

Utilisation des métallothionéines comme biomarqueur de la contamination métallique : variabilité entre sites et organes chez l'huître *Crassostrea gigas*

Florence GERET, Richard P. COSSON *

Laboratoire de Biologie Marine, ISOMer, université de Nantes, BP 92 208, 44035 Nantes cedex 31, France

Reçu le 25 mars 1999; reçu et accepté le 22 octobre 1999

Abstract – The use of metallothioneins as biomarker of metal contamination: variability between sites and organs in the oyster *Crassostrea gigas*. Heavy metals (Cd, Cu, Hg and Zn) and metallothionein levels were determined in oysters *Crassostrea gigas* from two sites: the Gironde Estuary (contaminated site) and Bourgneuf Bay (uncontaminated site). Metallothionein levels led us to suspect the presence of cadmium in the environment when quantified in the gills. Soluble cadmium and metallothioneins were positively correlated in the digestive gland of oysters from Gironde (contaminated site), but metallothionein levels in this organ were not significantly different from levels observed in the digestive gland of oysters from Bourgneuf Bay (uncontaminated site). Conversely, no correlation was noticed between metals and metallothioneins in the gills of oysters from Gironde despite metallothionein levels significantly higher than levels observed in oyster gills from Bourgneuf Bay. This significant difference of metallothionein levels is attributed to a higher ratio of soluble metals (Cd, Cu, Zn) in the gills of oysters from Gironde. The generalization of the use of metallothioneins as biomarkers of metal contamination of aquatic environments is questioned. © 2000 Ifremer/CNRS/IRD/Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

metallothioneins / metals / *Crassostrea gigas* / biomarker

Résumé – Chez *Crassostrea gigas*, les teneurs en zinc, cuivre et cadmium dans les huîtres de Gironde sont significativement supérieures à celles des huîtres de la baie de Bourgneuf. Cadmium soluble et métallothionéines sont corrélés positivement dans la glande digestive des huîtres prélevées en Gironde (site contaminé). Pour autant, les teneurs en métallothionéines dans cet organe ne sont pas significativement différentes de celles d'huîtres de la baie de Bourgneuf (site de référence). À l'opposé, il n'y a pas de corrélation entre métaux et métallothionéines dans les branchies des huîtres de Gironde, mais leurs teneurs en métallothionéines sont significativement supérieures à celles des huîtres de la baie de Bourgneuf. L'augmentation significative des teneurs en métallothionéines est liée à une proportion plus importante des métaux (Cd, Cu, Zn) sous forme soluble dans les branchies des huîtres de Gironde. Chez l'huître *Crassostrea gigas*, les niveaux de métallothionéines dans les branchies permettent de préjuger de la présence de cadmium dans le milieu. © 2000 Ifremer/CNRS/IRD/Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

métallothionéines / métaux / *Crassostrea gigas* / biomarqueur

* Correspondance et tirés à part : cosson@isomer.univ-nantes.fr

1. INTRODUCTION

Les métallothionéines, protéines soufrées de faible masse moléculaire, jouent un rôle primordial dans la régulation des teneurs internes en métaux essentiels (Cu, Zn) et la détoxification des métaux non-essentiels (Ag, Cd, Hg) [34, 41]. Leur ubiquité dans le règne animal, ainsi que l'induction expérimentale de leur synthèse par les métaux précités en font des biomarqueurs potentiels de la contamination de l'environnement [18, 35]. Cette utilisation repose sur l'existence d'une corrélation entre les concentrations métalliques dans le milieu et leur propre abondance dans les tissus des organismes qui y vivent [14, 15]. Cette relation a été mise en évidence expérimentalement chez de nombreuses espèces [7].

Dans les milieux aquatiques, les processus qui gouvernent la bio-accumulation des métaux dans les organismes sont variables et complexes [22]. Pour que les métallothionéines soient retenues comme biomarqueurs d'exposition aux métaux, elles doivent répondre à des critères définis par Stegeman et al. [36]. En particulier, la relation évoquée plus haut ne doit pas être perturbée par des facteurs intrinsèques ou extrinsèques susceptibles de modifier les niveaux de métallothionéines dans l'organisme-test. Il est donc nécessaire de valider in situ la corrélation métallothionéines/concentrations métalliques et son indépendance vis-à-vis des facteurs biotiques et abiotiques qui gouvernent la bio-accumulation des métaux. Malgré la difficulté à identifier, en milieu naturel, l'influence individuelle de tels facteurs, nous disposons actuellement, chez les mollusques, de données relatives à l'influence de la saison, de la salinité, du site géographique, de l'âge, de la taille/masse, de l'organe, du sexe, de la maturité sexuelle [2, 7, 14, 15, 20, 27,

Tableau I. Poids moyen des différents organes des huîtres prélevées en Gironde et en baie de Bourgneuf. Les moyennes sont exprimées en mg (poids frais) suivies de l'écart-type.

Table I. Mean weight (mg wet weight, standard deviation in brackets) of gills, digestive gland and remainders in oysters from Gironde and Bourgneuf Bay.

	Gironde	Bourgneuf
Branchies	485,6 (152,6)	608,3 (135,0)
Glande digestive	436,6 (138,5)	277,1 (88,3)
Restes	2001,7 (904,7)	1053,3 (289,7)

32]. La variabilité et la complexité observées pour la bio-accumulation des métaux se retrouve pour l'induction de la synthèse des métallothionéines dans les différents tissus des mollusques en réponse à la présence de ces métaux dans leur environnement [16, 22]. S'il a été établi que les métallothionéines pouvaient être utilisées comme biomarqueurs chez une espèce donnée, peut-on, pour autant, en généraliser l'usage sans vérifier au préalable qu'elles répondent aux critères évoqués plus haut ? C'est dans cette optique que nous avons comparé les teneurs en métallothionéines d'huîtres (*Crassostrea gigas*) provenant de deux sites ostréicoles différents par leur charge métallique. La baie de Bourgneuf, au sud de l'estuaire de la Loire, est une importante région conchylicole souvent retenue comme zone témoin ($20 \text{ ng}\cdot\text{Cd}\cdot\text{L}^{-1}$) [11] dans les études de notre laboratoire [1]. À l'opposé, l'estuaire de la Gironde est chroniquement contaminé par le cadmium ($100 \text{ à } 400 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) à la suite d'apports d'anciennes activités minières et industrielles sur ses affluents [8]. C'est une zone privilégiée pour l'étude des relations métaux/métallothionéines qui a servi de site atelier pour l'étude de l'impact de certains facteurs naturels sur les teneurs en métaux et métallothionéines des huîtres autochtones [27]. L'étude comparative à une échelle géographique plus large que nous développons ici, répond à une finalité complémentaire, puisqu'il s'agit de mettre en évidence l'existence d'une différence entre les teneurs en métallothionéines de cette population exposée et celles d'une population non exposée, en relation avec la bio-accumulation différentielle du cadmium.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Dix huîtres *Crassostrea gigas* Thunberg ont été prélevées au cours du mois de novembre 1995 dans la baie de Bourgneuf (Bouin) et dix dans l'estuaire de la Gironde (Le Cheyzin) au cours de l'étude de Mouneyrac et al. [27]. À cette époque de l'année, les gonades sont au repos. La taille moyenne des coquilles des huîtres de Bourgneuf était de 52 mm contre 84 mm pour les huîtres de Gironde. Les bivalves ont été conservés à $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ jusqu'à leur dissection. Les poids moyens des différents organes des huîtres prélevées en baie de Bourgneuf et en Gironde sont indiqués dans le *tableau I*.

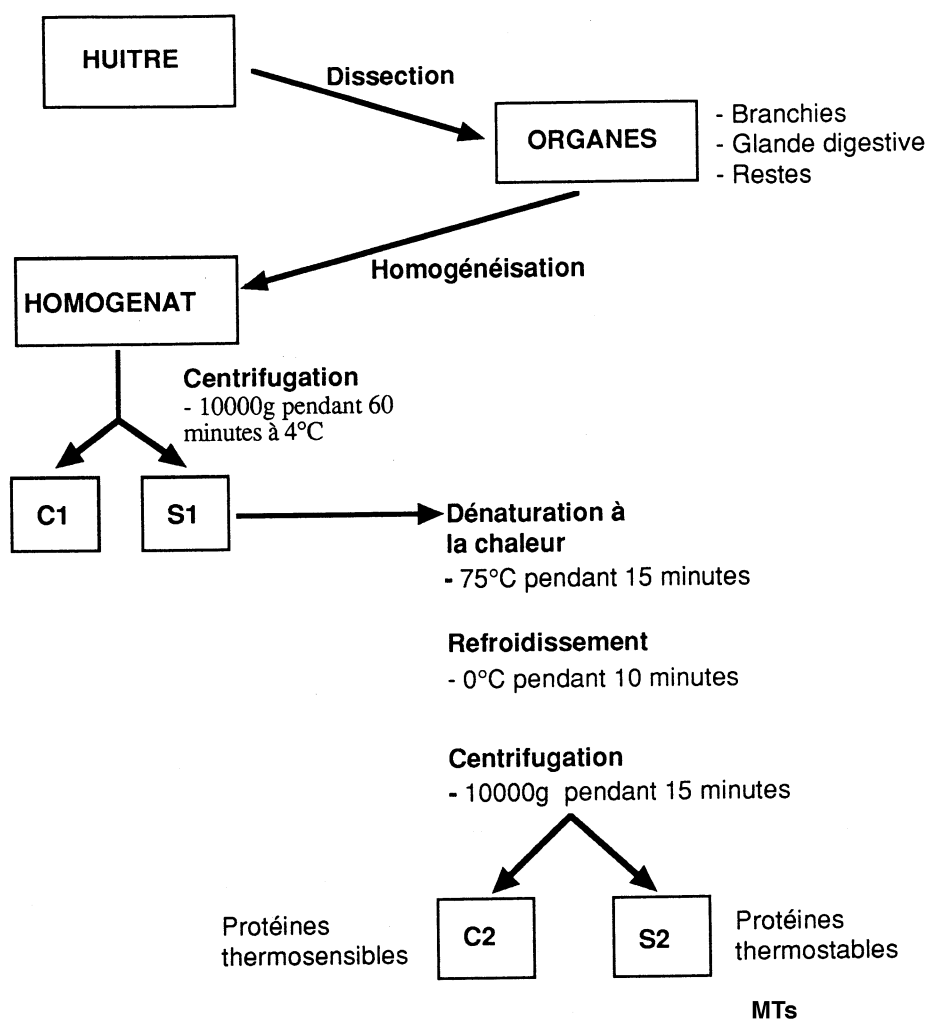


Figure 1. Protocole de préparation des échantillons pour le dosage des métallothionéines par la méthode polarographique. Le culot C1 contient les métaux associés à des composés insolubles (membranes, organites cellulaires, granules et cristaux, etc.). Le surnageant contient les métaux associés à des composés solubles, en majorité des protéines. Le culot C2 résulte de la précipitation des protéines thermolabiles. Le surnageant, S2, contient les protéines stables à la chaleur, dont les métallothionéines.

Figure 1. Protocol of sample preparation for metallothionein quantification by the polarographic method. The C1 pellet contains metals associated with insoluble compounds (membranes, cellular organites, granules and crystals). The S1 supernatant contains metals associated with soluble compounds, largely proteins. The C2 pellet results from non heat-stable protein precipitation. The S2 supernatant contains heat-stable proteins, including metallothioneins.

2.1. Préparation des échantillons

Chaque huître a été disséquée pour séparer les branchies et la glande digestive du reste des tissus mous. Les trois parties ainsi obtenues ont été pesées puis homogénéisées à 4 °C au moyen d'un broyeur électrique dans un tampon Tris (20 mM), NaCl (150 mM), β-mercaptoéthanol (10 mM) à pH 8,6

contenant de la leupeptine (20 μM), de l'aprotinine (2 μM) et de la benzamidine (100 μM). Les homogénats obtenus ont été centrifugés à 10 000 g à 4 °C pendant 1 h. Des aliquotes des surnageants (S1) ainsi obtenus ont été placés 15 min à 75 °C puis dans la glace pendant 10 min. Les protéines thermosensibles ont été séparées des protéines thermostables par centrifugation à 10 000 g pendant 15 min (*figure 1*).

Les surnageants (S2) contenant les protéines thermorésistantes dont les métallothionéines ont été ensuite congelés à -20°C jusqu'à leur analyse.

2.2. Analyse des métaux

Les surnageants (S1) et culots (C1) de chaque partie anatomique homogénéisée ont subi une digestion nitrique (6 h à 60°C pour minimiser les pertes de mercure) avant l'analyse des métaux. Le dosage du mercure total a nécessité une seconde digestion par le permanganate de potassium selon la méthode préconisée par Thibaud [39] et modifiée par Cosson et al. [12]. Les teneurs globales des organes ont été calculées pour chaque individu à partir des teneurs des fractions solubles et insolubles.

Deux techniques spectrophotométriques ont été utilisées pour quantifier les métaux présents dans les matrices acides obtenues :

- la spectrophotométrie d'absorption atomique sur vapeur froide pour le dosage du mercure total ;
- la spectrophotométrie d'absorption atomique en flamme ou électrothermique avec correction par effet Zeeman pour le dosage des autres métaux (Cd, Cu, Zn).

La verrerie utilisée a trempé dans l'acide chlorhydrique à 10 %, a été rincée trois fois à l'eau déminéralisée et séchée dans des dessiccateurs à l'abri de la poussière.

Les méthodes analytiques sont validées régulièrement par des exercices d'intercalibration [27].

Les teneurs en métaux sont exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids frais.

Les très faibles teneurs en mercure des fractions solubles et insolubles des huîtres de Bourgneuf (site non contaminé) n'ont pu être déterminées avec le protocole analytique utilisé.

2.3. Quantification des métallothionéines

La quantification des métallothionéines a été réalisée par polarographie à impulsions différentielles selon la méthode décrite par Olafson et Sim [28], modifiée par Thompson et Cosson [40]. Les analyses ont été ef-

fectuées avec un analyseur PAR 174A et une électrode EG&G PARC 303A en mode SMDE.

La détection électrochimique des métallothionéines s'effectue dans un tampon ammoniacé contenant du cobalt (qui catalyse la réduction du groupement thiol des cystéines) et dont la composition a été mise au point par Brdicka [9]. La technique des ajouts dosés de métallothionéine standard de foie de lapin (ref 7641, Sigma) permet d'obtenir une droite d'étalonnage à partir de laquelle seront déterminées les concentrations inconnues.

Les teneurs en métallothionéines sont exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids frais.

La quantification des métallothionéines dans des homogénats de tissus dénaturés à la chaleur par polarographie est une technique largement utilisée depuis son apparition [28] et l'optimisation des conditions analytiques à appliquer à la nouvelle génération d'électrode à goutte de mercure [40]. Elle est très fréquemment utilisée pour les bivalves [5, 6, 31]. La spécificité de cette technique analytique a été confirmée par l'examen chromatographique (perméation de gel et échange d'ions) de pics actifs d'un point de vue polarographique [29]. Elle a été validée par des essais comparatifs avec d'autres méthodes de dosage des métallothionéines [19, 30] et elle est reconnue comme une méthode fiable [37].

2.4. Analyse statistique

Nous avons réalisé des tests de comparaisons de moyenne représentés par le PLSD de Fisher et le F de Scheffé en Anova factorielle en utilisant le logiciel StatView. Le risque était de 5 %.

3. RÉSULTATS

3.1. Teneurs en métaux

Que les huîtres proviennent du site contaminé (Gironde) ou du site de référence (Bourgneuf), la hiérarchie des parties anatomiques est la même pour les teneurs totales en métaux, à savoir : glande digestive > branchies > restes (*figure 2*). En Gironde, la teneur moyenne en cadmium de la glande digestive

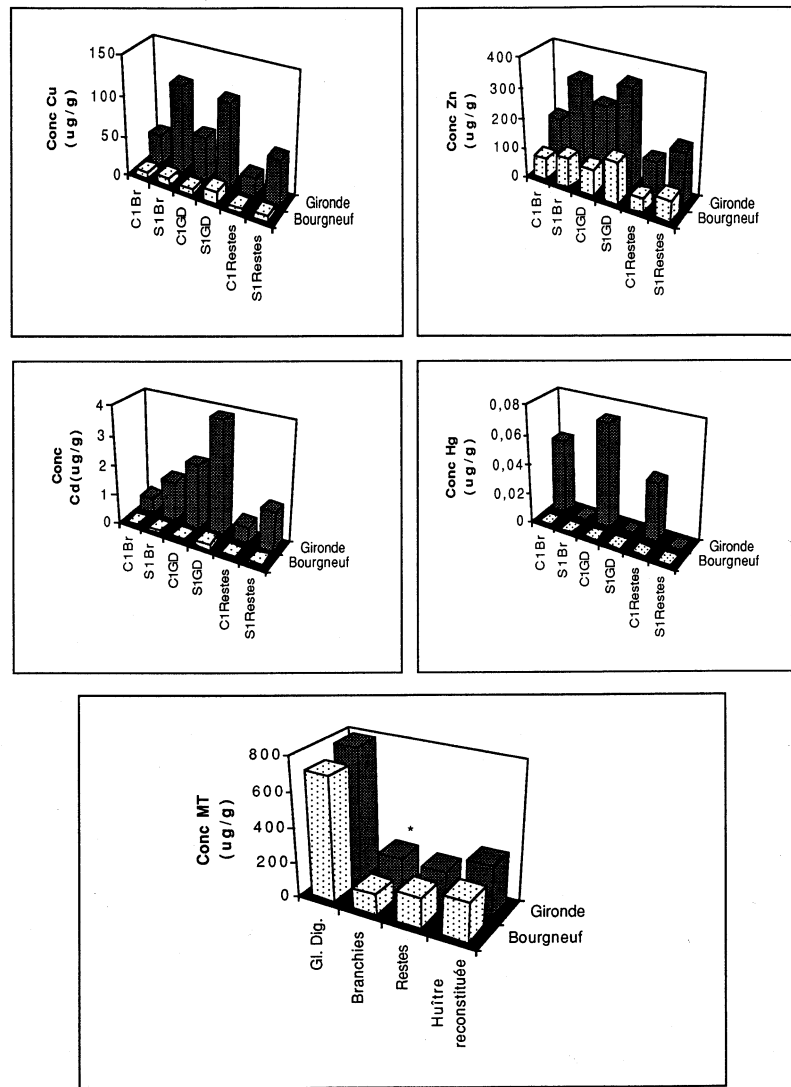


Figure 2. Comparaison des teneurs moyennes en métaux (cuivre, zinc, cadmium et mercure) et métallothionéines des différents tissus d'huîtres prélevées en Gironde (site contaminé) et en baie de Bourgneuf (site propre). Les teneurs sont exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids frais. Br : branchies ; GD ou Gl. Dig : glande digestive. C1 : culot obtenu après centrifugation de l'homogénat de tissus, il contient les métaux associés à des composés insolubles. S1 : surnageant obtenu après centrifugation de l'homogénat de tissus ; il contient les métaux associés à des composés solubles. Les métallothionéines (MT) ont été quantifiées par polarographie dans les surnageants (S2) obtenus après dénaturation à la chaleur, puis centrifugation, des surnageants (S1). * : différence significative entre les deux sites.

Figure 2. Comparison between metal (copper, zinc, cadmium and mercury) and metallothionein levels in various tissues of oysters from Gironde (contaminated site) and Bourgneuf bay (uncontaminated site). Levels are expressed as $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ wet weight. Br: gills, GD or Gl. Dig: digestive gland, C1: pellet obtained after centrifugation of the tissue homogenate, it contains metals associated with insoluble compounds. S1: supernatant obtained after centrifugation of the tissue homogenate, it contains metals associated with soluble compounds. Metallothionein (MT) quantification was performed by using the polarographic method, applied to S2 supernatants obtained after heat denaturation and centrifugation of S1 supernatants. *: significant difference between both sites at the 95 % level.

Tableau II. Teneurs globales (branchies+glande digestive+restes) en métaux des huîtres prélevées en Gironde (site contaminé) et en baie de Bourgneuf (site propre). Les moyennes sont exprimées en μg de métal par g de poids frais suivies de l'écart-type. ND : non détecté.

Table II. Metal levels ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ wet weight, standard deviation in brackets) in oysters from Gironde (contaminated site) and Bourgneuf bay (uncontaminated site). ND: undetected.

	Cadmium	Cuivre	Mercure	Zinc
Bourgneuf	0,14 (0,02)	15,0 (2,8)	ND	148,8 (47,8)
Gironde	2,6 (0,5)	123,9 (40,5)	0,05 (0,01)	389,0 (32,5)

est trois fois plus forte que celle des branchies, alors qu'à Bourgneuf l'écart n'est que de 1,8 entre les deux organes.

Les teneurs métalliques dans la masse molle totale (branchies + glande digestive + restes) des huîtres de Gironde sont beaucoup plus fortes que celles des huîtres de Bourgneuf (*tableau II*). En moyenne, elles sont trois fois plus élevées pour le zinc, sept à neuf fois plus élevées pour le cuivre et treize à vingt cinq fois plus élevées pour le cadmium. Les coefficients de variations sont faibles et traduisent l'homogénéité des teneurs des différents tissus pour chacun des sites échantillonnés.

Aux deux sites, les restes contiennent plus de métaux en valeur absolue que les branchies ou la glande digestive. Cette hiérarchie différente de celle des teneurs s'explique par les rapports massiques des différentes parties anatomiques étudiées. Cependant, en Gironde, les très fortes teneurs en cadmium de la glande digestive font que cet organe contient plus de métal que les branchies.

3.2. Compartimentation des métaux

Dans les huîtres de Gironde, le mercure est le seul métal en majorité associé à des composés insolubles (C1).

Dans les branchies, les pourcentages de métaux associés à la fraction soluble sont plus élevés pour les huîtres de Gironde (*tableau III*). C'est aussi le cas du cadmium et du cuivre dans les restes, mais aucune différence n'est notée pour le zinc dans ces tissus. À l'inverse, le pourcentage de zinc associé à la fraction soluble de la glande digestive est plus élevé chez les huîtres de Bourgneuf alors que les pourcentages de cadmium et de cuivre sont équivalents pour les deux sites (*tableau III*).

3.3. Teneurs en métallothionéines

Aux deux sites, les teneurs moyennes les plus élevées se rencontrent dans la glande digestive. Un facteur quatre existe entre la teneur moyenne de cet organe et celles des autres parties anatomiques. Les faibles coefficients de variation traduisent une faible variation entre individus pour un tissu dans un site donné. L'analyse statistique montre qu'il n'y a pas de différence significative des teneurs en métallothionéines dans les glandes digestives et les restes des huîtres de Gironde ou de Bourgneuf (respectivement $783/713 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ et $185/173 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). À l'inverse, les teneurs en métallothionéines des branchies des huîtres du site contaminé (Gironde) sont significativement supérieures à celles observées à Bourgneuf.

La glande digestive est aussi la partie anatomique qui contient le plus de métallothionéines, malgré sa masse faible comparativement aux restes qui précèdent les branchies dans ce classement.

Tableau III. Pourcentage des métaux solubles (cadmium, cuivre et zinc) dans les différents organes des huîtres prélevées au site contaminé (Gironde) et au site propre (Bourgneuf).

Table III. Percentage of soluble metals (cadmium, copper and zinc) of oysters from Gironde (contaminated site) and Bourgneuf (uncontaminated site).

		Cadmium	Cuivre	Zinc
Bourgneuf	Branchies	64	61	58
	Glande digestive	66	67	61
	Restes	59	60	60
Gironde	Branchies	72	74	66
	Glande digestive	64	66	57
	Restes	70	71	60

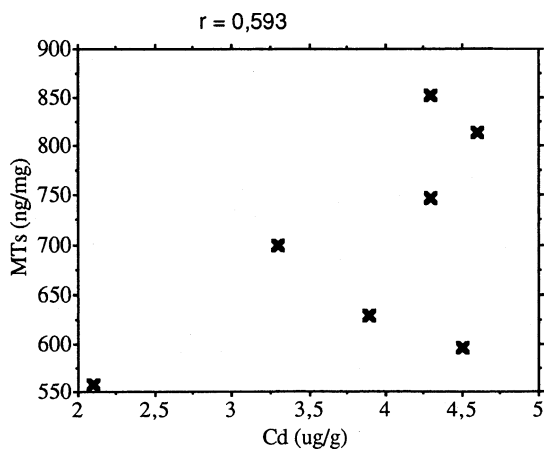


Figure 3. Teneurs en métallothionéines ($\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$) en fonction de la teneur en cadmium ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) dans la glande digestive des huîtres prélevées en Gironde.

Figure 3. Relation between metallothionein levels ($\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$) and cadmium levels ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) into digestive gland of oysters from contaminated site (Gironde).

3.4. Relation métaux/métallothionéines

Seule la glande digestive des huîtres prélevées en Gironde présente une corrélation positive entre teneur en cadmium et teneur en métallothionéines (figure 3). Dans les autres organes de ces mêmes huîtres, aucune corrélation n'est mise en évidence. C'est également le cas dans les différents organes des huîtres de la baie de Bourgneuf.

4. DISCUSSION

Les teneurs en métaux des huîtres entières que nous avons prélevées en baie de Bourgneuf ou en Gironde sont en accord avec les teneurs moyennes publiées par le Réseau national d'observation pour ces deux sites [33], mais légèrement plus faibles. Les valeurs du Réseau National d'Observation (R.N.O.) correspondent à une moyenne sur plusieurs années (1979–1993) et intègrent les fluctuations saisonnières. Les nôtres correspondent seulement au mois de novembre 1995. Amiard et al. [3] ont montré qu'aux deux sites étudiés, à cette date, les teneurs en métaux de moules (*Mytilus edulis*) étaient plus faibles qu'en mai 1997. La légère différence observée repose donc sur la comparaison d'une étude ponctuelle avec une étude à un long terme (quatorze ans). Nos résultats confir-

ment une bio-accumulation plus importante des métaux étudiés chez les huîtres de Gironde que chez celles de Bourgneuf, comme montré précédemment par les données du R.N.O. [33] et par Amiard et al. [3] chez *M. edulis*. L'influence de la taille des organismes sur les niveaux des métaux quantifiés dans leurs tissus a été étudiée [10]. Quant à la bio-accumulation du cadmium, l'âge et la croissance ont des effets opposés. Le cadmium s'accumule dans les tissus au cours du temps, mais la masse des tissus augmentant avec la croissance, il y a un effet de dilution. Cependant, la relation teneur en métal/taille de l'organisme dépend du niveau d'exposition. Dans les moules *Mytilus edulis*, mollusques bivalves comme les huîtres, dans les environnements contaminés il y a une nette accumulation chez les individus âgés, alors que dans les environnements peu contaminés cette relation n'est pas significative [10]. Bien que les huîtres de Bourgneuf soient plus petites que celles de Gironde nous pensons donc qu'elles peuvent être comparées. D'autre part, dans l'estuaire de la Gironde, Mouneyrac et al. [27] ont mis en évidence, chez les huîtres, un effet de dilution des métaux avec la taille. Une comparaison avec des huîtres de petite taille prélevées en Gironde aurait donc mis en évidence une différence encore plus importante au niveau des teneurs en cadmium des tissus.

L'organotropisme des métaux est semblable pour les deux sites. Il souligne le rôle prépondérant de la glande digestive dans le métabolisme des métaux, indépendamment de leur teneur dans le milieu. Cette prépondérance a déjà été mise en évidence par Viarengo et al. [42] chez *Adamussium colbecki*, *Pecten jacobaeus* et *Mytilus galloprovincialis*, par Martincic et al. [23–25] chez *Ostrea edulis*, par Mouneyrac et al. [27] pour des huîtres (*C. gigas*) de Gironde échantillonnées sur trois sites différents. La plus forte abondance des métaux dans les tissus des huîtres de Gironde est le reflet de leur exposition à un milieu contaminé.

L'association préférentielle d'un métal avec des composés intracellulaires solubles ou insolubles résulte d'interactions entre facteurs intrinsèques et extrinsèques dont la complexité et la variabilité chez les bivalves sont loin d'être élucidées. Malgré de nombreuses contradictions, les données expérimentales ou les observations de terrain ont permis d'avancer quelques hypothèses concernant les mécanismes qui

gouvernent cette distribution [7, 15, 20–22, 27, 32, 38, 42]. Malheureusement, ces hypothèses ne sont vérifiées, le plus souvent, que pour une espèce, pour un organe et pour un métal donnés, dans un site ou des conditions expérimentales donnés. Les facteurs extrinsèques agissent sur la biodisponibilité des métaux. Leurs variations sont souvent liées à la saison (salinité, température, nourriture, etc.). Les facteurs intrinsèques peuvent être indépendants de la saison (âge, sexe, etc.) ou pas (maturité sexuelle, poids, etc.) et donc sous la dépendance des facteurs extrinsèques.

Le mercure, faiblement bio-accumulé en Gironde, est essentiellement présent sous forme insoluble dans les tissus analysés, donc peu ou pas associé aux métallothionéines. En revanche, les autres métaux sont liés en majorité à des composés solubles, cette proportion étant plus forte chez les individus de Gironde que chez ceux de Bourgneuf, en particulier dans les branchies. Ceci est en accord avec la conclusion développée par Johansson et al. [20] selon laquelle les teneurs en métaux cytosoliques refléteraient celles des tissus totaux. En considérant l'organisme entier, Mouneyrac et al. [27] montrent que ces pourcentages élevés de métaux solubles ne varient pas avec le poids de l'animal lorsque l'étude porte sur des petites et des grandes huîtres collectées à différents sites de la Gironde. En revanche, une différence apparaît entre petites et grandes huîtres collectées sur un même site, mais uniquement pour le zinc cytosolique, son pourcentage étant plus élevé chez les grandes huîtres. Dans notre étude, les huîtres de Bourgneuf, plus petites que celles de Gironde, présentent un pourcentage de zinc cytosolique plus élevé mais uniquement dans la glande digestive. Martoja et Martoja [26] associent les plus forts pourcentages de zinc insoluble observés dans la glande digestive à l'âge. Les formes insolubles des métaux augmenteraient avec le temps, transformant la glande digestive en organe de stockage du zinc. Cela expliquerait notre observation, les huîtres de Gironde, plus grandes, étant aussi plus âgées.

Cette étude met en évidence de plus fortes teneurs en métaux (Cd, Cu, Zn) dans les huîtres prélevées en milieu contaminé et leur association préférentielle avec des ligands intracellulaires solubles. Les teneurs en métallothionéines (ligands solubles des métaux) ne sont pas, pour autant, systématiquement plus élevées

dans toutes les parties anatomiques étudiées. Il existe une corrélation positive entre cadmium soluble et teneur en métallothionéines dans la glande digestive des huîtres de Gironde, ce qui reflète la prise en charge de ce métal par ces protéines et leur implication dans sa détoxification. Des observations du même ordre ont été rapportées par Bordin et al. [7] pour *Macoma balthica*. En revanche, pour cet organe, nous n'observons pas d'augmentation significative du niveau de métallothionéines chez les individus exposés (Gironde) par rapport aux individus témoins (Bourgneuf). Les phénomènes de substitution d'un métal par un autre dans les molécules de métallothionéines sont connus et même utilisés pour les quantifier [13, 17]. Dans la glande digestive des huîtres de Gironde, le cadmium se substituerait au zinc dans les molécules de métallothionéines, ce dernier étant alors stocké sous forme insoluble. À l'opposé, même s'il n'a pas été possible de mettre en évidence une corrélation entre métaux et métallothionéines dans cet organe, il y a une augmentation significative des teneurs en métallothionéines dans les branchies des huîtres de Gironde, comparées à celles de Bourgneuf. Les plus fortes teneurs en métallothionéines sont à rapprocher des plus fortes teneurs globales en métaux et, plus particulièrement, à la prise en charge préférentielle de ces métaux au niveau du cytosol. Dans les restes, la différence observée pour les teneurs en métaux (plus élevées en Gironde) ne se traduit pas par une différence des teneurs en métallothionéines, bien que, là aussi pour le cuivre et le cadmium, les pourcentages de métaux cytosoliques soient plus élevés.

La salinité plus faible de la Gironde (15 à 25‰) par rapport à celle de la baie de Bourgneuf (30 à 35‰) favorise la bio-accumulation des métaux, comme l'a montré Roesijadi [35] chez *Crassostrea virginica*, et uniquement celle du cadmium dans le cas de *C. gigas* le long d'un gradient dans l'estuaire de la Gironde mise en évidence par Mouneyrac et al. [27]. En revanche, dans la même étude, ces derniers montrent que les différences de salinité n'influent pas sur les teneurs en métallothionéines chez cette espèce, comme l'ont aussi montré Amiard-Triquet et al. [4] pour *Macoma balthica* et *Mytilus edulis* prélevées dans divers estuaires arctiques. Une relation inverse entre poids et teneur en métallothionéines a été mise en évidence chez des bivalves dans ces deux derniers articles, en relation sans doute avec l'influence du

pois sur les teneurs en métaux. Dans le cas étudié ici, les organismes les plus grands (lourds) présentent les teneurs en métaux et en métallothionéines les plus élevées, montrant que l'influence du niveau de contamination du milieu l'emporte sur ce facteur intrinsèque.

Cette comparaison entre métaux et métallothionéines chez des huîtres vivant dans des milieux aux contenus métalliques très différents met en évidence l'existence de réponses spécifiques aux tissus analysés.

Les restes, dont les teneurs en métaux sont moins élevées que celles des branchies et de la glande digestive, accumulent les métaux dans le site contaminé et, préférentiellement, sous forme soluble dans le cas du cadmium et du cuivre. Ils ne présentent pas, pour autant, d'augmentation de leur teneur en métallothionéines.

Indépendamment du site, les teneurs en métaux sont plus élevées dans la glande digestive que dans les branchies. Nous avons quantifié cette différence sous la forme d'un rapport $((GD)-(Br)/(Br))$ à chacun des deux sites (*tableau IV*). Cet écart, exprimé en pourcentage, est systématiquement plus élevé pour le cadmium que pour les métaux essentiels (Cu, Zn). En

Tableau IV. A et B : Différences relatives (en pourcentage) entre les teneurs moyennes des métaux totaux des glandes digestives et des branchies $((GD)-(Br)/(Br))$ à chacun des deux sites (Gironde, site contaminé et Bourgneuf, site propre). C et D : comparaison des écarts entre les pourcentages moyens de métaux cytosoliques dans les branchies et dans la glande digestive chez les mêmes huîtres. Figurent l'organe présentant le plus fort pourcentage de métal soluble (GD : glande digestive ; Br : branchies) et l'écart avec l'autre organe.

Table IV. A and B: Relative differences between mean levels of total metals in digestive gland and gills $((GD)-(Br)/(Br))$ at both sites (Gironde: contaminated site and Bourgneuf: uncontaminated site). These relative differences are expressed in percentages. C and D: Comparison between deviation of mean percentages of cytosolic metals in gills and digestive gland in the same oysters. GD (digestive gland) and Br (gills) represents the organ with the highest soluble metal percentage followed by the deviation with the other organ.

		Cadmium %	Cuivre %	Zinc %
Bourgneuf	A	86	24	31
Gironde	B	216	7	19
Bourgneuf	C	GD+2	GD+6	GD+4
Gironde	D	Br+8	Br+8	Br+9

Gironde sa forte valeur (+ 216 %) traduit l'accumulation préférentielle du cadmium dans la glande digestive. À l'opposé, les plus faibles valeurs (+ 7 % et + 19 %) par rapport à Bourgneuf, traduisent l'enrichissement relatif en cuivre et en zinc des branchies par rapport à la glande digestive. Mais c'est surtout la distribution des métaux entre ligands solubles et insolubles qui n'est pas la même aux deux sites (*tableau IV*). À Bourgneuf, les plus forts pourcentages de métaux cytosoliques sont observés dans la glande digestive, les écarts avec les branchies varient de + 2 à + 6 %. En Gironde, au contraire, les branchies présentent des pourcentages de métaux solubles supérieurs à ceux de la glande digestive (+ 8 à + 9 %). Ces accroissements des métaux cytosoliques s'accompagnent d'une augmentation de 71 % de la teneur en métallothionéines par rapport aux branchies des huîtres de Bourgneuf, alors que pour la glande digestive l'augmentation n'est que de 10 %.

Il existe donc de notables différences entre ces deux organes quant aux mécanismes de bio-accumulation des métaux étudiés : fixation du cadmium par l'important pool de métallothionéines hépatiques natif avec passage du zinc relargué sous forme insoluble ; synthèse de métallothionéines de novo dans les branchies où les flux de métaux vers le cytosol sont plus importants que dans la glande digestive.

Comme biomarqueurs, les métallothionéines apportent des informations sur la biodisponibilité des métaux et sur leurs effets au niveau physiologique. Leur quantification dans les branchies des huîtres de la Gironde et de la baie de Bourgneuf met en évidence l'impact des métaux présents dans cet estuaire sur les populations autochtones.

Pour autant, il serait hasardeux de généraliser ces résultats à d'autres bivalves et à d'autres sites contaminés ou non. Le devenir des métaux dans l'organisme et l'induction de la synthèse de métallothionéines pour les neutraliser (qui se traduira par des teneurs supérieures à celles considérées comme « normales » pour l'espèce) dépendent de trop de facteurs pour établir un diagnostic de la qualité d'un écosystème aquatique uniquement basé sur la quantification de ces protéines, sans une étude approfondie de ces facteurs.

Une alternative à la simple détermination des niveaux de métallothionéines dans les espèces autochtones est

la transplantation d'espèces bio-indicatrices d'un site propre dans le site supposé contaminé. Les expériences qui ont montré l'efficacité de cette démarche soulignent la nécessité de laisser les individus transplantés suffisamment longtemps sur le site étudié pour permettre d'apprécier l'impact de la transplantation sur les niveaux de métallothionéines [14].

Pour éviter l'effet de dilution engendré par l'étude des organismes entiers, nous recommandons d'étudier les fluctuations des teneurs en métallothionéines sur plusieurs organes, car les réponses à l'exposition aux métaux dans le milieu aquatique peuvent être différentes d'un organe à l'autre, en relation avec la biodisponibilité des métaux dans le milieu.

Remerciements

Les auteurs remercient leurs collègues de l'EP61 du CNRS pour la collecte des huîtres en Gironde.

RÉFÉRENCES

- [1] Amiard J.-C., Berthet B., Fluctuations of cadmium, copper, lead and zinc concentrations in field populations of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Bourgneuf (France), *Ann. Inst. Oceanogr.* 72 (1996) 195–207.
- [2] Amiard J.-C., Métayer C., Baud J.-P., Ribeyre F., Influence of some ecological and biological factors on metal bio-accumulation in young oysters (*Crassostrea gigas*, Thunberg) during their spat rearing, *Water Res.* 28 (1994) 219–231.
- [3] Amiard J.-C., Geffard A., Amiard-Triquet C., La métallothionéine chez la moule *Mytilus edulis* comme biomarqueur de pollution métallique : variabilité entre sites, saisons et organes, *J. Rech. Océanogr.* 23 (1998) 25–30.
- [4] Amiard-Triquet C., Rainglet F., Larroux C., Regoli F., Hummel H., Metallothioneins in Arctic bivalves, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 41 (1998) 96–102.
- [5] Bebianno M.J., Langston W.J., Metallothionein induction by *Mytilus edulis* exposed to cadmium, *Mar. Biol.* 108 (1991) 91–96.
- [6] Bordin G., Cordeiro Raposo F., McCourt J., Rodriguez A.R., Identification de métalloprotéines du type métallothionéine chez un mollusque marin bivalve, *C. R. Acad. Sci. Paris* 317 (1994) 1057–1064.
- [7] Bordin G., McCourt J., Cordeiro Raposo F., Rodriguez A.R., Metallothionein-like metalloproteins in the Baltic clam *Macoma balthica*: seasonal variations and induction upon metal exposure, *Mar. Biol.* 129 (1997) 453–463.
- [8] Boutier B., Chiffolleau J.-F., La contamination de la Gironde par le cadmium : origine, extension, importance, *Rapports scientifiques de l'Ifremer n°14*, 1989.
- [9] Brdicka R., Polarographic studies with the dropping mercury cathode, XXXI, a new test for proteins in the presence of cobalt salts in ammoniacal solutions of ammonium chloride, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 5 (1933) 122–128.
- [10] Cossa D., A review of the use of *Mytilus* spp. as quantitative indicators of cadmium and mercury contamination in coastal waters, *Oceanol. Acta* 12 (1989) 417–432.
- [11] Cossa D., Lassus P., Le cadmium en milieu marin, biogéochimie et écotoxicologie, *Rapports scientifiques et techniques de l'Ifremer n°16*, 1989.
- [12] Cosson R.P., Amiard J.-C., Amiard-Triquet C., Trace elements in little egrets and flamingos of Camargue, France, *Ecotox. Environ. Safety* 5 (1988) 107–116.
- [13] Cosson R.P., Amiard-Triquet C., Amiard J.-C., Metallothioneins and detoxification, is the use of detoxication protein for MT a language abuse?, *Water Air Soil Pollut.* 57–58 (1991) 555–567.
- [14] Couillard Y., Campbell P.G.C., Tessier A., Pellerin-Masicotte J., Auclair J.C., Field transplantation of a 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 (1995a) 690–702.
- [15] Couillard Y., Campbell P.G.C., Pellerin-Masicotte J., Auclair J.C., Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. II Metallothionein response to Cd and Zn exposure, evidence for cytotoxicity, and links to effects at higher levels of biological organization, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52 (1995b) 703–715.
- [16] Dallinger R., Rainbow P.S., *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates*, Lewis, Boca Raton, FL, 1993.
- [17] Dutton M.D., Stephenson M., Klaverkamp J.F., A mercury saturation assay for measuring metallothionein in fish, *Environ. Toxicol. Chem.* 12 (1993) 1193–1202.
- [18] George S.G., Olsson P.-E., Metallothioneins as indicators of trace metal pollution, in: Kramer K.J.M. (Éd.), *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries*, CRC, Boca Raton, FL, 1994, pp. 151–178.
- [19] Hogstrand C., Haux C., Comparison of polarography and radioimmunoassay for the quantification of metallothionein in perch (*Perca fluviatilis*), *Mar. Environ. Res.* 28 (1989) 187–190.
- [20] Johansson C., Cain D.J., Luoma S.N., Variability in the fractionation of Cu, Ag and Zn among cytosolic proteins in the bivalve *Macoma balthica*, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 28 (1986) 87–97.
- [21] Julshamn K., Andersen K.J., Subcellular distribution of major and minor elements in unexposed molluscs in western Norway. I. The distribution and binding of cadmium, zinc and copper in the liver and the digestive system of the oyster *Ostrea edulis*, *Comp. Biochem. Physiol.* 75A (1) (1983) 9–12.

- [22] Langston W.J., Bebianno M.J., Metal Metabolism in Aquatic Environments, Chapman & Hall, London, 1998.
- [23] Martincic D., Nürnberg H.W., Stoeppler M., Branica M., Bio-accumulation of heavy metals by bivalves from Lim Fjord (North Adriatic Sea), Mar. Biol. 81 (1984) 177–188.
- [24] Martincic D., Nürnberg H.W., Branica M., Bio-accumulation of heavy metals by bivalves from Linski kanal (North Adriatic Sea), II. Copper distribution between oysters *Ostrea edulis* and ambient water, Mar. Chem. 18 (1986) 299–319.
- [25] Martincic D., Stoeppler M., Branica M., Bio-accumulation of heavy metals by bivalves from Linski kanal (North Adriatic Sea), IV. Zinc distribution between *Mytilus galloprovincialis*, *Ostrea edulis* and ambient water, Sci. Total Environ. 60 (1987) 143–172.
- [26] Martoja M., Martoja R., La bio-accumulation des métaux, processus physiologique normal et conséquence de la pollution, Courier du CNRS 54 (1984) 32–37.
- [27] Mouneyrac C., Amiard J.-C., Amiard-Triquet C., Effects of natural factors (salinity and body weight) on cadmium, copper, zinc and metallothionein-like protein levels in resident populations of oysters *Crassostrea gigas* from a polluted estuary, Mar. Ecol. Prog. Ser. 162 (1998) 125–135.
- [28] Olafson R.W., Sim R.G., An electrochemical approach to quantification and characterization of metallothioneins, Anal. Biochem. 100 (1979) 343–351.
- [29] Olafson R.W., Olsson P.-E., Electrochemical detection of metallothionein, in Metallobiochemistry Part B: Metallothionein and related molecules, in: Riordan J.F., Vallee B.L. (Éds.), Methods in Enzymology, 1991, pp. 205–213.
- [30] Onaska S., Cherian M.G., Comparison of metallothionein determination by polarographic and cadmium-saturation methods, Toxicol. Appl Pharmacol. 63 (1982) 270–274.
- [31] Pavicic J., Raspor B., Martincic D., Quantitative determination of metallothionein-like proteins in mussels, methodological approach and field evaluation, Mar. Biol. 115 (1993) 435–444.
- [32] Regoli F., Orlando F., Accumulation and subcellular distribution of metals (Cu, Fe, Mn, Pb and Zn) in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* during a field transplant experiment, Mar. Pollut. Bull. 28 (1994) 592–600.
- [33] R.N.O. Surveillance du milieu marin, ministère de l'Environnement, Rapp. Ifremer, 1995.
- [34] Roesijadi G., Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animal, Aquatic Toxicol. 22 (1992) 81–114.
- [35] Roesijadi G., Behavior of metallothionein-bound metals in a natural population of an estuarine mollusc, Mar. Environ. Res. 38 (1994) 147–168.
- [36] Stegeman J.J., Brouwer M., Di Giulio R.T., Förlin L., Fowler B.A., Sanders B.M., Van Veld P.A. Jr, Enzyme and protein synthesis as indicators of contaminant exposure and effect, in: Hugget R.J., Kimerle R.A., Merlho P.M. Jr, Bergman H.L. (Éds.), Biomarkers — Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress, Lewis, Chelsea, MI, 1992, pp. 235–335.
- [37] Summer K.H., Klein D., Quantification of metallothionein in biological materials, in: Suzuki K.T., Imura N., Kimura M. (Éds.), Metallothionein III, Birkhäuser Verlag, Basel, 1993, pp. 75–86.
- [38] Tallandini L., Cassini A., Favero N., Albergoni V., Regulation and subcellular distribution of copper in the freshwater molluscs *Anodonta cygnea* (L.) and *Unio elongatus* (Pf.), Comp. Biochem. Physiol. 84C (1) (1986) 43–49.
- [39] Thibaud Y., Dosage du mercure dans des organismes marins, in: Cnexo (Ed.), Manuel des analyses chimiques en milieu marin, Brest, 1983, pp. 243–250.
- [40] Thompson J.A.J., Cosson R.P., An improved electrochemical method for the quantification of metallothioneins in marine organisms, Mar. Environ. Res. 11 (1984) 137–152.
- [41] Viarengo A., Nott J.A., Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates, Comp. Biochem. Physiol. 104 (1993) 355–372.
- [42] Viarengo A., Canesi L., Mazzucotelli A., Ponzano E., Cu, Zn and Cd content in different tissues of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*: role of metallothionein in heavy metal homeostasis and detoxication, Mar. Ecol. Prog. Ser. 95 (1993) 163–168.