

DIRECTION DES RECHERCHES OCEANIQUES

**LES METALLOTHIONEINES : METHODES D'ANALYSE ET
UTILISATION COMME BIO-INDICATEURS**

PAR

JEAN-FRANCOIS CHIFFOLEAU



DRO-90-11-MR

398,1

DIRECTION DES RECHERCHES OCEANIQUES

**LES METALLOTHIONEINES : METHODES D'ANALYSE ET
UTILISATION COMME BIO-INDICATEURS**

PAR

JEAN-FRANCOIS CHIFFOLEAU

DRO-90-11-MR

IFREMER
Centre de Nantes
B. P. n° 1049
44037 NANTES CEDEX 01



DIRECTION DES RECHERCHES OCEANIQUES
Département "Milieu et Ressources"

AUTEUR (S) : Jean-François CHIFFOLEAU		CODE : N° <u>DRO-90-11-MR</u>
TITRE LES METALLOTHIONEINES : METHODES D'ANALYSE ET UTILISATION COMME BIO-INDICATEURS		date : décembre 1990 tirage nb : 50 Nb pages : 54 Nb figures : 14 Nb photos : 0
CONTRAT (intitulé) N° _____		DIFFUSION libre <input checked="" type="checkbox"/> restreinte <input type="checkbox"/> confidentielle <input type="checkbox"/>

RÉSUMÉ

Ce rapport décrit les différentes méthodes de détection et de quantification des métallothionéines (chromatographie/AAS, Cd-hème, Hg/TCA, colorimétrie, polarographie, RIA, ELISA) et compare leurs performances. Ensuite, une étude sur des huîtres prélevées depuis des milieux "propres" en métaux (Bassin d'Arcachon) jusqu'à une zone contaminée chroniquement par le cadmium (Estuaire de la Gironde), montre que la teneur en métallothionéine des tissus mous en totalité reste constante et d'environ 6 µg/g. Ce rapport conclue que la métallothionéine d'huître n'est pas un paramètre suffisamment sensible pour être utilisé comme bioindicateur.

ABSTRACT

This report reviews different current methods of metallothionein-determination (chromatography, Cd-heme, Hg/TCA, colorimetric method, polarography, RIA, ELISA) and compares their respective merits. Then, a study about oysters taken from "clean" areas (Bassin d'Arcachon) up to a chronically cadmium-contaminated area (Gironde estuary) shows that metallothionein-levels remain constant at about 6 µg/g in soft tissues "in-toto". This report comes to the conclusion that oyster metallothionein is not a sufficiently sensitive parameter to be used as a bioindicator.

mots-clés : Métallothionéines, détection, quantification, bioindicateur, huîtres.

key words : Métallothionein, determination, bioindicator, oyster.

© IFREMER - Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer,



INTRODUCTION

CHAPITRE 1.- LES METALLOTHIONEINES : CARACTERISTIQUES, DETECTION, QUANTIFICATION

1.1.- CARACTERISTIQUES DES METALLOTHIONEINES

1.2.- DETECTION, QUANTIFICATION

1.2.1.- PREPARATION DES ECHANTILLONS

1.2.2.- METHODES DE DOSAGE INDIRECTES

1.2.2.1.- Couplage gel filtration-absorption atomique

1.2.2.1.1.- Principe

1.2.2.1.2.- Mode opératoire

1.2.2.2.- Substitution de métaux

1.2.2.2.1.- Méthode "Cd hémoglobine"

Mode opératoire

1.2.2.2.2.- Méthode "Hg/TCA"

Mode opératoire

1.2.2.3.- Titration des groupements SH

1.2.2.3.1.- Méthode polarographique

Principe

Mode opératoire

1.2.2.3.2.- Méthode au DTNB

Fractionnement par solvants

Dosage des SH

1.2.3.- METHODES DE DOSAGE DIRECTES

1.2.3.1.- Radioimmunoessai (RIA)

Mode opératoire

1.2.3.2.- Test ELISA

Principe

Mode opératoire

1.3.- ETUDE COMPARATIVE DES DIFFERENTES METHODES

1.3.1.- ASPECTS QUANTITATIFS DES METHODES

1.3.1.1.- Sensibilité

1.3.1.1.1.- Méthodes chromatographiques

1.3.1.1.2.- Dosage des SH au DTNB

1.3.1.1.3.- Synthèse

1.3.1.2.- Précision, linéarité

1.3.1.3.- Reproductibilité

1.3.2.- FAISABILITE DES DIFFERENTES METHODES

1.3.2.1. Temps d'analyse

1.3.2.2.- Accessibilité des méthodes

1.3.2.2.1.- Matériel

1.3.2.2.2.- Compétence technique

1.3.2.2.3.- Analyses en série et automatisation

1.3.2.2.3.1.- Méthodes chromatographiques

1.3.2.2.3.2.- Substitution par des métaux

1.3.2.2.3.3.- Polarographie

1.3.2.2.3.4.- Méthode au DTNB

1.3.2.2.3.5. Immunoessais

1.3.3.- CONCLUSION

**CHAPITRE 2.- IDENTIFICATION DES LABORATOIRES SPECIALISES
DANS L'ETUDE DES METALLOTHIONEINES**

2.1.- LABORATOIRES FRANÇAIS

2.2.- LABORATOIRES ETRANGERS

**CHAPITRE 3.- ETUDE DE LA POTENTIALITE D'UTILISATION DES
METALLOTHIONEINES COMME BIOINDICATEURS**

3.1.- INTRODUCTION

3.2.- MATERIEL ET METHODES

3.2.1.- ORGANISMES

3.2.2.- ANALYSE DU Cd TOTAL

3.2.3.- ANALYSE DES SH SOLUBLES

3.2.3.1.- Fractionnement par la chaleur

3.2.3.2.- Fractionnement par solvants

3.2.3.3.- Dosage des SH

3.2.4.- ANALYSE DU Cd SOLUBLE

3.2.5.- CHROMATOGRAPHIE : CONDITIONS ANALYTIQUES

3.3. RESULTATS

3.3.1.- PERFORMANCES DE LA METHODE AU DTNB

3.3.1.1.- Calibration du lecteur de plaques

3.3.1.2.- Coefficient d'extinction molaire

3.3.1.3.- Limites de détection de la méthode

3.3.1.4.- Essais de la méthode avec un standard de métallothionéine

**3.3.2.- CONTAMINATION ENVIRONNEMENTALE DES HUITRES ET DOSAGE
DES METALLOTHIONEINES**

3.4.- DISCUSSION

INTRODUCTION

L'objectif du présent rapport est de se doter d'un document de référence concernant d'une part l'étude des métallothionéines, protéines induites chez les êtres vivants par la présence de métaux lourds dans l'environnement, et d'autre part leur utilisation comme outil de surveillance des effets causés par la détérioration du milieu marin.

Dans un premier chapitre, après une description des métallothionéines et de leur distribution chez les différentes espèces vivantes, on discutera des méthodes couramment employées pour leur détection et leur quantification.

Un deuxième chapitre sera consacré à l'identification des laboratoires nationaux et étrangers possédant une expérience dans l'étude des métallothionéines, leur caractérisation ou leur quantification.

Enfin, un troisième chapitre décrira une étude menée en 1989 dans notre laboratoire, concernant la potentialité d'utilisation des métallothionéines comme bio-indicateurs de la qualité du milieu marin.

CHAPITRE 1.- LES METALLOTHIONEINES : CARACTERISTIQUES, DETECTION, QUANTIFICATION

1.1.- CARACTERISTIQUES DES METALLOTHIONEINES

Les métallothionéines sont des protéines cytoplasmiques solubles, de faible poids moléculaire, qui ont été isolées pour la première fois à partir du rein de cheval (Margoshes et Vallée, 1957). Depuis ce jour, on a identifié des métallothionéines et d'autres protéines similaires dans un grand nombre d'organismes, depuis les mammifères jusqu'aux invertébrés, et on considère qu'elles sont présentes chez tous les être vivants (Kägi et Nordberg, 1987).

Les caractéristiques des métallothionéines sont basées sur les protéines de mammifères : poids moléculaire < 10.000 Daltons, haute teneur en métaux, composition particulière en acides aminés (teneur en cystéine > 30 %, absence d'acides aminés aromatiques) thermostables, inductibles par Cd, Zn, Cu, Hg.

Chez les invertébrés marins, on rencontre des protéines de type métallothionéine ("Metallothionein-like proteins") ; leurs caractéristiques sont généralement similaires à celles des mammifères, avec des variantes suivant les espèces.

Enfin, la configuration spatiale, imposée par la position des résidus cystéine dans la chaîne protéique, est caractéristique des métallothionéines (arrangements Cys-métal-Cys) et de ce fait, le rapport molaire métal/groupements SH est un paramètre caractéristique de chaque type de métallothionéine.

1.2.- DETECTION, QUANTIFICATION

Les métallothionéines sont présentes chez les êtres vivants dans des cellules de différents organes (foie, rein, glande digestive, hépatopancréas) et dans la plupart des cas sous forme soluble. Tout protocole analytique consistera donc dans un premier temps en la récupération de la fraction liquide des échantillons à analyser ; ensuite, la quantification consistera en la mesure d'un paramètre aisément corrélable avec la teneur en métallothionéines

(méthodes indirectes) ou directement de la concentration en métallothionéines (méthodes directes).

	Poids moléculaire (K Daltons)	Teneur en SH	métal/SH
Mammifère	10	30 %	(Cd + Zn) / SH = 3
Pseudomonas	3 - 7		(Cd + Zn + Cu) / SH = 1 à 2
Levure	1 - 3,6		Cd / SH = 2 à 3
Neurospora	2		Cd / SH = 3
Champignon	12	absence	13 Cd / mole
Riz	7		
Moule	10	12 - 26 %	(8 Cd + 1 Zn) / mole
Buccin	8	3 SH	
Huître	10 - 24	faible	
Algue	10		Cd / SH = 1
Bactérie	10	18 %	3 métaux / mole
homard	> 10		
Crabe	10	> 30 %	
Drosophile	2 - 6		
Carpe	10		
Truite (arc-en-ciel)	12		

Tableau 1.- Propriétés structurales des métallothionéines ou de protéines de type métallothionéine (d'après Petering et Fowler, 1986).

1.2.1. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Cette étape, commune à toutes les méthodes d'analyse, a pour but de récupérer la fraction soluble des échantillons à analyser, d'une part en brisant les membranes cellulaires, et d'autre part en étendant le volume recueilli afin de faciliter la séparation liquide-solide. Il faut pour cela utiliser des solutions tampons de pH voisin de celui du cytoplasme des cellules. Le type de tampon utilisé et la force ionique de celui-ci sont variables suivant les auteurs. On peut citer pour mémoire l'utilisation de phosphate de sodium (Pruell et Engelhardt, 1980), le tris-hydroxy aminométhane (Nordberg *et al.*, 1986), le chlorure de sodium (Thompson et Cosson, 1984), le saccharose (Frankenne *et al.*, 1980), à des pH variant de 7,0 à 8,6.

Le protocole analytique est le suivant :

- broyer l'échantillon partiellement décongelé dans trois volumes de solution tampon, en présence d'inhibiteur de protéases (PMSF) et à température inférieure à 4° C pour éviter une oxydation rapide des groupements SH,
- centrifuger à 30 000 g pendant 2 heures à température inférieure à 4° C, afin d'éliminer le matériel particulaire (débris de cellules, divers organites),
- récupérer le surnageant qui sera la solution de départ des différents dosages.

1.2.2.- METHODES DE DOSAGE INDIRECTES

Ces méthodes sont basées sur des propriétés ou paramètres particuliers des métallothionéines comme la teneur en métaux ou le nombre de groupements SH dans les échantillons.

Au moyen de facteurs de conversion connus (rapport molaire métal/métallothionéine, SH/métallothionéine), la concentration en métallothionéine est alors calculée.

1.2.2.1.- Couplage gel filtration-absorption atomique

1.2.2.1.1.- Principe

Dans cette méthode, on sépare par chromatographie sur gel les protéines de poids moléculaires différents, et on récupère en sortie de colonne les fractions correspondant au pic d'éluion des métallothionéines. Après avoir mesuré par absorption atomique la teneur en métaux des fractions récupérées, on calcule la teneur en métallothionéines de la solution de départ en utilisant le rapport molaire métal/métallothionéine, caractéristique de la protéine recherchée.

1.2.2.1.2.- Mode opératoire

Un traitement thermique de l'échantillon est préalablement nécessaire, ceci afin d'éliminer les protéines solubles de haut poids moléculaire par dénaturation, sans détériorer les métallothionéines qui sont thermostables. Cette étape permet de réduire la quantité de protéines devant être chargée dans la colonne de chromatographie et de diminuer la viscosité de la solution protéique, minimisant ainsi les artéfacts dus à une colonne saturée. En pratique, un chauffage de l'échantillon à 70° C pendant 10 minutes suivi d'une centrifugation à 30 000 g pendant 15 minutes est tout à fait satisfaisant.

La chromatographie est effectuée dans la plupart des cas sur colonne SEPHADEX G-75 ou G-50 (PHARMACIA). Les débits d'éluion sont de l'ordre de 25 ml/h et la durée d'une séparation avoisine les 20 h. Un collecteur de fractions en sortie de colonne est nécessaire.

Köhler et Riisgard (1982) décrivent ainsi leur procédure : 25 ml de surnageant de centrifugation sont injectés dans une colonne SEPHADEX G-50 (78 x 2,5 cm). L'éluion est

effectuée dans un tampon Tris HCl 0,02 M (pH 8,6) à 4° C et à un débit de 25-30 ml/h. Les fractions de 9,1 à 9,3 ml sont collectées au moyen d'un échantillonneur automatique. L'éluion est suivie par la lecture de la D.O. à 254 nm et 280 nm en sortie de colonne, les 2 longueurs d'onde étant caractéristiques des métallothionéines (absorption maximale à 254 nm, minimale à 280 nm). Cette chromatographie, dont le but était d'étudier un surnageant d'homogénat des fractions corporelles de moules exposées à 200 ppb de Cd pendant 36 jours, a donné la courbe d'éluion de la figure 1.

L'analyse des métaux est effectuée couramment par spectrophotométrie d'absorption atomique, après minéralisation des fractions récupérées à l'acide nitrique à 80° C.

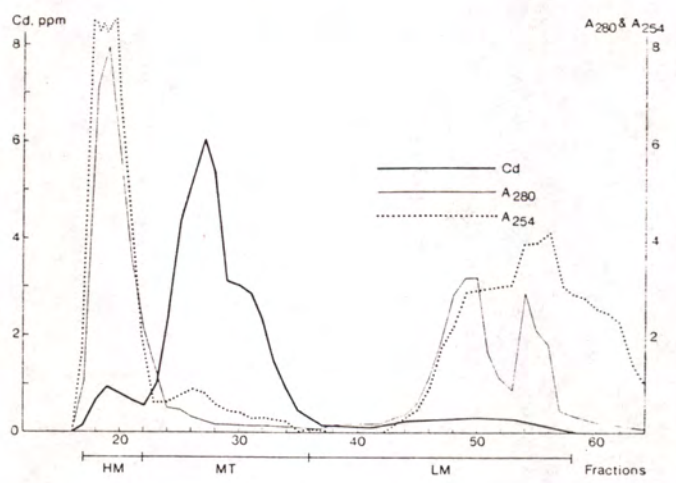


Figure 1.- Profil d'éluion d'homogénat de moules sur SEPHADEX G-50. HM = high - molecular weight molecules, MT = métallothionéines, LM = low-molecular weight molecules (d'après Köhler et Riisgard, 1982).

Le développement des colonnes à filtration sur gel pour l'HPLC a amélioré considérablement la méthode. Sanders *et al.* (1983) rapportent des temps d'analyse chromatographique de 25 minutes sur une colonne TOYO SODA TSK SW 3000, avec un débit d'éluion de 1 ml/min et la collecte de 25 fractions de 1 ml (fig. 2).

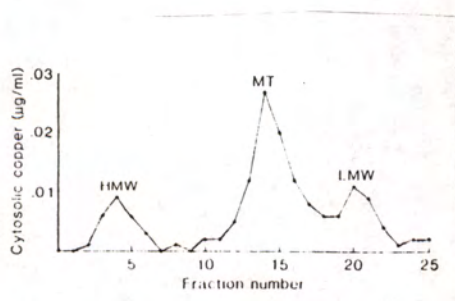


Figure 2.- Distribution cytosolique du cuivre chez des larves de crabe exposées à des ions cuivriques libres dans l'eau (d'après Sanders *et al.*, 1983).

1.2.2.2.- Substitution de métaux

Cette série de méthodes est basée sur la différence d'affinité des métaux pour les métallothionéines : $Hg > Ag > Cu > Cd > Zn$. Ceci signifie que les métaux possédant la plus forte constante de stabilité pour les métallothionéines (exemple Hg) déplacent ceux qui ont une constante plus faible (exemple Zn). Donc, en saturant tous les sites de fixation d'une métallothionéine par addition d'un métal ayant une forte affinité pour cette protéine, il est possible de quantifier les métallothionéines par dosage du métal fixé, en se basant sur les relations stoechiométriques entre le nombre de sites de fixation des métallothionéines et la quantité d'ions métalliques présents.

1.2.2.2.1.- Méthode "Cd - hémoglobine"

Dans cette méthode, décrite par Onosaka et Cherian (1982), on postule que tous les sites de fixation des métallothionéines à doser sont occupés par Cd ou Zn, ce qui représente toutefois un cas particulier. L'adjonction de Cd^{2+} dans la solution à analyser sature tous les sites de ligands en présence. Afin d'éliminer les métaux liés aux "non-métallothionéines", on ajoute de l'hémoglobine qui a une très forte affinité pour le Cd, affinité cependant inférieure à celle des métallothionéines. Une dénaturation par la chaleur suivie d'une centrifugation permettent d'éliminer l'hémoglobine, donc tout le Cd "non métallothionéique". On obtient donc finalement une solution contenant du Cd saturant exclusivement tous les sites des métallothionéines en présence.

Mode opératoire

Dans 5 ml de solution à analyser, ajouter 1 ml de $Cd Cl_2$ (10 mg/l) et laisser incubé 5 minutes à température ambiante. Ajouter 100 μl d'hémoglobine (4 % en poids/volume d'eau). Abandonner l'extrait pendant 3 minutes dans l'eau bouillante, puis centrifuger à 8 000 g.

Récupérer le surnageant et doser le Cd par absorption atomique.

1.2.2.2.2.- Méthode "Hg/TCA"

Le principe de cette méthode de quantification est le même que celui de la méthode précédente. Tous les sites fixateurs de métaux sont saturés par Hg ; alors, on sépare les métallothionéines des autres protéines par addition d'acide trichloracétique (TCA) qui précipite toutes les non -métallothionéines. On mesure alors la concentration en Hg du surnageant, et par l'intermédiaire du rapport molaire connu Hg/métallothionéine, on en déduit la concentration en métallothionéine.

Mode opératoire

Cette méthode, développée par Piotrowski *et al.*, (1973) a été modifiée par Kotsonis et Klaassen (1977) : à 3,5 ml d'homogénat de foie de rat dans KCl, ajouter 350 μg de ^{203}Hg en solution dans 250 μl d'eau. Laisser agir 10 minutes à température ambiante. Ajouter ensuite 1 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 10 % et après 10 minutes, centrifuger. Le surnageant est analysé pour ce qui concerne sa concentration en ^{203}Hg par un compteur gamma.

1.2.2.3.- Titration des groupements SH

1.2.2.3.1.- Méthode polarographique

Les techniques de polarographie par pulsation différentielle (DPP) pour la mesure de la teneur en groupements SH de protéines ont d'abord été développées par Brdicka (1933), améliorées Palecek et Pechan (1971) et plus tard adaptées à l'analyse des métallothionéines par Olafson (1981). Thompson et Cosson (1984) ont abaissé la limite de détection de cette méthode de quantification par optimisation des conditions expérimentales. Les interférences avec les protéines sulfhydrylées de haut poids moléculaire (albumines) peuvent être supprimées par dénaturation thermique et centrifugation ou chromatographie avant la polarographie. Les composés sulfhydrylés de bas poids moléculaire (glutathion, cystéine) produisent un signal assez faible pour ne pas modifier la mesure.

Principe

La polarographie par pulsation différentielle d'une solution de métallothionéines dans un électrolyte support à base de chlorure d'hexamine cobalt (solution de BRDICKA) donne trois pics de réduction. La base de la quantification des protéines thioliques (dont les métallothionéines) par cette procédure tient dans la relation linéaire entre le second des deux pics (pic B, figure 3) suivant la réduction du cobalt et la concentration en protéine. Ces deux pics seraient attribués à la réduction des H thioliques catalysée par le cobalt.

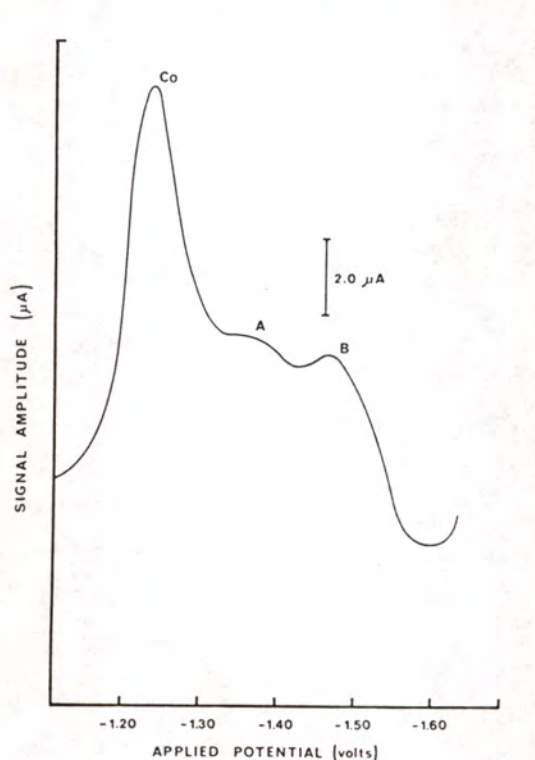


Figure 3.- Polarogramme à pulsation différentielle de l'électrolyte de Brdicka contenant 750 µg/l de métallothionéine de *Scylla serrata* (d'après Thompson et Cosson, 1984).

Mode opératoire

Dénaturer la solution à analyser par traitement à la chaleur et centrifugation (de la même manière qu'au paragraphe 1.2.2.1.2.).

A 10 ml d'électrolyte support (solution de Brdicka) précédemment purgée par un bullage d'azote, ajouter 100 μ l de solution d'échantillon dénaturée. Effectuer la DPP de - 1,3 V à - 1,6 V à la vitesse de 5 mV/sec. Une courbe d'étalonnage (fig. 4) avec de la métallothionéine pure donne directement la concentration en métallothionéine en fonction de la hauteur du pic B.

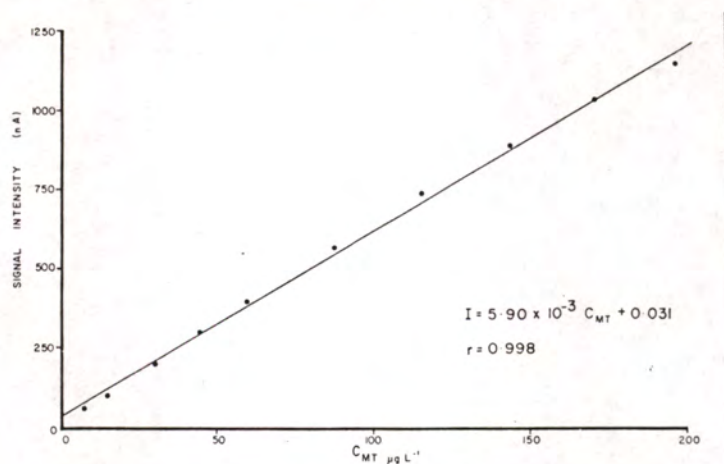
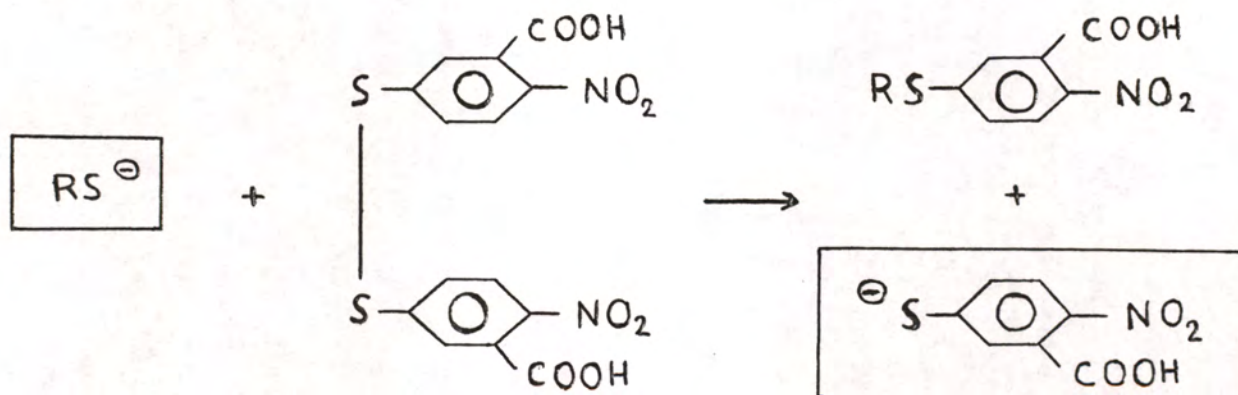


Figure 4.- Courbe de calibration typique de métallothionéine obtenue en utilisant l'électrode à goutte de mercure statique (d'après Thompson et Cosson, 1984).

1.2.2.3.2.- Méthode au DTNB

Le dithiobisnitrobenzoate (DTNB) réagit avec les groupements SH d'une solution pour donner un composé stable de couleur jaune (Ellman, 1959). La valeur de la densité optique à 412 nm de la solution est proportionnelle à la concentration en SH de l'échantillon.



Afin de s'affranchir le plus possible des SH d'autres ligands que les métallothionéines, deux traitements d'échantillons sont envisageables : dénaturation par la chaleur suivie d'une centrifugation et fractionnement par solvants. La première technique a été rapportée précédemment (paragraphe 1.2.2.1.2.).

Fractionnement par solvants

Cette technique a été rapportée par Kimura *et al.* (1979) et se décompose ainsi : à 1 volume d'homogénat, ajouter 1,05 volumes d'éthanol et 0,06 volume de chloroforme, les deux solvants étant à une température de - 30° C. Centrifuger à 27 000 g pendant

15 minutes à -20°C et récupérer le surnageant. Ajouter 3 volumes d'éthanol et laisser précipiter une nuit complète au congélateur. Récupérer le précipité par centrifugation et le dissoudre dans 1 ml d'eau.

Dosage des SH

A 1 ml d'échantillon préalablement traité par l'une des deux méthodes décrites plus haut, ajouter 0,45 ml de sodium dodecyl sulfate (SDS) à 4 % dans un tampon tris (0,1 M, pH 8,0) et 0,05 ml de DTNB (40 mg/10 ml de tris HCl 0,1 M, pH 8,0). Lire d'absorbance à 412 nm après 30 minutes.

On obtient la concentration en SH dans l'échantillon à l'aide d'une droite de calibration effectuée selon la même méthode, en utilisant comme étalon de la métallothionéine pure (à teneur connue en SH) ou du glutathion.

1.2.3. METHODES DE DOSAGE DIRECTES

1.2.3.1. Radioimmunoessai (RIA)

Cette méthode a été développée par Van Der Mallie et Garvey (1979) et le principe en est le suivant : on fait incuber l'échantillon à analyser avec une quantité connue d'anticorps en excès, anticorps spécifiques de la métallothionéine étudiée. Après cette première réaction immunologique, on ajoute un excès de métallothionéines marquées radioactivement. La quantité d'anticorps spécifiques n'ayant pas agi avec les métallothionéines non marquées va se fixer sur les métallothionéines marquées, et celles-ci étant en excès, tous les anticorps vont se trouver fixés.

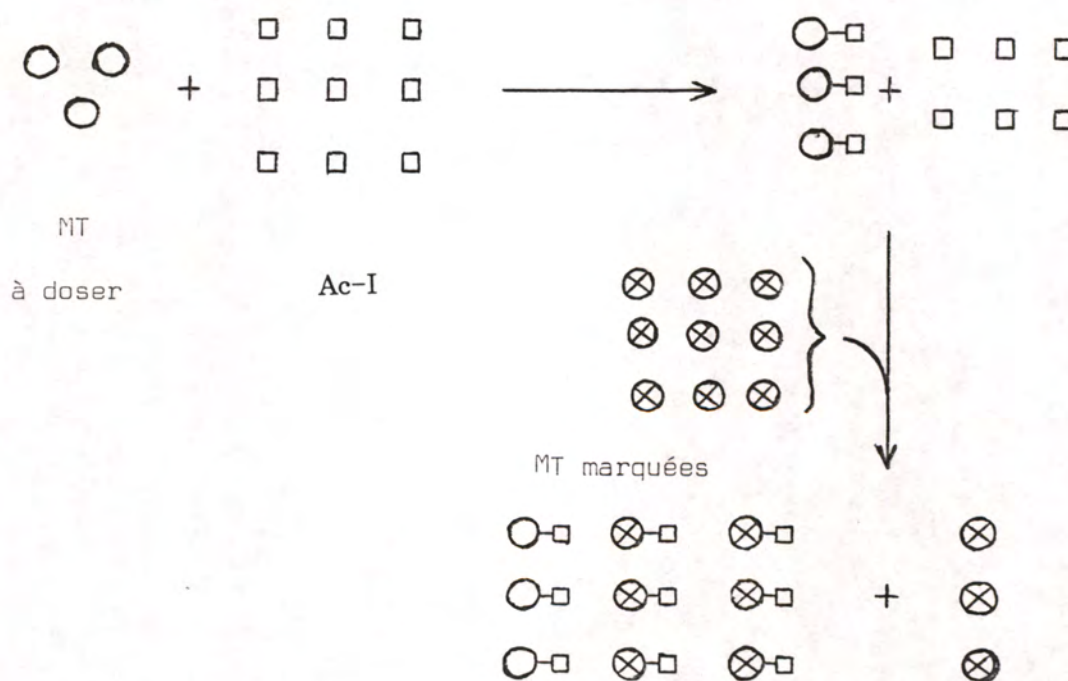


Figure 5.- RIA - action des anticorps primaires (MT = métallothionéine ; Ac - I = anticorps primaire)

On fait alors agir un anticorps secondaire, spécifique de l'anticorps primaire, qui va précipiter les complexes MT - Ac-I. La mesure de la radioactivité de ces complexes rapportée à une courbe de calibration donne la quantité de métallothionéines présentes dans l'échantillon.

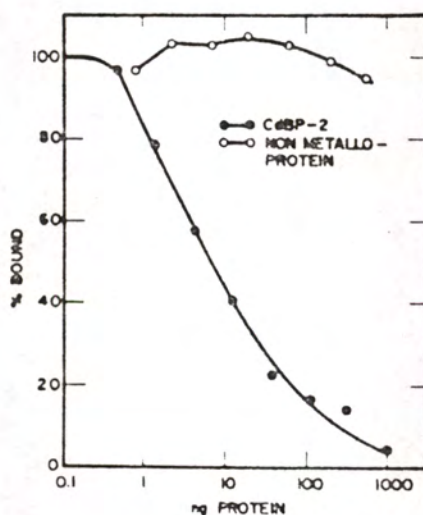


Figure 6.- Radioimmunoessai de métallothionéine de foie de rat (Cd BP-2), (d'après Van Der Mallie et Garvey, 1979).

Mode opératoire

L'essai de Van Der Mallie et Garvey (1979) a porté sur le dosage de Cd-thionénines de rat, et l'anticorps primaire utilisé était un anticorps de lapin anti Cd-thionéine de rat ($R \alpha$ CdBP). L'anticorps marqué était une métallothionéine de rat, iodée au moyen de ^{125}I (Cd BP*). L'anticorps secondaire était un anticorps de chèvre anti-sérum de lapin ($G \alpha R$).

Dans 400 μl de solution à analyser, ajouter 50 μl de $R \alpha$ CdBP. Incuber 13 heures à 24° C, puis ajouter 50 μl de CdBP*. Incuber 1 heure à 24° C. Ajouter une quantité adéquate de $G \alpha R$ (déterminée par des tests préliminaires) et laisser précipiter à 40° C pendant 20 heures.

Centrifuger à 7 000 g à 4° C pendant 30 minutes, récupérer le culot et le laver avec 1 ml de tampon borate refroidi à 4° C. Centrifuger de nouveau à 4° C pendant 10 minutes et récupérer le culot de centrifugation. Mesurer la radioactivité de ce culot au compteur gamma et convertir en métallothionéines à l'aide des courbes de calibration obtenues avec des standards selon la même méthode.

1.2.3.2. Test ELISA

Le protocole du test immunosorbant avec enzyme fixée (enzyme - linked

immunosorbent assay = ELISA), développé par Garvey *et al.* (1987) utilise les mêmes réactifs immunologiques que le RIA, mais la fluorescence remplace la radioactivité pour la détection de l'antigène de référence dans la réaction de liaison spécifique.

Principe

Après fixation d'une quantité importante de métallothionéines sur les parois d'un tube, on fait agir dans ce tube la solution à analyser avec un anticorps spécifique de ces deux antigènes. Par compétition, une partie seulement des anticorps va se lier aux antigènes fixés.

On élimine tous les réactifs non liés aux parois par lavage, puis on fait réagir un excès d'anticorps secondaire, spécifique de l'anticorps primaire, et couplé à une enzyme. On élimine après réaction les substances non liées aux parois par lavage, puis on rajoute un substrat qui réagit avec les enzymes fixés en donnant un produit fluorogénique. La mesure de la fluorescence de cette solution terminale est convertie en teneur en métallothionéines au moyen de courbe d'étalonnage.

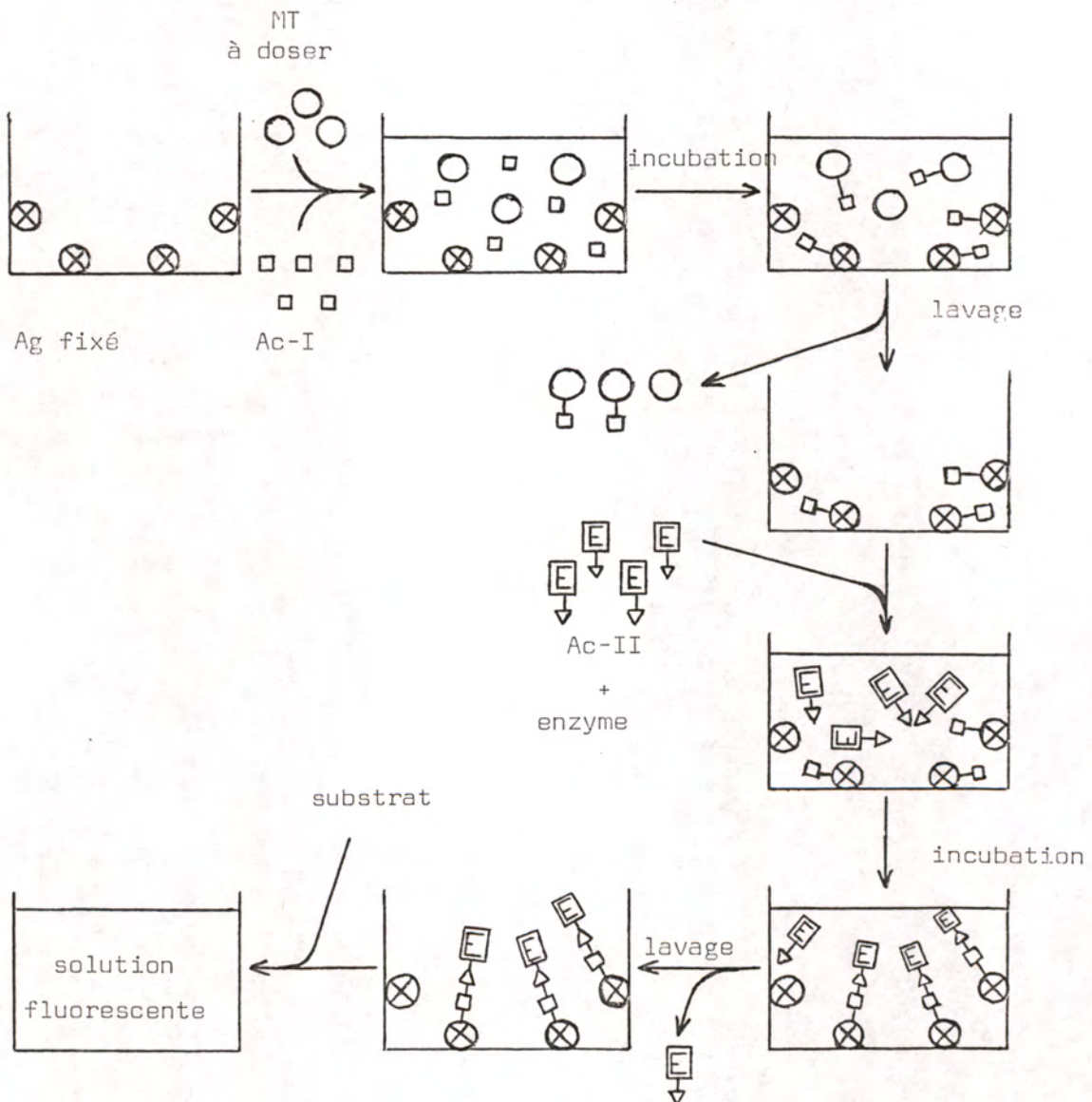


Figure 7.- Test ELISA (MT = Métallothionéine ; Ac = anticorps ; Ag = antigène).

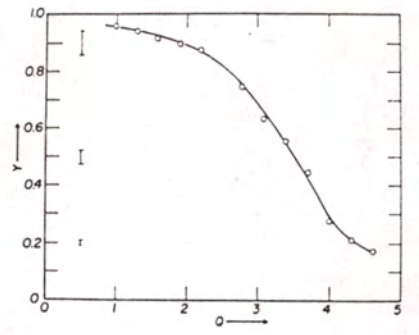


Figure 8.- ELISA fluorométrique pour des métallothionéines : courbe de calibration (d'après Garvey *et al.*, 1987)

$$Q = \log [MT \text{ (pg)}]$$

Y = réponse de MT compétitrice (pg)

Mode opératoire

Etape 1

Une solution de métallothionéine de rat (à 100 ng/ml de tampon) est adsorbée sur les parois des cupules de microplaques de polystyrène noir. La plaque est stockée à 4° C pendant 18 heures, puis lavée avec du tampon phosphate.

Etape 2

Ajouter dans chaque cupule 50 μ l de solution à analyser et 50 μ l d'anticorps primaire (R α CdBP, voir la méthode RIA). Après 4 heures d'incubation à 37° C, les cupules sont lavées comme dans l'étape 1.

Etape 3

100 μ l de conjugué d'anticorps secondaire (G α R) et d'enzyme (phosphatase alcaline) sont ajoutés à chaque cupule. Après 4 heures d'incubation à 37° C, les cupules sont de nouveau lavées comme dans l'étape 1.

Etape 4

Ajouter 150 μ l de substrat (4-méthyl umbelliferryl phosphate 2.10^{-4} M, pH 10,0) à chaque cupule.

Etape 5

Après 2 heures d'incubation à l'abri de la lumière, la fluorescence (450 nm) de la substance fixée (4-méthyl umbelliferrone) est déterminée.

1.3. ETUDE COMPARATIVE DES DIFFERENTES METHODES

Afin de comparer les méthodes décrites au chapitre précédent, nous regarderons dans un premier temps les paramètres quantitatifs (sensibilité, précision, linéarité, reproductibilité) en nous basant sur les données des auteurs et en nous appuyant sur des essais comparatifs réalisés par certains laboratoires.

Dans un deuxième temps, nous examinerons la faisabilité des différentes

méthodes par l'analyse des paramètres qualitatifs (temps d'analyse, accessibilité de la méthode, habileté technique requise, afin d'évaluer les mérites respectifs de chaque méthode en fonction des applications recherchées.

1.3.1. ASPECTS QUANTITATIFS DES METHODES

1.3.1.1. - Sensibilité

Dans ce paragraphe, on exprimera la sensibilité par rapport à la limite de détection des différentes méthodes. Celle-ci est en général fournie par les auteurs. Cependant, en ce qui concerne les méthodes chromatographiques et la méthode de dosage des SH par le DTNB, on ne dispose pas de données publiées. On doit donc procéder à un calcul basé sur les paramètres connus des analyses.

1.3.1.1.1. - Méthodes chromatographiques

D'après la méthode décrite par Köhler et Riisgard (1982), (SEPHADEX G-75 + absorption atomique), on récupère un pic d'éluion des métallothionéines correspondant à 14 fractions d'environ 9 ml. Le volume d'échantillon utilisé pour l'analyse de Cd est donc $14 \times 9 = 126$ ml.

La limite de détection de l'analyse de Cd au four-graphite avec correction Zeeman est de 100 ng/l. On peut donc calculer la teneur minimale de Cd détectable par absorption atomique :

$$\left. \begin{array}{l} [\text{Cd}] \geq 100 \text{ ng/l} \\ V = 0,126 \text{ l} \end{array} \right\} \Rightarrow \text{Cd} \geq 12,6 \text{ ng}$$

$$\text{ou} \quad \text{Cd} \geq \frac{12,6 \text{ n.mole}}{112}$$

soit Cd $\geq 0,11$ n.mole

Le principe de la quantification des métallothionéines par cette méthode est basée sur l'utilisation du coefficient $[\text{Cd}]/[\text{MT}]$, rapport molaire donné dans la littérature comme étant égal à 6 ou 7 suivant les espèces (Kägi et Nordberg, 1987). Prenons 7 comme le cas le plus défavorable et 6000 comme poids moléculaire moyen d'une métallothionéine ; on peut alors calculer une estimation :

$$\left. \begin{array}{l} \text{MT (n.mole)} = \frac{\text{Cd (n.mole)}}{7} \\ \text{Cd} \geq 0,11 \text{ n.mole} \end{array} \right\} \Rightarrow \text{MT} \geq \frac{0,11 \text{ n.mole}}{7}$$

$$\text{ou} \quad \text{MT} \geq \frac{0,11}{7} \times 6000 \text{ ng}$$

Dans la méthode décrite par Köhler et Riisgard, la prise d'essai était de 10 g d'échantillon en poids humide. On peut donc estimer :

MT ≥ 10 ng/g de poids humide

D'après la méthode décrite par Sanders *et al.* (1983), (HPLC + absorption atomique), on peut procéder au même calcul, en posant :

Volume d'échantillon = 9 fractions de 1 ml

Donc :

$$MT \geq \frac{(100 \times 9 \cdot 10^{-3})}{112} \times \frac{1}{7} \times 6000$$

Soit $MT \geq 7$ ng

La prise d'essai étant de 33 mg, on trouve :

$$MT \geq \frac{7}{33 \cdot 10^{-3}} \text{ ng/g}$$

Soit $MT \geq 200$ ng/g de poids humide

1.3.1.1.2. - Dosage des SH au DTNB

Le coefficient d'extinction molaire donné par Ellman (1959) est de 13 600, ce qui signifie que dans une cuve de spectrophotomètre de 1 cm de trajet optique, 1 groupement SH par litre donne une densité optique de 13 600.

On peut considérer l'écart-type d'une mesure de D.O. égal à 0,01, et on pose que la limite de détection est égale à trois fois l'écart-type sur une mesure.

Donc :

$$\text{L.D} = 0,03 \text{ D.O.}$$

On peut écrire :

$$\text{L.D.} = \frac{0,03}{13\,600} \text{ SH/l}$$

ou :

$$\text{Nombre de SH/l} \geq \frac{0,03}{13\,600}$$

Comme en règle générale, on compte 20 résidus cystéine par mole de métallothionéine (Kägi et Nordberg, 1987), on a :

$$[\text{MT}]_{\text{mole/l}} \geq \frac{0,03}{13\,600 \times 20}$$

$$\text{soit } [\text{MT}] \geq 1,1 \cdot 10^{-7} \text{ mole/l}$$

$$\text{ou } [\text{MT}] \geq 6000 \times 1,1 \times 10^{-7} \text{ g/l}$$

L'échantillon de départ a été préparé à partir d'un extrait de poids humide dilué par 3 volumes de tampon ; on peut écrire :

[échantillon] (poids humide) = 1 g/4 ml

ou [échantillon] (poids humide) = 250 g/l

Donc :

$$[\text{MT}] \geq \frac{6\,000 \times 1,1 \times 10^{-7}}{250} \text{ g/g}$$

ou $[\text{MT}] \geq 3 \mu\text{g/g}$

1.3.1.3. - Synthèse

METHODE	LIMITE DE DETECTION $\mu\text{g/g}$	REFERENCES
Chromatographie +	0,01	SEPHADEX G-50 ; valeur estimée à partir de Köhler et Riisgard (1982)
Absorption atomique	0,2	HPLC ; valeur estimée à partir de Sanders <i>et al.</i> (1983)
Cd-hémoglobine	40	Onosaka et Cherian (1982)
	10	Shaikh et Nolan (1987)
Hg/TCA	?	
Polarographie	0,03	Thompson et Cosson (1984)
DTNB	3	Valeur estimée à partir de Ellman (1959)
RIA	0,01	Van Der Mallie et Garvey (1979)
ELISA	0,01	Garvey <i>et al.</i> (1987)

Tableau 2. - Sensibilité des différentes méthodes de dosage des métallothionéines.

On peut constater, à la lecture du tableau 2, que les méthodes immunologiques (RIA, ELISA) sont les plus sensibles ; toutefois, les méthodes chromatographiques (SEPHADEX) atteignent le même niveau de performances et la méthode polarographique apparaît relativement

satisfaisante.

Il faut cependant rapprocher ces limites de détection des niveaux les plus faibles rencontrés chez les êtres vivants. Malheureusement, on ne dispose que de très peu de données ; on peut citer pour mémoire ces quelques valeurs.

Espèce	Organe	Concentration en MT ($\mu\text{g/g}$)	Référence
Rat	Foie	7	Shaikh et Nolan (1987)
	Foie + rein	12	Dieter <i>et al.</i> (1987)
Moule	Branchies	0,6	Roesijadi <i>et al.</i> (1988)
Huître	Tissous mous en totalité	6	ce travail

Tableau 3. - Niveau de base de métallothionéines (MT) chez quelques organismes.

A partir des tableaux 2 et 3, on peut conclure que toutes les méthodes décrites précédemment devraient pouvoir mesurer les niveaux de base de métallothionéines chez les mammifères, mais pour ce qui concerne les mollusques marins, les méthodes de substitution de métaux et la méthode au DTNB risquent de poser quelques problèmes de sensibilité.

Dieter *et al.* (1987), dans un exercice d'intercomparaison, ont testé l'aptitude de 5 méthodes courantes (G75 + AAS, Cd-hémoglobine, Hg/TCA, RIA, DTNB) à quantifier des niveaux de base de métallothionéines dans des homogénats de foie et de rein de rat. Vu la teneur négligeable en Cd dans le foie et le rein des animaux témoins, les métallothionéines endogènes n'ont pu être déterminées au moyen de chromatographie sur G75 et analyse exclusive de Cd. Les autres méthodes ont donné les résultats suivants :

Méthode	Concentration en MT	
	(n.mole/g)	($\mu\text{g/g}$)*
Cd/hémoglobine	2,05	12,30
RIA	2,14	12,84
DTNB	2,64	15,84
Hg/TCA	4 à 5	24 à 30

Tableau 4. - Concentration en métallothionéines de foie et de rein de rat (d'après Dieter *et al.*, 1987)

* Concentration calculée à partir d'un poids moléculaire de 6 000 D.

On peut regretter que, dans cet exercice, la méthode polarographique n'ait pas été étudiée.

On peut toutefois écrire que pour ce qui concerne la sensibilité, les méthodes immunologiques sont les plus performantes, mais que les méthodes "Cd-hémoglobine" et "DTNB" sont assez sensibles dans des études de métallothionéines de mammifères. Pour des études portant sur des mollusques marins, seules les méthodes immunologiques semblent convenir pour appréhender avec une marge suffisante les niveaux les plus bas.

1.3.1.2. - Précision, linéarité.

Dans ce paragraphe, nous allons nous appuyer sur les études comparatives de Dieter *et al.* (1987), déjà citées au paragraphe précédent. Les homogénats de foie et de rein de rat ont en effet été supplémentés par des concentrations croissantes de Cd-thionéines de rat pures, et ont été analysés par les 5 méthodes utilisées plus haut. On a obtenu les résultats suivants :

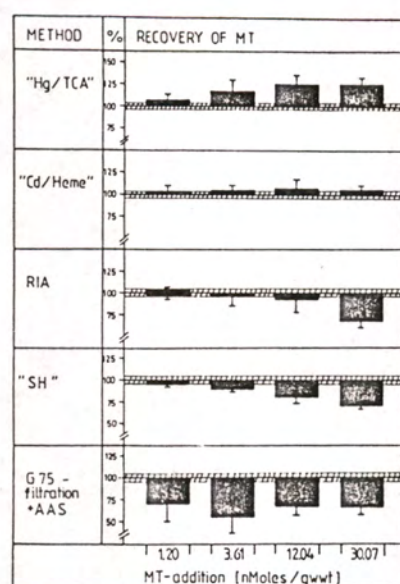


Figure 9 : Récupération de quantités connues de métallothionéines de foie de rat (d'après Dieter *et al.*, 1987).

D'après ces résultats, Dieter *et al.* ont dressé un tableau des performances de ces 5 méthodes au regard de cet exercice :

Method	Precision ^a	Correlation ^b
"Hg/TCA"	± 1.93 (n = 15)	0.9986
"Cd/heme"	± 6.64 (n = 20)	0.9584
RIA	± 8.20 (n = 20)	0.9227
"SH"	± 6.50 (n = 19)	0.9939
"G 75"	± 11.60 (n = 15)	0.9769

Tableau 5 : Précision et linéarité des méthodes examinées (d'après Dieter *et al.*, 1987)

a : moyenne de la déviation standard de n valeurs mesurées (en %).

b : corrélation entre addition et récupération observée.

Sur la gamme complète des additions de MT, la méthode "Cd-hème" donne la meilleure précision, suivie de près par le RIA qui donne cependant une valeur erronée inattendue. Par contre, les 3 autres méthodes montrent des déviations importantes par rapport aux 100 % de récupération espérés (la méthode Hg/TCA surestime toujours les teneurs, SH et G-75 sont toujours au-dessous du niveau espéré).

Néanmoins, au-vu de l'addition la plus faible (1,20 n.mole MT/g poids humide), toutes les méthodes sauf G75 sont précises à 7 %, ce qui indique leur aptitude à quantifier correctement les niveaux de base de MT dans le foie et le rein de rat. Si G-75 sousstime dans tous les cas les teneurs, c'est encore une fois à cause de la non-saturation préalable de tous les sites en Cd.

Par rapport à la liste des méthodes décrites dans un précédent paragraphe, 2 protocoles n'ont pas été étudiés dans l'intercalibration de Dieter *et al.*, à savoir le test ELISA et la méthode polarographique.

Le principe de l'ELISA étant le même que celui du RIA en ce qui concerne les liaisons spécifiques (seule la détection finale diffère), on peut penser a priori que ces 2 méthodes réalisent les mêmes performances. Garvey *et al.* (1987) ont comparé ces 2 méthodes développées dans leur laboratoire, en étudiant des cytosols de foie de rat.

X	pg Mt/ μ l		X	pg MT/ μ l	
	ELISA	RIA		ELISA	RIA
1	275(258)	199(144)	11	1516(324)	1317(134)
2	420(174)	324(125)	12	1551(330)	1511(134)
3	635(184)	897(130)	13	1802(352)	2193(147)
4	664(212)	816(128)	14	1806(354)	2199(148)
5	911(244)	1081(127)	15	2487(430)	2825(166)
6	994(256)	1033(128)	16	2768(494)	2330(162)
7	1140(292)	943(132)	17	3098(492)	2887(222)
8	1205(296)	1015(126)	18	3155(502)	3535(287)
9	1306(298)	1390(133)	19	5775(799)	5995(626)
10	1385(306)	1419(137)	20	6682(869)	6477(704)

Tableau 6 : Quantification de cytosols par les méthodes RIA et ELISA (d'après Garvey *et al.*, 1987). La déviation standard figure entre parenthèses.

Les données du tableau 6 montrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre les résultats obtenus par les 2 méthodes (coefficient de corrélation = 0,990).

Enfin, pour ce qui concerne la précision de la méthode polarographique, on peut se référer à l'étude de Onosaka et Cherian (1982), qui ont comparé les résultats obtenus par cette méthode à ceux obtenus par la méthode de saturation par le Cd, les échantillons étant des foies ou des reins de rat ayant reçu au préalable des injections de sulfate de zinc ou de chlorure de cadmium à forte dose. Cette expérience étudie l'aptitude des 2 méthodes à doser des quantités relativement élevées de métallothionéines (supérieures à 20 $\mu\text{g/g}$).

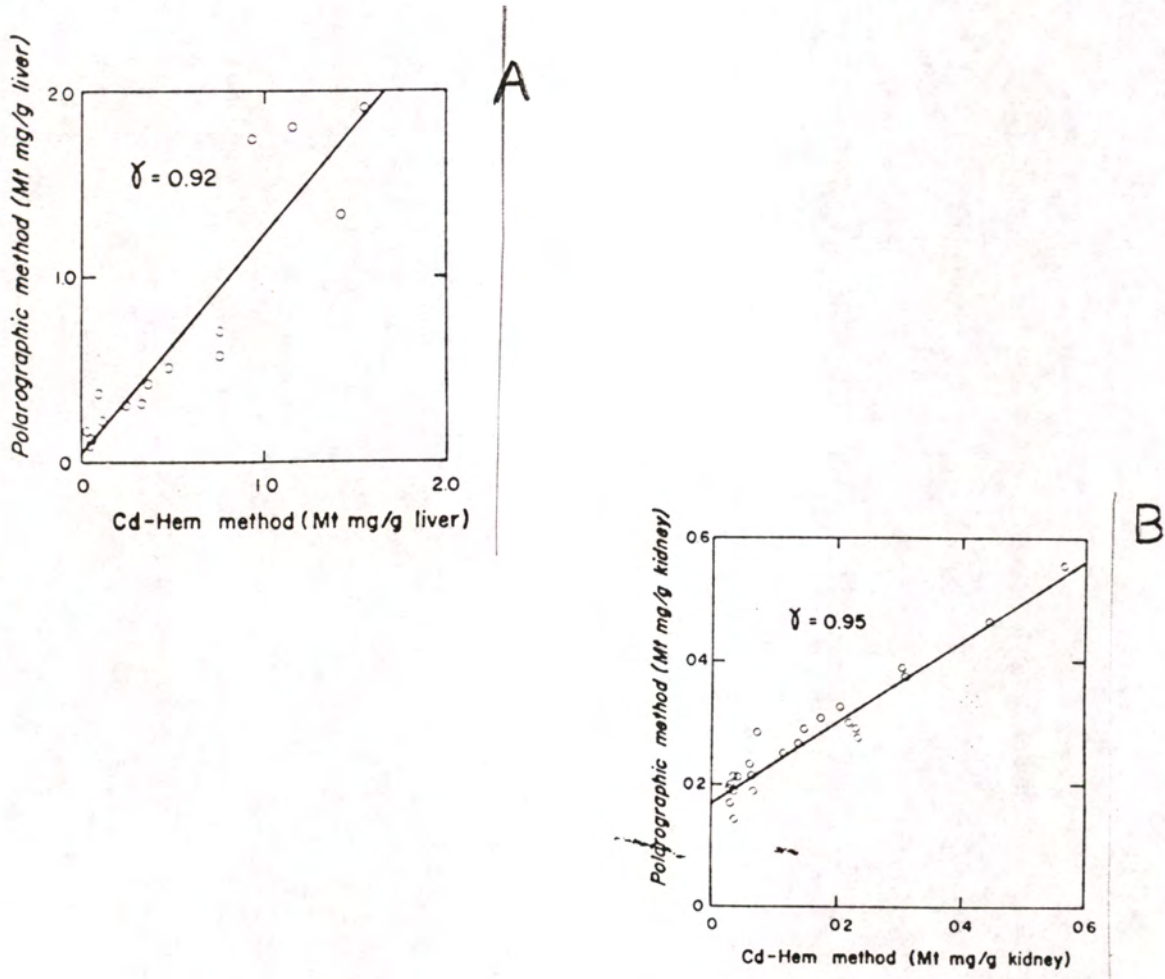


Figure 10. : Comparaison de la teneur en métallothionéines de foie (A) ou de rein (B) de rat déterminées par polarographie et méthode Cd-hémoglobine (d'après Onosaka et Cherian, 1982).

La corrélation entre les 2 méthodes est satisfaisante, avec une surestimation de la teneur en métallothionéines à faible dose pour la méthode polarographique par rapport à la méthode de saturation.

Ces résultats plus élevés par la méthode polarographique se retrouvent dans une expérience où Onosaka et Cherian (1982) ont analysé la réponse biologique de foies de rat à des injections répétées de chlorure de cadmium.

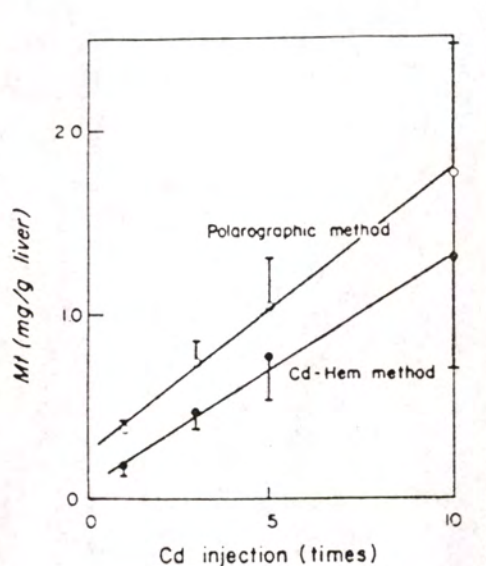


Figure 11. - Niveau de métallothionéines hépatiques de rat ayant reçu des injections répétées de Cd Cl_2 (d'après Onosaka et Cherian, 1982).

Dans ce cas encore sauf à faible dose, les 2 méthodes montrent une corrélation assez satisfaisante, avec toujours des résultats plus élevés par la méthode polarographique.

En conclusion de ce paragraphe, on peut écrire que seules les méthodes Hg/TCA et chromatographique posent de réels problèmes de précision, de même que la méthode polarographique pour les mesures de faibles concentrations.

1.3.1.3. - Reproductibilité

Pour toutes les méthodes employées pour la quantification des métallothionéines dans des échantillons biologiques, (Cd-hémoglobine, polarographie, RIA, ELISA), les résultats exprimés sont toujours une moyenne d'au-moins 6 réplicats et dans tous les cas, dès que l'on s'éloigne de la limite de détection, le coefficient de variation ne dépasse pas 15 %. Nous ne disposons pas de telles données pour ce qui concerne la méthode au DTNB, les méthodes chromatographiques ni la méthode Hg/TCA. L'étude de Dieter *et al.* (1987), rapportée dans le tableau 5, montre toutefois que ces méthodes offrent des résultats reproductibles sur un grand nombre de mesures.

1.3.2. - FAISABILITE DES DIFFERENTES METHODES

1.3.2.1 - Temps d'analyse

Nous nous limiterons dans ce paragraphe à évaluer le temps total nécessaire pour obtenir un résultat, sans tenir compte de la possibilité d'effectuer des analyses en série, et sachant que dans tous les cas, l'échantillon biologique aura été traité, pour obtenir un surnageant clair, par une étape d'homogénéisation-centrifugation d'environ 3 heures.

	Dénaturation Thermique	Isolement des Métallothionéines	Mesure du paramètre		Temps total d'analyse
			Prétraitement	mesure	
G75/AAS	15'	18 h	4 h	2 h	24 h
HPLC/AAS	15'	30'	4 h	1 h	6 h
Cd-héme		1 h	4 h	10'	5 h
Hg/TCA		20'		5'	25'
Polarographie	15'			5'	20'
DTNB	15' (a)	15 h (b)		30'	45' (a) 15 h (b)
RIA		35 h		5'	35 h
ELISA		30 h		5'	30 h

Tableau 7 : Temps d'analyse de la teneur en métallothionéines d'un échantillon biologique.

(a) : séparation par simple dénaturation thermique.

(b) : fractionnement par solvants.

Les temps d'analyses pour les différentes méthodes sont très inégaux. Les méthodes Hg/TCA et polarographique sont les plus rapides et les méthodes immunologiques, du fait de leur complexité et du nombre important d'étapes dans leur protocole, sont très longues.

1.3.2.2 - Accessibilité des méthodes

1.3.2.2.1 - Matériel

Toutes les méthodes demandent un équipement de laboratoire spécialisé : chromatographe en phase liquide, spectrophotomètre d'absorption atomique, polarographe, spectrophotomètre UV ou lecteur de plaques, fluorimètre.

Cependant, les méthodes Hg/TCA et RIA requièrent en outre des équipements spécialisés pour la manipulation d'éléments radioactifs.

Les réactifs utilisés sont courants pour tout laboratoire d'analyse et ne posent pas de problèmes de conservation ni de risque pour la santé, sauf en ce qui concerne encore une fois les méthodes dans lesquelles la détection est basée sur la radioactivité de certains éléments. L'obtention et la manipulation de ceux-ci sont nécessairement le fait des laboratoires spécialisés cités plus haut.

Les anticorps spécifiques utilisés dans les méthodes immunologiques sont produits directement dans les laboratoires d'analyse.

1.3.2.2.2. - Compétence technique

Toutes les méthodes non immunologiques, bien que classiques pour des laboratoires spécialisés, demandent une habileté technique de niveau élevé, à savoir une bonne pratique des matériels sophistiqués et une maîtrise parfaite des paramètres influençant la qualité des résultats.

Cependant, en ce qui concerne les immunoessais, une compétence particulière et une expérience importante dans la production d'anticorps est absolument nécessaire. La conduite de toutes les étapes d'isolement demande une technique très éprouvée et donc la spécialisation requise par ces techniques dépasse de beaucoup celle demandée dans les autres méthodes.

1.3.2.2.3. - Analyses en série et automatisation

1.3.2.2.3.1. - Méthodes chromatographiques

En chromatographie classique sur G75, le temps relativement long de séparation des protéines est un facteur limitant pour le temps total d'analyse. L'utilisation de passeur d'échantillons n'est d'aucune utilité. Seul un collecteur de fraction peut rendre l'opération moins fastidieuse.

En HPLC, un passeur d'échantillon automatise une série de séparations, et en utilisant un collecteur de fractions, on peut effectivement travailler en routine. L'utilisation d'un passeur d'échantillon en absorption atomique, après minéralisation simultanée d'une série d'échantillons rend la méthode satisfaisante pour traiter des grandes séries avec la restriction cependant qu'elle fait appel à plusieurs opérations unitaires, séparation, minéralisation, absorption atomique.

1.3.2.2.3.2. - Substitution par des métaux

L'étape d'isolement des protéines peut être simultanée dans une grande série d'échantillons. Avec la même remarque que précédemment en ce qui concerne la détection des métaux, on arrive à des méthodes pouvant convenir à l'analyse en routine.

1.3.2.2.3.3. - Polarographie

La méthode n'est pas automatisable.

1.3.2.2.3.4. - Méthode au DTNB

L'avènement des lecteurs de microplaque a rendue possible la lecture simultanée de l'absorption UV d'un grand nombre d'échantillons, sans perdre pour autant en sensibilité. Dans ce cas, on dispose une méthode idéale pour l'analyse en routine.

1.3.2.2.3.5. - Immunoessais

On peut réaliser ces dosages sur une série d'échantillons simultanément. Mais la durée très importante d'une analyse reste cependant un facteur limitant pour l'analyse en routine.

1.3.3. - CONCLUSION

Pour quantifier la teneur en métallothionéines dans des échantillons biologiques, la méthode la plus rigoureuse serait une méthode de mesure directe, n'utilisant pas de coefficients de corrélation plus ou moins bien connus ; c'est le cas des immunoessais, d'autant plus que si le RIA posait des problèmes à cause de manipulation de radionucléides, l'ELISA les a résolus en utilisant une détection par fluorescence et ses performances sont comparables à celles du RIA.

L'ELISA est une méthode longue, mais très précise et sensible. Elle est donc particulièrement adaptée à des études ponctuelles, dans des cas où les MT ont déjà été isolées et purifiées, et donc où la production d'anticorps spécifiques est possible. Cependant, dans une étude de métallothionéines plus ou moins bien connues ou de "métallothionein-like proteins", la réactivité croisée avec des anticorps polyclonaux du commerce n'est pas très bonne et on perd donc beaucoup en sensibilité et en précision.

Les méthodes de dosage des métallothionéines au moyen des groupements SH (polarographie, DTNB) sont très rapides et assez sensibles. Elles mesurent cependant tous les groupements SH des molécules thermostables, propriété qui n'est pas spécifique aux métallothionéines, et il y a risque de surestimer les niveaux dans des conditions de faibles teneurs. De plus, le résultat sera exprimé en concentration de SH plutôt qu'en concentration de protéine dans le cas où les "métallothionein-like proteins" recherchées ne sont pas précisément identifiées quant au rapport molaire SH/métallothionéine. Ce sont cependant des méthodes de suivi particulièrement adaptées aux grandes séries d'échantillons.

Les méthodes de saturation par les métaux (Cd, Hg) sont plus spécifiques que les précédentes, car, de par leur principe, elles n'analysent indirectement que les métallothionéines. Ce principe étant la différence d'affinité des métallothionéines pour les métaux ($Hg > Ag > Cu > Cd > Zn$), la méthode Hg/TCA pourrait être très intéressante si elle n'imposait pas la manipulation d'éléments radioactifs ; de plus, sa précision est souvent mise en doute dans des exercices d'intercomparaison entre différentes méthodes. La méthode "Cd-hème" est reconnue précise et facile à utiliser. Cependant, elle se limite à l'analyse des Zn et Cd-thionéines et les résultats seront plutôt exprimés en quantité de Cd saturant les métallothionéines qu'en concentration de celles-ci, si elles ne sont pas identifiées quant à leur rapport molaire Cd/métallothionéine. Cette méthode est aussi à conseiller dans le cadre d'un suivi.

Enfin, les méthodes chromatographiques sont longues et fastidieuses, et plutôt adaptées à la mise en évidence, l'isolement et la caractérisation de métallothionéines inconnues. Leur utilisation pour la quantification demande soit une saturation préalable de tous les sites de fixation par un métal d'affinité importante pour les métallothionéines et une analyse de ce métal, soit une analyse multi-métaux.

METHODE	AVANTAGES	INCONVENIENTS	UTILISATION SOUHAITABLE
Chromatographie + Absorption atomique SEPHADEX	très sensible	pas précise très longue	caractérisation de métallothionéines inconnues
HPLC	assez sensible séries	peu précise	détection isolement
Cd-héme	très précise assez rapide séries assez spécifique	peu sensible	monitoring
Hg/TCA	très rapide	peu précise peu sensible radio activité	
Polarographie	très rapide très sensible facile à utiliser automatisable	assez peu spécifique assez peu précise à faible niveau	monitoring
DTNB	rapide facile à utiliser	assez peu spécifique assez peu sensible	monitoring grandes séries d'analyse
RIA	très sensible très précise très spécifique	difficile à utiliser radioactivité	
ELISA	très sensible très précise très spécifique	difficile à utiliser	quantification de niveaux de base petites série d'analyses

Tableau 8 - Mérites respectifs des différentes méthodes d'analyse des métallothionéines.

CHAPITRE 2.- IDENTIFICATION DES LABORATOIRES SPECIALISES DANS L'ETUDE DES METALLOTHIONEINES

2.1. - LABORATOIRES FRANCAIS

Un programme de recherche du CNRS, financé par le PIREN, d'une durée de 2 ans, a débuté en avril 1988 et est intitulé : "Adaptation des organismes aux pollutions métalliques ; approche moléculaire et génétique par l'étude des métalloprotéines". Ce programme est coordonné par M. WEGNEZ (Laboratoire d'embryologie moléculaire et expérimentale, ORSAY) et a pour objectif de comprendre les mécanismes moléculaires et génétiques impliqués dans les réponses des organismes aux pollutions métalliques. Ce programme comprend 2 volets, d'une part l'étude des mécanismes de détoxification chez des espèces aquatiques (algues unicellulaires, annélides polychètes, mollusques et téléostéens) et d'autre part l'étude des mécanismes d'acquisition de la résistance au cadmium, dans une approche par la génétique moléculaire.

Ce programme concerne les 10 laboratoires suivants :

a - Laboratoire d'embryologie moléculaire et expérimentale, université PARIS XI, ORSAY

A. DEBEC
R. MOKDAD
M. WEGNEZ

b - Centre de dosage des éléments traces, faculté des sciences pharmaceutiques, université de Nantes

J.C. AMIARD
C. AMIARD-TRIQUET
R. COSSON

c - Laboratoire de biologie cellulaire, faculté de pharmacie, université PARIS XI, CHATENAY-MALABRY

A. BARIAUD
J. BONALY

d - Laboratoire d'écotoxicologie des pesticides, université PARIS XI, ORSAY

R. COSSON

e - Laboratoire d'endocrinologie des invertébrés, université de LILLE, VILLENEUVE D'ASCQ

N. DHAINAUT-COURTOIS
A. NEJMEDDINE

f - Laboratoire de cytophysiologie et toxicologie cellulaire, université PARIS VII

E. HEUILLET
F. MARANO

g - Laboratoire de bioaccumulations naturelles et induites, université PARIS VI

R. MARTOJA

h - Laboratoire "mer et santé", unité INSERM, VILLEFRANCHE sur MER

S. PUISEUX-DAO

i - Station marine de WIMEREUX

C. DELVAL
A. RICHARD

j - Laboratoire de biologie cellulaire, INRA de VERSAILLES

V. PAUTOT
M. TEPFER

2.2. - LABORATOIRES ETRANGERS

2.2.1. - AUSTRALIE

a - School of mathematical and physical sciences, Murdoch university, MURDOCH

V. TALBOT
J. WEBB

b - Australian institute of marine sciences, Cape Ferguson, TOWNS VILLE

R.W. OLAFSON

2.2.2. - BELGIQUE

a - Laboratoire d'océanologie, institut de chimie, université de LIEGE

J.M. BOUQUEGNEAU
F. FRANKENNE
F. NOEL-LAMBOT

2.2.3. - CANADA

a - Ocean Chemistry Division, Institute of Ocean Sciences, SIDNEY

J. A. J. THOMPSON

b - Department of biochemistry and microbiology, University of VICTORIA

J.A. MAC CARTER
R.W. OLAFSON
M. ROCH

c - Department of pharmacology, toxicology and pathology, University of western Ontario, LONDON

G. CHERIAN
S. ONOSAKA

d - Institute of oceanography, University of British Columbia, VANCOUVER

D.A. BROWN

e - Department of biochemistry and pathology, Dalhousie University, HALIFAX

Z.A. SHAIKH

2.2.4. - DANEMARK

a - Marine pollution laboratory, national agency of environmental protection, CHARLOTTENLUND

K. KOHLER

2.2.5. - ETATS-UNIS

a - Department of Biology and Curriculum in Genetics, University of North Carolina, CHAPELL HILL

G. MARONI
E. OTTO

b - Molecular Ecology Institute, Department of Biology, California State University, LONG BEACH

K.D. JENKINS

c - Environmental Sciences Division, Lawrence Livermore National Laboratory, University of California, LIVERMORE

F.L. HARRISSON

d - University of Texas, Marine Sciences Institute, Port Aransas Marine Laboratory, PORT ARANSAS

H.W.WOFFORD

**e - Howard HUGUES Medical Institute, Department of biochemistry,
University of Washington, SEATTLE**

R.D. PALMITER

**f - US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Animal
Science Institute, BELTSVILLE (Maryland)**

M.P. RICHARDS

**g - Department of biochemistry, College of Health Sciences, University of
Kansas, KANSAS CITY**

G.K. ANDREWS

**h - Laboratory of Biochemistry, National Cancer Institute, BETHESDA
(Maryland)**

D. H. HAMER

**i - Biology Department, Southeastern Massachussets University, NORTH
DARMOOUTH**

R. J. PRUELL

**j - US Fish and Wildlife Service, Columbia National Fisheries Research
Laboratory, COLUMBIA (MISSOURI)**

S. J. HAMILTON

**k - Department of Pharmacology and Toxicology, University of Rhode Island,
KINGSTON**

C. V. NOLAN

**l - National Marine Fisheries Service, NOAA, Southeast Fisheries Center,
Beaufort laboratory, BEAUFORT (North Carolina)**

D. W. ENGEL

m - Duke University Marine Laboratory, BEAUFORT (North Carolina)

M. BROUWER
B. M. SANDERS

**n - Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University,
NEW HAVEN (Connecticut)**

I. M. ARMITAGE
J. D. OTVOS

o - Department of Medicine and Biochemistry, University of Utah, Medical center, SALT LAKE CITY

D. R. WINGE

P - Department of Biology, Syracuse University, SYRACUSE (NEW-YORK)

J. S. GARVEY
D. G. THOMAS
R. J. VAN DER MALLIE

q - The Johns Hopkins University, BALTIMORE (Maryland)

J. M. FRAZIER

r - Environmental Health Science Center, Oregon State University, CORVALLIS

J. W. RIDLINGTON

s - Battelle, Pacific Northwest Laboratories, Marine Research Laboratory, SEQUIM (Washington)

G. ROESIJADI

t - Department of Chemistry, Laboratory for Molecular Biomedical Research, University of Wisconsin, MILWAUKEE

D. T. MINKEL
D. H. PETERING

u - Laboratory of Environmental Toxicology, National Institute of Environmental Health Sciences, RESEARCH TRIANGLE PARK (N. Carolina)

B. A. FOWLER
P. L. GOERING
K. S. SQUIBB

2.2.6. - ITALIE

a - Institute of Biochemistry, Faculty of veterinary Medicine, University of BOLOGNA

E. CARPENE

b - Istituto di Fisiologica Generale, Universita di GENOVA

A. VIARENGO

2.2.7. - JAPON

a - Department of physiology, Dokkyo University, School of Medicine, MIBU (Tochigi)

H. OHTAKE

b - Department of experimental Toxicology, National Institute of Industrial Health, KAWASAKI (Kanagawa)

M. KIMURA

c - Faculty of Agriculture, Miyazaki University, MIYASAKI

H. TAKEDA

d - Department of Environmental Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teiko University, SAGANIKO

F. OTSUKA

2.2.8. - NORVEGE

a - Department of Toxicology, National Institute of Public Health, OSLO

R. A. ANDERSEN

2.2.9. - PAYS-BAS

a - TNO-CIVO Food Technology Institute, Department Institute For Fishery products, TNO IJMUIDEN

J. B. LUTEN

2.2.10. - REPUBLIQUE FEDERALE D'ALLEMAGNE

a - Institute of Toxicology, University of DUSSELDORF

H. DIETER

b - Anorganisch-Biochemisches Arbeits gruppe, physiologisch-chemisches Institut der Universität, TUBINGEN

G. SOKOLOWSKI

2.2.11. - ROYAUME-UNI

a - National Environment Research Council, Institute of Marine Biochemistry, ABERDEEN (Scotland)

T. L. COOMBS
S. G. GEORGE
J. OVERNELL
H. STONE

b - The laboratory, Marine Biological Association, PLYMOUTH

W. G. LANGSTON

c - Department of Biochemistry, University College, CARDIFF (Wales)

J. KAY

d - Department of Chemistry, University of SOUTHAMPTON

A. G. HOWARD

e - Department of Zoology, University of READING

R. LYON

f - Department of zoology and comparative physiology, Queen Mary College, LONDON

P. S. RAINBOW

2.2.12. - SUEDE

a - Department of Environmental Hygiène, Kardinska Institute, STOCKHOLM

M. NORDBERG

b - Department of Zoophysiology, University of GOTEBORG

C. HAUX
P. E. OLSSON

2.2.13. - SUISSE

a - Biochemisches Institut der Universität, ZURICH

J. H. R. KAGI
M. M. KISSLING
S. KLAUSER
M. VASAK

CHAPITRE 3 – ETUDE DE LA POTENTIALITE D'UTILISATION DES METALLOTHIONEINES COMME BIOINDICATEUR

3.1. – INTRODUCTION

L'utilisation des métallothionéines comme outil de surveillance de la qualité du milieu marin est très tentante par le fait que ces protéines sont le résultat d'une induction par des métaux présents dans l'environnement. Les métallothionéines peuvent donc être considérées comme des indicateurs spécifiques de réponse des organismes à une contamination de leur environnement par les métaux. Mais avant de mettre en oeuvre des programmes de surveillance utilisant ce bioindicateur, il convient de répondre à deux questions :

a - Quelle est la signification de la présence d'un niveau élevé de métallothionéines chez un organisme ? Est-elle révélatrice d'un stress de cet organisme ou fait-elle partie d'un mécanisme parfaitement contrôlé visant à piéger les métaux avant que ceux-ci ne s'incorporent à d'autres molécules vitales pour les cellules ? Dans ce deuxième cas, jusqu'à quel niveau d'exposition l'organisme est-il protégé ?

b - Une variation de la teneur en métallothionéines est-elle corrélée avec un changement des conditions environnementales ? En effet, on sait que certains facteurs indépendants du milieu, comme la reproduction chez les mollusques et la mue chez les crustacés influencent la teneur en métallothionéines (Engel, 1988).

La première question est à l'heure actuelle sans réponse définitive. En ce qui concerne la deuxième, Roesijadi *et al* (1988) ont montré une corrélation étroite entre la concentration en métallothionéines dans la glande digestive de moule et la teneur en Cd ou Hg dans le milieu. Cependant, cette étude a été effectuée en laboratoire, dans des conditions d'intoxication aiguë, et à des concentrations de 1 à 50 $\mu\text{g/l}$. Or, Cossa et Lassus, (1988) dans une synthèse sur le cadmium en milieu marin, ont montré que dans très peu de cas, on rencontre des concentrations en Cd dissous supérieures à 0,5 $\mu\text{g/l}$. Il serait donc souhaitable de connaître la relation entre la teneur en métallothionéines d'organismes marins et la concentration en Cd dissous dans la gamme (0-200 $\mu\text{g/l}$) qui correspond aux concentrations effectivement rencontrées dans l'environnement. Il a donc paru nécessaire de vérifier l'existence de cette relation à partir de plusieurs sites géographiques de la façade Atlantique de la France, où la teneur en Cd dans les organismes correspond à des niveaux d'expositions de 15 à 200 $\mu\text{g/l}$ de Cd (Boutier et Chiffolleau, 1986).

3.2 – MATERIEL ET METHODES

3.2.1. – ORGANISMES

Cinq huîtres *Crassostrea gigas* d'environ trois ans ont été prélevées en octobre 1988 sur quatre stations Réseau National d'Observation (figure 12) , Les Jacquets (Station 115), Pontailac (Station 110), Mus de Loup (Station 107) et Rivedoux (Station 94).

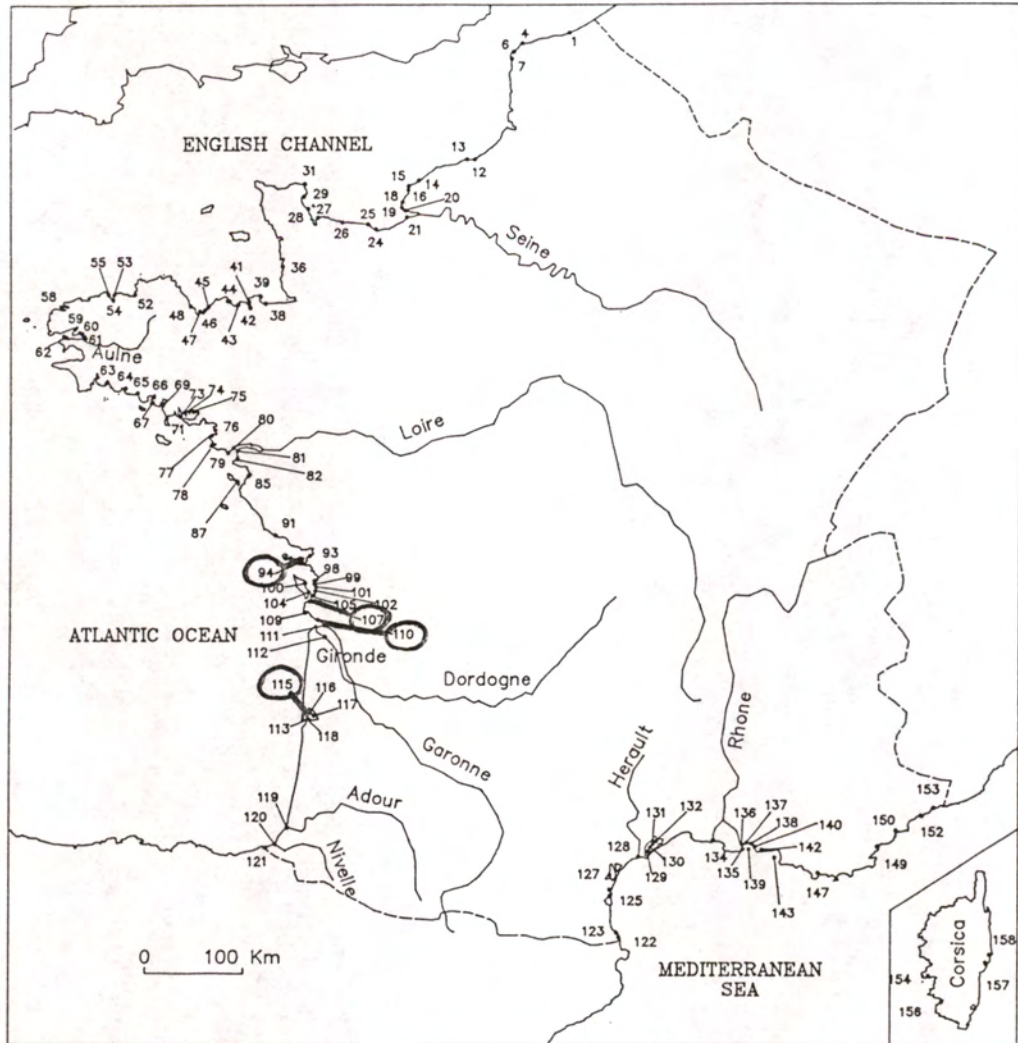


Figure 12 : Sites de prélèvement du Réseau National d'Observation (d'après Claisse, 1989)

Les tissus mous ont été ôtés de la coquille et congelés à -80°C immédiatement après le prélèvement.

3.2.2. - ANALYSE DU Cd TOTAL

Digestion de 1 g d'huître (poids humide) par 4 ml d'acide nitrique MERCK pour analyse, à 90° C pendant 4 h, selon la méthode décrite par Auger (1989). L'analyse a été effectuée au spectrophotomètre d'absorption atomique PERKIN-ELMER à correction ZEEMAN et four graphite.

3.2.3. - ANALYSE DES SH SOLUBLES

Broyage de 3 g d'huître partiellement décongelée avec 4 ml de tampon (phosphate de sodium 0,1 M + NaCl 0,5 M ; pH = 8,0) en présence de PMSF (SIGMA) à température inférieure à 4° C.

Centrifugation à 10 000 t/min pendant une heure à 3° C.

3.2.3.1. - Fractionnement par la chaleur

Prélèvement de 4 ml de surnageant. Chauffage à 80° C au bain-marie pendant 3 minutes. Refroidissement immédiat dans la glace fondante. Centrifugation 1 h à 3° C.

3.2.3.2. - Fractionnement par solvants

Prélèvement de 2 ml de surnageant de départ. Ajout de 2,1 ml d'éthanol et de 0,12 ml de chloroforme, les deux solvants à - 20° C. Centrifugation 15' à 10 000 t/min à T° < - 20° C. Récupération de 2 ml de surnageant. Ajout de 6 ml d'éthanol à - 20° C. Précipitation au congélateur à - 20° C pendant une nuit. Centrifugation et récupération du précipité par 1 ml de tampon phosphate.

3.2.3.3. - Dosage des SH

Dans les cupules de microplaques de lecteur TITERTECK modèle MCC 340, on dépose 300 µl de surnageant, puis 50 µl de DTNB (dithiobis nitrobenzoate à 1 g/l dans le tampon d'extraction) et 10 µl de SDS à 1 %. Lecture de la D.O. à 405 µm après 30 minutes.

3.2.4. - ANALYSE DU Cd SOLUBLE

Même méthode que pour Cd total, avec comme échantillon de départ 1 ml de surnageant obtenu en 3.2.3.1.

3.2.5. - CHROMATOGRAPHIE : CONDITIONS ANALYTIQUES

- Chromatographe VARIAN modèle VISTA 5500 équipé d'un détecteur LDC/Milton Roy Spectomonitor D.
- Colonne : PROTEIN PAK 60 (WATERS).
- Fluide vecteur : le tampon d'extraction.
- Débit : 1 ml/min.
- Quantité injectée : 100 µl.

- Temps d'analyse : 17 minutes.
- Lecture de la D.O. en sortie de colonne, en continu, à 254 nm.
- Volume des fractions récupérées : 500 μ l.

3.3. - RESULTATS

3.3.1. - PERFORMANCES DE LA METHODE AU DTNB

3.3.1.1. - Calibration du lecteur de plaques

Une droite de calibration (figure 13) a été effectuée à partir de solutions pures de glutathion. Chaque point représente une valeur moyenne de cinq réplicats, après correction des absorptions non spécifiques dues aux différents réactifs et solvants

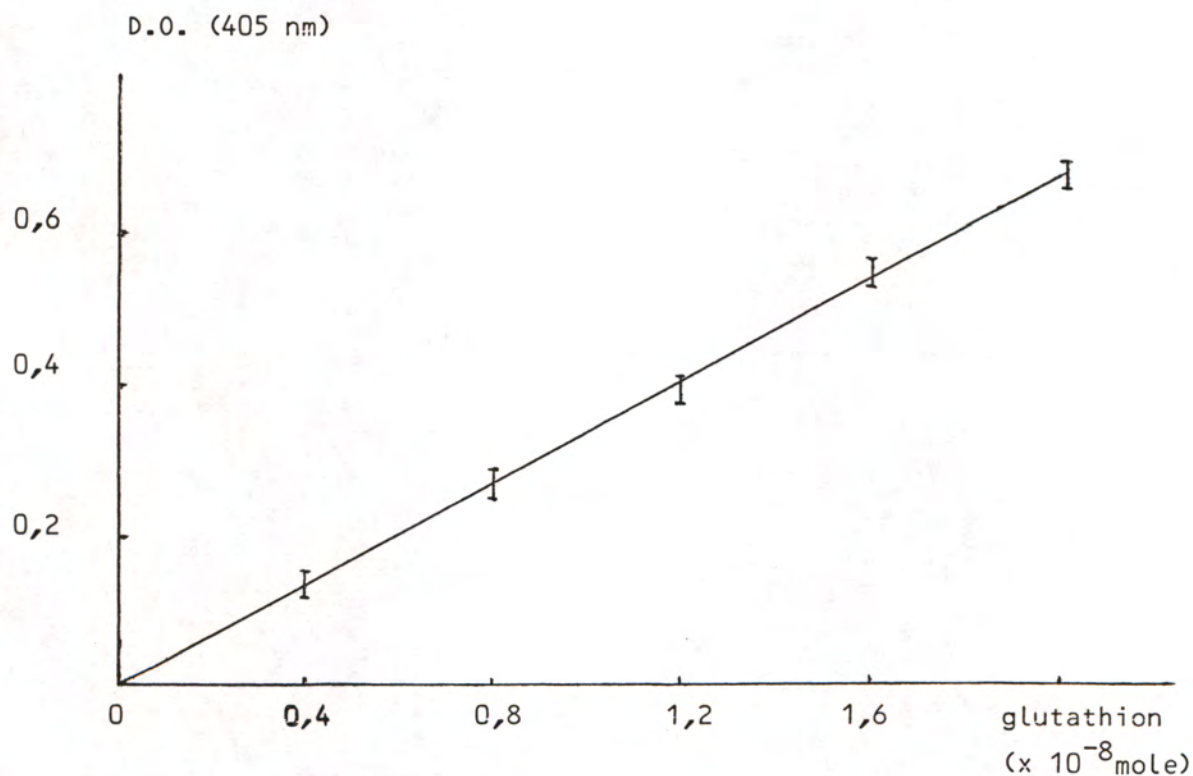


Figure 13 : Courbe de calibration de la mesure de groupements SH au DTNB sur lecteur de plaques.

Il avait été déposé 300 μl de solution de glutathion dans chaque cupule. On peut donc calculer la pente de la droite de calibration :

$$\text{Pente} = 0,67 \text{ D.O.} / 2.10^{-8} \text{ mole} \times (300.10^{-6} \text{ l})^{-1}$$

Soit

$$\text{Pente} = 10\,050 \text{ D.O./SH.l}^{-1}$$

3.3.1.2. - Coefficient d'extinction molaire

Dans les cupules de microplaque, on avait déposé :

- 300 μl de solution de glutathion
- 50 μl de DTNB
- 10 μl de SDS

Donc, pour le point le plus haut de la gamme, on a une concentration en SH de :

$$[\text{SH}] = 2.10^{-8} \text{ mole} / 360 \mu\text{l} = 5,56 \times 10^{-5} \text{ mole/l}$$

Le trajet optique est de 1 cm pour 380 μl de liquide dans une cupule, donc dans notre étude, il est de $360/380 = 0,947$ cm.

Donc le coefficient d'extinction molaire :

$$\text{C.E.M.} = 0,67 / 5,56.10^{-5} \times 0,947$$

$$\text{C.E.M.} = 12\,700 \text{ D.O./mole.l}^{-1}.\text{cm}$$

La valeur de ce coefficient donné par Ellman (1959) est de 13 600. On constate que par notre procédure (utilisation d'un lecteur de plaque), on s'éloigne de moins de 7 % de cette valeur théorique, ce qui peut être dû d'une part à l'incertitude sur la longueur du trajet optique, d'autre part à la longueur d'onde utilisée qui est de 405 nm dans notre cas (filtré livré par le constructeur de lecteur) contre 412 nm dans la méthode de Ellman.

3.3.1.3. - Limites de détection de la méthode

L'écart-type sur une mesure est de 0,005 D.O. On peut donc considérer que la limite de détection est de 0,015 D.O. (3 fois l'écart-type sur une mesure).

$$\text{Donc, L. D.} = 0,015 / 10\,050 \text{ SH/l}$$

$$\text{ou, L. D.} = 1,5 \times 10^{-6} \text{ SH/l}$$

Si on rapporte cette méthode au dosage des métallothionéines "vraies" (PM = 6 000 ; 20 SH/mole de MT).

On a :

$$L. D. = 1,5 \times 10^{-6} \times 6\,000/20$$

$$L. D. = 4,5 \times 10^{-4} \text{ g MT/l}$$

. Cas du fractionnement par la chaleur.

La prise d'essai étant de 3 g de produit frais dans 4 ml de tampon, la concentration de cet extrait frais est donc d'environ 3 g/7 ml.

$$\text{donc } L. D. = (4,5 \cdot 10^{-4}) / (3/7 \cdot 10^{-3}) \text{ g MT/g}$$

$$\text{soit } L. D. = 1 \mu\text{g MT/g}$$

. Cas du fractionnement par solvants

La prise d'essai est de 2 ml du surnageant précédent. Cette solution est étendue à 4,22 ml. La concentration en extrait frais est donc de $(3/7) \times (2/4,22) = 0,203 \text{ g/ml}$.

On prélève alors 2 ml de cette solution (voir "Matériel et Méthodes"), pour arriver à une solution finale d'un volume de 1 ml. On a donc pendant cette étape concentré l'extrait deux fois. Donc :

$$L. D. = (4,5 \cdot 10^{-4}) / (0,203 \cdot 10^{-3} \times 2)$$

Soit :

$$L. D. = 1 \mu\text{g MT/g}$$

On a donc, dans les deux techniques utilisées, abaissé la limite de détection de la méthode par rapport à la valeur annoncée au paragraphe 1.3.1.1., en utilisant une prise d'essai plus importante.

3.3.1.4. - Essai de la méthode avec un standard de métallothionéine

. Standard externe

On a effectué la mesure de cinq répliqués de solution de métallothionéine pure de foie de lapin (SIGMA), d'une concentration de 16,5 $\mu\text{g/ml}$. Les résultats apparaissent au tableau 9.

	MT mesurée ($\mu\text{g/ml}$)	Ecart
Fractionnement par la chaleur	$16,1 \pm 0,2$	- 3 %
Fractionnement par solvants	$14,8 \pm 0,2$	- 10 %

Tableau 9. - Mesure d'une standard externe de métallothionéine par la méthode au DTNB.

. Standard interne

Dans cinq échantillons contenant 1 g d'huîtres et quatre volumes de tampon, on a rajouté 100 μg de métallothionéine pure de foie de lapin. Les résultats apparaissent au tableau 10.

	MT mesurée		MT calculée	Ecart
	contrôle ($\mu\text{g/g}$)	contrôle + standard ($\mu\text{g/g}$)	standard (μg)	
Fractionnement par la chaleur	25 ± 3	118 ± 12	93 ± 8	- 7 %
Fractionnement par solvants	$1,5 \pm 0,2$	93 ± 9	92 ± 5	- 8 %

Tableau 10. - Mesure d'une standard interne de métallothionéine par la méthode au DTNB.

Dans les deux techniques utilisées, l'erreur sur la mesure d'une standard de métallothionéine ne dépasse jamais 10 %.

3.3.2. - CONTAMINATION ENVIRONNEMENTALE DES HUITRES ET DOSAGE DES METALLOTHIONEINES

Sur chaque site de prélèvement (voir "Matériel et Méthodes"), on a effectué les mesures dont les résultats sont rassemblés au tableau 11. Chaque valeur représente la moyenne de mesure de cinq prises d'essais, chaque mesure ayant elle-même été effectuée trois fois.

	Cd total	Cd soluble		Nbre de SH/g ($\times 10^{-9}$)	
	($\mu\text{g/g}$)	$\mu\text{g/g}$	n.mole/g	fractionnement par la chaleur solvants	
Les Jacquets	$0,21 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0,09$	203 ± 7	$5,6 \pm 0,5$
Pontailiac	$5,0 \pm 0,2$	$0,26 \pm 0,02$	$2,3 \pm 0,2$	81 ± 3	$4,9 \pm 0,5$
Mus de Loup	$1,1 \pm 0,1$	$0,13 \pm 0,02$	$1,2 \pm 0,2$	560 ± 11	$5,6 \pm 0,5$
Rivedoux	$0,52 \pm 0,06$	$0,07 \pm 0,01$	$0,63 \pm 0,09$	160 ± 3	$4,9 \pm 0,5$

Tableau 11. - Paramètres de la contamination environnementale des huîtres par le cadmium (toutes les valeurs sont données par rapport au poids humide).

Entre les deux méthodes de dosage des SH, on voit que l'on a une différence considérable quant au résultat, que l'on avait déjà entrevu en standardisant la méthode au moyen d'un étalon interne (tableau 10).

D'après la littérature, le rapport molaire SH/métal pour les métallothionéines est constant et environ égal à 3 (Kagi et Nordberg, 1987). Dans notre étude, il varie de 35 à 467 dans le cas du fractionnement du surnageant par la chaleur, et de 2,1 à 12 en fractionnant le surnageant par les solvants organiques. On peut donc conclure immédiatement que la première méthode (chaleur) dose beaucoup plus de SH que ceux provenant des MT et que la deuxième donne des rapports SH/métal se rapprochant de ceux de la littérature dans deux cas (Pontailiac : 2,3, Mus de Loup : 4,7) et dans les deux autres cas, il est vraisemblable que la MT contient d'autres métaux, les échantillons ayant été prélevés dans des environnements de moindre teneurs en Cd dissous.

Afin de vérifier ces hypothèses, on a effectué une chromatographie sur HPLC de tous les surnageants, avec mesure de la concentration en Cd des fractions récupérées en sortie de colonne.

Les surnageants injectés dans la colonne de chromatographie étaient soit non dénaturés, soit dénaturés à la chaleur. Dans ce dernier cas, on avait au préalable ajouté 100 μl de CdCl_2 à 10 mg/l afin de saturer les sites de fixation de métaux par Cd, et laissé reposer 30 minutes avant l'injection.

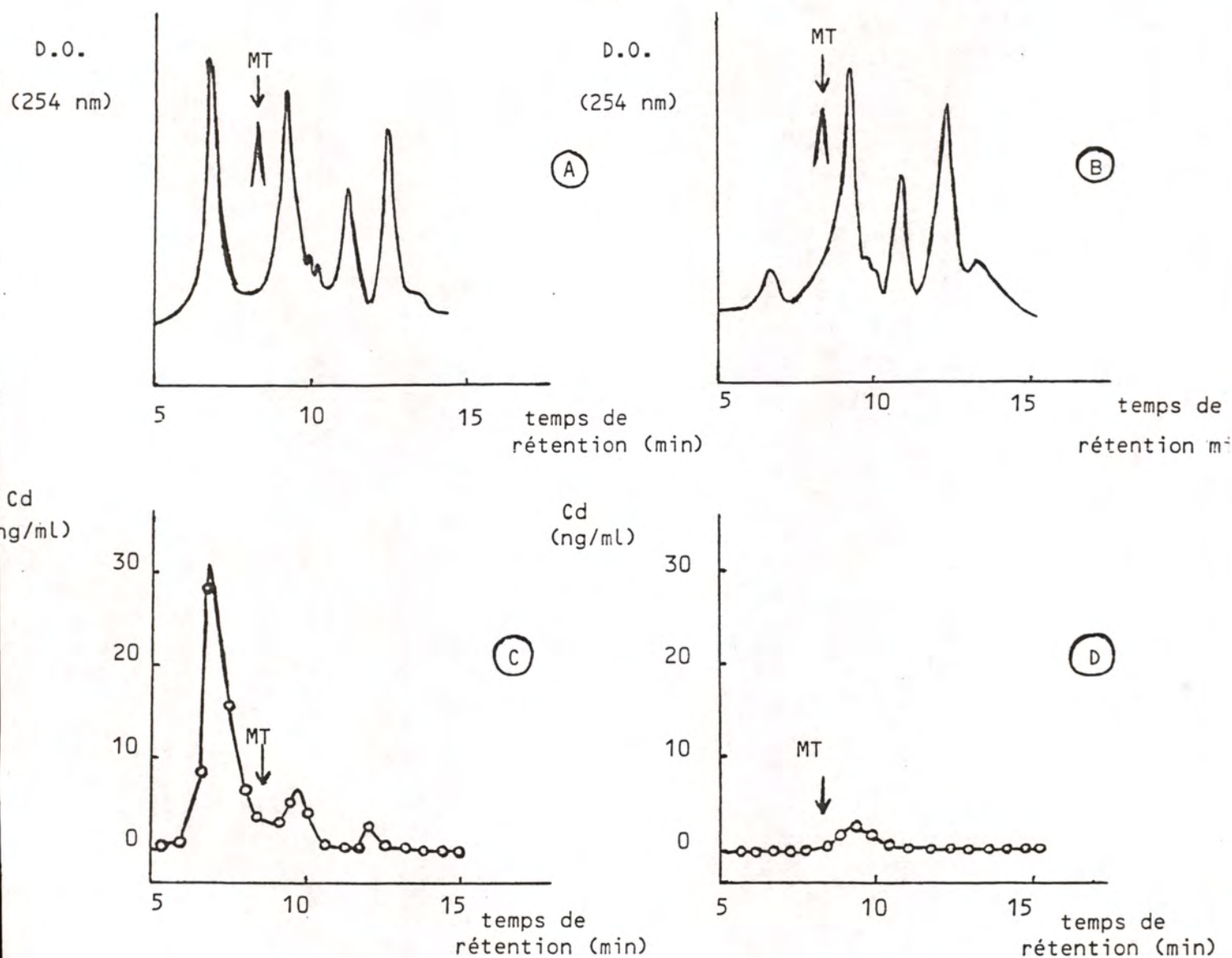


Fig 14. - Chromatogramme de surnageant d'huître de Pontaillac non dénaturée (A et C) ou dénaturée par la chaleur et saturée par CdCl_2 (B et D). MT indique le temps de rétention d'une métallothionéine de foie de lapin ; la solution injectée était diluée deux fois.

Pour tous les échantillons chromatographiés, on retrouve des courbes du même type. On peut remarquer que le pic d'absorption à 254 nm correspondant à un temps de rétention d'environ 7 minutes disparaît après un traitement par la chaleur, et que ce pic correspond à des protéines de poids moléculaire élevé et fixatrices de Cd. La présence de ce pic, puis sa disparition après traitement par la chaleur expliquent en partie la différence entre les valeurs en Cd total (mesurées sur des échantillons non dénaturés) et en Cd solubles (échantillons dénaturés par la chaleur). On peut évaluer dans le cas du site de Pontaillac (les autres sites ont donné des chromatogrammes de surnageant dénaturé similaires à la courbe D), la quantité de Cd lié aux protéines constituant le pic unique de la courbe D. Il correspond à 4 ng de Cd dans les 100 μl de surnageant injectés dans la colonne.

On peut conclure que l'on a bien identifié une "MT-like Protein" dans les quatre sites étudiés, de poids moléculaire inférieur à celui de la MT de foie de lapin, et correspondant à 4 ng environ de Cd dans le volume injecté. On peut essayer par cette méthode chromatographique de quantifier la teneur en métallothionéine des échantillons étudiés (cas de Pontaillac).

Cd récupéré = 4 ng

Volume injecté = 100 μ l

La teneur de la solution en Cd correspondant à une MT est donc de $2 \times (4/0,1)$ ng/ml en tenant compte de la dilution au 1/2 préalablement à l'injection dans la colonne de chromatographie. La concentration de l'échantillon de départ était de 3 g dans 7 ml. On a donc une teneur en Cd correspondant à une MT de :

$$[\text{Cd (MT)}] = 2 \times (4/0,1) \times 7/3 \text{ ng/g}$$

$$[\text{Cd (MT)}] = 187 \text{ ng/g}$$

Si on utilise le coefficient 3 pour utiliser le rapport SH/Cd, on peut écrire :

$$[\text{Cd (MT)}] = \frac{187}{112} \text{ n.mole/g}$$

$$\text{et } [\text{SH (MT)}] = 3 \times \frac{187}{112} \text{ n.mole/g}$$

$$\text{soit } [\text{SH (MT)}] = 5.10^{-9} \text{ mole/g}$$

Ce résultat, obtenu par calcul et approximation (SH/Cd = 3) est tout à fait en accord avec la valeur de SH mesurés par la méthode de fractionnement par solvants et lecture de la DO à 405 nm. En se référant à des valeurs caractéristiques données par Squibb *et al.* (1984) pour les huîtres (PM = 7 400 ; 6 SH/mole MT), on peut calculer la teneur en MT des 4 échantillons étudiés :

	Teneur en MT
Les Jacquets (Arcachon)	$7 \pm 1 \mu\text{g/g}$
Pontailiac (Gironde)	$6 \pm 1 \mu\text{g/g}$
Mus de Loup (Marennes)	$7 \pm 1 \mu\text{g/g}$
Rivedoux (Pertuis Breton)	$6 \pm 1 \mu\text{g/g}$

Tableau 12. - Teneur en métallothionéines des tissus mous d'huîtres de la façade Atlantique.

3.4. - DISCUSSION

Pour doser des métallothionéines dans des échantillons biologiques, la méthode de dosage des SH par le DTNB après fractionnement par solvants s'est avérée satisfaisante pour des dosages en routine. Elle est précise, assez sensible et ne nécessite pas d'appareillage sophistiqués. Le lecteur de plaque apporte un progrès par rapport à un spectrophotomètre UV classique par sa rapidité et sa facilité d'utilisation.

L'isolement des métallothionéines dans des tampons classiques et une dénaturation par la chaleur est très rapide, mais crée une erreur qui peut être très importante à des niveaux très faibles de métallothionéines. Ceci pourrait expliquer les surestimations de la méthode de dosage des SH par polarographie (même principe) dans l'intercalibration de Onosaka et Cherian (1982), que l'on a rapportée au paragraphe 1.3.1.2.

Pour ce qui concerne l'utilisation des métallothionéines de mollusques comme bioindicateurs, on a montré que la teneur en métallothionéines d'huîtres en octobre 1988 était d'environ 6 $\mu\text{g/g}$, et qu'elle ne variait pas entre des sites réputés propres comme le bassin d'Arcachon (site des Jacquets) et des sites connus pour être très contaminés par le cadmium comme l'estuaire de la Gironde (site de Pontailac).

Cette constatation a pour signification que s'il existe un seuil de concentration à partir duquel se produit une induction des métallothionéines chez les huîtres, ce seuil est supérieur aux concentrations de Cd en Gironde, et à fortiori aux teneurs même très élevées rencontrées dans l'environnement marin. Une contamination par le Cd ne peut donc pas être décelée par la mesure des métallothionéines chez les huîtres, de même que chez les huîtres aucun effet d'une contamination importante par le Cadmium ne peut être perçu par la seule analyse des métallothionéines.

La métallothionéine d'huître n'est donc pas un indicateur assez sensible pour être utilisé en surveillance de la qualité du milieu marin.

REFERENCES

- AMIARD-TRIQUET C., AMIARD J.C., BALLAN-DUFRANCAIS C., BERTHET B., GOUZERH D., JEANTET A. Y., MARTOJA R., TRUCHET M., (1987). Study of the bioaccumulation at the molecular, cellular and organism levels of silver transferred to the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg directly from water or via Food. Dans : Heavy Metals in the Environment, vol. 2, Lindberg and Hutchinson eds, 488-490.
- ANDERSEN R.A., DAAE H.L. (1988). Preparation of Metallothionein from rat liver and studies of its properties with respect to use as a standard in gel permeation chromatography, polyacrylamide gel systems, autoradiography and western blotting. Comp. Biochem. Physiol. vol. 90B, n° 1 : 59-67.
- ANDREWS G.K., GALLANT K.R., CHERIAN M.G. (1987). Regulation of the ontogeny of rat liver Metallothionein mRNA by Zinc. Eur. J. Biochem. 166 : 527-531.
- ARMITAGE I.M., OTVOS J.D., BRIGGS R.W., BOULANGER Y. (1982). Structure elucidation of metal-binding sites in Metallothionein by ^{113}Cd NMR. Fed. Proc. 41 : 2974-2980.
- AUGER D. (1989). Méthode de dosage du cadmium, du cuivre, du plomb et du zinc dans la chair de poissons. Rapport IFREMER, DERO-89-07-MR.
- BARIAUD A., MESTRE J.C. (1984). Heavy metal tolerance in a cadmium-resistant population of *Euglena gracilis*. Bull. Env. Cont. Tox. 32 : 597-601.
- BARIAUD A., BURY M., MESTRE J.C. (1985). Mechanism of cadmium resistance in *Euglena gracilis*. Physiol. Plant. 63 : 382-386.
- BOUQUEGNEAU J.M., MARTOJA M., TRUCHET M. (1983). Localisation biochimique du cadmium chez *Murex trunculus* L. (Posobranche Neogastéropode) en milieu naturel non pollué et après intoxication expérimentale. C.R. Acad. Sci. Paris, t. 296 : 1121-1124.
- BOUQUEGNEAU J.M., GERDAY C.H., DISTECHE A. (1975). Fish Hg-binding thionein related to adaptation mechanisms. FEBS Lett. 55 : 173-177.
- BOUTIER B., CHIFFOLEAU J.F. (1986). La contamination par le cadmium en Gironde et son extension sur le plateau continental. Rapport IFREMER, DERO-86-12-MR.
- BRDICKA R. (1933). Polarographie studies with the dropping mercury cathod. Part XXXI. A new test for proteins in presence of cobalt salts in ammoniacal solutions of ammonium chloride. Collect. Crech. Chem. Commun. 5 : 112-128.
- BROUWER M., BROUWER-HOEXUM T., ENGEL D.W. (1984). Cadmium accumulation by the blue crab *Callinectes sapidus* : involvement of Hemocyanin and characterisation of cadmium-binding proteins. Mar. Env. Res. 14 : 71-88.
- BROUWER M., WHALING P., ENGEL D.W. (1986). Copper-Metallothioneins in the american Lobster, *Homopus americanus* : potential rôle as Cu (I) Donors to apohemocyanin. Env. Health persp., vol 65 : 93-100.
- BROUWER M., ENGEL D.W., BONAVENTURA C., BONAVENTURA J. (1986). Toxic trace metals and Trace-metal binding proteins in marine organisms. An overview. In : Biology of benthic marine organisms, Mary-Frances Thompson, Rachakonda Sarojini and Rachakonda Nagabhushanam (Editors). Oxford and IBM Publ. Co, New Delhi, India : 97-109.

- BROWN D.A. (1977). Increases of Cd and Cd : Zn ratio in the high molecular weight protein pool from apparently normal liver of tumor-bearing flounders (*Parophrys vetulus*). Mar. Biol. 44 : 203-209.
- BROWN D.A., PARSONS T.R (1978). Relationship between cytoplasmic distribution of mercury and toxic effects to zooplankton and chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) exposed to mercury in a controlled ecosystem. Journal of the Fisheries Board of Canada. 35 : 880-884.
- BROWN D.A., BAY S.M., ALFAFARA J.F., HERSHELMAN G.P., ROSENTHAL K.D. (1984). Detoxification/toxification of cadmium in scorpionfish (*Scorpaena guttata*) : acute exposition. Aquat. Tox. 5 : 93-107.
- CARPENE E., CORTESI P., CRISSETIG G., SERRA ZANETTI G.P. (1980). Cadmium-binding proteins from the mantle of *Mytilus edulis* (L.) after exposure to cadmium. Thalassia Yougoslavica 16 : 317-323.
- CHERIAN M.G. (1974). Isolation and purification of cadmium binding proteins from rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 61 : 920-926.
- CHERIAN M.G., GOYER R.A, DELAQUERRIERE-RICHARDSON L. (1976). Cadmium-metallothionein-induced nephropathy. Tox. Appl. Pharm. 38 : 399-408.
- CHERIAN M.G. (1983). Absorption and tissue distribution of cadmium in mice after chronic feeding with cadmium chloride and cadmium-metallothionein. Bull. Env. Cont. Tox. 30 : 33-36.
- CHERIAN M.G., NORDBERG M. (1983). Cellular adaptation in metal toxicology and metallothionein. Toxicology 28 : 1-15.
- CLAISSE D. (1989). Chemical contamination of French coasts. The results of ten years mussel watch. Mar. Poll. Bull. Vol 20, N° 10 : 523-528.
- COOMBS T.L. (1974). The nature of zinc and copper complexes in the oyster *Ostrea edulis*. Mar. Biol. 28 : 1-10.
- COOMBS T.L. (1977). Uptake and storage mechanisms of heavy metals in marine organisms. Proc. anal. div. chem. soc. 14 : 219-222.
- COOMBS T.L., GEORGE S.G. (1978). Mechanisms of immobilization and detoxification of metals in marine organisms. Physiology and behaviour of marine organisms, Pergamon Press, New York, 179-187.
- COSSA D., LASSUS P. (1988). Le cadmium en milieu marin : biogéochimie et écotoxicologie. Rapport IFREMER n° 16 ; SDP, Brest (France). 112 pp.
- COSSON R.P., THOMPSON J.A.J. (1983). Utilisation de l'électrode PAR 303 pour la détection et le dosage des métallothionéines dans les tissus d'invertébrés marins. Analisis, vol. 11, N° 1 : 33-35.
- DEBEC A., MOKDAD R., WEGNEZ M. (1985). Metallothionein and resistance to cadmium poisoning in *Drosophila* cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 127 : 143-152.
- DELVAL C. (1984). Réactions du flet vis à vis des pollutions par les métaux (Cu, Zn, Cd et Pb) sur le littoral de la mer du nord : détoxification, métallothionéines. Thèse de 3ème cycle,

université de Lille, 173 pages.

- DHAINAUT-COURTOIS N., NEJMEDDINE A., BAERT J.L., DHAINAUT A. (1987). Localisation immunocytochimique en microscopie électronique d'une protéine complexant le cadmium chez un ver marin (*Nereis diversicolor* O.F. Müller). C.R. Acad. Sci. Paris, 305, série III : 237-241).
- DIETER H.H., MULLER L., ABEL J., SUMMER K.H. (1987). Metallothionein determination in biological materials : interlaboratory comparison of 5 current methods. *Experimentia supplementum* vol. 52 : 351-358.
- ELLMAN G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. of biochem. and biophys.* 82 : 70-77.
- ENGEL D.W., BROUWER M. (1984). Trace metals-binding proteins in marine molluscs and crustaceans. *Mar. env. res.* 13 : 177-194.
- ENGEL D.W., BROUWER M., THURBERG F.P. (1985). Comparison of metal metabolism and metal-binding proteins in the blue crab and american lobster. In : *Marine Pollution and Physiology, recent advances*, E.J. VERNBERG, F.P. THURBERG, A. CALABRESE, W. VERNBERG eds. pp. 229-245.
- ENGEL D.W., ROESIJADI G. (1987). Metallothionein : a monitoring tool. In : *Pollution physiology of estuarine organisms*, W.B. VERNBERG, A. CALABRESE, F.P. THURBERG, F.J. VERNBERG eds. pp. 421-438.
- ENGEL D.W. (1987). Metal regulation and molting in the blue crab, *Callinectes sapidus* : copper, zinc and metallothionein. *Biol. Bull.* 172 : 69-82.
- ENGEL D.W. (1988). The effect of biological variability on monitoring strategies : metallothioneins as an example. *Water Ressources Bulletin* Vol 24, n°5 : 981-987.
- FOWLER B.A., ENGEL D.W., BROUWER M. (1986). Purification and characterization studies of cadmium-binding proteins from the american oyster, *Crassostrea virginica*. *Env. Health persp* vol 65 : 63-69.
- FOWLER B.A., MEGGINSON M.M. (1986). Isolation and partial characterization of a high molecular weight Cd, Zn-binding protein from the kidney of the scallop, *Placopecten magillanicus* : Preliminary studies. *Env. health persp.* 65 : 57-62.
- FRANKENNE F., NOEL-LAMBOT F., DISTECHE A. (1980). Isolation and characterization of metallothioneins from cadmium - loaded mussel *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol 66 C : 179-182.
- FRAZIER J.M. (1986). Cadmium-binding proteins in the mussel, *Mytilus edulis*. *Env. Health persp*, vol 65 : 39-43.
- GARVEY J.S., THOMAS D.G., LINTON H.J. (1987). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for metallothionein. *Exp. Suppl.* Vol 52 : 335-342.
- GEORGE S.G., CARPENE E., COOMBS T.L., OVERNELL J., YOUNGSON A. (1979). Characterisation of cadmium-binding proteins from mussels, *Mytilus edulis* (L), exposed to cadmium. *Biochim. Biophys. Acta*, 580 : 225-233.
- GEORGE S.G., VIARENGO A. (1985). A model of heavy metal homeostasis and detoxification in

- mussels. In : Marine pollution and physiology : recent advances. F.J. VERNBERG, F.P. THURBERG, A. CALABRESE, W. WERNBERG (eds). pp.125-143.
- GOERING P.L., KLAASEN C.D. (1984). Tolerance to cadmium-induced toxicity depends on presynthesized metallothionein in liver. *J. Tox. Env. Health.* 14 : 803-812.
- HAMER D.H. (1986). Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 913-951.
- HAMILTON S.J., MEHRLE P.M. (1986). Metallothionein in fish : review of its importance in assessing stress from metal contaminants. *Trans. Ann. Fish. Soc.* 115 : 596-609.
- HARRISON F.L., LAM J.R. (1985). Partitioning of copper among copper-binding proteins in the mussel of *Mytilus edulis* exposed to soluble copper. *Mar. Env. Res.* 16, n° 3 : 151-163.
- HAUX C., OLSSON P.E., THORSEN I., FORLIN L., LARSSON A. (1984). Partial isolation and purification of cadmium-binding proteins from rainbow trout liver. *Mar. Env. Res.* 14 : 456-458.
- HEUILLET E., MOREAU A., HALPERN S., JEANNE N., PUISEUX-DAO S. (1986). Cadmium-binding to a thiol-molecule in vacuoles of *Dunaliella bioculata* contaminated with CdCl₂ : electron probe microanalysis. *Biol. Cell.* 58 : 79-86.
- HOWARD A.G., NICKLESS G. (1975). Protein binding of cadmium, zinc and copper in environmentally insulted limpets *Patella vulgata*. *J. Chromat.* 104 : 457-459.
- HOWARD A.G., NICKLESS G. (1977). Heavy metal complexation in polluted molluscs. I. limpets (*Patella vulgata* and *Patella intermedia*). *Chem. Biol. Interact.* 16 : 107-114.
- HOWARD A.G., NICKLESS G. (1977). Heavy metal complexation in polluted molluscs. II - Oysters (*Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*). *Chem. Biol. Interact.* 17 : 257-263.
- HOWARD A.G., NICKLESS G. (1978). Heavy metal complexation in polluted molluscs. III - Periwinkles (*Littorina littorea*), Cockles (*Cardium edule*) and scallops (*Chlamys opercularis*). *Chem. Biol. Interact.* 23 : 227-231.
- KAGI J.H.R., VASAK M., LERCH K., GILG G.E.O., HUNYIKER P., BERNHARD W.R., GOOD M. (1984). Structure of mammalian metallothionein. *Env. Health Persp.* 54 : 93-103.
- KAGI J.H.R., NORDBERG M. (1987). Metallothionein. *Exp. Suppl.* vol 52 : 1-59.
- KAY J., BROWN M.W., CRYER A., SOLBE J.F. de L.G., SHURBEN D., GARVEY J.S., THOMAS D.G. (1987). Metallothionein gene expression and cadmium toxicity in fresh water fish. *Exp. Suppl.* Vol. 52 : 627-630.
- KIMURA M., OTAKI N., IMANO M. (1979). Rabbit liver metallothionein. Tentative amino acid sequence of metallothionein-B. *Metallothionein*, Birkaüser Verlag : 163-168.
- KISSLING M.M., KAGI J.H.R. (1977). Primary structure of human hepatic metallothionein. *FEBS Lett.* vol 82, N° 2 : 247-250.
- KLAUSER S., KAGI J.H.R., WILSON K.J. (1983). Characterization of isoprotein patterns in tissue extracts and isolated samples of metallothioneins by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. *Biochem. J.* 209 : 71-80.

- KOHLER K., RIISGARD H.U. (1982). Formation of metallothioneins in relation to accumulation of cadmium in the common mussel *Mytilus edulis*. Mar. Biol. 66 : 53-58.
- KOTSONIS F.N., KLAASEN C.D. (1977). Comparison of methods for estimating hepatic metallothionein in rats. Tox. Appl. Pharm. 42 : 583-588.
- LANGSTON W.J., ZHOU M. (1986). An evaluation of the significance of metal binding proteins in the gastropod "*Littorina littorea*". Mar. Biol. 92 : 505-515.
- LANGSTON W.J., ZHOU M. (1987). Cadmium accumulation, distribution and elimination in the bivalve *Macoma balthica* : neither metallothionein nor metallothionein-like proteins are involved. Mar. Env. Res. 21 : 225-237.
- LUTEN J.B., BOUQUET W., BURGGRAAF M.M., RUS J. (1986). Accumulation, elimination and speciation of cadmium and zinc in mussels, *Mytilus edulis*, in the natural environment. Bull. Env. Comt. Toxicol. 37 : 579-586.
- LYON R., TAYLOR M., SINKISS K. (1983). Metal-binding proteins in the hepato pancreas of the crayfish (*Austropotamobius pallipes*). Comp. Biochem. Physiol. vol. 74 C, N° 1 : 51-54.
- Mc CARTER J.A., MATHESON A.T., ROCH M., OLAFSON R.W., BUCKLEY J.T. (1982). Chronic exposure of Coho Salmon to sub-lethal concentrations of copper. - II Distribution of copper between high and low molecular weight proteins in liver cytosol and the possible role of metallothionein in detoxification. Comp. Biochem. Physiol. 72 C : 21-26.
- Mc CARTER J.A., ROCH M. (1983). Hepatic metallothionein and resistance to copper in juvenile Coho Salmon. Comp. Biochem. Physiol. 74C : 133-137.
- MARGOSHES M., VALLEE B.L. (1983). A cadmium protein from the equine kidney cortex. J. Amer.Chem. Soc. 79 : 4813-4814.
- MARONI G., WISE J., YOUNG J.E., OTTO E. (1987). Metallothionein gene duplications and metal tolerance in natural populations of *Drosophila melanogaster*. Genetics, 117 : 739-744.
- MARTOJA R., MARTIN J.L.M. (1985). Recherche des mécanismes de détoxication du cadmium pour l'huître *Crassostrea gigas*. - I - Mise en évidence d'une protéine sulfhydrilée de complexation du métal dans les amœbocytes à zinc et cuivre. C.R. Acad. Sci. Paris, 300, série III : 549-554.
- MARTOJA R., BALLAN-DUFRANCAIS C., JEANTET A.Y., GOUZERH P., AMIARD J.C., AMIARD-TRIQUET C., BERTHET B. et BAUD J.P. (1988). Effets chimiques et cytologiques de la contamination expérimentale de l'huître *Crassostrea gigas* Thunberg par l'argent administré sous forme dissoute et par voie alimentaire. Can. J. Fish. Aquat. Sci. Vol. 45 : 1827-1841.
- MINKEL D.T., POULSEN K., WIELGUS S., SHAW C.F., PETERING D.H. (1980). On the sensitivity of metallothioneins to oxydation during isolation. Biochem J., 191 : 475-485.
- MOKDAD R., DEBEC A., WEGNEZ M., (1987). Metallothionein genes in *Drosophila melanogaster* constitute a dual system. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 84 : 2658-2662.

- NEJMEDDINE A., DHAINAUT-COURTOIS N., BAERT J.L., SAUTIERE P., FOURNET B., BOULENGUER P. (1988). Purification and characterization of a cadmium binding protein from *Nereis Diversicolor*. Comp. Biochem. Physiol., sous presse.
- NOEL-LAMBOT F. (1976). Distribution of Cd, Zn and Cu in the mussel *Mytilus edulis*. Existence of Cd-binding proteins similar to metallothioneins. *Experimentia* 32 : 324-326.
- NOEL-LAMBOT F., BOUQUEGNEAU J.M., FRANKENNE F. (1978). Le rôle des metallothionéines dans le stockage des métaux lourds chez les animaux marins. *Rev. Intern. Océan. Médic.* 49 : 13-20.
- NOEL-LAMBOT F. (1980). Cadmium accumulation correlated with increase in metallothioneins concentration in the limpet *Patella caerulea*. Dans : *Animals and environmental Fitness*, vol 2, Pergamon Press, pp 83-84.
- NOLAN C.V., DUKE E.J. (1983). Cadmium accumulation and toxicity in *Mytilus edulis* : involvement of metallothioneins and heavy-molecular weight protein. *Aquat. toxicol.* 4 : 153-163.
- NORDBERG M., KOJIMA Y. (1979). Metallothionein and others low molecular weight metal-binding proteins. *Metallothionein* : 41-135.
- NORDBERG M., NUOTTANIEMI I., CHERIAN M.G., NORDBERG G.F., KJELLSTROM T., GARVEY J.S. (1986). Characterization studies on the cadmium-binding proteins from two species of New-Zealand oysters. *Env. Health. Persp.* vol 65 : 57-62.
- OHTAKE H., SUYEMITSU T., KOGA M. (1983). Sea urchin (*Authocidaris crassispina*) egg zinc-binding protein. *Biochem J.* 211 : 109-118.
- OLAFSON R.W. (1981). Differential pulse polarographic determination of marine metallothionein induction kinetics. *J. Biol. Chem.* vol 256, n° 3 : 1263-1268.
- OLAFSON R.W. (1987). Electrochemical quantification and characterization of metallothioneins. *Exp. suppl.* vol. 52 : 329-333.
- OLSSON P.E., HAUX C. (1986). Increased hepatic metallothionein content correlates to cadmium accumulation in environmentally exposed perch, *Perca fluviatilis*. *Aquat. Toxicol.* 9 : 231-242.
- OLSSON P.E., HOGSTRAND C. (1987). Subcellular distribution and binding of cadmium to metallothionein in tissues of rainbow trout after exposure to ¹⁰⁹Cd in water. *Env. toxicol. and chem.* vol 6 : 867-874.
- OLSSON P.E., HAUX C., KORLIN L. (1987). Variations in MT hepatic level, Zn and Cu during an annual reproductive cycle in rainbow trout. *Fish. Physiol. Biochem.* 3 : 39-47.
- ONOSAKA S., CHERIAN G. (1982). Comparison of metallothionein determination by polarographic and cadmium saturation methods. *Tox. Appl. Pharm.* 63 : 270-274.
- OTSUKA F., KOIZUMI S., KIMURA M., OHSAWA M. (1988). Silver staining for carboxymethylated metallothioneins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 168 : 184-192.
- OTTO E., YOUNG J.E., MARONI G. (1986). Structure and expression of a tandem duplication of the drosophila metallothionein gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 6025-6029.

- OTVOS J.D., OLAFSON R.W., ARMITAGE I.M. (1982). Structure of a invertebrate metallothionein from *Scylla serrata*. J. Biol. Chem. 257 : 2427-2431.
- OVERNELL J., COOMBS T.L. (1979). Purification and properties of plaice metallothionein, a cadmium-binding protein from the liver of the plaice (*Pleuronectes platessa*). Biochem. J. 183 : 277-283.
- OVERNELL J., TREWHELLA E. (1979). Evidence for the natural occurrence of (Cd-Cu) metallothionein in the crab *Cancer pagurus*. Comp. Biochem. Physiol. C, 64 : 69-76.
- OVERNELL J., McINTOSH R., FLETCHER T.C. (1987). The enhanced induction of metallothionein by zinc, its half-life in the marine fish *Pleuronectes platessa*, and the influence of stress factors on metallothionein levels. Experimentia 43 : 178-181.
- PALECEK E., PECHAN Z. (1971). Estimation of nanogram quantities of proteins by pulse polarographic techniques. Anal. Biochem. 42 : 59-71.
- PALMITER R.D. (1987). Molecular biology of metallothionein gene expression. Exp. Suppl. vol 52, 63-80.
- PAUTOT V. (1987). Construction de gènes chimériques à partir d'un gène métallothionéine marin. Introduction dans les plantes et étude de leur expression. Thèse de doctorat, université Paris XI, 103 pages.
- PETERING D.H., FOWLER B.A. (1986). Discussion summary. Roles of metallothionein and related proteins in metal metabolism and toxicity : problems and perspectives. Env. Health persp. vol 65 : 217-224.
- PIOTROWSKI J.K., BOLANOWSKA W., SAPOTA A. (1973). Evaluation of Metallothionein content in animal tissues. Acta Biochem. Pol. 20 : 207-215.
- PRUELL R.J., ENGELHARDT F.R. (1980). Liver cadmium uptake, catalase inhibition and cadmium thionein production in the killifish (*Fundulus heteroclitus*) induced by experimental cadmium exposure. Mar. Env. Res. 3 : 101-111.
- RAINBOW P.S., SCOTT A.G. (1979). Two heavy metal-binding proteins in the Midgut gland of the crab *Carcinus maenas* Mar. Biol. 55 : 143-150.
- RICHARDS M.P., STEELE N.C. (1987). Isolation and quantitation of metallothionein isoforms using reversed-phase high performance liquid chromatography. J. of chromat. 402 : 243-256.
- RIDLINGTON J.W., FOWLER B.A. (1979). Isolation and partial characterization of a cadmium-binding protein from the american oyster (*Crassostrea virginica*). Chem. Biol. Interact. 25 : 127-138.
- RIDLINGTON J.W., CHAPMAN D.C., GOEGER D.E., WHANGER P.D. (1981). Metallothionein and Cu-chelatin : characterization of metal-binding proteins from tissues of four marine animals. Comp. Biochem. Physiol B, 70 : 93-104.
- ROCH M., Mc CARTER J.A., MATHESON M., CLARK M., OLAFSON R.W. (1982). Hepatic metallothionein in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) : as an indicator of metal pollution in the Campbell River system. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 39 : 1596-1601.

- ROESIJADI G. (1981). The significance of low molecular weight, metallothionein-like proteins in marine invertebrates : current status. *Mar. Env. Res.* 4 : 167-179.
- ROESIJADI G. (1986). Mercury-binding proteins from the marine mussel *Mytilus edulis*. *Env. Health. Res. p.*, vol 65 : 45-48.
- ROESIJADI G., UNGER M.E., MORRIS J.E. (1988). Immunochemical quantification of metallothioneins of a marine mollusc. *Can J. Fish Aquat. Sci.*, vol 45 : 1257-1263.
- SANDERS B.M., JENKINS K.D., SUNDA W.G., COSLTLOW J.D. (1983). Free cupric ion activity in seawater : effects on metallothionein and growth in crab larvae. *Science*, vol. 222 : 53-55.
- SHAIKH Z.A., NOLAN C.V. (1987). Comparison of cadmium-saturation assay and radioimmunoassay for the determination of metallothionein concentration in tissues. *Exp. Suppl.* vol 52 : 343-349.
- SOKOLOWSKI G., WESER U. (1975). Formation, circular dichroism and X-Ray Photoelectron Spectroscopy of hepatic Zn-thionein. *Hoppe Seyler's Z. Physiol-Chem.*, 356 : 1715-1726.
- SQUIBB. K.S., CHIGNELL C.F., FOWLER B.A. (1982). Characterization of oyster cadmium-binding protein : structural studies. *Fed. Proc.* 41, 644.
- SQUIBB. K.S., CHIGNELL C.F., FOWLER B.A. (1984). Structural and metal-binding characteristics of oyster low molecular weight cadmium binding protein. *Mar. Env. Res.* 14 : 453.
- STONE H.C., WILSON S.B., OVERNELL J. (1986). Cadmium-binding components of scallop (*Pecten maximus*) digestive gland. Partial purification and characterization. *Comp. Biochem. Physiol.* vol 85 C. N° 2 : 259-268.
- TAKEDA H., SHIMIZU C. (1982). Existence of the metallothionein-like protein in various fish tissues. *Bull. of Jap. Soc. of Sci. Fish.* 48 (5) : 711-715.
- TALBOT V., MAGEE R.J. (1978). Naturally occurring heavy metal-binding proteins in invertebrates. *Arch. Environ. Cont. Tox.* 7 : 73-81.
- THOMAS D.G., SOLBE J.F. de L.G., KAY J., CRYER A. (1983). Environmental cadmium is not sequestered by metallothionein in rainbow Trout. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 110 : 584-592.
- THOMAS D.G., CRYER A., SOLBE J.F. de L.G., KAY J. (1983). A comparison of the accumulation and protein binding of environmental cadmium in the gills, kidney and liver of rainbow Trout (*S. gairdneri* Richardson). *Comp. Biochem. Physiol C*, 76 : 241-246.
- THOMAS D.G., BROWN M.W., SHURBEN D., SOLBE J.F. de L.G., CRYER A., KAY J. (1985). A comparison of the sequestration of cadmium and zinc in the tissues of rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) following exposure to the metals singly or in combination. *Comp. Biochem. Physiol C*, 82 : 55-62.
- THOMPSON J.A.J., COSSON R.P. (1984). An improved electrochemical method for the quantification of metallothioneins in marine organisms. *Mar. Env. Res.* 11 : 137-152.
- VAN der MALLIE R.J., GARVEY J.S. (1979). Radioimmunoassay of metallothioneins. *J. Biol. Chem.* Vol 254, n° 17 : 8416-8421.

- VASAK M., ARMITAGE I. (1986). Discussion summary. Nomenclature and possible evolutionary pathways of metallothionein and related proteins. *Env. Health Persp.* vol. 65 : 215-216.
- VIARENGO A., PERTICA M., MANCINELLI G., ZANICCHI G., ORUNESU M. (1981). Synthesis of copper-binding proteins in different tissues of mussels exposed to the metal. *Mar. Poll. Bull.* 12 : 347-350.
- VIARENGO A. (1985). Biochemical effects of trace metals. *Mar. Poll. Bull.* Vol 16, n° 4 : 153-158.
- VIARENGO A., PALMERO S., ZANICCHI G., CAPELLI R., VAISSIERE R., ORUNESU M. (1985). Role of metallothioneins in Cu and Cd accumulation and elimination in the gill and digestive gland cells of the *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Mar. Env. Res.* 23-26.
- WEBB J., MACEY D.J., TALBOT V. (1985). Identification of Ferritin as a major high molecular weight zinc-binding protein in the tropical rock oyster, *Saccostrea cucullata*. *Arch. Env. Contam. Toxicol.* 14 : 403-407.
- WINGE D.R., GARVEY J.S. (1983). Antigenicity of metallothionein. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.* 80 : 2472-2476.
- WINGE D.R., BROUWER M. (1986). Discussion summary. Techniques and problems in metal-binding protein chemistry and implications for proteins in nonmammalian organisms. *Env. Health persp.* Vol. 65 : 211-214.
- WOFFORD H.W., THOMAS P. (1984). Interactions of cadmium with sulfhydryl-containing compounds in striped Mullet (*Mugil cephalus* L.). *Mar. Env. Res.* 14 : 119-137.



IFREMER

Siège social 66, avenue d'Iéna 75116 Paris
Tél. 47 23 55 28 Télex 610 775