes accumulations en comparaison du bruit de fond. Dans le manteau de *D. polymorpha*, une étude rapporte notamment la localisation du Cd dans des vésicules d'endocytose de cellules

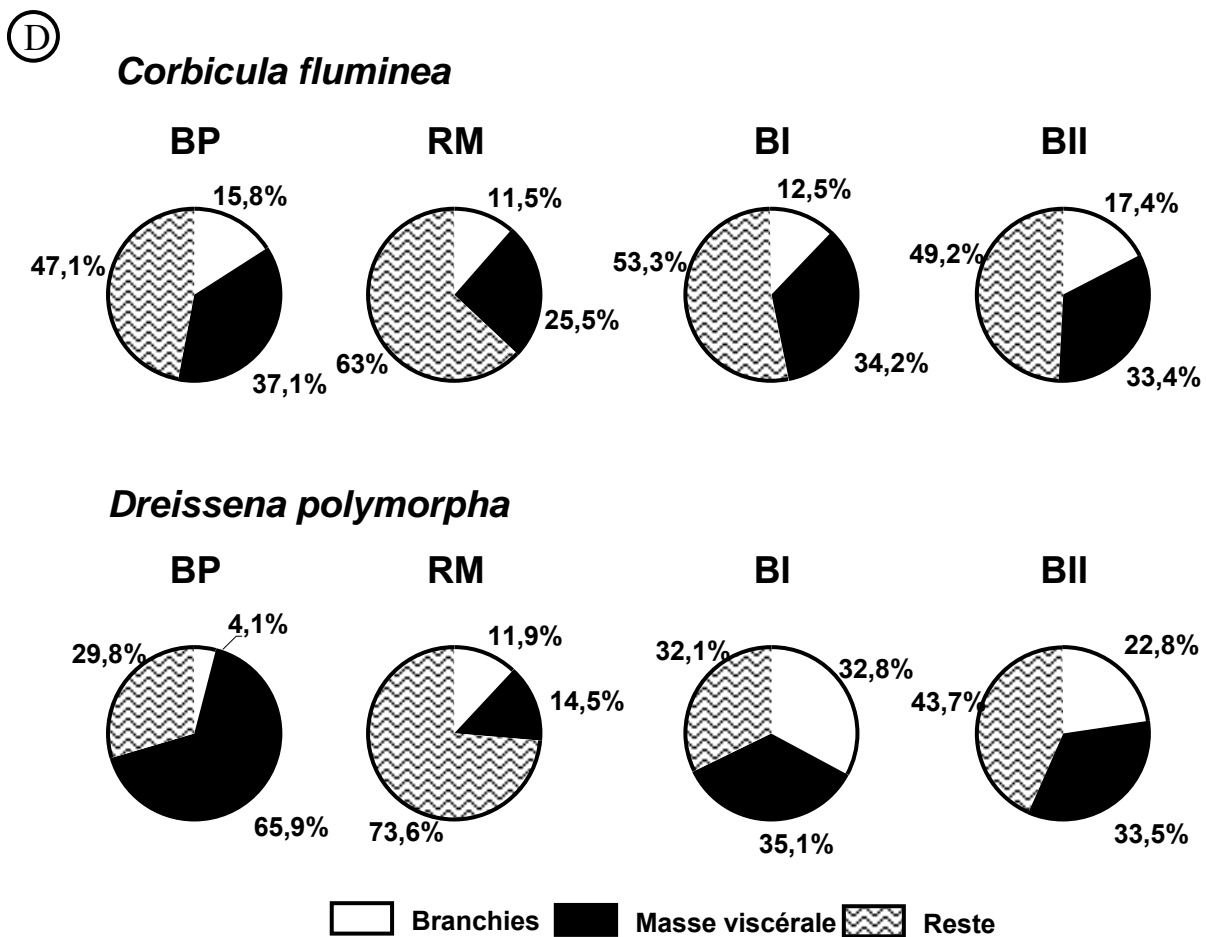
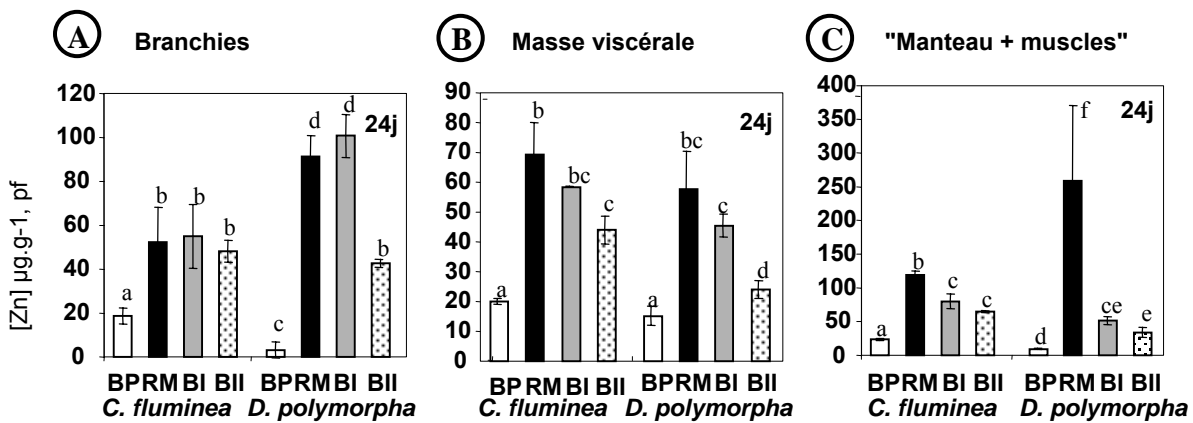


Figure 52 : Concentrations moyennes (µg.g⁻¹, poids frais ± ESM) de zinc dans (A-) les branchies, (B-) la masse viscérale et (C-) le "manteau + muscles" de *Corbicula fluminea* et *Dreissena polymorpha*, et (D-) teneurs relatives pour ce métal dans ces différents compartiments tissulaires après 24 jours de transplantation à Boisse-Penchat (BP), Bouillac I (BI), Bouillac II (BII) et Riou-Mort (RM).

Les valeurs des concentrations possédant la même lettre ne sont pas significativement différentes (p>0.05, test U de Mann-Whitney).

épithéliales du manteau comme chez la plupart des moules d'eau douce (Hemelraad et Herwig, 1988 ; Herwig *et al.*, 1989).

Les teneurs relatives moyennes (**Figure 51D**) montrent pour chaque station une répartition tissulaire du Cd quasi-identique chez *D. polymorpha* et *C. fluminea*. Pour les lots de bivalves transplantés à BP, BI et BII, la masse viscérale contribue essentiellement à la contamination du corps mou entier (autour de 80%) suivie des branchies et du "manteau + muscles" (~10% chacun). Par contre, pour les bivalves en provenance du site le plus contaminé (RM), la part du métal présente dans le "manteau + muscles" augmente pour atteindre 29%, cependant la masse viscérale conserve 55% du Cd total mesuré dans l'organisme. L'importance de ce compartiment tissulaire est donc essentielle en termes de stockage du Cd. Ce résultat est en accord avec les études de laboratoire menées sur chacun de ces bivalves. Chez *D. polymorpha*, Herwig *et al.* (1989) ont montré une accumulation du Cd dans les lysosomes et les granules des cellules digestives après exposition à 100 µg Cd.l⁻¹ pendant 4 semaines. Chez *C. fluminea*, une exposition à 35 µg.l⁻¹ pendant 15 et 30 jours a révélé les plus fortes concentrations cellulaires solubles dans la masse viscérale (48%), la fraction MTs intervenant à hauteur de 14% dans la séquestration du Cd total accumulé dans l'organisme entier (Baudrimont *et al.*, 1997a).

B- Bioaccumulation du zinc

Contrairement aux observations faites pour le Cd, la bioaccumulation du Zn au niveau des différents tissus des bivalves ne reflète pas toujours le gradient de pollution (notamment dans les branchies) et des différences inter-spécifiques notables apparaissent (**Figure 52 A, B et C**).

Pour *C. fluminea*, la régulation efficace de ce métal essentiel sur les sites de RM et BI conduisant à la réduction des concentrations de Zn accumulées rapidement dans un premier temps est plus ou moins avancée dans les tissus après 24 jours de transplantation (notamment dans la masse viscérale, résultats non montrés). Comme pour le Cd, la répartition du Zn entre les différents tissus étudiés est identique à BP, BI, BII (**Figure 52D**), par contre, le Zn s'accumule préférentiellement dans le "manteau + muscles" (~50%), comme observé lors des études précédentes de transplantation (Baudrimont, 1997 ; Andres *et al.*, 1999), alors que le Cd est surtout présent dans la masse viscérale. Sur la station de RM, la pression de contamination environnante conduit à une augmentation de la part de Zn contenue dans le "manteau + muscles" (63% du Zn accumulé) au détriment de la masse viscérale (25%).

Pour *D. polymorpha*, les accumulations de Zn dans les tissus sur les sites pollués sont progressives (résultats non montrés) et participent conjointement à la réponse observée précédemment à l'échelle du corps mou entier. Sur le site de référence (BP), la répartition du Zn diffère de celle observée pour *C. fluminea* : les quantités de Zn sont plus importantes dans la masse viscérale (65,9%) suivie du "manteau + muscles" (29,8%) et des branchies (4,1%). Ce profil de distribution dans les moules diffère à BI et BII où la part des branchies croît considérablement. Le Zn se distribue uniformément entre les compartiments tissulaires à BI, tandis qu'à BII le "manteau + muscles" contient 43,7% des quantités totales accumulées, contre 33,5% pour la masse viscérale et 22,8% pour les branchies. Sur le site de RM, les proportions de Zn accumulées dans les tissus sont proches de celles observées pour *C. fluminea* avec 73,6% du Zn dans le "manteau + muscles", suivi de la masse viscérale (14,5%) et des branchies (11,9%).

C- Conclusion

Globalement, au sein du gradient de pollution de la zone amont du *continuum*, la répartition du Cd et du Zn entre les différents tissus est très proche chez *C. fluminea* et *D. polymorpha* : la masse viscérale contenant les principaux organes de stockage et d'excrétion apparaît jouer un rôle majeur dans la séquestration du Cd sur les stations polluées, alors que pour le Zn, ce sont surtout le manteau et les muscles. Cette homologie de la répartition tissulaire des métaux chez ces deux bivalves ne permet donc pas d'expliquer les différences interspécifiques observées à l'échelle du corps mou entier, notamment en relation avec la régulation du Zn chez *C. fluminea*.

3-2. CARACTERISATION DE LA REPONSE DES METALLOTHIONEINES CHEZ *Corbicula fluminea* ET *Dreissena polymorpha* APRES EXPOSITION AU CADMIUM ET/OU AU ZINC. ETUDE EXPERIMENTALE

A ce stade de notre étude, après avoir mis en évidence le potentiel de réponse des métallothionéines pour les deux espèces de bivalves d'eau douce - *C. fluminea* et *D. polymorpha* - dans le gradient polymétallique au niveau de la confluence Riou-Mort / Lot, nos objectifs sont maintenant de caractériser plus spécifiquement cette réponse à l'égard du Cd et du Zn considérés isolément et en condition combinée (Cd+Zn). Les résultats précédemment présentés ayant révélé des réponses marquées pour les bivalves transplantés dans le Riou-Mort, les niveaux d'exposition aux métaux retenus pour l'étude expérimentale sont ceux des concentrations mesurées *in situ* sur cette station, au sein de la fraction dissoute de la colonne d'eau ($15 \mu\text{g Cd.l}^{-1}$ et 1 mg Zn.l^{-1}).

Cette approche expérimentale et les résultats obtenus sont présentés dans l'article intitulé "*Metallothionein response to cadmium and zinc exposures compared in two freshwater bivalves, Dreissena polymorpha and Corbicula fluminea*" accepté pour publication dans "*Biometals*".

*Metallothionein response to cadmium and zinc exposures compared in
two freshwater bivalves,
Dreissena polymorpha and Corbicula fluminea¹*

Marie Véronique, Gonzalez Patrice, Baudrimont Magalie, Bourdineaud Jean-Paul, Boudou
Alain

Laboratoire d'Ecophysiologie et Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques (LEESA), Université Bordeaux 1/UMR
CNRS 5805, Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France

KEYWORDS

Cadmium, Zinc, *Dreissena polymorpha*, *Corbicula fluminea*, Bioaccumulation,
Metallothionein, Gene expression.

¹ Article accepté pour publication dans *Biometals*.

ABSTRACT

Metallothionein (MT) response to cadmium (Cd) and zinc (Zn) bioaccumulation after single or combined direct exposure was compared in two freshwater bivalves, *Dreissena polymorpha* (zebra mussel) and *Corbicula fluminea* (Asiatic clam). Bivalves were exposed to 0.133 μM Cd and/or 15.3 μM Zn, with metal and MT concentrations analysed in the whole soft body after 1, 3, 10 and 24 days of exposure and compared with controls. Results showed significant increase in MT concentrations in both species exposed to Cd and Cd+Zn with a higher accumulation of the protein compared to the control in *D. polymorpha* for nevertheless similar Cd levels accumulated with time. Exposure to Zn alone led to a significant increase in MT concentrations only in *C. fluminea*, whereas there was a lack of MT gene induction in the zebra mussels which was confirmed by MT mRNA quantification in gills (RT-PCR). Mussel mortality after 10 days of exposure to Zn and Cd+Zn is discussed with regard to detoxification mechanisms, which include metallothioneins.

INTRODUCTION

Chronic anthropogenic contamination of freshwater systems by heavy metals can induce structural and functional disturbances in living organisms, from the cellular and molecular basis to higher biological levels, such as populations or communities. For the assessment of metal contamination at organ or individual level, metal-binding metallothioneins (MT) have been proposed as exposure biomarkers (Roesijadi, 1994a). These low-molecular-weight cytosolic proteins are a ubiquitous element, characterized by a large proportion of cysteine residues (around 30%) arranged inside globular domains or clusters, with differential binding affinity between metal ions: zinc < cadmium << copper, silver << mercury (Vasák, 1991). MT roles include the homeostatic regulation of essential metals such as zinc (Zn) or copper; detoxification *via* the chelation of harmful heavy metals such as cadmium (Cd) or mercury (Hg); the protection of tissues against various forms of oxidative injury (Davis and Cousins, 2000 ; Haq *et al.*, 2003). In aquatic environments, invertebrates and in particular bivalves are often used as biological models to study metal contamination and MT response because they are sessile, widely distributed geographically, and characterized by high bioaccumulation capacities, related to their filtration activity for respiratory and nutritional purposes (Boening, 1999). In Europe, two invasive species currently cohabit in freshwater rivers and lakes: the zebra mussel *Dreissena polymorpha*, attached to natural or artificial substrates within the water column; the Asiatic clam *Corbicula fluminea*, buried in the superficial sediment layers. Several field studies have reported significant increases in MT concentrations in response to metal bioaccumulation in these two species (Baudrimont *et al.*, 1999 ; De Lafontaine *et al.*, 2000 ; Gagne *et al.*, 2002). In laboratory experiments, only the effects of single metal exposure on bioaccumulation and MT response have been studied, usually under unrealistic environmental contamination pressures (Doherty *et al.*, 1988 ; High *et al.*, 1997 ; Engelken and Hildebrandt, 1999). To our knowledge, only one experimental study has been based on the combined effects of cadmium and copper on MT response in *D. polymorpha* (Lecoeur *et al.*, 2004). However, at the field level, metal mixtures are commonly present as a result of mining, industrial and domestic effluents (Baudrimont *et al.*, 1999 ; Gagne *et al.*, 2002). In this context, metal additive or synergic effects can be expected and must be assessed.

The aims of the present experimental study were to compare the effects of Cd, Zn and the two metals in interaction on metal bioaccumulation and MT response in *D. polymorpha* and *C. fluminea*. Cd and Zn metals are known to be simultaneously present in the environment, notably from extraction and treatment of Zn ores. In this study, they were added individually or in combination to the water. Metal concentrations and MT protein levels were analysed at the

whole soft body level, after 1, 3, 10 and 24 days of exposure and MT gene expression in the gills of *D. polymorpha* in response to metal contamination was quantified after 10 days.

MATERIAL AND METHODS

Bivalve collection and experimental design

Zebra mussels were collected from a reference-sampling site on the Garonne River, near Agen (southwest France). A batch of 500 individuals was sorted in order to select homogeneous specimens according to shell length: 27 ± 4 mm ($n = 240$). Around 600 *C. fluminea* were sampled from the Isle River, a tributary of the Dordogne River (southwest France); the organisms selected for the experiment were 28 ± 5 mm ($n = 288$). The bivalves were collected in early autumn, when MT levels are least affected by reproductive activities and body mass variations (Baudrimont *et al.*, 1997b ; Lowe and Day, 2002). Specimens of the two species were randomly allocated to 48 experimental units (EU: glass aquaria, 12x12x30 cm), with 5 mussels and 6 clams per EU. Each EU was based on a mixed biotope: a pure sand compartment (3 kg/EU, 5 cm deep - 98% silica - granulometry: 0.8 to 1.4 mm – Silaq) and the overlying water (3 litres, 20 cm deep). The clams were able to burrow in the sand, their filtration activity taking place at the sediment/water interface. A plastic horizontal grid was placed in the water column, 12 cm above the surface of the sand, in order to support the zebra mussels. During the acclimation (10 days) and experimental (24 days) periods, bivalves were maintained in dechlorinated and permanently aerated tap water at $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Daily measurements of pH and dissolved oxygen showed very small variations throughout the entire experiment: 8.5 ± 0.3 and 9.5 ± 0.3 mg.l⁻¹, respectively. The artificial photoperiod was 12h light per day. The bivalves were fed every two days with a small amount of fresh green algae (*Scenedesmus suspicatus*) (approximately 10^5 algae.ml⁻¹ per unit - Baudrimont *et al.*, 1997a).

Metal contamination procedure

Three metal exposure conditions were tested against a control: Cd contamination, with a nominal concentration of 0.133 μM (15 $\mu\text{g Cd.l}^{-1}$ added as CdCl_2); Zn contamination, with a nominal concentration of 15.3 μM ($1\ 000$ $\mu\text{g Zn.l}^{-1}$ added as ZnCl_2); Cd + Zn contamination (0.133 $\mu\text{M Cd} + 15.3$ $\mu\text{M Zn}$). Contamination levels were chosen with reference to dissolved metal concentrations measured in a tributary of the Lot River, the Riou-Mort in southwestern France which has been polluted by mining effluents (Audry *et al.*, 2004a). For each exposure

condition, there were three replicates per sampling time (1, 3, 10 and 24 days), thus 48 experimental units were set up simultaneously. Metal contamination pressures were maintained throughout the 24 days of experiment *via* daily Cd and Zn inputs from stock aqueous solutions (0.266 mM for Cd and 15.3 mM for Zn), after metal determinations on water samples from each EU, to compensate for metal concentration decreases: adsorption on the tank walls and sand surface; accumulation in bivalves, etc. Using this procedure, variations in Cd and Zn concentrations were very small throughout the whole experiment: 0.133 ± 0.025 and 0.133 ± 0.015 μM Cd for Cd and Cd+Zn exposure, respectively; 15.3 ± 2.1 and 15.3 ± 1.5 μM Zn for Zn and Cd+Zn exposure, respectively. At each sampling time, bivalves were collected and immediately frozen at -80°C under nitrogen atmosphere to ensure anoxic conditions and avoid MT oxidation and polymerization (Dutton *et al.*, 1993).

Cadmium and zinc determinations

Metal determinations were made on three replicates (one bivalve per EU) per species and experimental condition. The soft bodies were dissected using Teflon coated instruments, dried on absorbent paper and weighed (fresh weight, fw). For each sample, a classical digestion procedure was carried out with 3 ml of concentrated nitric acid (Merck 65% HNO_3) added in a pressurized medium (borosilicate glass tube) at 100°C for 3 hours. The digestates were diluted up to 20 ml with ultra-pure water (MilliQ plus). 10 μl of water samples or soft body digestates were mixed before atomization with 4 μl of a 0.2 g.l^{-1} Pd and 0.5 g.l^{-1} $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ mixture to avoid interference. Cd determinations were performed with a polarized Zeeman atomic absorption spectrophotometer (Varian AA400) equipped with a graphite tube atomizer (model GTA 96, Varian). The detection limit was 0.1 $\mu\text{g Cd.l}^{-1}$ (DL: 3x SD of the reagent blanks). Zn concentrations were determined on the same samples by flame atomic absorption spectrophotometry (Varian AA220FS). The detection limit was 5 $\mu\text{g Zn.l}^{-1}$. The analytical methods were simultaneously validated for each sample series by the analysis of standard biological reference materials (TORT-2, Lobster hepatopancreas; DOLT-2, Dogfish liver; NCR/CRNC). Values were consistently within the certified ranges (data not shown). Bioaccumulation levels were expressed in $\text{nmol Cd or Zn.g}^{-1}$, fw \pm standard error (SE).

Metallothionein determination

Total MT proteins were determined in the whole soft bodies by mercury-saturation assay using cold inorganic Hg (Dutton *et al.*, 1993 ; Baudrimont *et al.*, 1997b). MT analysis

was conducted on three replicates per experimental condition, each corresponding to a pool of two individuals collected in each EU. Soft bodies were homogenized in 20 ml-polypropylene tubes with a tissue grinder (Ultra-Turrax T-25) in an ice-cold Tris-HCl 25 mM buffer (Sigma, pH 7.2 at 20°C). This step was performed in a glove bag filled with nitrogen (Atmosbag, Aldrich Chemical Co.). The homogenized samples were kept on ice, to inhibit protease activity. Aliquots of 1.5 ml were placed in microtubes (Eppendorf) and centrifuged at 20,000 g for 60 min, at 4°C (Sigma 3K12). To 200 µl of supernatant was added a 200 µl HgCl₂ solution (Merck) at 50 mg Hg.l⁻¹ with trichloroacetic acid (10%, Sigma) for the precipitation of non-MT proteins. The Hg excess not bound to MTs was removed using lyophilised pig hemoglobin (Sigma) at 0.05 g Hb.ml⁻¹ in Tris-HCl 30 mM buffer (pH 8.2 at 20°C). The final supernatant was then quantitatively recovered and used for Hg determination by cold vapor and atomic absorption spectrometry (CETAC M 6000, Varian). The detection limit was estimated at 0.01 µg Hg.l⁻¹.

Reference samples or “blanks” (Baudrimont *et al.*, 1997b) were prepared to monitor the Hg chelation efficiency of the hemoglobin. Under our experimental conditions, an average burden of 1.76 ± 0.11 ng Hg (n = 14) was measured in these reference samples, corresponding to 0.01% of added total Hg. The mean of the three blank values measured in each analytical run was removed from the Hg burdens measured in each sample.

At the same time, a standard of purified rabbit liver MT (Sigma) enabled us to check the validity of the saturation assay by determining the ratio between the binding sites measured after Hg-saturation and the potential binding sites indicated by the supplier and previously verified by Hg, Cd, Zn and Cu determinations on purified MT solution (10 µg MT.ml⁻¹ in the homogenization buffer). In our experimental conditions, the average value of the recovery percentage was $104 \pm 3\%$ (n = 14).

MT concentrations were expressed in nmol of Hg-binding sites.g⁻¹ ± SE (fresh weight, fw). Since the exact quantity of Hg binding sites per MT molecule was unknown for these two bivalve species, MT concentrations cannot be expressed in nmol MT.g⁻¹.

Determination of MT gene expression

The *D. polymorpha* cDNA MT sequence has been described (Engelken and Hildebrandt, 1999), but no MT sequence is known for *C. fluminea*. We therefore used the RT-PCR technique to quantify MT gene expression in gills of zebra mussels after 10 days of exposure to Cd, Zn and Cd+Zn.

Total RNA extraction

Total RNAs were extracted from 40 mg of mussel gills using the Absolutely RNA RT-PCR Miniprep kit (Stratagene), according to the manufacturer's instructions. The gills cannot be considered as being strictly representative of the organs of the bivalve in general, but as they are a respiratory epithelium in direct contact with the water in the pallial cavity, they do have a high bioaccumulation capacity for metals and also for MT biosynthesis (Gundacker, 1999 ; Lecoecur *et al.*, 2004). The quality of all RNAs produced was evaluated by electrophoresis on a 1% agarose-formaldehyde gel, and their concentration determined by spectrophotometry. For each exposure condition, samples were carried out in triplicate. Each sample was obtained by mixing gills from two individuals.

Reverse transcription of total RNA

First-strand cDNA was synthesized from 5 µg total RNA using the Stratascript First-Strand Synthesis System (Stratagene). RNA was then adjusted to 38 µl with DEPC-treated water. After the addition of 2 µl of oligo(dT) and 1 µl of random primers, the reaction was incubated at 65°C for 5 min. 40 units of Rnase block Ribonuclease Inhibitor, 2 µl of 100 mM dNTPs, 5 µl of 10x first-strand buffer and 50 units of Stratascript reverse transcriptase were then added. The reaction was incubated for 1h at 42°C in an Eppendorf Mastercycler. The cDNA mixture was maintained at -20°C until it was needed for the RT-PCR reaction.

Primer design

A specific primer pair (5'-CCA TGC AAC TGC GTT GAA-3' and 5'-TGC ACT GGG CCA GAT TCG TGC-3') was selected within the coding region of the MT cDNA of *D. polymorpha*, from base pairs 151 to 313 (GenBank accession number: U67347).

Reverse polymerase chain reaction (RT-PCR)

RT-PCR reactions were performed in a LightCycler (Roche Diagnostics) following the manufacturer's instructions (one cycle at 95°C for 10 min, and 50 amplification cycles at 95°C for 5s, 60°C for 5s and 72°C for 20s). Each 20 µl reaction contained 2 µl of reverse transcribed product template, 1 µl of master mix including the SYBR Green I fluorescent dye, enabling the monitoring of the PCR amplification, and the primer pair at a final concentration of 300 nM for each primer.

Reaction specificity was determined from the dissociation curve of the PCR product obtained by following the SYBR Green fluorescence level during a gradual heating of the PCR

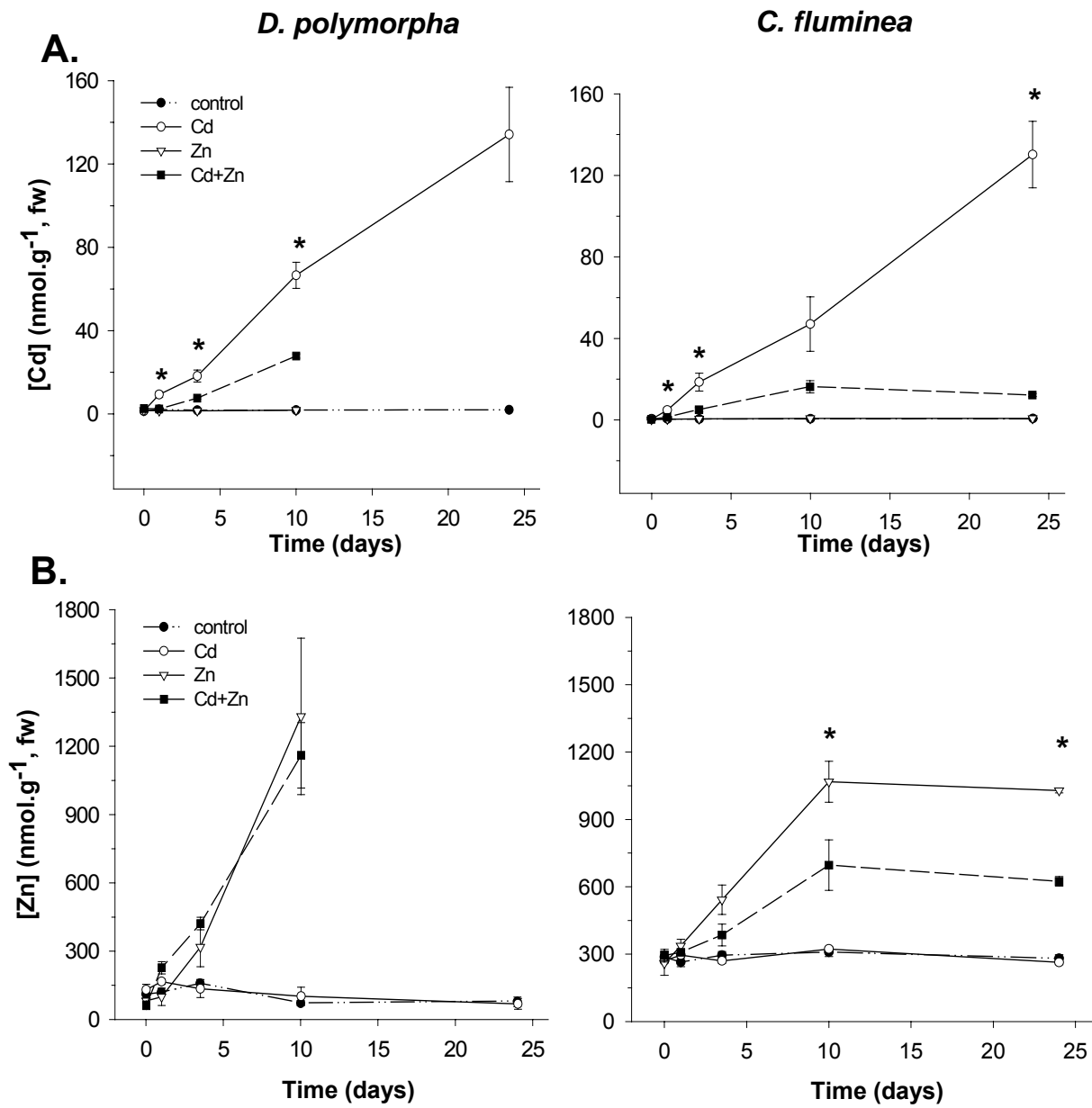


Figure 53: Cadmium (A.) and zinc (B.) concentrations (nmol.g⁻¹, fresh weight) in the whole soft body of *Dreissena polymorpha* and *Corbicula fluminea* exposed for 24 days to cadmium and/or zinc (0.133 μM Cd and 15.3 μM Zn in the water).

Control: no added metal in the experimental units.

Data are means with standard errors (n=3). Asterisks indicate the significant differences between single (Cd or Zn) and mixed (Cd+Zn) exposures for each exposure duration (Mann-Whitney U-test, $p < 0.05$).

products from 60 to 95°C. MT mRNA quantifications in the zebra mussel gills were expressed from induction factor compared with control values.

Statistical Analysis

Statistical comparisons between mean values of metal and MT concentrations and a number of mRNA copies were made with the non-parametric Mann-Whitney U-test (Statistica 5.1, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Differences were considered statistically significant at $p \leq 0.05$.

RESULTS

No mortality was observed for *C. fluminea* during the 24 days of exposure. In contrast, all the *D. polymorpha* individuals treated with Zn (Zn and Zn+Cd conditions) died during the last period of exposure (10-24 days). The soft body weight measurements at time zero and at the end of the experiment did not reveal any significant change in either species.

Metal bioaccumulation

Exposure to Cd alone showed a progressive and constant accumulation of the metal in the soft bodies of the two species, with similar maximal concentrations after 24 days: 134 ± 22 nmol Cd.g⁻¹ (fresh weight) for *D. polymorpha* and 130 ± 16 nmol Cd.g⁻¹ (fw) for *C. fluminea* (factors 70 and 175 compared to background levels, respectively - **Figure 53A**). After the combined exposure to Cd and Zn, Cd concentrations were markedly lower during the first 10 days (Cd/Cd+Zn ratio close to 2.3) and similar for the two species. At the end of the experiment, the mean Cd concentration in *C. fluminea* was 12.5 ± 0.7 nmol.g⁻¹ (fw), with a Cd/Cd+Zn ratio close to 10.

Zn background level in the whole soft bodies of *C. fluminea* was about 4-fold higher than in *D. polymorpha* (287 ± 8.5 and 74.5 ± 7.8 nmol.g⁻¹, fw - **Figure 53B**). In the soft bodies of *D. polymorpha*, the combined Cd+Zn exposure did not significantly modify Zn concentrations compared to the exposure to Zn alone, with a quasi-linear increase during the 10 days of exposure, with an average value around 1250 nmol Zn.g⁻¹ (x 17/control). In *C. fluminea*, Zn accumulation was significantly higher in individuals exposed to Zn alone (Zn/Zn+Cd ratio close to 1.6); after 10 days of exposure, an equilibrium was reached for the Zn

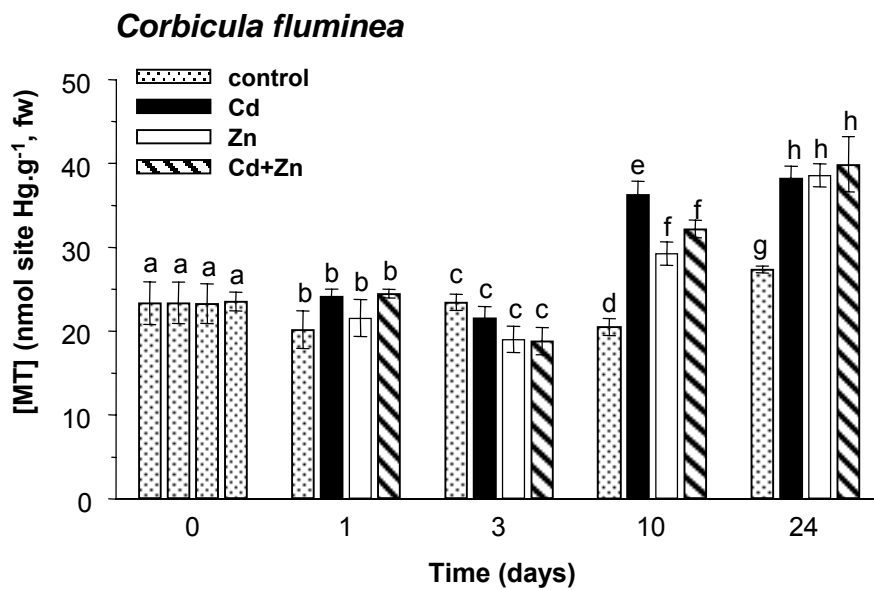
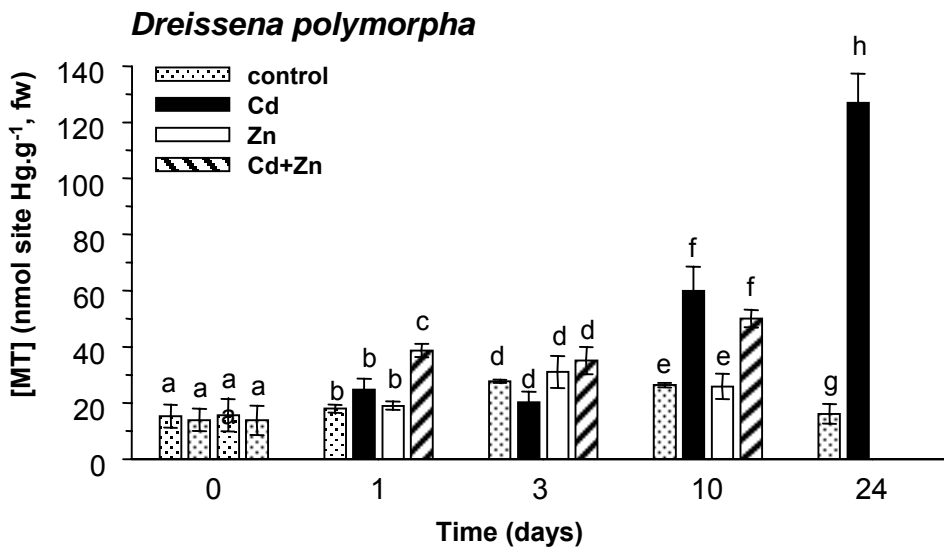


Figure 54: Metallothionein concentrations (nmol site Hg.g⁻¹, fresh weight) in the whole soft body of *Dreissena polymorpha* and *Corbicula fluminea* exposed for 24 days to cadmium and/or zinc (0.133 μ M Cd and 15.3 μ M Zn in the water).

Control: no added metal in the experimental units.

Data are means with standard errors (n=3). Values noted with the same letter indicate no significant difference between metal exposure conditions for each exposure duration (Mann-Whitney U-test, $p > 0.05$).

and Zn+Cd conditions, at around 1050 ± 24 and 660 ± 54 nmol Zn.g⁻¹ respectively (about 3.7-fold and 2.3-fold the control values).

Metallothionein levels

For *D. polymorpha*, the background MT level in the whole soft body at time zero was 15 ± 4 nmol site Hg.g⁻¹, fw (**Figure 54**). Significant increases in MT concentrations were observed after 10 and 24 days of exposure to Cd (Cd/control ratio of 2.3 and 8, respectively) and after 10 days of exposure to Cd+Zn (Cd+Zn/control ratio of 1.9). Unlike Cd, MT levels in zebra mussels showed no significant changes after exposure to Zn alone.

MT quantification in the whole soft bodies of *C. fluminea* were significantly affected by both Cd and Zn after 10 and 24 days of exposure, with accumulation factors of proteins compared to control close to those found in *D. polymorpha* after 10 days of exposure to Cd and Cd+Zn (**Figure 54**). Nevertheless, no marked increase was observed in these two conditions between 10 and 24 days and similar MT levels were measured for the three exposure conditions (Cd, Zn, Cd+Zn), close to 40 nmol site Hg.g⁻¹ (fw) and 1.4 higher than the control level.

MT mRNA quantification in *D. polymorpha*

The lack of increase in MT concentrations in *D. polymorpha* after 10 days exposure to Zn alone, contrasting with the Cd-triggered induction, encouraged us to measure MT gene expression for the three contamination conditions and control. RT-PCR results from gill samples evidenced similarity with MT protein responses at the whole soft body level (**Figure 55**). MT mRNA amounts in gills revealed that gene expression was significantly up-regulated after exposure to Cd and Cd+Zn (induction factor of 20 and 14, respectively). In sharp contrast, no significant change was observed between control and Zn-contaminated zebra mussels.

DISCUSSION

In this experimental study, the zebra mussel, *D. polymorpha*, and the Asiatic clam, *C. fluminea*, were exposed to Cd and/or Zn water concentrations (0.133 μM Cd and 15.3 μM Zn) similar to those found in numerous freshwater systems located downstream from industrial sites (Audry *et al.*, 2004a).

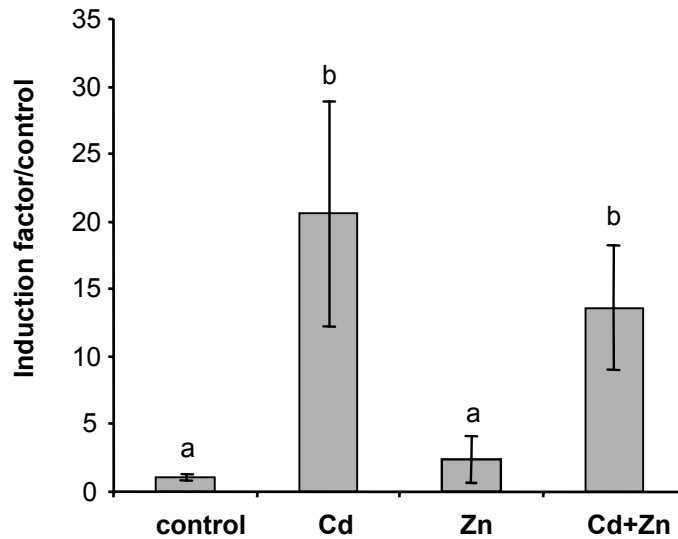


Figure 55. Metallothionein mRNA quantification by RT-PCR in gills of *Dreissena polymorpha* after 10 days of exposure to cadmium and/or zinc (0.133 μ M Cd and 15.3 μ M Zn in the water). mRNA levels are expressed as induction factors compared with control (control=1).

Control: no added metal in the experimental units.

Data are means with standard errors (n=3). Values noted with the same letter indicate no significant difference between metal exposure conditions (Mann-Whitney U-test, $p>0.05$).

Under exposure to Cd alone, the MT responses in the whole soft body differed considerably between the two species that we studied, whereas the metal accumulation levels measured over time were the same. In the zebra mussels, variations in MT concentrations over time remained correlated to the gradual accumulation of the metal and after 24 days of exposure gave values that were 8 times higher than those measured in the controls. In *C. fluminea*, on the other hand, quantities of MT were much less, corresponding to concentrations that were only 1.4 times higher than in the controls over the same time. In *D. polymorpha*, even though the Cd is potentially associated with different intra- and extra-cellular structures (Herwig *et al.*, 1989), the pool of MTs measured constitutes a sequestration potential similar to the amount of Cd bioaccumulated in the whole soft body at each exposure time (e.g. after 24 days: 127 nmol site Hg.g⁻¹ and 134 nmol Cd.g⁻¹, fw). For *C. fluminea*, the number of potential sites represents only 30% of the total quantity of Cd accumulated in the whole soft body after 24 days (40 nmol site Hg.g⁻¹ and 130 nmol Cd.g⁻¹). Other Cd sequestration mechanisms therefore predominated in the clam (e.g. glutathion, proteins, metal granules, membranes ... - Langston *et al.*, 1998). As the soluble cellular fraction could represent between 48 and 62% of the total amount of Cd accumulated in the soft body of this species (Baudrimont *et al.*, 1997a ; Baudrimont *et al.*, 2003), the sequestration potential offered by MTs in this soluble fraction could nevertheless represent 59 to 64%.

The differences between species could be accounted for by the different metal distribution between the soluble and insoluble fractions, as observed between *Macoma balthica* and *Potamocorbula amurensis* (Wallace *et al.*, 2003). Moreover, MT gene transcription regulation could be divergent (signal transduction cascade, transcription factors, cis-active boxes contained in the MT gene promoters - Andrews, 2000).

When *C. fluminea* was contaminated by Zn, MT concentrations increased after 10 days, however, the sequestration capacities of these proteins represented only 3 to 4% of the amount of Zn accumulated in the soft body between 10 and 24 days (30 to 40 nmol Hg.g⁻¹ and 1050 nmol Zn.g⁻¹). In this species, the contribution of MTs in fixing total Zn accumulated at the whole soft body level is therefore limited, as had been observed in other bivalves (*Crassostrea virginica*, *Hyridella depressa* and *Velesunio ambiguus*, *Macoma balthica*) (Roesijadi, 1994b ; Markich *et al.*, 2001 ; Baudrimont *et al.*, 2003 ; Wallace *et al.*, 2003). On the other hand, Zn bioaccumulation did not increase between days 10 and 24, which could be interpreted as the consequence of an equilibrium between metal entering and being eliminated from the soft body. This result is compatible with the induction of efflux mechanisms in relation to the metal

species, such as exocytosis and the contribution from metal pumps belonging to the ABC transporter family (ATP-binding cassette) (Rensing *et al.*, 1997 ; Achard *et al.*, 2004).

In *D. polymorpha*, Zn produced no increase in MT concentration over time. This protein plays therefore only a very small role in the high level of accumulation of this metal. The same result has been observed after copper contamination (Lecoeur *et al.*, 2004). Similar results have been reported after Zn contamination in other aquatic invertebrates, such as *Mytilus edulis*, *Orchestia gammarellus* or *Ruditapes decussatus* (George, 1990 ; George and Langston, 1994 ; Mouneyrac *et al.*, 2002 ; Geret and Bebianno, 2004). In the zebra mussel, it can be explained by the absence of MT gene induction by Zn.

The toxicity caused by Zn, which led to the death of the mussels, may be the result of less efficient overall detoxification mechanisms in respect of this metal compared with *C. fluminea*, particularly in relation to the limited role of the MTs in sequestration as MT expression was not induced.

In the combined exposure condition, Cd/Zn interactions may occur at the different stages of absorption, sequestration and excretion (Brzóska and Moniuszko-Jakoniuk, 2001). The exposure of the bivalves to cadmium and zinc simultaneously produced a very large decrease in Cd bioaccumulation in the soft body of the two species, over 50% after 10 days of exposure, and over 90% after 24 days in *C. fluminea*. In the zebra mussel, Zn bioaccumulation was not affected, whereas in *C. fluminea* it decreased by about 50% at 10 and 24 days, compared with the exposure to Zn alone. In *D. polymorpha*, these results are compatible with there being a competition mechanism in relation to divalent metal transport mechanisms through biological barriers (divalent metal transporter, calcium channels, ... - Vercauteren and Blust, 1999 ; Zalups and Ahmad, 2003) facilitated by a Zn/Cd molar concentration ratio in the water of 115. In *C. fluminea*, competition at entry between Zn and Cd cannot by itself account for the results obtained. The reduction in concentrations of Cd and Zn is compatible with an increased induction in combined contamination condition of active efflux mechanisms for metals with a lower affinity for Cd. In clams, combined and simple exposures produced the same level of MTs, whereas the total amounts of metal ions accumulated differed (672.5 nmol_{metal}.g⁻¹ compared with 130 and 1050 nmol.g⁻¹ for Cd and Zn alone after 24 days). The MT response in *C. fluminea* in the presence of the two metals is therefore not simply a combination of the effects observed under exposure to a single metal. Similarly, in *D. polymorpha*, this response which is attributable to the influence of Cd, does not decrease proportionately with the accumulation of the metal after 10 days. This could be the result of metal interactions on intracellular bioaccumulation. Zn toxicity in the zebra mussels, despite the increased MT

biosynthesis in the combined exposure, could be linked with the stronger affinity of Cd for fixing on these proteins (Vasák, 1991).

A comparative analysis of the MT gene expression rates measured by RT-PCR in the gill tissue of *D. polymorpha*, after 10 days of exposure, revealed responses comparable with those obtained from MT dosage in the whole soft body. The gills are therefore an appropriate tissue to study in order to analyse the expression of this gene. Cd triggered a MT gene expression rate that was 20 times greater than the level in the control. Zn, on the other hand, did not induce gene expression. These results differ from those obtained in mammals, where Zn concentration of about 100 μM , on cell culture, is a powerful MT gene inducer (Murphy *et al.*, 1999). The transcriptional induction of MT genes in mammals and *Drosophila melanogaster* is based on the binding of a transcription factor (MTF-1) to metal regulatory elements (MRE) in their promoters (Egli *et al.*, 2003). According to our results, it could be possible that the transcriptional activation of MT gene in *D. polymorpha* may be regulated by the same pathway, but that Zn concentration used in our experiment (15 μM) was not sufficient to induce this activation.

Acknowledgements

We would like to thank Henry Bouillard and Bruno Etecheverria for their helpful assistance during bivalve collection. This study was carried out with financial support from the GIS ECOBAG research programme (Adour-Garonne Water Agency, Aquitaine Region, French Ministry of Ecology and Sustainable Development, National Scientific Research Center). Véronique Marie was supported by a grant from the Aquitaine Region.

REFERENCES

- Achard M, Baudrimont M, Boudou A, Bourdineaud JP. 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquat. Toxicol.* 67, 347-357.
- Andrews GK. 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem. Pharmacol.* 59, 95-104.
- Audry S, Schafer J, Blanc G, Bossy C, Lavaux G. 2004a. Anthropogenic components of heavy metal (Cd, Zn, Cu, Pb) budgets in the Lot-Garonne fluvial system (France). *Appl. Geochem.* 19, 769-786.
- Baudrimont M, Andres S, Durrieu G, Boudou A. 2003. The key role of metallothioneins in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase, after in situ exposure to Cd and Zn. *Aquat.*

- Toxicol. 63, 89-102.
- Baudrimont M, Andres S, Metivaud J, Lapaquellerie Y, Ribeyre F, Maillet N, Latouche C, Boudou A. 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France): II. Metallothionein response to metal exposure. Environ. Toxicol. Chem. 18, 2472-2477.
- Baudrimont M, Lemaire-Gony S, Ribeyre F, Metivaud J, Boudou A. 1997a. Seasonal variations of metallothionein concentrations in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*). Comp. Biochem. Physiol. C 118, 361-367.
- Baudrimont M, Metivaud J, Maury-Brachet R, Ribeyre F, Boudou A. 1997b. Bioaccumulation and metallothionein response in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. Environ. Toxicol. Chem. 16, 2096-2105.
- Boening DW. 1999. An evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metals pollution in marine waters. Environ. Monit. Assess. 55, 459-470.
- Brzóska MM, Moniuszko-Jakoniuk J. 2001. Interactions between cadmium and zinc in the organism. Food Chem. Toxicol. 39, 967-980.
- Davis SR, Cousins RJ. 2000. Metallothionein expression in animals: A physiological perspective on function. J Nutr 2000 130, 1085-1088.
- de Lafontaine Y, Gagne F, Blaise C, Costan G, Gagnon P, Chan HM. 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). Aquat. Toxicol. 50, 51-71.
- Doherty FG, Failla ML, Cherry DS. 1988. Metallothionein-like heavy metal binding protein levels in asiatic clams are dependent on the duration and mode of exposure to cadmium. Water Res. 22, 927-932.
- Dutton MD, Stephenson M, Klaverkamp JF. 1993. A mercury saturation assay for measuring metallothionein in fish. Environ. Toxicol. Chem. 12, 1193-1202.
- Egli D, Selvaraj A, Yepiskoposyan H, Zhang B, Hafen E, Georgiev O, Schaffner W. 2003. Knockout of 'metal-responsive transcription factor' MTF-1 in *Drosophila* by homologous recombination reveals its central role in heavy metal homeostasis. EMBO J. 22, 100-108.
- Engelken J, Hildebrandt A. 1999. cDNA cloning and cadmium-induced expression of metallothionein mRNA in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. Biochem. Cell Biol. 77, 237-241.
- Gagne F, Blaise C, Aoyama I, Luo R, Gagnon C, Couillard Y, Campbell P, Salazar M. 2002. Biomarker study of a municipal effluent dispersion plume in two species of freshwater mussels. Environ. Toxicol. 17, 149-159.
- George SG. 1990. Biochemical and cytological assessments of metal toxicity in marine animals. In: Furness RW, Rainbow PS, eds. Heavy metal in the marine environment, vol. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 123-142
- George SG, Langston WJ. 1994. Metallothionein as an indicator of water quality: assessment of the bioavailability of cadmium, copper, mercury and zinc in aquatic animals at the cellular level. In:

- Sutcliffe DW, ed. Water quality and stress indicators in marine and freshwater ecosystems: linking levels of organisation (individuals, populations, communities), vol. The Freshwater Biological Association, Ambleside, 138-153
- Geret F, Bebianno MJ. 2004. Does zinc produce reactive oxygen species in *Ruditapes decussatus*? *Ecotox. Environ. Safe.* 57, 399-409.
- Gundacker C. 1999. Tissue-specific heavy metal (Cd, Pb, Cu, Zn) deposition in a natural population of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* Pallas. *Chemosphere* 38, 3339-3356.
- Haq F, Mahoney M, Koropatnick J. 2003. Signaling events for metallothionein induction. *Mutat. Res.* 533, 211-226.
- Herwig HJ, Brands F, Kruitwagen E, Zandee DI. 1989. Bioaccumulation and histochemical localization of cadmium in *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium chloride. *Aquat. Toxicol.* 15, 269-285.
- High KA, Barthet VJ, McLaren JW, Blais J-S. 1997. Characterization of metallothionein-like proteins from zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1111-1118.
- Langston WJ, Bebianno MJ, Burt JR. 1998. Metal handling strategies in molluscs. In: Langston WJ, Bebianno M.J, eds. *Metal Metabolism in Aquatic Environments*, Chapman and Hall, London, 219–283
- Lecoeur S, Videmann B, Berny P. 2004. Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*. *Environ. Res.* 94, 184-191.
- Lowe TP, Day DD. 2002. Metal concentrations in zebra mussels and sediments from embayments and riverine environments of eastern Lake Erie, southern Lake Ontario, and the Niagara River. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 301-308.
- Markich SJ, Brown PL, Jeffree RA. 2001. Divalent metal accumulation in freshwater bivalves: an inverse relationship with metal phosphate solubility. *Sci. Total Environ.* 275, 27-41.
- Mouneyrac C, Amiard JC, Amiard-Triquet C, Cottier A, Rainbow PS, Smith BD. 2002. Partitioning of accumulated trace metals in the talitrid amphipod crustacean *Orchestia gammarellus*: a cautionary tale on the use of metallothionein-like proteins as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 57, 225-242.
- Murphy BJ, Andrews GK, Bittel D, Discher DJ, McCue J, Green CJ, Yanovsky M, Giaccia A, Sutherland RM, Laderoute KR, Webster KA. 1999. Activation of metallothionein gene expression by hypoxia involves metal response elements and metal transcription factor-1. *Cancer Res* 59, 1315-1322.
- Rensing C, Mitra B, Rosen BP. 1997. The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 14326-14331.
- Roesijadi G. 1994a. Metallothionein induction as a measure of response to metal exposure in aquatic animals. *Environ. Health. Perspect.* 102, 91-95.
- Roesijadi G. 1994b. Behavior of metallothionein-bound metals in a natural population of an estuarine mollusc. *Mar. Environ. Res.* 38, 147-168.

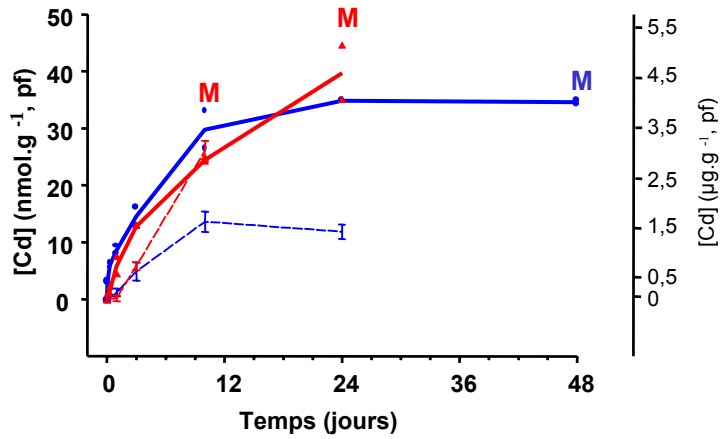
- Vasák M. 1991. Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins. *Methods Enzymol.* 205, 452–458.
- Vercauteren K, Blust R. 1999. Uptake of cadmium and zinc by the mussel *Mytilus edulis* and inhibition by calcium channel and metabolic blockers. *Mar. Biol.* 135, 615-626.
- Wallace WG, Lee B-G, Luoma SN. 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 249, 183-197.
- Zalups RK, Ahmad S. 2003. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol. Appl. Pharm.* 186, 163-188.

CONCLUSION DE L'ETUDE MENE EN CONDITIONS CONTROLEES DE LABORATOIRE

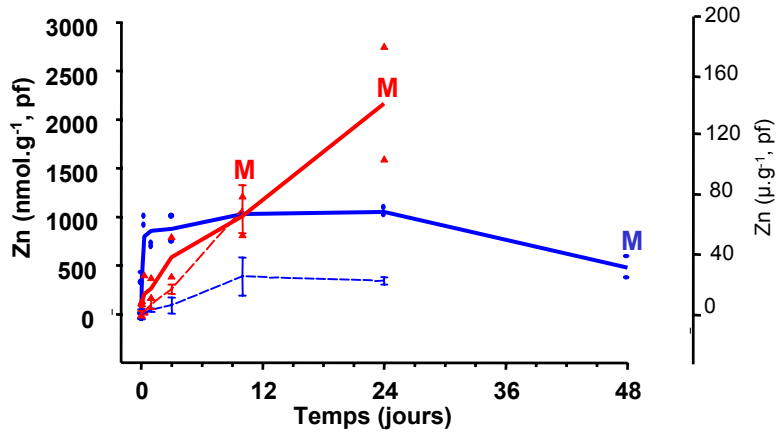
A partir de cette étude menée en conditions contrôlées de laboratoire, la caractérisation de la réponse des MTs à l'égard de la bioaccumulation du Cd et/ou du Zn a révélé des différences majeures entre *C. fluminea* et *D. polymorpha*.

A l'égard du Cd, les deux espèces montrent des capacités de réponse *via* les MTs mais le potentiel de séquestration offert par ces protéines chez *D. polymorpha* s'avère plus important que chez *C. fluminea*. A l'opposé, le Zn seul n'induit un accroissement de la production des MTs que chez *C. fluminea*, en relation avec l'absence d'induction du ou des gène(s) *mt* chez la moule zébrée. Le rôle des MTs demeure néanmoins faible à l'égard des quantités totales accumulées chez *C. fluminea*, qui paraît notamment développer des mécanismes de régulation du métal essentiel (mécanismes d'efflux). Ces différences entre les espèces, en relation avec l'induction des MTs et les mécanismes de détoxification en présence du Zn, pourraient être à l'origine des effets délétères survenus uniquement chez *D. polymorpha* et conduisant à la mort des individus. L'exposition combinée aux deux métaux suggère des phénomènes de compétitions pour la traversée des membranes biologiques chez les deux bivalves et une induction accrue des mécanismes d'efflux des métaux chez *C. fluminea*. Par contre, la présence combinée du Cd et du Zn pour les niveaux d'exposition testés n'a pas montré d'influence sur la réponse des MTs chez les deux espèces, et notamment, aucun effet additif n'est observé chez *C. fluminea*.

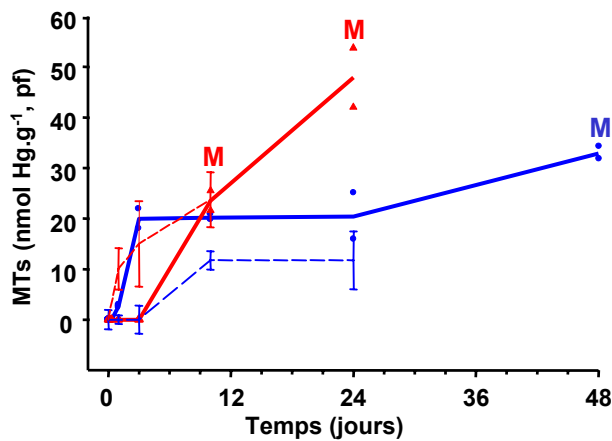
A - Bioaccumulation du Cd dans le corps mou (témoins déduits)



B - Bioaccumulation du Zn dans le corps mou (témoins déduits)



C - Réponse MT dans le corps mou (témoins déduits)



Bleu - <i>Corbicula fluminea</i>	Rouge - <i>Dreissena polymorpha</i>
— résultats de transplantation à la station de Riou-Mort (terrain)	- - - résultats de l'exposition au Cd+Zn (laboratoire)

Figure 56 : Synthèse schématique et comparative des résultats de bioaccumulation et de réponse associée des métallothionéines chez *Corbicula fluminea* et *Dreissena polymorpha* obtenus lors de la transplantation à la station du Riou-Mort et lors de l'exposition combinée au Cd+Zn en laboratoire.

Aux concentrations de cadmium, de zinc et de métallothionéines ont été retranchées les valeurs observées pour les témoins (valeurs de Boisse-Penchat sur le terrain et valeurs du Contrôle en laboratoire). Pour les graphes de bioaccumulation, l'axe gauche indique les concentrations en nmol.g⁻¹, poids frais et l'axe droit en µg.g⁻¹, poids frais.

M indique le dernier temps avant la mort des individus.

3-3. SYNTHÈSE DES ÉTUDES MENEES EN EAU DOUCE SUR *Corbicula fluminea* ET *Dreissena polymorpha*

Les objectifs de cette première phase de notre programme de recherche étaient d'analyser comparativement la réponse des MTs chez *Dreissena polymorpha* et *Corbicula fluminea* après exposition au Cd et au Zn. L'approche que nous avons menée *in situ* a permis d'évaluer le potentiel de réponse des MTs dans le gradient de pollution polymétallique de la zone amont du *continuum* fluvio-estuarien "Lot / Garonne / Gironde". L'approche expérimentale, réalisée en conditions contrôlées de laboratoire, a permis de caractériser cette réponse spécifiquement pour chacun des deux métaux (expositions isolées) et de préciser l'influence des interactions métalliques (exposition en mélange).

Rappelons que les niveaux d'exposition au Cd et au Zn que nous avons appliqués en laboratoire correspondent aux concentrations mesurées dans la fraction dissoute de la colonne d'eau au niveau de la station de terrain sur le Riou-Mort ($15 \mu\text{g Cd.l}^{-1}$ et 1 mg Zn.l^{-1}). Afin de tester la cohérence des résultats obtenus entre les deux conditions "terrain / laboratoire", reposant sur la présence simultanée des deux métaux dans l'eau, nous avons choisi de présenter sur les mêmes graphiques une synthèse schématique des données provenant de ces deux études, les bruits de fond ayant été déduits (**Figure 56**). Rappelons que les conditions d'exposition étudiées ont conduit à la mortalité des bivalves pour certaines d'entre elles (M sur les graphes) : *C. fluminea* uniquement sur le terrain après 48 jours à la station la plus contaminée (Riou-Mort, RM) ; *D. polymorpha* sur le terrain (RM) après 24 jours et en laboratoire après 10 jours (Cd+Zn mais également Zn seul).

L'analyse de ces graphiques révèle des tendances d'accumulation des métaux et de réponse conjointe des MTs relativement comparables entre les deux conditions d'exposition, avec par contre des écarts importants entre les niveaux de réponse en fonction des temps d'exposition. Les concentrations mesurées en Cd et le Zn chez *C. fluminea* montrent des profils d'accumulation en plateau, la diminution des concentrations de Zn n'étant observée que sur le terrain, après 24 jours de transplantation. Chez *D. polymorpha*, les tendances d'accumulation sont proches de la linéarité pour les deux métaux, aussi bien sur le terrain qu'en laboratoire.

Réponse des métallothionéines

Exposition	<i>C.fluminea</i>	<i>D. polymorpha</i>
Cd	+	+
Zn	+	-
Cd+Zn	+	+

Tableau 13 : Réponse des métallothionéines chez *Corbicula fluminea* et *Dreissena polymorpha* pour l'étude menée en conditions contrôlées de laboratoire après 10 jours d'exposition au cadmium et/ou zinc.

+ indique un accroissement significatif des concentrations de MTs pour l'exposition considérée
- indique une absence d'accroissement significatif des concentrations de MTs pour l'exposition considérée

Parmi les différents processus pouvant expliquer ces différences entre les deux espèces, nous avons proposé l'existence de mécanismes d'efflux des métaux qui seraient plus efficaces chez *C. fluminea*. Il est important de souligner que ces mécanismes actifs d'élimination des métaux seraient plus efficaces lorsque le cadmium et le zinc sont présents simultanément. L'analyse des expositions au Cd et au Zn considérés isolément et en mélange en laboratoire, a permis de révéler des processus de compétition entre les deux métaux, conduisant à une réduction très marquée de l'accumulation du Cd pour les deux espèces lors de l'exposition au mélange "Cd+Zn" ; pour le zinc, cette réduction est uniquement observée pour *C. fluminea*.

Les concentrations de MTs mesurées chez *C. fluminea* après transplantation sur le terrain évoluent en deux temps, avec des valeurs qui croissent très rapidement au cours des premiers jours, avec ensuite une tendance en plateau suivie d'une légère augmentation au-delà de 24 jours. La réponse de ce bivalve en conditions expérimentales apparaît beaucoup moins rapide, cette différence pouvant être mise en relation avec les écarts de bioaccumulation du Cd et du Zn, nettement plus faibles en laboratoire. Chez *D. polymorpha*, les concentrations de MTs pour les deux études augmentent quasi-linéairement au cours du temps, en accord avec l'accroissement des niveaux de bioaccumulation du Cd et du Zn, qui sont comparables sur le terrain et en laboratoire.

Pourquoi une telle différence de bioaccumulation chez *C. fluminea* entre le terrain et le laboratoire ? Les causes doivent être recherchées au niveau des conditions d'exposition du bivalve. En effet, sur le terrain, les organismes sont en contact direct avec le sédiment contaminé du Riou-Mort : ainsi, des transferts métalliques peuvent avoir lieu à partir de ce compartiment, *via* l'eau interstitielle et/ou l'ingestion de particules sédimentaires, *C. fluminea* ayant des capacités de "pedal-feeding" (prélèvement de particules alimentaires issues du sédiment à partir de la ciliature du pied - Reid *et al.*, 1992). De plus, les activités de ventilation/filtration peuvent conduire à l'ingestion de matières particulaires transportées par le cours d'eau (algues périphytiques, débris organiques) riches en métaux, ces différents apports trophiques se superposant à la voie directe d'exposition, à partir des métaux présents dans la fraction dissoute de la colonne d'eau. Rappelons que nos conditions expérimentales en laboratoire avaient été conçues pour minimiser la voie trophique (apports d'algues en faibles quantités et 2 fois par semaine).

Nous avons synthétisé dans le **Tableau 13** les résultats concernant la réponse "MTs" à l'égard des expositions métalliques, isolément ou en mélange (Cd+Zn), des deux espèces de bivalves après 10 jours en conditions contrôlées de laboratoire. Ainsi, chez *C. fluminea*, la biosynthèse des MTs est significativement accrue après contamination par le Cd et le Zn introduits isolément et en mélange dans l'eau (signe + sur le tableau), mais l'accroissement des

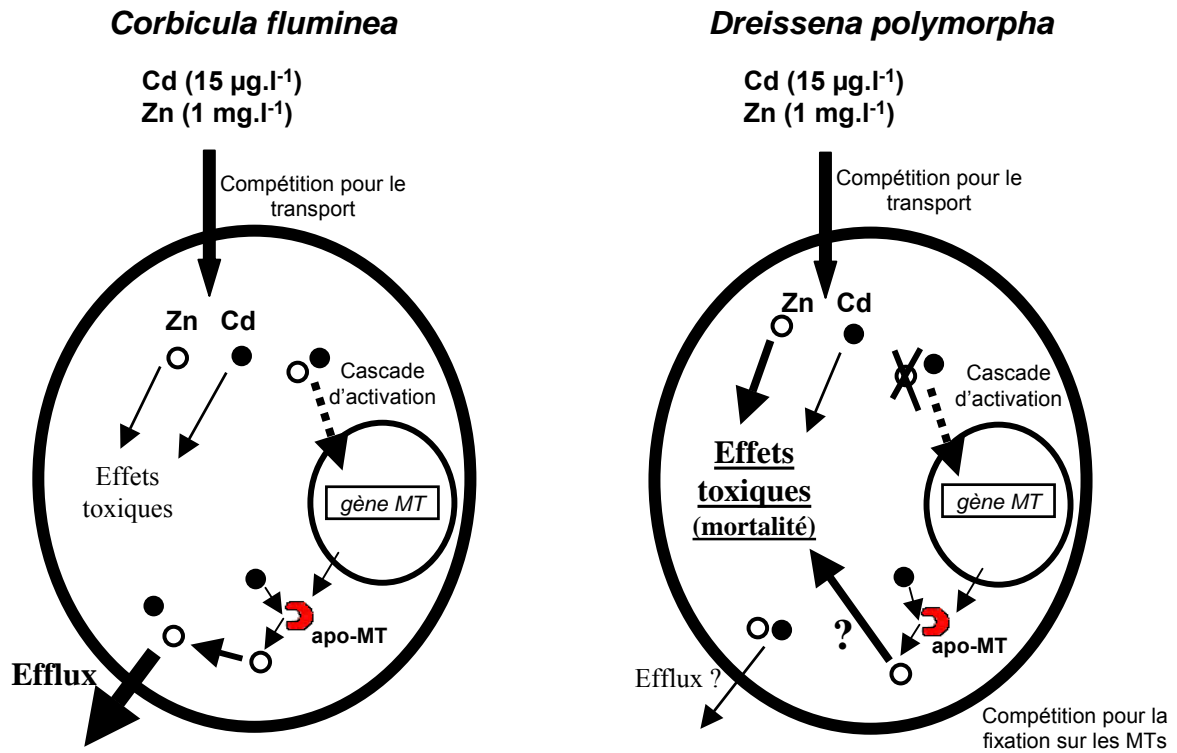


Figure 57 : Mécanismes cellulaires proposés pour interpréter la toxicité aiguë (mortalité) du zinc sur *D. polymorpha* lors de l'exposition combinée en laboratoire aux deux métaux (cadmium et zinc). Comparaison avec *C. fluminea*.

concentrations de MTs pour la condition "Cd+Zn" ne correspond pas à l'addition des effets observés lors des expositions isolées ; le facteur d'accroissement par rapport aux témoins est comparable pour les trois conditions d'exposition étudiées. Chez *D. polymorpha*, le Zn seul ne génère pas d'augmentation significative de la biosynthèse des MTs. Ce résultat est particulièrement important au regard des réactions de "défense" de cette espèce face à la contamination par ce métal. Ce résultat a été confirmé par une analyse quantitative des niveaux d'expression du gène *mt*. Dans ces conditions, la réponse générée par la présence simultanée des deux métaux résulterait du seul effet du Cd.

Nos résultats ont clairement mis en évidence un effet toxique du Zn chez *D. polymorpha*, pour les conditions d'exposition au "Zn seul" et au mélange "Cd+Zn", conduisant à la mort des individus après 10 jours en laboratoire et 24 jours sur le terrain, à la station Riou-Mort. Cet effet toxique peut être relié aux fortes accumulations de ce métal dans le corps mou de la moule zébrée, avec en parallèle et à la différence de *C. fluminea*, une absence d'induction de la biosynthèse des MTs après contamination par le Zn seul. Après exposition combinée avec le Cd, la compétition entre les deux métaux pour leur fixation sur les MTs, en faveur du Cd compte-tenu de son affinité supérieure pour les sites thiols au niveau des "clusters" des MTs, augmenterait la toxicité engendrée par le Zn. Chez *C. fluminea*, l'accroissement des concentrations des MTs à l'échelle du corps mou entier en réponse à la bioaccumulation du Zn ou du Cd engendre une réponse adaptative plus efficace que chez *D. polymorpha*, pouvant expliquer l'absence de mortalité en conditions expérimentales ou la mortalité plus tardive sur le terrain (au-delà de 48 jours à la station Riou-Mort). Nous avons schématisé ces différents mécanismes à l'échelle cellulaire (**Figure 57**) qui peuvent expliquer les différences de toxicité aiguë entre les deux métaux et les deux espèces.

En conclusion, les résultats que nous avons obtenus au cours de cette première phase d'étude sur les hydrosystèmes continentaux ont révélé le bien-fondé de l'analyse conjointe des approches menées sur le terrain et en laboratoire, pour caractériser comparativement la réponse des MTs chez *D. polymorpha* et *C. fluminea*. Ils ont montré des différences très importantes entre les deux espèces et les deux métaux, notamment en termes de capacité de réaction par la biosynthèse des MTs et donc de tolérance aux métaux.

CHAPITRE 4

**REPONSE DES METALLOTHIONEINES CHEZ UN
BIVALVE MARIN,
L'HUITRE CREUSE *CRASSOSTREA GIGAS*.
ETUDES *IN SITU* ET EN LABORATOIRE**

Dans la continuité de nos recherches sur la réponse des MTs chez les bivalves, nous nous sommes intéressés à une espèce estuarienne, l'huître creuse *Crassostrea gigas*, qui nous a permis d'analyser les impacts de la contamination polymétallique au niveau de la zone aval du *continuum* "Lot / Garonne / Gironde". Cette espèce d'huître est connue pour accumuler fortement les métaux et le site, quant à lui, se caractérise par un accroissement marqué de la biodisponibilité de ces éléments en relation avec les modifications de spéciation chimique engendrées dans les eaux saumâtres estuariennes (voir le paragraphe 1-2.1. " Biodisponibilité et transfert des métaux vers les animaux aquatiques", page 16).

Nos recherches ont été conduites en deux étapes :

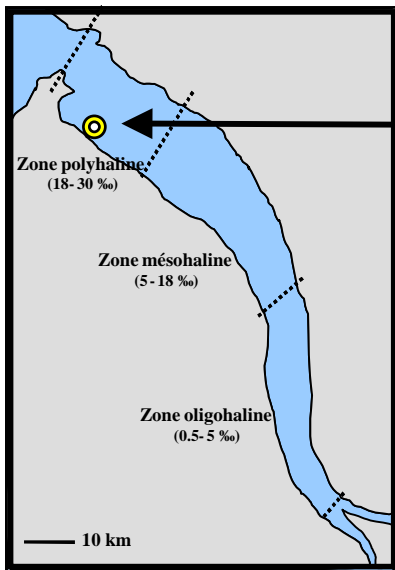
- dans un premier temps, au vu de la complexité des facteurs mis en jeu dans l'estuaire de la Gironde, aussi bien physico-chimiques que de contamination, il nous a paru nécessaire de caractériser *in situ* les potentialités de bioaccumulation du Cd, du Zn et du Cu par *C. gigas*. Rappelons que la pollution par le cuivre de l'estuaire est en relation avec les apports de résidus de fongicides à base de ce métal (bouillie bordelaise), utilisés pour le traitement de la vigne dans les zones en aval des rivières Garonne et Dordogne et sur les rives de l'estuaire (Schäfer et Blanc, 2002). Des expériences de transplantation d'individus adultes et juvéniles ont été réalisées directement dans l'estuaire, parallèlement à des transplantations dans le Bassin d'Arcachon, utilisé comme site de référence pour les adultes, et dans un bassin aquacole du Nord Médoc (ferme "Bleu Médoc") alimenté périodiquement par les eaux de l'estuaire, pour les juvéniles. Nos objectifs visaient à : (i) caractériser les niveaux d'accumulation de chaque métal par des huîtres adultes, en comparaison avec le site de référence du Bassin d'Arcachon ; (ii) évaluer l'influence de l'âge des huîtres, de la reproduction et des saisons sur les accumulations métalliques au niveau d'un même site ; (iii) valider la technique de transplantation à long terme dans les marais adjacents à l'estuaire pour des études ultérieures, l'échantillonnage étant beaucoup plus aisé sur ce site¹.

- dans un deuxième temps, des études approfondies ont été menées sur le terrain et en conditions contrôlées de laboratoire, afin de caractériser la réponse des MTs à

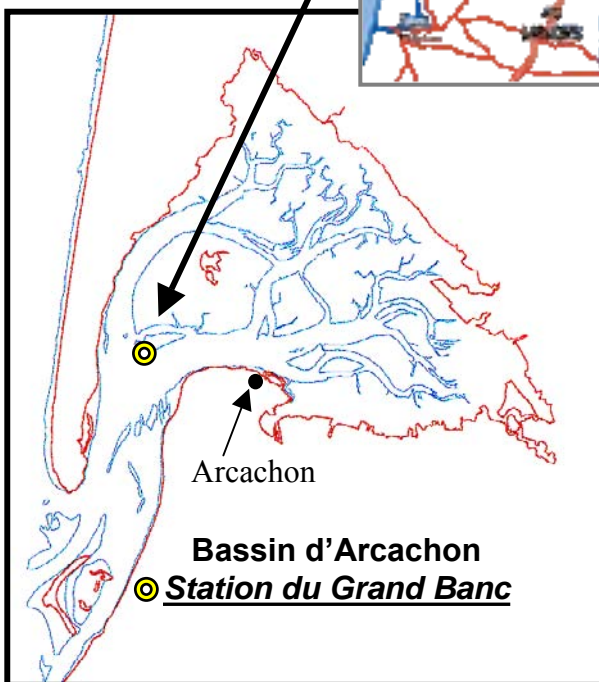
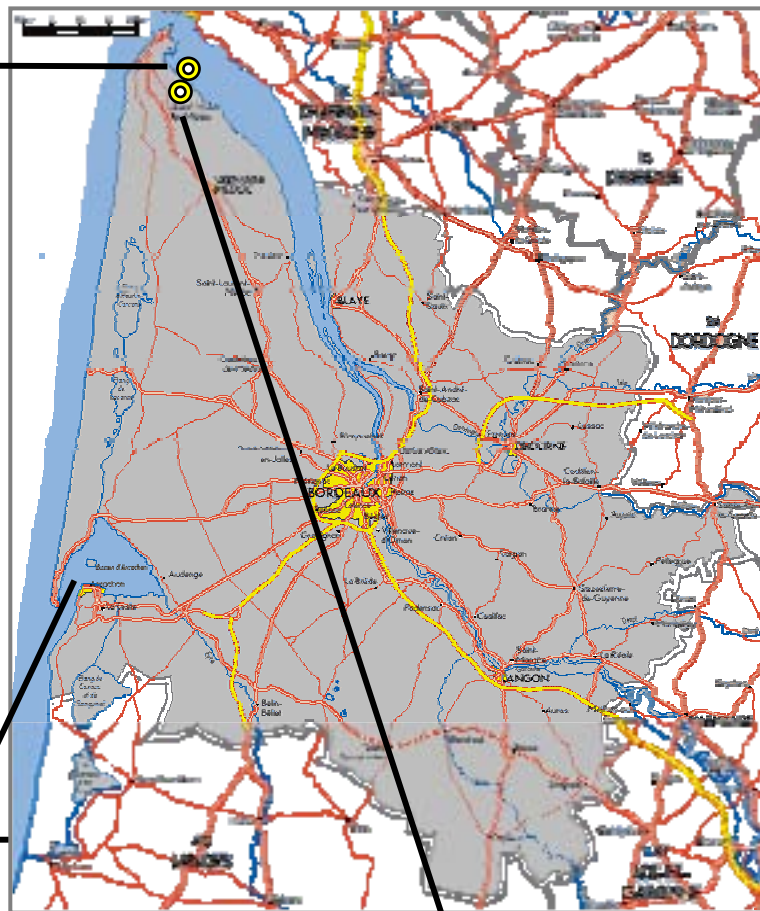
¹ Ces études ont été réalisées dans le cadre des programmes : Programme LITEAU, (2002) et Programme GIS-ECOBAG, (2002a et b).

l'égard de la bioaccumulation du Cd et du Zn chez *C. gigas*. En parallèle, face au développement important de la commercialisation des huîtres triploïdes (3n) en France, nous avons étudié, comparativement aux individus diploïdes (2n), l'influence de la présence d'un troisième jeu de chromosomes sur les potentialités de la réponse "MTs" chez *C. gigas* et conjointement sur les capacités de bioaccumulation des métaux.

En étroite relation avec ces études menées sur le terrain, nous avons mis en place une approche expérimentale visant à approfondir l'analyse de la réponse des MTs après contamination par le Cd et le Zn chez les deux statuts de ploïdie de *C. gigas* (2n et 3n). Cette approche a été réalisée sur des individus juvéniles diploïdes et triploïdes, le caractère juvénile permettant de s'affranchir totalement du cycle de reproduction. Conjointement à l'analyse protéique, le séquençage de deux gènes d'isoformes et un ADNc de MTs chez *C. gigas* (*CgMT1*, *CgMT2* et *CgMT3* - Tanguy et Moraga, 2001 ; Tanguy *et al.*, 2001) nous a permis d'approfondir la comparaison entre les deux populations d'huîtres par une analyse quantitative de l'expression différentielle de ces gènes.



Estuaire de la Gironde
station de La Fosse



Marais en bordure de l'Estuaire
Bassins de la ferme aquacole Bleu Médoc

Figure 58 : Localisation des sites de transplantation des huîtres (*C. gigas*) au niveau de l'estuaire de la Gironde et dans le Bassin d'Arcachon.

4-1. CARACTERISATION DE LA CONTAMINATION DES HUITRES AU NIVEAU DE L'ESTUAIRE DE LA GIRONDE

4-1.1. INTRODUCTION

Peu de données sont actuellement disponibles sur les cinétiques de bioaccumulation et d'élimination des métaux à partir d'huîtres transplantées dans l'estuaire de la Gironde, en fonction de la saison et de l'âge des organismes (Geffard *et al.*, 2001 ; Geffard *et al.*, 2002). Seuls les niveaux de contamination métalliques dans les huîtres indigènes de l'estuaire sont bien connus, dans le cadre du suivi mis en place par le Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin (RNO), depuis 1974. Rappelons que ces analyses montrent des concentrations de Cd très élevées dans les coquillages situés à l'embouchure. Les valeurs mesurées dépassent occasionnellement d'un facteur 10 la norme européenne actuellement fixée à 5 mg Cd.kg⁻¹ de matière sèche, pour la consommation humaine (directive européenne CE N°466/2001). Par ailleurs, si l'estuaire de la Gironde est fortement associé à la pollution par le Cd, depuis la mise en évidence de fortes concentrations du métal dans les huîtres à la fin des années 70 (Boutier, 1981), plusieurs métaux, comme le Zn et le Cu, sont également présents à des niveaux élevés en comparaison avec d'autres sites sur les côtes françaises (voir le **Tableau 2**, page 13).

Face au caractère polymétallique de la pollution de cet estuaire et aux variations permanentes des paramètres physico-chimiques des eaux, des études de transplantation *in situ* ont été réalisées afin de suivre les cinétiques de croissance et d'accumulation des métaux par l'huître creuse *Crassostrea gigas* :

(i) lors d'une première campagne, des huîtres adultes ont été transplantées dans l'estuaire de la Gironde, au niveau du site de la Fosse et parallèlement dans le Bassin d'Arcachon, sur le Grand Banc, utilisé comme site de référence (**Figure 58** – Programme Liteau *et al.*, 2002).

(ii) la deuxième campagne a été menée à partir d'huîtres juvéniles (naissain) transplantées simultanément dans l'estuaire et dans un bassin aquacole de la ferme "Bleu Médoc" (**Figure 58** – Programme GIS-ECOBAG, 2002a et b).

Mentionnons que les résultats sur les huîtres juvéniles transplantées au niveau de la ferme Bleu Médoc ont par ailleurs permis la comparaison de la bioaccumulation des métaux entre trois espèces de bivalves (*Crassostrea gigas*, *Cerastoderma edule* et *Ruditapes philipinarum*) étudiées simultanément dans ce système et sur deux autres fermes aquacoles du secteur, en relation avec les conditions physico-chimiques et de contamination du milieu. Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe "Traceurs Géochimiques et Minéralogiques" du Département de Géologie et d'Océanographie de l'Université Bordeaux 1 (UMR CNRS 5805). Elle a donné lieu à la production d'un rapport scientifique (Université Bordeaux 1/CNRS UMR EPOC 5805, 2002) et à la rédaction d'un article présenté en **Annexe 4** : "*Geochemical survey and metal bioaccumulation kinetics of three bivalve species (Crassostrea gigas, Cerastoderma edule and Ruditapes philipinarum) in North Médoc salt marshes (Gironde Estuary, France)*", - Baudrimont M., Schäfer J., Marie V., Maury-Brachet R., Bossy C., Boudou A., Blanc G. (2005), *The Science of the Total Environment*, 337, 265-280.

4-1.2. BASES METHODOLOGIQUES

A- Première campagne de transplantation - Etude de la bioaccumulation des métaux dans des huîtres adultes dans l'estuaire de la Gironde et dans le Bassin d'Arcachon (Programme Liteau, 2002)

a. Les sites d'étude

▪ ***La Fosse, un site pollué par les métaux lourds au niveau de l'estuaire***

La Fosse est un lieu-dit localisé sur la rive gauche de l'estuaire de la Gironde, 25 km en amont de l'embouchure (**Figure 58**). Le site a été caractérisé d'un point de vue biogéochimique et contamination métallique au cours de nombreuses études (Elbaz-Poulichet *et al.*, 1982 ; Boutier *et al.*, 1989 ; Jouanneau *et al.*, 1990 ; Irigoien et Castel, 1997 ; Kraepiel *et al.*, 1997 ; Jouanneau *et al.*, 1998 ; Goosen *et al.*, 1999 ; Boutier *et al.*, 2000 ; Michel *et al.*, 2000 ; Lemaire *et al.*, 2002 ; Schäfer *et al.*, 2002 ; Audry *et al.*, 2004a ; Robert *et al.*, 2004 ; UMR-



Figure 59 : Poches servant à la transplantation des huîtres adultes, fixées sur les tables au niveau du Bassin d’Arcachon.

CNRS-5805, 2004). Il correspond aux plus fortes concentrations métalliques mesurées par le RNO dans les tissus mous des huîtres sauvages, témoignant d'une importante biodisponibilité de ces éléments pour les mollusques filtreurs.

▪ ***Le Grand Banc dans le Bassin d'Arcachon, un site de référence***

Le Grand Banc, localisé en aval du chenal d'entrée dans le Bassin d'Arcachon (**Figure 58**), est un banc de sable découvrant à marée basse et recouvert de tables ostréicoles, attestant de l'activité intense de la culture des huîtres par les professionnels de la région. La surveillance de ce point, comme de nombreux autres dans le Bassin d'Arcachon, est assurée par l'IFREMER. Il constitue une station d'étude pour le Réseau de contrôle Microbiologique (REMI - IFREMER), dont l'objectif est le classement et le suivi des zones de productions conchyliques.

b. La méthode de transplantation et d'échantillonnage des huîtres adultes

Des huîtres adultes (âgées de 18 mois) en provenance du Bassin d'Arcachon ont été réparties dans 40 poches en plastique perforées (50 individus/poche de maille 2 cm ; standards professionnels). Le contrôle de l'homogénéité des lots a été accompli selon des critères morphométriques de la coquille (longueur moyenne de 51 à 52,5 mm). Vingt poches scellées et identifiées ont été implantées, fixées horizontalement sur des tables, sur le site de La Fosse, les vingt autres ayant été installées sur le Grand Banc (**Figure 59**). Durant un an, entre octobre 2000 et octobre 2001, 9 points d'échantillonnage (approximativement tous les 40 jours) ont été effectués. Deux poches ont été prélevées par site à chaque temps. Les échantillons ont été congelés à -80°C, les huîtres en provenance de l'estuaire étant ramenées au laboratoire dans des glacières remplies de carboglace (-70°C). Pour chaque temps de prélèvement, trois organes ou ensembles tissulaires ont été analysés : les branchies, la glande digestive (incluant l'estomac) et le reste des tissus contenant notamment la gonade, le manteau, les muscles, le cœur, les reins et les palpes labiaux. Ces tissus ont été obtenus à partir de trois individus pour chaque site, choisis aléatoirement entre les 2 poches échantillonnées (3 réplicats par compartiment tissulaire). Chaque échantillon tissulaire ainsi obtenu a été homogénéisé. Un premier aliquote a servi à la détermination du rapport individuel poids frais / poids sec ; le second a été analysé par spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) pour quantifier la bioaccumulation des métaux (Cd, Cu et Zn - voir le paragraphe 2-5. "Technique d'analyse des métaux", page 69).

B- Deuxième campagne de transplantation - Etude comparative de la bioaccumulation des métaux dans des huîtres juvéniles dans l'estuaire de la Gironde et dans les marais adjacents du Nord Médoc (Programme GIS-ECOBAG, 2002a et b)

a. Les bassins du Nord-Médoc

L'étude a été menée dans un des bassins de la ferme aquacole "Bleu Médoc" à St Vivien de Médoc. Cette ferme comprend dans sa totalité 11 bassins, correspondant chacun à une surface de 2,3 ha et une profondeur d'environ 0,8 m. Ces bassins, assimilés à des marais mis en eau, ont été dragués dans les années 60 et présentent ainsi des substrats sédimentaires relativement anciens. La principale activité de la ferme est la production de gambas *Penaeus japonicus*. Les bassins sont directement alimentés par les eaux de l'estuaire de la Gironde via un petit canal contrôlé par une porte sporadiquement ouverte lors des forts coefficients de marée, tout au long de la période de transplantation, de manière à renouveler l'eau des bassins (environ 50% du volume est renouvelé à chaque remplissage). Cette étude a été conduite dans un bassin sans gambas, afin de limiter les perturbations occasionnées par ce facteur biologique (perturbations associées aux activités d'élevage, remise en suspension, ...).

Les évolutions des paramètres physico-chimiques et des niveaux de contamination en métaux dans le bassin d'expérimentation ont été suivies par l'équipe "Traceurs Géochimiques et Minéralogiques" du DGO (UMR CNRS 5805). Périodiquement, des mesures *in situ* de la température de l'eau, de la salinité, du pH, de la concentration en oxygène dissous, et des concentrations de métaux dans la fraction dissoute, les matières en suspension et les sédiments, ont été réalisées. Les détails concernant les procédures d'échantillonnage et d'analyse sont précisés dans l'article joint en annexe (**Annexe 4** - Baudrimont *et al.*, 2005).

b. La méthode de transplantation et d'échantillonnage du naissain

La campagne de transplantation du naissain d'huîtres a été menée sur des individus âgés de 2 mois (longueur moyenne de la coquille : $17,4 \pm 0,5$ mm) obtenus par captage au niveau de l'île de Ré. Le naissain a été conditionné pour les transplantations dans 28 poches plastiques (50 individus/poche de maille 0,5 cm ; standards professionnels). Une moitié a été implantée directement dans l'estuaire sur le site de La Fosse et l'autre dans un des marais de la ferme aquacole Bleu Médoc.

Sept points d'échantillonnage entre mai 2000 et février 2001 (9 mois) ont été effectués avec pour chaque point, l'analyse séparée de 5 réplicats, chacun d'eux étant constitué d'un

"pool" d'individus au nombre suffisant pour atteindre approximativement 1,5 g de poids frais de corps mou (3 ou 4 individus). Les "pools" ont été homogénéisés et utilisés pour la détermination du rapport "poids frais / poids sec" des corps mous et pour la quantification des métaux par SAA (voir le paragraphe 2-5. "Technique d'analyse des métaux", page 69). Notons que sur le site Bleu Médoc, la détermination des concentrations en Zn et Cu n'a été réalisée que pour les points d'échantillonnage 1, 3, 5 et 7 (c'est-à-dire + 40, 120, 200 et 240 jours). Seuls les corps mous entiers ont été étudiés lors de cette campagne de transplantation.

C- Critères et niveaux d'analyse

Pour les deux campagnes de transplantation, trois critères d'analyses ont été retenus lors des échantillonnages :

- la longueur de la coquille et la masse du corps mou entier (et des tissus pour les adultes) ont permis d'apprécier la croissance des organismes en fonction des variations saisonnières des conditions environnementales (facteurs physico-chimiques, abondance et disponibilité des nutriments, pression de contamination) au sein des trois systèmes écologiques considérés. Cette croissance peut jouer un rôle prépondérant, *via* les processus de dilution pondérale par exemple, dans l'évolution de la bioaccumulation des contaminants ;

- les concentrations moyennes de Cd, Zn et Cu dans le corps mou entier des huîtres adultes et juvéniles et dans 3 organes ou ensembles tissulaires chez les adultes (branchies, glande digestive et reste des tissus) ont été mesurées ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \pm \text{SEM}$, sur la base du poids sec).

A partir de ces données, les cinétiques de croissance et de bioaccumulation des métaux pour chaque site ont été constituées.

La significativité statistique des différences entre les sites d'étude pour chaque durée de transplantation, ou entre les différents temps d'échantillonnage pour un même site de transplantation a été déterminée pour chacun des critères pris en compte (longueur de coquille, poids sec du corps mou entier et concentrations métalliques) en utilisant le test non paramétrique de Mann et Whitney (test U). Pour l'ensemble des traitements, le seuil de significativité a été fixé à $\alpha = 0,05$.

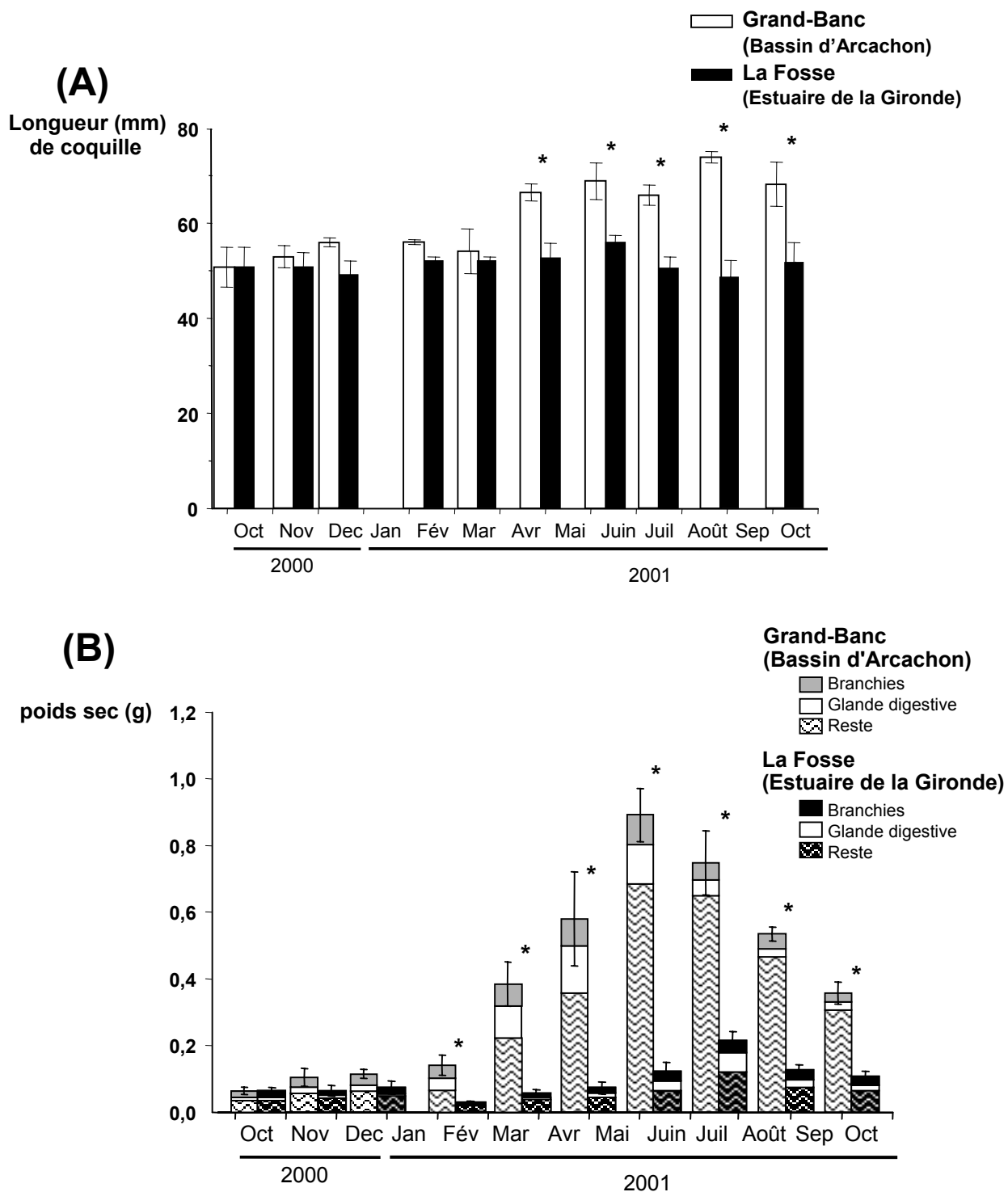


Figure 60 : Première campagne : Evolution de la croissance des huîtres adultes transplantées dans l'estuaire de la Gironde et dans le Bassin d'Arcachon au cours des 12 mois de transplantation : (A) longueur moyenne des coquilles (en mm \pm SEM, n=3) ; (B) poids sec moyen du corps mou entier et des différents tissus : branchies, glande digestive et reste des tissus (en g \pm SEM, n=3).

Les astérisques indiquent les différences significatives entre les deux sites de transplantation pour le temps d'échantillonnage considéré (test U de Mann et Whitney, $p < 0,05$).

4-1.3. RESULTATS DES CAMPAGNES DE TRANSPLANTATION

A- Première campagne : Huîtres adultes transplantées dans l'estuaire de la Gironde et dans le Bassin d'Arcachon (Programme Liteau, 2002)

a. La croissance des huîtres adultes

La **Figure 60** présente les résultats de la croissance des huîtres sur les 12 mois de transplantation dans l'estuaire et le Bassin d'Arcachon, à partir des mesures de la longueur des coquilles (A - en mm) et de la masse du corps mou entier et des différents tissus (B - en g, poids sec).

Dans le Bassin d'Arcachon, la taille des coquilles des huîtres adultes, constante dans un premier temps (d'octobre 2000 à mars 2001 : $54,0 \pm 1,2$ mm), augmente significativement entre mars et avril, pour se maintenir dans les mois suivants et jusqu'en octobre 2001 à une valeur moyenne de $68,7 \pm 0,6$ mm. L'accroissement annuel de la longueur de la coquille correspond à une croissance d'environ 30% sur ce site. En comparaison, les mesures reportées pour les huîtres transplantées dans l'estuaire démontrent une absence de croissance coquillière au cours des 12 mois de transplantation, les huîtres conservant leur longueur moyenne initiale de $51,4 \pm 0,6$ mm.

L'analyse de l'évolution de la masse du corps mou indique des variations pondérales saisonnières beaucoup plus marquées que pour la longueur de la coquille, sous l'influence du cycle de reproduction. Sur le site du Grand Banc, le poids de chair varie peu pendant les mois d'automne et d'hiver, d'octobre 2000 à février 2001 ($0,06 \pm 0,01$ et $0,14 \pm 0,03$ g, pds sec, respectivement) correspondant à une phase de repos. Par la suite, un accroissement pondéral graduel marque la croissance printanière du corps mou, qui culmine en juin, multipliant d'un facteur 14 les valeurs du temps zéro. Les trois tissus analysés sont concernés par la croissance pondérale, mais le reste des tissus contenant la gonade montre la plus forte augmentation (facteur d'accroissement pondéral = 18). Cette phase de forte croissance correspond en effet à la période de gamétogenèse. Elle est étroitement associée à la présence dans le milieu d'importantes ressources nutritives pour les bivalves filtreurs, essentiellement constituées d'algues phytoplanctoniques. Durant l'année 2001, de forts "blooms" algaux ont été observés au cours des mois de mars et avril, comparativement aux années précédentes, alors que le mois de février n'a pas montré de production algale, parallèlement à une forte dessalure des eaux (données - IFREMER, 2001). Au mois de juin, les valeurs culminent à $0,89 \pm 0,1$ g (pds sec),

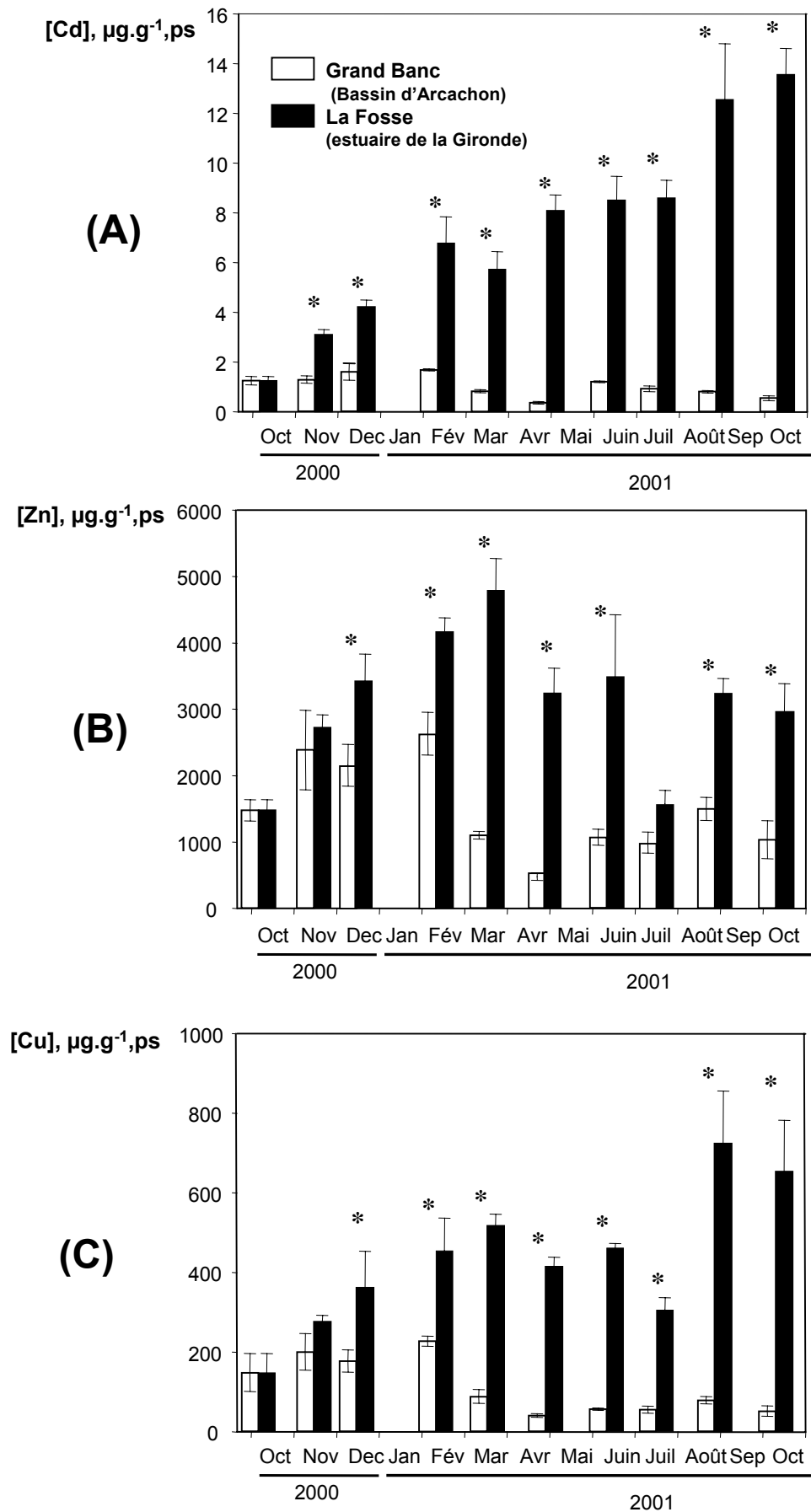


Figure 61 : Première campagne : Cinétiques des concentrations moyennes ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, poids sec \pm SEM, $n=3$) de cadmium (A), de zinc (B) et de cuivre (C) mesurées dans le corps mou entier des huîtres adultes au cours des 12 mois de transplantation dans l'estuaire de la Gironde et dans le Bassin d'Arcachon.
 Les astérisques indiquent les différences significatives entre les deux sites de transplantation pour le temps d'échantillonnage considéré (test U de Mann et Whitney, $p<0,05$).

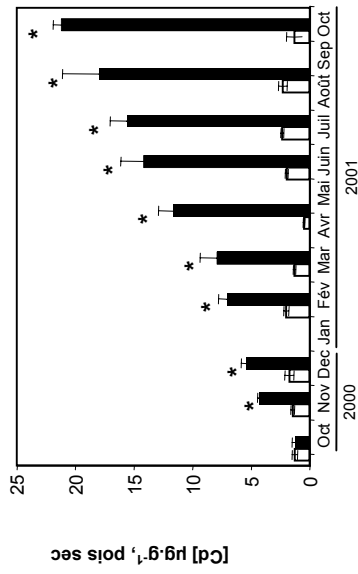
plus de 85% de la masse du corps mou correspondant au reste des tissus (gonade, manteau, palpes labiaux, cœur, muscle adducteur, reins). De juin à octobre, les poids diminuent progressivement. Cette réduction d'un facteur 2,5 est essentiellement sous l'influence de ce compartiment tissulaire, en relation avec la libération progressive des gamètes dans le milieu naturel à l'occasion de plusieurs phases de pontes. Une biomasse moyenne de $0,36 \pm 0,03$ g (pds sec) est atteinte en octobre, correspondant à un gain annuel de poids pour le corps mou entier des huîtres de 450% (entre octobre 2000 et octobre 2001). Au niveau du site de La Fosse, les données pondérales évoluent très peu au cours du temps en comparaison avec le Bassin d'Arcachon, avec une première diminution des poids d'un facteur proche de 2 entre décembre et février. Elle est suivie d'une légère croissance des organismes de février à juillet, multipliant les valeurs moyennes pondérales d'un facteur 8, contre 14 pour les huîtres dans le Bassin d'Arcachon. Cette différence dans le gain de poids marque l'importante carence nutritive qui caractérise les eaux de l'estuaire de la Gironde par rapport au Bassin d'Arcachon. Les tissus restants après le prélèvement des branchies et de la glande digestive représentent 56% du corps mou entier en juillet. A partir de cette date, le poids des individus diminue d'un facteur 2, en relation avec la réduction du compartiment tissulaire contenant la gonade, mais aussi de la glande digestive. En comparaison avec le Bassin d'Arcachon, la ponte des huîtres survient plus tardivement, indiquant un décalage dans le temps du cycle de reproduction des huîtres dans l'estuaire de la Gironde. Le poids moyen des corps mous après un an de transplantation traduit un gain de chair quasi-nul pour les huîtres transplantées dans l'estuaire. Notons que la mortalité de certains individus sur ce site a été observée en fin de transplantation.

b. Les cinétiques de bioaccumulation des métaux dans les corps mous entiers

Les cinétiques de bioaccumulation du Cd, Zn et Cu, sur la base des concentrations accumulées dans le corps mou des huîtres au cours des 12 mois de transplantation, sont présentées sur la **Figure 61** (en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, poids sec).

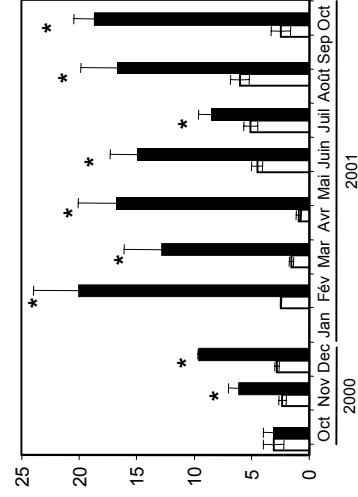
Pour le Cd, les concentrations mesurées au niveau du Bassin d'Arcachon demeurent relativement faibles, proches de la valeur moyenne initiale de $1,1 \pm 0,1$ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (pds sec), avec une diminution d'un facteur 3 entre février et avril. En comparaison, les huîtres de l'estuaire de la Gironde présentent de fortes accumulations, progressives au cours du temps. Un pallier à environ $7,5$ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ est observé de février à juillet, durant la phase de croissance des huîtres. Les valeurs maximales sont atteintes en août et octobre 2001, alors que les pertes de poids des corps mous entiers sont les plus importantes (**Figure 60B**). Elles correspondent à une

BRANCHIES

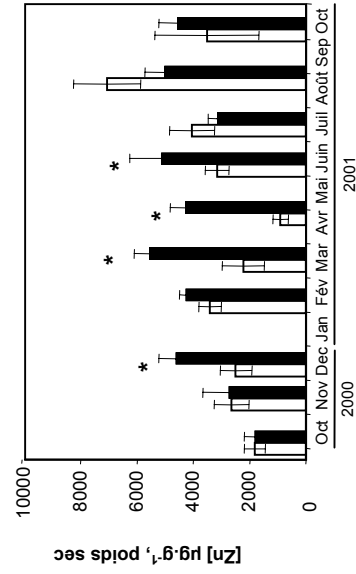
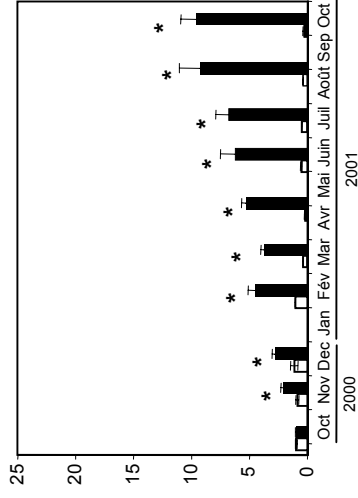


A

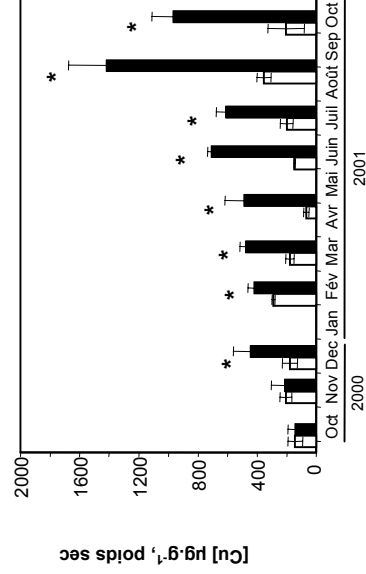
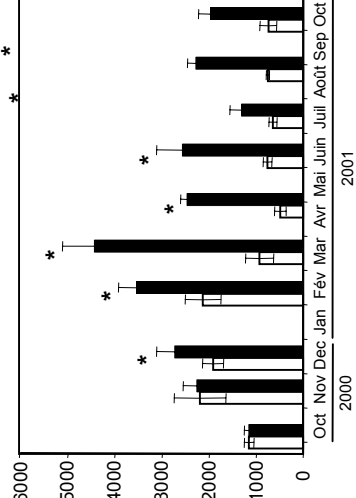
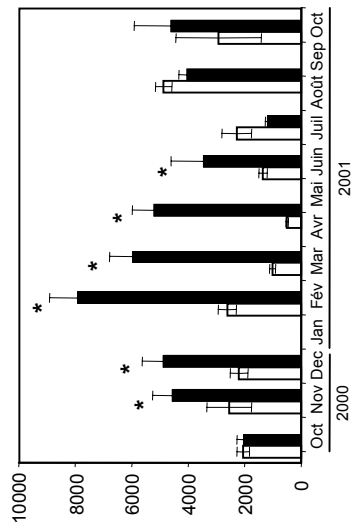
GLANDE DIGESTIVE



RESTE des TISSUS



B



C

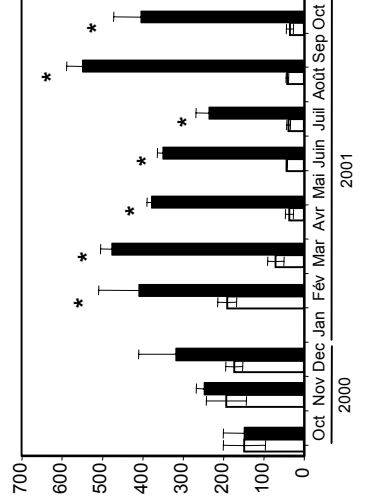
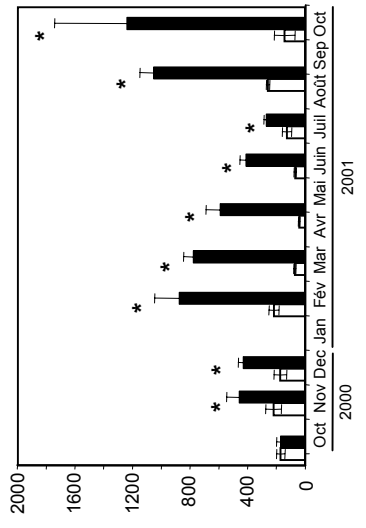


Figure 62 : Cinétiques des concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, poids sec \pm SEM) de cadmium (A), de zinc (B) et de cuivre (C) mesurées dans les différents tissus des huîtres adultes au cours des 12 mois de transplantation dans l'Estuaire de la Gironde \blacksquare et dans le Bassin d'Arcachon \square . Les astérisques indiquent les différences significatives entre les deux sites de transplantation pour le temps d'échantillonnage considéré (test U de Mann et Whitney, $p < 0,05$).

valeur moyenne de $13,5 \pm 1,1 \mu\text{g Cd.g}^{-1}$, 13 fois supérieure à celles mesurées sur le Bassin d'Arcachon. *A contrario*, les teneurs, correspondant aux quantités de métal accumulées par individu ($[\text{métal}] \times \text{poids}$), restent constantes durant cette phase finale de transplantation, avec des valeurs moyennes proches de $1\,500 \mu\text{g Cd/individu}$.

Le Zn et le Cu montrent des variations saisonnières des concentrations dans le corps mou des huîtres du Bassin d'Arcachon beaucoup plus marquées, en relation directe avec l'évolution des biomasses. Les tendances sont relativement proches entre les deux métaux, avec dans un premier temps, des valeurs stables d'octobre à février ($2\,160 \pm 91$ et $190 \pm 8 \mu\text{g.g}^{-1}$, pour le Zn et le Cu respectivement), puis une diminution significative des concentrations, parallèlement à l'accroissement pondéral, conduisant à des valeurs moyennes proches de $1\,000 \mu\text{g Zn.g}^{-1}$ et $60 \mu\text{g Cu.g}^{-1}$ jusqu'à la fin de la transplantation.

Sur le site de La Fosse, de fortes accumulations de Zn et de Cu caractérisent une première phase d'octobre 2000 à février/mars 2001, multipliant d'un facteur 3 environ les concentrations initiales, avec une moyenne maximale à $4\,780 \pm 490 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour le Zn (x4 par rapport au Grand Banc). Dans un second temps, les valeurs de Zn diminuent en avril pour globalement se maintenir jusqu'à la fin de la transplantation à $3\,000 \mu\text{g Zn.g}^{-1}$ (x3 par rapport à Arcachon en octobre). Parallèlement, les concentrations de Cu restent relativement stables de février à juin/juillet avant de culminer, comme pour le Cd, en août et octobre à près de $700 \mu\text{g Cu.g}^{-1}$, soit presque 5 fois les valeurs du temps zéro et 9 fois celles mesurées sur Arcachon pour le même temps de prélèvement.

c. Les cinétiques de bioaccumulation des métaux dans les branchies, la glande digestive et le reste des tissus

Les résultats des mesures des concentrations en (A) Cd, (B) Zn et (C) Cu au niveau des trois organes ou ensembles tissulaires retenus (branchies, glande digestive et reste des tissus) sont présentés sur la **Figure 62**.

Les cinétiques de bioaccumulation du Cd dans les branchies et le reste des tissus présentent une tendance d'accumulation progressive, comparable à celle décrite précédemment pour le corps mou entier, avec des maxima en fin de transplantation (septembre/octobre) : $21,2 \pm 0,7 \mu\text{g Cd.g}^{-1}$ (pds sec) dans les branchies, l'organe le plus accumulateur et $9,6 \pm 1,3 \mu\text{g Cd.g}^{-1}$ dans le reste des tissus (16 et 30 fois supérieures aux concentrations mesurées pour ces compartiments tissulaires dans le Bassin d'Arcachon). Le calcul des teneurs relatives, définies par le pourcentage de métal contenu dans un tissu par rapport à la quantité totale accumulée

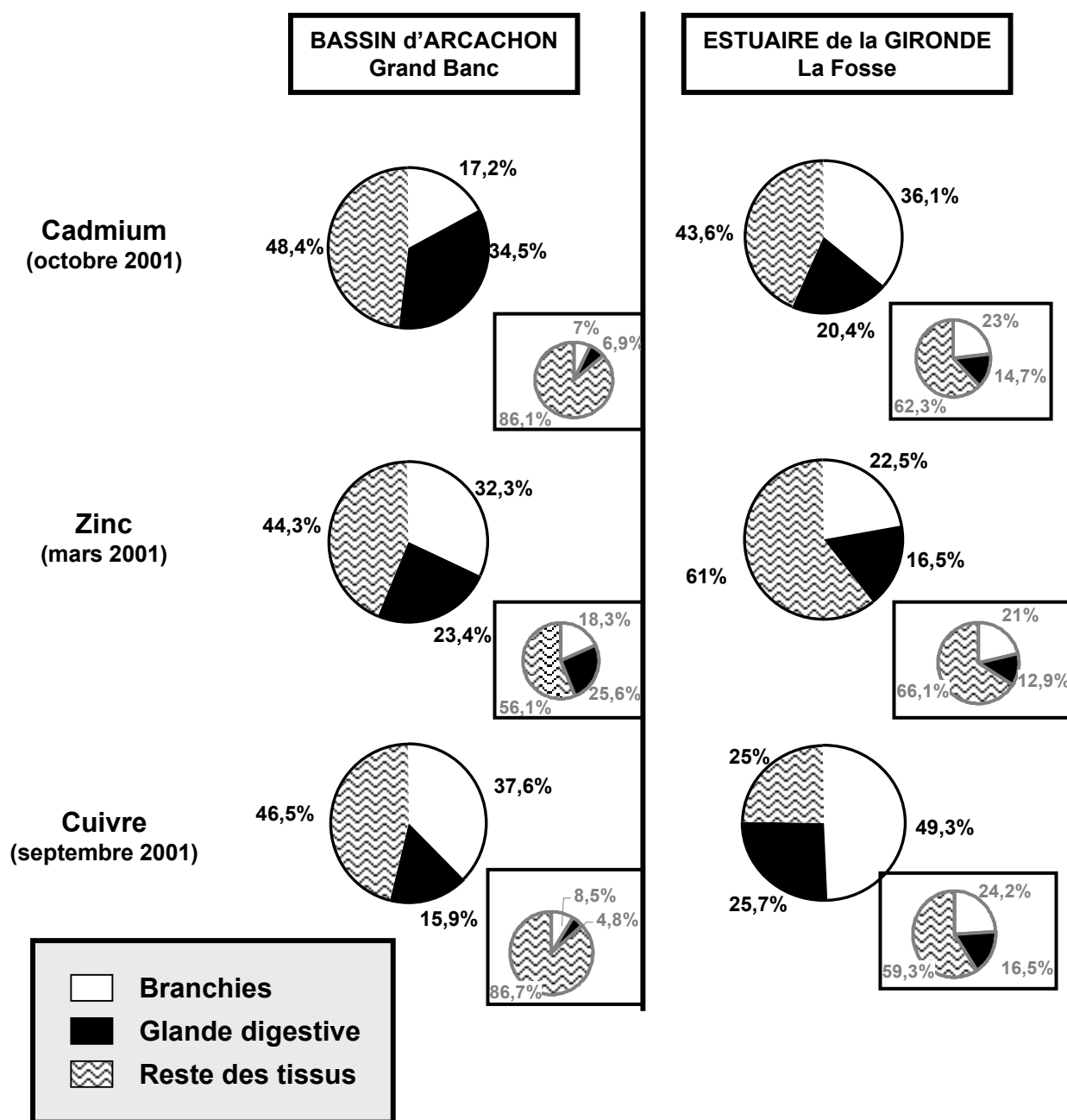


Figure 63 : Teneurs relatives moyennes (en pourcentage, n=3) calculées pour le Cd, Zn et Cu dans les différents tissus analysés (branchies, glande digestive et reste des tissus) pour les temps correspondant aux plus fortes concentrations mesurées au cours de la période de transplantation dans le corps mou entier des huîtres adultes dans l'estuaire de la Gironde et dans le Bassin d'Arcachon (première campagne).

En encadré sont reportés les poids relatifs (en pourcentage) de chaque organe pour les temps considérés.

dans le corps mou entier, révèle des modifications dans la répartition tissulaire du Cd en fin de transplantation par rapport aux huîtres en provenance du Bassin d'Arcachon (**Figure 63**). Le reste des tissus accumule toujours la quantité la plus importante, alors que son poids relatif diminue (62% du corps mou entier contre 86% pour Arcachon), mais la part contenue dans les branchies augmente nettement dans le milieu estuarien (36% du Cd total contre 17% au niveau du Bassin d'Arcachon). Dans la glande digestive, les concentrations maximales sont plus rapidement atteintes, avec des valeurs moyennes de $20 \pm 3,9 \mu\text{g Cd.g}^{-1}$ en février (x8 / Bassin d'Arcachon). Ce niveau est globalement maintenu jusqu'en octobre 2001.

L'évolution des concentrations de Zn mesurées dans les tissus des huîtres transplantées dans le Bassin d'Arcachon montre de fortes variations saisonnières. Les valeurs minimales sont observées en avril/mai pour les trois tissus, les valeurs maximales, en août/septembre pour les branchies et la glande digestive, et en hiver pour le reste des tissus. Dans l'estuaire, l'accumulation du Zn dans les branchies aboutit rapidement à un maximum de $4\,700 \mu\text{g Zn.g}^{-1}$ (poids sec) au mois de décembre (x2 à x5 / Bassin d'Arcachon). Ce niveau est conservé jusqu'à la fin de la transplantation. La glande digestive et le reste des tissus montrent des cinétiques proches de celles établies pour le corps mou entier. Les plus fortes concentrations sont mesurées dans la glande digestive avec $7\,940 \pm 965 \mu\text{g Zn.g}^{-1}$ au mois de février (x3 / Bassin d'Arcachon), contre $4\,430 \pm 683 \mu\text{g Zn.g}^{-1}$ dans le reste des tissus au mois de mars (x5 / Bassin d'Arcachon). Les teneurs relatives (**Figure 63**) déterminées pour le mois de mars, correspondant au maximum d'accumulation du Zn à l'échelle du corps mou entier, indiquent que ce métal essentiel s'accumule majoritairement dans le reste des tissus (61% du Zn total contre 44% au niveau Bassin d'Arcachon).

Pour le Cu, les variations observées à l'échelle du corps mou entier se retrouvent surtout pour la glande digestive et le reste des tissus. Les valeurs maximales sont obtenues pour les trois ensembles tissulaires en fin de transplantation (septembre/octobre 2001) avec environ $1\,300 \mu\text{g Cu.g}^{-1}$ (pds sec) dans les branchies et la glande digestive (soit respectivement 4 et 9 fois les valeurs dans le Bassin d'Arcachon) et $550 \mu\text{g Cu.g}^{-1}$ (pds sec) dans les tissus restant (x13 / Bassin d'Arcachon). Les branchies constituent l'organe cible pour l'accumulation du Cu, avec une teneur relative moyenne de 49% sur le site de La Fosse (**Figure 63**).

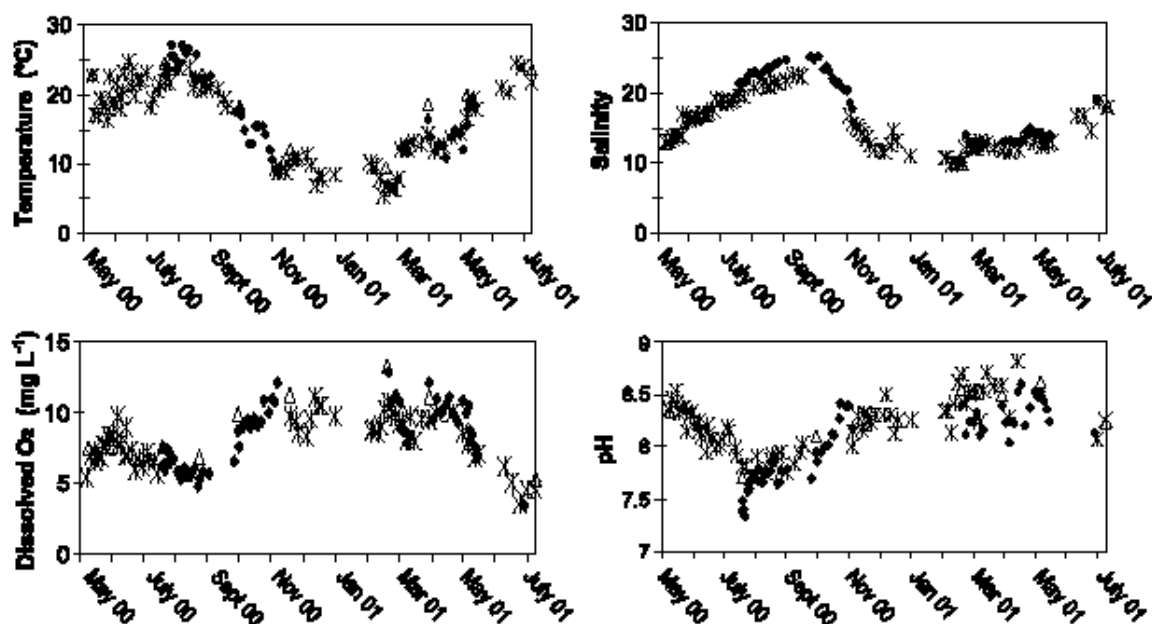


Figure 64 : Variations saisonnières des paramètres physico-chimiques majeurs (température, salinité, O2 dissous et pH) dans l'eau du bassin au cours des 9 mois de transplantation (Baudrimont *et al.*, 2005).

Les mesures manuelles à la surface (- 10 cm) sont représentées par des croix et des triangles blancs selon l'opérateur. Les losanges symbolisent les données collectées par la sonde multiparamètres (à - 50 cm de la surface) pour les heures correspondant aux mesures manuelles.

Table 1
Dissolved Cd, Cu, Zn

	[Cd] (ng l ⁻¹)	[Cu] (µg l ⁻¹)	[Zn] (µg l ⁻¹)
May 17, 2000	13	3.59	1.03
June 5, 2000	136	6.08	4.49
July 25, 2000	34	4.06	157
August 28, 2000	125	4.50	427
November 22, 2000	15	3.73	0.29
February 21, 2001	367	5.73	25.1
Gironde (typical range)	25–120 ^{a,b,c,d}	0.3–2.5 ^{c,d}	0.5–3 ^{a,d}

Copper and Zn concentrations are in µg l⁻¹. Cadmium concentrations are in ng l⁻¹

^a Data from Kraepiel *et al.* (1997).

^b Data from Boutier *et al.* (2000).

^c Data from Robert *et al.* (2004).

^d Data from Schäfer *et al.*, unpublished data.

^e Data from Cossa and Noël, 1987.

Tableau 14 : Concentrations dissoutes de cadmium, cuivre et zinc mesurées dans l'eau du bassin du Nord Médoc pour chaque temps de prélèvement de mai 2000 à février 2001 (Baudrimont *et al.*, 2005).

B- Etude comparative de la bioaccumulation des métaux dans des huîtres juvéniles transplantées dans l'estuaire de la Gironde et dans les marais adjacents du Nord Médoc (Programme GIS-ECOBAG, 2002a et b)

a. Les paramètres physico-chimiques et niveaux d'exposition métallique dans le bassin de transplantation

Les variations des paramètres physico-chimiques observées durant la période de transplantation reflètent les changements saisonniers et la gestion des eaux du bassin (**Figure 64** – Baudrimont *et al.*, 2005). Les fluctuations de la température (5°C au minimum en hiver et 28°C au maximum en été) correspondent à la durée et à l'intensité d'ensoleillement. La baisse rapide de ce facteur parallèlement à celle de la salinité, à l'échelle journalière, correspond aux effets de dilution par les eaux de pluie. Au contraire, la décroissance de la température associée à l'augmentation de la salinité survient en relation avec l'alimentation du bassin *via* les eaux de l'estuaire. A l'échelle saisonnière, l'évolution de la température et de la concentration en O₂ dissous dans l'eau sont inversement proportionnelles, du fait de la solubilité accrue de l'O₂ à basse température. Les profils verticaux en O₂ dissous révèlent une augmentation de l'hypoxie avec la profondeur en relation étroite avec la production/dégradation intense de la biomasse végétale et animale (phyto et zooplancton), au cours des mois les plus chauds, induisant des conditions sub-oxiques (<1% de saturation en O₂) à la surface des sédiments. A l'échelle journalière, par contre, les variations de la concentration en O₂ dissous (jusqu'à 2,5 mg.l⁻¹) et du pH peuvent s'expliquer par la photosynthèse et la respiration.

Les concentrations en Cd et Zn dans la fraction dissoute de la colonne d'eau du bassin¹ sont assez bien corrélées aux échelles de valeurs observées dans l'estuaire de la Gironde (**Tableau 14** – Baudrimont *et al.*, 2005). Par contre, il n'y a pas de relation apparente entre ces concentrations et la salinité de l'eau. La gestion de l'alimentation en eau du bassin depuis le canal en provenance de l'estuaire semble expliquer la plupart des valeurs mesurées au cours de la transplantation. Néanmoins, certaines concentrations de Cd et de Zn et la plupart des concentrations en Cu sont ponctuellement plus fortes que les valeurs établies dans l'estuaire. Cela suggère des changements dans la répartition des métaux et notamment des phénomènes de relargage vers la phase dissoute, en raison de processus biogéochimiques survenant probablement à l'interface eau/sédiment. Les concentrations de métaux associés aux particules qui sédimentent (collecte par des pièges à particules) et dans les sédiments (prélèvements par

¹ Les mesures physico-chimiques et les dosages des métaux dans les biotopes ont été réalisés par l'équipe TGM, Département de Géologie et Océanographie, UMR CNRS 5805, Université Bordeaux 1.

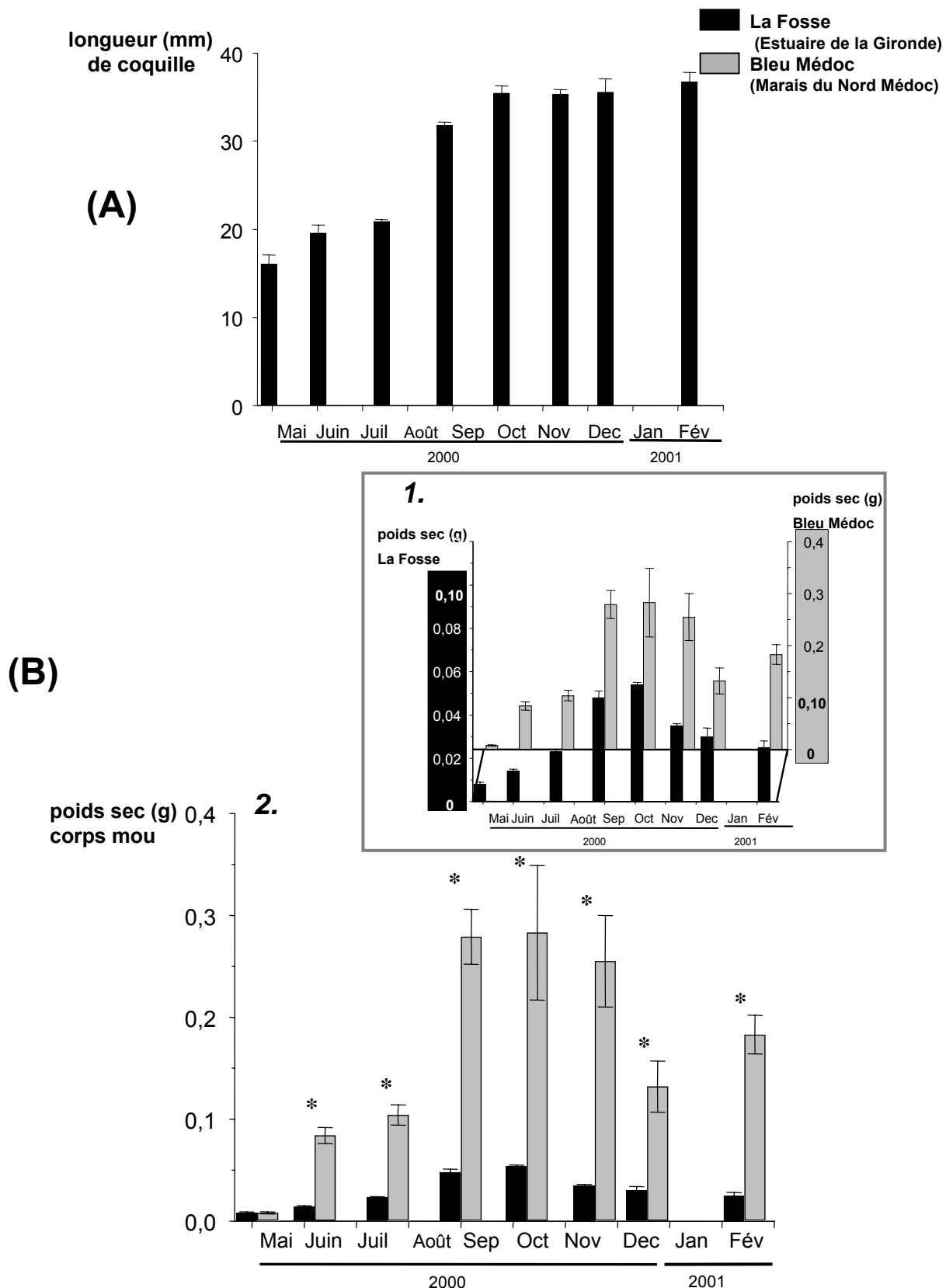


Figure 65 : Deuxième campagne : Evolution de la croissance du naissain transplanté dans l'estuaire de la Gironde et dans un bassin du Nord-Médoc durant 9 mois : (A) longueurs moyennes des coquilles (en mm \pm SEM, n=5 pools de 3-4 individus) ; (B) masses moyennes des corps mous entiers (en g de poids sec \pm SEM, n=5 pools de 3-4 individus) : 1. Echelle de poids propre à chaque site ; 2 Même échelle de poids pour comparaison.

Les astérisques indiquent les différences significatives entre les deux sites de transplantation pour le temps d'échantillonnage considéré (test U de Mann et Whitney, $p < 0,05$).

carottages) sont plus faibles que celles mesurées directement sur les matières en suspension (MES) : ces différences seraient dues à des processus de dissolution dans le gradient redox, comparables à ceux survenant dans les couches supérieures des sédiments. Les concentrations de Cd dans le compartiment sédimentaire correspondent à la fraction résiduelle qui résiste à la désorption par la salinité des eaux estuariennes et au gradient redox (Kraepiel *et al.*, 1997 ; Boutier *et al.*, 2000). Ces phénomènes de désorption semblent importants et expliqueraient l'adsorption des métaux sur les matières en suspension ou leur stabilisation dans la fraction dissoute (métaux en solution et fixés sur les colloïdes - $<0,45 \mu\text{m}$). Ce relargage des métaux pourrait expliquer les concentrations de Cd, Zn et Cu mesurées dans la fraction particulaire, qui sont plus élevées que dans l'estuaire de la Gironde. De même, les concentrations métalliques dans la fraction dissoute occasionnellement élevées (par exemple la concentration maximale en Cd mesurée en février 2001 – **Tableau 14**) seraient le résultat de la dégradation intense de la matière organique en raison d'un important "bloom" algal dans la zone en aval de l'estuaire de la Gironde (IFREMER, 2002).

b. La croissance du naissain

Les cinétiques de croissance des huîtres juvéniles transplantées en parallèle dans l'estuaire de la Gironde (La Fosse) et dans les marais du Nord-Médoc, sont présentées sur la **Figure 65**, à partir de (A) la longueur moyenne des coquilles pour les individus de La Fosse et de (B) la masse des corps mous sur les deux sites.

Au niveau de La Fosse, la mesure de la longueur des coquilles indique deux phases au cours de la transplantation (**Figure 65A**) : une phase de croissance de mai à octobre (x2,2), suivie d'une stabilisation durant les périodes automnale et hivernale (longueurs moyennes proches de 35 mm). Le gain annuel de croissance en longueur des coquilles pour le naissain est d'environ 120% dans l'estuaire, alors qu'il était nul pour les adultes. Pour le bassin "Bleu Médoc", ce critère n'a pas été déterminé systématiquement, ne permettant pas une analyse comparative avec le site de la Fosse.

La **Figure 65 B1**. montre des tendances d'évolution comparables de la masse des corps mous entiers sur les deux sites de transplantation (axe gauche : La Fosse ; axe droit : Bleu Médoc). Globalement, trois phases se distinguent. Au niveau de La Fosse, le poids moyen des individus augmente fortement dans un premier temps, parallèlement à la phase de croissance en longueur de la coquille (de mai à octobre) et en relation avec un accroissement en nutriments

(algues phytoplanctoniques) spécifiquement observé dans l'estuaire de la Gironde entre juin et août par le Réseau National des Stations Marines, Service d'Observation en Milieu LIToral (SOMLIT : point : pK85 - données Chlorophylle a ; UMR-CNRS-5805, 2004). Un maximum de $0,051 \pm 0,001$ g (pds sec)/individu est atteint en octobre (x6 / temps zéro). Dans un second temps, une décroissance progressive des poids est observée pendant les périodes automnale et hivernale (octobre à février) : les moyennes pondérales sont divisées par un facteur 2 environ (poids sec moyen de $0,025 \pm 0,003$ g/individu). Notons qu'après les 9 mois de transplantation, la mortalité de certains individus juvéniles est apparue et, pour les survivants, le gain total de croissance de chair a été évalué à 210% dans l'estuaire de la Gironde.

En comparaison avec cette évolution, dans le bassin de la ferme Bleu Médoc, la croissance du naissain apparaît nettement plus forte (**Figure 65 B2.**). L'accroissement très important des poids de mai à octobre - facteur proche de 20 par rapport au temps zéro (x6 pour La Fosse) - conduit à des valeurs moyennes maximales de $0,280 \pm 0,03$ g/individu, soit plus de 5 fois supérieures à celles de l'estuaire. Ces résultats sont en relation avec les variations des paramètres physico-chimiques observées sur cette période et stimulant l'activité de filtration des bivalves (Grant, 1996 ; Levinton *et al.*, 2002). En effet, une importante augmentation de la température et de la salinité de l'eau, accompagnée d'une faible décroissance du pH, de concentrations moyennes stables en oxygène dissous (Baudrimont *et al.*, 2005) et d'apports importants de phytoplancton (IFREMER, 2002) sont à l'origine de la forte croissance des huîtres juvéniles. Ensuite, les valeurs des poids, maintenues à ce niveau jusqu'en novembre, chutent en décembre. Ces évolutions sur la période hivernale correspondent à la baisse de la température et de la salinité de l'eau et à la réduction des apports nutritifs. Le poids moyen des corps mous atteint en fin de transplantation $0,183 \pm 0,02$ g/individu, soit environ 7 fois les valeurs du naissain transplanté à La Fosse et sans mortalité des individus. Le gain total de poids observé par rapport au début de la transplantation dans le bassin du Nord Médoc est très élevé, de l'ordre de 2 200%.

c. Les cinétiques de bioaccumulation des métaux à l'échelle de l'organisme entier

Les évolutions des concentrations en Cd, Zn et Cu mesurées dans le corps mou entier des huîtres juvéniles transplantées à La Fosse ou dans le bassin Bleu Médoc sont relativement proches d'un métal à l'autre (**Figure 66**).

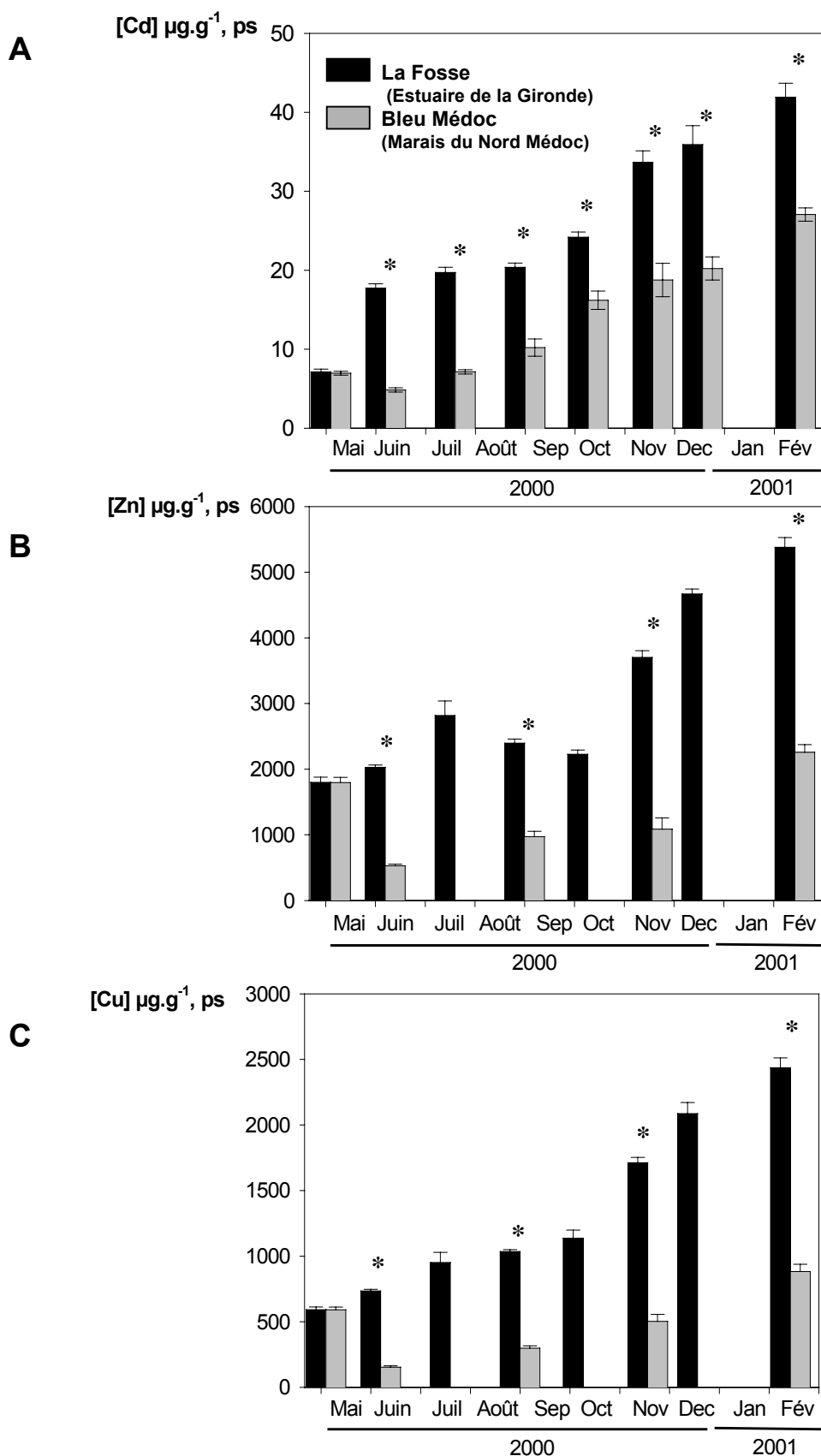


Figure 66 : Deuxième campagne : Cinétiques des concentrations moyennes ($\mu\text{g.g}^{-1}$, poids sec \pm SEM, $n=5$ pools de 3-4 individus) de cadmium (A), de zinc (B) et de cuivre (C) mesurées dans le corps mou entier des huîtres juvéniles (naissain) au cours des 9 mois de transplantation dans l'estuaire de la Gironde (7 temps d'échantillonnage) et les marais du Nord-Médoc (7 temps pour le Cd, 4 pour le Zn et le Cu).

Les astérisques indiquent les différences significatives entre les deux sites de transplantation pour le temps d'échantillonnage considéré (test U de Mann et Whitney, $p < 0,05$).

Pour le Cd (**Figure 66A**), les concentrations au temps zéro sont de $7,1 \pm 0,3 \mu\text{g Cd.g}^{-1}$ (pds sec). Elles augmentent rapidement sur le site de La Fosse (x2,5) pour atteindre, dès juin, un palier maintenu jusqu'en août durant la phase de croissance des organismes (dilution pondérale). Puis, à partir du mois d'octobre, les concentrations montrent un accroissement significatif et quasi-constant jusqu'en février 2001 (x2 entre octobre et février), alors que les poids des corps mous entiers diminuent (**Figure 65 B1**). Les teneurs métalliques dans les organismes restent cependant stables durant cette phase, autour de $1,1 \mu\text{g Cd/individu}$. Les concentrations atteignent des niveaux élevés en fin de transplantation - $42 \pm 1,8 \mu\text{g Cd.g}^{-1}$ (février 2001), soit environ 6 fois les niveaux mesurés au temps zéro.

Sur le site de Bleu Médoc, les tendances d'accumulation restent proches de celles de l'estuaire, également influencées par les variations du poids des huîtres, avec cependant des niveaux moins élevés. Dans un premier temps, les concentrations de Cd ne varient presque pas. Après le mois de juillet, l'augmentation croissante et significative des concentrations du métal est amorcée ; elle se poursuit jusqu'en octobre pour se maintenir jusqu'en décembre. Une accumulation significative du Cd survient ensuite, en accord avec l'augmentation des concentrations dans la fraction dissoute de la colonne d'eau du bassin entre décembre et février (**Tableau 14**). Les concentrations atteignent en fin de transplantation $27,1 \pm 0,8 \mu\text{g Cd.g}^{-1}$ (pds sec), ; elles sont 1,5 fois moins élevées que pour le naissain transplanté directement dans l'estuaire.

Pour le Zn et le Cu (**Figure 66B et C**), même si seulement 4 temps ont été analysés pour les huîtres transplantées dans le bassin Bleu Médoc, les cinétiques de bioaccumulation suivent, pour chaque site de transplantation, des variations comparables à celles du Cd en fonction du temps. Cependant, pour le même métal, d'importants écarts d'accumulation se révèlent entre La Fosse et Bleu Médoc, donnant une très nette supériorité aux valeurs mesurées dans le naissain transplanté dans l'estuaire.

Au niveau de La Fosse, deux phases d'accumulation se distinguent pour le Zn et le Cu. La première traduit un accroissement significatif (x1,5) des concentrations entre mai et juillet, puis les niveaux se stabilisent. La seconde phase survient entre octobre et février 2001, multipliant, sur cette période, les valeurs d'un facteur proche de 2, comme pour le Cd. Les maxima atteints après 9 mois de transplantation ($5\,385 \pm 148 \mu\text{g Zn.g}^{-1}$ et $2\,438 \pm 76 \mu\text{g Cu.g}^{-1}$, pds sec) sont alors près de 4 fois supérieurs aux valeurs initiales, malgré le caractère essentiel de ces métaux.

Les évolutions des concentrations en Zn et Cu dans les organismes transplantés dans le bassin Bleu Médoc sont marquées par une chute des valeurs (facteur 3,5 par rapport au temps zéro) après 40 j de transplantation (juin 2000). Par la suite, les concentrations augmentent progressivement pour atteindre en fin de transplantation des valeurs moyennes environ 1,5 fois plus importantes que celles mesurées au temps zéro. Néanmoins, comme pour le Cd, les niveaux moyens atteints dans le naissain après 9 mois de transplantation ($2\,262 \pm 115$ et $884 \pm 55 \mu\text{g.g}^{-1}$ de Zn et Cu, respectivement) sont environ 2,5 fois plus faibles que pour le naissain transplanté parallèlement à La Fosse.

4-1.4. DISCUSSION

Dans l'estuaire de la Gironde, une très faible croissance des huîtres adultes et juvéniles a été observée au cours des deux campagnes de transplantation, par comparaison avec les deux autres sites sur le Bassin d'Arcachon et dans le bassin aquacole "Bleu Médoc". Ces résultats sont en relation avec des carences nutritives qui caractérisent le système estuarien de la Gironde. Elles sont principalement dues à la très forte turbidité des eaux, en comparaison avec d'autres estuaires, limitant la production primaire phytoplanctonique (Irigoiien et Castel, 1997 ; Goosen *et al.*, 1999). Nos observations montrent que ces apports nutritifs revêtent un caractère limitant pour les huîtres, susceptible d'affecter le cycle de reproduction des individus adultes (développement limité durant la gamétogenèse et décalage de la phase de ponte) et d'altérer à terme la survie des bivalves transplantés (adultes et naissain). Mentionnons que les métaux, et notamment le Cd, ont probablement joué un rôle dans le retard de croissance d'une part, et de la gamétogenèse, d'autre part. Frazier, en 1976, a montré que le Cu et le Cd peuvent interférer dans la formation de la coquille des huîtres, en inhibant des métalloenzymes impliquées dans le métabolisme de la coquille, et conduire ainsi à un ralentissement de la croissance. Cette altération du développement a notamment conduit à l'élaboration de nombreux tests de toxicité utilisant les anomalies de formation des larves d'huîtres comme biomarqueur de l'exposition aux polluants, dont les métaux. En ce qui concerne l'inhibition de la reproduction, il semble que la vitellogenèse chez les bivalves soit en partie commandée par des œstrogènes comme le 17β -œstradiol chez *C. gigas* (Li *et al.*, 1998b) et que ce processus peut être affecté par le Cd, qui apparaît alors se comporter comme un composé anti-œstrogénique, affectant le

développement des follicules gonadiques chez les moules (Depledge et Billingham, 1999 ; Gauthier-Clerc *et al.*, 2002).

La caractérisation de la bioaccumulation des métaux chez les huîtres en Gironde nous a permis de mettre en évidence des niveaux de contamination élevés en Cd, mais aussi en Zn et Cu. Ces résultats montrent l'importante contamination de l'estuaire de la Gironde par rapport à un site défini comme "non pollué" (le Bassin d'Arcachon). Les niveaux atteints pour les deux classes d'âge dépassent largement la nouvelle norme établie en 2002 de $5 \mu\text{g Cd.g}^{-1}$ (pds sec). De plus, nos résultats révèlent des concentrations maximales dans les huîtres juvéniles aussi importantes que celles mesurées dans les huîtres adultes sauvages natives de l'estuaire ($\sim 43 \mu\text{g Cd.g}^{-1}$, pds sec - IFREMER, 2002).

Chez les adultes, l'analyse de la bioaccumulation au niveau des trois ensembles tissulaires a révélé de plus fortes concentrations de Cd dans les branchies, suivies de la glande digestive et du reste des tissus. Pour le Cu et le Zn, l'ordre est différent : glande digestive > reste des tissus > branchies. Notons que les valeurs mesurées dans ces tissus sont cohérentes par rapport aux données résultant de transplantations préalablement réalisées dans la zone aval de l'estuaire de la Gironde, notamment au niveau des branchies (Geffard *et al.*, 2002).

L'analyse comparative des niveaux de bioaccumulation sur le site de La Fosse a démontré le fort potentiel du naissain à concentrer les métaux, notamment le Cu et le Cd, en comparaison avec les adultes (x3,5 pour le Cu ; x3 pour le Cd ; x1,1 pour le Zn). Ces différences d'accumulation peuvent s'expliquer par une activité métabolique et de ventilation, à des fins respiratoire et nutritionnelle, plus importante chez les jeunes individus, en relation avec leur faible poids, conduisant à une exposition métallique plus prononcée (Mill, 1972). Ces résultats confirment l'influence très marquée du stade de développement sur les potentialités de bioaccumulation des métaux par les huîtres.

D'autre part, pour les deux stades étudiés (naissain/adulte), les variations des concentrations métalliques sont apparues directement reliées aux fluctuations de la masse des corps mous durant les phases de croissance et/ou du cycle de reproduction des organismes, elles mêmes influencées par les facteurs environnementaux (température, qualité et quantité de nourriture, ...) et hormonaux (gamétogenèse, ponte). Ainsi, chez les adultes, même si les concentrations dans les tissus contenant la gonade restent faibles, ce compartiment représentant

une part importante de la masse du corps mou, il influence fortement les concentrations déterminées à l'échelle des organismes entiers. Les cinétiques de bioaccumulation des trois métaux ont globalement montré des concentrations stables durant les phases de croissance pondérale (dilution pondérale) et des accroissements significatifs de ces concentrations lors des diminutions du poids des tissus. Ce phénomène a déjà été observé pour des adultes de cette espèce par Boyden et Phillips (1981). En termes de teneurs, cela correspond à des valeurs relativement stables, impliquant un équilibre entre l'entrée et l'élimination des métaux. Pour le Zn et le Cu, notons que leur statut de métaux essentiels peut également constituer une source supplémentaire de variation des concentrations, en fonction des saisons et des besoins métaboliques (Roesijadi, 1994b).

Dans le bassin du Nord-Médoc, la croissance des huîtres juvéniles est importante en comparaison avec le site de la Fosse : les écarts de poids des corps mous atteignent un facteur 3. Ce résultat indique que les apports nutritifs ne semblent pas constituer un facteur limitant pour la croissance des bivalves sur ce site. Cependant, les niveaux de bioaccumulation sont plus faibles, notamment en Zn et Cu : les écarts d'accumulation entre les deux sites de transplantation correspondent à un facteur 3 pour le Cu, 2,5 pour le Zn et seulement 1,5 pour le Cd. Ils s'expliquent essentiellement par un phénomène important de dilution pondérale, mais également par les conditions physico-chimiques différentes dans ces bassins, conduisant probablement à une moins grande biodisponibilité des éléments présents au sein de la colonne d'eau (Baudrimont *et al.*, 2005). L'ensemble de ces résultats (croissance plus importante et accumulation moindre des métaux) au sein des bassins aquacoles est à rapprocher d'une absence de mortalité des huîtres au cours de la phase de transplantation, alors que dans l'estuaire, une mortalité était apparue progressivement en fin de période de transplantation.

Nos études montrent que les bassins aquacoles du Nord Médoc représentent des sites de transplantation plus appropriés pour des études *in situ* de la bioaccumulation des métaux que les stations localisées dans la zone aval de l'estuaire de la Gironde. En effet, malgré des niveaux d'accumulation plus faibles que dans l'estuaire, ils permettent à moyen/long terme une croissance importante des individus transplantés, sans mortalité, avec des variations des concentrations métalliques bioaccumulées comparables à celles survenant au cours des saisons au sein de l'estuaire. Notons également que les contraintes liées à la transplantation des organismes, aux échantillonnages périodiques et à l'acquisition des données physico-chimiques

et de contamination au sein des biotopes, sont nettement atténuées : facilité d'accès ; zones surveillées ; pas d'influence des marées, hormis lors des phases de remplissage et de renouvellement de l'eau.¹

Ce site de transplantation a donc été choisi pour la poursuite de nos recherches. Une nouvelle campagne de transplantation a été mise en place dans le bassin Bleu Médoc afin d'analyser la réponse des métallothionéines face à la contamination métallique des huîtres transplantées dans ce système, en aval du *continuum* fluvio-estuarien. En parallèle, cette réponse a été analysée comparativement chez des individus diploïdes et triploïdes, ces derniers pouvant notamment constituer un "témoin négatif" par rapport au cycle de reproduction.

¹ Je tiens à exprimer tous mes remerciements à Bertrand Claude et Daniel Dufaure, de la ferme Bleu Médoc, pour leur précieuse collaboration.

4-2. ANALYSE COMPARATIVE *IN SITU* DU POTENTIEL DE REPONSE DES METALLOTHIONEINES CHEZ DES HUITRES DIPLOÏDES ET TRIPLOÏDES *Crassostrea gigas*. ETUDE DE TRANSPLANTATION DANS UN MARAIS DU NORD MEDOC

Les recherches conduites pour améliorer la production des élevages de poissons, crustacés et coquillages, tout en privilégiant les attentes des consommateurs, ont conduit à la production de divers organismes polyploïdes. Chez les bivalves, la triploïdie est actuellement couramment exploitée chez les huîtres, les moules, les palourdes, les coquilles Saint Jacques. Les individus triploïdes (3n) ont la particularité de posséder un jeu de chromosomes homologues supplémentaire par rapport aux individus diploïdes (2n). Cette caractéristique génétique conduit à une activité réduite de la gamétogenèse, le nombre impair de chromosomes créant des difficultés pendant la fabrication des gamètes. Ces organismes sont généralement caractérisés par une meilleure croissance que leurs homologues diploïdes, incitant de plus en plus les professionnels de l'aquaculture à s'intéresser à leur production.

Chez les huîtres, l'induction de la triploïdie est une méthode originellement développée aux Etats-Unis, dans un objectif de limiter la mortalité fréquemment observée après la reproduction (Nell, 2002). Aujourd'hui, bien que le bénéfice commercial des populations triploïdes ait été démontré et évalué chez l'huître du Pacifique *Crassostrea gigas* (Thunberg), l'huître orientale *C. virginica* (Gmelin), les huîtres australiennes *Saccostrea glomerata* (Gould - encore appelée *S. commercialis*) et l'huître plate européenne *Ostrea edulis* (Linnaeus), ce procédé a seulement été appliqué à des fins commerciales pour l'espèce *C. gigas* (Nell, 2002). La triploïdie peut être obtenue par suppression de la méiose I ou II, la deuxième option donnant de meilleurs résultats en pourcentage de triploïdie et de survie larvaire (Hand et Nell, 1999). Cette seconde stratégie est la plus utilisée. L'induction de la triploïdie dans les huîtres a principalement été réalisée en bloquant le dégagement du deuxième corps polaire avec de la

cytochalasine B (CB), un facteur dépolymérisant de l'actine (Allen *et al.*, 1989) et plus récemment avec la diméthylaminopurine (6-DMAP) (Desrosiers *et al.*, 1993). Cependant, il existe des inconvénients majeurs dans leur utilisation qui ont conduit la France à interdire la pratique de ces procédés. Le premier est relatif à l'efficacité de ces techniques qui produisent systématiquement moins de 100% d'huîtres triploïdes, du fait des variations inhérentes aux divisions cellulaires. Les populations larvaires ainsi obtenues contiennent à la fois des individus triploïdes et diploïdes. En outre, la croissance des spécimens triploïdes pourrait être affectée par le blocage du globule polaire 2, probablement en relation avec le traitement lui-même (Downing et Allen, 1987) ou avec des évènements génétiques tels que l'endogamie. De plus, la CB présente un caractère toxique et constitue un danger potentiel pour l'opérateur (Guo et Allen, 1994a). Enfin, le 6-DMAP, en utilisation alternative, est moins efficace que la CB (Nell *et al.*, 1996 ; Tian *et al.*, 1999). D'autres procédés, comme le stress physique par choc thermique (Quillet et Panelay, 1986) ou par pression hydrostatique (Chaiton et Allen, 1985 ; Allen *et al.*, 1986 ; Shen *et al.*, 1993) ont été testés pour induire la triploïdie chez les huîtres. Cependant, le traitement chimique avec la CB est apparu comme étant le plus efficace (Scarpa *et al.*, 1994 ; Nell, 2002).

C'est finalement avec le développement récent de populations d'huîtres tétraploïdes que la pratique d'induction de la triploïdie s'est développée (Guo et Allen, 1994a ; Guo X. *et al.*, 1996 ; Eudeline *et al.*, 2000a ; Eudeline *et al.*, 2000b). Elle peut, en effet, par croisement avec des individus diploïdes, induire une génération d'individus triploïdes avec un résultat maximal (100%). En France, comme aux Etats-Unis, les huîtres triploïdes sont maintenant produites en utilisant des mâles tétraploïdes pour féconder des femelles diploïdes (Nell, 2002). Le protocole signé en 1998 entre le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, le CNC (Comité National de la Conchyliculture), l'IFREMER et les écloséries françaises, régit les stocks d'huîtres tétraploïdes en France, qui se trouvent confinés en quarantaine dans le laboratoire de l'IFREMER à La Tremblade (Charentes Maritimes). Ce protocole prévoit que seul l'IFREMER est apte à fournir des gamètes mâles aux écloséries qui en font la demande (IFREMER, 2000). Notons cependant que certaines données rapportent l'existence de mosaïques parmi des huîtres triploïdes de l'espèce *C. gigas*. Ces individus, consécutivement à la perte de chromosomes, présentent des cellules à la fois triploïdes et diploïdes (hétéroploïdie $2n/3n$), suggérant que la triploïdie peut être instable (Guo et Allen, 1994b ; Allen *et al.*, 1996 ; Allen et Guo, 1996 ; Allen *et al.*, 1999).

Chez les huîtres triploïdes, le retard prononcé du développement de la gonade en relation avec une inhibition de la gamétogenèse constitue une particularité très attractive pour un grand nombre de consommateurs à la recherche de qualités gustatives différentes de celles des spécimens diploïdes, en période de reproduction (de mai à août). Des études réalisées pour l'espèce *C. gigas* ont révélé que les individus triploïdes ne sont pas totalement stériles (Guo et Allen, 1994b). Le développement de leur gonade est 60 à 80% plus faible que pour les huîtres diploïdes (Shpigel *et al.*, 1992) avec un dimorphisme sexuel notable (retard plus important chez les femelles - Allen et Downing, 1986). La libération dans le milieu de gamètes (compétents ou non) à partir des tissus gonadiques a pu être observée, le phénomène restant néanmoins très nettement plus limité que pour les huîtres diploïdes (Allen et Downing, 1986 ; Shpigel *et al.*, 1992). Selon Allen et Downing (1986), cette émission des gamètes, malgré leur immaturité, indique que seuls les facteurs environnementaux sont susceptibles d'induire la ponte chez les huîtres triploïdes, suggérant qu'il existe un faible contrôle rétroactif entre l'état de maturité des gamètes et la physiologie régulant l'évènement de ponte chez *C. gigas*.

Les études comparatives entre les huîtres diploïdes et triploïdes de l'espèce *C. gigas* reposent essentiellement sur l'évaluation des performances de survie et de croissance en conditions de production ostréicole. Elles confirment l'avantage de croissance des individus triploïdes (Allen et Downing, 1986 ; Shpigel *et al.*, 1992), en accord avec les résultats obtenus sur d'autres espèces comme *S. commercialis*, *Argopecten ventricosus* ou *M. edulis* (Cox *et al.*, 1996 ; Hand *et al.*, 1998 ; Ruiz-Verdugo *et al.*, 2000 ; Brake *et al.*, 2004). Plusieurs hypothèses sont actuellement étudiées pour tenter d'expliquer ces différences de croissance : demande réduite en besoins énergétiques liés à l'inhibition de la reproduction ; augmentation du taux de nourriture ingérée et/ou plus grande efficacité d'absorption des éléments nutritifs ; niveau plus élevé du métabolisme en raison de l'hétérozygotie ou du gigantisme induit par la polyploïdie (Guo et Allen, 1994c ; Hawkins *et al.*, 1994 ; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2001 ; Nell, 2002). Néanmoins, pour la majorité des auteurs, la croissance plus rapide des individus triploïdes semble en partie résulter de la redistribution de l'énergie allouée à la gamétogenèse vers la croissance somatique (Allen et Downing, 1986 ; Hawkins *et al.*, 1994 ; Hand *et al.*, 1998).

Dans le domaine de l'écotoxicologie, malgré le développement de la production des huîtres triploïdes, les capacités de réponse de ces bivalves à l'égard des pollutions et notamment des pollutions métalliques n'ont pas été étudiées. Pourtant, compte-tenu des caractéristiques génétiques, reproductives et physiologiques de ces organismes, leurs capacités d'accumulation des métaux et de tolérance et les effets toxiques engendrés pourraient être modifiés en comparaison des huîtres au statut "originel" diploïde.

Ainsi, dans le cadre de nos recherches visant à caractériser la réponse des MTs à l'égard des métaux chez *C. gigas*, nous avons analysé, dans un premier temps, les réponses comparatives entre triploïdes et diploïdes pour des individus adultes subissant un cycle de reproduction. Nous avons suivi *in situ* les variations saisonnières des concentrations de MTs en fonction des cinétiques de bioaccumulation du Cd, du Zn et du Cu chez des huîtres triploïdes et diploïdes transplantées pendant 10 mois dans un bassin aquacole du Nord Médoc. Les analyses ont été réalisées dans trois organes ou ensembles tissulaires : les branchies, la glande digestive et le reste du corps mou contenant la gonade.

Ces travaux et les résultats obtenus sont présentés dans l'article soumis pour publication à "*Marine Environmental Research*", intitulé : "*Triploidy effect on seasonal variations of metallothionein concentrations in the Pacific oyster (Crassostrea gigas)*".

***Triploidy effect on seasonal variations of metallothionein concentrations
in the Pacific oysters (*Crassostrea gigas*)¹***

Marie Véronique, Baudrimont Magalie and Boudou Alain.

Laboratoire d'Ecophysiologie et Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques (LEESA), Université Bordeaux 1/UMR
CNRS 5805, Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France

KEYWORDS

Metallothionein; *Crassostrea gigas*; Diploid; Triploid; Heavy metals;
Reproductive cycle

¹ Article soumis pour publication à *Marine Environmental Research*.

ABSTRACT

Field study was conducted to compare under chronic metal exposure the bioaccumulation of cadmium, zinc and copper and the seasonal variations in metallothionein (MT) concentrations in triploid and diploid oysters (*Crassostrea gigas*), with the triploidy giving rise to a major reduction in gonadal development and reproductive processes. The transplantation of the two oyster populations was conducted over ten months in a breeding basin connected to the Gironde estuary (southwestern France). At each sampling time, growth, metal and MT concentrations were measured at the whole soft body level and in three tissues: gills, digestive gland and remaining tissues, including the gonads. Results showed a considerable weight loss in the remaining tissues, evaluated at 75% in diploids, against only 35% in triploids during the summer spawn and a growth advantage of the triploid oysters after spawn period (factor 2). No marked difference was observed in maximum levels of accumulated metal in the tissues of both populations. MT response showed a specific increase of concentrations in the remaining tissues of diploid specimens when gonadal development is maximal (factor close to 4 between the two populations). Out of this period, close MT levels were reached in the two oyster populations. The influence of the polyploidy statuses in *C. gigas* on MT response is discussed.

INTRODUCTION

Bivalves such as oysters are recognized as good sentinel organisms for assessing the ambient bioavailability of heavy metals in coastal marine environments. Studies on metal bioaccumulation and depuration have been developed in relation to their capacity to concentrate elements contained in the water and to survive a wide range of metal exposure conditions. To assess the cellular response to heavy metals, metallothioneins (MT) have been suggested as molecular biomarkers in oysters and in various aquatic invertebrates (Frazier and George, 1983). These proteins have a low molecular weight and a cysteine-rich polypeptide sequence (30% of total amino acids) without aromatic amino acids. MT are involved in the metabolic cellular regulation of essential elements (such as copper and zinc) and in cell protection by chelating and detoxifying heavy metals (*e.g.* cadmium, mercury, silver, or copper, zinc in excess...). Other important functions are conferred on MT *e.g.* free radical scavenger or immune response (Kägi, 1991 ; Nordberg, 1998 ; Viarengo *et al.*, 2000). Many metals are able to induce MT synthesis by a transcriptional activation system (Viarengo *et al.*, 2000 ; Haq *et al.*, 2003). In the oysters *Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas*, studies carried out on MT quantification and MT mRNA expression levels have shown positive correlations between their biosynthesis induction and bioaccumulation under metal exposure (Roesijadi, 1994b ; Unger et Roesijadi, 1996 ; Geffard *et al.*, 2002). However, numerous factors can induce MT synthesis, such as hormones, second messengers, cytotoxic agents, physical stress, and others (Kägi, 1991). Thus, many factors can interfere with the specific MT response to heavy metals, especially during the reproductive cycle. Indeed, marked seasonal fluctuations in MT concentrations have been observed in various species of bivalves independently of changes in metal concentrations (George and Langston, 1994 ; Baudrimont *et al.*, 1997b ; Serafim and Bebianno, 2001). Concerning the Pacific oyster *C. gigas*, usually recognized for its exceptional fecundity under its usual diploid status, very little data is currently available to enable us to assess to what extent the reproductive cycle is involved in the variations in MT levels. A useful approach would be to compare diploid and triploid specimens, as the triploidy leads to a considerable reduction in reproductive phenomena (Nell, 2002). These individuals, which have an additional set of chromosomes compared to the "normal" diploid oysters, were originally developed in the USA. The aim was to produce specimens in which the gonad tissues were significantly reduced (Shpigel *et al.*, 1992), and which are thus more attractive for many consumers over the spawning season, when diploids are gravid. In France, triploid oysters are produced as a result of crossing tetraploid males and

diploid females. Comparative studies evaluating survival performances and growth in farmed oysters revealed a better relative growth in triploids, associated with either reduced energy needs, an increase in the rate of food ingestion or more effective nutrient absorption (Shpigel *et al.*, 1992 ; Guo X *et al.*, 1996). This faster growth was also attributed to energy reallocation from gametogenesis to somatic growth (Allen and Downing, 1986 ; Hawkins *et al.*, 1994).

The main objective of the present study was to determine the influence of triploidy on seasonal variations of MT concentrations in *C. gigas*. Bioaccumulation of cadmium (Cd), zinc (Zn) and copper (Cu) and MT concentrations were compared in triploid and diploid adult oysters under chronic metal exposure. Transplant experiment was carried out during a ten-month period in a breeding basin of “Nord Médoc” salt marshes close to the Gironde estuary (southwestern France). Growth and the kinetics of metal bioaccumulation were analyzed in the whole soft body and in different tissues (gills, digestive gland, remaining tissues including the gonads), together with the quantification of MT concentrations.

MATERIAL AND METHODS

Experimental design and sampling procedure

The study site was a fish farm consisting of several salt breeding basins producing penaeid shrimps. It was located on the left side of the Gironde estuary (Southwestern Atlantic coast of France), 25 km upstream from the mouth, and periodically received an influx of estuarine water.

The macrotidal Gironde estuary is one of the largest in Western Europe, with a surface area of 625 km² at high tide. Chronic contamination by heavy metals was first identified in the 1980's. The pollution originated from discharge from an old Zn producing factory in the Decazeville basin (Aveyron), more than 400 km upstream from the estuary (Blanc *et al.*, 1999 ; Schäfer *et al.*, 2002). Contamination levels in a breeding basin of the “Bleu Médoc” farm were measured in a previous geochemical study conducted over a 15-month period (2000-2001) which revealed wide variations according to the seasons and the frequency of water inputs from the estuary: average dissolved metal concentrations (<0.45 µm) were close to 100 ng.l⁻¹ for Cd (min/max values: 10 / 370 ng.l⁻¹), 70 µg.l⁻¹ for Zn (0.3 / 430 µg.l⁻¹) and 4 µg.l⁻¹ for Cu (1 / 6 µg.l⁻¹)(Baudrimont *et al.*, 2005).

Sampling date	Temperature (°C)	Salinity (‰)	Dissolved O2 (mg.L⁻¹)	pH
Nov. - 2001	9.5	14.2	11.3	8.3
Mar. - 2002	6.8	15.8	16.9	8.3
Apr. - 2002	10.8	17.0	8.6	8.4
Jun. - 2002	18.3	20.2	6.8	8.4
Jul. - 2002	18.5	20.4	5.8	8.4
Aug. - 2002	21.1	23.5	8.1	8.6
Sep. - 2002	21.0	24.7	7.6	8.6

Table 15: Physico-chemical parameters of the water column (temperature, salinity, dissolved oxygen and pH) measured at each sampling date (between 10:00 - 11:00 AM) in the salt marsh during the oyster transplantation.

Oyster transplantation was carried out in one of the breeding basins bordering the Gironde estuary (2.3 Ha surface area; 1 m depth), where there was no prawn production. A total of 600 triploid and 600 diploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*, 15 months old) were purchased from an oyster farm in the Arcachon Bay (South-west France) in November 2001. The oysters were sorted according to size by measuring shell length and were kept in 24x70 cm plastic net bags (20 mm mesh, professional standards) positioned horizontally in the water column at a depth of 50 cm. Each bag contained 30 triploids or 30 diploids. The oyster transplantation was carried out over a ten-month period, from November 2001 to September 2002 (6 sampling times) and two bags were collected for each population at each sampling (60 diploids and 60 triploids). At the same time, temperature, salinity, dissolved oxygen and pH were measured in the water column (**Table 15**). Specimens were transferred to the laboratory mixed with carbonic ice in sticks. Samples were then stored in the laboratory at -80°C in a nitrogen atmosphere to ensure anoxic conditions and avoid MT oxidation and polymerization, which could interfere with the isolation and quantification procedures (Dutton *et al.*, 1993).

Biometric parameters and oyster growth

Growth was evaluated in 5 animals per sampling time and oyster population. The same individuals were used for metal analysis. The length of the shell (from the hinge to the lower side of the valve) was measured to compare shell growth between diploid and triploid oysters. Flesh growth was monitored in three organs or groups of tissues: gills, digestive gland, and remaining tissues (gonad, mantle, adductor muscle, kidneys, heart). After thawing, dissected tissues were placed on absorbent paper and weighed (wet weight, ww). Each sample was homogenized in 20 ml polypropylene tubes with a tissue grinder (Ultra-Turrax T-25). An aliquot of homogenates was dried for 48 hours at 60°C , establishing the wet/dry weight ratios for each sample.

Metal determination in oyster tissues

Total Cd, Zn and Cu concentrations were analyzed in each tissue (n = 5 replicates) of the diploid and triploid populations. From sample homogenates, an aliquot was digested by nitric acid attack (3 ml of pure HNO_3) in a pressurized medium (borosilicate glass tube) at 95°C for 3 hours. The digestate was then diluted up to 20 ml with ultra-pure water (MilliQ plus). Cadmium concentrations were measured from 10 μl of sample mixed with 4 μl of a "50% Pd + 50% $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ " solution with an atomic absorption spectrophotometer (Varian AA400, Zeeman correction, Victoria, Australia) equipped with a graphite tube atomizer (model GTA

96, Varian). The detection limit was $0.1 \mu\text{g Cd.l}^{-1}$. Zn and Cu quantifications were carried out on the same samples by flame atomic absorption spectrophotometry (Varian AA220FS, Victoria, Australia). The detection limits were $5 \mu\text{g Zn.l}^{-1}$ and $20 \mu\text{g Cu.l}^{-1}$. The accuracy and validity of the analytical methods were simultaneously checked by the analysis of two standard biological reference materials (TORT-2, Lobster hepatopancreas; DOLT-2, Dogfish liver; NCR/CRNC, Ottawa, Canada). Values were consistent with the certified ranges (data not shown).

Metal concentrations were expressed on the dry weight basis ($\mu\text{g.g}^{-1}$, dw). Bioaccumulation levels in the whole soft bodies were determined from the metal burdens measured in the three compartments (gills, digestive gland, remaining tissues).

Metallothionein determination

MT concentrations in diploid and triploid oysters were determined by mercury-saturation assay using cold inorganic mercury (Dutton *et al.*, 1993 ; Baudrimont *et al.*, 1997b). MT analysis was carried out on gills, digestive gland and remaining tissues from 3 individuals per oyster population for each sampling time. Note that MT quantification in March was not performed owing to a technical problem during the sample storage. The saturation assay is based on mercury (Hg) having the strongest affinity of all trace metals for the MT binding sites ($\text{HgII} \gg \text{AgI} \sim \text{CuI} \gg \text{CdII} > \text{ZnII}$ - Vasák, 1991). The saturation capability of the molecule with metal ions in excess has been exploited for indirectly measuring MT concentrations (Couillard *et al.*, 1993 ; Baudrimont *et al.*, 1997b). To sum up, an acidified solution of nonradioactive Hg in excess (trichloroacetic acid 10% + 200 μl of 50 mg Hg.l^{-1}) was added to the cytosol of homogenized sample tissues to denature proteins other than MT and to replace any other metals bound to the MT molecule. A solution of lyophilised pig hemoglobin (Sigma H-4131) at 0.2 g Hb.ml^{-1} in Tris-HCl 30 mM buffer (pH 8.2 at 20°C) was used for scavenging excess free Hg and removing it from samples. Hg determination was performed by flameless atomic absorption spectrometry (AMA 254, Altec, Prague, Czech Republic). The detection limit was 1 ng Hg.

Reference samples or “blanks” (200 μl Tris-HCl 25 mM homogenization buffer – pH 7.2 at 20°C + 200 μl trichloroacetic HgCl_2 solution + 400 μl pig hemoglobin solution) were prepared to monitor the Hg complexation efficiency of the hemoglobin. Under our experimental conditions, an average burden of 2 ng Hg was measured in these reference samples, compared with the 10.000 ng initially added (0.02%). The mean of the three blank values measured in

each analytical run was deducted from the Hg burdens measured in each tissue sample replicate.

At the same time, a standard of purified rabbit liver MT (Sigma M-7641) was used to check the validity of the saturation assay by determining the ratio between the binding sites measured after Hg-saturation and the potential binding sites indicated by the supplier and previously verified by Hg, Cd, Zn and Cu determinations on purified MT solution ($10 \mu\text{g MT}\cdot\text{ml}^{-1}$ in the homogenization buffer). In our experimental conditions, the average value of the recovery percentage was $98.2 \pm 5.6\%$.

MT concentrations in oyster tissue were expressed in nanomoles of Hg-binding sites per gram, dry weight (based on measured Hg-binding capacities): $[(\text{ng Hg in sample}) / (\text{ml of supernatant})] \times [(\text{tissue dilution}) / (\text{Hg molar mass})] \times [\text{specific mean wet/dry weight ratio of analyzed tissue}]$ (Couillard *et al.*, 1993 ; Baudrimont *et al.*, 1997b). The mean wet/dry weight ratios for each tissue were: 8.2 ± 1.1 for gills (mean \pm SD; $n = 60$), 6 ± 1.2 for the digestive gland, 5.8 ± 0.7 for the remaining tissues and 6 ± 0.8 for the whole soft body. Note that Mann-Whitney tests revealed no significant difference between the tissue ratios of the two oyster populations for each tissue analyzed ($p > 0.05$). Owing to the fact that the exact quantity of Hg atom bound per saturated-MT molecule is unknown for this species, MT concentrations cannot be expressed in $\text{nmol MT}\cdot\text{g}^{-1}$.

Data analysis

Because shell lengths, tissue and whole soft body weights, metal and MT concentrations were not independent through time, these factors could not be included in a statistical variance analysis (ANOVA). Differences between diploid and triploid oysters for each sampling point or between two sampling times for one oyster population were therefore tested using the non-parametric Mann-Whitney U test. For all analyses, the level of significance was set at 0.05.

RESULTS

Diploid and triploid growth

Shell length

Shell length (in mm) of diploid and triploid oysters was measured over the ten months of the transplantation period (**Figure 67A**). At the beginning of the study, measurements revealed that the triploids were larger than diploids of the same age (15 months): 96.0 ± 0.5

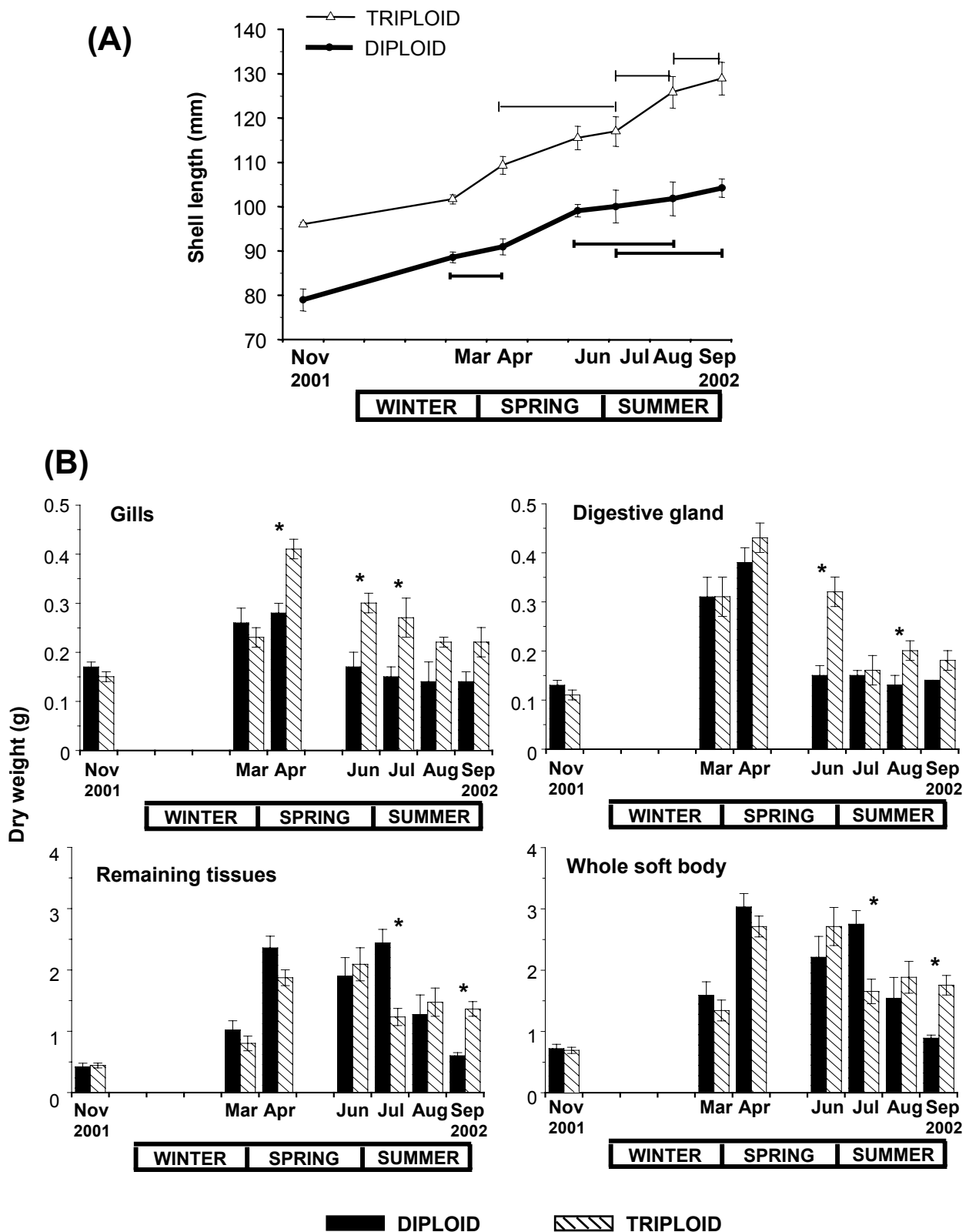


Figure 67: (A) Shell growth in length (in mm) and (B) dry weight (in g) of transplanted diploid and triploid oysters (*C. gigas*).

Mean values ($n=5$) \pm SE. The stars represent significant statistical differences between diploid and triploid oysters for each sampling point ($p<0.05$). The horizontal bars indicate values not significantly different between the sampling times ($p>0.05$).

mm and 78.9 ± 2.5 mm. Shell length increased during the study for both batches of oysters ($p < 0.05$) and at the end of the transplantation, an equal growth increase was observed for diploids and triploids: 32% and 34% respectively. Nevertheless, shell growth did not follow the same trend in the two populations: the diploids grew essentially between November and June (20.2 mm on average, *i.e.* 2.9 mm/month) and thereafter growth was reduced in the summer (5.2 mm, *i.e.* 1.7 mm/month) whereas shell growth in the triploids was relatively constant throughout the seasons, with a comparatively fast rate of shell growth during the summer (13.5 mm, *i.e.* 4.5 mm/month).

Organ and whole soft body weights

The mean dry weights (in g) of the different tissues and of the whole soft bodies are presented in **Figure 67B** for diploid and triploid oysters.

Despite a significant difference in the shell size at the beginning of the transplantation (November 2001), the initial dry weight of the tissues and of the whole soft bodies did not differ significantly (around 0.7 g, dw for the whole soft body). The largest weight increases occurred from November to April, leading to a significantly higher gill mass in triploids than in diploids. On the other hand, the average weight increase in the remaining tissues was similar for the two oyster populations. After April, the weights of somatic tissues (gills and digestive gland) progressively decreased, reaching values in September 2002 that were close to those measured at time zero. In the remaining tissues containing the gonad, the weight decrease occurred later, during summer in diploids, and also in triploids but to a lesser extent and only between June and July (decrease of 35%). It should be noted that no marked development of the gonad or characteristic state of maturation was observed during the dissection of triploid oysters. In the diploids, a first weight decrease occurred between April and June (31%). Thereafter, the tissue weight was restored in July and finally there was a gradual decrease until September leading to a reduction of 75% in the mean weight of the remaining tissues. Direct observation of dissected diploid specimens during the pre-spawning period systematically confirmed their ripeness. At the end of the transplantation phase, the average dry weight of the remaining tissues in the triploid oysters was significantly higher than that of the diploid oysters (x2.2).

The dry weight evolution at whole soft body level was closely related to that of the remaining tissues due to the high relative proportion of this compartment, notably in April: 78% on average of the whole soft body of diploids, 69% for triploids. After nearly one year of transplantation in the basin close to the Gironde estuary, the total weight gain was 150% for

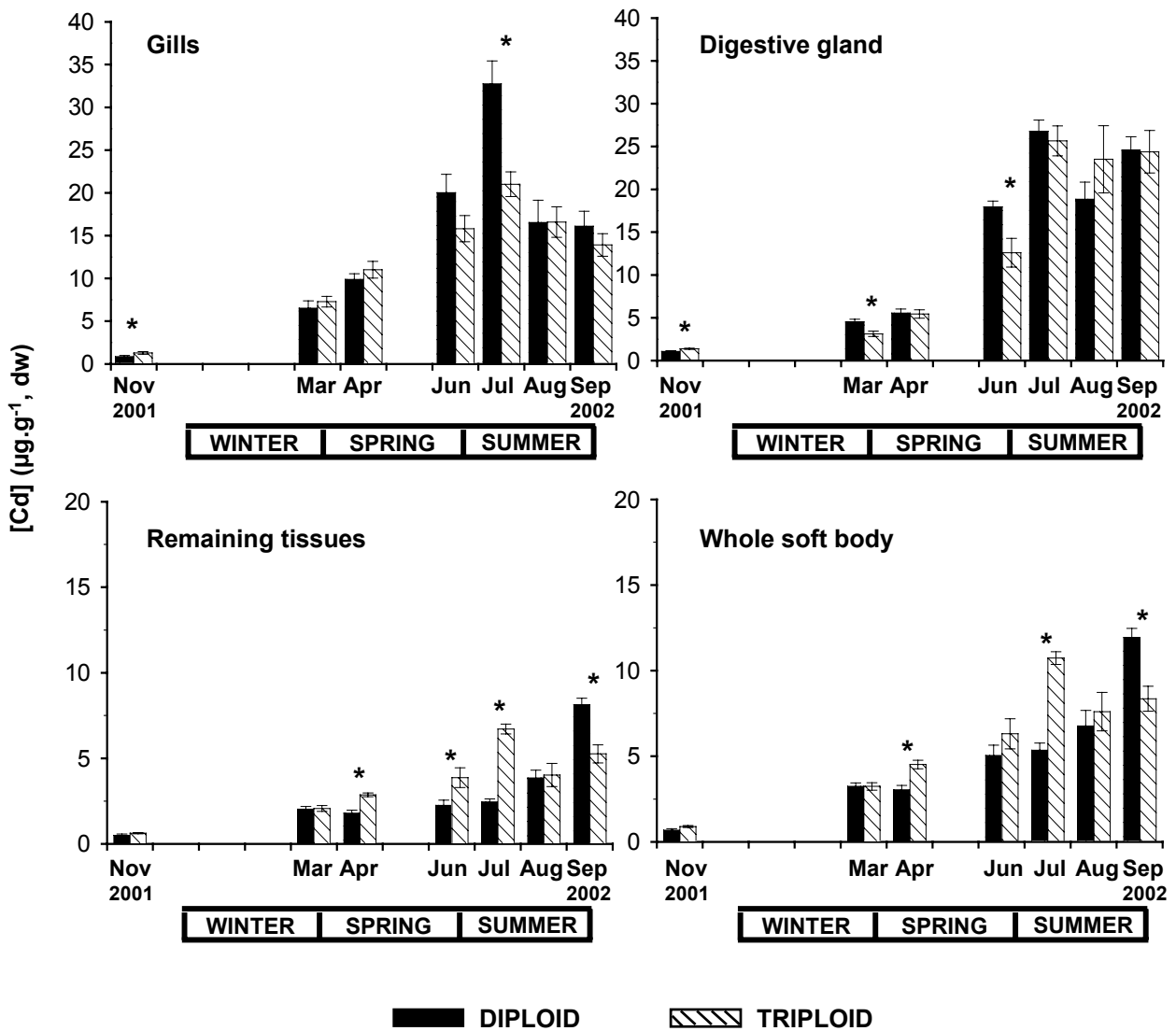


Figure 68: Total cadmium concentrations (in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, dry weight) in gills, digestive gland, remaining tissues and whole soft body of transplanted diploid and triploid oysters (*C. gigas*).

Mean values ($n=5$) \pm SE. The stars represent significant statistical differences between diploid and triploid oysters for each sampling point ($p < 0.05$).

triploids against only 27% for diploids at the whole soft body level (1.75 ± 0.2 g and 0.89 ± 0.1 g respectively).

Kinetics of metal bioaccumulation

Cadmium concentrations

Cadmium accumulation in the two somatic tissues (gills and digestive gland) revealed few differences between diploids and triploids (**Figure 68**). Concentrations progressively and significantly increased with time during winter/spring periods and the early summer. Maximum values were reached in July with a 38 fold increase compared with initial values in gills of diploids against only 17 in the triploids. In subsequent months, gill concentrations decreased, strongly in diploids but progressively in triploids and the same average values were measured in September (around $15 \mu\text{g Cd.g}^{-1}$, dw). In the digestive gland, similar maximum concentrations were reached in July (about $25 \mu\text{g Cd.g}^{-1}$, dw) and were maintained until the end of the transplantation period.

In the remaining tissues, Cd concentrations showed marked differences between diploids and triploids in relation to the weight fluctuations during the reproductive period (**Figure 67B**): (1) triploids exhibited a pattern of Cd bioaccumulation similar to that previously observed in gills and digestive gland, with a maximum concentration of $6.7 \pm 0.3 \mu\text{g.g}^{-1}$, dw in July (x11 compared with the initial values) when the gonad weight decreased slightly. Thereafter, a decrease occurred, and at the end of the study mean Cd concentration was $5.2 \pm 0.5 \mu\text{g.g}^{-1}$ (dw), *i.e.* 9 times higher than the initial level; (2) Cd measured in diploids increased slightly during the pre-spawning period and the mean concentration in the remaining tissues reached only $2.5 \pm 0.2 \mu\text{g.g}^{-1}$ (dw) in July, significantly lower than for triploids (factor 2.6). However, a marked increase in Cd concentrations occurred during the spawning period, leading to a maximum in September 2002 ($8.1 \pm 0.4 \mu\text{g.g}^{-1}$, dw; x16 compared to initial values).

At the whole soft body level, Cd concentrations reflected variations observed in the remaining tissues with maximum values when the weight of the oysters decreased (July for triploids, September for diploids – **Figure 67B**). However, no significant difference was established between these maximum concentrations (around $11 \mu\text{g Cd.g}^{-1}$, dw). At the end of the transplantation phase, mean value in the whole soft bodies was significantly higher in diploids (factor 1.5).

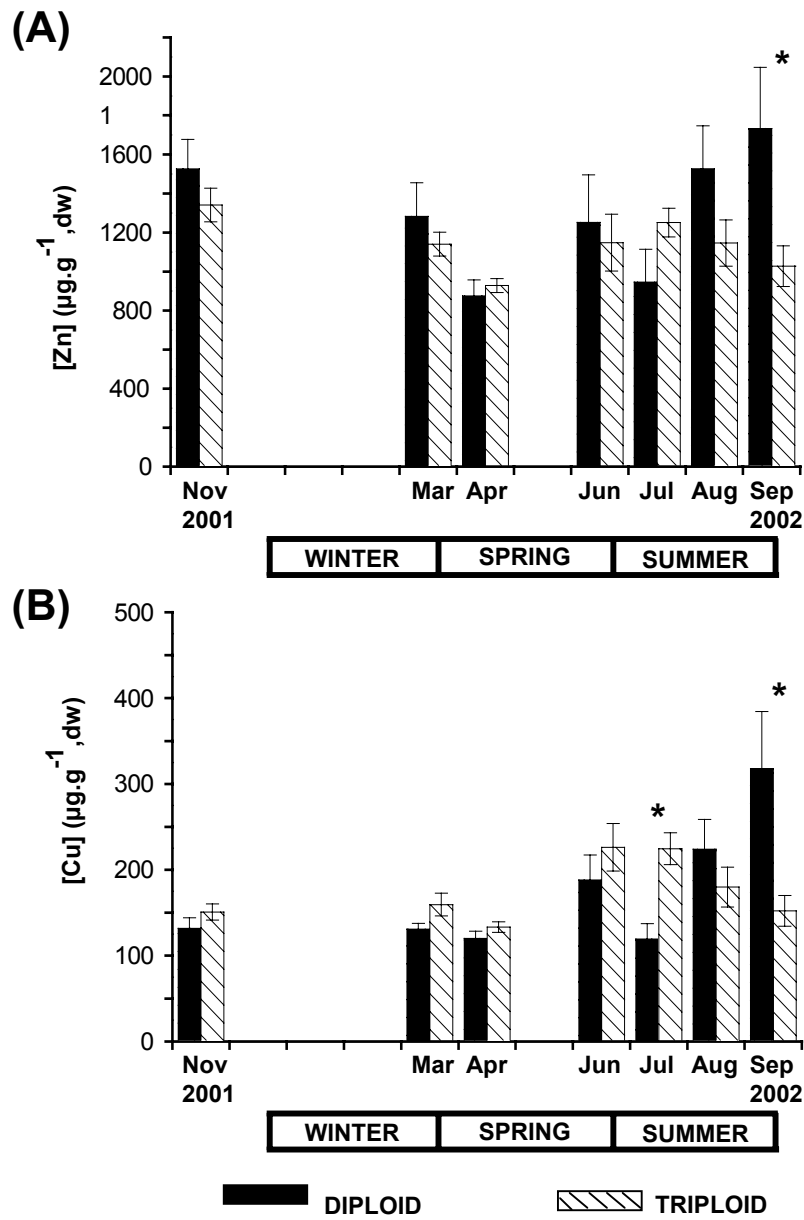


Figure 69: Total zinc and copper concentrations (in $\mu\text{g.g}^{-1}$, dry weight) in the whole soft body of transplanted diploid and triploid oysters (*C. gigas*).

Mean values ($n=5$) \pm SE. The stars represent significant statistical differences between diploid and triploid oysters for each sampling point ($p < 0.05$).

Zinc and copper concentrations

For Zn and Cu, total concentrations measured in the different tissues and at the whole soft body level showed minor accumulations compared to initial values throughout the transplantation period (**Figure 69**). Small differences were observed as a function of the diploid/triploid status of oysters. For Zn, concentrations revealed significant differences only in September in favor of diploids, with values nevertheless not significantly different from those at time zero. For Cu, a significant difference was observed in July with lower concentrations in diploids, whereas at the end of the transplantation, levels in diploids exceeded those in triploids with concentrations showing a 2-fold increase over those observed initially.

Metallothionein concentrations

MT concentrations (nmol sites Hg.g⁻¹, dry weight) in tissues and in the whole soft body of diploid and triploid oysters are shown in **Figure 70**.

In the gills, no difference was observed between the two populations except for July and August samplings. During the winter and spring periods, MT levels increased with a maximum concentration in June: the average values for diploids reached levels 18 times higher than the initial values in November 2001. Subsequently, MT concentrations decreased markedly until the end of the transplantation period, and similar mean values were measured for diploids and triploids (around 37 nmol sites.g⁻¹, dw, *i.e.* x2.3 the initial level).

The digestive gland recorded the highest MT concentrations. Maxima were reached in June, with significantly higher values in diploids (389 ± 51.2 compared to 283 ± 3 nmol sites.g⁻¹, dw). At the end of the transplantation phase, triploid MT levels were half those measured in the diploids, but significantly higher than the initial levels in November 2001 (x4 for diploids, x5.5 for triploids).

The remaining tissues revealed the strongest differences in term of MT response between the two oyster populations. A very marked increase in MT concentrations was observed in June only for diploids (266.6 ± 13.9 nmol sites.g⁻¹, dw; x10.6 compared to November 2001), followed by a progressive decrease, leading to an average level of 47.5 ± 10.5 nmol sites.g⁻¹ (dw) in September, close to the initial value. The evolution of MT concentrations in triploid remaining tissues clearly differed: while the average values measured at the end of the transplantation period were similar for diploid and triploid oysters, comparatively small variations were observed for the triploids, with maximum MT concentrations appearing in July (81.6 ± 5.7 nmol sites.g⁻¹, dw; x2.7 compared to November 2001).

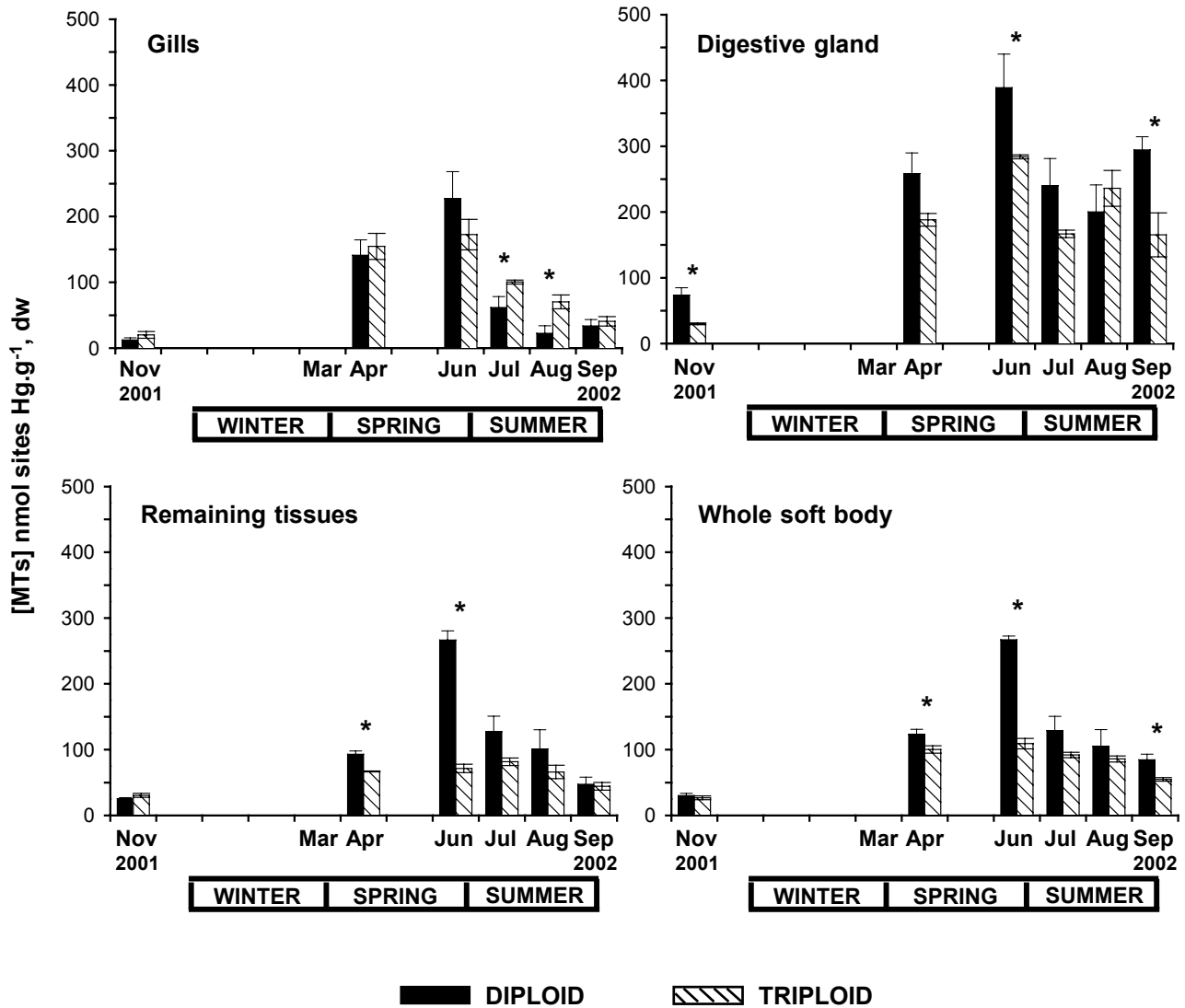


Figure 70: Metallothionein concentrations (in nmol sites Hg.g⁻¹, dry weight) in tissues (gills, digestive gland and remaining tissues) and whole soft body of transplanted diploid and triploid oysters (*C. gigas*).

Mean values (n=3) ± SE. The stars represent significant statistical differences between diploid and triploid oysters for each sampling point (p<0.05).

At the whole soft body level, changes in MT concentrations reflected the trends recorded in the remaining tissues. Maximum MT concentrations in diploids were reached in June (267.1 ± 5.4 nmol sites.g⁻¹, dw), with the same typical peak, which did not appear for the triploid specimens. Final MT values in September 2002 were significantly higher in diploids, due to the significant difference observed in the digestive gland.

DISCUSSION

Growth of diploid and triploid oysters

Pacific oysters are known for their exceptional fecundity and gonadic development: in our study, the remaining tissues containing the gonad represented as much as 78% of the whole soft body weight of diploids in the pre-spawning period (April). Diploid oyster growth follows a classic pattern with the reproductive cycle having a marked influence: after a “rest” period in winter, relatively short along the West European coast (Berthelin *et al.*, 2000), gonad differentiation is linked to rapid somatic growth, associated notably with glycogen storage which plays a central role in energetic and metabolic supply for gametogenesis (Allen and Downing, 1986 ; Berthelin *et al.*, 2000). The oyster gametogenesis stage occurs from the end of winter to early summer with an increase in the mean weight of somatic tissues (gills and digestive gland) and remaining tissues, in relation with considerable food supplies due to phytoplanktonic blooms occurring in the salt marshes. This stage is controlled by numerous environmental factors, such as temperature, food supply and salinity (Thompson *et al.*, 1996 ; Chavez-Villalba *et al.*, 2002). The cycle is completed by the accumulation of sexual material to the detriment of nutrient reserves in the somatic tissues (Gabbott, 1975); these processes can explain the higher weights of gills and digestive gland in triploids compared to diploids (**Figure 67B**). Finally, the reproductive cycle ends with the release of gametes during episodes of partial or total spawn in diploid oysters, indicating the spawning period between June and September. These spawns lead to a significant reduction in the mean dry weight of the remaining tissues of both populations during summer (75% and 35%, respectively). Thus, both diploid and triploid oysters, though the triploid to a lesser extent, appeared to spawn. A few studies have already mentioned the capacity of triploid oysters to produce gametes and spawn despite their reduced gonadal development: an increase in gamete content in the water (not necessarily competent) and a significant decrease in follicle cross-sectional area have been observed in triploid *C. gigas* following the spawn (Allen and Downing, 1986 ; Shpigel *et al.*,

1992). Nevertheless, triploid specimens appear to produce considerably less gametogenic material than ripe diploid oysters. In our study, the slight weight decrease in the remaining tissues during the spawning period confirms this pattern. Moreover, at the end of the spawning period transplanted triploid oysters showed larger weight gains, suggesting that this population indeed had a faster growth in flesh than diploids of the same age after the first gametogenesis and spawn event. This growth advantage can be linked to the energy reallocation from gametogenesis to somatic growth in adult triploids as observed for *C. gigas* produced from tetraploids as well as for those that had been chemically induced, or for triploid *Saccostrea commercialis* and *C. virginica* (Allen et Downing, 1986 ; Guo X *et al.*, 1996 ; Hand *et al.*, 1998 ; Nell, 2002). This could partly explain the constant shell growth of these oysters during the summer period unlike the diploids, where a notable reduction in the rate of shell length increase was observed (**Figure 67A**). Nevertheless, the energy reallocation does not explain why the triploid shell is already larger in size than that of diploids at the beginning of the transplantation phase (November 2001), *i.e.* before the first reproductive cycle.

Metal bioaccumulation and MT levels in diploid and triploid oysters

Oyster transplantation in the breeding basin connected to the Gironde estuary showed relevant metal accumulations at the whole soft body level. Maximum levels were lower than those measured in juvenile diploid *C. gigas* in a previous transplantation of 15 months (Baudrimont *et al.*, 2005). Generally, the results of metal bioaccumulation in the whole soft body and in the different tissues showed no major differences in the capacity to concentrate Cd, Zn and Cu between adult diploid and triploid *C. gigas*, under the chronic metal exposure. For each metal, maximum levels measured in both populations during the transplantation period were not significantly different. Of the three metals analyzed, Cd showed the strongest increases and bioaccumulation variations. They were markedly influenced by the weight variations associated with the reproductive cycle. This was particularly evident in diploid oysters for which a strong increase in Cd concentrations in the remaining tissues including the gonad was generated by the spawn and the associated significant weight loss after July. The corresponding Cd burdens in these tissues showed no significant variations from July to September, revealing the lack of Cd depuration during the release of the gametes into the surrounding medium. These results indicate that under our field exposure conditions, the gametes contain a negligible proportion of Cd compared with the quantity accumulated in the remaining tissues. The moderate variations in Cu and Zn concentrations in the whole soft bodies could be directly linked to their status of essential trace elements and to their

homeostatic regulations, already expressed in numerous other marine mollusks such as *Littorina littorea*, *Ruditapes decussatus*, *Macoma balthica*, or freshwater bivalves (*Anodonta grandis* or *Corbicula fluminea*) for which Cu and/or Zn bioaccumulation levels were not correlated to metal environmental loads (Langston and Zhou, 1986 ; Couillard *et al.*, 1995 ; Bordin *et al.*, 1997 ; Andres *et al.*, 1999 ; Serafim and Bebianno, 2001).

The main difference in the MT response between transplanted diploid and triploid oysters was in the remaining tissues: at the end of spring, a specific marked increase in MT concentrations was revealed in diploid oysters, leading to a factor close to 4 between the two populations in June. This peak contrasted with Zn and Cu concentrations that were not significantly different between the two populations and were even higher in triploid oysters for Cd (**Figures 69 and 68**). These results suggest that the major disparity in the MT response between diploid and triploid oysters was related to differential investment in the reproductive processes. Identified in June, and thus at the onset of the spawning period when gonadal development is maximal, this stimulation of MT biosynthesis in diploid oysters could be linked to gametogenic activity. The decrease in MT concentrations during the summer spawning period suggests the hypothesis of MT turnover in the remaining tissues or the presence of MT in released gametes. Indeed, the presence of MT has already been reported in unfertilized sea-urchin eggs (Ohtake *et al.*, 1983) and experimental studies on MT expression during embryonic and larval development have revealed the presence of maternal MT mRNA in eggs in *C. virginica*, as seen in other taxa (sea urchin, mouse) (Nemer *et al.*, 1984 ; Andrews *et al.*, 1991 ; Roesijadi *et al.*, 1996). In the same way, Moraga *et al.* (2005) observed the accumulation of MT in the nucleus of oocytes in gonad of *C. gigas* and suggest a role for MT in maturing gametes. However, the direct or indirect effects of factors controlling this reproductive phase, such as hormones, change in metal partitioning in gonadic tissues and environmental factors could also be implied in the acute production of MT in diploid oysters (Roesijadi, 1994b ; Couillard *et al.*, 1995). In contrast, in triploid oysters, the lack of the MT peak in June and over the entire summer period could be linked to the strong reduction in gonadal development and the reproductive processes involving endogenous MT induction factors. Other triploidy effects on MT biosynthesis can nevertheless be considered: for example, triploidy is characterized by pleiotropic phenotypes, among which are perhaps the signal transduction pathways triggered by environmental factors controlling oyster gametogenesis. These induction pathways could be affected by an unfavorable balance of the various effectors operating on MT responses in triploid oysters (transcription factors, protein kinases, etc.), which in turn could lead to a lesser

MT response in the remaining tissues. However, to our knowledge, no data are available in the literature regarding this hypothesis.

The importance of gills and digestive gland against metal bioaccumulation in bivalves is commonly recognized. Gills have a large exchange area, in direct contact with the surrounding environment, and represent the main barrier involved in metal uptake *via* the direct exposure route. The digestive gland reflected the long term metal exposure *via* the trophic route, acting as a storage compartment with globally the highest concentrations measured. As in the remaining tissues, maximum MT levels in gills and digestive gland were reached during the pre-spawning period, but differences observed between diploid and triploid oysters were comparatively small in the digestive gland (x1.5 in favor of diploid specimens) and were not significant in the gills. Whatever the tissue, no significant correlation was observed between MT concentrations and global Cd concentrations. These results are in agreement with several field studies showing no clear relationships between metal and MT concentrations in gills and/or the digestive gland of oysters under chronic exposure (Roesijadi, 1994b ; Mouneyrac *et al.*, 1999). In gills of *C. virginica*, the overall contribution of the MT fraction to the total metal concentrations was estimated at only 20% for Cd, 0.3% for Zn and 0.9% for Cu (Roesijadi, 1994b).

In conclusion, it will undoubtedly be appropriate in future to pay attention to the reproductive cycle when analysing variations in MT concentrations at the whole soft body level in diploid *C. gigas*. Our results suggest that the triploid oyster could represent an alternative model to free itself from the influence of the reproductive cycle on MT concentrations in environmental monitoring programmes. Outside the pre-spawning period, the presence of a third set of chromosomes has no effect on MT levels in the whole soft bodies compared to diploid population. These results indicate that the amounts of MT genes and MT proteins are not strictly linked, suggesting the presence of regulation mechanisms at the transcriptional and/or translational level. Thus, complementary studies on MT gene expression in diploid and triploid *C. gigas* will have to be developed in order to clarify the induction signals during gametogenesis, and to determine the mechanisms regulating MT production between the two ploidy statuses outside this period.

Acknowledgements

The authors thank B. Claude and D. Dufaure of “Bleu Médoc” farm for their cooperation. This work was carried out with the financial support of the GIS ECOBAG (MATE, AEAG, Aquitaine Region, CNRS/PEVS). V. Marie was supported by a grant from the Aquitaine Region. The assistance of H. Bouillard, V. Duflo and B. Etcheverria on the continuous sampling is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Allen SK and Downing SL (1986). Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **102**, 197-208.
- Andres S, Baudrimont M, Lapaquellerie Y, Ribeyre F and Maillet N (1999). Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France): I. Geochemical characteristics of the sampling sites and cadmium and zinc bioaccumulation kinetics. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**, 2462-2471.
- Andrews GK, Huet-Hudson YM, Paria BC, McMaster MT, De SK and Dey SK (1991). Metallothionein gene expression and metal regulation during preimplantation mouse embryo development (MT mRNA during early development). *Developmental Biology* **145**, 13-27.
- Baudrimont M, Lemaire-Gony S, Ribeyre F, Metivaud J and Boudou A (1997b). Seasonal variations of metallothionein concentrations in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*). *Comp. Biochem. Physiol. C* **118**, 361-367.
- Baudrimont M, Schafer J, Marie V, Maury-Brachet R, Bossy C, Boudou A and Blanc G (2005). Geochemical survey and metal bioaccumulation of three bivalve species (*Crassostrea gigas*, *Cerastoderma edule* and *Ruditapes philippinarum*) in the Nord Medoc salt marshes (Gironde estuary, France). *Sci. Total Envir.* **337**, 265-280.
- Berthelin C, Kellner K and Mathieu M (2000). Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comp. Biochem. Physiol. B* **125**, 359-369.
- Blanc G, Lapaquellerie Y, Maillet N and Anschutz P (1999). A cadmium budget for the Lot-Garonne fluvial system (France). *Hydrobiologia* **410**, 331-341.
- Bordin G, McCourt J, Cordeiro Raposo F and Rodriguez AR (1997). Metallothionein-like metalloproteins in the Baltic clam *Macoma balthica*: seasonal variations and induction upon metal exposure. *Mar. Biol.* **129**, 453-463.
- Chavez-Villalba J, Pommier J, Andriamiseza J, Pouvreau S, Barret J, Cochard J-C and Le Pennec M (2002). Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture* **214**, 115-130.

- Couillard Y, Campbell PGC and Tessier A (1993). Response of metallothionein concentrations in a freshwater bivalve (*Anodonta grandis*) along an environmental cadmium gradient. *Limnol. Oceanogr.* **38**, 299-313.
- Couillard Y, Campbell PGC, Tessier A, Pellerin-Massicotte J and Auclair JC (1995). Field transplantation of the freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. I. Temporal changes in metallothionein and metal (Cd, Cu, and Zn) concentrations in soft tissues. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **52**, 690-702.
- Dutton MD, Stephenson M and Klaverkamp JF (1993). A mercury saturation assay for measuring metallothionein in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* **12**, 1193-1202.
- Frazier JM and George SG (1983). Cd kinetics in oysters: a comparative study of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Mar. Biol.* **76**, 55-61.
- Gabbott PA (1975). Storage cycle in marine bivalve molluscs: a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. In Proceedings of the 9th European Marine Biology Symposium. H. Barnes, ed., p. 191–211. Aberdeen University Press, Scotland.
- Geffard A, Amiard JC and Amiard-Triquet C (2002). Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker: seasonal and intersite fluctuations. *Biomarkers* **7**, 123-137.
- George SG and Langston WJ (1994). Metallothionein as an indicator of water quality: assessment of the bioavailability of cadmium, copper, mercury and zinc in aquatic animals at the cellular level. In Water quality and stress indicators in marine and freshwater ecosystems: linking levels of organisation (individuals, populations, communities). D. W. Sutcliffe, ed., pp. 138-153. The Freshwater Biological Association, Ambleside.
- Guo X, DeBrosse GA and Allen SK (1996). All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. *Aquaculture* **142**, 149-161.
- Hand RE, Nell JA and Maguire GB (1998). Studies on triploid oysters in Australia: X. Growth and mortality of diploid and triploid Sydney rock oysters, *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). *J. Shellfish Res.* **17**, 1115-1127.
- Haq F, Mahoney M and Koropatnick J (2003). Signaling events for metallothionein induction. *Mutat. Res.* **533**, 211-226.
- Hawkins AJS, Day AJ, Gerard A, Naciri Y, Ledu C, Bayne BL and Heral M (1994). A genetic and metabolic basis for faster growth among triploids induced by blocking meiosis I but not meiosis II in the larviparous European flat oyster, *Ostrea edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **184**, 21-40.
- Kägi JHR (1991). Overview of metallothionein. *Methods Enzymol.* **205**, 613-626.
- Langston WJ and Zhou M (1986). Evaluation of the significance of metal-binding proteins in the gastropod *Littorina littorea*. *Mar. Biol.* **92**, 505-515.
- Moraga D, Meistertzheim A-L, Tanguy-Royer S, Boutet I, Tanguy A, and Donval A (2005). Stress response in Cu²⁺ and Cd²⁺ exposed oysters (*Crassostrea gigas*): An immunohistochemical approach. *Comp. Biochem. and Physiol. C* **141**, 151-156.

- Mouneyrac C, Berthet B and Amiard J-C (1999). Cd distribution in the tissues of oysters (*Crassostrea gigas*) exposed chronically *in situ*. *Water Air Soil Pollut.* **112**, 187-196.
- Nell JA (2002). Farming triploid oysters. *Aquaculture* **210**, 69-88.
- Nemer M, Travaglini EC, Rondinelli E and D'Alonzo J (1984). Developmental regulation, induction, and embryonic tissue specificity of sea urchin metallothionein gene expression. *Dev. Biol.* **102**, 471-482.
- Nordberg M (1998). Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta* **46**, 243-253.
- Ohtake H, Suyemitsu T and Koga M (1983). Sea urchin (*Anthocardia crassispina*) egg zinc-binding protein. Cellular localization, purification and characterization. *Biochem. J.* **211**, 109-118.
- Roesijadi G (1994b). Behavior of metallothionein-bound metals in a natural population of an estuarine mollusc. *Mar. Environ. Res.* **38**, 147-168.
- Roesijadi G, Hansen KM and Unger ME (1996). Cadmium-induced metallothionein expression during embryonic and early larval development of the mollusc *Crassostrea virginica*. *Toxicol. Appl. Pharm.* **140**, 356-363.
- Schäfer J, Blanc G, Lapaquellerie Y, Maillet N, Maneux E and Etcheber H (2002). Ten-year observation of the Gironde tributary fluvial system: fluxes of suspended matter, particulate organic carbon and cadmium. *Mar. Chem.* **79**, 229-242.
- Serafim MA and Bebianno MJ (2001). Variation of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of the clam *Ruditapes decussatus*: Sex and seasonal effects. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**, 544-552.
- Shpigel M, Barber BJ and Mann R (1992). Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology, and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **161**, 15-25.
- Thompson R, Newell R, Kennedy V and Mann R (1996). Reproductive processes and early development. In *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. R. N. a. A. E. V. Kennedy, ed., p. 335-370. Maryland Sea Grant Books, Maryland.
- Unger ME and Roesijadi G (1996). Increase in metallothionein mRNA accumulation during Cd challenge in oysters preexposed to Cd. *Aquat. Toxicol.* **34**, 185-193.
- Vasák M (1991). Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins. *Methods Enzymol.* **205**, 452-458.
- Viarengo A, Burlando B, Ceratto N and Panfoli I (2000). Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell. Mol. Biol.* **46**, 407-417.
- Viarengo A and Nott JA (1993). Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C* **104**, 355-372.

CONCLUSION DE L'ETUDE DE TRANSPLANTATION DANS LE BASSIN AQUACOLE EN BORDURE DE L'ESTUAIRE DE LA GIRONDE

Les résultats de cette étude n'ont pas révélé de différences majeures en terme de capacité à accumuler les métaux entre les huîtres adultes diploïdes et triploïdes. L'analyse comparative de la réponse des MTs entre les deux populations a révélé le rôle prépondérant des facteurs liés au cycle de reproduction chez les huîtres adultes diploïdes au début de la période de ponte (maximum de maturité sexuelle). Ces facteurs induisent, à l'échelle du corps mou entier, des concentrations significativement plus élevées que pour les individus triploïdes, en particulier dans les tissus contenant la gonade. En dehors de cette période, aucune différence marquée entre les deux populations d'huîtres adultes n'a été observée pour la réponse protéique des MTs dans les tissus.

A ce stade de nos recherches, la réalisation d'études complémentaires était nécessaire, afin de caractériser plus précisément la réponse de ces protéines chez les individus diploïdes et triploïdes à l'égard de la bioaccumulation du Cd et du Zn et de comprendre les mécanismes équilibrant les concentrations de MTs en dehors de la période de reproduction. En effet, il est nécessaire de vérifier si l'isoforme CgMT2, qui semble posséder des capacités supérieures de fixation en relation avec la présence d'un deuxième domaine β (Tanguy et Moraga, 2001 ; Tanguy *et al.*, 2001), module à elle seule la réponse globale des MTs et masque des différences entre les huîtres triploïdes et diploïdes. En effet, même si les capacités de séquestration des MTs engagées pour les deux populations se révèlent identiques par le dosage des protéines avec la technique de saturation, le niveau d'expression de chacune des isoformes pourrait néanmoins différer.

Une étude comparative entre des lots d'huîtres diploïdes et triploïdes a donc été menée en laboratoire, afin de contrôler les conditions d'exposition par le cadmium et par le zinc, isolément et en mélange. L'expression des gènes des isoformes de MTs a été analysée conjointement à la réponse protéique et la bioaccumulation des métaux.

4-3. CARACTERISATION DE LA REPOSE DES METALLOTHIONEINES CHEZ LES HUITRES JUVENILES TRIPLOÏDES ET DIPLOÏDES *Crassostrea gigas* APRES EXPOSITION AU CADMIUM ET/OU AU ZINC. ETUDE EXPERIMENTALE

Rappelons que pour l'espèce *C. gigas*, deux gènes d'isoformes et un ADNc de MTs ont, à ce jour, été séquencés : *CgMT1*, *CgMT2* et *CgMT3* (Tanguy et Moraga, 2001 ; Tanguy *et al.*, 2001). Les deux gènes (*CgMT1*, *CgMT2*) possèdent des séquences nucléotidiques très proches au niveau de la partie codante, mais aussi au niveau des régions 3' et 5' non codantes. Néanmoins, des différences notables ont été décrites entre le nombre de copies de séquences MRE dans la région promotrice (1 copie pour *CgMT2*, 2 pour *CgMT1*) et dans le doublement de la séquence codant pour le domaine β dans *CgMT2*. Il s'agit là d'un modèle atypique, conduisant à la biosynthèse de MT ayant trois domaines ou "clusters" (α - β - β), au lieu des deux classiquement rencontrés (α - β). Cette structure originale peut conférer à la protéine *CgMT2* de *C. gigas* des potentialités de fixation des métaux supérieures à celles des deux autres isoformes (Tanguy et Moraga, 2001).

L'étude que nous avons réalisée *in situ* (voir section 4-2.), en utilisant des huîtres adultes, a révélé la difficulté de caractériser la réponse spécifique des MTs en réponse aux accumulations métalliques, en raison de l'influence prononcée du cycle de reproduction, en interaction avec les conditions abiotiques et biotiques et du caractère polymétallique de la contamination.

Pour minimiser, voire supprimer, les effets directs et indirects de ces facteurs et caractériser plus précisément la réponse des MTs chez *C. gigas*, nous nous sommes placés en conditions contrôlées de laboratoire. Deux contaminants métalliques ont été retenus, le Cd et le Zn. Cette expérience a été menée sur des huîtres juvéniles diploïdes et triploïdes, nous permettant : (i) de s'affranchir de l'influence du cycle de reproduction, afin de comparer la réponse MTs entre les deux statuts de ploïdie sur une même base (différences génétiques) ; (ii)

de quantifier l'induction des différents gènes des isoformes en réponse à la bioaccumulation du Cd et du Zn, présents isolément ou en mélange dans le milieu, aucune étude n'ayant été réalisée dans ce domaine ; (iii) d'estimer l'influence potentielle de l'augmentation du nombre de copies des gènes *mt* chez les individus triploïdes par rapport aux diploïdes, sur la réponse génique pour les trois isoformes de MT ; (iv) de connaître si hors reproduction, les mêmes niveaux protéiques de MTs mesurés précédemment par la technique de saturation chez les individus adultes triploïdes et diploïdes (étude *in situ*) sont le résultat de l'induction différentielle ou non de chacune des isoformes. Dans ce dernier cas, cette étude devrait nous permettre d'appréhender les mécanismes mis en jeu pour réguler, malgré la présence d'un troisième jeu de chromosomes chez les triploïdes, la production des MTs entre les deux statuts de ploïdie (régulation transcriptionnelle et/ou traductionnelle).

Ainsi, nous avons étudié l'induction différentielle des gènes de MTs et les niveaux protéiques associés dans les branchies d'huîtres juvéniles diploïdes et triploïdes, après exposition au Cd et au Zn, ajoutés isolément ou en mélange dans le milieu. Ces recherches sont présentées dans l'article "*Metallothionein gene expression and protein levels in triploid and diploid oysters Crassostrea gigas after exposure to cadmium and zinc*", accepté pour publication dans "*Environmental Toxicology and Chemistry*".

***Metallothionein gene expression and protein levels
in triploid and diploid oysters *Crassostrea gigas* after exposure
to cadmium and zinc¹***

Marie Véronique[†], Gonzalez Patrice[†], Baudrimont Magalie[†], Boutet Isabelle[‡], Moraga Dario[‡],
Bourdineaud Jean-Paul[†], Boudou Alain[†]

[†] Laboratoire d'Ecophysiologie et Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques (LEESA), UMR CNRS 5805,
Université Bordeaux 1, Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France

[‡] Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR CNRS 6539, Institut Universitaire
Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Technopôle Brest-Iroise, Place Nicolas Copernic, 29280
Plouzané, France

KEYWORDS

Crassostrea gigas, Diploid, Triploid, Metallothionein, Real-time Quantitative PCR

¹ Article accepté pour publication dans *Environmental Toxicology and Chemistry*

METALLOTHIONEIN GENE EXPRESSION AND PROTEIN LEVELS IN TRIPLOID AND DIPLOID OYSTERS *CRASSOSTREA GIGAS* AFTER EXPOSURE TO CADMIUM AND ZINC

VÉRONIQUE MARIE,† PATRICE GONZALEZ,† MAGALIE BAUDRIMONT,† ISABELLE BOUTET,‡ DARIO MORAGA,‡
 JEAN-PAUL BOURDINEAUD,† and ALAIN BOUDOU*†

†Laboratoire d'Ecophysiologie et Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques (LEESA), Université Bordeaux 1/UMR CNRS 5805,
 Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France

‡Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR CNRS 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer,
 Université de Bretagne Occidentale, Technopôle Brest-Iroise, Place Nicolas Copernic, 29280 Plouzané, France

(Received 17 February 2005; Accepted 12 July 2005)

Abstract—Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) was used to compare for the first time the differential expression of metallothionein (MT) isoform genes, together with biosynthesis of the total MT proteins, in the gills of triploid and diploid juvenile Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to cadmium (Cd) and zinc (Zn) exposure. Oysters were exposed to Cd (0.133 μ M), Zn (15.3 μ M), and Cd+Zn for 14 d. Results showed similar response capacities to metal exposures in the two populations. No significant difference was revealed in terms of MT gene expression, MT protein synthesis, and Cd accumulation. However, triploid oysters bioaccumulated Zn 30% less efficiently than diploid oysters. Among the three MT isoforms, *CgMT2* appeared to be more expressed than *CgMT1*, whereas *CgMT3* appeared to be anecdotal (10 times lower than *CgMT2*). *CgMT2* and *CgMT1* gene expression levels were increased sevenfold in the presence of Cd, whereas Zn appeared to have no effect. A twofold increase in MT protein levels occurred in response to Cd exposure. Discrepancies between mRNA and protein levels suggest that in *gigas* MT are regulated at the transcriptional level, as well as at the translational level.

Keywords—*Crassostrea gigas* Diploid Triploid Metallothionein Expression levels

INTRODUCTION

Triploidy in oysters has been developed to enhance the production and selling period of commercial bivalve species [1,2]. Triploid individuals are characterized by three sets of chromosomes, against two for diploid oysters. Classically, triploid oysters are recognized as having reduced gametogenic activity and could be viewed as an adjunct tool in studies of reproductive biology and related physiological aspects such as growth, glycogen utilization, and survival [2–4]. In the ecotoxicological field, oysters like mussels are widely used as bioindicators in monitoring programs in coastal areas, especially in relation to their strong capacities of heavy metal accumulation [5].

Numerous field or experimental studies have shown the key role of metallothioneins (MTs) in sequestration and detoxification of toxic metals (e.g., cadmium [Cd], mercury [Hg]), as well as their important role in the metabolism of essential elements (e.g., zinc [Zn], copper [Cu]). These cytosolic proteins belong to a family of low-molecular mass and cysteine-rich proteins, in which biosynthesis can be induced by intracellular metal accumulation. Nevertheless, many other important functions have been reported, such as free radical scavenging or immune response [6].

In this paper, we investigated whether the presence of an additional set of chromosomes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* could be at the origin of modifications in MT biosynthesis in response to metal exposure. Indeed, a long-standing assumption has been that each additional gene copy would

contribute equally to expression levels after polyploidization. This occurrence could induce better physiological performances (feeding rate, absorption, and growth efficiency) because of a faster potential for transcription [7]. Nevertheless, some exceptions exist, notably as a consequence of gene silencing after polyploidization [8]. The development of triploidy in aquaculture raised the question of whether this parameter can be at the origin of changes in oyster resistance under stressful metal conditions in relation to a possible influence on metal accumulation (absorption and detoxification). To our knowledge, consideration of such a genetic factor (polyploidy) as a source of variation of MT expression has not been analyzed so far for bivalves.

In *C. gigas*, three MTs have been reported to date [9,10]. The *CgMT1* and *CgMT2* genes have been characterized, whereas *CgMT3* is only available as a complementary DNA (cDNA) sequence. The *CgMT1* and *CgMT2* possess quasi-similar sequences and can be differentiated by their molecular organization. Indeed, whereas *CgMT1* encodes for a classical $\alpha\beta$ domain organization, *CgMT2* presents an additional β -domain.

However, the differential expression level of each MT is not yet known. Moreover, nothing is known about the expression of *CgMT3*.

In this context, we have set up an experimental study with juvenile diploid and triploid oysters to investigate Cd and Zn effects on MT biosynthesis in gills. Cadmium and Zn were selected as toxic and essential elements, respectively; they are often present simultaneously in the environment, notably in manufacturing wastes from extraction and treatment of Zn ores. These two metals were added to the water individually

* To whom correspondence may be addressed
 (a.boudou@epoc.u-bordeaux1.fr).

and in combination to study their potential interactive effects. Two complementary approaches were used to quantify MT biosynthesis: global protein determination with the HgII saturation assay, and differential expression of the three MT genes by quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR). In addition, metal concentrations in the gills were determined after a two-week exposure period of diploid and triploid oysters.

MATERIALS AND METHODS

Experimental metal exposures

Juvenile diploid and triploid *C. gigas* oysters (12 months old, 5.7 ± 0.1 cm shell length) were obtained from an oyster farmer in Arcachon Bay, on the French Atlantic coast, in September 2003. Triploidy in oysters was originally achieved by crossing diploid females and tetraploid males. A total of 288 individuals were acclimated for 7 d before the experiment began in tanks containing aerated artificial seawater prepared with Instant Ocean synthetic sea salt (Mentor, OH, USA) in dechlorinated tap water and adjusted to $\pm 5.5\%$. Subsequently, diploid and triploid oysters were transferred into four polypropylene tanks (60 L) at a density of 36 animals of each population per tank. In these tanks, the oysters were exposed for 14 d to $0.133 \mu\text{M}$ Cd ($15 \mu\text{g/L}$), $15.3 \mu\text{M}$ Zn (1 mg/L), or a combination of both metals ($0.133 \mu\text{M}$ Cd + $15.3 \mu\text{M}$ Zn) adjusted in water from stock aqueous solutions CdCl_2 (0.266 mM for Cd and 15.3 mM for Zn). These exposure levels are appropriate for significant metal accumulation after 14 d of exposure. The fourth tank contained untreated individuals (controls). Experiments were performed at 20.5°C , pH 8.5 ± 0.3 , with 9.5 mg/L of dissolved O_2 under a 12:12 h light:dark photoperiod. Water in each tank was renewed every 2 d to maintain contamination pressure throughout the experiment and to avoid changes in the physicochemical parameters. Metal concentrations were measured in water samples collected at the end of each renewal cycle (7 for each condition). Results showed a very small decrease, close to 4%, with no significant variations during the 14 d of the experiment: $14.4 \pm 0.2 \mu\text{g Cd/L}$ and $0.96 \pm 0.02 \text{ mg Zn/L}$. Same values were obtained when the two metals were added simultaneously. On alternate days, the oysters were fed with a restricted quantity of fresh green marine algae (0.05 g from a culture of *Isochrysis galbana*) to minimize metal transfers via the trophic exposure route.

Flow cytometry analysis of hemocyte DNA content

Flow cytometry measurements of hemocyte DNA content were performed to validate ploidy status of exposed populations. After 14 d of exposure, the hemolymph of 30 randomly selected individuals for each treatment (15 diploid and 15 triploid oysters) was withdrawn and processed individually for analysis. Hemolymph ($0.5\text{--}1 \text{ ml}$) was collected from the adductor muscle sinus with a sterile 1 ml syringe equipped with a needle ($0.9 \times 25 \text{ mm}$) and filtered ($8 \mu\text{m}$) to eliminate aggregates or large pieces of debris. Hemolymph samples were conserved on ice to prevent hemocyte aggregation [11]. Hemocytes were washed in sterile seawater by centrifugation ($200 \times g$, 10 min). After hemocyte collection, oysters were frozen at -80°C under nitrogen atmosphere to ensure anoxic conditions and kept for biochemical and genetic analysis and metal determination performed two months later. The hemocyte samples were treated with solutions of trypsin (30 mg/L) and

ribonuclease A (100 mg/L) and stained with propidium iodide for a minimum of 1 h according to the method described by Vindelov and Christensen [12]. Red fluorescence signals emitted by the propidium iodide-stained hemocyte nuclei were collected with a flow cytometer at 617 nm (Becton Dickinson Immunocytometry Systems FACScalibur, San Jose, CA, USA). Chicken blood cells were used as an internal control in each sample for calibration (reference peaks) and to estimate average DNA content of oyster hemocytes. Light emission was analyzed on 10,000 events per sample. For fluorescence-level analysis, frequency distribution histograms were established with Cell Quest software (Becton Dickinson). A relative mean fluorescence intensity was calculated by the software from these histograms for selected cell populations and expressed in a range of 1 to 10 arbitrary units then used to estimate hemocyte DNA. Most oysters analyzed per exposure condition were found to be diploid or triploid, as expected. The few mosaic individuals found in the triploid population (4%) were discarded from our analysis.

Metal determination

Of all the bivalve organs, the gills have proved to be the most suitable for analyses because they represent the main barrier involved in metal uptake via the direct exposure route, with a large exchange area in contact with the surrounding environment [13]. Gills from three oysters used for ploidy determination were dissected after thawing dried on absorbent paper and weighed (wet wt). Samples were digested in 3 ml of concentrated nitric acid added to a pressurized medium (borosilicate glass tube) at 125°C for 3 h. The resulting digestate was diluted to 20 ml with ultrapure water (MilliQ Plus[®], Millipore, Saint Quentin-Yvelines, France) and analyzed by atomic absorption spectrophotometry [14]. The Cd determinations were performed with a polarized Zeeman atomic absorption spectrophotometer (Varian AA400; Victoria, Australia) equipped with a graphite tube atomizer (model GTA 96, Varian). To avoid interferences, the appropriately diluted digestates were analyzed in a tube atomizer with a mixture of Pd+Mg(NO_3)₂. The detection limit was $0.1 \mu\text{g Cd/L}$ ($3 \times$ the standard deviation of 10 reagent blanks). Zinc concentrations were carried out on the same samples by flame atomic absorption spectrophotometry (Varian AA220FS). The detection limit was $5 \mu\text{g Zn/L}$. The analytical methods were simultaneously validated for each sample series by the analysis of standard biological reference materials (TORT-2, lobster hepatopancreas; DOLT-2, dogfish liver; National Research Council of Canada, Ottawa, ON). Percent recovery of metals was $98 \pm 2\%$ for Cd and $100 \pm 2\%$ for Zn ($n = 8$).

The results are expressed as average metal concentrations accumulated in oyster gills (in nmol Cd/g [wet wt] SE and $\mu\text{mol Zn/g}$ [wet wt] \pm SE) for three samples from each population and metal exposure.

Mercury saturation assay

The levels of total MT proteins in gills from diploid and triploid oysters were determined by mercury saturation assay as previously described with the use of cold inorganic mercury (three gills from three different oysters) per exposure condition for each oyster population, with the saturation assay repeated twice per sample. This technique is based on the quantification of Hg bound to the saturated MT. The denaturation of non-MT proteins was performed with trichloroacetic acid, and the

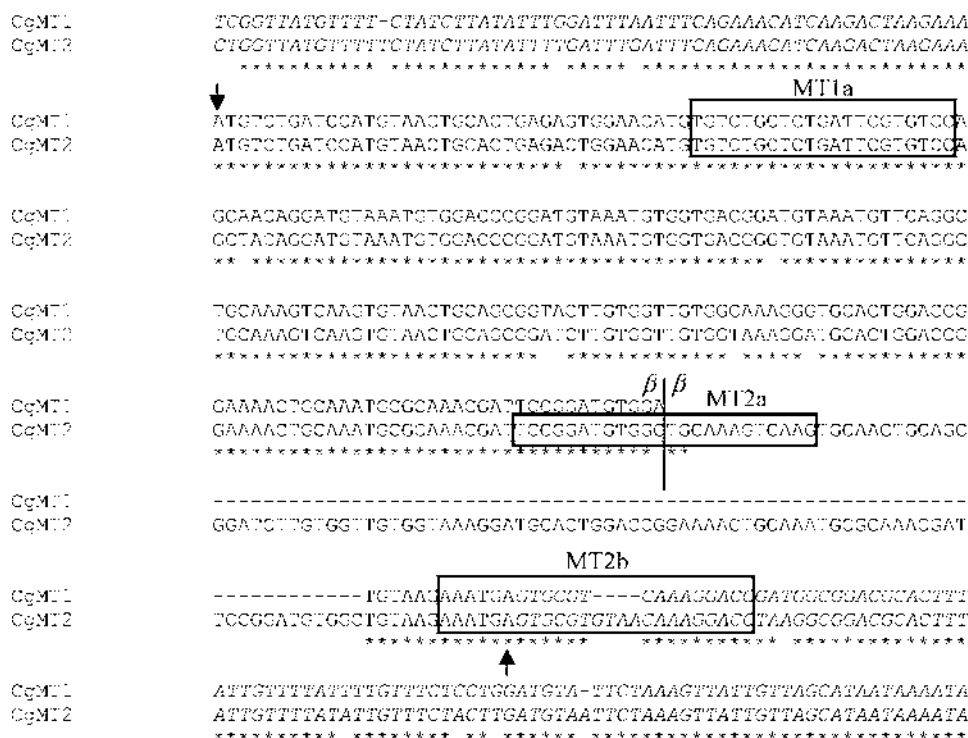


Fig. 1. Alignment of the *CgMT1* and *CgMT2* complementary DNA sequence from *Crassostrea gigas*. Position of MT1a, MT2a, and MT2b primers are framed. Sequence of the first β domain of *CgMT2* is underlined and stop codons are indicated with arrows. The 5 and 3' untranslated sequences are in italic. Asterisks represent identical nucleotides at the same position in *CgMT1* and *CgMT2*.

excess Hg not bound to the MT was removed by scavenging manufacturer's instructions. The quality of all RNAs produced with lyophilized pig hemoglobin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 0.05 g Hb/ml in 30 mM Tris-HCl buffer (pH 8.2 at 20°C) [15]. The final supernatant was then recovered and used for Hg determination by flameless atomic absorption spectrometry (AMA 254, Altec, Prague, Czech Republic). The detection limit was estimated at 1 ng Hg.

Reference samples or blanks (200 μ l Tris-HCl homogenization buffer + 200 μ l trichloroacetic HgCl₂ solution + 400 μ l pig hemoglobin solution) were prepared to monitor Hg complexation efficiency of the hemoglobin. Under our experimental conditions, an average burden of 1.2 ng Hg was measured in these reference samples, compared with the 10,000 μ l of oligo-desoxynucleoside triphosphates (-dNTPs) and 1 ng initially added (0.01%). The mean of the three blank values measured in each analytical run was deducted from the Hg burdens measured in each replicate tissue sample.

At the same time, a standard of purified rabbit liver MT (Sigma) was used to check the validity of the saturation assay by determining the ratio between the binding sites measured after Hg saturation and the potential binding sites indicated by the supplier and previously verified by Hg, Cd, Zn, and Cu determinations on purified MT solution (10g MT/ml in the homogenization buffer). In our experimental conditions, the average value of the recovery percentage was 100.47%. MT concentrations in oyster gills were expressed in nanomoles of Hg binding sites per gram (nmol Hg sites/g [wet wt] SE). Because the exact number of Hg binding sites per MT molecule is unknown for this species, MT concentrations cannot be expressed as nanomoles of MT per gram (wet wt).

Total RNA extraction

Total RNAs were extracted from 40 mg of gills with the Absolutely RNA reverse transcriptase PCR (RT-PCR) Mini-prep kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA), according to the

was evaluated by electrophoresis on a 1% agarose-formaldehyde gel, and concentration was determined by spectrophotometry. For each exposure condition, samples were carried out in triplicate. Each sample was obtained by mixing gills from two individuals.

Reverse transcription of RNA

First-strand complementary DNA (cDNA) was synthesized from 5 μ g total RNAs with the Stratascript First-Strand Synthesis System (Stratagene). Briefly, RNAs were adjusted to 38 μ l with diethyl pyrocarbonate-treated water. After addition of 1 μ l of oligo-desoxynucleoside triphosphates (-dNTPs) and 1 μ l of random primers, the reaction was incubated at 65°C for 5 min. Then 40 units of RNase block ribonuclease inhibitor, 2 μ l of 100 mM dNTP, 5 μ l of 10 \times first-strand buffer, and 50 units of Stratascript reverse transcriptase were added. The reaction was incubated for 1 h at 42°C in an Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). The cDNA mixture was kept at -20°C until required for real-time PCR analysis.

Primer design

To determine specific primer pairs, the nucleotide sequences from *CgMT1* (AJ242657) and *CgMT2* (AJ297818) were aligned. Indeed, these two genes possessed nearly the same 5' and 3' untranslated regions and the same α domain sequences, but *CgMT2* was characterized by the occurrence of an additional β domain. From the alignment, the specific primer pair MT2a-MT2b was deduced to amplify *CgMT2*, where MT2a was chosen at the $\beta\beta$ domain junction (Fig. 1). The primer pair MT1a-MT2b allows the amplification of both *CgMT1* and *CgMT2*. Indeed, PCR products with this primer pair on plasmids containing *CgMT1* and *CgMT2* cDNA, used

Table 1. Specific primers used in quantitative real-time polymerase chain reaction

Name	Sequence
MT1a	5'-TGTCTGCTCTGATTTCGTGTCC-3'
MT2a	5'-TCCGATGTGGCTGCAAAGTCAAG-3'
MT2b	5'-GGTCTTTGTTACACGCACTCATT-3'
MT3a	5'-GCTCTGCTCAATGTACTAGCG-3'
MT3b	5'-GTCCACACAAATCGTTGAAACC-3'

independently or mixed in equimolar quantities, possessed an intensity ratio roughly equal to 1.5, meaning an equimolar amount of amplified fragments. Quantification of the *CgMT1* gene expression was therefore deduced by subtracting the quantification corresponding to the *CgMT2* gene expression (MT2a–MT2b primer pair) from the quantification obtained with the MT1a–MT2b primer pair. Specific primers (MT3a–MT3b) were determined from the *CgMT3* sequence (AJ295157). All the primers used in this study are reported in Table 1.

Real-time PCR

Real-time PCR were performed in a LightCycler (Roche Meylan, France) according to the manufacturer's instructions (one cycle at 96°C for 10 min; 50 amplification cycles at 95°C for 5 s, 60°C for 5 s, and 72°C for 20 s). Each 20- μ l reaction contained 1 μ l of reverse transcribed product template; 1 μ l of master mix, including the SYBR Green I fluorescent dye (Roche), enabling the PCR amplification to be monitored and the primer pair MT1a–MT2b, MT2a–MT2b, or MT3a–MT3b at a final concentration of 300 nM for each primer. To quantify transcript levels, a standard reference was obtained by cloning the *CgMT1* PCR product from *C. gigas* in the pGEMT vector. After transformation of the *Escherichia coli* JM109 strain, a large amount of plasmid was obtained and quantified by spectrophotometry. Dilutions of this plasmid were used as standard reference in real-time PCR with the MT1a–MT2b primer pair.

Reaction specificity was determined for each reaction from the dissociation curve of the PCR product. This dissociation curve was obtained by following the SYBR Green fluorescence level during a gradual heating of the PCR products from 60 to 95°C. The MT mRNA quantifications were expressed in number of copies (μ g total RNAs \pm SE).

Statistical analysis

Because diploid and triploid oysters were placed in the same tank for each treatment they could not be considered like true replicates. In this context, parametric analyses are violated (normality and homogeneity of variances). Significant differences between metal concentrations, MT concentrations, and number of mRNA copies were determined with the nonparametric Mann–Whitney *U* test (Statistica 5.1, StatSoft, Tulsa, OK, USA). Results were considered statistically significant at $p < 0.05$. Interindividual variability for each experimental condition was defined by the mean SE.

RESULTS

Oyster growth, as reflected in mean soft tissue weights and mean shell lengths, was not significant and did not differ among treatments during the exposure period.

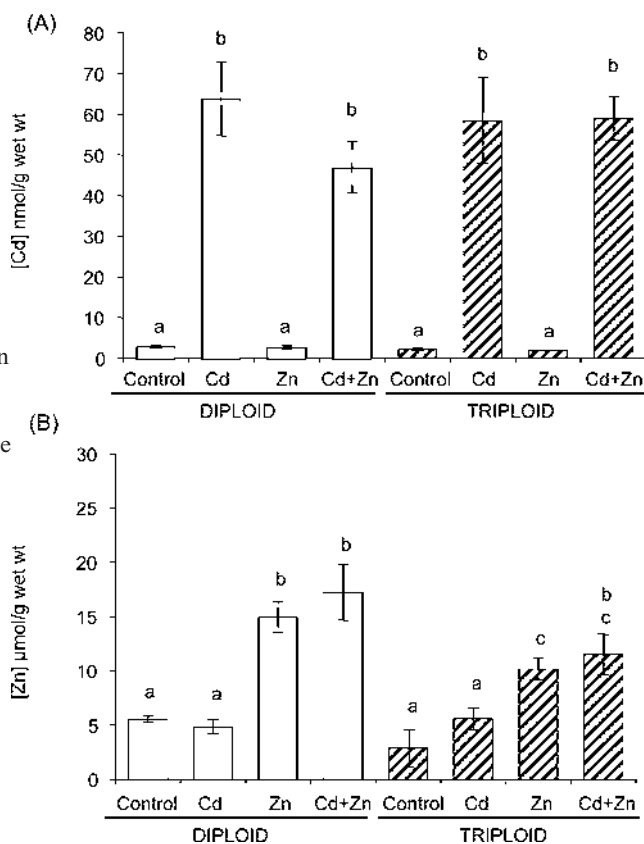


Fig. 2. Mean levels of (A) cadmium (nmol Cd/g [wet wt] \pm SE; $n = 3$) and (B) zinc (μ mol Zn/g [wet wt] \pm SE; $n = 3$) in the gills of diploid and triploid oysters in control, cadmium, or zinc treatments or a combination treatment (0.13 μ M Cd and 15.3 μ M Zn) after 14 d (values annotated by a same letter are not statistically different, $p > 0.05$).

Cadmium bioaccumulation

Mean concentrations of Cd measured in the oyster gills are shown in Figure 2A. Results revealed no significant effect ($p > 0.05$) of the ploidy status on Cd bioaccumulation for each exposure condition. The Cd background levels in controls were not significantly different ($p > 0.05$) between oyster populations: 3.2 ± 0.3 and 2.5 ± 0.3 nmol Cd/g (wet wt) in diploid and triploid oysters, respectively. After exposure to Cd alone, metal bioaccumulation presented a 20- and 23-fold increase in diploid and triploid oysters, respectively. Similarly, in combined Cd and Zn exposure, increases ranged from 15- to 23-fold in diploid and triploid oysters, respectively.

Zinc bioaccumulation

The Zn background levels in gills of controls from the two populations also were not significantly different ($p > 0.05$): 5.6 ± 0.3 and 3.0 ± 1.7 μ mol Zn/g (wet wt) in diploid and triploid oysters, respectively (Fig. 2B). However, under Zn exposure, diploid oysters were found to accumulate Zn with 30% greater efficiency than triploid oysters ($p < 0.05$), accumulating 15 ± 1.4 μ mol/g compared with 10.3 ± 1.0 μ mol/g. The same holds true for combined Zn and Cd treatment because Zn concentrations reached 17.3 ± 1.6 μ mol/g and 11.6 ± 1.9 μ mol/g for diploid and triploid oysters, respectively. However, accumulation factors for diploid and triploid oysters for both Zn treatments were observed to be close a three-fold increase was measured in a single metal exposure

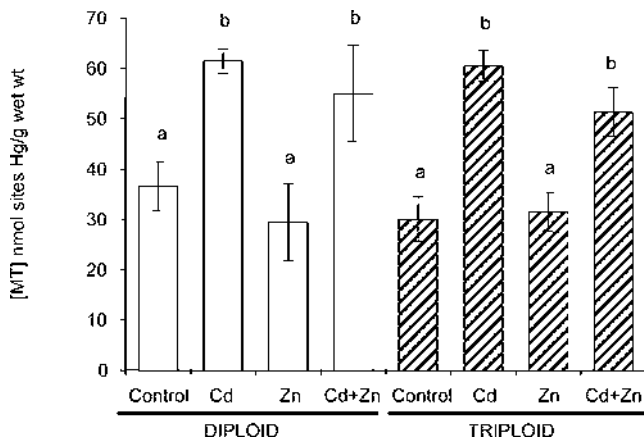


Fig. 3. Mean levels of total soluble metallothionein (MT) proteins (nmol Hg sites/g [wet wt] ± SE; n = 3) measured by mercury saturation assay in the gills of diploid and triploid oysters in control, cadmium, or zinc treatments or a combination treatment (0.13 μM Cd and 15.3 μM Zn) after 14 d (values annotated by a same letter are not statistically different p > 0.05).

for both populations, with a 3.5-fold increase under Cd exposure compared with respective control oysters.

Total metallothionein proteins

The results revealed a significant effect of Cd exposure on MT concentrations measured in the gills (Fig. 3). However, no effect of ploidy was observed on MT concentration (p > 0.05). Untreated diploid and triploid oysters exhibited comparable basal levels in MT proteins with 36.78 and 30.3 ± 7.6 nmol Hg sites/g (wet wt), respectively. For both oyster populations, MT concentrations increased similarly under single Cd or combined Cd and Zn exposures (p < 0.05). After 14 d of exposure, the total MT protein quantities were about twofold higher than control levels. In contrast, exposure to Zn alone did not significantly change the MT levels in the gills of diploid and triploid oysters compared with their control values.

Expression of metallothionein mRNA

Diploid oysters. Basal expression levels of *CgMT1*, *CgMT2*, and *CgMT3* genes were quite variable. *CgMT2* was the most abundant MT in unexposed *C. gigas*, with about 5 × 10⁷ copies/μg of total RNA (Fig. 4A). By comparison, *CgMT1* was present at only 0.7 × 10⁷ copies/μg of total RNA, whereas *CgMT3* showed only 30 copies/μg of total RNA (Fig. 4B) and appeared to be anecdotal compared *CgMT1* and *CgMT2*.

The expression levels of *CgMT1* and *CgMT2* were significantly up-regulated after Cd exposure (p < 0.05), with *CgMT1* and *CgMT2* mRNAs increasing sevenfold relative to controls. The same genetic response was observed after joint exposure to Cd and Zn. In this condition *CgMT1* and *CgMT2* presented a sevenfold and a fivefold increase, respectively. In contrast, no significant changes in the expression levels of *CgMT1* and *CgMT2* were observed between untreated and Zn-contaminated oysters.

Analysis of *CgMT3* gene expression revealed that the number of copies of this MT remained unchanged (p > 0.05) after Cd exposure (Fig. 4B). However, a significant increase was observed after 14 d of Zn treatment alone. Indeed *CgMT3* ranged from 30 copies in the control to about 360 copies in

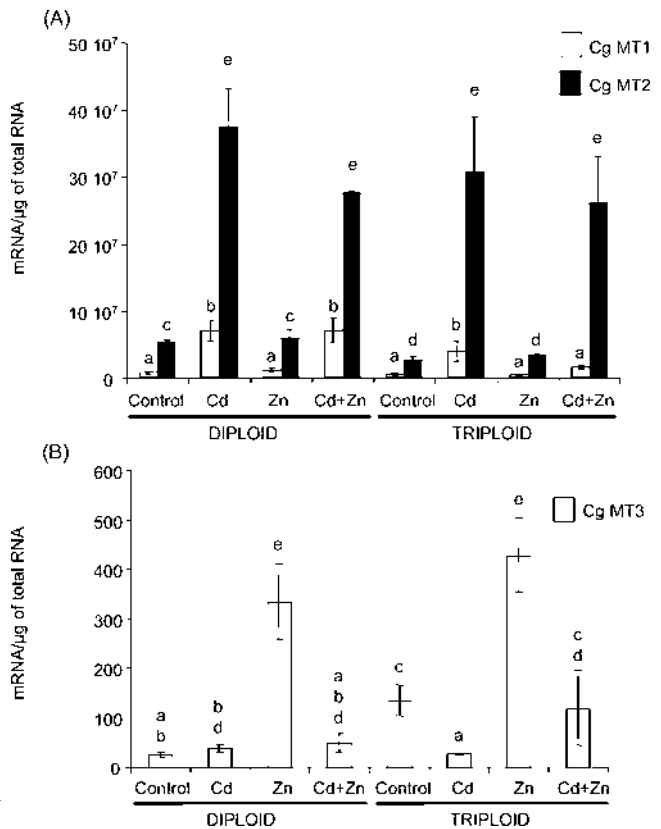


Fig. 4. Mean mRNA levels of (A) *CgMT1*, *CgMT2*, and (B) *CgMT3* (number of copies/μg of total RNA ± SE; n = 3) measured by quantitative real-time polymerase chain reaction in the gills of diploid and triploid oysters in control, cadmium, or zinc treatments or a combination treatment (0.13 μM Cd and 15.3 μM Zn) after 14 d (values annotated by a same letter are not statistically different p > 0.05).

the treated individuals. Interestingly, no increase in *CgMT3* gene expression was obtained in oysters exposed to Cd and Zn together.

Triploid oysters. When compared to diploid oysters, the basal expression of *CgMT1* in triploids appeared comparable (0.7 × 10⁷ copies/μg of total RNA, p > 0.05). However, in controls, the number of *CgMT2* copies in triploids (2.7 × 10⁷ copies/μg of total RNA), was roughly half that in diploids, whereas *CgMT3* was five times more abundant in triploid than in diploid oysters.

Expression levels of the *CgMT1* and *CgMT2* genes increased in Cd-treated individuals compared with controls (p < 0.05), with a sevenfold and 11-fold increase, respectively (Fig. 4A). Similarly, a threefold and a ninefold increase in expression was observed for these two genes after Zn treatment. As in diploid oysters, induction of *CgMT1* and *CgMT2* expression did not occur after Zn exposure. It is to be noted that the induced expression levels of *CgMT1* and *CgMT2* were similar after treatment with Cd alone or Cd and Zn together in diploid and triploid oysters.

Again, the *CgMT3* gene expression level remained unchanged (p > 0.05) after Cd and Zn exposure, whereas a decrease was observed when Cd was used alone. Exposure to Zn alone led to a significant threefold increase in expression of the *CgMT3* gene in triploid oysters, which corresponded to the same final level as in diploid oysters.

DISCUSSION

As in vertebrates, one of the response capacities of oysters to heavy metal exposure is MT protein biosynthesis through MT gene expression. Several studies have shown that heterozygosity in triploid oysters could explain their growth performances, via a significant increase in feeding rates and in absorption/excretion processes [2,16,17]. In this context, significant differences could be expected in metal bioaccumulation and MT biosynthesis between diploid and triploid oysters. Nevertheless, our results revealed similar responses in terms of MT gene expression, MT protein synthesis, and Cd accumulation in gills. Only Zn bioaccumulation showed higher significance levels in diploid oysters (Fig. 2B).

We report for the first time the differential expression levels of MT isoform genes from *C. gigas*. *CgMT2* appeared to be more expressed, *CgMT1* was present at a lower copy number, and *CgMT3* seemed to be trivial compared with the other MTs. The MT genes exhibited similar levels of expression whatever the ploidy, suggesting a dosage regulation of these gene expressions in *C. gigas*. Such regulation has been reported in diploid, triploid, and tetraploid corn (*Zea mays*), for which the analysis of 18 gene expression levels evidenced that most genes were expressed equally regardless of the chromosome copy number [18]. In the same way, some genes investigated in the silkworm of *Bombyx mori* showed the same expression levels in diploid and triploid strains [19]. From these studies, a dosage compensation of MT expression can be hypothesized in *C. gigas*. In addition, another mechanism that could explain our results would be a silencing of expression of the additional copy of the MT allele (parental imprinting) [8,20].

The same order of expression level ($CgMT2 > CgMT1 \gg CgMT3$) was conserved after induction by Cd. The *CgMT2* was more expressed than *CgMT1* could be related to its molecular organization. Indeed, *CgMT1* possesses a classical organization with one α domain and one β domain, which are known to bind four and three metal ions (Cd or Zn) in mammals, respectively [21]. In contrast, *CgMT2* exhibits an additional β domain and could potentially bind three additional ions. In this context, a previous study evidenced that *Escherichia coli* BL21 transformed with a periplasmic-addressed *CgMT2* construct appeared to grow faster than those transformed with *CgMT1* when Cu^{2+} or Cd^{2+} were added to the culture medium [9]. From this analysis *CgMT2* has been hypothesized to have a greater detoxification capacity than *CgMT1*.

The expression level of *C. gigas CgMT3* appeared to be induced only in response to Zn exposure; Cd and Zn mixture had no effect. The MT isoforms induced by specific metals have been reported in vertebrates Cd-specific and Cu-specific MTs have been described in the crab *Libinia emarginata* [22,23] and in the periwinkle *Littorina brevicula* [24]. However, no metal-specific role could be hypothesized for *CgMT3* because of its low level of gene expression. The total copy number of *CgMT3* remains extremely low compared with *CgMT1* and *CgMT2*, whereas after Zn exposure, it increased to 334 and 429 in diploid and triploid oysters, respectively ($p > 0.05$). This very low expression of *CgMT3* suggests that this MT has probably no significant physiological functions under metal exposure or could be only expressed in particular developmental stages in oysters.

Zinc did not induce *CgMT1* or *CgMT2* expression. This result disagrees with a model of MT gene induction by metals [25]. Indeed, in this model, heavy metals displace Zn bound

to MTs, leading to an increased intracellular Zn concentration. Zinc is then able to activate the transcription factor MTF-1, which in turn induces MT transcription by binding to the metal regulatory elements present in the promoter region of MT genes. Thus, our results mean that in *C. gigas* this model of MT expression is not valid and that alternative posttranslational mechanisms of MTF-1 exist. This could explain, for instance, why in mammals, MTF-1 binds to metal regulatory elements boxes not only during Zn exposure, but also in response to some oxidative stresses (such as those generated by H_2O_2 or *t*-butylhydroquinone) [26]. The MT induction by a Cd-specific pathway also cannot be excluded. Indeed, recent studies on *Crassostrea virginica* suggest that MT induction by Cd could follow a specific cellular response not mediated by pathways involving Zn [27]. In this way, Cd-mediated metal regulatory element activation independent of MTF-1 and Zn has been reported in cells lacking functional MTF-1 [28]. Such observations have been reinforced by the description of a signal transduction pathway involving an upstream regulatory factor in Cd induction [26].

The MT protein concentrations followed the pattern of *CgMT1* and *CgMT2* gene expressions. Levels increased about twofold after exposure to Cd alone or in combination with Zn. However, this increase is less than the mRNA increase (about sevenfold) observed under the same conditions of treatment, suggesting that MT synthesis, in this species, is regulated at the transcriptional level as well as the translational level. Discrepancies between mRNA and protein levels were also previously reported in Antarctic fish [29,30], or blue mussels (*Mytilus edulis*) [31].

The results of this study showed comparable response in gill metal bioaccumulation and genetic/protein MT response in diploid and triploid oysters. This suggests that in *C. gigas*, the occurrence of a third set of chromosomes in triploid individuals is not subjected to modifications in MT isoform gene expression and MT levels. This result indicates that under the metal exposure conditions used during our experiment (0.5 Cd/L and 1 mg Zn/L, 14 d of exposure), triploid juvenile oysters have the same capacities to respond to Cd, Zn, or exposure to both as diploid oysters.

Acknowledgement—The authors thank Francis Maleyran for providing the oysters used in this experiment. V. Marie was supported by a grant from the Aquitaine Region.

REFERENCES

- Allen SK, Downing SL. 1991. Consumers and experts alike prefer the taste of sterile triploid over gravid diploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*, Thunberg, 1793). *Shellfish Res* 10: 19-22.
- Neill JA. 2002. Farming triploid oysters. *Aquaculture* 210: 69-88.
- Allen SK, Downing SL. 1986. Performance of triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg) I. Survival, growth, glycogen content and sexual maturation in yearlings. *J Exp Mar Biol Ecol* 102:197-208.
- Shpigol M, Barber BJ, Mann R. 1992. Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology, and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* Thunberg. *J Exp Mar Biol Ecol* 161: 15-25.
- Goldberg ED, Koide M, Hodge V, Flegal AR, Martin J. 1983. U.S. mussel watch: 1977-1978 results on trace metals and radionuclides. *Estuar Coast Shelf Sci* 16: 69-93.
- Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. 2002. Metallothionein: The multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci* 59: 627-674.
- Magoulas A, Kotoulas G, Gerard A, Naciri-Graven Y, Demitziakis E, Hawkins AJ. 2000. Comparison of genetic variability and parentage in different ploidy classes of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Genet Res* 76: 261-272.

8. Adams KL, Cronn R, Percifield R, Wendel JF. 2003. Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 4649–4654.
9. Tanguy A, Mura C, Moraga D. 2001. Cloning of a metallothionein gene and characterization of two other cDNA sequences in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT1). *Aquat Toxicol* 55: 35–47.
10. Tanguy A, Moraga D. 2001. Cloning and characterization of a gene coding for a novel metallothionein in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT2): A case of adaptive response to metal-induced stress. *Gene* 273: 123–130.
11. Auffret M, Oubella R. 1997. Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: In vitro measurement and experimental modulation by xenobiotics. *Comp Biochem Physiol A* 118: 705–712.
12. Vindelov LL, Christensen IJ. 1990. A review of techniques and results obtained in one laboratory by an integrated system of methods designed for routine clinical flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 11: 753–770.
13. Bebianno MJ, Serafim MA. 2003. Variation of metal and metallothionein concentrations in a natural population of *Ruditapes decussatus*. *Arch Environ Contam Toxicol* 44: 53–66.
14. Baudrimort M, Lemaire-Goy S, Ribeyre F, Metivaud J, Boudou A. 1997. Seasonal variations of metallothionein concentrations in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*). *Comp Biochem Physiol C* 118: 361–367.
15. Dutton MD, Stephenson M, Klaverkamp JF. 1993. A mercury saturation assay for measuring metallothionein in fish. *Environ Toxicol Chem* 12: 1193–1202.
16. Garnier-Gere PH, Naciri-Graven Y, Bougrier S, Magoulas A, Heral M, Kotoulas G, Hawkins A, Gerard A. 2002. Influences of triploidy, parentage and genetic diversity on growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* reared in contrasting natural environments. *Mol Ecol* 11: 1499–1514.
17. Hawkins AJ, Magoulas A, Heral M, Bougrier S, Naciri-Graven Y, Day AJ, Kotoulas G. 2000. Separate effects of triploidy, parentage and genomic diversity upon feeding behaviour, metabolic efficiency and net energy balance in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genet Res* 76: 273–284.
18. Guo M, Davis D, Birchler JA. 1996. Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series. *Genetics* 142: 1349–1355.
19. Suzuki MG, Shimada T, Yokoyama T, Kobayashi M. 1999. The influence of triploidy on gene expression in the silkworm *Bombyx mori*. *Heredity* 82: 661–667.
20. Ford VS, Gottlieb LD. 2002. Single mutations silence PGIC2 genes in two very recent allotetraploid species *Citrinia*. *Evolution* 56: 699–707.
21. Chan J, Huang Z, Merrifield ME, Salgado MT, Stillman MJ. 2002. Studies of metal binding reactions in metallothioneins by spectroscopic, molecular biology, and molecular modeling techniques. *Coord. Chem. Rev* 233–234: 319–339.
22. Brouwer M, Schlenk D, Ringwood AH, Brouwer-Hoexum T. 1992. Metal-specific induction of metallothionein isoforms in the blue crab *Callinectes sapidus* in response to single- and mixed-metal exposure. *Arch Biochem Biophys* 294: 461–468.
23. Syring RA, Brouwer TH, Brouwer M. 2000. Cloning and sequencing of cDNAs encoding for a novel copper-specific metallothionein and two cadmium-inducible metallothioneins from the blue crab *Callinectes sapidus*. *Comp Biochem Physiol C* 125: 325–332.
24. Ryu S-K, Park J-S, Lee I-S. 2003. Purification and characterization of a copper-binding protein from Asian periwinkle *Littorina brevicula*. *Comp Biochem Physiol C* 134: 101–107.
25. Haq F, Mahoney M, Koropatnick J. 2003. Signaling events for metallothionein induction. *Mutat Res* 533: 211–226.
26. Andrews GK. 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol* 59: 95–104.
27. Butler RA, Roesijad G. 2001. Disruption of metallothionein expression with antisense oligonucleotides abolishes protection against cadmium cytotoxicity in molluscan hemocytes. *Toxicol Sci* 59: 101–107.
28. Chu WA, Moehlenkamp JD, Bittel D, Andrews GK, Johnson JA. 1999. Cadmium-mediated activation of the metal response element in human neuroblastoma cells lacking functional metal response element-binding transcription factor-1. *J Biol Chem* 274: 5279–5284.
29. Carginale V, Scudiero R, Capasso C, Capasso A, Kille P, Di Prisco G, Parisi E. 1998. Cadmium-induced differential accumulation of metallothionein isoforms in the Antarctic icefish, which exhibits no basal metallothionein protein but high endogenous mRNA levels. *Biochem J* 332: 475–481.
30. Scudiero R, Verde C, Carginale V, Kille P, Capasso C, di Prisco G, Parisi E. 2000. Tissue-specific regulation of metallothionein and metallothionein mRNA accumulation in the Antarctic notothenioid *Notothenia coriiceps*. *Polar Biol* 23: 17–23.
31. Lemoine S, Laulier M. 2003. Potential use of the levels of the mRNA of a specific metallothionein isoform (MT-20) in mussel (*Mytilus edulis*) as a biomarker of cadmium contamination. *Mar Pollut Bull* 46: 1450–1455.

CONCLUSION DE L'ETUDE

Les résultats de cette étude comparative entre les huîtres juvéniles diploïdes et triploïdes ont montré l'absence de différence importante dans l'expression des gènes des isoformes de MTs, la réponse protéique et, parallèlement, l'accumulation du Cd dans les branchies. Seul le Zn a révélé des concentrations significativement plus élevées chez les huîtres diploïdes (30%). Pour les deux populations, deux isoformes jouent un rôle majeur : CgMT2 et, à un degré moindre, CgMT1. L'expression de leur gène, en réponse uniquement au Cd, se révèle régulée aux niveaux transcriptionnel et traductionnel. *CgMT3* peut être qualifié de "gène anecdotique" dans cet organe, compte-tenu des taux d'expression mesurés (10^6 fois plus faibles que pour *CgMT2*), avec un rôle négligeable d'un point de vue biochimique/physiologique. Nos résultats ont montré que l'exposition des huîtres au Zn seul n'engendre pas d'induction significative de l'expression des gènes majeurs *CgMT2* et *CgMT1* et donc pas de réponse des MTs.

4-4. SYNTHÈSE DES ÉTUDES EN MILIEU ESTUARIEN

SUR L'HUITRE *Crassostrea gigas*.

ANALYSE COMPARATIVE ENTRE DIPLOÏDES ET TRIPLOÏDES

Dans cette seconde phase de notre programme de recherche, l'objectif principal était d'analyser la réponse "MTs" chez un bivalve marin, l'huître creuse *C. gigas*, après exposition au cadmium et au zinc. Contrairement aux études menées en eau douce, les deux approches méthodologiques de terrain et de laboratoire ont reposé sur des niveaux d'exposition différents. En effet, ceux de la zone aval du *continuum* fluvio-estuarien étant très faibles ($<150 \text{ ng Cd.l}^{-1}$ dans le bassin aquacole "Bleu Médoc" - Baudrimont *et al.*, 2005), des niveaux d'exposition comparables aux concentrations mesurées dans la fraction dissoute des eaux du Riou Mort ont été appliqués pour l'étude expérimentale.

Un intérêt particulier a été porté aux huîtres triploïdes *C. gigas*, notre but étant d'évaluer l'influence d'un troisième jeu de chromosomes ($3n$) sur la réponse "MTs" en comparaison aux huîtres de statut "originel" diploïde ($2n$), alors que la culture des huîtres triploïdes prend un essor commercial de plus en plus important en France. Les différences $2n/3n$ ont été évaluées pour trois critères: la croissance des organismes, la bioaccumulation des métaux et la réponse associée des MTs. De plus, le séquençage récent de deux gènes et un ADNc de MTs chez *C. gigas*, nous a permis d'approfondir la comparaison entre les huîtres diploïdes et triploïdes, à partir d'une quantification par RT-PCR de l'expression de ces gènes en réponse aux contaminations métalliques.

En terme de croissance, les résultats de l'étude de transplantation des huîtres adultes diploïdes et triploïdes dans le bassin aquacole "Bleu Médoc" révèlent, à partir d'un même poids initial, une croissance pondérale du corps mou à tendance exponentielle durant le printemps, comparable entre les populations $2n$ et $3n$ (**Figure 75A**). Par contre, un avantage pondéral

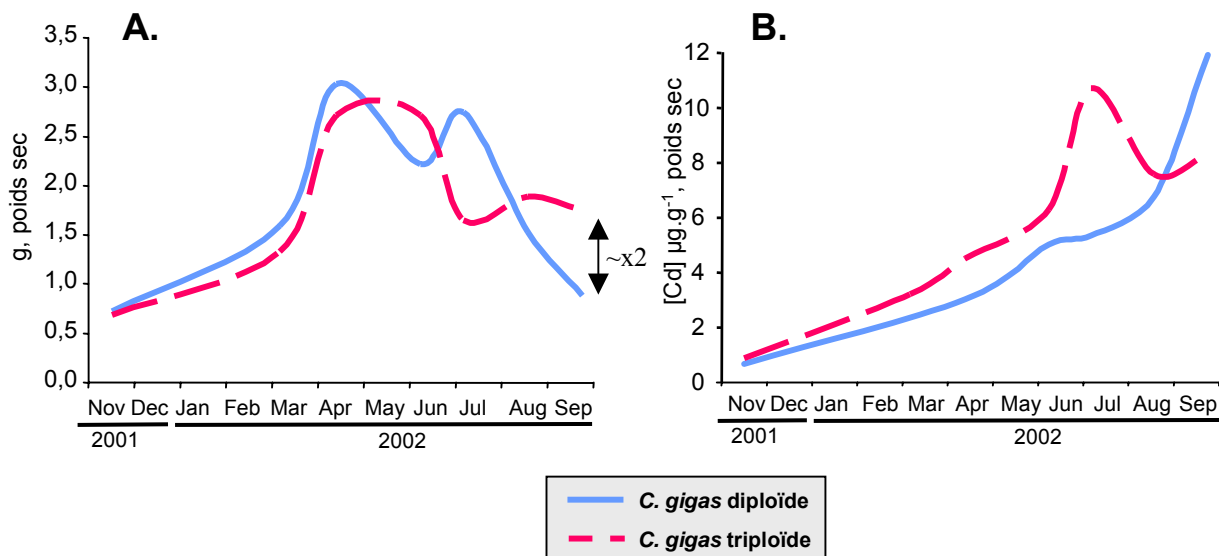


Figure 75 : Cinétiques de la croissance du corps mou (A. – g, poids sec) et des concentrations de cadmium (B. - µg.g⁻¹, poids sec) mesurés en parallèle chez les huîtres diploïdes et triploïdes lors de la transplantation dans le bassin aquacole Bleu Médoc.

Valeurs moyennes (n=5).

Comparaison entre les huîtres diploïdes et triploïdes <i>C. gigas</i>							
ETUDE	Age	Exposition	Bioaccumulation			Réponse des MTs	
			Niveaux maximums en Cd	en Zn	en Cu	génétique protéique	
Transplantation sur le TERRAIN	Adultes (organisme entier)	Cd + Zn + Cu	=	=	=	#	
		Cd	=	=	=	=	
		Zn	=	#	=	=	
Exposition expérimentale en LABORATOIRE	Juvéniles (branchies)	Cd+Zn	=	=	=	=	

Tableau 17 : Récapitulatif des différences observées entre les huîtres diploïdes (2n) et triploïdes (3n) *Crassostrea gigas* en termes de bioaccumulation et de réponse des métallothionéines après transplantation d'adultes dans le bassin aquacole "Bleu Médoc" et exposition expérimentale de juvéniles.

= : indique aucune différence significative 2n/3n

: indique des différences significative 2n/3n

apparaît après la période de ponte, qui se prolonge jusqu'en septembre, en faveur des huîtres triploïdes (poids triploïdes / poids diploïdes = 2 environ), parvenues pour la première fois à maturité sexuelle. Ce résultat suggère une réorientation d'une plus grande partie de l'énergie vers la croissance somatique chez les huîtres triploïdes. Par contre, pour les deux populations d'huîtres, les variations du poids de chair influencent fortement la bioaccumulation des métaux, avec un accroissement des concentrations métalliques pendant les périodes d'amaigrissement correspondant aux périodes de pontes. D'autre part, notons que la libération des gamètes d'avril à septembre ne participe pas à la réduction des quantités de métal accumulées, notamment de Cd dans les huîtres diploïdes (**Figure 75B**), indiquant leur faible contenu en Cd.

Nous avons regroupé, dans un tableau de synthèse (**Tableau 17**), les principaux résultats relatifs à la comparaison entre la bioaccumulation des métaux et les réponses "MTs" entre les huîtres diploïdes et triploïdes. Nos résultats montrent que la triploïdie n'engendre pas d'influence marquée sur la bioaccumulation du Cd, du Zn et du Cu dans les tissus des huîtres adultes transplantées sur le terrain, les concentrations maximales étant similaires. Il en est de même pour la bioaccumulation du Cd dans les branchies d'huîtres juvéniles après 14 jours d'exposition au laboratoire à $15 \mu\text{g Cd.l}^{-1}$. Notons que pour le zinc, les juvéniles triploïdes accumulent environ 30% de moins que les diploïdes, après une exposition de 14 jours à 1 mg Zn.l^{-1} , mais cette différence n'a pas été retrouvée chez les adultes. Ceci pourrait s'expliquer par un métabolisme du Zn plus important dans les jeunes huîtres triploïdes ou par les niveaux d'exposition différents entre l'étude de terrain et celle menée en laboratoire.

L'analyse comparative des concentrations de MTs entre les huîtres diploïdes et triploïdes transplantées révèle une influence marquée des facteurs associés à la reproduction. Elle se traduit par une stimulation importante et temporaire de la biosynthèse des MTs en fin de gamétogenèse dans les tissus contenant la gonade, influençant fortement les différences entre les deux populations testées à l'échelle du corps mou entier (facteur 4 entre $2n/3n$ - mois de juin). Comme pour la bioaccumulation, la réponse protéique des MTs dans ces tissus est comparable entre les huîtres $2n/3n$, en dehors de cette période critique. Il en est de même pour les organes somatiques, comme les branchies et la glande digestive, et ce durant toute la période de transplantation. Ce résultat se confirme dans la réponse protéique et génétique des MTs que nous avons analysée dans les branchies des juvéniles exposées expérimentalement au Cd et au Zn, isolément ou en mélange. Cette similitude de réponse, malgré la présence d'un troisième jeu de chromosomes chez les triploïdes, suggère l'existence de mécanismes de régulation post-traductionnels de l'expression des gènes MT chez *C. gigas* (dosage par

compensation) ou le silence des copies d'allèles. En outre, les résultats que nous avons obtenus en laboratoire mettent en évidence une absence d'interaction entre le Cd et le Zn introduits en mélange, sur la réponse protéique et génétique des MTs pour les deux populations, comme pour la bioaccumulation.

Notre étude de l'expression différentielle des trois gènes d'isoformes de MT chez les huîtres diploïdes et triploïdes a mis en évidence le rôle quasi-négligeable du gène *cgmt3*, et ce malgré un accroissement significatif de son expression en réponse au Zn introduit isolément : les niveaux d'expression apparaissent insignifiants par rapport aux deux autres isoformes (facteur proche de 10^6 entre ce gène et *CgMT2* et *CgMT1*). A l'opposé, les deux gènes *CgMT2* et *CgMT1* codent pour deux isoformes majeures, et leur expression est uniquement amplifiée sous l'influence du Cd. Il est important de souligner que nous retrouvons des spécificités de réponse génétique comparables à celles observées chez *D. polymorpha*. Ce résultat peut expliquer l'homologie de la réponse des MTs entre les huîtres diploïdes et triploïdes après exposition au Zn seul, malgré les différences observées dans les capacités à accumuler le métal. Cependant, aucune toxicité létale n'a été observée chez *C. gigas* alors que chez *D. polymorpha*, une mortalité de l'ensemble des individus avait été observée en laboratoire après 10 jours d'exposition à la même concentration de Zn dans l'eau.

En conclusion, les résultats que nous avons obtenus sur le modèle "huître" sont cohérents pour les deux approches menées conjointement sur le terrain et en laboratoire. La présence d'un troisième jeu de chromosomes chez *C. gigas* n'a pas révélé de modifications majeures dans la bioaccumulation des métaux étudiés et dans la réponse génétique et protéique des MTs. En outre, le potentiel de réponse des MTs, fortement influencé par les facteurs associés au cycle de reproduction chez les huîtres adultes, demeure limité au Cd, comme pour la moule zébrée *Dreissena polymorpha*.

CHAPITRE 5

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES DE RECHERCHE

CONCLUSION

Nos travaux de recherche menés dans le contexte de la pollution polymétallique caractéristique du *continuum* fluvio-estuarien "Lot / Garonne / Gironde" ont été orientés vers la caractérisation de la réponse des MTs, plus spécifiquement à l'égard de l'exposition à deux métaux - cadmium et zinc -, chez plusieurs espèces de bivalves d'eau douce et marins : *Corbicula fluminea*, *Dreissena polymorpha* et *Crassostrea gigas*. Les résultats que nous avons obtenus à partir des approches menées conjointement sur le terrain et en laboratoire ont révélé des différences inter-spécifiques très importantes, en termes de potentiel de réponse protéique et génétique et de sensibilité des MTs en fonction de la bioaccumulation, des interactions métalliques, de la présence de copies surnuméraires de gènes et des facteurs associés au cycle de reproduction des bivalves.

C. fluminea, *D. polymorpha* et *C. gigas* ont révélé des potentialités de réponse spécifiques des MTs à l'égard des métaux étudiés. Les réponses protéiques que nous avons quantifiées par dosage des MTs par la technique de saturation avec le mercure inorganique (HgII) sont inéluctablement le reflet des inductions du ou des gène(s) correspondants. De façon récurrente, le cadmium est apparu induire la synthèse des MTs chez les trois espèces de bivalves, après une exposition isolée à ce métal, pour des concentrations dans l'eau de 15 µg.l⁻¹. Ce potentiel de réponse a été décrit chez de nombreuses espèces, telles que *Pyganodon grandis*, *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, *Ruditapes decussatus* (Langston *et al.*, 1998). Certaines d'entre elles, comme la moule *M. edulis*, caractérisées par un polymorphisme génétique pour les MTs, démontrent l'existence d'isoformes spécifiques au Cd, qui sont directement impliquées dans sa séquestration intracellulaire. Les résultats que nous avons obtenus à partir de l'étude de l'expression différentielle des gènes de MTs ont montré que chez *C. gigas*, les deux isoformes majeures CgMT2 et CgMT1 sont régulées uniquement par le Cd. A l'opposé du Cd, le potentiel de réponse à l'égard du zinc est apparu différent selon l'espèce. A l'inverse de *C. fluminea*, cet élément essentiel n'induit pas un accroissement de l'expression des gènes de MTs pouvant susciter une production accrue de la protéine chez *D. polymorpha* et *C. gigas*, après exposition à 1 mg Zn.l⁻¹. Ces résultats peuvent résulter de stratégies adaptatives différentes chez *D. polymorpha* et *C. gigas* pour la prise en charge du zinc dans la cellule et/ou de caractéristiques génétiques distinctes en amont de la

régulation des gènes de MTs (facteurs de transcription, cascades d'activation, ...), ce qui pourrait notamment expliquer la contradiction avec les mammifères chez lesquels le Zn est connu comme un bon inducteur des MTs (Andrews, 2000). La toxicité aiguë de ce métal chez *D. polymorpha* pour des expositions à 1 mg Zn.l⁻¹, conduisant à la mortalité, pourrait être en relation avec la défaillance d'induction du mécanisme de détoxification *via* les MTs et/ou l'absence d'efficacité d'autres mécanismes impliqués dans la régulation du métal.

Les résultats provenant des études que nous avons développées en laboratoire ont montré l'existence d'interactions entre les deux métaux présents en mélange sur leur bioaccumulation, mais uniquement chez les bivalves d'eau douce. Ceci pourrait être corrélé à la spéciation chimique des éléments métalliques en solution dans l'eau, qui régit leur biodisponibilité et leur transport au travers des barrières biologiques à l'interface "organismes/milieu". Malgré ces interactions, la présence simultanée du Cd et du Zn n'a révélé aucune influence significative sur l'intensité de la réponse des MTs pour les trois espèces de bivalves. Ce résultat est important, car il pourrait indiquer des modifications dans la répartition du Cd en présence du Zn entre les fractions solubles et insolubles à l'échelle cellulaire et tissulaire et/ou une compétition *in vivo* des métaux vis-à-vis de leur fixation sur les groupements thiols des MTs.

D'autres facteurs sont également susceptibles de perturber la réponse spécifique des MTs en réponse à la bioaccumulation des métaux chez les bivalves. Au cours de nos travaux de recherche menés sur l'huître *C. gigas*, un intérêt particulier a été porté à l'influence des effets de certains de ces facteurs lors de l'exposition au cadmium et au zinc. En effet, avec le développement de la triploïdie dans l'ostréiculture française, la caractérisation de la réponse des MTs chez *C. gigas* a pu être étendue à un paramètre différent de ceux classiquement étudiés chez les bivalves : la présence d'un troisième jeu de chromosomes. A partir d'adultes transplantés sur le terrain, ou de juvéniles exposés en laboratoire, nos travaux n'ont montré quasiment aucune influence de ce facteur 2n/3n sur la bioaccumulation du Cd et du Zn et sur la réponse associée des MTs dans les tissus somatiques (branchies et glandes digestives). Par contre, sous l'influence de facteurs liés au cycle de reproduction, les tissus contenant la gonade conduisent à une importante production de MTs dans le corps mou entier des individus diploïdes parvenue à maturité sexuelle (Juin) et sans relation directe avec des variations de concentrations métalliques au niveau tissulaire. Un constat analogue avait été fait chez *C. fluminea* dans le lac de Cazaux-Sanguinet, non contaminé par les métaux lourds (Baudrimont *et al.*, 1997a). Les concentrations maximales étaient atteintes au mois de mai dans la masse viscérale incluant l'organe reproducteur du bivalve. Cet accroissement des concentrations de MTs pourrait être corrélé aux besoins métaboliques durant cette phase du

cycle de reproduction (Wang *et al.*, 1999). Ces résultats démontrent l'importance du choix des organes et de la période de collecte des échantillons pour l'analyse des MTs chez les bivalves.

Ainsi, même si l'analyse des MTs chez les bivalves reste largement utilisée pour l'évaluation des contaminations métalliques en milieu aquatique, les différences interspécifiques mises en évidence dans nos travaux de recherche, au regard de l'influence des facteurs mis en jeu et des différences de sensibilité selon la nature du métal, limitent leur utilisation spontanée, sans la considération d'études préliminaires. Elles permettent de caractériser les limites du potentiel de réponse de ces protéines à l'égard des métaux entre les espèces. Ce bilan est en accord avec les conclusions tirées récemment par Pinel-Alloul *et al.* (2004), suite à une synthèse bibliographique sur les MTs en Ecotoxicologie moléculaire : "Même si les bases conceptuelles et scientifiques de l'utilisation de biomarqueurs tels que la MT sont bien établies pour l'évaluation diagnostique et prédictive des effets du Cd au niveau cellulaire chez les invertébrés marins et d'eau douce, le manque de connaissance sur les effets confondants des facteurs écologiques en milieu naturel limite beaucoup la signification écotoxicologique de la MT comme biomarqueur d'effets toxiques au niveau des populations et des communautés."

PERSPECTIVES DE RECHERCHE

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus au cours de nos travaux de thèse permet de définir plusieurs perspectives de recherche, afin d'approfondir la caractérisation de la réponse des MTs chez les bivalves. Elles s'inscrivent dans le prolongement direct des différentes approches mises en œuvre en milieu dulçaquicole et estuarien, sur le terrain et en laboratoire. Trois orientations principales et complémentaires ont été retenues.

(i) Dans un premier temps, il nous paraît fondamental de maintenir, et même de renforcer, la complémentarité entre d'une part, les études de terrain et de laboratoire, et d'autre part, entre les analyses génétiques et moléculaires, en vue de poursuivre la caractérisation de la réponse des MTs chez les bivalves. Dans ce sens, l'étude que nous avons menée sur l'huître creuse *C. gigas* a permis une compréhension plus fine de la réponse grâce à l'analyse de l'expression différentielle des gènes de MTs après contamination par le cadmium et/ou le zinc. Il sera donc nécessaire de rechercher l'existence éventuelle d'autres isoformes MTs chez *D. polymorpha*. Pour l'espèce *C. fluminea*, le ou les gènes MTs ne sont pas encore séquencés ; des recherches sont en cours dans notre laboratoire et devraient conduire à court terme à ce séquençage, qui permettra ensuite d'appliquer la technique de PCR quantitative en temps réel pour quantifier l'expression du ou des gènes en réponse aux expositions métalliques. Dans un objectif final, la caractérisation des séquences promotrices des gènes de MTs, pour ces trois espèces de bivalves, pourrait notamment permettre de clarifier les différences de capacités d'induction des gènes, notamment en réponse à la bioaccumulation du Zn entre *C. fluminea* et *D. polymorpha/C. gigas*.

(ii) Dans un second temps, la compréhension des mécanismes de bioaccumulation du Cd et du Zn devra être approfondie, en parallèle avec l'analyse des effets des interactions lors des expositions polymétalliques. Ceci implique l'évaluation de la contribution de la voie trophique dans la bioaccumulation des métaux, grâce à des études de transferts trophiques à partir d'algues contaminées par exemple. Parallèlement, l'analyse de la spéciation chimique des métaux en solution devra être envisagée, afin d'estimer l'importance dans ces transferts du rôle des complexes métalliques formés notamment avec les colloïdes. Des études sont en

cours au sein de notre laboratoire¹, en utilisant la technique de dialyse pour séparer les différents complexes métalliques et analyser leur biodisponibilité et leur capacité de bioaccumulation chez les bivalves. Mentionnons enfin que des études récentes ont révélé l'importance des granules insolubles dans la séquestration et la détoxification des métaux chez les bivalves d'eau douce, conjointement aux mécanismes de séquestration par les MTs ; des analyses complémentaires devront être développées pour déterminer la répartition subcellulaire des métaux dans les différents organes de *C. fluminea* et *D. polymorpha*, conjointement à la recherche des effets toxiques engendrés par le zinc chez la moule.

(iii) A partir de l'intégration de l'ensemble des paramètres susceptibles d'influencer les cinétiques de bioaccumulation des métaux et de biosynthèse des MTs, il faudra développer une modélisation de ces réponses, notamment pour *C. fluminea*. Cette démarche a déjà été appliquée pour plusieurs bivalves marins. Les travaux récents réalisés par S. Cazas (Casas, 2005) ont permis de modéliser la bioaccumulation des métaux chez *M. edulis* à partir du couplage de modèles cinétiques et de croissance.

¹ Recherches menées en collaboration avec le LMTG, UMR CNRS/Université de Toulouse III (O. Pokrovsky et coll.), dans le cadre du Programme National ECODYN.

REFERENCES

A

- Achard M., Baudrimont M., Boudou A. et Bourdineaud J.P. (2004).** Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquat. Toxicol.*, 67, 347-357.
- Acharya M.P., Jaggernautha W., Grossa E., Alfierib A., Klingerc H.P. et Vikrama B. (2000).** Cell lines from the same cervical carcinomabut with different radiosensitivities exhibit different cDNA microarray patterns of gene expression. *Cytogenet. Cell Genet.*, 91, 39-43.
- Adams K.L., Cronn R., Percifield R. et Wendel J.F. (2003).** Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 4649-4654.
- Adams S.M., Shorey C.D. et Byrne M. (1997).** An ultrastructural and microanalytical study of metal-ion content in granular concretions of the freshwater mussel *Hyridella depressa*. *Micron*, 28, 1-11.
- Adams T.K., Saydam N., Steiner F., Schaffner W. et Freedman J.H. (2002).** Activation of gene expression by metal-responsive signal transduction pathways. *Environ. Health. Perspect.*, 110, 813-817.
- Agence de l'eau Adour Garonne (2005).** La Qualité de l'Eau, http://www.eau-adour-garonne.fr/interimages_qualite_eau_f.html.
- Agius C., Jaccarini V. et Ritz D.A. (1978).** Growth trials of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* in inshore waters of Malta (central Mediterranean). *Aquaculture*, 15, 195-218.
- Allan J.D. (1995).** Trophic relationships. In: *Stream Ecology: Structure and function of running waters*. Ed.: JD Allan. Chapman & Hall, London, pp. 131-161.
- Allen S.K. et Downing S.L. (1986).** Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 102, 197-208.
- Allen S.K., Downing S.L., Chaiton J. et Beattie J.H. (1986).** Chemically and pressure-induced triploidy in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 57, 359-360.
- Allen S.K., Downing S.L. et Chew K.K. (1989).** Hatchery manual for producing triploid oysters. In: *Washington Sea Grant Program*. University of Washington Press, Seattle, WA, pp. 27.
- Allen S.K. et Downing S.L. (1991).** Consumers and experts alike prefer the taste of sterile triploid over gravid diploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*, Thunberg, 1793). *J. Shellfish Res.*, 10, 19-22.
- Allen S.K. et Guo X. (1996).** Triploids for biological containment: The risk of heteroploid mosaics.
- Allen S.K., Guo X., Burreson G. et Mann R. (1996).** Heteroploid mosaics and reversion among triploid oysters, *Crassostrea gigas*: fact or artifact? *J. Shellfish Res.*, 15, 514.
- Allen S.K., Howe A., Gallivan T., Guo X. et DeBrosse G.A. (1999).** Genotype and environmental variation in reversion of triploid *Crassostrea gigas* to the heteroploid mosaic state. *J. Shellfish Res.*, 18, 293 (abstract).
- Anderson R.S., Patel K.M. et Roesijadi G. (1999).** Oyster metallothionein as an oxyradical scavenger: implications for hemocyte defense responses. *Dev. Comp. Immunol.*, 23, 443-449.

- Andres S., Baudrimont M., Lapaquellerie Y., Ribeyre F. et Maillet N. (1999).** Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France): I. Geochemical characteristics of the sampling sites and cadmium and zinc bioaccumulation kinetics. Environ. Toxicol. Chem., 18, 2462-2471.
- Andrews G.K., Huet-Hudson Y.M., Paria B.C., McMaster M.T., De S.K. et Dey S.K. (1991).** Metallothionein gene expression and metal regulation during preimplantation mouse embryo development (MT mRNA during early development). Dev. Biol., 145, 13-27.
- Andrews G.K. et Geiser J. (1999).** Expression of the mouse metallothionein-I and -II genes provides a reproductive advantage during maternal dietary zinc deficiency. J. Nutr., 129, 1643-1648.
- Andrews G.K. (2000).** Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. Biochem. Pharmacol., 59, 95-104.
- Andrews G.K. (2001).** Cellular zinc sensors: MTF-1 regulation of gene expression. BioMetals, 14, 223-237.
- Andrews G.K., Lee D.K., Ravindra R., Lichtlen P., Sirito M., Sawadogo M. et Schaffner W. (2001).** The transcription factors MTF-1 and USF1 cooperate to regulate mouse metallothionein-I expression in response to the essential metal zinc in visceral endoderm cells during early development. EMBO J., 20, 1114-1122.
- Audry S. (2003).** Bilan géochimique du transport des éléments traces métalliques dans le système fluvial anthropisé Lot-Garonne-Gironde. Université Bordeaux 1, Talence, Thèse de Doctorat, pp. 413.
- Audry S., Schafer J., Blanc G., Bossy C. et Lavaux G. (2004a).** Anthropogenic components of heavy metal (Cd, Zn, Cu, Pb) budgets in the Lot-Garonne fluvial system (France). Appl. Geochem., 19, 769-786.
- Audry S., Blanc G. et Schafer J. (2004b).** Cadmium transport in the Lot-Garonne River system (France) - temporal variability and a model for flux estimation. Sci. Total Envir., 319, 197-213.
- Audry S., Schafer J., Blanc G. et Jouanneau J.-M. (2004c).** Fifty-year sedimentary record of heavy metal pollution (Cd, Zn, Cu, Pb) in the Lot River reservoirs (France). Environ. Pollut., 132, 413-426.
- Auf der Maur A., Belser T., Wang Y., Günes C., Lichtlen P., Georgiev O. et Schaffner W. (2000).** Characterization of the mouse gene for the heavy metal-responsive transcription factor MTF-1. Cell Stress Chaperon., 5, 196-206.
- Auffret M. et Oubella R. (1997).** Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: *In vitro* measurement and experimental modulation by xenobiotics. Comp. Biochem. Physiol. A, 118, 705-712.

--B-----

- Batley G., E., Apte S., C. et Stauber J., L. (2004).** Metal speciation and bioavailability of trace metal in Water : Progress since 1982. Aust. J. Chem., 57, 903-919.
- Baudrimont M. (1997).** Etude du rôle des métallothionéines à l'égard des mécanismes de bioaccumulation du cadmium, du mercure et du zinc par les organismes aquatiques (mollusque bivalve d'eau douce : *Corbicula fluminea*, poissons Cyprinidés) - Approches expérimentales et in situ. Université Bordeaux 1, Talence, Thèse de Doctorat, pp. 230.

- Baudrimont M., Metivaud J., Maury-Brachet R., Ribeyre F. et Boudou A. (1997a).** Bioaccumulation and metallothionein response in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. Environ. Toxicol. Chem., 16, 2096-2105.
- Baudrimont M., Lemaire-Gony S., Ribeyre F., Metivaud J. et Boudou A. (1997b).** Seasonal variations of metallothionein concentrations in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*). Comp. Biochem. Physiol. C, 118, 361-367.
- Baudrimont M., Andres S., Metivaud J., Lapaquellerie Y., Ribeyre F., Maillet N., Latouche C. et Boudou A. (1999).** Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France): II. Metallothionein response to metal exposure. Environ. Toxicol. Chem., 18, 2472-2477.
- Baudrimont M., Andres S., Durrieu G. et Boudou A. (2003).** The key role of metallothioneins in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase, after in situ exposure to Cd and Zn. Aquat. Toxicol., 63, 89-102.
- Baudrimont M., Schafer J., Marie V., Maury-Brachet R., Bossy C., Boudou A. et Blanc G. (2005).** Geochemical survey and metal bioaccumulation of three bivalve species (*Crassostrea gigas*, *Cerastoderma edule* and *Ruditapes philippinarum*) in the Nord Medoc salt marshes (Gironde estuary, France). Sci. Total Environ., 337, 265-280.
- Bauman J.W., Liu J., Liu Y.P. et Klaassen C.D. (1991).** Increase in metallothionein produced by chemicals that induce oxidative stress. Toxicol. Appl. Pharm., 110, 347-354.
- Bebiano M.J. et Serafim M.A. (2003).** Variation of metal and metallothionein concentrations in a natural population of *Ruditapes decussatus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 44, 53-66.
- Beeby A. (2001).** What do sentinels stand for? Environ. Pollut., 112, 285-298.
- Bernhard M., Brinckman F.E. et Sadler P.J. (1986).** The importance of chemical "speciation" in environmental processes. In: *Life Sciences Research Reports*. Eds.: M Bernhard, FE Brinckman and PJ Sadler. Springer-Verlag, Berlin, pp. 762-796.
- Berthelin C., Kellner K. et Mathieu M. (2000).** Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). Comp. Biochem. Physiol. B, 125, 359-369.
- Bittel D., Dalton T., Samson S.L.-A., Gedamu L. et Andrews G.K. (1998).** The DNA binding activity of metal response element-binding transcription factor-1 is activated in vivo and in vitro by zinc, but not by other transition metals. J. Biol. Chem., 273, 7127-7133.
- Bittel D.C., Smirnova I.V. et Andrews G.K. (2000).** Functional heterogeneity in the zinc fingers of metalloregulatory protein metal response element-binding transcription factor-1. J. Biol. Chem., 275, 37194-37201.
- Blackmore G. et Wang W.-X. (2004).** The transfer of cadmium, mercury, methylmercury, and zinc in an intertidal rocky shore food chain. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 307, 91-110.
- Blanc G., Lapaquellerie Y., Maillet N. et Anschutz P. (1999).** A cadmium budget for the Lot-Garonne fluvial system (France). Hydrobiologia, 410, 331-341.
- Block M. et Glynn A.W. (1992).** Influence of xanthates on the uptake of Cd by eurasian dace (*Phoxinus phoxinus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem., 11, 873-879.

- Boening D.W. (1999).** An evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metals pollution in marine waters. Environ. Monit. Assess., 55, 459-470.
- Bolognesi C., Landini E., Roggieri P., Fabbri R. et Viarengo A. (1999).** Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: Experimental studies. Environ. Mol. Mutagen., 33, 287.
- Bonneris E., Giguere A., Perceval O., Buronfosse T., Masson S., Hare L. et Campbell P.G.C. (2005).** Sub-cellular partitioning of metals (Cd, Cu, Zn) in the gills of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*: role of calcium concretions in metal sequestration. Aquat. Toxicol., 71, 319-334.
- Borcherding J. (1995).** Laboratory experiments on the influence of food availability, temperature and photoperiod on gonad development in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. Malacologia, 36, 15-27.
- Bordin G., McCourt J., Cordeiro Raposo F. et Rodriguez A.R. (1997).** Metallothionein-like metalloproteins in the Baltic clam *Macoma balthica*: seasonal variations and induction upon metal exposure. Mar. Biol., 129, 453-463.
- Bourg A. (1992).** Le cadmium : une pollution régionale. In: *Revue de l'Agence de l'Eau*, pp. 16-19.
- Boutier B. (1981).** Synthèse des résultats de la surveillance des micropolluants dans la matière vivante. Ministère de l'Environnement, Bulletin du Réseau National d'Observation., pp. 115-174.
- Boutier B., Chiffolleau J.F., Jouanneau J.M., Latouche C. et Phillips I. (1989).** La contamination de la Gironde par le Cadmium; Origine, Extention, Importance. Scientific and Technical Report, IFREMER.
- Boutier B., Chiffolleau J.F., Auger D. et Truquet I. (1993).** Influence of the Loire River on dissolved lead and cadmium concentrations in coastal waters of Brittany. Estuar. Coast. Shelf Sci., 36, 133-145.
- Boutier B., Chiffolleau J.-F., Gonzalez J.-L., Lazure P., Auger D. et Truquet I. (2000).** Influence of the Gironde estuary outputs on cadmium concentrations in the waters: consequences on the Marennes-Oleron bay (France). Oceanol. Acta, 23, 745-757.
- Boyden C.R. et Phillips D.J.H. (1981).** Seasonal variation and inherent variability of trace elements in oyster and their implications for indicator studies. Mar. Ecol. Progr. Ser., 5, 29-40.
- Brake J., Davidson J. et Davis J. (2004).** Field observations on growth, gametogenesis, and sex ratio of triploid and diploid *Mytilus edulis*. Aquaculture, 236, 179-191.
- Bremmer I. (1987).** Involvement of metallothionein in the hepatic metabolism of copper. J. Nutr., 117, 19.
- Britton J.C. et Morton B. (1982).** A dissection guide, field and laboratory manual for the introduced bivalve *Corbicula fluminea*. Malacol. Rev., Suppl. 3, 1-82.
- Brouwer M., Schlenk D., Ringwood A.H. et Brouwer-Hoexum T. (1992).** Metal-specific induction of metallothionein isoforms in the blue crab *Callinectes sapidus* in response to single- and mixed-metal exposure. Arch. Biochem. Biophys., 294, 461-468.
- Brouwer M., Syring R. et Hoexum Brouwer T. (2002).** Role of a copper-specific metallothionein of the blue crab, *Callinectes sapidus*, in copper metabolism associated with degradation and synthesis of hemocyanin. J. Inorg. Biochem., 88, 228-239.
- Brzówska M.M. et Moniuszko-Jakoniuk J. (2001).** Interactions between cadmium and zinc in the organism. Food Chem. Toxicol., 39, 967-980.
- Bury N.R., Walker P.A. et Glover C.N. (2003).** Nutritive metal uptake in teleost fish. J Exp Biol, 206, 11-23.

- Butler R.A. et Roesijadi G. (2000).** Resistance to cadmium cytotoxicity in molluscan hemocytes is compromised by downregulation of MT expression with antisense oligonucleotides. *Comp. Biochem. Phys. A*, 126, 21.
- Butler R.A. et Roesijadi G. (2001a).** Disruption of metallothionein expression with antisense oligonucleotides abolishes protection against cadmium cytotoxicity in molluscan hemocytes. *Toxicol. Sci.*, 59, 101-107.
- Butler R.A. et Roesijadi G. (2001b).** Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction of a molluscan metallothionein mRNA. *Aquat. Toxicol.*, 54, 59-67.

--C-----

- Cai L., Satoh M., Tohyama C. et Cherian M.G. (1999).** Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. *Toxicol.*, 132, 85-98.
- Cai L. et Cherian M.G. (2003).** Zinc-metallothionein protects from DNA damage induced by radiation better than glutathione and copper- or cadmium-metallothioneins. *Toxicol. Lett.*, 136, 193-198.
- Campbell P.G.C. (1995).** Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. In: *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. Eds.: A Tessier and DR Turner. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 45-102.
- Campbell P.G.C., Errecalde O., Fortin C., Hiriart-Baer V.P. et Vigneault B. (2002).** Metal bioavailability to phytoplankton--applicability of the biotic ligand model. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 133, 189-206.
- Campbell H.A. et Couillard Y. (2004).** Prise en charge et détoxification des métaux chez les organismes aquatiques. In: *Écotoxicologie moléculaire : Principes fondamentaux et perspectives de développement*. Eds.: E Pelletier, PGC Campbell and F Denizeau. Presses de l'Université du Québec, Sainte-Foy (Quebec), Canada, pp. 9-61.
- Cano-Gauci D.F. et Sarkar B. (1996).** Reversible zinc exchange between metallothionein and the estrogen receptor zinc finger. *FEBS Lett.*, 386, 1-4.
- Capblancq J. et Tourenq J.N. (1978).** Hydrochimie de la rivière. *Lot. Anns Limnol.*, 14, 25-37.
- Carginale V., Scudiero R., Capasso C., Capasso A., Kille P., Di Prisco G. et Parisi E. (1998).** Cadmium-induced differential accumulation of metallothionein isoforms in the Antarctic icefish, which exhibits no basal metallothionein protein but high endogenous mRNA levels. *Biochem. J.*, 332, 475-481.
- Casas S. (2005).** Modélisation de la bioaccumulation des métaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) chez la moule, *Mytilus galloprovincialis*, en milieu méditerranéen. IFREMER, Nantes, Thèse de Doctorat, pp. 301.
- Cavaletto M., Ghezzi A., Burlando B., Evangelisti V., Ceratto N. et Viarengo A. (2002).** Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 131, 447-455.
- Çevik C., Öztürk B. et Buzzuro G. (2001).** The presence of *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) and *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley, 1933) in the Eastern Mediterranean Sea. *La Conchiglia*, 298, 25-28.
- Chaiton J.A. et Allen S.K. (1985).** Early detection of triploidy in the larvae of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, by flow cytometry. *Aquaculture*, 48, 35-43.

- Chan J., Huang Z., Merrifield M.E., Salgado M.T. et Stillman M.J. (2002).** Studies of metal binding reactions in metallothioneins by spectroscopic, molecular biology, and molecular modeling techniques. Coord. Chem. Rev., 233-234, 319-339.
- Chavez-Villalba J., Pommier J., Andriamiseza J., Pouvreau S., Barret J., Cochard J.-C. et Le Penne M. (2002).** Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. Aquaculture, 214, 115-130.
- Chen Y. et Maret W. (2001).** Catalytic selenols couple the redox cycles of metallothionein and glutathione. Eur. J. Biochem., 268, 3346-3353.
- Cheney D.P., Macdonald B.F. et Elston R.A. (2000).** Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): Initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. J. Shellfish Res., 19, 353-359.
- Cherian M.G. et Apostolova M.D. (2000).** Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation. Cell. Mol. Biol., 46, 347-356.
- Chiffolleau J.-F., Cossa D., Auger D. et Truquet I. (1994).** Trace metal distribution, partition and fluxes in the Seine estuary (France) in low discharge regime. Mar. Chem., 47, 145-158.
- Chimienti F., Jourdan E., Favier A. et Seve M. (2001).** Zinc resistance impairs sensitivity to oxidative stress in hela cells: protection through metallothioneins expression. Free Radical Bio. Med., 31, 1179-1190.
- Chu W.A., Moehlenkamp J.D., Bittel D., Andrews G.K. et Johnson J.A. (1999).** Cadmium-mediated activation of the metal response element in human neuroblastoma cells lacking functional metal response element-binding transcription factor-1. J. Biol. Chem., 274, 5279-5284.
- Ciutat A. (2003).** Impact de la bioturbation des sédiments sur les transferts et la biodisponibilité des métaux - Approches expérimentales. Université Bordeaux 1, Talence, Thèse de Doctorat, pp. 210.
- Claudi R. et Mackie G.L. (1993).** Practical manual for zebra mussel monitoring and control. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.
- Coleman N. (1996).** Potential for the establishment of wild populations and biological risk assessment of the introduction of Pacific oysters into Victoria. Marine and Freshwater Resources Institute, Department of Natural Resources and Environment, Victoria, pp. 40.
- Comans R.N.J. et Van Dijk C.P.J. (1988).** Role of complexation processes in cadmium mobilization during estuarine mixing. Nature, 336, 151-154.
- Couillard Y., Campbell P.G.C. et Tessier A. (1993).** Response of metallothionein concentrations in a freshwater bivalve (*Anodonta grandis*) along an environmental cadmium gradient. Limnol. Oceanogr., 38, 299-313.
- Couillard Y., Campbell P.G.C., Tessier A., Pellerin-Massicotte J. et Auclair J.C. (1995).** Field transplantation of the freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. I. Temporal changes in metallothionein and metal (Cd, Cu, and Zn) concentrations in soft tissues. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 52, 690-702.
- Couillard Y. (1997).** Technical evaluation of metallothionein as a biomarker for the mining industry. In: *Aquatic Effects Technology Evaluation Program Report 2.2.1*. Report Prepared for Natural Resources Canada, Ottawa, pp. 191.
- Counts C.L. (1986).** The zoogeography and history of the invasion of the United States by *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae). Am. Malacol. Bull., Special Edition 2, 7-39.

Cox E.S., Smith M.S.R., Nell J.A. et Maguire G.B. (1996). Studies on triploid oysters in Australia. VI. Gonad development in diploid and triploid Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 197, 101-120.

Coyle P., Philcox J.C., Carey L.C. et Rofe A.M. (2002). Metallothionein: the multipurpose protein. Cell. Mol. Life Sci., 59, 627-674.

--D-----

Dalton T., Palmiter R.D. et Andrews G.K. (1994). Transcriptional induction of the mouse metallothionein-I gene in hydrogen peroxide-treated Hepa cells involves a composite major late transcription factor/antioxidant response element and metal response promoter elements. Nucleic. Acids Res., 22, 5016-5023.

Dalton T., Li Q., Bittel D., Liang L. et Andrews G.K. (1996a). Oxidative stress activates metal-responsive transcription factor-1 binding activity. Occupancy in vivo of metal response elements in the metallothionein-I gene promoter. J. Biol. Chem., 271, 26233-26241.

Dalton T., Fu K., Palmiter R.D. et Andrews G.K. (1996b). Transgenic mice that overexpress metallothionein-I resist dietary zinc deficiency. J. Nutr., 126, 825-833.

Dalton T.P., Bittel D. et Andrews G.K. (1997). Reversible activation of mouse metal response element-binding transcription factor 1 DNA binding involves zinc interaction with the zinc finger domain. Mol. and Cell. Biol., 17, 2781-2789.

Dalton T.P., Solis W.A., Nebert D.W. et Carva M.J. (2000). Characterization of the MTF-1 transcription factor from zebrafish and trout cells. Comp. Biochem. Physiol. B, 126, 325-335.

Daniels P.J. et Andrews G.K. (2003). Dynamics of the metal-dependent transcription factor complex in vivo at the mouse metallothionein-I promoter. Nucl. Acids. Res., 31, 6710-6721.

Daskalakis K.D. (1996). Variability of metal concentrations in oyster tissue and implications to biomonitoring. Mar. Pollut. Bull., 32, 794-801.

Datta P.K. et Jacob S.T. (1997). Activation of the metallothionein-I gene promoter in response to cadmium and USF in vitro. Biochem. Biophys. Res. Co., 230, 159-163.

Davies M.S. et Cliffe E.J. (2000). Adsorption of metals in seawater to limpet (*Patella vulgata*) pedal mucus. Bull. Environ. Contam. Tox., 64, 228-234.

Davies N.A., Taylor M.G. et Simkiss K. (1997). The influence of particle surface characteristics on pollutant metal uptake by cells. Environ. Pollut., 96, 179-184.

Davis S.R. et Cousins R.J. (2000). Metallothionein expression in animals: A physiological perspective on function. J. Nutr., 130, 1085-1088.

De Lafontaine Y., Gagne F., Blaise C., Costan G., Gagnon P. et Chan H.M. (2000). Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). Aquat. Toxicol., 50, 51-71.

- De Min R. et Vio E. (1997).** Molluschi conchiferi del litorale sloveno. In: *Annals for Istran and Mediterranean Studies*. Ed.: Serie historia naturalis, Koper, pp. 241-258.
- Depledge M.H. et Rainbow P.S. (1990).** Models of regulation and accumulation of trace metals in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 97, 1-7.
- Depledge M.H. et Billingham Z. (1999).** Ecological significance of endocrine disruption in marine invertebrates. *Mar. Pollut. Bull.*, 39, 32-38.
- Desrosiers R.R., Gerard A., Peignon J.-M., Naciri Y., Dufresne L., Morasse J., Ledu C., Phelipot P., Guerrier P. et Dube F. (1993).** A novel method to produce triploids in bivalve molluscs by the use of 6-dimethylaminopurine. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 170, 29-43.
- Doherty F.G., Failla M.L. et Cherry D.S. (1988).** Metallothionein-like heavy metal binding protein levels in asiatic clams are dependent on the duration and mode of exposure to cadmium. *Water Res.*, 22, 927-932.
- Domouhtsidou G.P. et Dimitriadis V.K. (2000).** Ultrastructural localization of heavy metals (Hg, Ag, Pb, and Cu) in gills and digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 38, 472-478.
- Domouhtsidou G.P., Dailianis S., Kaloyianni M. et Dimitriadis V.K. (2004).** Lysosomal membrane stability and metallothionein content in *Mytilus galloprovincialis* (L.), as biomarkers: Combination with trace metal concentrations. *Mar. Pollut. Bull.*, 48, 572-586.
- Downing S.L. et Allen S.K. (1987).** Induced triploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature. *Aquaculture*, 61, 1-15.
- Dubois C. (1995).** Biologie et démo-écologie d'une espèce invasive, *Corbicula fluminea* (Mollusca: Bivalvia) originaire d'Asie: étude *in situ* (canal latéral à la Garonne, France) et en canal expérimental. Université de Toulouse, Toulouse, Thèse de Doctorat.
- Dupuy C., Le Gall S., Hartmann H.J. et Breret M. (1999).** Retention of ciliates and flagellates by the oyster *Crassostrea gigas* in French Atlantic coastal ponds: Protists as a trophic link between bacterioplankton and benthic suspension-feeders. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 177, 165-175.
- Dutton M.D., Stephenson M. et Klaverkamp J.F. (1993).** A mercury saturation assay for measuring metallothionein in fish. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12, 1193-1202.

E-----

- Edmond J.M., Spivack A., Grant B.C., Ming-Hui H. et Zexiam; Chen Sung; Zeng Xiushau C. (1985).** Chemical dynamics of the Changjiang estuary. *Cont. Shelf Res.*, 4, 17-36.
- Egli D., Selvaraj A., Yepiskoposyan H., Zhang B., Hafen E., Georgiev O. et Schaffner W. (2003).** Knockout of 'metal-responsive transcription factor' MTF-1 in *Drosophila* by homologous recombination reveals its central role in heavy metal homeostasis. *EMBO J.*, 22, 100-108.
- Elbaz-Poulichet F., Huang W.W., Jednacak-Biscan J., Martin J.M. et Thomas A.J. (1982).** Trace metal behaviour in the Gironde Estuary. *Thalassia Jugoslavica*, 18, 61-95.

- Elbaz-Poulichet F., Martin J.M., Huang W.W. et Zhu J.X. (1987).** Dissolved Cd behaviour in some selected french and chinese estuaries. Consequences on Cd supply to the ocean. *Mar. Chem.*, 22, 125-136.
- Elbaz-Poulichet F., Garnier J.-M., Guan D.M., Martin J.-M. et Thomas A.J. (1996).** The conservative behaviour of trace metals (Cd, Cu, Ni and Pb) and as in the surface plume of stratified estuaries: Example of the Rhone River (France). *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 42, 289-310.
- Eng L.L.** Populations dynamics of the Asian clam, *Corbicula luminea* (Müller), in the concrete-lined Delta-Mendota canal of central California. *First International Corbicula Symposium*. Fort Worth, Texax Christian University, 1979, pp. 15-38.
- Engel D.W. (1987).** Metal regulatory and molting in the blue crab, *Callinectes sapidus*: copper, zinc, and metallothionein. *Bio. Bull.*, 172, 69-81.
- Engel D.W. et Brouwer M. (1987).** Metal regulation in molting in the blue crab, *Callinectes sapidus*: metallothionein function in metal metabolism. *Bio. Bull.*, 173, 239-251.
- Engelken J. et Hildebrandt A. (1999).** cDNA cloning and cadmium-induced expression of metallothionein mRNA in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Biochem. Cell Biol.*, 77, 237-241.
- English T.E. et Storey K.B. (2003).** Freezing and anoxia stresses induce expression of metallothionein in the foot muscle and hepatopancreas of the marine gastropod *Littorina littorea*. *J Exp Biol*, 206, 2517-2524.
- Ettajani H., Berthet B., Amiard J.-C. et Chevolot L. (2001).** Determination of cadmium partitioning in microalgae and oysters: contribution to the assessment of trophic transfer. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 40, 209-221.
- Eudeline B., K. A.S. et Guo X. (2000a).** Delayed meiosis and polar body release in eggs of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in relation to tetraploid production. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 248, 151-161.
- Eudeline B., Allen S.K. et Guo X. (2000b).** Optimization of tetraploid induction in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, using first polar body as a natural indicator. *Aquaculture*, 187, 73-84.

F-----

- Fan W. et Wang W.X. (2001).** Sediment geochemical controls on CD, CR, and ZN assmilation by the clam *Ruditapes philippinarum*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20, 2309-2317.
- Farey B.J., Nelson L.A. et Rolph M.G. (1978).** Rapid technique for the breakdown of organic mercury compounds in natural waters and effluents. *The Analyst*, 103, 656.
- Finkel T. et Holbrook N.J. (2000).** Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239-247.
- Foe C. et Knight A. (1986).** Growth of *Corbicula fluminea* (*bivalvia*) fed artificial and algal diets. *Hydrobiologia*, 133, 155-164.
- Ford V.S. et Gottlieb L.D. (2002).** Single mutations silence PGiC2 genes in two very recent allotetraploid species of *Clarkia*. *Evolution*, 56, 699-707.

- Fowler B.A. (1987).** Intracellular compartmentation of metals in aquatic organisms: roles in mechanisms of cell injury. *Environ. Health. Perspect.*, 71, 121-128.
- Fowler B.A., Hildebrand C.E., Kojima Y. et Webb M. (1987).** Nomenclature of metallothionein. In: *Metallothionein II*. Ed.: JHRKY Kojima. Birkhauser-Verlag, Basel., pp. 19-22.
- Fraysse B., Baudin J.P., Garnier-Laplace J., Boudou A., Ribeyre F. et Adam C. (2000).** Cadmium uptake by *Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*: effects of pH and temperature. *Bull. Environ. Contam. Tox.*, 65, 638-645.
- Frazier J.M. et George S.G. (1983).** Cd kinetics in oysters: a comparative study of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Mar. Biol.*, 76, 55-61.

--G-----

- Gabbott P.A. (1975).** Storage cycle in marine bivalve molluscs: a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. In: *Proceedings of the 9th European Marine Biology Symposium*. Ed.: H Barnes. Aberdeen University Press, Scotland, pp. 191-211.
- Gagne F., Blaise C., Aoyama I., Luo R., Gagnon C., Couillard Y., Campbell P. et Salazar M. (2002).** Biomarker study of a municipal effluent dispersion plume in two species of freshwater mussels. *Environ. Toxicol.*, 17, 149-159.
- Galtsoff P.S. (1964).** The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fish. Bull.*, 64, 1-480.
- Garnier-Gere P.H., Naciri-Graven Y., Bougrier S., Magoulas A., Heral M., Kotoulas G., Hawkins A. et Gerard A. (2002).** Influences of triploidy, parentage and genetic diversity on growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* reared in contrasting natural environments. *Mol Ecol*, 11, 1499-1514.
- Gauthier-Clerc S., Pellerin J., Blaise C. et Gagne F. (2002).** Delayed gametogenesis of *Mya arenaria* in the Saguenay fjord (Canada): a consequence of endocrine disruptors? *Comp. Biochem. Physiol. C*, 131, 457-467.
- Geffard A., Amiard-Triquet C., Amiard J.C. et Mouneyrac C. (2001).** Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of oysters (*Crassostrea gigas*) from a clean and a metal-rich site. *Biomarkers*, 6, 91-107.
- Geffard A., Amiard J.C. et Amiard-Triquet C. (2002).** Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker: seasonal and intersite fluctuations. *Biomarkers*, 7, 123-137.
- George S. (1982).** Subcellular accumulation and detoxification of metals in aquatic animals. In: *Physiological Mechanisms of Marine Pollutant Toxicity*. Ed.: WB Vernberg, Calabrese, A., Thurberg, F.P. and Vernberg, F.J. Academic Press, New York, pp. 3-52.
- George S.G. (1983).** Heavy metal detoxication in the mussel *Mytilus edulis*-composition of Cd-containing kidney granules (tertiary lysosomes). *Comp. Biochem. Physiol. C*, 76, 53-57.
- George S.G. (1988).** Biochemical and cytological assessments of metal toxicity in marine animals. In: *Heavy Metals in the Marine Environment*. Eds.: RW Furness and PS Rainbow. CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 123-142.

- George S.G. (1990).** Biochemical and cytological assessments of metal toxicity in marine animals. In: *Heavy metal in the marine environment*. Eds.: RW Furness and PS Rainbow. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, pp. 123-142.
- George S.G. et Langston W.J. (1994).** Metallothionein as an indicator of water quality: assessment of the bioavailability of cadmium, copper, mercury and zinc in aquatic animals at the cellular level. In: *Water quality and stress indicators in marine and freshwater ecosystems: linking levels of organisation (individuals, populations, communities)*. Ed.: DW Sutcliffe. The Freshwater Biological Association, Ambleside, pp. 138-153.
- Geret F., Serafim A., Barreira L. et Bebianno M.J. (2002).** Response of antioxidant systems to copper in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. *Mar. Environ. Res.*, 54, 413-417.
- Geret F. et Bebianno M.J. (2004).** Does zinc produce reactive oxygen species in *Ruditapes decussatus*? *Ecotox. Environ. Safe.*, 57, 399-409.
- Geret F., Manduzio H., Company R., Leboulenger F., Bebianno M.J. et Danger J.M. (2004).** Molecular cloning of superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) from aquatic molluscs. *Mar. Environ. Res.*, 58, 619-623.
- Ghoshal K., Wang Y., Sheridan J.F. et Jacob S.T. (1998).** Metallothionein induction in response to restraint stress. Transcriptional control, adaptation to stress, and role of glucocorticoid. *J. Biol. Chem.*, 273, 27904-27910.
- Giamberini L. et Pihan J.-C. (1996).** The pericardial glands of the zebra mussel: Ultrastructure and implication in lead detoxication process. *Biol. Cell*, 86, 59-65.
- Giguere A., Couillard Y., Campbell P.G.C., Perceval O., Hare L., Pinel-Alloul B. et Pellerin J. (2003).** Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. *Aquat. Toxicol.*, 64, 185-200.
- Girardi H. (1989-1990).** Deux bivalves d'eau douce récents pour la faune française (*Mollusca, Bivalvia*). *Bull. Soc. Et. Sci. Nat. Vaucluse*, 87-93.
- Girault L. (1996).** Etude au niveau moléculaire des interactions entre les métaux - cadmium, mercure inorganique et méthylmercure - et les phospholipides membranaires. In: *Bordeaux*. Université Bordeaux 1, Talence, pp. 213.
- Girault L., Boudou A. et Dufourc E.J. (1998).** ¹¹³Cd-, ³¹P-NMR and fluorescence polarization studies of cadmium(II) interactions with phospholipids in model membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1414, 140-154.
- Glover C.N., Bury N.R. et Hogstrand C. (2003).** Zinc uptake across the apical membrane of freshwater rainbow trout intestine is mediated by high affinity, low affinity, and histidine-facilitated pathways. *Biochim. Biophys. Acta*, 1614, 211-219.
- Godefroy D., Burgeot T. et Le Grand J. (1996).** L'éthorésorufine-O-dééthylase (EROD), biomarqueur d'exposition aux polluants du milieu marin : Mise en place d'un réseau expérimental de surveillance des effets biologiques en baie de Seine et résultats préliminaires. *J. de Recherche Océanographique*, 21, 83-87.
- Goldberg E.D., Koide M., Hodge V., Flegal A.R. et Martin J. (1983).** U.S. Mussel Watch: 1977-1978 results on trace metals and radionuclides. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 16, 69-93.
- Goosen N.K., Kromkamp J., Peene J., van Rijswijk P. et van Breugel P. (1999).** Bacterial and phytoplankton production in the maximum turbidity zone of three European estuaries: the Elbe, Westerschelde and Gironde. *J. Marine Syst.*, 22, 151-171.

H

- Hamer D.H. (1986).** Metallothionein. Annu. Rev. Biochem., 55, 913-951.
- Hamilton S.J. et Mehrle P.M. (1986).** Metallothionein in brook trout (*Salvelinus fortinalis*) as a biological indicator of cadmium stress. Abstr. Pap. Am. Chem. Soc., 194, 289.
- Hand R.E., Nell J.A. et Maguire G.B. (1998).** Studies on triploid oysters in Australia: X. Growth and mortality of diploid and triploid Sydney rock oysters, *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). J. Shellfish Res., 17, 1115-1127.
- Hand R.E. et Nell J.A. (1999).** Studies on triploid oysters in Australia; XII. Gonad discolouration and meat condition of diploid and triploid Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*) in five estuaries in New South Wales, Australia. Aquaculture, 171, 181-194.
- Haq F., Mahoney M. et Koropatnick J. (2003).** Signaling events for metallothionein induction. Mutat. Res., 533, 211-226.
- Hare L. et Tessier A. (1996).** Predicting animal cadmium concentrations in lakes. Nature, 380, 430-432.
- Hawkins A.J.S., Day A.J., Gerard A., Naciri Y., Ledu C., Bayne B.L. et Heral M. (1994).** A genetic and metabolic basis for faster growth among triploids induced by blocking meiosis I but not meiosis II in the larviparous European flat oyster, *Ostrea edulis* L. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 184, 21-40.
- Hawkins A.J.S., Magoulas A., Heral M., Bougrier S., Naciri-Graven Y., Day A.J. et Kotoulas G. (2000).** Separate effects of triploidy, parentage and genomic diversity upon feeding behaviour, metabolic efficiency and net energy balance in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Genet. Res., 76, 273-284.
- Hebert P.D.N., Muncaster B.W. et Mackie G.L. (1989).** Ecological and genetic studies on *Dreissena polymorpha* (Pallas): a new mollusc in the Great Lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 46, 1587-1591.
- Hebert P.D.N., Wilson C.C., Murdoch M.H. et Lazar R. (1991).** Demography and ecological impacts of the invading mollusc *Dreissena polymorpha*. Can. J. Zool., 69, 405-409.
- Hemelraad J. et Herwig H.J. (1988).** Cadmium kinetics in freshwater clams. IV. Histochemical localization of cadmium in *Anodonta cygnea* and *Anodonta anatina* exposed to cadmium chloride. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 17, 337-343.
- Herbert P.D.N., Muncaster B.W. et Mackie G.L. (1989).** Ecological and genetic studies on *Dreissena polymorpha* Pallas, a new mollusc in the Great Lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 46, 1587-1591.
- Herwig H.J., Brands F., Kruitwagen E. et Zandee D.I. (1989).** Bioaccumulation and histochemical localization of cadmium in *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium chloride. Aquat. Toxicol., 15, 269-285.
- Heuchel R., Radtke F., Georgiev O., Stark G., Aguet M. et Schaffner W. (1994).** The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal- induced metallothionein gene expression. EMBO J., 13, 2870-2875.
- High K.A., Barthet V.J., McLaren J.W. et Blais J.-S. (1997).** Characterization of metallothionein-like proteins from zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). Environ. Toxicol. Chem., 16, 1111-1118.

- Gouletquer P. (1997).** Cycle de reproduction naturelle de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. In: *La reproduction naturelle et contrôlée des Bivalves cultivés en France*. IFREMER Rapport Interne DRV/RA/RST/97-11 RA, Brest, pp. 7-19.
- Grant J. (1996).** The relationship of bioenergetics and the environment to the field growth of cultured bivalves. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 200, 239-256.
- Grosell M., Nielsen C. et Bianchini A. (2002).** Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 133, 287-303.
- Grosell M. et Wood C.M. (2002).** Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *J. Exp. Biol.*, 205, 1179-1188.
- Grousset F.E., Jouanneau J.M., Castaing P., Lavaux G. et Latouche C. (1999).** A 70 year record of contamination from industrial activity along the Garonne River and its tributaries (SW France). *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 48, 401-414.
- Gruet Y. (1992).** Un nouveau mollusque bivalve pour notre région: *Corbicula* sp.(*Heterodonta sphaeriacea*). *Bull. Soc. Nat. Ouest de la France*, 14, 37- 43.
- Guerrero A.L. et Berg J.M. (2004).** Metal ion affinities of the zinc finger domains of the metal responsive element-binding transcription factor-1 (MTF1). *Biochemistry*, 43, 5437-5444.
- Guillard R.R.L. et Ryther J.H. (1962).** Studies of marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.*, 8, 229-239.
- Gundacker C. (1999).** Tissue-specific heavy metal (Cd, Pb, Cu, Zn) deposition in a natural population of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* Pallas. *Chemosphere*, 38, 3339-3356.
- Günes C., Heuchel R., Georgiev O., Müller K.-H., Lichtlen P., Bluthmann H., Marino S., Aguzzi A. et Schaffner W. (1998).** Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the metal-responsive transcriptional activator MTF-1. *EMBO J.*, 17, 2846-2854.
- Guo L., Hunt B.J., Santschi P.H. et Ray S.M. (2001).** Effect of dissolved organic matter on the uptake of trace metals by American oysters. *Environ. Sci. Technol.*, 35, 885-893.
- Guo M., Davis D. et Birchler J.A. (1996).** Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series. *Genetics*, 142, 1349-1355.
- Guo X. et Allen S.K. (1994a).** Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body 1 in eggs from triploids. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3, 42-50.
- Guo X. et Allen S.K. (1994b).** Reproductive potential and genetics of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Biol Bull*, 187, 309-318.
- Guo X. et Allen S.K. (1994c).** Sex determination and polyploid gigantism in the dwarf surfclam (*Mulinia lateralis* Say). *Genetics*, 138, 1199-1206.
- Guo X., DeBrosse G.A. et Allen S.K. (1996).** All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. *Aquaculture*, 142, 149-161.
- Gutknecht J. (1983).** Cadmium and thallos ion permeabilities through lipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 735, 185-188.

- His E., Robert R. et Dinet A. (1989).** Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. Mar. Biol., 100, 455–463.
- His E. (1991).** Biologie et écotoxicologie des véligères de *Crassostrea gigas* (Thunberg) dans le Bassin d'Arcachon. Université de Bordeaux 1, Talence, Thèse de Doctorat, pp. 192.
- Huanxin W., Lejun Z. et Presley (2000).** Bioaccumulation of heavy metals in oyster (*Crassostrea virginica*) tissue and shell. Environ. Geol., 39, 1216-1226.

--I-----

- Idlafkih Z., Cossa D. et Meybeck M. (1995).** Comportements des contaminants en trace dissous et particulaires (As, Cd, Cu, Hg, Pb, Zn) dans la Seine. Hydroecol. Appl., 7, 127–150.
- IFREMER (1994).** Surveillance du milieu marin. Travaux du Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin. Edition 1994, Nantes.
- IFREMER (1995).** Surveillance du milieu marin. Travaux du Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin. Edition 1995, Nantes.
- IFREMER (2000).** L'huître triploïde n'est pas un organisme génétiquement modifié (OGM) “Savoir et comprendre avant de diaboliser”. In: *Les nouvelles d'Ifremer*, pp. 1.
- IFREMER (2001).** Résultats de la surveillance de la qualité du milieu marin littoral. Départements : Gironde, Landes et Pyrénées Atlantiques Edition 2001, Nantes, pp. 45.
- IFREMER (2002).** Résultats de la surveillance de la qualité du milieu marin littoral. Départements : Gironde, Landes et Pyrénées Atlantiques Edition 2002, Nantes, pp. 45.
- Imbert J., Culotta V.C., Furst P., Gedamu G. et Hamer D. (1990).** Regulation of metallothionein gene transcription by metals. Adv. Inorg. Biochem., 8, 140–150.
- Irato P., Santovito G., Cassini A., Piccinni E. et Albergoni V. (2003).** Metal accumulation and binding protein induction in *Mytilus galloprovincialis*, *Scapharca inaequalvis*, and *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 44, 476-484.
- Irigoien X. et Castel J. (1997).** Light limitation and distribution of chlorophyll pigments in a highly turbid estuary: the Gironde (SW France). Estuar. Coast. Shelf Sci., 44, 507-517.

--J-----

- Jacob C., Maret W. et Vallee B.L. (1998).** Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 95, 3489-3494.

- Jacob C., Maret W. et Vallee B.L. (1999).** Selenium redox biochemistry of zinc-sulfur coordination sites in proteins and enzymes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 96, 1910-1914.
- Jenny M.J., Ringwood A.H., Schey K., Warr G.W. et Chapman R.W. (2004).** Diversity of metallothioneins in the American oyster, *Crassostrea virginica*, revealed by transcriptomic and proteomic approaches. Eur. J. Biochem., 271, 1702-1712.
- Jiang H., Daniels P.J. et Andrews G.K. (2003).** Putative zinc-sensing zinc fingers of metal-response element-binding transcription factor-1 stabilize a metal-dependent chromatin complex on the endogenous metallothionein-I promoter. J. Biol. Chem., 278, 30394-30402.
- Jiang H., Fu K. et Andrews G.K. (2004).** Gene- and cell-type-specific effects of signal transduction cascades on metal-regulated gene transcription appear to be independent of changes in the phosphorylation of metal-response-element-binding transcription factor-1. Biochem. J., 382, 33-41.
- Jiang L.J., Maret W. et Vallee B.L. (1998a).** The ATP-metallothionein complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 95, 9146-9149.
- Jiang L.J., Maret W. et Vallee B.L. (1998b).** The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 95, 3483-3488.
- Jiang L.J., Vasak M., Vallee B.L. et Maret W. (2000).** Zinc transfer potentials of the alpha - and beta-clusters of metallothionein are affected by domain interactions in the whole molecule. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 97, 2503-2508.
- Jouanneau J.M., Boutier B., Chiffolleau J.-F., Latouche C. et Philipps I. (1990).** Cadmium in the gironde fluvioestuarine system: Behaviour and flow. Sci. Total Environ., 97-98, 465-479.
- Jouanneau J.M., Lapaquellerie Y. et Latouche C. (1993).** Origin and pathways of Cd contamination in the Gironde estuary, Garonne river and tributaries. In: *Environment contamination*. Ed.: JP Vernet. Elsevier, Amsterdam, pp. 373-389.
- Jouanneau J.-M., Weber O., Grousset F.E. et Thomas B. (1998).** Pb, Zn, Cs, Sc and rare earth elements as tracers of the Loire and Gironde particles on the Biscay shelf (SW France). Oceanol. Acta, 21, 233-241.
- Jozereau C. (1997).** La production de zinc dans la vallée du Lot depuis le XIX^{ème} siècle. Conséquences sur l'environnement. In: *Rapport de stage de Maîtrise des Sciences de l'Environnement, option Océanologie*. Université Bordeaux I, Talence.

K-----

- Kägi J.H.R. et Kojima Y. (1987).** Chemistry and biochemistry of metallothionein. Experientia Suppl., Suppl. 52, 25-61.
- Kägi J.H.R. (1991).** Overview of metallothionein. Methods Enzymol., 205, 613-626.
- Kägi J.H.R. (1993).** Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins: an overview. In: *Metallothionein III. Biological Roles and Medical Implications*. Eds.: KT Suzuki, N Imura and M Kimura. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 29-55.

- Ke C. et Wang W.-X. (2001).** Bioaccumulation of Cd, Se, and Zn in an estuarine oyster (*Crassostrea rivularis*) and a coastal oyster (*Saccostrea glomerata*). Aquat. Toxicol., 56, 33-51.
- Kelly E.J., Quaife C.J., Froelick G.J. et Palmiter R.D. (1996).** Metallothionein I and II protect against zinc deficiency and zinc toxicity in mice. J. Nutr., 126, 1782-1790.
- Kesarcodi-Watson A., Klumpp D.W. et Lucas J.S. (2001).** Comparative feeding and physiological energetics in diploid and triploid Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*) - II. Influences of food concentration and tissue energy distribution. Aquaculture, 203, 195-216.
- Khalanski M. (1996).** Conséquences industrielles et écologiques de l'introduction de nouvelles espèces dans les hydrosystèmes continentaux : la Moule zébrée et autres espèces invasives. Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture, 385-404.
- Khoo H.W. et Patel K.H. (1999).** Metallothionein cDNA, promoter, and genomic sequences of the tropical green mussel, *Perna viridis*. J. Exp. Biol., 284, 445-453.
- Kiningham K. et Kasarskis E. (1998).** Antioxidant function of metallothioneins. J. Trace Elem. Exp. Med., 11, 219-226.
- Kinzelbach R. (1992).** The main features of the phylogeny and dispersal of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. In: *The zebra mussel Dreissena polymorpha*. Eds.: D Neumann and HA Jenner. Gustav Fisher Verlag, New York, pp. 5-17.
- Klaassen C.D., Choudhuri S., McKim J.M., Lehman-McKeeman J.L.D. et Kershaw W.C. (1994).** In vitro and in vivo studies on the degradation of metallothionein. Environ. Health. Perspect., 102, 141-146.
- Klerks P.L. et Fraleigh P.C. (1997).** Uptake of nickel and zinc by the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 32, 191-197.
- Kling P., Erkell L.J., Kille P. et Olsson P.-E. (1996).** Metallothionein induction in rainbow trout gonadal (RTG-2) cells during free radical exposure. Mar. Environ. Res., 42, 33-36.
- Kojima Y. (1991).** Definitions and nomenclature of metallothioneins. In: *Methods Enzymol.* Academic Press, pp. 8-10.
- Kovalak W.P., Longton G.D. et Smithee D. (1993).** Infestation of power plant water systems by the zebra mussel (*Dreissena polymorpha* Pallas). In: *Zebra mussels: Biology, impacts, and control*. Eds.: TF Nalepa and DW Schloesser. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, pp. 359-380.
- Kraak M.H., Toussaint M., Lavy D. et Davids C. (1994a).** Short-term effects of metals on the filtration rate of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. Environ. Pollut., 84, 139-143.
- Kraak M.H.S., Wink Y.A., Stuijzand S.C., Buckert-de Jong M.C., de Groot C.J. et Admiraal W. (1994b).** Chronic ecotoxicity of Zn and Pb to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. Aquat. Toxicol., 30, 77-89.
- Kraepiel A.M.L., Chiffolleau J.-F., Martin J.-M. et Morel F.M.M. (1997).** Geochemistry of trace metals in the Gironde estuary. Geochim. Cosmochim. Acta 61, 1421-1436.
- Kwan K.H.M., Chan H.M. et de Lafontaine Y. (2003).** Metal contamination in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) along the St. Lawrence River. Environ. Monit. Assess., 88, 193-219.

L

- Langmade S.J., Ravindra R., Daniels P.J. et Andrews G.K. (2000).** The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *J. Biol. Chem.*, 275, 34803-34809.
- Langston W.J. et Zhou M. (1986).** Evaluation of the significance of metal-binding proteins in the gastropod *Littorina littorea*. *Mar. Biol.*, 92, 505-515.
- Langston W.J., Bebianno M.J. et Burt J.R. (1998).** Metal handling strategies in molluscs. In: *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Eds.: WJ Langston and MJ Bebianno. Chapman and Hall, London, pp. 219–283.
- Lapaquellerie Y., Jouanneau J.M., Maillet N. et Latouche C. (1995).** Cadmium pollution in sediments of the Lot river (France). Estimate of the mass of cadmium. *Envir. Techn.*, 16, 1145-1154.
- LaRochelle O., Gagne V., Charron J., Soh J.-W. et Seguin C. (2001).** Phosphorylation is involved in the activation of Metal-regulatory Transcription Factor 1 in response to metal ions. *J. Biol. Chem.*, 276, 41879-41888.
- Latouche C. (1988).** Cadmium pollution in the Gironde estuary. *Bulletin - Institut de Geologie du Bassin d'Aquitaine*, 44, 15-21.
- Lazo J.S., Kondo Y., Dellapiazza D., Michalska A.E., Choo K.H. et Pitt B.R. (1995).** Enhanced sensitivity to oxidative stress in cultured embryonic cells from transgenic mice deficient in metallothionein I and II genes. *J. Biol. Chem.*, 270, 5506-5510.
- Le Pennec G. et Le Pennec M. (2001).** Evaluation of the toxicity of chemical compounds using digestive acini of the bivalve mollusc *Pecten maximus* L. maintained alive in vitro. *Aquat. Toxicol.*, 53, 1-7.
- Lecoeur S., Videmann B. et Berny P. (2004).** Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*. *Environ. Res.*, 94, 184-191.
- Lekube X., Cajaraville M.P. et Marigomez I. (2000).** Use of polyclonal antibodies for the detection of changes induced by cadmium in lysosomes of aquatic organisms. *Sci Total Envir*, 247, 201-212.
- Lemaire E., Abril G., De Wit R. et Etcheber H. (2002).** Effet de la turbidite sur la degradation des pigments phytoplanctoniques dans l'estuaire de la Gironde: Effect of turbidity on phytoplanktonic pigments degradation in the Gironde Estuary. *Comptes Rendus Geosciences*, 334, 251-258.
- Lemoine S. et Laulier M. (2003).** Potential use of the levels of the mRNA of a specific metallothionein isoform (MT-20) in mussel (*Mytilus edulis*) as a biomarker of cadmium contamination. *Mar. Pollut. Bull.*, 46, 1450-1455.
- Levinton J.S., Ward J.E. et Shumway S.E. (2002).** Feeding responses of the bivalves *Crassostrea gigas* and *Mytilus trossulus* chemical composition of fresh and aged kelp detritus. *Mar. Biol.*, 141, 367–376.
- Li Q., Hu N., Daggett M.A., Chu W.A., Bittel D., Johnson J.A. et Andrews G.K. (1998a).** Participation of upstream stimulator factor (USF) in cadmium-induction of the mouse metallothionein-I gene. *Nucleic. Acids Res.*, 26, 5182-5189.
- Li Q., Osada M., Suzuki T. et Mori K. (1998b).** Changes in vitellin during oogenesis and effect of estradiol-17 on vitellogenesis in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Invertebr. Reprod. Dev.*, 33, 87–93.

- Lichtlen P. et Schaffner W. (2001).** Putting its fingers on stressful situations: The heavy metal-regulatory transcription factor MTF-1. Bioessays, 23, 1010-1017.
- Liu S.X., Fabisiak J.P., Tyurin V.A., Borisenko G.G., Pitt B.R., Lazo J.S. et Kagan V.E. (2000).** Reconstitution of apo-superoxide dismutase by nitric oxide-induced copper transfer from metallothioneins. Chem. Res. Toxicol., 13, 922-931.
- Lobel P.B. et Payne J.F. (1987).** The mercury-203 method for evaluating metallothioneins: interference by copper, mercury, oxygen, silver and selenium. Comp. Biochem. Physiol. C, 86, 37-39.
- Lowe T.P. et Day D.D. (2002).** Metal concentrations in zebra mussels and sediments from embayments and riverine environments of eastern Lake Erie, southern Lake Ontario, and the Niagara River. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 43, 301-308.
- Lubet P.E. et Mathieu M. (1999).** Recent acquisitions of bivalves biology applied to mollusc farming. L'Année Biologique, 38, 27-50.

--M-----

- Mackie G.L. et Schloesser D.W. (1996).** Comparative biology of zebra mussels in Europe and North America: An overview. Am. Zool., 36, 244-258.
- Majumder S., Ghoshal K., Gronostajski R.M. et Jacob S.T. (2001).** Downregulation of constitutive and heavy metal-induced metallothionein-I expression by nuclear factor I. Gene Expr., 9, 203-215.
- Mann R., Burreson E.M. et Baker P.K. (1991).** The decline of the Virginia oyster fishery in Chesapeake Bay: considerations for the introduction of a non-endemic species, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). J. Shellfish Res., 10, 379-388.
- Maret W. (1994).** Oxidative metal release from metallothionein via zinc-thiol/disulfide interchange. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91, 237-241.
- Maret W., Larsen K.S. et Vallee B.L. (1997).** Coordination dynamics of biological zinc "clusters" in metallothioneins and in the DNA-binding domain of the transcription factor Gal4. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 94, 2233-2237.
- Maret W., Jacob C., Vallee B.L. et Fischer E.H. (1999).** Inhibitory sites in enzymes: Zinc removal and reactivation by thionein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 96, 1936-1940.
- Maret W., Heffron G., Hill H.A.O., Djuricic D., Jiang L.-J. et Vallee B.L. (2002).** The ATP/metallothionein interaction: NMR and STM. Biochemistry, 41, 1689-1694.
- Maret W. (2003).** Cellular zinc and redox states converge in the metallothionein/thionein pair. J. Nutr., 133, 1460S-1462.
- Marie V., Gonzalez P., Baudrimont M., Bourdineaud J.-P. et Boudou A. (in press).** Metallothionein response to cadmium and zinc exposures compared in two freshwater bivalves, *Dreissena polymorpha* and *Corbicula fluminea*. Biometals.

- Marigomez I., Orbea A., Olabarrieta I., Etxebarria M. et Cajaraville M.P. (1996).** Structural changes in the digestive lysosomal system of sentinel mussels as biomarkers of environmental stress in Mussel-Watch Programmes. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 113, 291-297.
- Marigomez I., Soto M., Cajaraville M.P., Angulo E. et Giamberini L. (2002).** Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microsc. Res. Techniq.*, 56, 358-392.
- Markich S.J., Brown P.L. et Jeffree R.A. (2001).** Divalent metal accumulation in freshwater bivalves: an inverse relationship with metal phosphate solubility. *Sci. Total Environ.*, 275, 27-41.
- Maroni G. (1990).** Animal Metallothioneins. In: *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*. Ed.: AJ Shaw. CRC Press, Florida, pp. 215-232.
- Marsh P.C. (1985).** Secondary production of introduced Asiatic clam, *Corbicula fluminea* in a central Arizona canal. *Hydrobiologia*, 124, 103-110.
- Martin D.J. et Rainbow P.S. (1998a).** The kinetics of zinc and cadmium in the haemolymph of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Aquat. Toxicol.*, 40, 203-231.
- Martin D.J. et Rainbow P.S. (1998b).** Haemocyanin and the binding of cadmium and zinc in the haemolymph of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Sci. Total Environ.*, 214, 133-152.
- Martin J.M. et Windom H.L. (1990).** Present and future of ocean margin in the regulating marine biogeochemical cycle of trace elements. In: *Proceeding of Dahlem Conference Marginal seas Processes in the Global Changes*. Eds.: RFC Mantoura, JM Martin and R Wollast.
- Martoja M. (1995).** Mollusques. Institut océanographique, Paris, pp. 167.
- Mason A.Z. et Jenkins K.D. (1995).** Metal detoxification in aquatic organisms. In: *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. Eds.: A Tessier and DR Turner. John Wiley and Sons, New York, pp. 479-608.
- Masters B.A., Kelly E.J., Quaife C.J., Brinster R.L. et Palmiter R.D. (1994).** Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91, 584-588.
- Mattice J.S. et Wright L.L.** Aspects of growth of *Corbicula fluminea*. *Second Int. Corbicula Symp. Am. Malacol. Bul.*, 1986.
- McMahon R.F. et Williams C.J.** Growth, life cycle, upper thermal limit and downstream colonization rates in a natural population of the freshwater bivalve mollusc, *Corbicula fluminea*. *Proc. Second Internat. Corbicula Symp. Am. Malacol. Bull.*, 1986, pp. 231-239.
- Meplan C., Richard M.-J. et Hainaut P. (2000).** Metalloregulation of the tumor suppressor protein p53: Zinc mediates the renaturation of p53 after exposure to metal chelators in vitro and in intact cells. *Oncogene*, 19, 5227-5236.
- Michalska A.E. et Choo K.H. (1993).** Targeting and germ-line transmission of a null mutation at the metallothionein I and II loci in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90, 8088-8092.
- Michel P., Boutier B. et Chiffolleau J.-F. (2000).** Net fluxes of dissolved arsenic, cadmium, copper, zinc, nitrogen and phosphorus from the Gironde Estuary (France): Seasonal variations and trends. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 51, 451-462.
- Mill P.J. (1972).** Respiration in the invertebrates. Eds.: JB Jennings and PJ Mill. Macmillan, St Martin's Press, University of Leeds.

- Minelli A., Ruffo S. et La Posta S. (1995).** Checklist delle specie della fauna Italiana. Edizioni Calderini, Bologna.
- Ministère de l'Agriculture de l'Alimentation de la Pêche et des Affaires Rurales F. (2004).** PÊCHE - AQUACULTURE - L'AQUACULTURE EN FRANCE, http://www.agriculture.gouv.fr/spip/ressources.themes.pecheaquaculture.aquaculture_r61.html.
- Moraga D., Meistertzheim A.-L., Tanguy-Royer S., Boutet I., Tanguy A. et Donval A. (2005).** Stress response in Cu²⁺ and Cd²⁺ exposed oysters (*Crassostrea gigas*): An immunohistochemical approach. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 141, 151-156.
- Morel F.M.M. (1983).** Principles of aquatic chemistry. Wiley-Interscience, New York, pp. 301.
- Morton B.S. (1983).** Feeding and digestion in Bivalvia. In: *The Mollusca*. Eds.: ASM Salenddin and KM Wilbur. Academic Press, New York, pp. 64.
- Morton B.S. (1993).** The anatomy of *Dreissena polymorpha* and the evolution and success of the hereromyarian form in the *Dreissenoidea*. In: *Zebra mussels: biology, impacts, and control*. Eds.: TF Nalepa and DW Schloesser. Boca Raton, Lewis, pp. 185-215.
- Mouneyrac C., Berthet B. et Amiard J.C. (1999).** Cd distribution in the tissues of oysters (*Crassostrea gigas*) exposed chronically *in situ*. *Water Air Soil Pollut.*, 112, 187-196.
- Mouneyrac C., Amiard J.C., Amiard-Triquet C., Cottier A., Rainbow P.S. et Smith B.D. (2002).** Partitioning of accumulated trace metals in the talitrid amphipod crustacean *Orchestia gammarellus*: a cautionary tale on the use of metallothionein-like proteins as biomarkers. *Aquat. Toxicol.*, 57, 225-242.
- Mouthon J. (1981).** Sur la présence en France et au Portugal de *Corbicula fluminea* (*Bivalvia: Corbiculidae*) originaire d'Asie. *Basteria*, 45, 109-116.
- Mouthon J. (2000).** Répartition du genre *Corbicula* Megerle von Mühlfeld. *Hydroecol. Appl.*, 1/2, 135-146.
- Mouthon J. (2001).** Life cycle and population dynamics of the Asian clam *Corbicula fluminea* (*Bivalvia: Corbiculidae*) in the Saone River at Lyon (France). *Hydrobiologia*, 452, 109-119.
- Murphy B.J., Andrews G.K., Bittel D., Discher D.J., McCue J., Green C.J., Yanovsky M., Giaccia A., Sutherland R.M., Laderoute K.R. et Webster K.A. (1999).** Activation of metallothionein gene expression by hypoxia involves metal response elements and metal transcription factor-1. *Cancer Res*, 59, 1315-1322.
- N-----**
- Narula S.S., Brouwer M., Hua Y. et Armitage I.M. (1995).** Three-dimensional solution structure of *Callinectes sapidus* metallothionein-1 determined by homonuclear and heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, 34, 620-631.
- Nell J.A., Hand R.E., Goard L.J., McAdam S.P. et Maguire G.B. (1996).** Studies on triploid oysters in Australia: Evaluation of cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine for triploidy induction in Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). *Aquac Research*, 27, 689-698.
- Nell J.A. (2002).** Farming triploid oysters. *Aquaculture*, 210, 69-88.

- Nemer M., Travaglini E.C., Rondinelli E. et D'Alonzo J. (1984).** Developmental regulation, induction, and embryonic tissue specificity of sea urchin metallothionein gene expression. Dev. Biol., 102, 471-482.
- Nemer M., Wilkinson D.G., Travaglini E.C., Sternberg E.J. et Butt T.R. (1985).** Sea urchin metallothionein sequence: key to an evolutionary diversity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 82, 4992-4994.
- Nordberg M. (1998).** Metallothioneins: historical review and state of knowledge. Talanta, 46, 243-253.
- NRCC (1985).** The role of biochemical indicators in the assessment of aquatic ecosystem health - their development and validation. National Research Council of Canada, Ottawa, pp. 119.

O-----

- Ogra Y. et Suzuki K.T. (2000).** Nuclear trafficking of metallothionein: possible mechanisms and current knowledge. Cell. Mol. Biol., 46, 357-365.
- Ohtake H., Suyemitsu T. et Koga M. (1983).** Sea urchin (*Anthocidaris crassispina*) egg zinc-binding protein. Cellular localization, purification and characterization. Biochem. J., 211, 109-118.

P-----

- Palmiter R.D. (1987).** Molecular biology of metallothionein gene expression. Experientia. Supplementum, 52, 63-80.
- Palmiter R.D. (1994).** Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91, 1219-1223.
- Palmiter R.D. et Findley S.D. (1995).** Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. EMBO J., 14, 639-649.
- Palmiter R.D. (1998).** The elusive function of metallothioneins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 95, 8428-8430.
- Paquin P.R., Gorsuch J.W., Apte S.C., Batley G.E., Bowles K.C., Campbell P.G.C., Delos C.G., Di Toro D.M., Dwyer R.L. et Galvez et a. (2002).** The biotic ligand model: a historical overview. Comp. Biochem. Physiol. C, 133, 3-35.
- Pavicic J., Skreblin M., Kregar I., Tusek-Znidaric M. et Stegnar P. (1994a).** Embryo-larval tolerance of *Mytilus galloprovincialis*, exposed to the elevated sea water metal concentrations--I. Toxic effects of Cd, Zn and Hg in relation to the metallothionein level. Comp. Biochem. Physiol. C, 107, 249-257.
- Pavicic J., Smodis B., Skreblin M., Kregar I. et Stegnar P. (1994b).** Embryo-larval tolerance of *Mytilus galloprovincialis*, exposed to elevated seawater metal concentrations--II. Stage-specific fluctuations in sensitivity toward Zn and Cd and their bioaccumulation into veliger larvae. Comp. Biochem. Physiol. C, 109, 37-46.

- Peakall D. et Burger J. (2003).** Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. *Ecotox. Environ. Safe.*, 56, 110-121.
- Pedersen T.V. et Bjerregaard P. (1995).** Calcium and cadmium fluxes across the gills of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Mar. Pollut. Bull.*, 31, 73-77.
- Pinel-Alloul B., Perceval O., Giguère A., Couillard Y., Campbell P.G.C. et Hare L. (2004).** La métallothionéine : un biomarqueur d'exposition : au cadmium pour les invertébrés d'eau douce. In: *Écotoxicologie moléculaire : Principes fondamentaux et perspectives de développement*. Eds.: E Pelletier, PGC Campbell and F Denizeau. Presses de l'Université du Québec, Sainte-Foy (Québec), Canada, pp. 63-108.
- Poutiers J.M. (1987).** Bivalves. In: *Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. Méditerranée et Mer Noire. Zone de pêche 37. Révision 1*. FAO, Rome, pp. 369-514.
- Programme G.I.S.-ECOBAG, Boudou A., Baudrimont M., Maury-Brachet R., Sautour B., Durrieu G., Rochard E. et Marie V. (2002a).** Système fluvio-estuarien de la Gironde : Contamination des réseaux trophiques de l'estuaire de la Gironde par les métaux-traces. In: *G.I.S.-ECOBAG Programme de recherche*. Eds.: G.I.S.-ECOBAG and Agence de l'eau Adour Garonne. Edicis, Toulouse, pp. 21-23.
- Programme G.I.S.-ECOBAG, Boudou A., Blanc G., Baudrimont M., Schäfer J., Marie V., Maury-Brachet R., Bossy C. et Durrieu G. (2002b).** Système fluvio-estuarien de la Gironde : Contamination des bivalves (huîtres, coques, palourdes) par les métaux dans les Marais du Nord-Médoc. In: *G.I.S.-ECOBAG Programme de recherche*. Eds.: G.I.S.-ECOBAG and Agence de l'eau Adour Garonne. Edicis, Toulouse, pp. 24-26.
- Programme LITEAU, Baudrimont M., Marie V., Roques-Duflo V., Bouillard H., Etcheverria B. et Boudou A. (2002).** Approche intégrée de la contamination des réseaux trophiques de l'estuaire de la Gironde - Etude cinétique de la contamination métallique de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, à partir de populations transplantées dans l'estuaire de la Gironde (site de la Fosse) et dans le bassin d'Arcachon. In: *Programme LITEAU Gironde : rôle de la dynamique des masses d'eau et des sédiments fins dans les transferts chimiques et biologiques dans l'estuaire*. Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, Talence, pp. 197-212.

Q-----

- Qu W. et Kelderman P. (2001).** Heavy metal contents in the Delft canal sediments and suspended solids of the River Rhine: multivariate analysis for source tracing. *Chemosphere*, 45, 919-925.
- Quillet E. et Panelay P.J. (1986).** Triploidy induction by thermal shocks in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 57, 271-279.

R-----

- Radtke F., Heuchel R., Georgiev O., Hergersberg M., Gariglio M., Dembic Z. et Schaffner W. (1993).** Cloned transcription factor MTF-1 activates the mouse metallothionein I promoter. *EMBO J.*, 12, 1355-1362.

- Raimbault R. (1964).** Croissance des huîtres atlantiques élevées dans les eaux méditerranéennes françaises. Science Pêche, 126, 1-10.
- Rainbow P.S. et Dallinger R. (1993).** Metal uptake, regulation and excretion in freshwater invertebrates. In: *Ecotoxicology of metals in invertebrates*. Eds.: R Dallinger and PS Rainbow. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, pp. 119–131.
- Rainbow P.S. et Phillips D.J.H. (1993).** Cosmopolitan biomonitors of trace metals. Mar. Pollut. Bull., 26, 593-601.
- Rainbow P.S. (1995a).** Physiology, physicochemistry and metal uptake--A crustacean perspective. Mar. Pollut. Bull., 31, 55-59.
- Rainbow P.S. (1995b).** Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. Mar. Pollut. Bull., 31, 183-192.
- Ram J.L. et McMahon R.F. (1996).** Introduction: The biology, ecology, and physiology of zebra mussels. Am. Zool., 36, 239-243.
- Reid R.G.B., McMahon R.F., Foighill D.O. et Finnigan R. (1992).** Anterior inhalant currents and pedal feeding in bivalves. The Veliger, 35, 93–104.
- Rensing C., Mitra B. et Rosen B.P. (1997).** The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 94, 14326-14331.
- Riek R., Precheur B., Wang Y., Mackay E.A., Wider G., Guntert P., Liu A., Kagi J.H.R. et Wuthrich K. (1999).** NMR structure of the sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) Metallothionein MTA. J. Mol. Biol., 291, 417-428.
- Ringwood A.H., Connors D.E. et Hoguet J. (1998).** Effects of natural and anthropogenic stressors on lysosomal destabilization in oysters *Crassostrea virginica*. Mar. Ecol. Progr. Ser., 166, 163-171.
- Riordan J.F. et Vallee B.L. (1991).** Metallobiochemistry. Part B. Metallothioneins and related molecules. In: *Methods Enzymol.* Eds.: JF Riordan and BL Vallee. Academic Press, New York, pp. 1-681.
- Robbins A.H., McRee D.E., Williamson M., Collett S.A., Xuong N.H., Furey W.F., Wang B.C. et Stout C.D. (1991).** Refined crystal structure of Cd, Zn metallothionein at 2.0 Å resolution. J. Mol. Biol., 221, 1269-1293.
- Robert S., Blanc G., Schafer J., Lavaux G. et Abril G. (2004).** Metal mobilization in the Gironde Estuary (France): the role of the soft mud layer in the maximum turbidity zone. Mar. Chem., 87, 1-13.
- Robinson W.E., Ryan D.K., Sullivan P.A. et Boggs C.C. (1997).** Cadmium binding in the blood plasma of two marine bivalves. Environ. Toxicol. Chem., 16, 1195-1202.
- Roditi H.A., Fisher N.S. et Sañudo-Wilhelmy S.A. (2000).** Uptake of dissolved organic carbon and trace elements by zebra mussels. Nature, 407.
- Roesijadi G., Drum A.S., Thomas J.M. et Fellingham G.W. (1982).** Enhanced mercury tolerance in marine mussels and relationship to low molecular weight, mercury-binding proteins. Mar. Pollut. Bull., 13, 250-253.
- Roesijadi G. (1992).** Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. Aquat. Toxicol., 22, 81-114.
- Roesijadi G. et Unger M.E. (1993).** Cadmium uptake in gills of the mollusc *Crassostrea virginica* and inhibition by calcium channel blockers. Aquat. Toxicol., 24, 195-206.

- Roesijadi G. et Robinson W. (1994).** Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation, and release. In: *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives*. Eds.: M D. and O G. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 387–420.
- Roesijadi G. (1994a).** Metallothionein induction as a measure of response to metal exposure in aquatic animals. *Environ. Health. Perspect.*, 102, 91-95.
- Roesijadi G. (1994b).** Behavior of metallothionein-bound metals in a natural population of an estuarine mollusc. *Mar. Environ. Res.*, 38, 147-168.
- Roesijadi G. (1996).** Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 113, 117-123.
- Roesijadi G., Hansen K.M. et Unger M.E. (1996).** Cadmium-induced metallothionein expression during embryonic and early larval development of the mollusc *Crassostrea virginica*. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 140, 356-363.
- Roesijadi G., Brubacher L.L., Unger M.E. et Anderson R.S. (1997a).** Metallothionein mRNA induction and generation of reactive oxygen species in molluscan hemocytes exposed to cadmium *in vitro*. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 118C, 171-176.
- Roesijadi G., Hansen K.M. et Unger M.E. (1997b).** Metallothionein mRNA accumulation in early developmental stages of *Crassostrea virginica* following pre-exposure and challenge with cadmium. *Aquat. Toxicol.*, 39, 185-194.
- Roesijadi G., Bogumil R., Vasák M. et Kagi J.H.R. (1998).** Modulation of DNA binding of a tramtrack zinc finger peptide by the metallothionein-thionein conjugate pair. *J. Biol. Chem.*, 273, 17425-17432.
- Roesijadi G. (2000).** Metal transfer as a mechanism for metallothionein-mediated metal detoxification. *Cell. Mol. Biol.*, 46, 393-405.
- Romero-Isart N. et Vasák M. (2002).** Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *J. Inorg. Biochem.*, 88, 388-396.
- Ruiz-Verdugo C.A., Ramirez J.L., Allen S.K. et Ibarra A.M. (2000).** Triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842): growth, gametogenesis, and suppression of functional hermaphroditism. *Aquaculture*, 186, 13-32.
- Ryu S.-K., Park J.-S. et Lee I.-S. (2003).** Purification and characterization of a copper-binding protein from Asian periwinkle *Littorina brevicula*. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 134, 101-107.

--S-----

- Samson S.L. et Gedamu L. (1998).** Molecular analyses of metallothionein gene regulation. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 59, 257-288.
- Saydam N., Georgiev O., Nakano M.Y., Greber U.F. et Schaffner W. (2001).** Nucleo-cytoplasmic trafficking of metal-regulatory transcription factor 1 is regulated by diverse stress signals. *J. Biol. Chem.*, 276, 25487-25495.

- Saydam N., Adams T.K., Steiner F., Schaffner W. et Freedman J.H. (2002). Regulation of metallothionein transcription by the metal-responsive transcription factor MTF-1: identification of signal transduction cascades that control metal-inducible transcription. *J. Biol. Chem.*, 277, 20438-20445.
- Scarpa J., Toro J.E. et Wada K.T. (1994). Direct comparison of six methods to induce triploidy in bivalves. *Aquaculture*, 119, 119-133.
- Schäfer J. et Blanc G. (2002). Relationship between ore deposits in river catchments and geochemistry of suspended particulate matter from six rivers in southwest France. *Sci. Total Environ.*, 298, 103-118.
- Schäfer J., Blanc G., Lapaquellerie Y., Maillet N., Maneux E. et Etcheber H. (2002). Ten-year observation of the Gironde tributary fluvial system: fluxes of suspended matter, particulate organic carbon and cadmium. *Mar. Chem.*, 79, 229-242.
- Schwarz M.A., Lazo J.S., Yalowich J.C., Reynolds I., Kagan V.E., Tyurin V., Kim Y.M., Watkins S.C. et Pitt B.R. (1994). Cytoplasmic metallothionein overexpression protects NIH 3T3 cells from tert-butyl hydroperoxide toxicity. *J. Biol. Chem.*, 269, 15238-15243.
- Scudiero R., Verde C., Carginale V., Kille P., Capasso C., diPrisco G. et Parisi E. (2000). Tissue-specific regulation of metallothionein and metallothionein mRNA accumulation in the Antarctic notothenioid, *Notothenia coriiceps*. *Polar Biol.*, 23, 17-23.
- Serafim M.A. et Bebianno M.J. (2001). Variation of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of the clam *Ruditapes decussatus*: Sex and seasonal effects. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20, 544-552.
- Shatkin G., Shumway S.E. et Hawes R. (1997). Considerations regarding the possible introduction of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to the Gulf of Maine: a review of global experience. *J. Shellfish Res.*, 16, 463-477.
- Shen Y.-p., Zhang X.-y., He H.-p. et Ma L.-j. (1993). Triploidy induction by hydrostatic pressure in the pearl oyster, *Pinctada martensii* Dunker. *Aquaculture*, 110, 221-227.
- Shi D. et Wang W.-X. (2004). Understanding the differences in Cd and Zn bioaccumulation and subcellular storage among different populations of marine clams. *Environ. Sci. Technol.*, 38, 449-456.
- Shpigel M., Barber B.J. et Mann R. (1992). Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology, and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 161, 15-25.
- Sickel J.B. (1986). *Corbicula* population mortalities: factors influencing population control. *Am. Malacol. Bull.*, Special Edition 2, 89-94.
- Sidoumou Z., Gnassia-Barelli M. et Romeo M. (1997). Cadmium and calcium uptake in the mollusc *Donax rugosus* and effect of a calcium channel blocker. *Bull. Environ. Contam. Tox.*, 58, 318-325.
- Silverman H., Lynn J.W., Achberger E.C. et Dietz T.H. (1996). Gill structure in zebra mussels: Bacterial-sized particle filtration. *Am. Zool.*, 36, 373-84.
- Simkiss K. et Taylor M. (1989). Metal fluxes across the membranes of aquatic organisms. *CRC Crit. Rev. Aquat. Sci.*, 1, 173-188.
- Simkiss K. et Taylor M.G. (1995). Transport of metals across membranes. In: *Metal speciation and bioavailability in aquatic Systems*. Eds.: A Tessier and DR Turner. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 2-44.

- Simon O. et Boudou A. (2001).** Direct and trophic contamination of the herbivorous carp *Ctenopharyngodon idella* by inorganic mercury and methylmercury. Ecotox. Environ. Safe., 50, 48-59.
- Simpkins C., Balderman S. et Mensah E. (1998).** Mitochondrial oxygen consumption is synergistically inhibited by metallothionein and calcium. J. Surg. Res., 80, 16-21.
- Smirnova I.V., Bittel D.C., Ravindra R., Jiang H. et Andrews G.K. (2000).** Zinc and cadmium can promote rapid nuclear translocation of metal response element-binding transcription factor-1. J. Biol. Chem., 275, 9377-9384.
- Soltaninassab S.R., Sekhar K.R., Meredith M.J. et Freeman M.L. (2000).** Multi-faceted regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase. J. Cell. Physiol., 182, 163-170.
- Sorentino C. (1979).** The effects of heavy metals on phytoplankton - a review. Phykos, 18, 149-161.
- Soto M., Ireland M.P. et Marigomez I. (1997).** The contribution of metal/shell-weight index in target-tissues to metal body burden in sentinel marine molluscs. 2. *Mytilus galloprovincialis*. Sci. Total Environ., 198, 149-160.
- Soto M., Quincoces I., Lekube X. et Marigomez I. (1998).** Autometallographed metal content in digestive cells of winkles: a cost-effective screening tool for monitoring Cu and Zn pollution. Aquat. Toxicol., 40, 123-140.
- Sprung M. (1987).** Ecological requirements of developing *Dreissena polymorpha* eggs. Arch. Hydrobiol., 1, 69-86.
- Sprung M. (1989).** Field and laboratory observations of *Dreissena polymorpha* larvae: abundance, growth, mortality and food demands. Arch. Hydrobiol., 115, 537-561.
- Stanczykowska A. (1978).** Occurrence and dynamics of *Dreissena polymorpha* (Pall.) (*Bivalvia*). Internat. Verein. Limnol., 20, 2431-2434.
- Steiger J. et Gurnell A.M. (2003).** Spatial hydrogeomorphological influences on sediment and nutrient deposition in riparian zones: observations from the Garonne River, France. Geomorphology, 49, 1-23.
- Stillman M.J. (1995).** Metallothioneins. Coord. Chem. Rev., 144, 461-511.
- Stuart G.W., Searle P.F. et Palmiter R.D. (1985).** Identification of multiple metal regulatory elements in mouse metallothionein-I promoter by assaying synthetic sequences. Nature, 317, 828-831.
- Suzuki M.G., Shimada T., Yokoyama T. et Kobayashi M. (1999).** The influence of triploidy on gene expression in the silkworm, *Bombyx mori*. Heredity, 82, 661-667.
- Syring R.A., Brouwer T.H. et Brouwer M. (2000).** Cloning and sequencing of cDNAs encoding for a novel copper-specific metallothionein and two cadmium-inducible metallothioneins from the blue crab *Callinectes sapidus*. Comp. Biochem. Physiol. C, 125, 325-332.

--T-----

- Tanguy A. et Moraga D. (2001).** Cloning and characterization of a gene coding for a novel metallothionein in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT2): a case of adaptive response to metal-induced stress? Gene, 273, 123-130.

- Tanguy A., Mura C. et Moraga D. (2001).** Cloning of a metallothionein gene and characterization of two other cDNA sequences in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT1). Aquat. Toxicol., 55, 35-47.
- Taylor J.D., Kennedy W.J. et Hall A. (1973).** The shell structure and mineralogy of the Bivalvia. Part 2, Chamacea–Poromyacea, conclusions. Bull. Br. Mus. Nat. Hist. Zool., 22, 255–294.
- Templeton D.M., Ariese F., Cornelis R., Danielsson L.-G., Muntau H., van Leeuwen H.P. et Lobinski R. (2000).** Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of trace elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). Pure Appl. Chem., 72, 1453-1470.
- Tessier A., Couillard Y., Campbell P.G.C. et Auclair J.C. (1993).** Modeling Cd partitioning in oxic lake sediments and Cd concentrations in the freshwater bivalve *Anodonta grandis*. Limnol. Oceanogr., 38, 1-17.
- Tessier C. et Blais J.-S. (1996).** Determination of cadmium-metallothioneins in zebra mussels exposed to subchronic concentrations of Cd²⁺. Ecotox. Environ. Safe., 33, 246-252.
- Thompson R., Newell R., Kennedy V. et Mann R. (1996).** Reproductive processes and early development. In: *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. Ed.: RNaAE V. Kennedy. Maryland Sea Grant Books, Maryland, pp. 335–370.
- Thornalley P.J. et Vasak M. (1985).** Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. Biochim. Biophys. Acta, 827, 36-44.
- Thunus L. et Lejeune R. (1994).** Zinc. In: *Handbook on metals in clinical and analytical chemistry*. Eds.: HG Seiler, A Sigel and H Sigel. Marcel Dekker, New York, pp. 667-674.
- Tian C., Wang R., Liang Y., Wang Z. et Yu R.T. (1999).** Triploidy of *Crassostrea gigas* induced with 6-DMAP: by blocking of the second polar body of the zygotes. J. Fish. Sci. China, 6, 1–4.
- Tourenq J.N., Capblancq J. et Casanova H. (1978).** Bassin versant et hydrologie de la rivière Lot. Annals Limnol., 14.
- Tran D. (2001).** Etude des mécanismes de régulation de la ventilation chez le bivalve *Corbicula fluminea*. Influence de l'oxygène et de l'apport trophique. Application aux problèmes de bioaccumulation et de biodétection du cadmium. Université Bordeaux 1, Talence, Thèse de Doctorat, pp. 141.
- Turner A. (1996).** Trace-metal partitioning in estuaries: importance of salinity and particle concentration. Mar. Chem., 54, 27-39.
- Turner D.R., Whitfield M. et Dickson A.G. (1981).** The equilibrium speciation of dissolved components in freshwater and seawater at 25 °C and 1 atm pressure. Geochim. Cosmochim. Acta 45, 855-881.

U-----

UMR-CNRS-5805 (2004). Gironde: Paramètres environnementaux (SOMLIT), <http://www.domino.u-bordeaux.fr/parsogir/parsogir.php>.

Unger M.E. et Roesijadi G. (1996). Increase in metallothionein mRNA accumulation during Cd challenge in oysters preexposed to Cd. Aquat. Toxicol., 34, 185-193.

Université Bordeaux 1/CNRS UMR EPOC 5805 (2002). Etude de la contamination des bivalves (huîtres, coques, palourdes) par le cadmium et quatre autres métaux (zinc, cuivre, mercure, plomb) dans les marais du Nord Médoc. Approches géochimique et écotoxicologique. LEESA, TGM, Talence, pp. 94.

-- V -----

Vallee B.L. et Falchuk K.H. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. Physiol. Rev., 73, 79-118.

Vallee B.L. (1995). The function of metallothionein. Neurochemistry International, 27, 23-33.

Van Leeuwen H.P. et Köster W. (2004). Physicochemical kinetics and transport at biointerfaces, Volume 9. In: *IUPAC Series on analytical and physical Chemistry of environmental systems*. Eds.: J Buffle and HP Van Leeuwen. John Wiley & sons, LTD, USA, pp. 553.

Vasák M. (1991). Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins. Methods Enzymol., 205, 452-458.

Vasák M. et Hasler D.W. (2000). Metallothioneins: new functional and structural insights. Curr. Opin. Chem. Biol., 4, 177-183.

Vasseur P. et Cossu-Leguille C. (2003). Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. Environ. Int., 28, 711-717.

Vercauteren K. et Blust R. (1999). Uptake of cadmium and zinc by the mussel *Mytilus edulis* and inhibition by calcium channel and metabolic blockers. Mar. Biol., 135, 615-626.

Viarengo A., Zanicchi G., Moore M.N. et Orunesu M. (1981). Accumulation and detoxication of copper by the mussel *mytilus galloprovincialis* Lam: A study of the subcellular distribution in the digestive gland cells. Aquat. Toxicol., 1, 147-157.

Viarengo A. (1989). Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. Aquat. Toxicol., 1, 295-317.

Viarengo A., Pertica M., Canesi L., Mazzucotelli A., Orunesu M. et Bouquegneau J.M. (1989). Purification and biochemical characterization of a lysosomal copper-rich thionein-like protein involved in metal detoxification in the digestive gland of mussels. Comp. Biochem. Physiol. C, 93, 389-395.

Viarengo A. et Nott J.A. (1993). Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. C, 104, 355-372.

Viarengo A., Burlando B., Cavaletto M., Marchi B., Ponzano E. et Blasco J. (1999). Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Am. J. Physiol., 277, 1612R-1619.

Viarengo A., Burlando B., Ceratto N. et Panfoli I. (2000). Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. Cell. Mol. Biol., 46, 407-417.

Vincent T. et Brancotte V. (2000). Le bivalve invasif asiatique *Corbicula fluminea* (*Heterodonta*, *Sphaeriacea*, *Corbiculidae*) dans le bassin hydrographique de la Seine (France) : première prospection systématique et hypothèse sur la colonisation. Hydroecol. Appl., 1/2, 147-158.

Vincent T. et Brancotte V. (2002). Present distribution and spreading modes of *Corbicula* spp. in France. B. Soc. Zool. Fr., 127, 241-252.

Vindelov L.L. et Christensen I.J. (1990). A review of techniques and results obtained in one laboratory by an integrated system of methods designed for routine clinical flow cytometric DNA analysis. Cytometry, 11, 753-770.

--W-----

Waalkes M.P. et Goering P.L. (1990). Metallothionein and other cadmium-binding proteins: recent developments. Toxicol., 281-288.

Wallace W.G., Lee B.-G. et Luoma S.N. (2003). Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). Mar. Ecol. Progr. Ser., 249, 183-197.

Wallace W.G. et Luoma S.N. (2003). Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). Mar. Ecol. Progr. Ser., 257, 125-137.

Wang D., Couillard Y., C. C.P.G. et Jolicoeur P. (1999). Changes in subcellular metal partitioning in the gills of freshwater bivalves (*Pyganodon grandis*) living along an environmental cadmium gradient. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 56, 774-784.

Wang W.-X. et Fisher N.S. (1999). Effects of calcium and metabolic inhibitors on trace element uptake in two marine bivalves. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 236, 149-164.

Wang W.-X. (2001). Comparison of metal uptake rate and absorption efficiency in marine-bivalves. Environ. Toxicol. Chem., 20, 1367-1373.

Wang W.-X. (2002). Interactions of trace metals and different marine food chains. Mar. Ecol. Progr. Ser., 243, 295-309.

Way C.M., Hornbach D.J., Miller-Way C.A., Payne B.S. et Miller A.C. (1990). Dynamics of filter feeding in *Corbicula fluminea* (*Bivalvia: Corbiculidae*). Can. J. Zool., 68, 115-120.

Winge D.R. et Thrower A.R. (1988). Metallothionein: structure and metal cluster stability. Essential and toxic elements in Human health disease, 381-392.

Wright D.A. (1995). Trace metal and major ion interactions in aquatic animals. Mar. Pollut. Bull., 31, 8-18.

Wright J., George S., MartinezLara E., Carpena E. et Kindt M. (2000). Levels of cellular glutathione and metallothionein affect the toxicity of oxidative stressors in an established carp cell line. Mar. Environ. Res., 50, 503-508.

Y-----

Yang Y., Maret W. et Vallee B.L. (2001). Differential fluorescence labeling of cysteinyl clusters uncovers high tissue levels of thionein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 98, 5556-5559.

Ye B., Maret W. et Vallee B.L. (2001). Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 98, 2317-2322.

Z-----

Zadhin V.I. (1965). Mollusks of fresh and brackish waters of USSR (Translated from Russian). Academy of Sciences of the USSR, pp. 368.

Zalups R.K. et Ahmad S. (2003). Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. Toxicol. Appl. Pharm., 186, 163-188.

Zanger K., Oz G. et Armitage I.M. (2000). Re-evaluation of the binding of ATP to metallothionein. J. Biol. Chem., 275, 7534-7538.

Zeng J., Vallee B.L. et Kagi J.H. (1991a). Zinc transfer from transcription factor IIIA fingers to thionein clusters. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 88, 9984-9988.

Zeng J., Heuchel R., Schaffner W. et Kagi J.H.R. (1991b). Thionein (apometallothionein) can modulate DNA binding and transcription activation by zinc finger containing factor Spl. FEBS Lett., 279, 310-312.

Zhang B., Egli D., Georgiev O. et Schaffner W. (2001). The *Drosophila* homolog of mammalian zinc finger factor MTF-1 activates transcription in response to heavy metals. Mol. and Cell. Biol., 21, 4505-4514.

Zhang B., Georgiev O., Hagmann M., Günes C., Cramer M., Faller P., Vasák M. et Schaffner W. (2003). Activity of metal-responsive transcription factor 1 by toxic heavy metals and H₂O₂ in vitro is modulated by metallothionein. Mol. and Cell. Biol., 23, 8471-8485.

Zibrowius H. (1992). Ongoing modifications of the Mediterranean marine fauna and flora by the establishment of exotic species. Mésogée, 51, 83-107.

Zwolsman J.J.G., Van Eck B.T.M. et Van Der Weijden C.H. (1997). Geochemistry of dissolved trace metals (cadmium, copper, zinc) in the Scheldt estuary, southwestern Netherlands: Impact of seasonal variability. Geochim. Cosmochim. Acta 61, 1635-1652.

ANNEXES

Milieu de base	Concentration dans le milieu final mg.l⁻¹
Na ₂ EDTA	1 <i>non ajouté au milieu</i>
FeSO ₄ , 7H ₂ O	1
NaHCO ₃	50
Na ₂ CO ₃	5
MgSO ₄ , 7H ₂ O	25
CaCl ₂ , 2H ₂ O	25

Oligo-éléments	Concentration dans le milieu final mg.l⁻¹
ZnSO ₄	0,02
CuCl ₂ , 2H ₂ O	0,02
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,4
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,01
H ₃ Bo ₃	0,001
Na ₂ Mo ₄	0,035

Nutriments	Concentration dans le milieu final mg.l⁻¹
KNO ₃	200
K ₂ HPO ₄	25

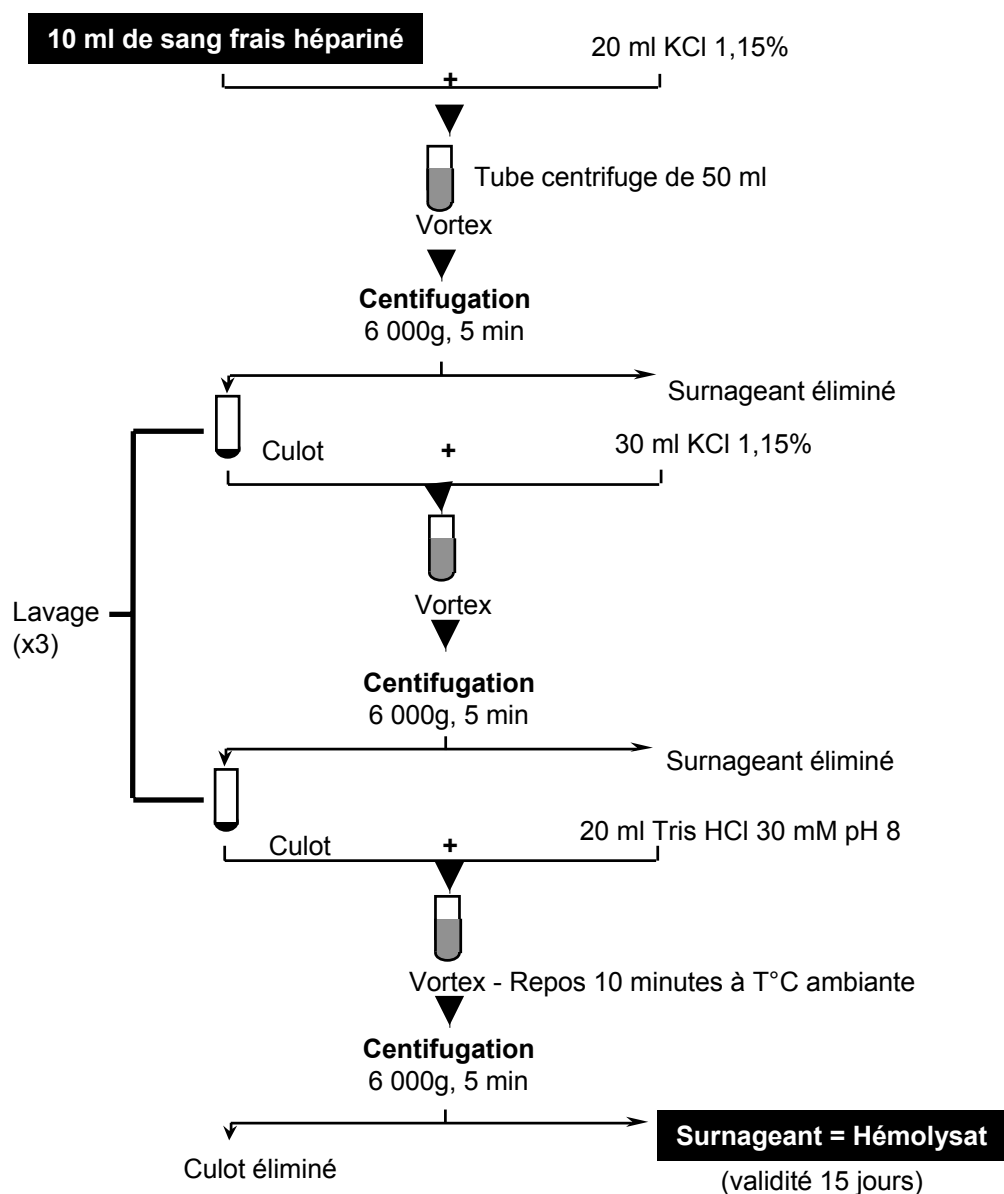
Annexe 1 : Composition du "milieu Dauta" utilisé sans EDTA pour la culture des algues phytoplanctoniques, *Scenedesmus subspicatus*, apportées en faible quantité aux bivalves d'eau douce au cours de l'expérience menée en conditions contrôlées de laboratoire (en référence avec la page 64).

Milieu de base	Concentration molaire dans le milieu final	
NaNO ₃	8.83 x 10 ⁻⁴ M	
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	3.63 x 10 ⁻⁵ M	
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	1.07 x 10 ⁻⁴ M	<i>non ajouté au milieu</i>
<i>f/2 trace metal solution</i>		<i>1 ml pour 1 litre</i>
<i>f/2 vitamin solution</i>		<i>0,5 ml pour 1 litre</i>

f/2 trace metal solution	Concentration molaire dans le milieu final	
FeCl ₃ · 6H ₂ O,	1 x 10 ⁻⁵ M	
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	1 x 10 ⁻⁵ M	<i>non ajouté au milieu</i>
CuSO ₄ · 5H ₂ O	4 x 10 ⁻⁸ M	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	3 x 10 ⁻⁸ M	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8 x 10 ⁻⁸ M	
CoCl ₂ · 6H ₂ O	5 x 10 ⁻⁸ M	
MnCl ₂ · 4H ₂ O	9 x 10 ⁻⁷ M	

f/2 vitamin solution	Concentration molaire dans le milieu final	
Vitamin B12 (cyanocobalamin)	1 x 10 ⁻¹⁰ M	
Biotin	2 x 10 ⁻⁹ M	
Thiamine · HCl	3 x 10 ⁻⁷ M	

Annexe 2 : Composition du milieu "f/2" sans silice, ni EDTA, utilisé pour la culture des algues phytoplanctoniques, *Isochrysis galbana*, apportées en faible quantité pour nourrir les huîtres au cours de l'expérience menée en conditions contrôlées de laboratoire (en référence avec la page 64).



Annexe 3 : Protocole de préparation de l'hémolysat de sang frais de rat ou de porc servant pour le dosage des métallothionéines par la méthode de saturation au mercure froid (en référence avec la page 75).

***Geochemical survey and metal bioaccumulation of
three bivalve species (Crassostrea gigas, Cerastoderma edule
and Ruditapes philippinarum) in the Nord Médoc salt marshes
(Gironde estuary, France)¹***

Baudrimont M., Schäfer J., Marie V., Maury-Brachet R., Bossy C., Boudou A.,
Blanc G.

¹ Article publié dans *Science of the Total Environment* 337 (2005) 265–280



Geochemical survey and metal bioaccumulation of three bivalve species (*Crassostrea gigas*, *Cerastoderma edule* and *Ruditapes philippinarum*) in the Nord Médoc salt marshes (Gironde estuary, France)

M. Baudrimont^{a,*}, J. Schäfer^{b,*}, V. Marie^a, R. Maury-Brachet^a,
C. Bossy^b, A. Boudou^a, G. Blanc^b

^aLaboratoire d'Ecophysiologie et Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques, LEESA, University Bordeaux 1/UMR CNRS 5805 EPOC, Place du Dr B. Peyneau, 33120 Arcachon, France

^bEquipe "Traceurs Géochimiques et Minéralogiques", TGM, University Bordeaux 1/UMR CNRS 5805 EPOC, Avenue des Facultés, 33405 Talence cedex, France

Received 7 January 2004; accepted 2 July 2004

Abstract

A 15-month experiment combining a geochemical survey of Cd, Cu, Zn and Hg with a bioaccumulation study for three filter-feeding bivalve species (oysters, *Crassostrea gigas*; cockles, *Cerastoderma edule*; and clams, *Ruditapes philippinarum*) was conducted in a breeding basin of the Nord Médoc salt marshes connected to the Gironde estuary, which is affected by historic polymetallic pollution. Regular manual surface measurements of temperature, salinity, pH and dissolved O₂ concentration and hourly multiprobe in situ measurements throughout several periods for 6–8 weeks were performed. The geochemical behavior of metals in water, suspended particulate matter and sediment and their ecotoxicological impact on the three bivalve species were evaluated by in situ exposure of juvenile oysters (water column) and adult cockles and clams (sediment surface).

The physico-chemical parameters reflected seasonal variations and basin management. A distinct daily periodicity (except salinity) indicated intense photosynthesis and respiration. In summer, low dissolved O₂ saturations (~40–50%) occurred in the early morning at 30 cm above the sediment, whereas in depressions, the water column near the sediment surface was suboxic. Cadmium, Zn and Cu concentrations in suspended particulate matter exceeded typical estuarine values and were much higher than the homogeneously distributed concentrations in different depth ranges of the basin sediment. Particles collected in sediment traps showed intermediate metal concentrations close to sediment values. These results

* Corresponding authors. M. Baudrimont is to be contacted at Tel.: +33 5 5622 3927; fax: +33 5 5654 9383. J. Schäfer, Tel.: +33 5 4000 2967; fax: +33 5 5684 0848.

E-mail addresses: m.baudrimont@epoc.u-bordeaux1.fr (M. Baudrimont), j.schaefer@epoc.u-bordeaux1.fr (J. Schäfer).

suggest trace metal recycling due to reductive dissolution under suboxic conditions at the sediment surface resulting in trace metal release to the water column and adsorption onto suspended particles. Dissolved Cd, Zn and Hg concentrations (e.g. 13–136 ng l⁻¹; 0.3–25.1 µg l⁻¹ and 0.5–2.0 ng l⁻¹, respectively) in the basin corresponded to the concentration range typically observed in the Gironde estuary, except for some maximum values attributed to metal recycling. In contrast, dissolved Cu concentrations (1.08–6.08 µg l⁻¹) were mostly higher than typical estuarine values, probably due to recycled Cu complexation by dissolved organic matter. Growth, bioaccumulation rates and kinetics in the whole soft body of the bivalves were analyzed every 40 days. Although Cd bioaccumulation of oysters was lower in the basin than in the estuary during the same period (27,000 ng g⁻¹, dry weight and 40,000 ng g⁻¹, respectively) these values are largely above the new human consumption safety level (5000 ng g⁻¹, dw; European Community, 2002). For cockles and clams, Cd bioaccumulation was lower, reaching 1400 ng g⁻¹ and 950 ng g⁻¹, respectively. Similar results were obtained for Zn and Cu suggesting physiological differences between the species and/or differences in the exposure of the organisms due to physico-chemical conditions and metal distribution between dissolved and particulate phases. In contrast, Hg bioaccumulation was highest for cockles reaching bioconcentration factors of ~200,000, which even exceeded that of Cd in oysters (50,000) for the same exposition period. Nevertheless, Hg concentrations remained relatively low in the three bivalve species.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Geochemical survey; Cd; Zn; Cu; Hg; Metal bioaccumulation; *Crassostrea gigas*; *Cerastoderma edule*; *Ruditapes philippinarum*

1. Introduction

The Gironde estuary (southwestern France) is characterized by a historic cadmium (Cd) contamination of the water and the sediment, which originated from a former ore treatment plant in the industrial basin of Decazeville (Latouche, 1988, Jouanneau et al., 1990; Fig. 1). The Cd pollution was discovered in the early 1980s by the National Observation Network (RNO), as the Cd concentrations measured in oysters from the Gironde

estuary were close to 100,000 ng g⁻¹ (dry weight). This value represents 20 times the consumption safety level currently authorized in France for marine bivalves (5000 ng g⁻¹, dry weight or 1000 ng g⁻¹ fresh weight; CE No. 466/2001; Boutier et al., 1989; Latouche, 1992). As a consequence, the Gironde estuary has been classified as “zone D”, i.e. interdiction of oyster recovery for consumption, production or purification. After an accidental polymetallic pollution (Cd, Zn, Cu, Hg, Ba, As) in 1986, important work was done

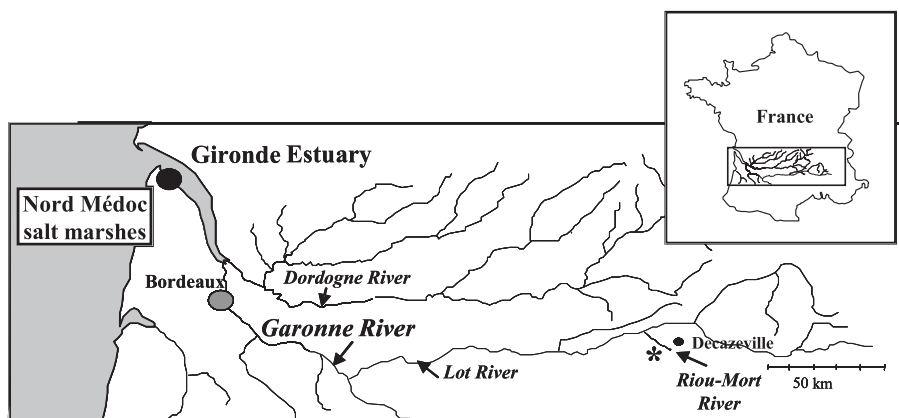


Fig. 1. Map of the fluvio-estuarine continuum of the Gironde, affected by historic polymetallic pollution (*, former Zn ore treatment plant). The experimentation site in the Nord Médoc salt marshes near the estuary mouth is represented by a black dot.

(e.g. groundwater treatment) limiting Cd emission into the Lot River (Roux and Simonet, 1987; Blanc et al., 1999; Audry et al., 2003). After a distinct decrease of Cd emission in the early 1990s, Cd transport in the Lot–Garonne River system, still accounts for 40–80% of the annual gross fluxes into the Gironde estuary (Schäfer et al., 2002, Blanc et al., in press; Audry et al., 2004). Important sediment stocks ($9.47 \pm 0.9 \cdot 10^6 \text{ m}^3$; $\sim 200 \text{ t}$ of Cd; Lapaquellerie et al., 1995) accumulated in the Lot valley between the Riou-Mort and the Garonne River (Fig. 1) may represent additional Cd sources due to remobilization by floods or dredging (Blanc et al., 1999; Audry et al., 2004). Although Cd is mainly transported in the particulate phase, most of it ($\sim 90\%$) becomes highly bioavailable by dissolution due to estuarine biogeochemical processes and management (e.g. Elbaz-Poulichet et al., 1996; Kraepiel et al., 1997; Robert et al., 2004). As a result, Cd concentrations in the Gironde's oysters show a progressive decrease of 30–40% between 1979 and 1993 (e.g. Jouanneau et al., 1990, Michel et al., 2000), but average values remain very high (National Observation Network—RNO, France).

During the past 15 years, several fish farms have developed production of kuruma prawn (*Penaeus japonicus*) in the Nord Médoc salt marshes, adjacent to the Gironde estuary (Fig. 1). In these breeding basins, periodically alimanted by water from the Gironde estuary, an important proliferation of savage cockles (*Cerastoderma edule*) of economic interest was observed each year. Filter-feeding bivalves filter large quantities of water, resulting in bioaccumulation of ambient metals (Andrès et al., 1999; Baudrimont et al., 2003; Hamza-Chaffai et al., 2000).

The aim of the present 15-month survey (May 2000 to December 2001) in a Nord Médoc breeding basin under realistic conditions, was to characterize the geochemical behavior and ecotoxicological impact of selected heavy metals (Cd, Cu, Zn and Hg) on three bivalves of economical interest (*Crassostrea gigas*, *Cerastoderma edule* and *Ruditapes philippinarum*). The impact of physico-chemical conditions and heavy metal contamination levels in water, suspended particulate matter (SPM) and sediment on bioaccumulation rates and kinetics is analyzed and discussed.

2. Materials and methods

2.1. Study site

The present large-scale experimentation was conducted in one of the breeding basins of the “Bleu Médoc” fish farm at St Vivien de Médoc, France. The farm consists of 11 basins (each of 2.3 ha of surface and $\sim 0.8 \text{ m}$ depth), which were dredged 30 years ago (Fig. 1). The main activity of this farm is kuruma prawn (*P. japonicus*) production. The basins are directly supplied by the Gironde estuary waters via a small channel, controlled by a gate. During the 15-month experiment, the water in the basin was regularly changed ($\sim 50\%$ of the volume renewed), generally at high tide. This study was conducted in a basin without prawn production to limit biologic perturbation factors. However, parallel surveys were performed in other basins in the context of a larger research program comparing and evaluating several other salt marshes in condition of prawn production.

2.2. Physico-chemical parameters

The transplantation experiment was accompanied by regular in situ measurements of the main physico-chemical parameters: temperature, salinity, pH, E_h and dissolved O_2 concentration. Variation of these parameters was observed by electrode measurements at the water surface (0.1 m depth; WTW, Germany) every 2–3 days. Vertical distribution of oxygen in the water column was measured periodically. Additionally, periodic in situ measurements were done in the lower zone of the water column at 0.3 m distance from the sediment using multiprobe systems with a data logger (models: data 3 and 4, Hydrolab, USA). The used equipment permits measuring physico-chemical parameters every hour, throughout 6–8 weeks.

2.3. Sampling

2.3.1. Basin water

Water samples were collected with acid-cleaned (HCL; Baker instra-analyzed, 10%) 500 ml Teflon bottles thoroughly rinsed with basin water. The samples were immediately filtered through $0.45 \mu\text{m}$ Teflon filters (LCR Membranes, Millipore) for dis-

solved Hg analysis and through 0.2 µm Nucleopore® polycarbonate filters for dissolved Cd, Zn and Cu determination. Filtration was done in a glove box (laboratory van, dust-free N₂-atmosphere purified from Hg by a gold trap) to avoid sample alteration and contamination. Before collecting the samples for analysis, all recipients were thoroughly rinsed with an aliquot of the filtrate. Filtrates for Hg analysis were stocked in acid-cleaned (HCL; Baker instra-analyzed, 10%) 125 ml Teflon bottles and acidified with HCL (Baker instra-analyzed, 1:100). The samples for Cd, Zn and Cu measurements were collected in acid-cleaned (HNO₃; Baker normapur, 10%) Polypropylene-bottles (Nalgene®) and acidified (HNO₃ supra-pur grade; 1:1000). All samples were stored in double-sealed polyethylene bags in the dark and at 4–6 °C until analysis.

2.3.2. Sediment and suspended particulate matter (SPM)

Sediment cores were taken at the beginning, after 9 months, and at the end of the experiment to compare initial and final heavy metal concentrations. All sampling material in contact with the samples was of unused, acid-cleaned polyethylene. The cores were sampled from the upper sediment layer to 0.5 m depth using a polyethylene tube (50 mm diameter). The outer 10 mm layer possibly in contact with the tube walls was discarded and different depth ranges (0–5, 5–10 and 20–25 cm) were separated. The samples were immediately transferred into double-sealed polyethylene bags and kept cool (6 °C) during the transport to the laboratory, where the samples were dried (45 °C, 48 h), ground and homogenized. Aliquots (1 g) of the dry powder were thoroughly mixed during 4 h with 100 ml of de-ionised water (Milli-Q®, Bedford, MA, USA) to dissolve their salt content. After centrifugation, the sediment was separated from the supernatant, dried and weight again to determine the salt concentration in the solid samples. Like sediment, suspended particulate matter (SPM) was sampled three times throughout the experiment using the pumping/centrifugation technique and protocol described in Blanc et al. (1999) and Schäfer and Blanc (2002). This technique permits obtaining samples representative of a large water volume, especially in aquatic environments with high particulate loads, where filter saturation may be a

problem. Additional SPM samples were taken using conventional honeycomb-like polyethylene particle traps (e.g. Gardner, 1980; Ciffroy et al., 1999; Schäfer and Blanc, 2002). The traps were installed upright in the water column (inlet at 0.3 m depth) and collected settling particles for the period between two interventions at the site, i.e. 1 or 2 months.

2.4. Origin of the bivalves and transplantation procedure

The breeding basin sediment was dried during 3 weeks in order to eliminate all benthic macroorganisms. Then, the polyethylene cages for benthic bivalves (*C. edule* and *R. philippinarum*) were disposed on the sediment and the basin was filled. After an equilibration period of 30 days, the benthic species were introduced into the cages. Juveniles of *C. gigas* (shell length=8 mm) were obtained from a nursery located in the north of the Marennes-Oléron Bay, France. They were introduced into net-like polyethylene bags (5 mm mesh) and suspended in the water column (60 cm above the sediment). Fifty individuals were introduced in each of the 16 bags placed in the basin. Two bags were sampled every 40 days, from May 2000 to March 2001. Another batch of oysters was transplanted jointly directly in the Gironde estuary, at the station of La Fosse (data not shown). Adult (1-year-old) cockles (*C. edule*) originated from the Eau Médoc farm (St Vivien de Médoc, France), where they develop natural populations. Adult (1-year-old) clams (*R. philippinarum*) were imported from Italy (natural recruitment, Venise lagoon). Twenty cockles and twenty clams were introduced into each of the 16 cages. At each sampling time, from June to December 2000, two cages were sampled. All the bags and cages were sealed with a collar and specifically identified to avoid mismatches in the sampling strategy or exchanges between several batches of organisms. After sampling, the organisms were frozen at –70 °C on the site and stored at –20 °C at the laboratory until analysis. The length of the oyster shells was measured from the hinge to the inferior side of the valve. After drying (60 °C during 48 h), the shells and the soft bodies of the organisms were weighed and metal concentrations were determined after tissue digestion.

2.5. Treatment and analysis of sediment, water and biological samples

2.5.1. Preconcentration of dissolved Cd, Zn and Cu

Prior to analysis, Cd, Zn and Cu were separated from the saline matrix and preconcentrated (20-fold) in a class 100 laminar flow box in a clean room by ion exchange chromatography using Chelex 100 chelating resin (e.g. Kingston et al., 1978). Extraction efficiency was double-checked for Cd and Cu under identical laboratory conditions by preconcentration of sample aliquots using complexation by ammonium pyrrolidine dithiocarbamate/diethylammonium diethyl dithiocarbamate (APDC/DDDC) followed by extraction into freon before back-extraction by HNO₃ (Danielsson et al., 1982). Comparison of the analytical data obtained by both techniques (i.e. liquid solid and liquid–liquid extraction) typically showed differences in Cd and Cu concentrations of less than 10%.

2.5.2. Digestion of sediment, SPM and biological samples

Representative sub-samples (e.g. 30 mg of dry, powdered and homogenized material, corrected for the salt content of the samples) were digested in closed Teflon reactors (Savillex®) on a heating plate (2 h at 110 °C) using 750 µl HCl (12N, suprapur), 2 ml HF (26N, suprapur) and 250 µl HNO₃ (14N, suprapur). After evaporation to dryness the residues were completely re-dissolved in 150 µl HNO₃ (14N) on a heating plate and after cooling brought to 10 ml in volumetric flasks using Milli-Q® water (Blanc et al., 1999; Schäfer and Blanc, 2002). Each batch of samples included method blanks and digestion of international certified reference materials (PACS-1, CRM-320). Biological samples were digested by nitric acid (3 ml of normapure HNO₃, MERCK) in a pressurized medium (borosilicate glass tubes) at 95 °C for 3 h and made up to 20 ml with ultrapure water (Milli-Q®).

2.5.3. Analysis

Analysis of dissolved and particulate Cd, Zn and Cu was done by ICP-MS (Perkin Elmer, ELAN 5000). Quality control and determination of accuracy were performed by analysis of certified international reference materials of river, estuarine and open ocean

waters (SLRS-3, SLRS-4, SLEW-2, NASS-4) and river and marine sediments (BCR-CRM 320, PACS-1). Typical recoveries obtained from preconcentration of certified reference materials and spiked samples ranged from 92% to 109%. For every metal examined, analytical results obtained for the particulate and dissolved reference materials always differed by less than 10% from the certified values and reproducibility was generally better than 7% (rsd) for concentrations 10 times higher than detection limits.

Cadmium concentrations in biological samples were measured by atomic absorption spectrometry with Zeeman correction (AA 400, Varian, Walnut Creek, CA, USA) equipped with a graphite tube atomizer and autosampler (model GTA 96, Varian, Mulgrave, Australia). Samples of 10 µl were mixed before atomization with 4 µl of a 50% Pd+50% Mg(NO₃)₂ mixture, to facilitate matrix removal and analyzed. The detection limit (3 × SD of reagent blanks) was 0.1 µg l⁻¹ for Cd. Copper and Zn concentrations in aliquots of the same samples were analyzed by flame atomic absorption spectrometry (Varian AA20), with detection limits of 20 µg l⁻¹ for Cu and 10 µg l⁻¹ for Zn. The validity of the analytical method was checked periodically by means of standard biological reference material (TORT-2 and DORM-2; CNRC, Ottawa, Canada). Values were consistently within the certified ranges for each element.

Dissolved reactive (Hg_R) and total Hg (Hg_T) concentrations were measured by cold vapour atomic fluorescence spectrometry (AFS-Merlin, PSAnalytical) after oxidation (Hg_T only) and subsequent Hg⁽⁰⁾ generation using the BrCl–NH₂OH–SnCl₂ method described by Bloom and Crecelius (1983). Calibration was done by injection of variable amounts of gaseous Hg⁽⁰⁾. Detection limits (3 SD of the blank values) were determined daily and varied from 0.05 to 0.2 pM. Reproducibility was better than 15% rsd for concentrations in the 1 ng l⁻¹ range. Detailed method descriptions are reported in Quémerais and Cossa (1995).

Mercury in sediment, SPM and bivalves was analyzed from the dry, homogenized material using an Automated Mercury Analyzer (LECO, AMA-254) after drying (200 °C) and burning (600 °C) under constant oxygen flow. Detection limit (3 SD of blank

values) was 0.05–0.1 pM. The analytical results were quality checked analyzing international certified reference materials (e.g. CRM 320, PACS-1, SL-1, TORT-2 and DORM-2) after each set of four samples. Precision (relative standard deviation) determined by replicate analysis of reference materials and samples was 5% and results were consistently within the certified ranges.

2.6. Statistical treatment

All the biological data were analyzed for each species by a one-factor analysis of variance (ANOVA) to check the contribution of ‘time’ factor. The comparison between the three species after 120 days of transplanted (time T3) was also realized with respect to ‘species’ factor. Previously, normality was assumed and homogeneity of variance was verified with Cochran’s test (data were log-transformed when homogeneity was not achieved). There were five replicates. Whenever ANOVA was significant for ‘time’ or ‘species’ factors, mean comparisons were realized by the LSD comparison test. Statistical analysis was performed using STA-

TISTICA 5.0 (StatSoft, 2002), with an alpha risk of 5%.

3. Results

3.1. Physico-chemical parameters

Temperatures measured throughout the experiment reached maximum values of 28 °C in summer and minimum values of 5 °C in winter. There were no systematic differences between temperatures obtained by the multiprobe and manual measurements (Fig. 2). Salinity also showed seasonal trends with maximum values of $S=25$ at the end of summer and minimum values of $S=10$ in winter. From July to September 2000 salinities were systematically higher (up to 3 points) at ~50 cm depth than in surface water (Fig. 2). Dissolved oxygen concentrations varied from 4 mg l⁻¹ in July 2001 to 12 mg l⁻¹ in March 2001. At a seasonal time-scale, dissolved oxygen concentrations were inversely related with temperature and pH varied from 7.3 in July 2000 to 8.8 in April 2001.

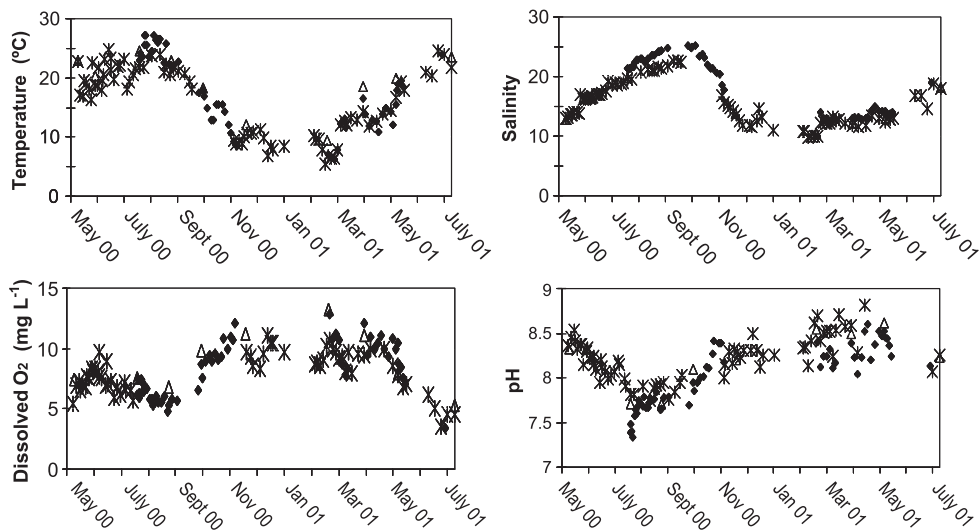


Fig. 2. Seasonal variations of the major physico-chemical parameters temperature, salinity, dissolved O₂ and pH in the breeding basin throughout the whole experiment. Manual measurements at the surface (~10 cm depth) are represented by crosses and open triangles, representing different operators. Full lozenge symbols represent selected multiprobe data (~50 cm depth) corresponding to the regular hour of manual measurements.

At a daily scale, temperature, dissolved O₂ concentration and pH showed distinct periodic variations (Fig. 3a). From July to September 2000 amplitudes of daily temperature variations reached up to 3 °C at ~50 cm depth. In contrast, salinity generally did not show important variations or periodicity, and exceptionally occurring changes were mainly due to basin management (Fig. 3a). Decreasing temperatures throughout several days generally coincided with changes in salinity. At the beginning of September 2000 a general depression of water temperature coincided with a constant increase in salinity throughout 2 weeks.

Dissolved O₂ concentrations showed daily amplitudes of up to 2.5 mg l⁻¹ in phase with variations in temperature, i.e. minimum values in the early morning before sunrise and maximum values in the early afternoon (Fig. 3a). In summer, the water column at ~50 cm depth generally was undersaturated in O₂ with values of down to ~40%, except for the short periods, when maximum O₂ concentrations and saturations of 90–105% occurred (Fig. 3b). Vertical O₂ profiles show that hypoxia increases with depth, causing suboxic

conditions (<1% O₂ saturation) at the sediment surface (data not shown). Daily variations of pH with amplitudes of up to 0.4 units typically paralleled those of temperature and O₂.

3.2. Trace metal concentrations in SPM, sediment and water

Cadmium, Cu and Zn concentrations in SPM sampled in May 2000 and July 2001 were clearly (ca. two to three times) higher than those in SPM sampled in February 2001 (Fig. 4). Indeed, the latter were comparable to mean values in trapped sediment measured throughout the whole experimentation period. Particulate Hg concentrations in centrifuged SPM samples did not show important variations and were close to those in trapped sediment. Trace metal concentrations in the basin sediment did not vary within the three depth ranges during the 15-month experiment (Fig. 4). In most of the cases, trace metal concentrations were lower in the consolidated sediment than in SPM or trapped sediment. Dissolved Cd concentrations in the basin

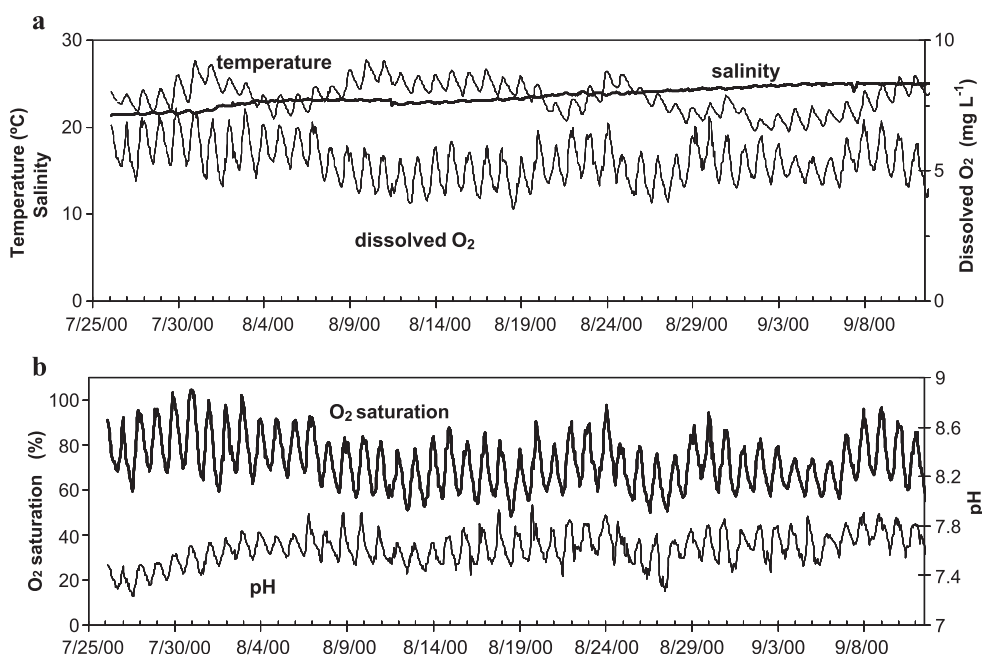


Fig. 3. Example of multiprobe data (one measurement per hour) showing daily variations of major physico-chemical parameters (a) temperature, salinity, dissolved O₂ concentration and (b) O₂ saturation and pH at ~50 cm depth from July 26 to September 12, 2000. Graduations on the time axis represent 12:00 in Universal Time (i.e. 14:00 in European Summer Time) for the respective day.

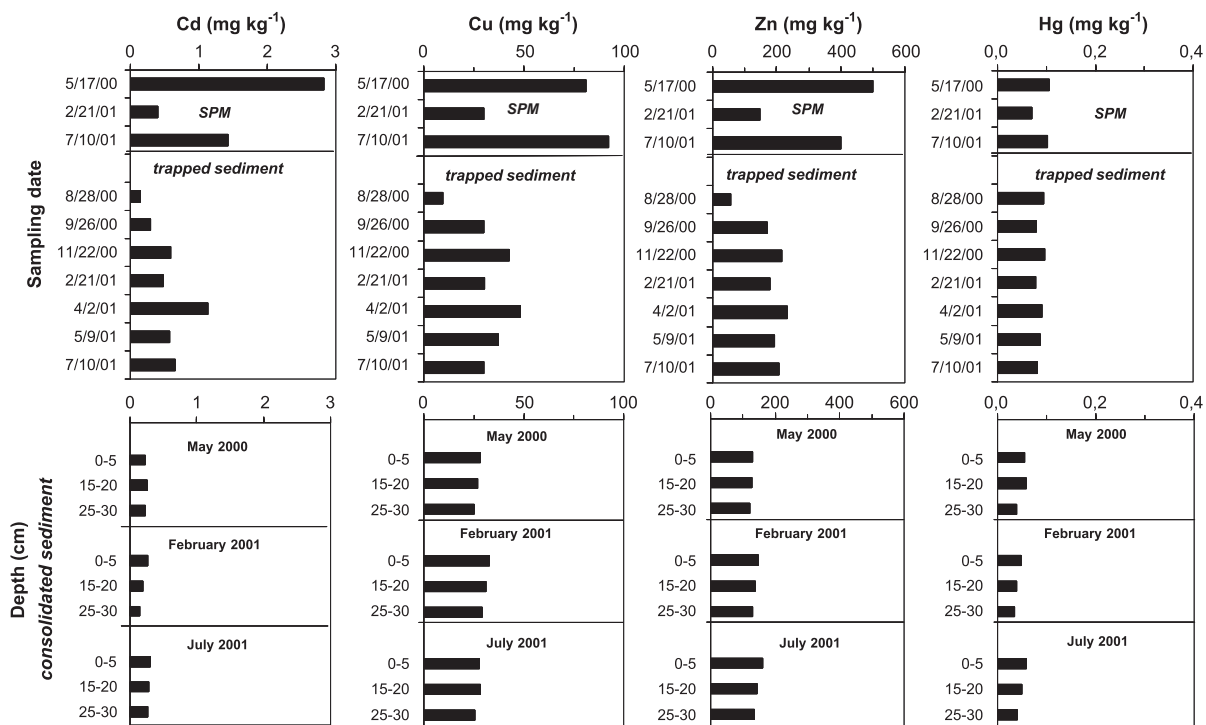


Fig. 4. Cadmium, Cu, Zn and Hg concentrations in SPM and trapped sediment for the different sampling dates.

varied from 13 to 136 ng l^{-1} , except for one sample (367 ng l^{-1} in February 2001; Table 1). Typical dissolved Zn concentrations ranged from 0.3 to 25.1

$\mu\text{g l}^{-1}$, except for two samples in July and September 2000, when respective values of 157 and 427 $\mu\text{g l}^{-1}$ occurred. Copper and Hg_T concentrations were less

Table 1
Dissolved Cd, Cu, Zn, Hg_T and Hg_R in the breeding basin

	[Cd] (ng l^{-1})	[Cu] ($\mu\text{g l}^{-1}$)	[Zn] ($\mu\text{g l}^{-1}$)	[Hg_T] (ng l^{-1})	[Hg_R] (ng l^{-1})
May 17, 2000	13	3.59	1.03	2.0	n.m.
June 5, 2000	136	6.08	4.49	2.0	n.m.
July 25, 2000	34	4.06	157	n.m.	n.m.
August 28, 2000	125	4.50	427	n.m.	n.m.
November 22, 2000	15	3.73	0.29	1.4	0.5
February 21, 2001	367	5.73	25.1	1.3	0.6
April 2, 2001	32	6.26	1.73	0.9	<0.1
May 9, 2001	74	1.08	1.46	0.8	0.4
July 10, 2001	65	1.20	1.76	0.5	<0.1
Gironde (typical range)	25–120 ^{a,b,c,d}	0.3–2.5 ^{c,d}	0.5–3 ^{a,d}	0.4–6 ^{d,e}	<0.1–0.6 ^{d,e}

Copper and Zn concentrations are in $\mu\text{g l}^{-1}$. Cadmium and Hg concentrations are in ng l^{-1} ; (n.m.=not measured).

^a Data from Kraepiel et al. (1997).

^b Data from Boutier et al. (2000).

^c Data from Robert et al. (2004).

^d Data from Schäfer et al., unpublished data.

^e Data from Cossa and Noël, 1987.

variable and ranged from 1.08 to 6.08 $\mu\text{g l}^{-1}$ and 0.5 to 2.0 ng l^{-1} , respectively (Table 1). Reactive Hg (Hg_R) concentrations varied from below detection limits (0.1 ng l^{-1}) to 0.6 ng l^{-1} (Table 1).

3.3. Kinetics of Cd bioaccumulation in the three biological models

3.3.1. *C. gigas*

The dry weight of the shells showed an important and significant increase with time, reaching a factor of 12 after 10 months (Fig. 5a). Three major phases of growth were distinguished: (i) an increase from June to August (T1–T3), then (ii) stagnation from August to

December (T3–T6), and (iii) an increase from December 2000 to March 2001 (T6–T8). Soft body weights (Fig. 5b) also showed three phases with (i) an important increase between May and August (factor 18), (ii) stagnation between August and November, and (iii) a significant decrease in December (Fig. 5b).

Fig. 5c and d represent the kinetics of Cd bioaccumulation in the oysters, using, respectively, two complementary criteria: (i) metal concentrations, highly dependant of the weight of the organisms and used for human consumption levels, and (ii) metal burdens, representing the quantity of metal accumulated in one organism. Cadmium concentrations showed a significant and quasi-linear

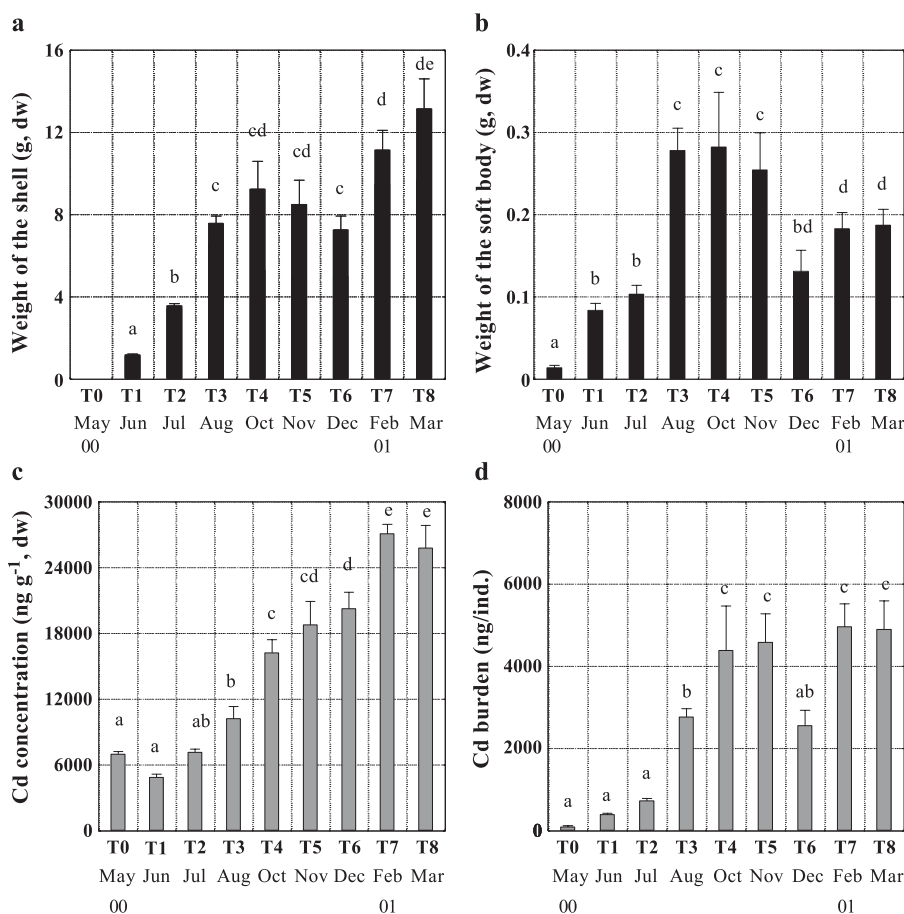


Fig. 5. Kinetics of growth and Cd bioaccumulation for juveniles of oysters *C. gigas*. Growth is represented by the dry weight of the shell (a) and of the whole soft body (b). Cd bioaccumulation is expressed as concentrations in relation to dry weights (c) and burdens (d). The histograms represent average values and standard errors ($n=5$). The letters above the histograms illustrate the significant differences between the mean values, as a result of the LSD comparison test.

increase with time, reaching up to $27,000 \text{ ng g}^{-1}$ (dw) in March (T8). At the end of the transplantation phase, Cd concentrations and Cd burdens were 3.6-fold and 50-fold higher than the respective initial values. Although Cd concentrations in the oysters were relatively high at time zero (i.e. $7000 \pm 1100 \text{ ng g}^{-1}$; dw), Cd burdens per individual were very low ($102 \pm 89 \text{ ng}$) as the organisms were very small, with soft body dry weights of $0.014 \pm 0.011 \text{ g}$ (dw).

3.3.2. *C. edule* and *R. philippinarum*

Marked differences appeared in the soft body dry weights of the two benthic species *C. edule* and *R. philippinarum* during the 6 months of transplantation (Fig. 6a and b). For cockles, an important decrease of

the body weights occurred from June to October (T0–T3), representing a loss of 77% of the dry mass, followed by a stabilization of the values. For clams, the whole soft body dry weights remained stable during the entire transplantation period.

Both benthic species showed a significant bioaccumulation of Cd notably after 4 months of exposure (T3). For *C. edule* (Fig. 6c), the Cd concentrations increased from time T3 and reached values of about 1400 ng g^{-1} (dw) at time T5. The increase in Cd concentrations coincides with the weight loss observed between June and October (T0–T3), accompanied by stable Cd burdens (data not shown). In contrast, from December 2000 (T5) on, soft body weights were constant (Fig. 6a), whereas the Cd bioaccumulation increased again (Fig. 6c). For *R.*

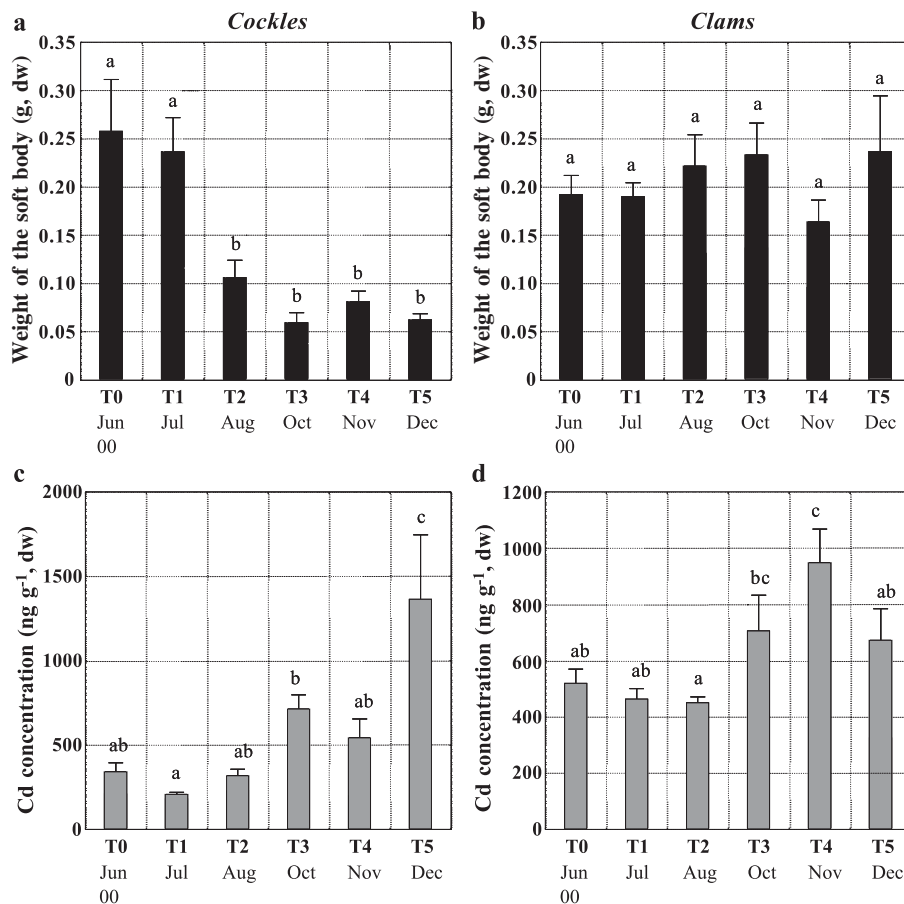


Fig. 6. Kinetics of the soft body dry weights of adult cockles *C. edule* (a) and clams *R. philippinarum* (b). Associated Cd concentrations measured in cockles (c) and clams (d). The histograms represent average values and standard errors ($n=5$). The letters above the histograms illustrate the significant differences between the mean values, as a result of the LSD comparison test.

Table 2

Metal concentrations measured at time T0 of the transplantation phase in the soft body (dry weight, dw) of the three selected bivalves: cockle (*C. edule*), clam (*R. philippinarum*) and oyster (*C. gigas*)

	[Cd] (ng g ⁻¹ , dw)	[Cu] (μg g ⁻¹ , dw)	[Zn] (μg g ⁻¹ , dw)	[Hg] (ng g ⁻¹ , dw)
Cockle	344±117	12.4±4.4	72.7±18.2	126±15.0
Clam	520±112	9.4±1.0	97.2±8.0	163±24.6
Oyster	7000±1100	154±22.9	531±59.5	130±51.0

Mean values±standard deviation (n=5).

philippinarum (Fig. 6d), significant Cd bioaccumulation was observed after T3, reaching maximum average Cd concentrations of 950 ng g⁻¹ (dw).

3.4. Concentrations of Cd, Zn, Cu and Hg in the three biological models after 120 days of transplantation

Cadmium, Cu and Zn showed significant accumulations in the three species between T0 and T3 (Table 2; Fig. 7a, b and c). The highest concen-

trations (up to 10,000 ng g⁻¹ for Cd, 300 μg.g⁻¹ for Cu, and 730 μg g⁻¹ for Zn) were systematically measured in the oysters. At this time, oysters and clams presented relatively comparable soft body dry weights (0.28 and 0.22 g, respectively). The differences between the species are marked, with accumulation and burden ratios (oyster/clam) of 14.5, 22.5 and 10.2 for Cd, Cu and Zn, respectively. The highest Hg concentrations were measured in cockles (Fig. 7d). Only this species significantly accumulated Hg (up to 355 ng g⁻¹; dw) after 120 days of transplantation (Table 2).

4. Discussion

4.1. Geochemical scenario

Variation of physico-chemical parameters throughout the experiment reflects seasonal changes and basin management. Temperature reflects length

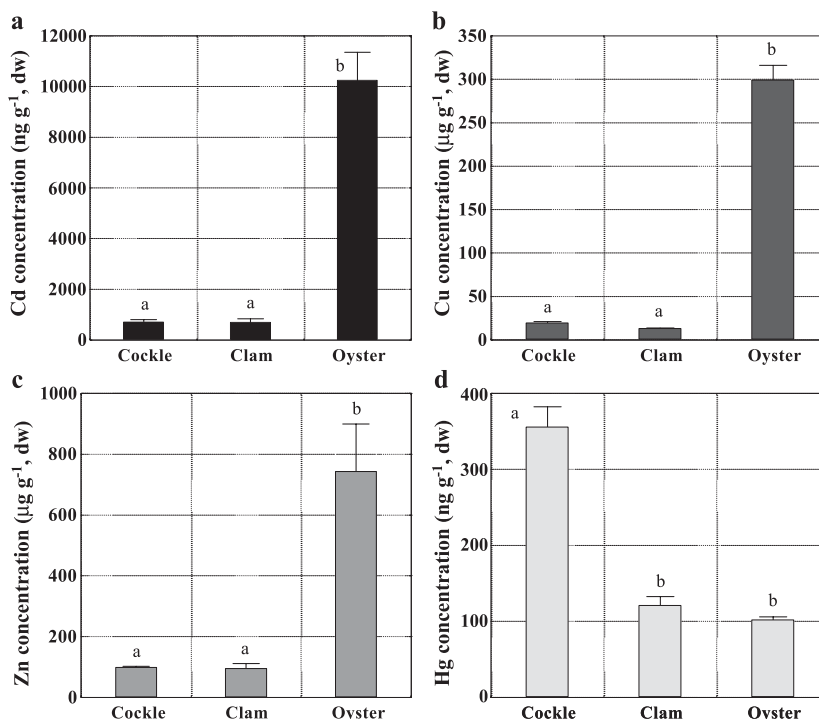


Fig. 7. Soft body concentrations of Cd (a), Cu (b), Zn (c) and Hg (d) of the three bivalve species, after 120 days of transplantation. The histograms represent average values and standard errors (n=5). The letters above the histograms illustrate the significant differences between the mean values, as a result of the LSD comparison test.

and intensity of exposition to sunlight at both, seasonal and daily time-scale (Figs. 2 and 3). Additionally, rapid decreases in temperature and salinity are due to important precipitation, i.e. dilution by rainwater. In contrast, decreasing temperature coinciding with increasing salinity was due to basin alimentation by estuarine water. On a seasonal scale, temperature and O₂ concentration are inversely related, as O₂ solubility increases with decreasing water temperature, whereas daily periodicity of dissolved O₂ concentrations and pH can be explained by photosynthesis and respiration. Dissolved Cd, Zn and Hg concentrations in nearly all samples corresponded well to the range of values typically observed in the Gironde estuary (Table 1). As there was no apparent relation between dissolved Cd and Zn concentrations and salinity in the breeding basins (Fig. 3a; Table 1), Cd and Zn concentrations could reflect water management. However, some Cd and Zn concentrations and most of the dissolved Cu concentrations measured in the basin were higher than typical estuarine values (Table 1). This suggests important changes in distribution and partition of heavy metals, i.e. release of metals into the dissolved phase due to biogeochemical processes, probably at the sediment/water interface. High water temperatures and intense biomass production/degradation resulted in very low dissolved O₂ concentrations. For example, minimum values of 4–5 mg l⁻¹ (<40% of O₂ saturation) occurred at 30 cm above the sediment (~50 cm depth). Differences in salinity between bottom and surface water suggest temporary stratification and important vertical gradients (Fig. 2). The low pH accompanying minimum O₂ saturation was interpreted as a result of CO₂ production by respiration. However, dissolved O₂ concentrations were clearly lower in July 2001 than in 2000, but pH remained around 8, suggesting the presence of a pH-buffer such as bicarbonates. Anaerobic degradation of organic matter using nitrate or Mn-oxyhydroxides as oxidants produces bicarbonates and increases alkalinity in the water column of the Gironde's Maximum Turbidity zone (e.g. Tseng et al., 2001; Robert et al., 2004). Accordingly, we propose that (i) anaerobic organic matter degradation in the lower water column of the Nord Médoc basin buffers pH and (ii) diagenetic processes release trace metals to

the dissolved phase. Indeed, vertical profiles of dissolved O₂ concentrations in the water column indicate suboxic conditions near the sediment/water interface. Sediment was either brown or black, depending on whether it was located on an elevation or in a depression, respectively. Trapped sediment (particles collected by sediment traps) also was black/anoxic. The trapped particles and basin sediments showed metal concentrations that were clearly lower than those of SPM (except February 2001). The intermediate concentration level of trapped particles cannot be explained by grain size segregation during particle settling, as current velocities in the basin were too low (<0.1 m s⁻¹; Schäfer and Blanc, 2002). Therefore, the different concentrations in centrifuged (SPM) and trapped sediment are attributed to dissolution processes in the redox gradient (early diagenesis) comparable to those in the upper sediment layers. For example, Cd concentrations in the sediment (0.4–0.5 mg kg⁻¹; Fig. 4) correspond well to the non-reactive Cd portion in SPM of the Gironde, attributed to the residual fraction, which resists desorption by estuarine salinity, and redox gradients (e.g. Kraepiel et al., 1997; Boutier et al., 2000). Although high SPM concentrations in the Maximum Turbidity Zone (MTZ), may retard exhaustion of desorbable Cd load (Robert et al., 2004), temporary formation of fluid mud causes suboxic conditions in the lower water column leading to reductive dissolution of Mn oxyhydroxides, releasing associated trace metals into the water (e.g. Tseng et al., 2001; Robert et al., 2004). As the trapped material was sampled monthly, kinetics of redox-driven dissolution and the related release of metals into the water column appear to be high. Here, the metals can be adsorbed onto SPM or be stabilized within the truly dissolved or the colloidal phases by complexation. This recycling of trace metals may explain why Cd, Zn and Cu concentrations in SPM were higher in the basin than in the Gironde estuary. Accordingly, the occasional occurrence of high dissolved metal concentrations (e.g. the maximum Cd concentration in February 2001) probably resulted from intense degradation of organic matter due to an important algal bloom in the Gironde estuary (IFREMER, 2002). Dissolved total Hg concentrations were higher (2 ng l⁻¹) at the beginning of the experiment

than in the second half (Table 1). These Hg_T concentrations correspond well to those typically observed in oxic water of the Gironde estuary throughout the whole salinity gradient (0.4–1 ng l^{-1} ; e.g. Cossa and Noël, 1987; Schäfer et al., unpublished data). However, in the maximum turbidity zone, clearly higher concentrations may occur in surface water (Cossa and Noël, 1987) and in bottom water (Tseng et al., 2001). The higher Hg_T concentrations in the basin measured in spring 2000 and in winter 2000/2001 may be due to the influence of the MTZ approaching the Nord Médoc region during high discharge periods (Castaing and Allen, 1981; Sottolichio and Castaing, 1999).

4.2. Scenario of growth and metal bioaccumulation

4.2.1. *C. gigas*

Growth (soft body dry weight) of the oysters (*C. gigas*) showed three stages reflecting variations in numerous abiotic and biotic factors (Fig. 5b). First, during spring and summer 2000, an important increase of water temperature and salinity was accompanied by a weak decrease in pH, stable mean dissolved oxygen concentrations and important phytoplanktonic algae supplies (Fig. 2; IFREMER, 2002). In winter, the decrease in temperature and salinity and the break in alimentary supplies lead to stagnation of growth and even to a weight loss (T5–T6). After this phase, oyster growth continued due to stable though low temperature and salinity, high dissolved O_2 , and regular water and food supplies from the Gironde estuary. The significant and quasi-linear increase in Cd concentrations corresponded to more than five times the authorized level for human consumption (Fig. 5c). The accumulation factor ($[Cd]_{ng/g, dw} T8/[Cd]_{ng/g, dw} T0$) was only 3.6, owed to the soft body weight increase during the whole transplantation phase. We can nevertheless estimate a bioconcentration factor (BCF) during this period ($([Cd]_{ng/g, dw} T8 - [Cd]_{ng/g, dw} T0 \text{ in the soft body}) / \text{mean } [Cd]_{\mu g/l} \text{ in the basin water}$) of 160,000. This factor is 2.5-fold lower than that in juvenile oysters transplanted directly in the Gironde estuary during the same period (data not shown). We compared the Cd accumulation during the two exposition periods: from July to December 2000 (T2–T6) and from December 2000 to February 2001 (T6–T7). The

second period, corresponding to the reinstallation of regular food supplies by Gironde estuary water and an increase of soft body weight, showed higher mean daily Cd accumulation (175 ng g^{-1} , dw), compared to the first period (80 ng g^{-1} , dw). Thus, between T6 and T7 the Cd accumulation gradient was more than two times higher than during the first period, which seems to reflect dissolved Cd concentrations in the basin that were three to four times higher than mean values (Table 1). These results suggest close relations between dissolved Cd concentrations in the basin water and Cd bioaccumulation by the filter-feeding oysters.

4.2.2. *C. edule* and *R. philippinarum*

The weight loss observed in adult cockles between July and August (T1–T2, Fig. 6a), currently observed for this species in winter (Honkoop and Beukema, 1997), could be attributed to stress conditions (decreasing temperature, food supplies and salinity; Fig. 2), resulting in mortality in October to December (T3–T5). Indeed, this species is known to tolerate salinities from 15 to 40, with a better tolerance of low salinity only for young specimens (Rygg, 1970). All these factors are supposed to have weakened the organisms defence, whereas oxygenation problems can be excluded for this period of high O_2 concentrations. In the same period, the soft body weights of clams did not change, suggesting a better resistance of these benthic bivalves to the basin conditions compared with cockles. It is important to mention also that the basin sediment (essentially silt) is rather convenient for clams than for cockles that are more naturally situated on sandy–muddy substrate (Kang et al., 1999). The bioaccumulation factors of Cd in both benthic species, were low at the end of the transplantation period (4 and 2, respectively, for cockles and clams), leading to low maximal Cd concentrations, far below the human consumption limit. However, the high Cd accumulation increase in the cockles between T4 and T5 cannot be totally explained by the decrease in soft body weight. Indeed, stress periods weakening the organisms defence can lead to lower ventilation performance and consequently increase opening times of the valves, followed by an increase in soft body exposure surface to ambient water and dissolved metals (Tran et al., 2001). This effect may be enhanced by the fact that weakened benthic bivalves (e.g. parasitized individu-

als), tend to migrate to the sediment/water interface (Desclaux et al., 2002; Blanchet et al., 2003).

4.2.3. Comparison of metal bioaccumulation in the three species

The comparison of Cd, Cu and Zn accumulation in the three species at time T3 (Fig. 7a, b and c) showed high contamination levels in the oysters, reflecting their high filter capacity, enhancing exposure to dissolved metals present in the water column (Mouneyrac et al., 1999; Ettajani et al., 2001; Tran et al., 2001). On the other hand, benthic species located at the sediment/water interface, such as cockles and clams, did not present important metal contamination, despite their high metal bioaccumulation potential (Hamza-Chaffai et al., 2000; Cheggour et al., 2001). These results are consistent with low metal concentrations measured in the basin sediment and in trapped particles, contrasting with punctually high dissolved and particulate metal levels in the water column. For Hg, only cockles presented significant bioaccumulation (Fig. 7d). These results are particularly interesting with regard to the contamination route of the bivalves for Hg that concerns essentially the trophic way instead of the direct route. Nevertheless, Hg concentrations in the basin sediment, trapped particles, and in the water column were relatively low. As clams did not accumulate Hg in the same proportions, these results may suggest a specific accumulation capacity of cockles for this metal. Indeed, the bioaccumulation factor of Hg in cockles after 120 days was close to 200,000, whereas the bioaccumulation factor calculated for Cd in oysters reached only 50,000 for the same period. These results open a large scale of future research on the exploration of the mechanisms of Hg accumulation by this species, with respect to intense recycling coupled to speciation changes of Hg in highly turbid estuaries like the Gironde estuary (e.g. Tseng et al., 2001).

5. Conclusion

The present study was part of a larger research program realized in four basins on three aquaculture farms in the Nord Médoc salt marshes, to evaluate the impact of geochemical conditions on metal bioaccumulation by shellfish under realistic conditions of prawn production. The basin presented in this work

corresponded to the reference site without perturbations by prawn production. The results show the high potential of Cd, Cu and Zn bioaccumulation in oysters, compared to other species and with respect to consumption limits. They also suggest a close relation between geochemical processes leading to metal mobilization and bioaccumulation. Further work will allow better quantifying and understanding processes of metal recycling due to important oxygen undersaturation at the sediment/water interface. The high bioaccumulation of Hg in cockles will be considered in future studies as (i) it might represent a risk in terms of consumption limits and (ii) it could help in understanding physiological differences between bivalve species or (iii) even be used as a stress indicator for benthic bivalves. Nevertheless, based on the results for metal accumulation and bacteriological studies, four prawn producers obtained a derogation to produce cockles and clams in the Nord Médoc salt marshes from 2003 on.

Acknowledgements

The authors wish to thank Y. Lapaquellerie, N. Maillet, H. Bouillard, V. Roques-Duflo, G. Durrieu, G. Lavaux, E. Maneux, A. Palvadeau and B. Etcheverria for their important support in field work, analysis and data treatment. We thank also the Bleu Médoc fish farm for their important contribution. This work is part of the GIS ECOBAG program and was financially supported by the Agence de l'Eau Adour-Garonne, Conseil Général de la Gironde, the European Community (FEDER-PESCA), District de la Pointe du Médoc, Direction Régionale des Affaires Maritimes, the French Ministry of Environment and by a Marie Curie fellowship of the European Community programme "Energy, Environment and Sustainable Development" under contract number EVK1-CT-2000-5003.

References

- Andrès S, Baudrimont M, Lapaquellerie Y, Ribeyre F, Maillet N, Latouche C, et al. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (Lot River, France): Part I Geochemical characteristics of the

- sampling sites and cadmium and zinc bioaccumulation kinetics. *Environ Toxicol Chem* 1999;18:2462–71.
- Audry S, Blanc G, Schäfer J. Cadmium fluxes in the Lot–Garonne River system (France)—temporal variability and empiric model. *Sci Total Environ* 2003;319:197–213.
- Audry S, Schäfer J, Blanc G. Anthropogenic components on Heavy metal budgets (Cd, Zn, Cu and Pb) in the Lot–Garonne fluvial system (France). *Appl Geochem* 2004;19:769–86.
- Baudrimont M, Andrès S, Durrieu G, Boudou A. Key role of metallothioneins in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase, after an in situ exposure to Cd and Zn. *Aquat Toxicol* 2003;63:89–102.
- Blanc G, Lapaquellerie Y, Maillet N, Anschutz P. A cadmium budget for the Lot–Garonne fluvial system (France). *Hydrobiologia* 1999;410:331–41.
- Blanc G, Schäfer J, Audry S, Bossy C, Lavaux G, Lissalde JP. The cadmium in the Lot and Garonne Rivers: sources and transport. *Hydroécol Appl* (2004) (in press).
- Blanchet H, Raymond N, de Montaudouin X, Capdepuy M, Bachelet G. Effects of digenean trematodes and heterotrophic bacteria on mortality and burying capability of the common cockle *Cerastoderma edule* (L.). *J Exp Mar Biol Ecol* 2003;293:89–105.
- Bloom NS, Crecelius EA. Determination of mercury in seawater at nanogram per liter levels. *Mar Chem* 1983;14:49–59.
- Boutier B, Chiffolleau JF, Jouanneau JM, Latouche C, Phillips I, 1989. La contamination de la Gironde par le cadmium; origine, extension, importance. Scientific and technical report, Ifremer no. 14.
- Boutier B, Chiffolleau JF, Gonzalez JL, Lazure P, Auger D, Truquet I. Influence of the Gironde estuary outputs on cadmium concentrations in the coastal waters: consequences on the Marennes-Oléron bay (France). *Oceanol Acta* 2000;23:745–57.
- Castaing P, Allen GP. Mechanisms controlling seaward escape of suspended sediment from the Gironde: a macrotidal estuary in France. *Mar Geol* 1981;40:101–18.
- Cheggour M, Chafik A, Langston WJ, Burt GR, Benbrahim S, Texier H. Metals in sediments and the edible cockle *Cerastoderma edule* from two Moroccan Atlantic lagoons: Moulay Bou Selham and Sidi Moussa. *Environ Pollut* 2001;115:149–60.
- Ciffroy P, Vazelle D, Mataix V, Taconnet J, Estèbe A, Thévenot D, et al. Intercomparaison de méthodes d'échantillonnage des matières en suspension en milieu fluvial: application à la mesure de la concentration en micropolluants métalliques. *Hydroécol Appl* 1999;11:71–102.
- Cossa D, Noël J. Concentrations of Mercury in near shore surface waters of the Bay of Biscay and in the Gironde estuary. *Mar Chem* 1987;20:389–96.
- Danielsson LG, Magnusson B, Westerlund S, Zhang K. Trace metal determinations in estuarine waters by electrothermal atomic absorption spectrometry after extraction of dithiocarbamate complexes into freon. *Anal Chim Acta* 1982;144:183–8.
- Desclaux C, de Montaudouin X, Bachelet G. Cockle emergence at the sediment surface: 'favourization' mechanism by digenean parasites? *Dis Aquat Org* 2002;52:137–49.
- Elbaz-Poulichet F, Garnier JM, Guan DM, Martin JM, Thomas AJ. The conservative behavior of trace metals (Cd, Cu, Ni and Pb) and As in the surface plume of stratified estuaries: example of the Rhône River (France). *Estuar Coast Shelf Sci* 1996;42:289–310.
- Ettajani H, Berthet B, Amiard JC, Chevolut L. Determination of cadmium partitioning in microalgae and oysters: contribution to the assessment of trophic transfer. *Arch Environ Contam Toxicol* 2001;40:209–21.
- Gardner WD. Sediment trap dynamics and calibration: a laboratory evaluation. *J Mar Res* 1980;38:17–39.
- Hamza-Chaffai A, Amiard JC, Pellerin J, Joux L, Berthet B. The potential use of metallothionein in the clam *Ruditapes decussates* as a biomarker of in situ metal exposure. *Comp Biochem Physiol C* 2000;127:185–97.
- Honkoop PJC, Beukema JJ. Loss of body mass in winter in three intertidal bivalve species: an experimental and observational study of the interacting effects between water temperature, feeding time and feeding behaviour. *J Exp Mar Biol Ecol* 1997;212:277–97.
- IFREMER. Résultats de la surveillance de la qualité de milieu marin littoral Départements: Gironde, Landes et Pyrénées Atlantiques. Arcachon, 2002. 60 p.
- Jouanneau JM, Boutier B, Chiffolleau JF, Latouche C, Phillips I. Cadmium in the Gironde fluvio-estuarine system: behaviour and flow. *Sci Total Environ* 1990;97/98:465–9.
- Kang CK, Sauriau PG, Richard P, Blanchard GF. Food sources of the infaunal suspension-feeding bivalve *Cerastoderma edule* in a muddy sandflat of Marennes-Oléron Bay, as determined by analyses of carbon and nitrogen stable isotopes. *Mar Ecol, Prog Ser* 1999;187:147–58.
- Kingston HM, Barnes IL, Brady TJ, Rains TC. Separation of eight transition elements from alkali and alkaline earth elements in estuarine and seawater with chelating resin and their determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Anal Chem* 1978;50:2064–70.
- Kraepiel AML, Chiffolleau JF, Martin JM, Morel FMM. Geochemistry of trace metals in the Gironde estuary. *Geochim Cosmochim Acta* 1997;61:1421–36.
- Lapaquellerie Y, Jouanneau JM, Maillet N, Latouche C. Pollution en Cd dans les sédiments du Lot (France) et calcul du stock de polluant. *Environ Technol* 1995;16:1145–54.
- Latouche C. La pollution en cadmium de l'Estuaire de la Gironde. *Bull Inst Géol Bassin Aquitaine* 1988;44:15–21.
- Latouche C. La pollution par le cadmium des huîtres sauvages de l'Estuaire de la Gironde Origine Mécanismes responsables de la fixation du cadmium. *Ichthyophysiol Acta* 1992;15:139–52.
- Michel P, Boutier B, Chiffolleau JF. Net fluxes of dissolved arsenic, cadmium, copper, zinc, nitrogen and phosphorus from the Gironde estuary (France): seasonal variations and trends. *Estuar Coast Shelf Sci* 2000;51:451–62.
- Mouneyrac C, Berthet B, Amiard JC. Cd distribution in the tissues of oysters (*Crassostrea gigas*) exposed chronically in situ. *Water Air Soil Pollut* 1999;112:187–96.
- Quémerais B, Cossa D, 1995. Protocoles d'échantillonnage et d'analyse du mercure dans les eaux naturelles. Environnement Canada—région du Québec, Conservation de l'environnement, Centre Saint-Laurent. Scientifique and technical report ST-31. 39 pp.

- Robert S, Blanc G, Schäfer J, Lavaux G, Abril G. Metal mobilization in the fluid mud of the Gironde estuary (France) in low discharge regime. *Mar Chem* 2004;87:1–13.
- Roux M, Simonet F. Pollutions accidentelles du Lot: flux polluant. *Revue de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne*, 34 (1987) 7–9.
- Rygg B. Studies on *Cerastoderma edule* (L) and *Cerastoderma glaucum* (Poiret). *Sarsia* 1970;43:65–80.
- Schäfer J, Blanc G. Relationship between ore deposits in river catchments and geochemistry of suspended particulate matter from six rivers in southwest France. *Sci Total Environ* 2002; 298:103–18.
- Schäfer J, Blanc G, Lapaquellerie Y, Maillet N, Maneux E, Etcheber H. Ten-year-observation of the Gironde tributary fluvial system: fluxes of suspended matter, particulate organic carbon and cadmium. *Mar Chem* 2002;79:229–42.
- Sottolichio A, Castaing P. A synthesis on seasonal dynamics of highly-concentrated structures in the Gironde estuary. *C R Acad Sci Paris, Earth Planet Sci* 1999;329:795–800.
- Tran D, Boudou A, Massabuau JC. How water oxygenation level influences cadmium accumulation pattern in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*: a laboratory and field study. *Environ Toxicol Chem* 2001;20:2073–80.
- Tseng CM, Amouroux D, Abril G, Tessier E, Etcheber H, Donard OFX. Speciation of Mercury in a fluid mud profile of a highly turbid macrotidal estuary (Gironde France). *Environ Sci Technol* 2001;35:2627–33.

Annexe 5 : Les études menées en conditions contrôlées de laboratoire sur *Corbicula fluminea*, *Dreissena polymorpha* et *Crassostrea gigas*, après exposition au cadmium et/ou zinc, ont servi de support pour une partie des travaux de thèse de Maud Achard-Joris (Etudes biochimiques et génétiques de la réponse adaptative de mollusques face aux contaminations métalliques et au stress oxydant, 2005). L'objectif était d'évaluer l'impact des deux métaux sur l'expression du gène de la sous-unité 1 de la cytochrome c oxydase (*Cox1*) chez les bivalves.

*Cytochrome c oxydase subunit I gene is up-regulated by cadmium in freshwater and marine bivalves*¹

Achard-Joris M., Gonzalez P., Marie V., Baudrimont M., Bourdineaud J.-P.

Laboratoire d'Ecophysiologie et d'Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques (LEESA), Université Bordeaux1/UMR CNRS 5805, Place du Dr. Peyneau, 33120 Arcachon, France.

KEYWORDS

cadmium; zinc; *CoxI* gene; biomarker; bivalves; quantitative real-time PCR

¹ Article accepté pour publication dans *Biometals*

2 **Cytochrome *c* oxidase subunit I gene is up-regulated by cadmium** 3 **in freshwater and marine bivalves**

4 Maud Achard-Joris, Patrice Gonzalez, Véronique Marie, Magalie Baudrimont & Jean-
5 Paul Bourdineaud*

6 *Laboratoire d'Ecophysiologie et d'Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques (LEESA), Université Bordeaux1/*
7 *UMR CNRS 5805, Place du Dr. Peyneau, 33120, Arcachon, France; *Author for correspondence (Tel: +33-*
8 *556-22-39-26; Fax: +33-556-54-93-83; E-mail: jp.bourdineaud@epoc.u-bordeaux1.fr)*

9 Received 28 January 2005; Accepted 18 April 2005; Published online: ■

10 **Key words:** biomarker, bivalves, cadmium, *CoxI* gene, quantitative real-time PCR, zinc

12 **Abstract**

13 Inhibition of the mitochondrial electron transfer chain and induction of reactive oxygen species (ROS)
14 production are one of the roots of cadmium (Cd) toxicity. To appreciate the impact of Cd on mitochondria,
15 we focused on the expression of *CoxI* gene which encodes the subunit I of the Cytochrome *c* oxidase
16 (complex IV of the respiratory chain). *CoxI* gene expression was studied by real-time quantitative PCR in
17 three species: two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) and one marine
18 bivalve (diploid or triploid *Crassostrea gigas*). Bivalves were exposed for 10 or 14 days to 0.13 μM Cd²⁺
19 and 15.3 μM Zn²⁺ in controlled laboratory conditions. We demonstrate that in the three mollusk species
20 *CoxI* gene was up-regulated by Cd. Zinc (Zn), which is known to have antioxidant properties, had no effect
21 on *CoxI* gene expression. In the presence of Cd and Zn, *CoxI* gene inducibility was lower than after a single
22 Cd exposure, in each species; result that could not be fully explained by a decreased Cd accumulation. *CoxI*
23 gene induction by Cd was 4.8-fold higher in triploid oysters than in diploid ones, indicating a possible
24 influence of triploidy on animal responses to Cd contamination.

27 **Introduction**

28 Heavy metals, depending on their oxidation states,
29 can be highly reactive and hence toxic to most
30 organisms. Metals such as copper (Cu) and zinc
31 (Zn) are essential for life, whereas others, such as
32 mercury (Hg) and cadmium (Cd), are not known
33 to perform any useful biochemical function. Cd in
34 particular is very toxic and is considered a serious
35 occupational and environmental health threat
36 since it is a metal with many industrial uses which
37 is continuously introduced into the atmosphere,
38 into aquatic and terrestrial environments. Toxic-
39 ological responses of Cd exposure include kidney
40 damage, respiratory diseases, neurological disor-
41 ders and several kinds of cancer (Waalkes *et al.*
42 1992).

To counter Cd toxicity, living organisms use 43
several metal resistance mechanisms. Cells respond 44
by increasing the expression of genes encoding a 45
variety of proteins (Carginale *et al.* 2002); toxic 46
ions can be segregated by thiol-containing mole- 47
cules like metallothioneins (Roesijadi *et al.* 1996) 48
or pumped out of the cell via a membrane protein 49
(Li *et al.* 1997; Achard-Joris *et al.* 2005). A variety 50
of mechanisms have been attributed to Cd toxicity. 51
It interferes with the intracellular signaling net- 52
work and gene regulation at multiple levels 53
(Beyersmann & Hechtenberg 1997) and may be 54
associated with the production of reactive oxygen 55
species (ROS, molecules and free radicals such as 56
superoxide anion and hydrogen peroxide derived 57
from molecular oxygen) (Szuster-Ciesielska *et al.* 58
2000). Under normal conditions the production 59

60 and destruction of ROS is well regulated in cell
61 metabolism, but under environmental oxidative
62 stress the balance between prooxidative and anti-
63 oxydative reactions is shifted in favor of the
64 former.

65 As mitochondria are a major source of super-
66 oxide and hydrogen peroxide production in cells
67 (Turrens 1997) several studies have focused on the
68 effect of Cd on mitochondrial metabolism: Cd has
69 been shown to inhibit the mitochondrial electron
70 transfer chain and to induce ROS production
71 (Wang *et al.* 2004). Moreover, Cd-promoted oxi-
72 dative stress leads to DNA strand damage –
73 especially mitochondrial ones (Yakes & Van
74 Houten 1997) – and to apoptotic cell death (Bag-
75 chi *et al.* 2000). This suggests that enhanced ROS
76 production may be at the root of Cd toxicity. Two
77 more ways in which cells might avoid Cd toxicity
78 can then be proposed: hypertrophied antioxidant
79 defenses or increased consumption of molecular
80 oxygen. As Cd can induce alterations in the
81 activity of antioxidant enzymes such as superoxide
82 dismutase, catalase, glutathione reductase, and
83 glutathione peroxidase after only a few hours
84 exposure (Company *et al.* 2004; Ikediobi *et al.*
85 2004), we focused on the second way and espe-
86 cially on Complex IV (Cytochrome *c* oxidase
87 (COX)) of the mitochondrial respiratory chain.
88 This transfers electrons from reduced Cytochrome
89 *c* to molecular oxygen, and contributes to the
90 production of an electrochemical proton gradient
91 across the mitochondrial inner membrane that
92 drives the synthesis of ATP (Capaldi *et al.* 1983;
93 Capaldi 1990). Complex IV is particularly
94 interesting because it has been shown that oxygen-
95 tolerant strain of HeLa cells had twice the Cyto-
96 chrome *c* oxydase activity of the wild-type ones,
97 and inhibition of Cytochrome *c* oxydase enhanced
98 ROS production (Campian *et al.* 2004). Assuming
99 that cell damage does arise from exaggerated
100 mitochondrial ROS production, the site of elec-
101 tron leak from the electron transport chain
102 becomes an important question.

103 To study the impact of Cd toxicity on mito-
104 chondria we looked at *Cox* subunit I mitochon-
105 drial gene (*CoxI*) expression. An advantage of
106 using COX to study the impact of Cd on mito-
107 chondrial metabolism is that *CoxI* gene sequence is
108 highly conserved between lower and higher
109 eukaryotes (Capaldi 1990). Thus a similar *CoxI*
110 gene regulation between species can be expected.

111 Many aquatic organisms are of potential
112 interest as ecologically sensitive targets of metallic
113 pollution. Among them, bivalve mollusks are
114 regularly used as bioindicators of water metal
115 pollution because of their high bioaccumulation
116 capacities for heavy metals (Inza *et al.* 1997) and
117 because they are well represented in aquatic eco-
118 systems. In this study, three aquatic species were
119 chosen: two freshwater bivalves (the Asiatic clam
120 *Corbicula fluminea* and the zebra mussel *Dreissena*
121 *polymorpha*) and one seawater bivalve (the Pacific
122 oyster *Crassostrea gigas*). Triploid *C. gigas*, oys-
123 ters developed to enhance the production and
124 selling period of commercial bivalves, were also
125 used to investigate whether a third set of chro-
126 mosomes could influence *CoxI* gene expression
127 after metal contamination. *CoxI* gene expression
128 level was studied in gill tissues because gills are the
129 organ at the interface with the polluted environ-
130 ment and are thus the main tissues from which the
131 metal loading in the organism will proceed (Mar-
132 igoomez *et al.* 2002). Cd concentration was set to
133 0.13 μM which is close to that found in a Cd
134 contaminated river used for field contaminations
135 (Achard *et al.* 2004). Since Zn has antioxidant
136 properties (Bray & Bettger 1990), bivalves were
137 also contaminated with Zn and a mix of Cd and
138 Zn.

139 **Materials and methods**

140 *Animals*

141 *C. fluminea* (2 ± 0.2 cm shell length) were col-
142 lected from a reference site in Cazaux-Sanguinet
143 freshwater lake (Aquitaine region, south-west
144 France). *D. polymorpha* (2.7 ± 0.2 cm shell
145 length) were collected in the Garonne river, close
146 to Agen (Aquitaine region, France).

147 Diploid and triploid *C. gigas* oysters
148 (12 months old, 5.7 ± 0.1 cm shell length) were
149 obtained from an oyster farmer in Arcachon Bay
150 (Aquitaine region, France).

151 *Metal contaminations*

152 For freshwater bivalves, laboratory experiments
153 were carried out using experimental units (EUs)
154 based on glass tanks lined with plastic bags con-
155 taining pure sand and dechlorinated tap water

156 permanently aerated by a diffuser connected to an
157 air pump (Achard *et al.* 2004). Groups of 20
158 *C. fluminea* and 20 *D. polymorpha* were exposed
159 for 10 days to ZnCl₂ (15.3 μM Zn²⁺), CdCl₂
160 (0.13 μM Cd²⁺) and ZnCl₂ + CdCl₂ (15.3 μM
161 Zn²⁺ and 0.13 μM Cd²⁺). Metal concentrations
162 were maintained constant during the whole
163 experiment by daily additions of aqueous Cd and
164 Zn solutions, adjusted according to the decrease in
165 metal concentration in each EU (determined by
166 atomic absorption spectrometry – VARIAN AA
167 400, Victoria, Australia). The bivalves were fed
168 every two days with 3 × 10⁵ green algae
169 (*Scenedesmus subspicatus*) per ml culture.

170 Experiments on oysters were performed using
171 EUs based on polyethylene tanks containing aer-
172 ated (281 μM of dissolved O₂) artificial seawater
173 prepared by mixing Instant Ocean synthetic sea
174 salt (Mentor, OH, USA; 25 ± 0.5‰) with de-
175 chlorinated tap water. Groups of 36 *C. gigas* dip-
176 loid and 36 *C. gigas* triploid were exposed for
177 14 days to ZnCl₂ (15.3 μM Zn²⁺), CdCl₂ (0.13 μM
178 Cd²⁺) and ZnCl₂ + CdCl₂ (15.3 μM Zn²⁺ and
179 0.13 μM Cd²⁺). The contaminated water was
180 changed daily to maintain Zn and/ or Cd con-
181 centrations constant. Oysters were contaminated
182 4 days longer than freshwater bivalves in order to
183 obtain an equivalent Cd concentration in tissues.
184 Indeed, for a given metal concentration, levels of
185 free metal ions are much less in seawater than in
186 tap water due to the presence of metal chloride
187 species which are less available (Campbell 1995).
188 Oysters were fed every two days with 0.05 g green
189 algae (*Isochrysis galbana*) per oyster.

190 All the experiments were performed at
191 20 ± 0.3 °C, pH 8.5 ± 0.3 and with 12 h light
192 per day according to a protocol already described
193 (Achard *et al.* 2004). Cadmium chloride (CdCl₂)
194 and zinc chloride (ZnCl₂) were purchased from
195 Merck.

196 Cadmium and zinc determinations

197 The whole soft body of one bivalve was taken
198 from each of the three replicates for each condi-
199 tion, then dissected, dried on absorbent paper and
200 weighed (fresh weight, f.w.). Tissues and water
201 samples were then analyzed for metal bioaccu-
202 mulation by atomic absorption spectrophotometry
203 as previously described (Achard *et al.* 2004).

204 Inter-individual variability for each experi-
205 mental condition was defined by mean ± stan-
206 dard error (SE). Significant differences between
207 metal concentrations in the whole soft body were
208 determined using the nonparametric Mann–Whit-
209 ney *U*-test (*P* < 0.05).

cDNA fragment production and SYBR green real-time PCR 210 211

212 Total RNA were extracted from gills of bivalves
213 (two animals per reaction) using the Absolutely
214 RNA RT-PCR Miniprep kit (Stratagene) accord-
215 ing to the manufacturer's instructions. Three
216 microgram of RNAs from laboratory bivalves
217 were retrotranscribed in 50 μl reaction using the
218 ProStar First-Strand RT-PCR kit (Stratagene).

219 Primers COXI5 5'-GGAATACCACGACG-
220 GTACTCT-3' and COXI3 5'-AGGGCAGCC-
221 GTGTAAT-3' were used on cDNA prepared from
222 *D. polymorpha* and *C. gigas* RNA and primers
223 CFCOXI5 5'-GATGGGTGGTTTTGGAAATT-
224 GAC-3' and CFCOXI3 5'-ACTGACGGGCCA-
225 GAATG-3' on cDNA prepared from *C. fluminea*
226 RNA. *CoxI* gene sequence from these three species
227 were available in GenBank (*D. polymorpha*:
228 AF120663; *C. gigas*: AF280608; *C. fluminea*:
229 AF120666) and primers were designed according to
230 the LightCycler probe design software (version 1.0,
231 Roche). Normalization was carried out detecting
232 cDNA 28S with the following primers: 5'-CCA
233 AGG AGT CTA ACA TGT GC-3' and 5'-GAT
234 GGT TCG ATT AGT CTT TC-3'. Quantitative
235 real-time PCR assay was carried out in 20 μl PCR
236 mixture volume consisting of 1 μl LightCycler
237 FastStart reaction mix SYBR Green I (containing
238 FastStart *Taq* DNA polymerase, 0.3 μM of each
239 oligonucleotide; Roche), 5 mM MgCl₂, 0.3 μM of
240 each primer and 3 μl of cDNA. Gene amplification
241 was carried out as follows: initial activation of
242 HotStart *Taq* DNA Polymerase at 95 °C for
243 10 min; 50 cycles in three steps: 95 °C for 5 s, 60 °C
244 for 5 s, 72 °C for 20 s. At the end of amplification
245 cycles, melting temperature analysis was carried
246 out by slow increase in temperature (0.05 °C s⁻¹)
247 from 65 up to 95 °C. Amplification, data acquisi-
248 tion and analysis were carried out with a Light-
249 Cycler instrument (Roche, Mannheim, Germany)
250 using LightCycler 5.3.2 software (Roche). Three
251 replicates were performed, meaning three inde-

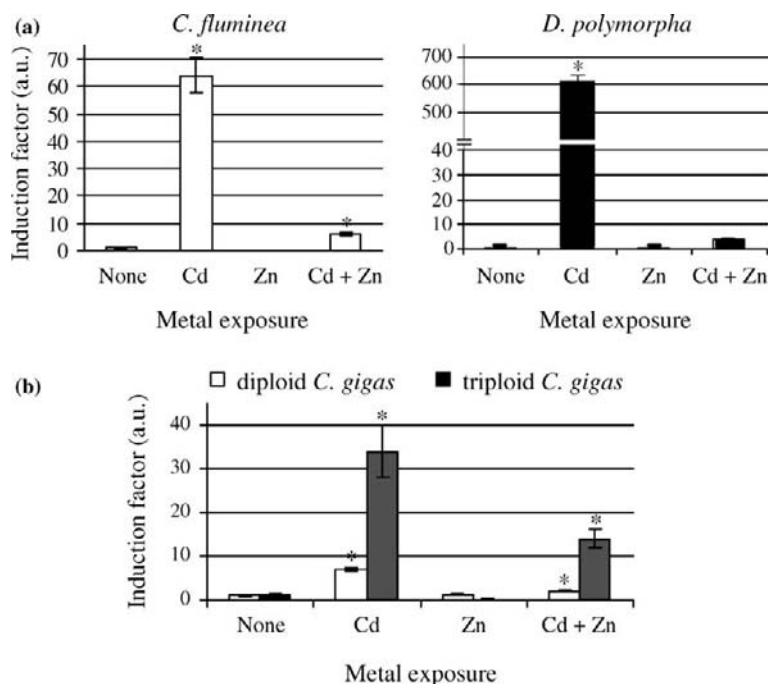


Figure 1. (a) Expression levels (\pm SE) after normalization for *CoxI* transcript in gills of *C. fluminea* and *D. polymorpha* exposed for 10 days to cadmium ($0.13 \mu\text{M Cd}^{2+}$), zinc ($15.3 \mu\text{M Zn}^{2+}$), or cadmium and zinc ($0.13 \mu\text{M Cd}^{2+}$ and $15.3 \mu\text{M Zn}^{2+}$). (b) Expression levels (\pm SE) after normalization for *CoxI* transcript in gills of diploid and triploid *C. gigas* exposed for 14 days to cadmium, zinc, or both metals at the same concentrations as in a. Expression ratio between *CoxI* and 28S genes in control bivalves was set to one. a.u. stands for arbitrary units. Measurements were done in triplicate. *Statistically different compared to control ($P < 0.05$).

252 pendent RNA extractions and retrotranscriptions
 253 for each contamination condition. Relative quan-
 254 tifications of *CoxI* gene expression levels were
 255 normalized according to the 28S rRNA gene
 256 expression. Expression ratio between *CoxI* and 28S
 257 genes in control bivalves was set to one. Inter-
 258 individual variability for each experimental condi-
 259 tion was defined by mean \pm SE ($n = 3$). Signifi-
 260 cant differences between *CoxI* gene expression
 261 levels in the gills were determined using the non-
 262 parametric Kruskal–Wallis method ($P < 0.05$) for
 263 more than two samples comparisons. If the test was
 264 rejected, we performed the Mann–Whitney *U*-test
 265 ($P < 0.05$).

266 Results

267 Bivalves were exposed to Cd, Zn, or both metals in
 268 controlled conditions. After Cd exposure, no
 269 mortality was observed and bivalves accumulated
 270 Cd well. The Cd accumulation factor (defined as
 271 Cd concentration in Cd-contaminated bivalve
 272 versus Cd concentration in control bivalve) was 79

in *C. fluminea*, 56 in *D. polymorpha*, 15 in dip-
 273 loid *C. gigas*, and 16 in triploid *C. gigas*. Cd con-
 274 centration in the whole soft body of bivalves was
 275 similar in each species (around $48 \text{ nmol Cd g}^{-1}$
 276 fw.) (Table 1). After Cd and Zn exposure, a dif-
 277 ference in Cd accumulation was observed only in
 278 *D. polymorpha*: Cd concentration was 2.4 times
 279 lower in mussels exposed to Cd and Zn than in the
 280 one exposed to Cd (Table 1); the 2.2 times lower
 281 Cd concentration observed in *C. fluminea* was not
 282 statistically significant.

283 Zn concentration in the whole soft body of
 284 control bivalves was different for each species.
 285 Indeed, in *C. gigas*, it was 13 and 53 times
 286 higher than in *C. fluminea* and *D. polymorpha*,
 287 respectively (Table 2). Although Zn basal levels
 288 were different for each species, similar Zn accu-
 289 mulation factors (defined as Zn concentration in
 290 Zn-contaminated bivalve versus Zn concentra-
 291 tion in control bivalve) were observed between
 292 diploid *C. gigas*, triploid *C. gigas*, and *C. fluminea*
 293 after Zn exposure. Zn accumulation factor in *D.*
 294 *polymorpha* was calculated to be 18 and was six
 295 times higher than in the other bivalves (Table 2).
 296

Table 1. Cadmium concentrations (measured in nanomol per gram fresh weight \pm SE) in the whole soft body of bivalves after exposure to Cd, Zn, or Cd and Zn.

Species	Metal exposure, nmol Cd g ⁻¹ (fw)			
	None	Cd	Zn	Cd + Zn
<i>C. fluminea</i> ^a	0.6 \pm 0.1	47.3 \pm 23.1 ^c	0.9 \pm 0.04	20.9 \pm 10.4 ^c
<i>D. polymorpha</i> ^a	1 \pm 0.2	55.5 \pm 7.4 ^c	1.1 \pm 0.2	23.6 \pm 5.2 ^c
<i>C. gigas</i> diploid ^b	3.4 \pm 0.2	52.4 \pm 9 ^c	3.2 \pm 0.4	40.7 \pm 3.8 ^c
<i>C. gigas</i> triploid ^b	2.6 \pm 0.3	41.4 \pm 7.5 ^c	2.4 \pm 0.1	61.2 \pm 5.2 ^c

^a*C. fluminea* and *D. polymorpha* were contaminated for 10 days. ^bDiploid or triploid *C. gigas* were contaminated for 14 days. ^cSignificantly different to control ($P < 0.05$). Cadmium determination was done in triplicate for each condition.

Table 2. Zinc concentrations (measured in nanomol per gram fresh weight \pm SE) in the whole soft body of bivalves after exposure to Cd, Zn, or Cd and Zn.

Species	Metal exposure, nmol Zn g ⁻¹ (fw)			
	None	Cd	Zn	Cd + Zn
<i>C. fluminea</i> ^a	309 \pm 34	323 \pm 16	1067 \pm 158 ^c	696 \pm 195 ^c
<i>D. polymorpha</i> ^a	72 \pm 20	98 \pm 69	1326 \pm 595 ^c	1154 \pm 249 ^c
<i>C. gigas</i> diploid ^b	4165 \pm 310	3871 \pm 368	13499 \pm 171 ^c	15266 \pm 955 ^c
<i>C. gigas</i> triploid ^b	3424 \pm 1042	4015 \pm 797	9266 \pm 847 ^c	11006 \pm 1540 ^c

^a*C. fluminea* and *D. polymorpha* were contaminated for 10 days. ^bDiploid or triploid *C. gigas* were contaminated for 14 days. ^cSignificantly different to control ($P < 0.05$). Zinc determination was done in triplicate for each condition.

297 In *C. fluminea*, *D. polymorpha*, and diploid *C.*
 298 *gigas*, there was a slight decrease in Zn accu-
 299 mulation factor after Cd and Zn exposure
 300 compared to that obtained after a single Zn
 301 exposure.

302 *CoxI* gene expression profiles of control and
 303 metal contaminated bivalves were then compared
 304 by quantitative real-time RT-PCR.

305 *Effects of cadmium on CoxI gene expression*

306 As shown in Figure 1, our experiments demon-
 307 strated for the first time that *CoxI* gene expression
 308 was up-regulated by Cd in the three different
 309 species. However, the induction factors were dif-
 310 ferent between each mollusk: although freshwater
 311 bivalves accumulated the same amount of Cd
 312 (Table 1), *CoxI* induction was 9.5-fold higher in
 313 Cd-exposed *D. polymorpha* than in Cd-exposed *C.*
 314 *fluminea* (Figure 1a). *CoxI* expression level also
 315 differed between diploid and triploid *C. gigas*,
 316 whereas the Cd concentration in tissues was simi-
 317 lar: a 4.8 ratio of triploid versus diploid *CoxI* gene
 318 expression was observed (Figure 1b).

Effects of cadmium on *CoxI* gene expression in presence of zinc

319
 320
 321 In each species, Zn alone did not significantly
 322 affect *CoxI* gene expression level; indeed induc-
 323 tion factors in *C. fluminea*, *D. polymorpha*, dip-
 324 loid *C. gigas*, and triploid *C. gigas* were
 325 0.1 \pm 0.1, 1 \pm 0.2, 1.3 \pm 0.3, and 0.1 \pm 0.1,
 326 respectively. When Cd and Zn were present in
 327 the water column, *CoxI* gene expression level
 328 was increased and induction factors in *C. flumi-*
 329 *nea*, *D. polymorpha*, diploid *C. gigas*, and trip-
 330 loid *C. gigas* were equal to 6 \pm 0.6, 4 \pm 0.2,
 331 2 \pm 0.2, and 14 \pm 2, respectively (Figure 1).
 332 Nevertheless, gene induction was significantly
 333 lower than after a single Cd contamination; it
 334 had decreased by 10- and 200-fold in *C. fluminea*
 335 and *D. polymorpha*, respectively (Figure 1a).
 336 *CoxI* gene expression was still higher in triploid
 337 oysters than in diploid (sevenfold) but *CoxI* gene
 338 induction level underwent a 3.5- and 2.4-fold
 339 decrease in diploid and triploid *C. gigas*
 340 (respectively) as compared with single Cd
 341 contamination (Figure 1b).

342 **Discussion**

343 We designed this study to establish a possible
344 relationship between Cd contamination and
345 expression of the mitochondrial gene *CoxI*. COXI
346 is the subunit one of the Cytochrome *c* oxydase
347 which provides a critical function during respira-
348 tion by transferring electrons from Cytochrome *c*
349 to oxygen and contributing to ATP generation
350 (Malatesta *et al.* 1995). Indeed it has been dem-
351 onstrated that a reduced level of COX activity
352 causes functional reduction in Na⁺-K⁺-ATPase
353 capacity, an important factor responsible for
354 neuronal death in the mammalian brain (Greena-
355 myre *et al.* 1999), and that complex IV inhibitors
356 cause a rapid and severe depletion of cellular ATP
357 content, resulting in acute cell death (Zhang *et al.*
358 2001).

359 In the present study, the first result of our
360 experiments showed that *CoxI* gene expression
361 was up-regulated in different aquatic organisms
362 after Cd exposure. Overexpression of *CoxI* has
363 been demonstrated associated with a pyrethroid
364 insecticide resistant strain of *Blatella germanica*
365 (German cockroach) (Pridgeon & Liu 2003) and in
366 *Danio rerio* (zebrafish) fed with diets contaminated
367 by methyl mercury (Gonzalez *et al.* 2005), but to
368 our knowledge, the direct relation between *CoxI*
369 expression and Cd contamination has never been
370 reported before. Although *CoxI* gene induction by
371 Cd is clear, no direct link was established between
372 Cd concentration in tissues and *CoxI* gene
373 expression level. Indeed, *CoxI* gene expression
374 level was 10 times higher in *D. polymorpha* than in
375 *C. fluminea*, whereas the Cd accumulation factor
376 was lower in *D. polymorpha* than in *C. fluminea*.
377 The finding of 4.8-times higher up-regulation of
378 *CoxI* gene expression in triploid than in diploid *C.*
379 *gigas* cannot be explained in a simple way by the
380 presence of an extra structural gene copy, as a
381 quantitative effect alone would be expected to be
382 in the order of 1.5, or even less if the background
383 expression is higher in the triploid due to the extra
384 gene copy. The expression level of a single gene in
385 a polyploid organism as compared to the diploid
386 one is hardly predictable. For instance, in cotton
387 (*Gossypium hirsutum*) the alcohol dehydrogenase
388 A (*adhA*) gene expression level in tetraploid leaves
389 is two times higher than in diploid ones whereas it
390 is two times lower in tetraploid roots than in dip-
391 loid ones. And the *adhD* gene is 10 times more

expressed in the diploid leaves and roots than in 392
tetraploid ones (Adams *et al.* 2003). This high- 393
lights the non-Mendelian mechanisms than often 394
occurs for gene expressions in polyploid organ- 395
isms. 396

As COX is considered as the rate-limiting step 397
for mitochondrial respiration (Villani & Attardi 398
2000), *CoxI* gene overexpression could be a com- 399
pensating mechanism to restore the decrease in 400
mitochondrial activity and to efficiently consume 401
O₂, thus limiting Cd induced damage in the cell. 402
Some of this damage is a consequence of increased 403
ROS production. Indeed, Cd stimulates ROS for- 404
mation in mitochondria because it blocks electron 405
transport, especially electron transfer through the 406
complex III which is considered as the principal 407
site for ROS generation (Chen *et al.* 2003; Wang 408
et al. 2004). Prevention of the slowing electron 409
flow can thus be considered as a mechanism to 410
avoid ROS production. For instance, an 411
increased activity of complex IV, causing the 412
depletion of electron rich intermediates, could 413
prevent Cd-promoted oxidative stress. Moreover, 414
Cytochrome *c* oxydase activity has been shown to 415
be higher in oxygen-tolerant HeLa cells than in the 416
control cells (Campian *et al.* 2004). 417

Another result of this study showed that *CoxI* 418
gene inducibility was lowered when bivalves were 419
contaminated with Cd and Zn compared with 420
single Cd contamination. Even for *D. polymorpha*, 421
this reduction of *CoxI* gene expression level could 422
not be explained only by a decrease in intracellular 423
Cd accumulation. Indeed, the ratio of *CoxI* gene 424
induction levels after Cd exposure versus after Zn 425
+ Cd exposure was 200 in *D. polymorpha* and 10 426
in *C. fluminea*, whereas the decrease in Cd accu- 427
mulation was similar for the two species. 428

Whereas Cd induced ROS production, Zn 429
was shown to have antioxidant properties. For 430
instance, it protected cultured skin cells against the 431
cytotoxic effects of UV irradiation and decreased 432
the production of ROS (Parat *et al.* 1997). More- 433
over, Zn added to a cell culture medium inhibited 434
Cd-induced ROS production (Szuster-Ciesielska 435
et al. 2000). These findings suggest that at least 436
one of the mechanisms involved in the protective 437
role of Zn against Cd-induced toxicity is connected 438
with inhibition of Cd-induced ROS formation in 439
cells. In our study, the decreased *CoxI* gene 440
expression level in bivalves contaminated with Cd 441
and Zn compared to those contaminated only with 442

443 Cd could be explained by a lower toxic effect of
 444 Cd. In any case, *CoxI* gene expression level was
 445 reduced in the presence of Zn but remained at least
 446 two times higher than in control animals (Fig-
 447 ure 1). Thus, *CoxI* gene expression level might
 448 constitute a new tool, in addition to metallothi-
 449 oneins and heat shock proteins levels, for detecting
 450 Cd contamination of both freshwater and marine
 451 sentinel organisms or for detecting Cd pollution
 452 from the river to the sea.

453 Acknowledgements

454 We would like to thank Gilles Durrieu for his help
 455 in statistical analysis.

456 References

457 Achard M, Baudrimont M, Boudou A, Bourdineaud J-P. 2004
 458 Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in
 459 the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals
 460 exposure. *Aquatic Toxicol* **67**, 347–357.
 461 Achard-Joris M, van den Berg van Saparoea HB, Driessen
 462 AJM, Bourdineaud J-P. 2005 Heterologously expressed
 463 bacterial and human multidrug resistance proteins confer
 464 cadmium resistance to *Escherichia coli*. *Biochemistry* **44**,
 465 5916–5922.
 466 Adams KL, Cronn R, Percifield R, Wendel JF. 2003 Genes
 467 duplicated by polyploidy show unequal contributions to the
 468 transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proc*
 469 *Natl Acad Sci USA* **100**, 4649–4654.
 470 Bagchi D, Joshi SS, Bagchi M, et al. 2000 Cadmium- and
 471 chromium-induced oxidative stress, DNA damage, and
 472 apoptotic cell death in cultured human chronic myelogenous
 473 leukemic K562 cells, promyelocytic leukemic HL-60 cells,
 474 and normal human peripheral blood mononuclear cells.
 475 *J Biochem Mol Toxicol* **14**, 33–41.
 476 Beyersmann D, Hechtenberg S. 1997 Cadmium, gene regula-
 477 tion, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol Appl*
 478 *Pharmacol* **144**, 247–261.
 479 Bray TM, Bettger WJ. 1990 The physiological role of zinc as an
 480 antioxidant. *Free Radical Biol Med* **8**, 281–291.
 481 Campbell PGC. 1995 Interactions between trace metals and
 482 aquatic organisms a critique of the free-ion activity model.
 483 In: Tessier A, Turner DR, eds. *Metal Speciation and Bio-*
 484 *availability in Aquatic Systems*. John Wiley & Sons; Chich-
 485 ester: pp. 45–102.
 486 Campian JL, Qian M, Gao X, Eaton JW. 2004 Oxygen toler-
 487 ance and coupling of mitochondrial electron transport.
 488 *J Biol Chem* **279**, 46580–46587.
 489 Capaldi RA. 1990 Structure and assembly of Cytochrome *c*
 490 oxidase. *Arch Biochem Biophys* **280**, 252–262.
 491 Capaldi RA, Malatesta F, Darley-USmar VM. 1983 Structure
 492 of Cytochrome *c* oxidase. *Biochim Biophys Acta* **726**,
 493 135–148.
 494 Carginale V, Capasso C, Scudiero R, Parisi E. 2002 Identifi-
 495 cation of cadmium-sensitive genes in the Antarctic fish

Chionodraco hamatus by messenger RNA differential dis-
 496 play. *Gene* **299**, 117–124.
 497
 498 Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ.
 2003 Production of reactive oxygen species by mitochondria:
 499 central role of complex III. *J Biol Chem* **278**, 36027–36031.
 500
 501 Company R, Serafim A, Bebianno MJ, Cosson R, Shillito B,
 Fiala-Medioni A. 2004 Effect of cadmium, copper and
 502 mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxi-
 503 dation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathy-*
modiolus azoricus. *Mar Environ Res* **58**, 377–381.
 504
 505 Gonzalez P, Dominique Y, Massabuau J-C, Boudou A,
 Bourdineaud J-P. 2005 Comparative effects of dietary
 506 methylmercury on gene expression in liver, skeletal muscle,
 507 and brain of the zebra fish (*Danio rerio*). *Environ Sci Technol*
 508 (in press).
 509
 510 Greenamyre JT, MacKenzie G, Peng TI, Stephans SE. 1999
 511 Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochem*
Soc Symp **66**, 85–97.
 512
 513 Ikediobi CO, Badisa VL, Ayuk-Takem LT, Latinwo LM, West
 J. 2004 Response of antioxidant enzymes and redox metab-
 514 olites to cadmium-induced oxidative stress in CRL-1439
 515 normal rat liver cells. *Int J Mol Med* **14**, 87–92.
 516
 517 Inza B, Ribeyre F, Maury-Brachet R, Boudou A. 1997 Tissue
 518 distribution of inorganic mercury, methylmercury and cad-
 519 mium in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) in relation to
 520 the contamination levels of the water column and sediment.
 521 *Chemosphere* **35**, 2817–2836.
 522
 523 Li ZS, Lu YP, Zhen RG, Szczypka M, Thiele DJ, Rea PA. 1997 A
 524 new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccha-*
romyces cerevisiae: YCF1-catalyzed transport of bis(gluta-
 525 thionato)cadmium. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 42–47.
 526
 527 Malatesta F, Antonini G, Sarti P, Brunori M. 1995 Structure
 528 and function of a molecular machine: Cytochrome *c* oxidase.
 529 *Biophys Chem* **54**, 1–33.
 530
 531 Marigomez I, Soto M, Cajaraville MP, Angulo E, Giamberini
 L. 2002 Cellular and subcellular distribution of metals in
 532 molluscs. *Microsc Res Tech* **56**, 358–392.
 533
 534 Parat MO, Richard MJ, Pollet S, Hadjir C, Favier A, Beani
 JC. 1997 Zinc and DNA fragmentation in keratinocyte
 535 apoptosis: its inhibitory effect in UVB irradiated cells.
 536 *J Photochem Photobiol* **37**, 101–106.
 537
 538 Pridgeon JW, Liu N. 2003 Overexpression of the Cytochrome *c*
 oxidase subunit I gene associated with a pyrethroid resistant
 539 strain of German cockroaches, *Blattella germanica* (L.).
 540 *Insect Biochem Mol Biol* **33**, 1043–1048.
 541
 542 Roesijadi G, Hansen KM, Unger ME. 1996 Cadmium-induced
 543 metallothionein expression during embryonic and early lar-
 544 val development of the mollusc *Crassostrea virginica*. *Toxicol*
Appl Pharmacol **140**, 356–363.
 545
 546 Szuster-Ciesielska A, Stachura A, Slotwinska M, et al. 2000
 The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell
 547 apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in
 548 cell cultures. *Toxicology* **145**, 159–171.
 549
 550 Turrens JF. 1997 Superoxide production by the mitochondrial
 respiratory chain. *Biosci Rep* **17**, 3–8.
 551
 552 Villani G, Attardi G. 2000 In vivo control of respiration by
 553 Cytochrome *c* oxidase in human cells. *Free Radical Biol Med*
29, 202–210.
 554
 555 Waalkes MP, Coogan TP, Barter RA. 1992 Toxicological
 556 principles of metal carcinogenesis with special emphasis on
 557 cadmium. *Crit Rev Toxicol* **22**, 175–201.
 558
 559 Wang Y, Fang J, Leonard SS, Krishna Rao KM. 2004 Cadmium
 inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxy-
 560 gen species. *Free Radical Biol Med* **36**, 1434–1443.

560	Yakes FM, Van Houten B. 1997 Mitochondrial DNA damage	Zhang J-G, Tirmenstein MA, Nicholls-Grzemeski FA, Fariss MW.	565
561	is more extensive and persists longer than nuclear DNA	2001 Mitochondrial electron transport inhibitors cause lipid	566
562	damage in human cells following oxidative stress. <i>Proc Natl</i>	peroxidation-dependent and -independent cell death: protec-	567
563	<i>Acad Sci USA</i> 94 , 514-519	tive role of antioxidants. <i>Arch Biochem Biophys</i> 393 , 87-96.	568
564			569

RESUME

Le potentiel de réponse des métallothionéines (MTs) à l'égard de la bioaccumulation du cadmium (Cd) et du zinc (Zn) a été étudié pour trois espèces de mollusques bivalves, *Corbicula fluminea*, *Dreissena polymorpha* et *Crassostrea gigas*, dans un contexte environnemental de pollution polymétallique, en amont et en aval du *continuum* fluvio-estuarien "Lot / Garonne / estuaire de la Gironde". Ces travaux de recherche ont reposé sur des études menées conjointement sur le terrain, à partir de transplantations *in situ*, et en conditions contrôlées de laboratoire, après exposition au Cd et au Zn, isolément et en mélange.

Les objectifs étaient (i) de caractériser la réponse protéique des MTs chez les trois espèces de bivalves en fonction des facteurs abiotiques et de contamination rencontrés en milieu naturel ; (ii) d'explorer l'influence de la présence d'un troisième jeu de chromosomes chez *C. gigas* (triploïdie) d'un point de vue physiologique (cycle de reproduction) et génétique ; (iii) de définir la capacité de biosynthèse protéique et d'expression des gènes de MTs disponibles chez *D. polymorpha* et *C. gigas*, en fonction de chaque métal.

Les résultats ont mis en évidence des différences interspécifiques majeures en termes de sensibilité de la réponse MTs face à la contamination métallique, notamment vis-à-vis du Zn. Des interactions métalliques ont été observées sur la bioaccumulation uniquement chez les deux bivalves d'eau douce, avec néanmoins la même induction des MTs pour les métaux considérés isolément et en mélange, et ceci pour les trois espèces. Chez *C. gigas*, la triploïdie a montré n'exercer aucune influence sur la bioaccumulation du Cd et du Zn et sur la production de MTs. Seuls les facteurs liés à la reproduction se sont révélés être une source de variation des concentrations de MTs chez les individus diploïdes. L'analyse de l'expression des trois gènes de MTs clonés chez *C. gigas* a permis de révéler une induction différentielle de chacun d'eux en fonction du métal considéré.

Mots clés : métallothionéines, bioaccumulation, cadmium, zinc, *Corbicula fluminea*, *Dreissena polymorpha*, *Crassostrea gigas*, triploïdie, terrain / laboratoire.

ABSTRACT

The potential of the metallothioneins (MTs) response with regard to the bioaccumulation of cadmium (Cd) and zinc (Zn) was studied for three bivalve species, *Corbicula fluminea*, *Dreissena polymorpha* and *Crassostrea gigas*, in an environmental context of polymetallic pollution, upstream and downstream from the fluvio-estuarine *continuum* "Lot / Garonne / Gironde estuary". The research were based on studies conducted jointly in the field, by *in situ* transplantation, and under controlled conditions in the laboratory, after single and combined Cd and Zn exposures.

The objectives were (i) to characterize the MTs proteic response in the three bivalve species according to abiotic and contamination factors encountered in the field; (ii) to explore the influence of a third set of chromosomes in *C. gigas* (triploidy) from a physiologic (reproductive cycle) and genetic point of view; (iii) to define the capacity of biosynthesis and gene expression of MTs in *D. polymorpha* and *C. gigas*, in function of each metal.

The results highlighted major inter-specific differences in term of sensitivity of the MT response according to the metallic contamination factors, notably with regard to Zn. Metal interactions were observed on the bioaccumulation only in the two freshwater bivalves, with nevertheless the same MT induction in both case of single or combined exposures, for the three studied species. In *C. gigas*, no influence of triploidy was shown on Cd and Zn bioaccumulation and on MT production. Only the factors linked to the reproductive cycle were revealed to be a source of variation in MT concentrations in diploid individuals. The expression analysis of the three cloned MT genes in *C. gigas* allowed to reveal a differential induction of them in function of the considered metal.

Keywords: metallothioneins, bioaccumulation, cadmium, zinc, *Corbicula fluminea*, *Dreissena polymorpha*, *Crassostrea gigas*, triploidy, field / laboratory.