

**THESE**  
PRESENTEE A  
**L'UNIVERSITE BORDEAUX 1**

**ECOLE DOCTORALE**  
« Sciences du Vivant, Géosciences et Sciences de l'environnement »

**par Maud Achard-Joris**  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR**  
SPECIALITE : Ecotoxicologie

**Etudes biochimiques et génétiques de la réponse  
adaptative de mollusques face aux  
contaminations métalliques et au stress oxydant**

**Soutenue le 7 octobre 2005**

Après avis de :

<b>M. François Leboulenger</b>	Professeur, Université du Havre	Rapporteur
<b>Mme Elisabeth Mintz</b>	Directrice de recherche UMR CEA-CNRS-UJF 5090, Grenoble	Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

<b>M. François Leboulenger</b>	Professeur, Université du Havre	Rapporteur
<b>Mme Elisabeth Mintz</b>	Directrice de recherche UMR CEA-CNRS-UJF 5090, Grenoble	Rapporteur
<b>Mme Michèle Capdepuy</b>	Professeur, Université Bordeaux 1	Examineur
<b>M. Arnold Driessen</b>	Professeur, <i>Rijksuniversiteit</i> Groningen (NL)	Examineur
<b>Mme Magalie Baudrimont</b>	Maître de conférences, Université Bordeaux 1 Co-directrice de thèse	Examineur
<b>M. Jean-Paul Bourdineaud</b>	Professeur, Université Bordeaux 1 Directeur de thèse	Examineur



pour l'aide précieuse qu'il m'a apportée lors des étapes de correction de ce mémoire et Régine, Nathalie, et Véro pour s'être occupé entre autres de mes échantillons bactériens lorsqu'il étaient contaminés avec les métaux et de moi quand j'étais contaminée avec des pensées cafardeuses en fin de parcours. Merci aussi à Henri, Bruno, et Véro de m'avoir rapporté tous les pauvres bivalves que j'ai découpé.

Je salue également les membres du laboratoire d'A. Driessen que j'ai côtoyé et qui m'ont aidé à m'intégrer très rapidement et à trouver un deuxième chez moi aux Pays Bas.

Je souhaite enfin remercier mes proches qui m'ont toujours encouragé lors de ce long parcours. J'ai une pensée particulière pour Marie-France, ma mère, et Thiébaud, mon mari, qui m'ont énormément soutenue tout en supportant mon caractère de bélier.

Je dédie cette thèse à mes grands parents, Jean et Irène.

Vous auriez été fiers de moi...

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : Le cadmium - Stratégie de l'étude</b>	<b>5</b>
<b>I- LE CADMIUM</b>	<b>7</b>
1- LE CADMIUM DANS L'ENVIRONNEMENT	7
2- LE CADMIUM ET LE VIVANT	9
2-1 Effets du cadmium au niveau des organismes	9
2-2 Effets du cadmium au niveau moléculaire	13
2.2.1- Cadmium et génération d'un stress oxydant	14
2.2.2- Cadmium et réponse cellulaire	15
2.2.3- Quelques exemples chez les bivalves	16
<b>II- STRATÉGIE DE NOTRE ÉTUDE</b>	<b>18</b>
1- LES OBJECTIFS	18
2- LES MODÈLES BIOLOGIQUES UTILISÉS	19
2-1 Mollusques bivalves	20
2-2 Les bactéries	23
2-3 Les vésicules inversées	24
3- LES CONDITIONS DE CONTAMINATION	26
3-1 Pour les bivalves	26
3-2 Pour les bactéries	28
4- LES MÉTHODES UTILISÉES	28
4-1 Etude de l'expression d'un gène par PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitative	29
4-2 (Semi) quantification d'une protéine	30
4-3 Dosage des métaux par spectrométrie d'absorption atomique (SAA)	32
4-4 Protéine et résistance aux métaux : test en goutte	32
4-5 Etude de phénomènes de transport	33
<b>RÉFÉRENCES DE L'INTRODUCTION ET DU CHAPITRE 1</b>	<b>35</b>

<b>Chapitre 2 : Le rôle complexe des métallothionéines</b>	<b>43</b>
I- LES MÉTALLOTHIONÉINES (MTS)	45
1- STRUCTURE DES MTs ET PROPRIÉTÉS DE SÉQUESTRATION DES MÉTAUX	45
2- LES FONCTIONS DES MTs	46
II- METHODOLOGIE : EXPRESSION DE MÉTALLOTHIONÉINES CHEZ <i>E. COLI</i>	52
1- LES MÉTALLOTHIONÉINES CHOISIES	52
2- LES CONSTRUCTIONS PLASMIDIQUES	53
3- LES SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES ET LES CONDITIONS DE CULTURE	56
III- RESULTATS	59
1- EFFET DES MTs CHEZ <i>E. COLI</i> LORS D'UNE CONTAMINATION MÉTALLIQUE	59
1-1 Expression des MTs dans la souche QC1301	59
1-2 Expression des MTs dans la souche QC1726	65
2- MODÈLE DE GÉNÉRATION DE ROS EN PRÉSENCE DE MTs, MÉTAL, ET D'OXYGÈNE	71
IV- DISCUSSION	76
RÉFÉRENCES DU CHAPITRE 2	82
<b>Chapitre 3 : Sous unité I de la cytochrome-c-oxydase et stress oxydant</b>	<b>89</b>
1- LA CYTOCHROME-C-OXYDASE : COMPLEXE IV DE LA CHAÎNE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE	91
1-1 Mitochondrie et chaîne respiratoire	91
1-2 Structure de la cytochrome-c-oxydase	94
2- RÉSULTATS : CYTOCHROME-C-OXYDASE ET CADMIUM	95
COMPLÉMENTS DE RÉFÉRENCES DU CHAPITRE 3	106

<b>Chapitre 4 : Protéines MDR et expulsion des métaux</b>	<b>109</b>
I- LES PROTÉINES DE TYPE MDR, TRANSPORTEURS DE LA FAMILLE ABC (ATP-BINDING CASSETTE)	111
1- STRUCTURE DES TRANSPORTEURS ABC	112
2- MÉCANISMES DE TRANSPORT PROPOSÉS	115
2-1 Les différents modèles	115
2-2 Enjeu de la compréhension du mécanisme de transport de la P-gp	117
3- LES PROTÉINES DE TYPE MDR EN TOXICOLOGIE	118
II- RESULTATS	121
1- PREMIÈRE PARTIE : INDUCTION D'UNE PROTEINE DE TYPE MDR CHEZ <i>C. FLUMINEA</i> APRÈS EXPOSITION AUX MÉTAUX	121
2- DEUXIÈME PARTIE : DES PROTEINES DE TYPE MDR EXPRIMÉES CHEZ <i>E. COLI</i> CONFÈRENT UNE RÉSISTANCE AUX MÉTAUX	139
2-1 Les transporteurs MDR et les souches bactériennes utilisées	139
2-2 Première étude : bactéries contaminées avec du cadmium	143
2-3 Deuxième étude : bactéries contaminées avec du zinc ou du mercure	155
COMPLÉMENTS DE RÉFÉRENCES DU CHAPITRE 4	162

<b>Chapitre 5 : Expression d'un gène codant pour une protéine ribosomale</b>	<b>167</b>
1- IDENTIFICATION ET CLONAGE D'UN GÈNE DE <i>C. FLUMINEA</i> SUR-EXPRIMÉ EN CONDITION DE CONTAMINATION MÉTALLIQUE	171
2- ETUDE DE L'EXPRESSION DU GÈNE <i>RPS9</i> EN FONCTION DE LA CONTAMINATION MÉTALLIQUE	173
2-1 Contamination sur le terrain	173
2-2 Contamination en laboratoire	175
3- DISCUSSION	176
RÉFÉRENCES DU CHAPITRE 5	178
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE</b>	<b>179</b>
ANNEXE 1	183
ANNEXE 2	197

## INTRODUCTION

La découverte des métaux constitue une étape fondamentale dans l'histoire de l'homme. Ils paraissent étroitement liés à la civilisation, canalisation en plomb à Rome, pigments à base de plomb ou de mercure dans les peintures anciennes, miroirs étamés à l'étain et au mercure, outils de toutes sortes. La civilisation moderne fait un usage important des métaux et en particulier des métaux dits « lourds », qui sont des toxiques puissants.

Les métaux sont présents dans tous les compartiments de l'environnement, en particulier dans l'eau et leurs concentrations varient suivant l'élément considéré. Par exemple le fer, le zinc, le nickel et le cuivre peuvent se retrouver fréquemment à des concentrations de 100 nM à 1 µM, alors que d'autres métaux comme le cadmium et le mercure se présentent sous forme de traces de l'ordre de 1 nM.

Au niveau biologique, certains métaux comme le cuivre, le zinc et le fer jouent un rôle fondamental dans les réactions biochimiques. Le cuivre par exemple intervient dans la respiration cellulaire comme constituant de la cytochrome-c-oxydase (Namslauer et Brzezinski, 2004), dans les réactions radicalaires au niveau de la superoxyde-dismutase (McCord et Fridovich, 1969) et de façon générale dans l'activité de plusieurs enzymes impliquées dans diverses biotransformations. De même le zinc est indispensable à l'activité de nombreuses enzymes. Il peut être directement actif au niveau de leur site catalytique, ou intervenir dans leur conformation. C'est le cas d'enzymes à zinc comme la superoxyde-dismutase à zinc (Klotz *et al.*, 2003) ou la phosphatase alcaline (Coleman, 1992a). Le zinc participe également à la biosynthèse de certaines hormones et de certaines cytokines, notamment celle de l'insuline (Brange et Langkjoer, 1993). Il pénètre dans le noyau de la cellule et joue un rôle déterminant dans la transcription de l'ADN par les facteurs de transcription à doigts de zinc (Miller *et al.*, 1985 ; Coleman, 1992b). L'incorporation du fer dans la protoporphyrine la transforme en hème (Ryter et Tyrrell, 2000 ; Carlsen *et al.*, 2005), constituant de base de l'hémoglobine qui transporte l'oxygène du poumon aux tissus, de la myoglobine qui fixe l'oxygène au niveau des tissus, des cytochromes qui oxydent divers substrats endogènes et exogènes comme les médicaments ainsi que des cytochromes des mitochondries qui assurent le transfert des électrons à l'oxygène. Notons cependant que ces métaux comme le cuivre, le zinc et le fer, essentiels au fonctionnement de la cellule peuvent également se révéler toxiques lorsque leur concentration est trop élevée. Par contre, dans l'état actuel des connaissances, et exception faite de l'exemple d'une

Je tiens à remercier et à exprimer toute ma gratitude aux différentes personnes qui ont contribué à l'élaboration de cette thèse.

Tout d'abord merci à Monsieur A. Boudou, Professeur de l'Université Bordeaux 1 et directeur du LEESA, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Je lui suis très reconnaissante de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir soutenue tout au long de ce travail.

Je remercie également Monsieur A. Driessen, Professeur à la Rijksuniversiteit de Groningen, d'une part pour avoir su trouver le temps pour participer à mon jury de thèse, mais aussi pour m'avoir accueillie 4 mois dans son laboratoire (Department of Microbiology, Gronigen Biomolecular and Biotechnology Institute). Cette expérience a été très riche autant du point de vue humain que scientifique.

Je remercie Madame M. Capdepuuy, Professeur à l'Université Bordeaux 1, pour avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que présidente du jury, pour sa bonne humeur, et surtout pour ses encouragements dans les moments les plus difficiles.

Je remercie vivement Madame E. Mintz, Directrice de recherche au sein UMR CEA-CNRS-UJF 5090 de Grenoble, pour avoir si gentiment accepté de juger ce travail et d'en être le rapporteur.

Je remercie également Monsieur F. Leboulenger, Professeur à l'Université du Havre, pour m'avoir fait le plaisir de juger ce travail en tant que rapporteur.

Je remercie Madame M. Baudrimont, Maître de conférences à l'Université Bordeaux 1, qui a m'a guidée vers le monde de l'écotoxicologie en tant que co-directrice de thèse. Je lui suis très reconnaissante pour ses conseils avisés et pour sa disponibilité.

Je remercie aussi JP. Bourdineaud, Professeur à l'Université Bordeaux 1, pour avoir proposé un sujet de thèse passionnant, pour m'avoir permis d'acquérir une expérience de recherche à l'étranger et une grande autonomie. Merci aussi pour toutes les discussions si riches en informations.

J'aimerais également remercier l'ensemble des membres du laboratoire actuels ou non qui ont contribué à rendre trois ans de thèse dans un laboratoire en bord de plage et à côté d'un glacier encore plus agréables ! Ils m'ont tous appris quelque chose et je les en remercie. Parmi eux je souhaite remercier tout particulièrement Patrice pour ses conseils judicieux et

anhydrase carbonique à cadmium récemment caractérisée chez une diatomée marine (Lane *et al.*, 2005), le cadmium ou le mercure ne semblent pas intervenir dans les processus biochimiques et l'on ne retient en général que leur toxicité.

Pour agir de façon positive ou négative au niveau cellulaire, les métaux doivent tout d'abord être accessibles au niveau physiologique, c'est à dire qu'ils doivent pouvoir pénétrer dans les cellules. Selon les conditions physico-chimiques du milieu, les métaux se présentent sous des espèces chimiques différentes, mais ils ne pénètrent efficacement dans les cellules que sous forme d'ion divalent ou de complexes chlorés (Jumarie *et al.*, 2001).

Les ions métalliques ne peuvent pas être dégradés comme les composés organiques toxiques. Ils peuvent être piégés dans des concrétions calciques intracellulaires insolubles ou granules (Adams *et al.*, 1997; Bonneris *et al.*, 2005) ou éventuellement évacués par exocytose par la voie lysosomale (Viarengo, 1989; Marigomez *et al.*, 2002), mais ces deux processus ne constituent pas vraiment une réponse « adaptative » de détoxification des métaux. Face à un stress métallique, les organismes s'adaptent en développant deux types de défense « active » pour atténuer ou supprimer les dommages intracellulaires induits par le métal toxique : les cations peuvent être stockés et neutralisés en formant des complexes avec des molécules contenant des groupements thiols, ou leur concentration peut être diminuée dans la cellule par un efflux actif. Pour cela, certains gènes qui codent pour des protéines de « défense » peuvent être induits. Il faut cependant noter que toute modification génétique ou moléculaire peut à son tour interférer à un autre niveau et affecter le fonctionnement normal de la cellule.

Comme nous allons le voir plus loin, certaines espèces aquatiques, comme les mollusques, sont capables de survivre et de s'adapter dans des conditions de pollution environnementale assez sévères, en particulier lors d'une contamination par des métaux. Afin de comprendre les mécanismes de défense qu'ils développent alors, la détection de gènes dont l'expression est modifiée et l'étude du rôle des protéines correspondantes sont fondamentales.

Ce travail de thèse s'inscrit dans cette problématique puisque l'objectif premier était d'étudier les réponses adaptatives de bivalves soumis à une contamination métallique, tant sur le plan moléculaire que génétique. Pour ce faire, les voies explorées ont été très variées. Cependant malgré l'aspect multidirectionnel de cette recherche, un fil conducteur continu s'attachant à explorer successivement les deux mécanismes de défense évoqués, la séquestration et l'efflux des métaux, a guidé cette étude. La forme sous laquelle sont

présentés les résultats est double. En effet, pour certains chapitres, les articles acceptés ou publiés sont insérés directement dans le manuscrit. Dans ce cas, la problématique spécifique accompagnée d'une mise au point bibliographique les précède, les résultats principaux sont résumés et les expériences complémentaires non publiées décrites. Pour d'autres chapitres, une forme de rédaction plus classique a été adoptée afin d'éviter des redites inévitables liées à une succession d'articles ou simplement lorsque les résultats sont encore en cours de publication.

Le chapitre 1 est consacré au cadmium, qui est le métal essentiellement étudié dans ces travaux, à la fois dans l'environnement et lors des expériences en laboratoire. Nous insisterons en particulier sur les effets connus de ce métal au niveau cellulaire. La stratégie générale de notre étude sera ensuite détaillée, les modèles biologiques et les méthodes décrits.

Le deuxième chapitre traite d'un mécanisme de résistance couramment évoqué qui consiste à séquestrer les ions métalliques dans certaines protéines. Ce travail se focalise uniquement sur une famille de métalloprotéines : les métallothionéines. Les résultats obtenus avec des bactéries exprimant des métallothionéines révéleront le rôle complexe de ces protéines et souligneront leur importance lors du stress oxydant généré par la contamination métallique. La construction de clones bactériens exprimant des métallothionéines de mollusques ou de mammifère dans leur cytoplasme ou leur périplasme, la quantification de l'expression de ces métallothionéines, et l'analyse de leurs propriétés de séquestration du cadmium et du zinc y seront tout d'abord présentés, puis les phénotypes des bactéries exprimant chacune des métallothionéines étudiées et cultivées en présence de cadmium ou de zinc seront analysés.

L'importance des espèces réactives de l'oxygène mise en évidence dans le chapitre sur les métallothionéines nous a conduit à aborder l'étude de l'expression d'un gène directement impliqué dans la chaîne respiratoire. Ainsi, le chapitre 3 présente un article qui traite de l'induction du gène *CoxI*, codant pour la sous-unité I de la cytochrome-c-oxydase, protéine de la chaîne respiratoire mitochondriale, lors d'une contamination par le cadmium, le zinc, ou une combinaison des deux métaux.

Le chapitre 4 développe des résultats concernant le second mécanisme de résistance principalement étudié : l'expulsion de métaux par des transporteurs ABC (ATP-binding cassette) de la famille des protéines de type MDR (Multidrug resistance protein).

Un premier article met en évidence une protéine de type MDR chez un mollusque et établit un lien entre la contamination métallique par du cadmium, mais aussi du zinc, du mercure, et du cuivre et la quantité de protéine présente dans les tissus. Dans la suite du chapitre, le modèle utilisé est la bactérie *E. coli* exprimant un transporteur de type MDR d'origine bactérienne ou humaine. Dans un deuxième article, les phénotypes de résistance au cadmium associés à une accumulation moindre de ces métaux sont décrits. Grâce à l'utilisation de vésicules membranaires inversées, l'activité de pompage du cadmium de l'un des transporteurs étudiés est démontrée. Enfin, pour terminer ce chapitre, une étude complémentaire concernant le zinc et le mercure est présentée.

D'une façon générale, la réponse d'un organisme à un stress environnemental est particulièrement complexe et peut entraîner la sur-expression de gènes « de défense » directe, mais aussi par des modifications en cascade de l'expression de gènes impliqués de façon indirecte. Il est ainsi fréquent d'observer une sur-expression de gènes codant pour des protéines qui *a priori* ne sont pas impliquées dans un mécanisme de résistance ou de détoxification mais qui constituent cependant une réponse de l'organisme à « l'attaque » d'un polluant. Dans un dernier chapitre, l'exemple d'un gène induit lors d'une contamination métallique par le cadmium, codant pour une protéine ribosomique, mais dont la fonction dans des conditions de contamination n'est pas comprise, est développé.

Une conclusion générale récapitulera les faits marquants de ce travail et suggèrera des voies à explorer tant au niveau de la compréhension fondamentale que dans des perspectives appliquées à la surveillance de l'environnement.

## *Chapitre 1*

### *Le cadmium*

#### *Stratégie de l'étude*



## I- LE CADMIUM

### 1- LE CADMIUM DANS L'ENVIRONNEMENT

Le cadmium n'existe pas à l'état natif. Son minerai, la greenockite, est un sulfure (CdS) présent en faibles proportions (de 0,01 à 0,05%) dans presque tous les minerais de zinc. C'est donc un sous-produit de la métallurgie du zinc, mais il est aussi présent dans des minerais de cuivre, de plomb et dans certains phosphates naturels. Ce métal n'a été découvert et isolé qu'au début du XIX<sup>ème</sup> siècle et il est resté inexploité jusqu'à ce que ses potentialités industrielles soient mises en évidence. La production mondiale annuelle est de 20.000 tonnes et la consommation française de l'ordre de 1800 t, dont la moitié environ provient du recyclage (rapport du Sénat 2611- 2001 Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé).

Le cadmium est un métal blanc argenté, ductile et malléable qui résiste particulièrement à la corrosion. Après dépôt par électrolyse, il constitue de ce fait un revêtement protecteur de qualité pour l'acier (cadmiage). Il sert également de pigments pour colorer divers matériaux en jaune avec CdS ou en rouge avec Cd(S,Se), mais à cause de leur toxicité, l'utilisation de ces pigments est fortement réglementée par la Communauté Européenne. Il est également ajouté comme stabilisant (anti-UV) dans les plastiques, le PVC. Mais son utilisation essentielle, à plus de 70%, concerne la fabrication des accumulateurs, les piles rechargeables Ni-Cd.

La toxicité des métaux lourds comme le plomb, le mercure ou le cadmium constitue une préoccupation environnementale majeure qui conduit les gouvernements à en réglementer les émissions en en fixant des teneurs limites. Cependant les sources de pollution par les métaux, et c'est le cas du cadmium, sont bien sûr pour une part d'origine anthropique mais aussi d'origine naturelle et donc pas toujours contrôlables.

Par exemple, l'érosion est à l'origine d'une mobilisation du cadmium particulaire présent dans les roches vers les eaux de surface et la nappe phréatique, dont une partie peut être de nouveau piégée dans les sédiments. Les éruptions volcaniques constituent une source de pollution atmosphérique. On estime que les volcans libèrent en moyenne annuelle dans le monde, de 800 à 1.400 tonnes de cadmium, 18.800 à 27.000 tonnes de cuivre, 3.200 à 4.200 tonnes de plomb, et 1.000 tonnes de mercure dans l'atmosphère. Une fois en circulation, les métaux se distribuent dans tous les compartiments de la biosphère, les échanges sont permanents et se chiffrent par milliers ou centaines de milliers de tonnes.

Les flux naturels sont largement complétés par les flux d'origine anthropique bien que la prise de conscience de la toxicité du cadmium conduise depuis quelques années à diminuer les pollutions résultant de l'activité humaine. Le cadmium ne se dégrade pas dans l'environnement, mais des processus physiques et chimiques peuvent modifier sa mobilité, sa biodisponibilité et son temps de séjour dans différents milieux. Dans ce sens, l'activité humaine peut en changer la répartition, la complexation chimique et les concentrations par l'introduction de nouveaux modes de dispersion. Les activités humaines entraînent des rejets de cadmium, dans l'air, le sol et l'eau.

L'évaluation des émissions atmosphériques de cadmium en France était de 9,4 tonnes en 2002 (Source CITEPA<sup>1</sup>). En France, les rejets industriels varient fortement suivant les activités et les régions mais les émissions atmosphériques de cadmium proviennent principalement de la métallurgie. Le traitement des ordures ménagères est responsable d'environ 7% des émissions de cadmium (4 mg.kg<sup>-1</sup> de matière sèche). Les sels de cadmium, très peu volatils, sont présents dans l'air sous forme de très fines particules solides (fumées ou poussières). Lors d'expositions professionnelles ou environnementales, ces particules peuvent être inhalées et se déposer principalement dans les alvéoles pulmonaires. La valeur guide pour la concentration du cadmium dans l'air, proposée par le bureau Européen de l'Organisation Mondiale pour la Santé (O.M.S.), est de 5 ng.m<sup>-3</sup>.

En plus des rejets atmosphériques, une partie du cadmium part directement dans le sol et les eaux. Cette pollution résulte essentiellement des activités métallurgiques, minières et agricoles. L'utilisation d'engrais phosphatés introduit par exemple une pollution par le cadmium dans l'eau et donc au niveau de la chaîne alimentaire (82 tonnes par an). Les normes européennes fixent une limite pour l'eau potable à 5 µg.L<sup>-1</sup> de cadmium<sup>2</sup>.

L'eau est un élément très important pour la pollution par les métaux lourds, car elle sert d'une part de vecteur, mais peut également entraîner des modifications chimiques selon la salinité ou la température, ce qui est essentiel puisque les divers composés du cadmium présentent des effets toxiques variables selon leur solubilité et donc leur facilité d'assimilation par un organisme (Jumarie *et al.*, 2001).

L'exemple de la pollution de la Gironde par le cadmium et le zinc illustre ce double rôle de l'eau. L'origine de cette pollution doit en effet être cherchée bien en amont, au niveau du bassin de Decazeville, où une ancienne mine de zinc (usine de Vieille Montagne) a laissé près d'un petit ruisseau, le Riou Mort, des terrils d'extraction riches en cadmium, et en zinc

---

<sup>1</sup> Centre interprofessionnel technique d'études de la pollution atmosphérique

<sup>2</sup> Directive du Conseil de l'Union européenne n° 98/83/CE du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine (JOCE n° L 330 du 5 décembre 1998 et rectific. JOCE n° L 111 du 20 avril 2001)

(Audry *et al.*, 2004b). Les eaux de lessivage enrichies en matière en suspension chargées en cadmium arrivent dans le Riou-Mort, rejoignent le système hydrologique, le Lot, la Garonne puis la Gironde. Jusqu'à la confluence du Lot avec la Garonne, la majorité du cadmium est adsorbée sur les matières en suspension. L'augmentation progressive de la salinité dans l'estuaire provoque la désorption du cadmium des particules en suspension qui se retrouve sous forme  $Cd^{2+}$ ,  $CdCl^+$ , et  $CdCl_2$ , espèces beaucoup plus biodisponibles pour les organismes aquatiques et notamment pour les bivalves filtreurs. Conséquence directe de cette pollution : une concentration en cadmium particulièrement élevée dans les huîtres de l'embouchure (Boutier, 1981; Boutier *et al.*, 2000).

## **2- LE CADMIUM ET LE VIVANT**

### **2.1- Effets du cadmium au niveau des organismes**

Le cadmium est un élément toxique. Selon les doses d'exposition, les modes de contamination et les organismes considérés, ses effets peuvent être plus ou moins importants. Présent dans tous les compartiments de l'environnement, il peut contaminer les plantes, les animaux et bien sûr l'homme.

- Chez l'homme, des cas d'intoxication aiguë provenant d'expositions accidentelles provoquent d'importants dommages pulmonaires et peuvent entraîner la mort (Nordberg et Group, 2003). Cependant, en dehors de ces expositions accidentelles, la principale préoccupation pour la santé correspond aux possibilités d'expositions prolongées de l'ensemble d'une population à de faibles doses de cadmium.

Pour l'homme, les deux principales voies de contamination sont l'inhalation et l'ingestion. Par voie pulmonaire, une partie du cadmium se dépose dans le système respiratoire. Les sels de cadmium les plus solubles, les chlorures et les oxydes sont absorbés à 90%, les sulfures beaucoup moins solubles, seulement à 10%. Cette absorption peut se poursuivre plusieurs semaines après l'inhalation. L'origine de cette contamination provient de l'air atmosphérique urbain, où les niveaux de cadmium peuvent être élevés près des centres industriels, mais aussi de la fumée de cigarette. Selon l'OMS<sup>3</sup> (1992) une cigarette contient entre 1 et 2  $\mu g$  de cadmium et environ 10% de ce cadmium est inhalé lorsque la cigarette est fumée. Une autre source de contamination est l'alimentation (légumes, poissons, *etc.*)

---

<sup>3</sup> Organisation Mondiale de la Santé

(Boisset et Cumont, 1996), même si le cadmium est beaucoup moins absorbé par voie gastro-intestinale que par voie pulmonaire. En France, la quantité moyenne ingérée par personne et par an est évaluée à 12 mg et chez les gros fumeurs (plus de 20 cigarettes par jour) cette quantité peut doubler (Summer *et al.*, 1986).

Puisque l'homme ne peut échapper à la pollution environnementale par le cadmium, il est fondamental de connaître les effets de ce métal sur la santé. Plusieurs études menées sur des groupes d'individus ayant été soumis à une contamination chronique au cadmium, révèlent l'apparition de maladies rénales, des atteintes pulmonaires et des maladies osseuses (Nordberg et Group, 2003). L'accumulation de cadmium s'effectuant principalement dans les reins, cet organe est considéré de ce fait comme un organe « cible » et l'exposition chronique au cadmium entraîne l'apparition d'une néphropathie irréversible pouvant évoluer vers une insuffisance rénale. On a également relié l'ingestion chronique de cadmium avec la maladie dite itai-itai observée au Japon chez des populations exposées au cadmium lors de la consommation d'eau et de riz contaminés. Cette maladie correspond à des atteintes osseuses graves et s'accompagne de défaillances rénales (Ishizaki et Funkushima, 1968).

Un autre aspect de la toxicologie du cadmium est son pouvoir cancérigène. Différentes études ont été réalisées en milieu professionnel, dans plusieurs pays et ont été récemment référencées par l'INERIS<sup>4</sup> (Le Cadmium et ses dérivés, mise à jour 22 février 2005). Ces études mettent clairement en évidence un lien entre l'exposition au cadmium et la survenue de cancers pulmonaires et prostatiques. Des expérimentations menées sur l'animal montrent le développement de tumeurs malignes et de divers cancers confirmant ainsi les observations faites chez l'homme (Waalkes, 2003). En conséquence, l'Union Européenne a classé le cadmium et ses dérivés (chlorure, oxyde, sulfate, sulfure) en catégorie 2, comme substance devant être assimilées à des substances cancérigènes pour l'homme (JOCE<sup>5</sup> 2004). D'autres travaux soulignent le pouvoir mutagène du cadmium et le chlorure de cadmium a été classé en catégorie 2 « substance devant être assimilée à des substances mutagènes pour l'homme ».

Compte tenu de tous ces éléments, la dernière directive de l'OMS a fixé une dose hebdomadaire acceptable de 7 µg par kilo, soit pour une personne de 60kg environ 420 µg par semaine et 22 mg par an. On peut remarquer que la marge entre cette dose acceptable

---

<sup>4</sup> Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques

<sup>5</sup> Journal officiel des Communautés européennes

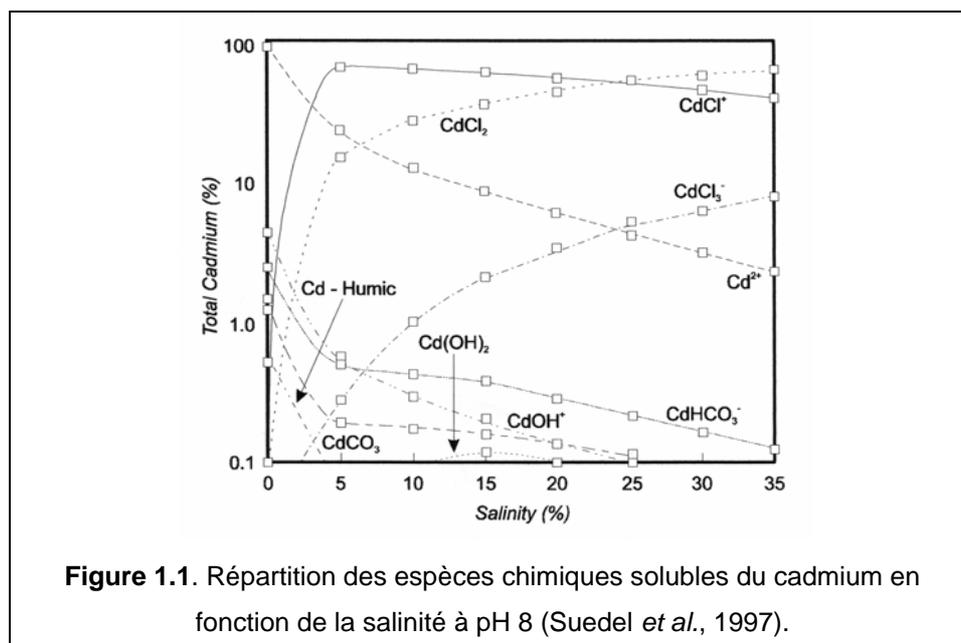
et la dose de cadmium effectivement absorbée par la population en France reste faible et que cette marge est peut être encore réduite chez les fumeurs.

- Chez les organismes aquatiques

La toxicité avérée du cadmium et de ses composés impose un principe de précaution limitant au maximum les contaminations par ce métal et une stratégie de surveillance du niveau de pollution. Dans cette optique, la recherche d'organismes sentinelles et la mise au point d'indicateurs, ou biomarqueurs<sup>6</sup> permettant de détecter de façon précoce une pollution par le cadmium est très importante.

Comme nous venons de le voir, les sources de contamination environnementale par le cadmium sont variées et l'eau est un vecteur important de cette pollution. Les organismes aquatiques peuvent être contaminés directement à partir de la phase soluble ou par ingestion de la phase particulaire.

L'impact du cadmium sur les organismes dépend tout d'abord de la forme chimique sous laquelle il se trouve. Il peut exister sous forme d'ion libre, de complexes organiques ou inorganiques, ou sous des forme insolubles, hydroxyle ou sulfure. La chimie du cadmium soluble dans l'eau est affectée par de nombreux paramètres tels que le pH ou la salinité (Figure1.1).



<sup>6</sup> changements biochimiques ou physiologiques d'organismes soumis à une pollution et enregistrés pour mesurer les effets des divers stress.

En plus de la spéciation et bien sûr de la dose et du temps d'exposition au cadmium, d'autres facteurs peuvent affecter la réponse des organismes, et c'est en particulier le cas de l'activité respiratoire qui est fortement dépendante des facteurs environnementaux. Plusieurs études chez les bivalves ont en effet montré qu'en présence de métal ces organismes filtreurs peuvent adapter leur réponse physiologique et modifier leur ventilation ou le temps d'ouverture de leurs valves (Kramer *et al.*, 1989). Ainsi, en condition de stress métallique le bivalve d'eau douce *Corbicula fluminea* a tendance à rester fermé plus longtemps, et cette modification a une conséquence directe sur l'accumulation du cadmium (Tran *et al.*, 2003 ; Tran *et al.*, 2004). De même, chez la moule *Mytilus edulis*, la contamination métallique est associée à une réduction du taux de filtration (Grace et Gainey, 1997). Pendant une exposition au cadmium de la moule *Mytilopsis sallei*, une diminution de leur consommation d'oxygène conjuguée avec l'utilisation de glycogène et de carbohydrates est observée (Uma Devi, 1996). Cet auteur suggère que ces bivalves adoptent un métabolisme anaérobie afin de contrebalancer le stress métallique.

De façon générale, les effets toxiques d'une substance vis à vis d'organismes représentatifs des écosystèmes et appartenant à différents niveaux trophiques sont évalués à partir de données écotoxicologiques souvent obtenues en laboratoire. De nombreux résultats sont décrits dans la littérature et concernent à la fois des expositions aiguës et des expositions chroniques au cadmium. Pour évaluer les effets sur les organismes, plusieurs indices sont évalués :

- Ce sont tout d'abord des paramètres liés à des **effets de concentration** (EC), qui correspondent à la concentration en toxique qui entraîne un effet négatif pour un certain pourcentage d'individus (Bispo et Jourdain, 1998). Cet effet négatif peut être une mortalité (on définit alors par exemple la dose létale 50, CL<sub>50</sub>, correspondant la concentration du composé testé pour laquelle 50% de la population est décimée) ou un effet sub-létal, par exemple la diminution du taux de filtration qui est l'un des paramètres intéressants permettant d'évaluer l'effet du cadmium sur les bivalves.
- D'autres indices sont liés à la **bioaccumulation** de cadmium par les organismes et correspondent à la concentration de cadmium ramenée au poids (sec ou frais). Le **facteur de bioconcentration** (BCF) correspond au rapport de la concentration de cadmium dans l'organisme contaminé (ou un tissu spécifique) et de la concentration de cadmium dans l'eau.

L'ensemble des données montre plusieurs effets :

- Une importante capacité de bioaccumulation du cadmium par les mollusques bivalves liée à leur intense activité de filtration, accompagnée d'une grande tolérance

face à la contamination métallique (George et Langston, 1994; Mason et Jenkins, 1995).

- De grandes différences de comportement sont observées entre les espèces soumises à une même contamination par le cadmium. Ces différences s'expriment au niveau de la CL<sub>50</sub> (Carlson *et al.*, 1991) et au niveau des capacités de bioaccumulation du cadmium (Irato *et al.*, 2003; Baudrimont *et al.*, 2005). En effet, les BCF du cadmium, du zinc, et du cuivre sont beaucoup plus élevés pour une huître (*Crassostrea gigas*) que pour des espèces benthiques comme les coques *Cerastoderma edule* et les palourdes *Ruditapes philippinarum* (Baudrimont *et al.*, 2005).
- Une différence de « comportement » existe aussi pour une même espèce face à différents métaux (Graney *et al.*, 1983; Inza *et al.*, 1997; Baudrimont *et al.*, 2005). Par exemple, la palourde asiatique *Corbicula fluminea* présente une accumulation de cadmium dans ses tissus constante et proportionnelle à la quantité de cadmium dans l'eau. En revanche, les accumulations de cuivre et de zinc ne sont pas linéaires, indiquant que leur concentration tissulaire est contrebalancée par leur expulsion (Graney *et al.*, 1983).

Grâce à ces propriétés, une grande attention est portée aux bivalves dans le cadre de la surveillance de l'environnement.

## **2.2- Effets du cadmium au niveau moléculaire**

La toxicité du cadmium s'exerce à l'échelle infra-individuelle, au niveau cellulaire. Les effets de ce métal sont multiples et complexes et les dommages intracellulaires générés concernent tous les types de biomolécules : dénaturation de certaines protéines, peroxydation lipidique, cassures de l'ADN, répression ou au contraire surexpression de nombreux gènes (Liao et Freedman, 1998; Waisberg *et al.*, 2003). Tous ces effets peuvent être simultanés ou se produire en cascade et il est impossible de considérer qu'un seul mécanisme soit responsable des effets toxiques du cadmium. Les mécanismes proposés incluent en général la liaison du métal à des dérivés soufrés et la production d'espèces réactives de l'oxygène. De nombreuses études sont menées pour essayer de comprendre quels sont les effets du cadmium au niveau moléculaire et bien qu'il soit difficile d'isoler chacun de ces effets et d'en faire une liste exhaustive, il nous sera utile de développer les points suivants.

### 2.2.1- Cadmium et génération d'un stress oxydant

La génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (anion superoxyde, radical hydroxyle, peroxyde d'hydrogène, oxyde nitrique) fait partie du métabolisme normal de la cellule. La chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie et les lysosomes génèrent ces espèces de manière constitutive (Nohl *et al.*, 2003). Par contre, lors d'une contamination par le cadmium, il se crée un déséquilibre entre la génération de ROS et la production d'antioxydants (Stohs et Bagchi, 1995; Ikediobi *et al.*, 2004).

Le cadmium n'étant pas un métal de Fenton<sup>7</sup>, il induit de façon indirecte la production de ROS et la peroxydation lipidique par interférence avec les systèmes antioxydants. En effet le cadmium peut entraîner une diminution de la quantité d'antioxydants (glutathion) ou de l'activité d'enzymes permettant de lutter contre le stress oxydant (superoxyde-dismutase, glutathion-peroxydase, catalase) (Leonard *et al.*, 2004).

Un autre mécanisme possible est l'augmentation de la concentration en fer ou en cuivre à la suite de leur déplacement par le cadmium de métallo-protéines. A l'inverse du cadmium, ces deux métaux peuvent causer un stress oxydant direct par réaction de Fenton (Wardman et Candeias, 1996).

La complexité des effets du cadmium s'illustre ici par le fait que la génération de ROS peut d'une part avoir des effets néfastes directs sur le bon fonctionnement de la cellule et d'autre part être considérée comme un mécanisme de riposte où les ROS sont des messagers secondaires. En effet, l'augmentation de la quantité de ROS lors d'une contamination par du cadmium peut influencer l'expression de nombreux gènes dont ceux de facteurs de transcription (Haddad, 2002).

Comme conséquence néfaste du cadmium et du stress oxydant sur la cellule, on peut évoquer ici les atteintes à l'ADN. En effet, la génotoxicité observée en présence de cadmium est étroitement liée au stress oxydant. Le cadmium, faiblement mutagène en tant que tel (Waalkes et Misra, 1996), peut inhiber la réparation de lésions de l'ADN formées spontanément ou suite à des réactions oxydatives en interférant avec des enzymes antioxydantes par exemple en se substituant au zinc de certaines protéines à doigt de zinc impliquées dans la réparation de l'ADN (Hartwig, 2001 ; Hartwig et Schwerdtle, 2002). Suivant la localisation et le nombre des lésions de l'ADN le cadmium peut induire la formation de cellules tumorales, l'apparition d'un cancer, et même la mort cellulaire programmée appelée apoptose (Waisberg *et al.*, 2003).

---

<sup>7</sup> Réaction de type Fenton :  $\text{metal } n^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{metal } (n+1)^+ + \text{radical hydroxyle} + \text{anion hydroxyle}$

### 2.2.2- Cadmium et réponse cellulaire

Pour éviter les dégâts intracellulaires induits pas le cadmium, les cellules répondent à une contamination métallique par l'induction de la transcription de gènes qui codent des protéines de « défense » ou de « réparation ». Ces protéines peuvent séquestrer les métaux afin de neutraliser leurs effets toxiques, lutter contre la formation d'espèces réactives de l'oxygène, réparer (dans le cas où elles ne sont pas inhibées par le cadmium) les atteintes au niveau de l'ADN, renaturer ou dégrader des protéines mal repliées.

Une contamination par le cadmium peut entraîner l'induction de plusieurs gènes de réponse au stress tels que les gènes codant pour les métallothionéines (MTs) (Hamer, 1986), les protéines de choc thermique (HSPs, Heat Shock Proteins) (Wiegant *et al.*, 1994), des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant ou encore la synthèse de glutathion (Chin et Templeton, 1993; Eneman *et al.*, 2000). D'une façon générale, les protéines à groupement thiol jouent un rôle clef dans la défense cellulaire contre la toxicité du cadmium. C'est en particulier le cas des protéines MTs dont 1/3 des acides aminés sont des cystéines. Elles peuvent fixer le cadmium par leurs groupements thiol et entraîner une diminution de la concentration en  $Cd^{2+}$  capable d'interagir avec d'autres cibles cellulaires (Chapitre 2). Comme nous l'avons vu plus haut, le cadmium peut induire la génération de protéines dénaturées ou anormales en atteignant leur groupement thiol ou en se substituant au zinc de ces protéines. Ceci a été reconnu comme signal d'induction des HSPs (Parsell, 1994). Comme les métallothionéines, le glutathion réduit (GSH) peut lier le cadmium et empêcher son interaction néfaste avec des cibles cellulaires (Singhal *et al.*, 1987). De plus, le cycle rédox du glutathion (GSH), qui fait intervenir la glutathion-peroxydase et la glutathion-reductase, joue un rôle important dans la détoxification des ROS générés par le cadmium. En effet, une augmentation de la synthèse de GSH permet de protéger la cellule de la toxicité du cadmium (Chin et Templeton, 1993; Eneman *et al.*, 2000). En général l'activité d'enzymes antioxydantes telles que la superoxyde-dismutase (SOD) et la catalase reste basale (Company *et al.*, 2004; Ikediobi *et al.*, 2004). Cependant, une augmentation de leur activité enzymatique est observée lors d'une contamination par le cadmium de cellules en culture ou d'animaux (Kostic *et al.*, 1993 ; Salovsky *et al.*, 1992).

Ces quelques exemples montrent que de nombreux gènes peuvent être induits après une contamination par le cadmium, mais cependant les mécanismes par lesquels ce métal module les niveaux d'expression de la plupart de ces gènes restent inconnus.

Plusieurs voies sont possibles. La transcription activée par le cadmium peut se produire par la fixation d'un facteur de transcription comme MTF-1 (Metal Transcription Factor 1) sur les séquences MRE (Metal Response Element) situées dans la région promotrice de gènes

répondant au cadmium comme les métallothionéines (Culotta et Hamer, 1989 ; Searle, 1990 ; Giedroc *et al.*, 2001).

Le cadmium peut aussi influencer le niveau d'expression de gènes en interférant dans des voies de transduction du signal. En effet, une contamination par le cadmium peut également entraîner l'augmentation d'un autre messager secondaire que les ROS : le calcium intracellulaire (Joseph *et al.*, 2001; Misra *et al.*, 2002). Cette augmentation en  $Ca^{2+}$  peut provoquer une dérégulation de l'expression de gènes de façon directe en interagissant avec certains facteurs de transcription (Hardingham *et al.*, 1997) ou de façon indirecte *via* l'activation de protéines kinases. Ces dernières entraînent une sur-expression de gènes en phosphorylant des facteurs de transcription (Livneh et Fishman, 1997).

Le cadmium induit une surexpression d'« immediate early response genes » (IEGs), comme les proto-oncogènes *c-fos* et *c-jun* *via* la protéine kinase C et la calmoduline (Beyersmann et Hechtenberg, 1997). Ces proto-oncogènes codent pour des composants de facteurs de transcription, par exemple NF-kappaB (Thevenod *et al.*, 2000), et AP-1 (Daffada *et al.*, 1994). NF-kappaB se lie à des séquences d'ADN spécifiques (« kappaB elements ») de la région promotrice de gènes cible. Ainsi il régule la transcription de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, la carcinogénèse, et les mécanismes antiapoptotiques. AP-1 interagit avec des séquences d'ADN comme les sites AP-1, ce qui provoque l'induction de nombreux facteurs de croissance.

Ainsi, *via* l'activation plus ou moins directe de facteurs de transcription, le cadmium peut moduler l'activité de voies de transduction du signal complexes qui à leur tour peuvent influencer l'expression d'un grand panel de gènes. Cependant, encore peu de gènes de réponse au cadmium ont été identifiés. Il est ainsi aisé de comprendre que nous sommes loin de connaître tous les scénarii possibles au niveau cellulaire d'une atteinte par le cadmium. Ceci est d'autant plus vrai que d'un type cellulaire à l'autre les gènes induits peuvent être différents.

### 2.2.3- Quelques exemples chez les bivalves

D'une façon générale, les effets du cadmium au niveau cellulaire chez les espèces aquatiques sont les mêmes que ceux que nous venons de décrire et nous allons simplement donner quelques exemples concernant les bivalves.

Comme nous l'avons vu, les bivalves sont souvent utilisés en tant que bioindicateurs. Le dosage des métaux dans leur tissus constitue un moyen de détecter une contamination du milieu mais ne permet pas de déterminer son impact sur les populations. Pour ce faire, le dosage des métaux dans les tissus est couramment associé à l'utilisation de marqueurs

biologiques et biochimiques comme la quantification des métallothionéines (Isani *et al.*, 2000 ; Bebianno *et al.*, 2004), des cassures de l'ADN (Bolognesi *et al.*, 1999), ou encore du niveau de peroxydation lipidique (Cossu *et al.*, 1997; Bebianno *et al.*, 2004).

Ces biomarqueurs peuvent être utilisés pour évaluer la contamination d'un milieu mais aussi l'effet des métaux au niveau cellulaire.

- Plusieurs auteurs ont travaillé sur l'activité des **enzymes antioxydantes** lors d'une contamination de bivalves par le cadmium (Prakash et Rao, 1995 ; Regoli *et al.*, 1998) ; (Geret *et al.*, 2002 ; Company *et al.*, 2004) mais aucune « règle » quant à l'action du cadmium sur l'activité de ces enzymes ne peut vraiment être dégagée. Chez la moule *Perna viridis* une exposition au cadmium s'accompagne d'une augmentation de l'activité d'enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase dans le manteau (Prakash et Rao, 1995). Il en est de même chez la telline *Macoma balthica* soumise à une exposition polymétallique, pour laquelle cependant une augmentation de l'activité de la catalase n'est pas observée (Regoli *et al.*, 1998). A l'inverse, chez la moule des sources hydrothermales (*Bathymodiolus azoricus*), une exposition au cadmium provoque une diminution de l'activité de la catalase et de la glutathion peroxydase et d'autre part une augmentation de la peroxydation lipidique dans les branchies (Company *et al.*, 2004). Une inhibition de la glutathion peroxydase est observée dans les branchies de la palourde *Ruditapes decussatus* exposée au cadmium (Geret *et al.*, 2002).

- L'induction des **métallothionéines** lors d'une contamination au cadmium est très largement décrite, que ce soit chez des bivalves d'eau douce (Baudrimont *et al.*, 1997 ; Lecoeur *et al.*, 2004) ou d'eau de mer (Geret *et al.*, 2002 ; Tanguy *et al.*, 2002). L'effet du cadmium sur ces protéines sera détaillé dans le chapitre 2.

- D'autres protéines sont impliquées après exposition au cadmium comme les **protéines de choc thermique**. Une étude menée sur la moule *Mytilus edulis* propose l'induction de la protéine de HSP60 comme un biomarqueur potentiel de la contamination par les métaux dont le cadmium (Radlowska et Pempkowiak, 2002).

- Plus récemment, une relation entre contamination métallique de bivalves et induction de **protéines MXR** (mutlixenobiotic resistance), connues pour expulser des composés cytotoxiques variés hors des cellules (Bard, 2000), a pu être établie (Article 4-1, Chapitre 4).

## II- STRATÉGIE DE NOTRE ÉTUDE

### 1-LES OBJECTIFS

Comme l'indique le titre de cette thèse, l'objectif général de cette recherche consiste à étudier les réponses adaptatives, au niveau moléculaire et génomique, de bivalves en réponse à une contamination métallique et au stress oxydant qui l'accompagne.

Face à cette problématique, à la diversité et à la complexité des réponses possibles d'un organisme soumis à une contamination par les métaux, quatre questions schématiques se posent :

- Quels gènes sont impliqués ?
- Comment leur expression varie-t-elle en condition de contamination métallique ?
- Les protéines codées par ces gènes confèrent-elles une protection à l'organisme ?
- Si oui, par quel mécanisme ?

La première étape consiste donc à sélectionner des gènes codant pour des protéines potentiellement impliquées dans la résistance aux métaux lourds. Comme nous le verrons par la suite, cette recherche peut conduire à choisir des gènes déjà identifiés pour leur importance face à une contamination métallique. Les gènes codant pour les métallothionéines en sont un exemple. Le choix peut se porter sur des gènes qui ont un rôle potentiel mais non démontré. Ainsi, les gènes codant pour des protéines MDR sont largement associés à la contamination par les xénobiotiques, mais au début de cette thèse, la réponse à un stress métallique n'avait encore été que peu étudiée. Un autre exemple dans ce travail, concerne le gène *CoxI* codant pour une sous-unité de la cytochrome-c-oxydase. Enfin, d'autres gènes peuvent être sélectionnés par des méthodes différentielles sans qu'une relation avec la contamination ne soit *a priori* prévisible. C'est le cas du gène codant pour la protéine ribosomale S9 qui est présenté dans le dernier chapitre de ce manuscrit.

Une fois le gène candidat sélectionné, la deuxième étape consiste à analyser la relation entre la contamination par les métaux et l'induction de ce gène ou l'augmentation de la quantité de protéine codée par ce gène. Suivant le niveau de connaissance initial, le gène doit être tout d'abord isolé, cloné et séquencé, ou si la séquence est déjà connue, son expression peut être directement étudiée en fonction des paramètres de contamination choisis. On peut aussi ne s'intéresser qu'au « résultat » de la sur-expression, c'est à dire directement à la quantité de protéine produite.

Après avoir établi la relation métal-induction du gène ou métal-augmentation de la quantité de protéine codée par le gène d'intérêt, la troisième étape consiste à démontrer que la sur-

expression du gène choisi augmente la résistance aux métaux. Comme nous le verrons, à ce niveau il est extrêmement difficile de travailler sur un modèle biologique complexe, puisque le stress métallique induit plusieurs réponses complémentaires ou opposées et il est alors impossible d'isoler l'effet d'un seul gène ou d'une seule protéine.

Enfin, la dernière étape est de comprendre par quel mécanisme cette résistance est possible. C'est bien sûr l'étape qui est de loin la plus délicate, car s'il est possible par la connaissance du gène et de la protéine de formuler des hypothèses, il est beaucoup plus difficile d'en apporter la démonstration. Cela a été réalisé dans le cas de gènes codant pour des protéines de type MDR par des études de transport de cadmium radioactif sur des vésicules membranaires inversées.

## **2- LES MODÈLES BIOLOGIQUES UTILISÉS**

Afin de réaliser ces objectifs, des modèles biologiques situés à des niveaux de complexité décroissante ont été utilisés.

Le modèle le plus complet, et donc le plus complexe, est constitué par des animaux aquatiques, des mollusques bivalves. Une grande partie de ce travail les concerne. Cependant, chez un organisme soumis à un stress métallique, plusieurs mécanismes de réponse peuvent être mis en œuvre en même temps et la complexité et la grande variété de réponses cellulaires à une contamination par le cadmium vient d'être soulignée au début de ce chapitre. C'est pourquoi dans un deuxième temps, l'outil bactérien a été utilisé. Grâce aux techniques de biologie moléculaire, il est possible de faire exprimer un gène d'intérêt par une souche bactérienne et l'on peut disposer à la fois de bactéries exprimant et n'exprimant pas le gène testé. Grâce à un tel contrôle, l'influence spécifique du gène d'intérêt et de la protéine correspondante dans la résistance aux métaux peut être étudiée.

Enfin, un niveau de complexité encore plus faible a été utilisé dans le cas où le gène d'intérêt code pour un transporteur membranaire. Il consiste à fabriquer des vésicules membranaires inversées qui sont constituées des composants habituels d'une membrane cytoplasmique mais dans laquelle la protéine d'intérêt est sur-représentée. Grâce à ce système, le rôle potentiel de transport des ions métalliques par la protéine d'intérêt peut être étudié en écartant toute possibilité d'interaction avec des composés cytoplasmiques.

## 2.1- Mollusques bivalves

Dans une optique de surveillance du niveau de pollution de l'eau (ou de l'air), les organismes sentinelles sont déterminants afin de détecter une pollution, au sens large du terme, le plus précocement possible. Nous pouvons donner l'exemple en milieu terrestre, des rosiers plantés en bord de vigne, destinés à détecter une infection par un champignon avant qu'elle n'atteigne les plantations (oïdium de la vigne ou maladie du blanc). En milieu aquatique, les mollusques bivalves comptent parmi les espèces sentinelles couramment utilisées en écotoxicologie et sont utilisés dans plusieurs programmes internationaux de surveillance de l'environnement (Goldberg, 1986; Gunther *et al.*, 1999 ; De Lafontaine *et al.*, 2000 ; Garcia-Rico *et al.*, 2001 ; Olivier *et al.*, 2002 ; Valbonesi *et al.*, 2003).

Les mollusques bivalves respirent et se nourrissent en filtrant l'eau par leur branchies. Ils peuvent ainsi accumuler des métaux par contamination directe (contaminant dissous) et indirecte ou trophique (contaminants absorbées ou adsorbés sur des particules en suspension, nutritives ou non). En raison de ces caractéristiques, ils concentrent les métaux et s'avèrent des indicateurs de premier ordre pour mesurer l'exposition et évaluer les effets d'une pollution métallique à travers l'espace et le temps. Les bivalves sont par ailleurs des sujets de choix, car ils se prêtent autant aux études *in situ* qu'aux travaux réalisés en laboratoire.

Au cours de cette thèse, deux bivalves d'eau douce ont été utilisées : *Corbicula fluminea* et *Dreissena polymorpha*, et un bivalve d'eau de mer : *Crassostrea gigas*.

Des études (Marigomez *et al.*, 2002) montrent une répartition différentes des métaux dans les différents tissus des mollusques. Dans ce travail, les tissus branchiaux sont systématiquement utilisés car ils constituent une interface privilégiée avec le milieu extérieur et représentent une clef de pénétration du cadmium dans l'animal par la voie directe de contamination. De plus, les branchies sont souvent les tissus qui accumulent le plus de cadmium (Baudrimont *et al.*, 1997 ; Inza *et al.*, 1997 ; Fraysse *et al.*, 2000).

### ▪ ***Corbicula fluminea***

*Corbicula fluminea* ou palourde asiatique (« Asiatic clam ») est un petit bivalve d'eau douce dont la coquille est généralement brune et caractérisée par une série de stries concentriques. Il vit à l'interface entre le sédiment et la colonne d'eau et se situe notamment en Asie, en Amérique du nord et en Europe. C'est une espèce invasive originaire



du sud-est asiatique et introduite en Europe autour de 1980. Elle est présente dans la plupart des rivières et des lacs du sud de la France (Dubois, 1995).

Ce bivalve est couramment utilisé dans les programmes de surveillance de la qualité de l'eau tel que le programme ECODYN<sup>8</sup> auquel le LEESA<sup>9</sup> est associé. Cette action thématique vise, entre autres, à favoriser le développement de recherches associant l'étude du devenir du cadmium et du zinc au sein du Lot et de la Garonne, à celle des transferts vers les êtres vivants (comme *C. fluminea*) et des perturbations structurales et fonctionnelles engendrés sur différents niveaux d'organisation biologique.

- ***Dreissena polymorpha***

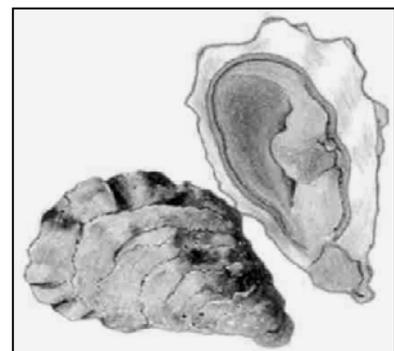
*Dreissena polymorpha* ou moule zébrée (« zebra mussel ») est une autre espèce invasive de bivalve d'eau douce et est couramment rencontrée en Europe. Elle diffère des moules d'eau douce autochtones car elle se fixe sur toute surface immergée à l'aide de filaments byssaux situés sous la face ventrale plate de la moule. Il est possible de la rencontrer dans les mêmes lacs ou cours d'eau que *C. fluminea* mais elle



occupe une niche écologique différente : *C. fluminea* est un animal benthique alors que *D. polymorpha* vit accrochée sur un support dans la colonne d'eau. En plus de cette différence d'ordre écologique, la sensibilité particulière de *D. polymorpha* aux métaux lourds l'a désignée comme second modèle. En effet lorsque ces deux espèces sont exposées en laboratoire à une même concentration de cadmium et de zinc, *D. polymorpha* ne survit pas au delà de 10 jours alors qu'après 24 jours *C. fluminea* est toujours en vie (Marie, 2005).

- ***Crassostrea gigas***

L'huître creuse ou japonaise (*Crassostrea gigas*) a été choisie comme troisième modèle biologique pour son omniprésence dans le bassin d'Arcachon. En effet, même si l'espèce indigène *Ostrea edulis*, communément appelée huître plate ou gravette subsiste encore à l'état sauvage dans ce milieu, l'huître qui est élevée pour la consommation est *C. gigas*.



<sup>8</sup> ECOtoxicologie et écoDYNamique des contaminants

<sup>9</sup> Laboratoire d'Ecophysiologie et d'Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques

L'expédition et la vente de ces huîtres s'effectuent sous le strict contrôle des services vétérinaires. La recherche dans les tissus de ce bivalve de composés potentiellement toxiques entre aussi dans le cadre du contrôle de la qualité des eaux littorales (RNO<sup>10</sup>). En effet, les laboratoires de l'IFREMER<sup>11</sup> procèdent entre autres à des analyses d'échantillons prélevés sur des huîtres *C. gigas* afin d'évaluer la contamination chimique du littoral. Ce choix d'une espèce vivant en eau de mer permet l'analyse de l'impact du cadmium et du zinc du Lot jusque dans l'estuaire de la Gironde (Schäfer *et al.*, 2002).

Parallèlement des huîtres *C. gigas* triploïdes ont aussi été utilisées. D'une façon générale, les huître triploïdes présentent de meilleures performances par rapport aux diploïdes, à la fois en terme de survie (Hand *et al.*, 1998), et de croissance (Allen et Downing, 1986). En effet, ces huîtres qui possèdent un jeu de chromosomes supplémentaire sont partiellement ou totalement stériles, et donc ne s'épuisent pas dans leur tâche de reproduction et grossissent plus vite. L'avantage économique est évident, puisque les huîtres triploïdes sont plus grosses que les huîtres diploïdes du même âge (qui peuvent perdre jusqu'à 60% de leur poids de chair lorsqu'elles pondent) et qu'elles peuvent être consommées toute l'année par des personnes qui ne les apprécient pas laiteuses (Marie, 2005). Cette particularité leur vaut d'ailleurs le nom d'« huître des quatre saisons ». Commercialisées récemment<sup>12</sup>, la question de la bioaccumulation des métaux s'est posée. Chez *C. gigas*, une plus faible bioaccumulation de cadmium a été observée dans les triploïdes par rapport aux diploïdes (Amiard *et al.*, 2005) et ceci est d'autant plus intéressant pour la commercialisation que les directives Européennes ont ramené la dose seuil de cadmium à 5 mg.kg<sup>-1</sup> de poids sec (CE N° 466/2001).

De plus, ces huîtres triploïdes possédant un troisième jeu de chromosomes, et donc en particulier une copie supplémentaire des gènes impliqués dans la résistance aux métaux, des effets de résistance plus marqués peuvent être espérés et il nous a paru intéressant d'inclure ce modèle biologique dans nos travaux.

---

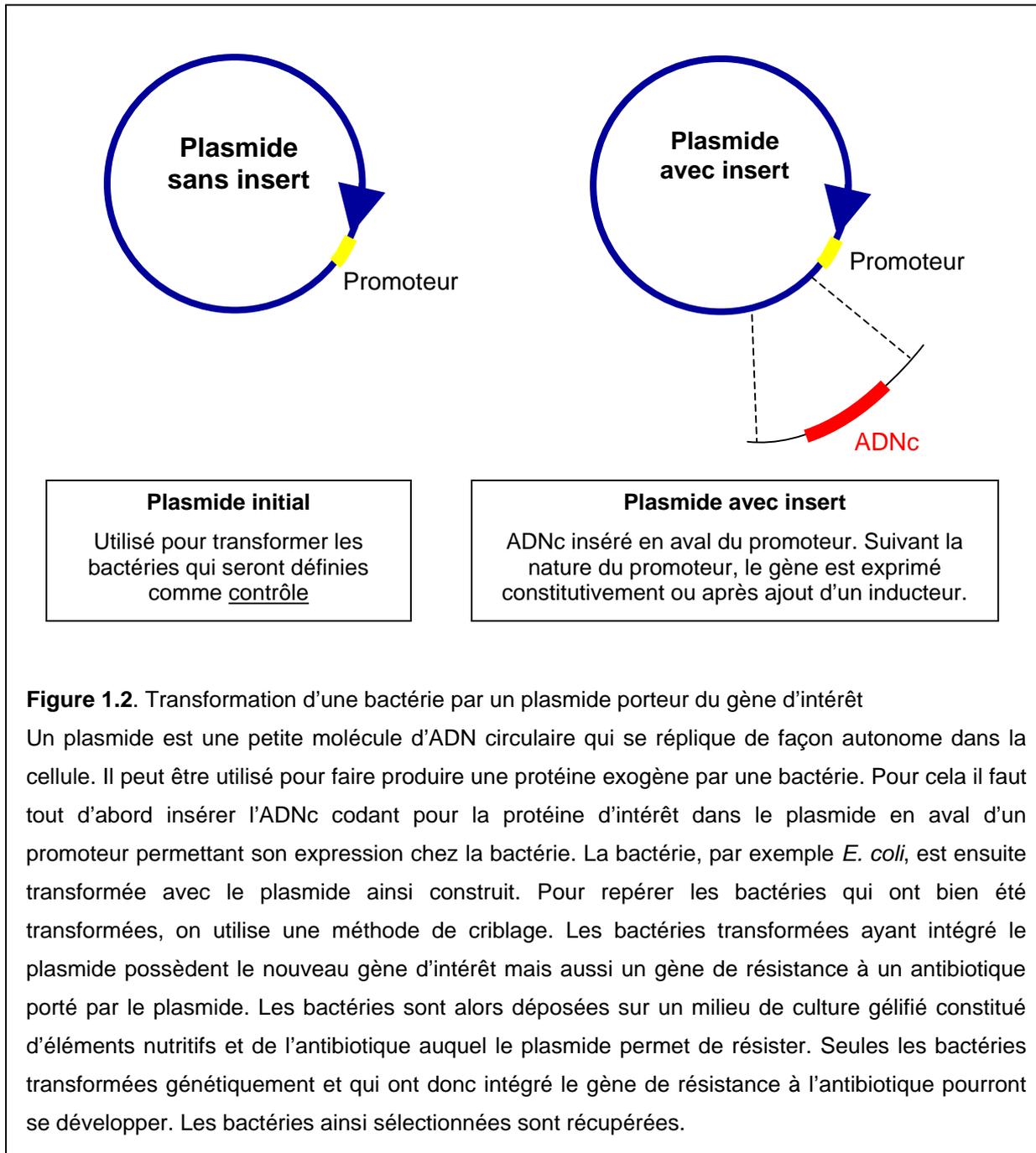
<sup>10</sup> Réseau National d'Observation

<sup>11</sup> Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer

<sup>12</sup> au cours de l'année 2001 après accord de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments

## 2.2- Les bactéries

Le principe a été d'obtenir des bactéries *Escherichia coli* transformées soit avec un plasmide sans insert (contrôle) soit avec le même plasmide contenant un ADNc codant pour une protéine impliquée ou susceptible d'être impliquée dans la résistance au stress métallique (Figure 1.2) et de comparer, entre autres, leur capacité de croissance en présence de métaux. De cette façon toute différence observée avec les bactéries contrôle peut être attribuée à l'expression de la protéine.



L'autre avantage d'utiliser la bactérie comme modèle est de pouvoir disposer de différentes souches, c'est à dire de bactéries de la même espèce (ici *E. coli*) mais qui ont un patrimoine génétique différent (un ou plusieurs gènes non fonctionnels). Ainsi, en utilisant une souche hypersensible aux métaux, le « contraste » entre résistance aux métaux d'une culture bactérienne exprimant une protéine impliquée dans la résistance aux métaux et une culture ne l'exprimant pas peut se trouver augmenté. Dans le cas extrême, l'utilisation d'une telle souche permet de visualiser l'effet bénéfique d'une protéine qui n'était pas détectable dans une souche dite sauvage. En effet, *E. coli* possède ses propre systèmes de défense contre un stress donné et l'effet des protéines endogènes d'*E. coli* peut masquer celui de la protéine exogène.

Encore par souci de simplification du modèle nous avons utilisé de façon ponctuelle des vésicules membranaires préparées à partir d'un autre type de bactérie : *Lactococcus lactis*. Utilisé moins couramment en biologie moléculaire qu'*E. coli*, *L. lactis* est une bactérie qui intervient dans la fermentation lactique des fromages.

Les principales souches bactériennes que j'ai utilisées sont listées dans le tableau 1.1. Les caractéristiques de toutes les souches bactériennes utilisées sont détaillées dans les chapitres 2 et 4.

**Tableau 1.1.** Souches bactériennes les plus utilisées dans les travaux présentés dans ce mémoire. *ImrA* est une pompe transmembranaire. Ces caractéristiques seront décrites dans le chapitre 4 (§ II.2.1).

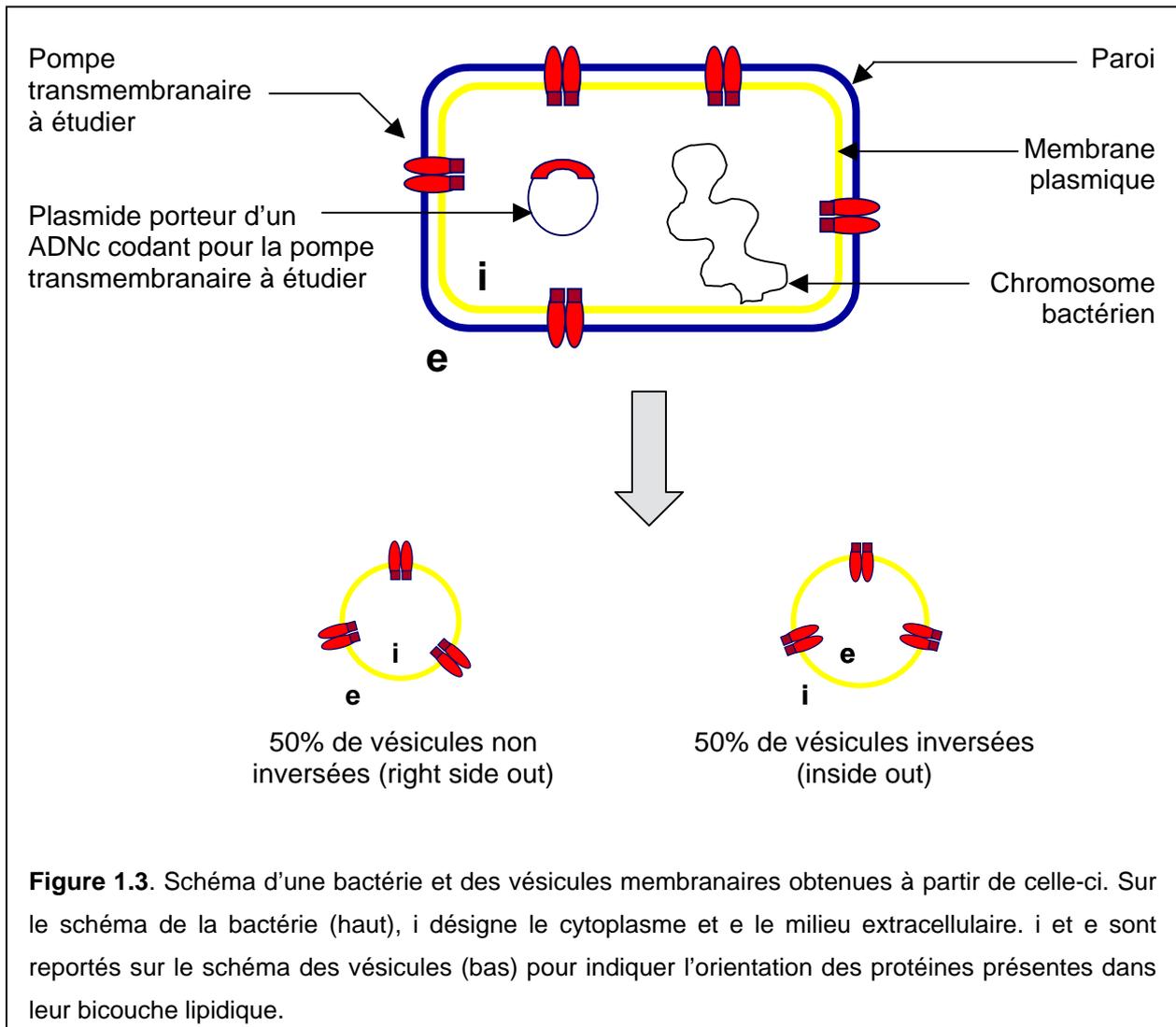
Bactérie	Souche	Particularité	Chapitre
<i>E.coli</i>	QC1726	Hypersensible au stress oxydant	2
<i>E. coli</i>	CS1562	Hypersensible au stress métallique (démonstré dans le chapitre 4, § II.2)	4
<i>L. Lactis</i>	NZ9000	Ne possède pas de gène <i>ImrA</i> fonctionnel	4

### 2.3- Les vésicules inversées

Au cours de ce travail, nous avons été amenés à étudier l'implication d'une famille de transporteurs membranaires dans la résistance aux métaux. Après avoir travaillé sur un modèle bivalve puis sur l'outil bactérien, l'utilisation des vésicules membranaires inversées pour isoler l'activité de transport de ces pompes s'est avérée indispensable pour compléter la démonstration.

La préparation de vésicules membranaires s'est faite à partir de la bactérie *L. lactis* sur-exprimant le gène codant pour une de ces pompes. Elle consiste à casser la membrane

bactérienne par de fortes variations de pression. Les morceaux de membrane vont naturellement former des vésicules dont environ 50% seront inversées, c'est à dire que l'orientation des protéines membranaires dans la vésicule est inversée par rapport à celle dans la membrane bactérienne : l'intérieur de la vésicule correspond à ce qu'était l'extérieur de la bactérie (Figure 1.3).



La membrane des vésicules membranaires ayant la même composition que celle de la membrane plasmique des bactéries à partir desquelles elles ont été préparées, la pompe transmembranaire que l'on veut étudier ne sera pas la seule protéine présente. Cependant, le fait d'utiliser pour la préparation des bactéries qui sur-expriment le gène codant pour cette pompe permet d'obtenir des vésicules où cette protéine est sur-représentée (jusqu'à 30% des protéines totales de la membrane dans notre cas (Margolles *et al.*, 1999).

L'intérêt d'utiliser des vésicules membranaires est double :

- isoler la protéine afin d'écartier l'hypothèse d'une interaction de la protéine étudiée avec une protéine endogène cytoplasmique de la bactérie modèle.
- simplifier techniquement l'étude du transport d'un métal. En effet, pour étudier le transport d'un métal du milieu intracellulaire vers le milieu extérieur il est techniquement plus facile et plus précis d'ajouter du métal dans le tampon contenant des vésicules inversées et de regarder si le métal est transporté à l'intérieur de celle-ci que de préparer des vésicules non inversées contenant ce métal et de suivre son accumulation dans le tampon.

### 3- LES CONDITIONS DE CONTAMINATION

Dans toute la thèse, les notations « cadmium », « zinc », « mercure », « cuivre » correspondent aux cations respectifs  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  provenant de  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$  et  $\text{CuSO}_4$ .

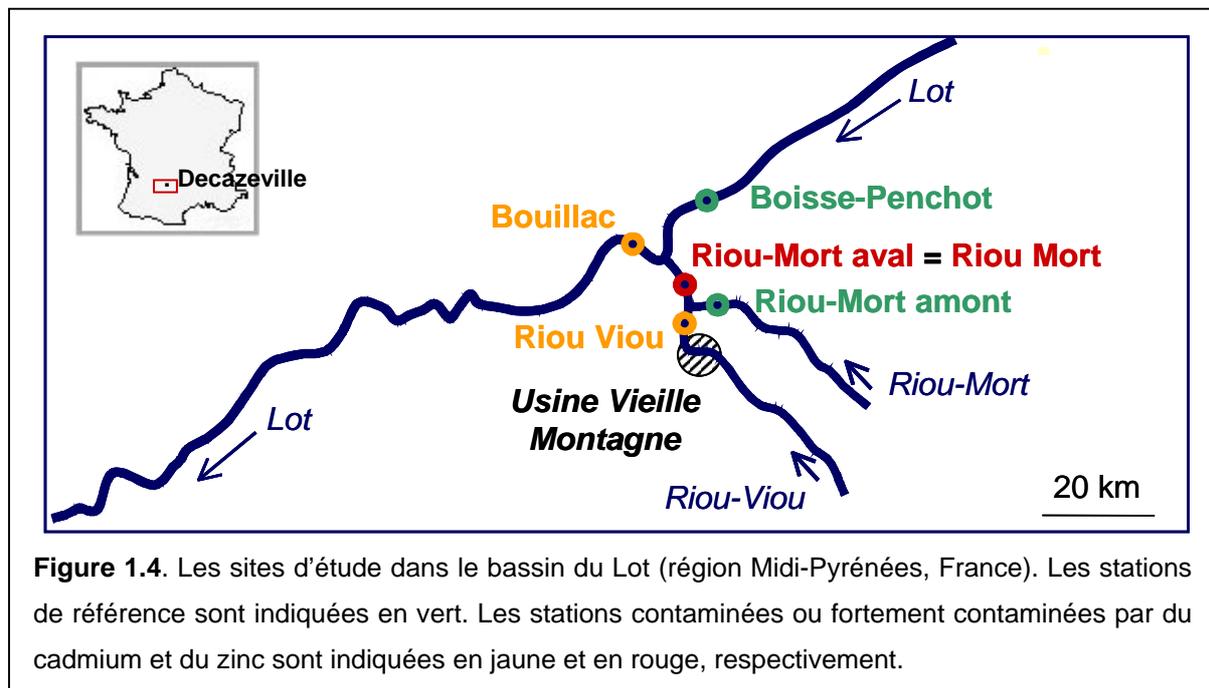
#### 3.1- Pour les bivalves

Une pollution d'origine anthropique par le zinc et le cadmium d'un petit affluent du Lot (Audry *et al.*, 2004a ; Audry *et al.*, 2004b) a permis d'aménager différentes stations d'étude sur le terrain dans le bassin de Decazeville (Figure 1.4). Des bivalves ont été récoltés sur des sites de référence non pollués par les métaux et transplantés dans des cages sur les différentes stations d'étude. Ils y ont été laissés au moins 3 semaines. Ramenés au laboratoire vivants dans des aquariums contenant l'eau du site dans lequel ils avaient séjourné, ils étaient ensuite congelés à  $-80^\circ\text{C}$  ou analysés le jour même.



Les caractéristiques des sites de références et les stations d'étude sont décrites en détail dans la section matériel et méthodes des articles qui vont suivre (Articles 4-1 et 5-1). L'eau de ces stations est notamment polluée par du zinc et du cadmium. Le flux de ces deux métaux diminue globalement avec les années mais il est affecté par divers paramètres environnementaux. Il varie ainsi avec les saisons, la température et les niveaux d'eau (Audry *et al.*, 2004a ; Audry *et al.*, 2004b). Les valeurs maximales de zinc et de cadmium

mesurées pendant les transplantations étaient respectivement de  $2200 \mu\text{g.L}^{-1}$  et de  $36,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ .



L'inconvénient majeur des contaminations sur le terrain est qu'il est difficile d'isoler l'effet d'un seul paramètre car la contamination est polymétallique et d'autres paramètres comme la température ou la pollution par d'autres xénobiotiques peuvent influencer les résultats. C'est pourquoi, au cours de cette étude des contaminations contrôlées ont également été réalisées en laboratoire.

Pendant il convient de souligner un point important : très souvent les contaminations métalliques en laboratoire décrites dans la littérature sont aiguës ( $0,35$  à  $3 \text{ mg.L}^{-1}$  Cd dans (Almeida *et al.*, 2002);  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  Cd dans (Siraj Basha et Usha Rani, 2003)) et de courte durée (quelques heures), ce qui n'est pas représentatif de ce que l'on peut rencontrer sur le terrain (Audry *et al.*, 2004a). Les réponses cellulaires analysées n'illustrent alors pas forcément ce qui se produit réellement en milieu naturel.

Pour étudier des réponses cellulaires représentatives de celles en milieu naturel, l'eau des aquariums a été contaminée avec des concentrations en métaux proches des celles rencontrées dans le bassin du Lot et les bivalves ont été soumis à cette pollution pendant des périodes allant de 3 à 15 jours (Articles 3-1 et 4-1, Chapitre 5, et Annexes 1 et 2).



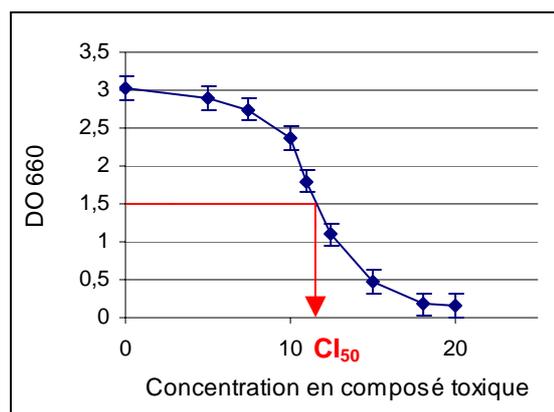
### 3.2- Pour les bactéries

Les contaminations de bactéries ont été effectuées dans deux conditions de culture, soit en milieu liquide soit en milieu gélifié.

Les cultures bactériennes en milieu liquide ont été contaminées par ajout de solutions contenant les ions métalliques directement dans le milieu de culture. Dans le cas de cultures sur milieu gélifié, la solution contenant le métal voulu a été ajoutée dans le milieu avant sa stérilisation par autoclave, sauf dans le cas du mercure. En effet, dans ce cas nous avons remarqué que la toxicité observée était moins marquée si le mercure était ajouté avant la stérilisation du milieu. Des explications seront proposées dans le chapitre 4 (§ II.2.3).

Les doses métalliques utilisées sont beaucoup plus élevées que dans le cas des bivalves et correspondent à des contaminations aiguës à temps court (quelques heures). Les concentrations ont été choisies après détermination de la concentration inhibitrice 50 ( $CI_{50}$ )

de la façon suivante : une culture de bactéries de  $DO_{660}$  inférieure à 0,1 est divisée en plusieurs tubes contenant différentes concentrations du composé toxique à tester. Après 10 à 15h d'incubation, la  $DO_{660}$  est de nouveau mesurée. Cela permet de tracer un graphe  $DO_{660}$  en fonction de la concentration du composé toxique. La  $CI_{50}$  correspond à la concentration de composé toxique ajoutée dans la culture dont la  $DO_{660}$  est égale à la moitié de celle qu'on aurait obtenu si on n'avait pas rajouté de composé toxique (Figure ci-dessus).

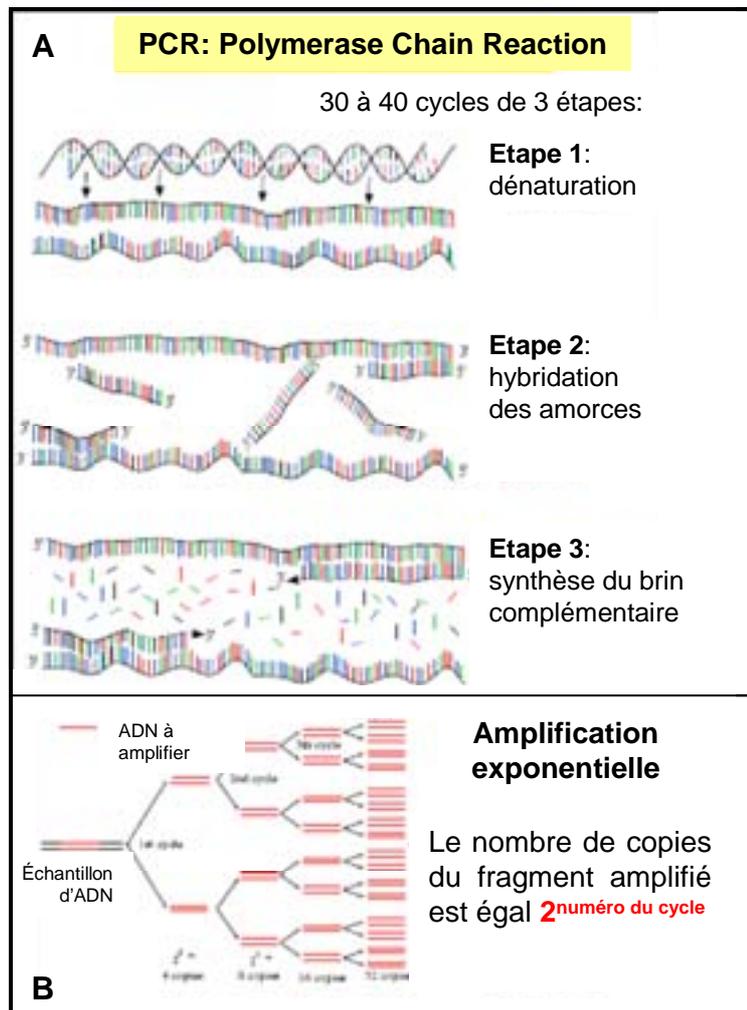


## 4- LES MÉTHODES UTILISÉES

Les méthodes et techniques utilisées sont des méthodes classiques de biologie moléculaire, de biochimie, et de microbiologie. Néanmoins, pour des lecteurs non familiers de ces techniques, nous allons brièvement en donner les définitions et en rappeler les principes essentiels nécessaires à la compréhension de la démarche expérimentale développée dans ce travail. Les détails spécifiques des conditions utilisées sont décrits dans chaque chapitre de cette thèse.

#### 4.1- Etude de l'expression d'un gène par PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitative

Brièvement, la PCR<sup>13</sup> « classique » est une méthode permettant d'obtenir rapidement une quantité importante et exploitable d'un segment précis d'ADN contenu dans un mélange complexe. Ce procédé consiste en une répétition d'une trentaine de cycles de synthèse comprenant trois étapes (Panneau A ci-contre) : la dénaturation de l'ADN par élévation de température, l'hybridation des amorces<sup>14</sup> au niveau de régions encadrant la zone à amplifier, la synthèse du brin complémentaire grâce à une ADN polymérase. A chaque cycle, le nombre de copies du fragment d'ADN au niveau duquel le couple d'amorce peut s'hybrider double. L'amplification est exponentielle (Panneau B ci-dessus).



La PCR quantitative, quant à elle, peut être utilisée pour évaluer les effets des différents traitements (ici la contamination métallique) sur le niveau d'expression de gènes, autrement dit sur la production d'ARN messagers (ARNm) à un temps  $t$  pour un gène donné. Afin d'être utilisable en PCR quantitative, les ARNm doivent préalablement être rétro-transcrits en ADN complémentaire (ADNc), c'est à dire des ADN simple brin qui sont des copies des ARNm. Ensuite, comme lors d'une PCR classique, l'utilisation d'amorces spécifiques lors de la PCR quantitative permet d'amplifier uniquement l'ADNc d'intérêt. L'avantage par rapport à une PCR classique est la détection des produits de PCR en cours de réaction. Pour cela on

<sup>13</sup> Abréviation de l'expression anglaise Polymerase Chain Reaction

<sup>14</sup> séquence oligonucléotidique qui hybridée avec une matrice d'ADN dont elle est complémentaire, permet à une ADN polymérase d'initier la synthèse du brin complémentaire de cette matrice

utilise un fluorophore s'intercalant entre les bases de l'ADN double brin : le SYBR-Green. Au début de l'amplification, le mélange réactionnel contient de l'ADN dénaturé, les amorces, et le fluorophore non lié qui n'est alors pas fluorescent. Après le couplage des amorces, le fluorophore s'intercale au double brin et émet de la fluorescence. Pendant l'étape d'élongation, le nombre de molécules de fluorophore lié à l'ADN synthétisé augmente ce qui se traduit par une augmentation de la fluorescence. Celle-ci est mesurée à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle et est représentative de la quantité d'ADN présente dans chaque tube. De plus, la quantité de produit de PCR obtenue à chaque moment de la phase d'amplification exponentielle est directement fonction du nombre de copies initiale du fragment d'ADNc amplifié ; ainsi il est possible de déterminer le niveau d'expression d'un gène.

Dans ce travail, la quantification a été relative. Pour cela, un contrôle endogène était amplifié en même temps que le gène d'intérêt. Les critères de choix pour ce gène contrôle sont qu'il soit suffisamment exprimé et que la proportion de l'ARN correspondant reste constante par rapport à l'ARN total. Dans ces travaux, ce gène a été celui codant pour l'ARN ribosomique 28S. Pour chaque échantillon d'ADNc, le nombre de copies d'ADNc du gène d'intérêt a d'abord été normalisé par rapport au nombre de copies d'ADNc 28S avant d'être comparé à d'autres échantillons.

Une relation entre contamination métallique et réponse cellulaire peut être établie à plusieurs niveaux. Nous l'avons vu précédemment, le niveau d'expression d'un gène en réponse à une contamination métallique peut être analysé par PCR quantitative. Mais cette technique, qui nécessite un couple d'amorces spécifique du gène d'intérêt, implique qu'au moins une partie de la séquence du gène soit connue.

#### **4.2- (Semi) quantification d'une protéine**

Une réponse cellulaire à une contamination métallique peut également se traduire par une augmentation de la quantité d'une protéine donnée. Pour détecter la protéine en question, nous avons eu recours à deux méthodes.

Dans le chapitre 4, pour établir une relation entre contamination métallique et quantité de protéine de type MDR, nous avons utilisé la technique du **transfert western**. Le principe est relativement simple. Après extraction des protéines totales, elles sont séparées dans un gel en fonction de leur taille (électrophorèse sur gel) grâce à un champ électrique. Ensuite elles sont transférées et fixées sur une membrane. Par la suite, cette dernière est mise en contact avec une solution d'anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine d'intérêt

(anticorps primaire). Après plusieurs lavages, la membrane est plongée dans une solution d'un deuxième anticorps, couplé à une enzyme, dont une partie reconnaît le premier anticorps qui est toujours fixé à la protéine d'intérêt. Lorsque le substrat de cette enzyme est ajouté sur la membrane, sa transformation en produit s'accompagne d'une émission de lumière qui va noircir un film photographique placé au dessus de la membrane. La protéine d'intérêt va alors être visualisée sur le film photographique sous forme d'une bande plus ou moins noire, la coloration de la bande étant directement proportionnelle à la quantité de protéine. Si une même quantité de protéines totale est utilisée pour chaque échantillon, la comparaison de l'intensité des bandes entre chaque échantillon est possible et permet de suivre la quantité de protéine en fonction de la nature et de la durée de la contamination métallique.

Le transfert western est une méthode classique pour détecter une protéine dans un mélange. Son succès dépend notamment de la qualité de l'anticorps primaire utilisé et la quantification peut ne pas être absolue.

Des méthodes de dosage ont pu être développées pour certaines protéines possédant des propriétés particulières. Dans le cadre de l'étude sur les métallothionéines (MTs) décrite dans le chapitre suivant, une méthode de dosage particulière aux MTs a été utilisée. Il s'agit d'un **dosage indirect par saturation au mercure** selon une technique adaptée au laboratoire par M. Baudrimont. L'avantage essentiel de cette méthode est d'utiliser du mercure inorganique à la place de l'isotope radioactif  $^{203}\text{Hg}$  (Baudrimont *et al.*, 1997). L'extrait protéique est d'abord mélangé à une solution de mercure inorganique préparée dans de l'acide trichloroacétique (TCA) à 10% ; les sites de liaisons de métaux (cystéines) des MTs sont alors saturés en mercure, puisque le mercure a une plus grande affinité pour les fonctions thiol que les autres métaux. L'excès de mercure est enlevé par ajout d'hémoglobine : le mercure non lié par les MTs est fixé par l'hémoglobine et celle-ci est séparée de la fraction contenant les MTs par centrifugation. La quantité de mercure contenue dans le surnageant et spécifiquement fixée aux MTs est alors déterminée par spectrométrie d'absorption atomique en vapeur froide (AMA 254). Elle est directement proportionnelle au nombre de MTs et permet une détermination indirecte de la concentration de ces protéines. Lorsqu'on ne connaît pas le nombre de sites de liaisons par protéine (c'est à dire le nombre de cystéines), la concentration en MTs est exprimée en nanomoles de sites de liaison au mercure par gramme de tissu ou par nombre de cellules (Baudrimont *et al.*, 2003).

#### 4.3- Dosage des métaux par spectrométrie d'absorption atomique (SAA)

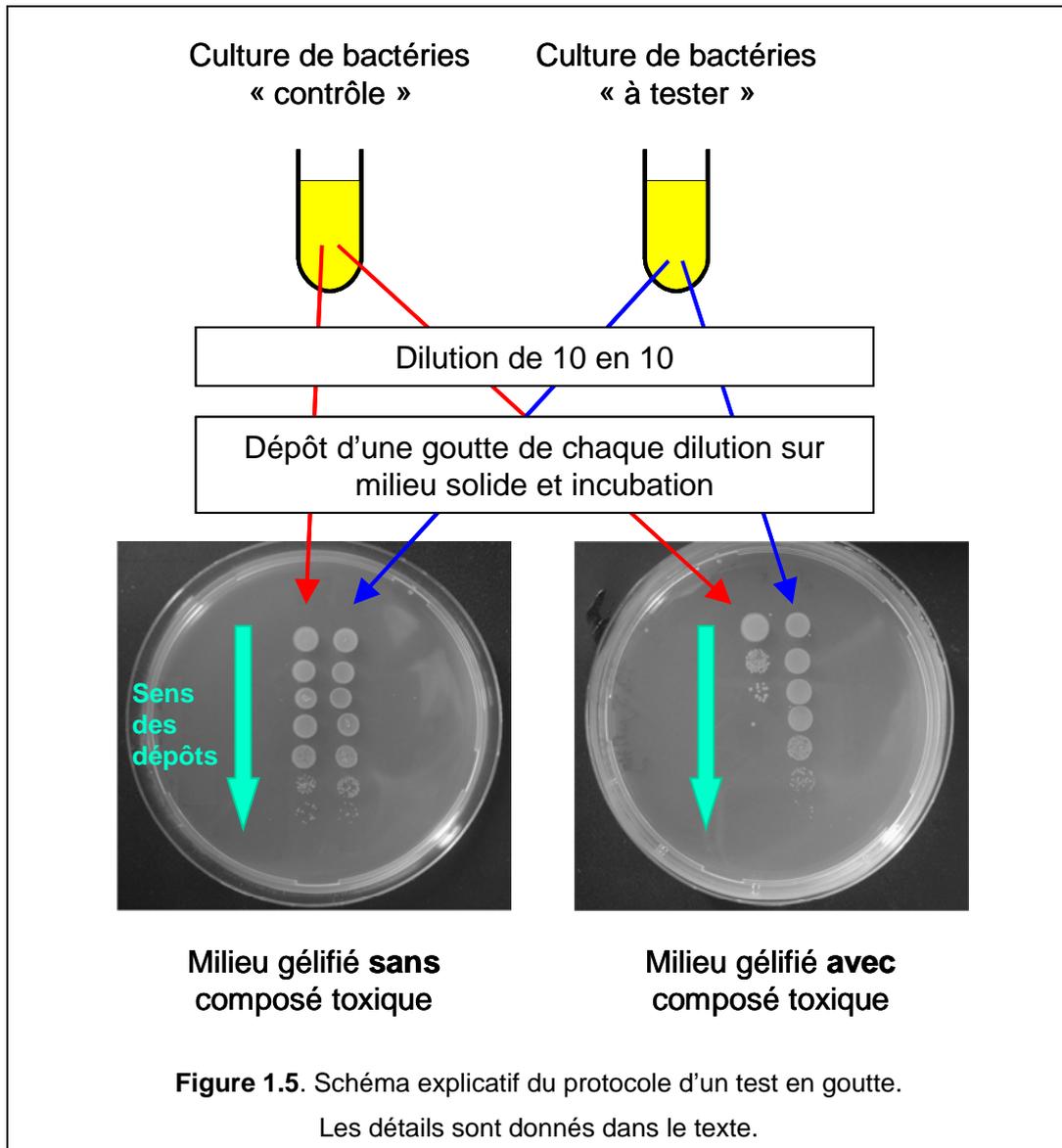
Que ce soit dans les tissus de bivalves ou dans les bactéries, la méthode de quantification des métaux reste toujours la même : la **spectrométrie d'absorption atomique** (SAA).

La SAA permet de doser des éléments chimiques à l'état de traces (quelques  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). L'analyse est basée sur l'absorption de photons par des atomes à l'état fondamental. L'absorption de chaque élément est spécifique, aucun autre élément n'absorbe la même longueur d'ondes. La méthode est quantitative et relative (il faut faire un étalonnage). Pour obtenir des atomes à l'état fondamental et pouvoir relier l'absorption de ces atomes à leur nombre et à leur concentration dans la solution à doser, deux méthodes sont possibles suivant les éléments à doser. Pour doser le mercure, celui-ci est libéré sous forme atomique soit par réaction chimique soit par combustion (absorption atomique en vapeur froide). Il est ensuite amalgamé sur un piège d'or puis libéré par évaporation après chauffage du piège. Pour les autres éléments il faut atomiser par énergie thermique après minéralisation des échantillons par attaque acide. L'échantillon à doser est vaporisé par aspiration de la solution dans une flamme (dosage du Cd, Zn, Cu), ou par atomisation électrothermique dans un four graphite pyrolytique (dosage du Cd).

#### 4.4- Protéine et résistance aux métaux : test en goutte

Pour étudier la fonction d'une protéine particulière dans la résistance aux métaux l'outil bactérien *E. coli* a été utilisé. Pour comparer rapidement la résistance aux métaux de bactéries produisant ou ne produisant pas la protéine d'intérêt, un test rapide et facile à mettre en œuvre a été développé : **le test en goutte**.

Ce type de test est en général utilisé en génétique de la levure mais le principe est le même avec des bactéries. Il s'agit de comparer la croissance de deux cultures sur un milieu gélosifié contenant un composé toxique (ici un métal). Pour cela on effectue des dilutions de 10 en 10 de chacune des cultures, qui contiennent bien entendu le même nombre de cellules. Une goutte de chaque dilution est déposée sur le milieu contaminé, puis les bactéries sont placées dans une étuve pendant une nuit. Les spots correspondant aux bactéries qui ont pu pousser en présence du métal ajouté dans le milieu sont ensuite visualisés (Figure 1.5).

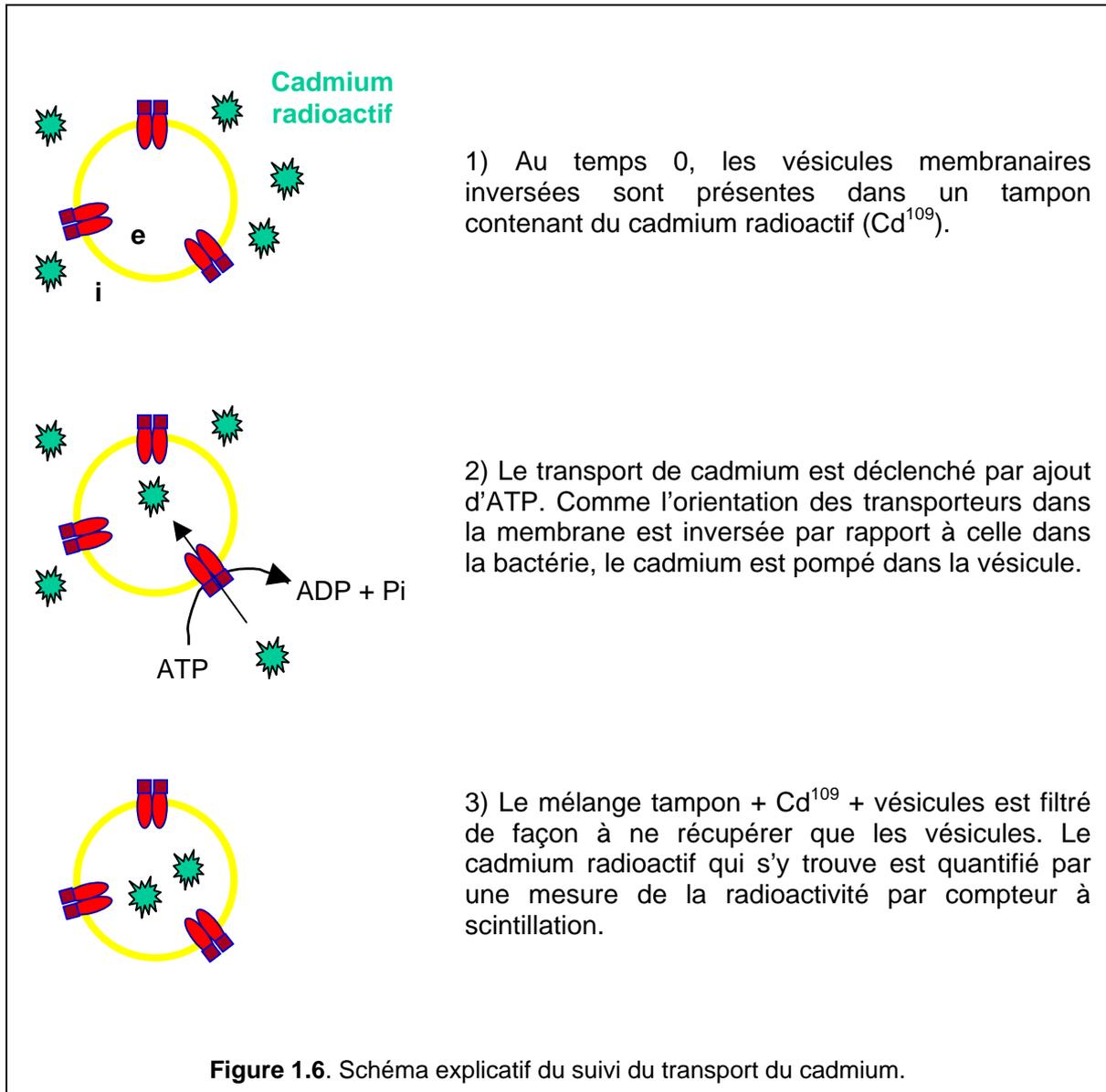


Pour comparer la croissance de deux cultures il suffit alors de regarder dans les deux cas, à partir de quel spot plus aucune croissance n'est observée. On considère qu'il y a une différence quand on observe au moins une dilution d'écart.

#### 4.5- Etude de phénomènes de transport

Pour étudier le transport du cadmium avec des vésicules membranaires inversées préparées à partir de bactéries sur-exprimant le transporteur membranaire d'intérêt, du cadmium radioactif a été utilisé. Les vésicules membranaires inversées sont diluées dans un tampon contenant l'élément radioactif et le transport de cadmium initié par ajout d'ATP. A chaque point de cinétique, une partie aliquote du mélange réactionnel est prélevé et déposé

sur un filtre retenant les vésicules membranaires et bien entendu le cadmium radioactif qui aurait pu y pénétrer. Le cadmium radioactif pouvant être fixé non spécifiquement au filtre ou aux vésicules est éliminé par plusieurs rinçages puis la radioactivité associée au filtre mesurée (Figure 1.6).



## RÉFÉRENCES DE L'INTRODUCTION ET DU CHAPITRE 1

- Adams SM, Shorey CD, Byrne M. 1997. An ultrastructural and microanalytical study of metal-ion content in granular concretions of the freshwater mussel *Hyridella depressa*. *Micron* 28, 1-11.
- Allen SK, Downing SL. 1986. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 102, 197-208.
- Almeida JA, Diniz YS, Marques SFG, *et al.* 2002. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environment International* 27, 673-679.
- Amiard JC, Perrein-Ettajani H, Gerard A, Baud JP, Amiard-Triquet C. 2005. Influence of ploidy and metal-metal interactions on the accumulation of Ag, Cd, and Cu in oysters *Crassostrea gigas* Thunberg. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 68-74.
- Audry S, Blanc G, Schäfer J. 2004a. Cadmium transport in the Lot-Garonne river system (France) - temporal variability and a model for flux estimation. *The Science of the Total Environment* 319, 197-213.
- Audry S, Schafer J, Blanc G, Jouanneau JM. 2004b. Fifty-year sedimentary record of heavy metal pollution (Cd, Zn, Cu, Pb) in the Lot River reservoirs (France). *Environ. Pollut.* 132, 413-426.
- Bard SM. 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 48, 357-389.
- Baudrimont M, Andres S, Durrieu G, Boudou A. 2003. The key role of metallothioneins in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase, after in situ exposure to Cd and Zn. *Aquat. Toxicol.* 63, 89-102.
- Baudrimont M, Metivaud J, Maury-Brachet R, Ribeyre F, Boudou A. 1997. Bioaccumulation and metallothionein response in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2096-2105.
- Baudrimont M, Schafer J, Marie V, *et al.* 2005. Geochemical survey and metal bioaccumulation of three bivalve species (*Crassostrea gigas*, *Cerastoderma edule* and *Ruditapes philippinarum*) in the Nord Medoc salt marshes (Gironde estuary, France).
- Bebiano MJ, Geret F, Hoarau P, *et al.* 2004. Biomarkers in *Ruditapes decussatus*: a potential bioindicator species. *Biomarkers* 9, 305-330.
- Beyersmann D, Hechtenberg S. 1997. Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 144, 247-261.

- Bispo A, Jourdain M. 1998. Méthodes d'évaluation du danger écotoxique. Ecotoxicologie des sols et des déchets: enjeux réglementaires, normalisation et recherches. In *Séminaire national ADEME - Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement*, pp. 15-33. Paris, 4 décembre 1998.
- Boisset M, Cumont G. 1996. Origines et évolution de l'apport alimentaire de cadmium. In: Documentation T, ed. *Plomb, cadmium et mercure dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque*. Paris: Ministère du travail et des affaires sociales. Direction générale de la santé.
- Bolognesi C, Landini E, Roggieri P, Fabbri R, Viarengo A. 1999. Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies. *Environ. Mol. Mutagen.* 33, 287-292.
- Bonneris E, Perceval O, Masson S, Hare L, Campbell PGC. 2005. Sub-cellular partitioning of Cd, Cu and Zn in tissues of indigenous unionid bivalves living along a metal exposure gradient and links to metal-induced effects. *Environ. Poll.* 135, 195-208.
- Boutier B. 1981. Synthèse des résultats de la surveillance des micropolluants dans la matière vivante. Ministère de l'Environnement. *Bull. du Réseau Natl. d'Obs.* 17, 115-174.
- Boutier B, Boutier J, Chiffolleau F, *et al.* 2000. Influence of the Gironde estuary outputs on cadmium concentrations in the coastal waters: consequences on the Marennes–Oléron bay (France). *Ocean. Acta.* 23, 745-757.
- Brange J, Langkjoer L. 1993. Insulin structure and stability. *Pharm. Biotechnol.* 5, 315-350.
- Carlsen CU, Moller JKS, Skibsted LH. 2005. Heme-iron in lipid oxidation. *Coord. Chem. Rev.* 249, 485-498.
- Carlson AR, Phipps GL, Mattson VR, Kosian PA, Cotter TG. 1991. The role of AVS in determining Cd bioavailability and toxicity in freshwater sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1309-1319.
- Chin TA, Templeton DM. 1993. Protective elevations of glutathione and metallothionein in cadmium-exposed mesangial cells. *Toxicology* 77, 145-156.
- Coleman JE. 1992a. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21, 441-483.
- Coleman JE. 1992b. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 897-946.
- Company R, Serafim A, Bebianno MJ, Cosson R, Shillito B, Fiala-Medioni A. 2004. Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Mar. Environ. Res.* 58, 377-381.

- Cossu C, Doyotte A, Jacquin MC, Babut M, Exinger A, Vasseur P. 1997. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38, 122-131.
- Culotta VC, Hamer DH. 1989. Fine mapping of a mouse metallothionein gene metal response element. *Mol. Cell Biol.* 9, 1376-1380.
- Daffada AA, Murray EJ, Young SP. 1994. Control of activator protein-1 and nuclear factor kappaB activity by interleukin-1, interleukin-6 and metals in HEPG2 cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1222, 234-240.
- De Lafontaine Y, Gagné F, Blaise C, Costan G, Gagnon P, Chan HM. 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence river (Canada). *Aquat. Toxicol.* 50, 51-71.
- Dubois C. 1995. Biologie et démo-écologie d'une espèce invasive, *Corbicula fluminea* (Mollusca: Bivalvia) originaire d'Asie: étude in situ (canal latéral à la Garonne, France) et en canal expérimental: Toulouse University, France.
- Eneman JD, Potts RJ, Oisier M, et al. 2000. Suppressed oxidant-induced apoptosis in cadmium adapted alveolar epithelial cells and its potential involvement in cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 147, 215-228.
- Fraysse B, Baudin JP, Garnier-Laplace J, Boudou A, Ribeyre F, Adam C. 2000. Cadmium uptake by *Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha* effects of pH and temperature. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 65, 638-645.
- Garcia-Rico L, Ramos Ruiz RE, Jimenez JV. 2001. Determination of total metals in cultivated oysters (*Crassostrea gigas*) from the northwest coast of Mexico by microwave digestion and atomic absorption spectrometry. *J. AOAC Int.* 84, 1909-1913.
- George SG, Langston WJ. 1994. Metallothionein as an indicator of water quality - the assessment of the bioavailability of cadmium, copper, mercury and zinc in aquatic animals at the cellular level. In: Sutcliffe D W, ed. *Water quality and stress indicators in marine and freshwater ecosystems: linking levels of organisation (individuals, populations, communities)*. Cumbria: Freshwater Biological Association, 138-153.
- Geret F, Serafim A, Barreira L, Bebianno MJ. 2002. Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. *Biomarkers* 7, 242-256.
- Giedroc DP, Chen X, Apuy JL. 2001. Metal response element (MRE)-binding transcription factor-1 (MTF-1): structure, function, and regulation. *Antioxid. Redox Signal.* 3, 577-596.
- Goldberg ED. 1986. The mussel watch concept. *Environ. Monit. Assess.* 7, 91-103.

- Grace AI, Gainey JLF. 1997. The effect of copper on the heart and filtration rate of *Mytilus edulis*. *Mar. Poll. Bull.* 18, 87-91.
- Graney RLJ, Cherry DS, Cairns JJ. 1983. Heavy metal indicator potential of the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) in artificial stream system. *Hydrobiologia* 102, 81-88.
- Gunther AJ, Davis JA, Hardin DD, *et al.* 1999. Long-term bioaccumulation monitoring with transplanted bivalves in the San Francisco estuary. *Mar. Poll. Bull.* 38, 170-181.
- Haddad JJ. 2002. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell Signal.* 14, 879-897.
- Hamer DH. 1986. Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 913-151.
- Hand RE, Nell JA, Maguire GB. 1998. Studies on triploid oysters in Australia XI. Survival of diploid and triploid Sydney rock on oysters *Saccostrea commercialis* (Ireland and Roughley) through out-breaks winter mortality caused by *Microcytos roughleyi* infestation. *J. Shellfish Res.* 17, 1129-1135.
- Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM, Bading H. 1997. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* 385, 260-265.
- Hartwig A. 2001. Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions: differential effects on structure and function. *Antioxid. Redox Signal.* 3, 625-634.
- Hartwig A, Schwerdtle T. 2002. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol. Lett.* 127, 47-54.
- Ikediobi CO, Badisa VL, Ayuk-Takem LT, Latinwo LM, West J. 2004. Response of antioxidant enzymes and redox metabolites to cadmium-induced oxidative stress in CRL-1439 normal rat liver cells. *Int. J. Molec. Med.* 14, 87-92.
- Inza B, Ribeyre F, Maury-Brachet R, Boudou A. 1997. Tissue distribution of inorganic mercury, methylmercury and cadmium in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) in relation to the contamination levels of the water column and sediment. *Chemosphere* 35, 2817-2836.
- Irato P, Santovito G, Cassini A, Piccinni E, Albergoni V. 2003. Metal accumulation and binding protein induction in *Mytilus galloprovincialis*, *Scapharca inaequalvis*, and *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44, 476-484.
- Isani G, Andreani G, Kindt M, Carpena E. 2000. Metallothioneins (MTs) in marine molluscs. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 46, 311-330.
- Ishizaki A, Funkushima M. 1968. Studies on "Itai-itai" disease (Review). *Nippon Eiseigaku Zasshi* 23, 271-285.
- Joseph P, Muchnok TK, Klishis ML, *et al.* 2001. Cadmium-induced cell transformation and tumorigenesis are associated with transcriptional activation of *c-fos*, *c-jun*, and *c-myc*

- proto-oncogenes: role of cellular calcium and reactive oxygen species. *Toxicol. Sci.* 61, 295-303.
- Jumarie C, Fortin C, Houde M, Campbell P, Denizeau F. 2001. Cadmium uptake by Caco-2 cells: Effects of Cd complexation by chloride, glutathione and phytochelatins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 170, 29-38.
- Klotz L, Kroncke KD, Buchczyk DP, Sies H. 2003. Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J. Nutr.* 133, 1448S-1451S.
- Kostic MM, Ognjanovic B, Dimitrijevic S, *et al.* 1993. Cadmium-induced changes of antioxidant and metabolic status in red blood cells of rats: in vivo effects. *Eur. J. Haematol.* 51, 86-92.
- Kramer KJM, Jenner HA, deZwart D. 1989. The valve movement response of mussels : a tool in biological monitoring. *Hydrobiologia* 189, 433-443.
- Lane TW, Saito MA, George GN, Pickering IJ, Prince RC, Morel FM. 2005. Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature* 435, 42.
- Lecoeur S, Videmann B, Berny P. 2004. Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*. *Environ. Res.* 94, 184-191.
- Leonard SS, Harris GK, Shi X. 2004. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Rad. Biol. Med.* 37, 1921-1942.
- Liao VH, Freedman JH. 1998. Cadmium-regulated genes from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Identification and cloning of new cadmium-responsive genes by differential display. *J. Biol. Chem.* 273, 31962-31970.
- Livneh E, Fishman DD. 1997. Linking protein kinase C to cell-cycle control. *Eur. J. Biochem.* 248, 1-9.
- Margolles A, Putman M, van Veen HW, Konings WN. 1999. The purified and functionally reconstituted multidrug transporter LmrA of *Lactococcus lactis* mediates the transbilayer movement of specific fluorescent phospholipids. *Biochemistry* 38, 16298-16306.
- Marie V. 2005. Etude de la réponse des métallothionéines chez les bivalves, *Corbicula fluminea*, *Dreissena polymorpha* et *Crassostrea gigas*, après exposition au cadmium et au zinc. Approches *in situ* et expérimentales. France: University Bordeaux 1.
- Marigomez I, Soto M, Cajaraville MP, Angulo E, Giamberini L. 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microsc. Res. Tech.* 56, 358-392.
- Mason AZ, Jenkins KD. 1995. Metal detoxification in aquatic organisms. In: Tessier A , Turner D R, eds. *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. New York: John Wiley and Sons.

- McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- Miller J, McLachlan AD, Klug A. 1985. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. *EMBO J.* 4, 1609-1614.
- Misra UK, Gawdi G, Akabani G, Pizzo SV. 2002. Cadmium-induced DNA synthesis and cell proliferation in macrophages: the role of intracellular calcium and signal transduction mechanisms. *Cell Signal.* 14, 327-340.
- Namslauer A, Brzezinski P. 2004. Structural elements involved in electron-coupled proton transfer in cytochrome c oxidase. *FEBS Lett.* 567, 103-110.
- Nohl H, Kozlov AV, Gille L, Staniek K. 2003. Cell respiration and formation of reactive oxygen species: facts and artefacts. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1308-1311.
- Nordberg G, Group C. 2003. Cadmium and human health: a perspective based on recent studies in China. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 16, 307-319.
- Olivier F, Ridd M, Klumpp D. 2002. The use of transplanted cultured tropical oysters (*Saccostrea commercialis*) to monitor Cd levels in North Queensland coastal waters (Australia). *Mar. Poll. Bull.* 44, 1051-1062.
- Parsell DLS. 1994. In: Morimoto R I, Tissieres A, Georgopoulos C, eds. *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. New York: CSHL Press, 457-494.
- Prakash NT, Rao KS. 1995. Modulations in antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalve *Perna viridis* during heavy metal exposure. *Mol. Cell. Biochem.* 146, 107-113.
- Radlowska M, Pempkowiak J. 2002. Stress-70 as indicator of heavy metals accumulation in blue mussel *Mytilus edulis*. *Environ. Int.* 27, 605-608.
- Regoli F, Hummel H, C. A-T, Larroux C, Sukhotin A. 1998. Trace metals and variations of antioxidant enzymes in Arctic bivalve populations. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 594-601.
- Ryter SW, Tyrrell RM. 2000. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity: Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Rad. Biol. Med.* 28, 289-309.
- Salovsky P, Shopova V, Dancheva V, Marev R. 1992. Changes in antioxidant lung protection after single intra-tracheal cadmium acetate instillation in rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 11, 217-222.
- Schäfer J, Blanc G, Lapaquellerie Y, Maillet N, Maneux E, Etcheber E. 2002. Ten-year-observation of the Gironde tributary fluvial system: fluxes of suspended matter, particulate organic carbon and cadmium. *Mar. Chem.* 79, 229-242.

- Searle PF. 1990. Zinc dependent binding of a liver nuclear factor to metal response element MRE-a of the mouse metallothionein-I gene and variant sequences. *Nucleic Acids Res.* 18, 4683-4690.
- Singhal RK, Anderson ME, Meister A. 1987. Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity. *FASEB J.* 1, 220-223.
- Siraj Basha P, Usha Rani A. 2003. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotox. Environ. Safe.* 56, 218-221.
- Stohs SJ, Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 321-336.
- Suedel BC, Rodgers JHJ, Deaver E. 1997. Experimental factors that may affect toxicity of cadmium to freshwater organisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 33, 188-193.
- Summer KH, Drasch GA, Heilmaier HE. 1986. Metallothionein and cadmium in human kidney cortex: influence of smoking. *Human Toxicol.* 5, 27-33.
- Tanguy A, Boutet I, Bonhomme F, Boudry P, Moraga D. 2002. Polymorphism of metallothionein genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* as a biomarker of response to metal exposure. *Biomarkers* 7, 439-450.
- Thevenod F, Friedmann JM, Katsen AD, Hauser IA. 2000. Up-regulation of multidrug resistance P-glycoprotein via nuclear factor-kappaB activation protects kidney proximal tubule cells from cadmium- and reactive oxygen species-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275, 1887-1896.
- Tran D, Boudou A, Massabuau JC. 2004. Relationship between feeding-induced ventilatory activity and bioaccumulation of dissolved and algal-bound cadmium in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 327-333.
- Tran D, Ciret P, Ciutat A, Durrieu G, Massabuau JC. 2003. Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: application to cadmium. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 914-920.
- Uma Devi UV. 1996. Bioaccumulation and metabolic effects of cadmium on marine fouling dressinid bivalve, *Mytilopsis sallei* (Recluz). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 47-53.
- Valbonesi P, Sartor G, Fabbri E. 2003. Characterization of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic sea and their possible use as sentinel organisms for biosurveillance programmes. *Sci. Tot. Env.* 312, 79-88.
- Viarengo A. 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Aquat. Sci.* 1, 295-317.
- Waalkes MP. 2003. Cadmium carcinogenesis. *Mutat. Res.* 533, 107-120.

- Waalkes MP, Misra RR. 1996. Toxicology of Metals. In: Chang L W, ed. *CRC press*. Boca Raton, FL, 231-244.
- Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192, 95-117.
- Wardman P, Candeias LP. 1996. Fenton chemistry: an introduction. *Radiat. Res.* 145, 523-531.
- Wiegant FA, Souren JE, van Rijn J, van Wijk R. 1994. Stressor-specific induction of heat shock proteins in rat hepatoma cells. *Toxicology* 94, 143-159.

## *Chapitre 2*

### *Le rôle complexe des métallothionéines*



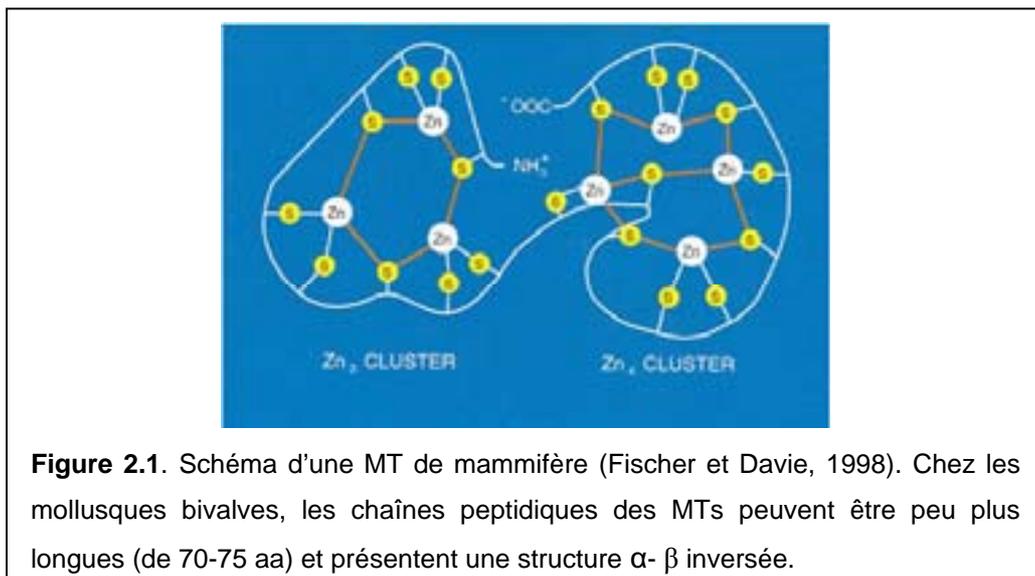
## I- LES METALLOTHIONIÉINES

Les métallothionéines (MTs) appartiennent à la famille des protéines intracellulaires qui sont capables de lier les métaux et qui régulent en particulier l'homéostasie des métaux essentiels comme le cuivre ou le zinc. Elles ont été isolées et caractérisées pour la première fois il y a 48 ans (Margoshes et Vallee, 1957) à partir de rein de cheval. Potentiellement présentes dans tous les organismes vivants, elles passionnent beaucoup de chercheurs en raison de leur structure chimique très particulière. En effet, les MTs sont des protéines de faible poids moléculaire (< 7000 Da) qui ne contiennent pas d'acides aminés aromatiques ni d'histidine. Elles sont par contre très riches en cystéines (Cys). Grâce au groupement thiol de ces cystéines elles peuvent séquestrer des métaux comme le zinc, le cuivre, le cadmium ou le mercure.

### 1- STRUCTURE DES MTs ET PROPRIÉTÉS DE SÉQUESTRATION DES MÉTAUX

Le nombre et la position des cystéines des MTs sont fortement conservés d'une espèce à l'autre. Les métaux divalents sont liés aux atomes de soufre dans des amas à géométrie tétraédrique (« cluster »).

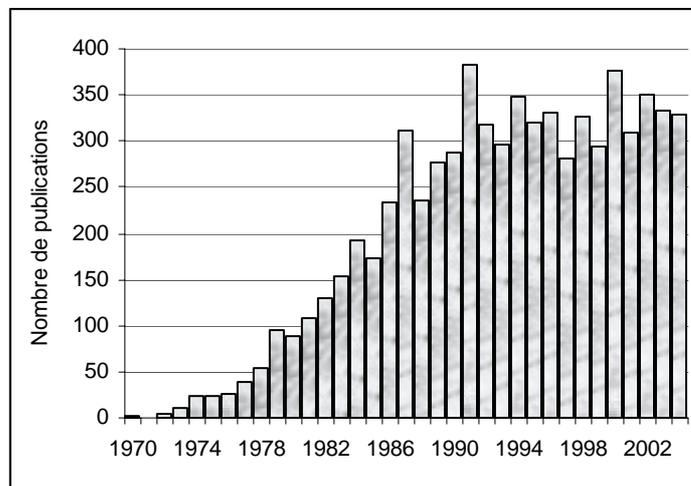
Chez les mammifères, les résidus cystéines sont distribués dans deux domaines indépendants : 11 sont localisées dans le domaine  $\alpha$  qui lie 4 atomes de métal divalent et 9 dans le domaine  $\beta$  qui ne lie que 3 atomes de métal divalent (Figure 2.1). Une protéine MT peut donc lier 7 atomes métalliques à saturation (Hamer, 1986). Les MTs de mammifères sont en général longues de 60 à 63 acides aminés et présentent une structure  $\beta$ - $\alpha$ .



L'affinité des métaux pour les atomes de soufre varie suivant les métaux, et la liaison avec le cadmium est plus stable (constante de stabilité :  $10^{17}$ - $10^{15} \text{ M}^{-1}$ ) qu'avec le zinc ( $10^{14}$ - $10^{11} \text{ M}^{-1}$ ). Le cadmium peut donc déplacer le zinc (Luther *et al.*, 1996).

## 2- LES FONCTIONS DES MTs

Comme le montre le graphe ci-dessous, le nombre de publications traitant des métallothionéines se situe autour de 300 par an depuis une quinzaine d'années. L'étude de ces protéines motive donc de nombreuses équipes de chercheurs et malgré tous ces travaux la fonction première des MTs reste encore partiellement une énigme (Coyle, 2002).



Evolution du nombre de publications traitant des métallothionéines et référencées sur PubMed depuis 1970

L'objectif n'est donc pas de faire ici une revue bibliographique exhaustive sur la ou les fonctions des MTs, mais plutôt de donner quelques éléments de réflexion pour poser le problème de la compréhension de leur rôle, en particulier vis-à-vis des métaux. Leur structure très particulière en amas avec leurs nombreuses cystéines, leur confère deux propriétés potentiellement utiles dans presque tous les processus biochimiques : la possibilité de lier des métaux et des propriétés rédox.

Beaucoup d'études ont été réalisées sur les mammifères, grâce notamment à des souris transgéniques. Des souris notées MT<sup>-/-</sup> ne possédant aucune des deux principales isoformes de MT (MT1 et MT2) constituent un bon outil (Michalska et Choo, 1993; Masters *et al.*, 1994). La croissance normale de ces souris (MT<sup>-/-</sup>) montre que les MTs ne sont pas essentielles pour la croissance et le développement (Michalska et Choo, 1993). D'autres

souris transgéniques, notées MT-Tg, possèdent plusieurs copies du gène codant pour MT1 et présentent ainsi des niveaux de MT bien supérieurs à ceux des souris contrôle (MT+/+) (Iszard *et al.*, 1995). L'utilisation de souris MT-/- et MT-Tg permet l'étude des fonctions des MTs dans diverses situations, en particulier lors de la contamination par le cadmium (des exemples sont développés dans les paragraphes suivants).

L'expression et la synthèse de MTs peut être induite par divers métaux (tels que le cadmium, le zinc, le cuivre ou le mercure), mais aussi par divers agents cytotoxiques (éthanol, tétrachlorure de carbone) dans des conditions de stress (diète, infection, irradiation) ou par les cytokines (Andrews, 2000 ; Isani *et al.*, 2000 ; Haq *et al.*, 2003). De nombreux travaux montrent l'induction de MTs après une contamination par le cadmium en particulier chez les organismes aquatiques, chez les poissons (Carginale *et al.*, 1998 ; Chowdhury *et al.*, 2005), les crabes (Silvestre *et al.*, 2005), les bivalves (Tessier et Blais, 1996 ; Baudrimont *et al.*, 1997 ; Baudrimont *et al.*, 1999 ; Engelken et Hildebrandt, 1999 ; Lemoine *et al.*, 2000 ; Geret et Cosson, 2002 ; Lecoeur *et al.*, 2004). Ces résultats, cités parmi d'autres, montrant l'induction des MTs par la contamination métallique, posent la question de la fonction des MTs par rapport aux métaux. La question de la fonction de détoxification des MTs est essentielle en écotoxicologie, et il est en particulier très important d'étudier ces protéines chez les espèces aquatiques puisque les MTs sont considérées comme des biomarqueurs potentiels de l'exposition aux métaux (Cosson et Amiard, 1998).

### **Propriétés de liaison des métaux et rôle de protection**

La sur-expression des gènes de MTs induite par la contamination métallique suggère un effet de protection de ces protéines vis-à-vis des métaux lourds. Une revue récente (Klaassen *et al.*, 1999) regroupe les résultats en faveur de ce rôle de protection des MTs par rapport à la toxicité du cadmium. Cependant la détoxification des métaux lourds est parfois considérée comme une propriété fortuite des MTs plutôt que comme une fonction liée à l'évolution (Palmiter, 1998).

Deux exemples peuvent illustrer cet effet de protection *in vivo* et *in vitro* :

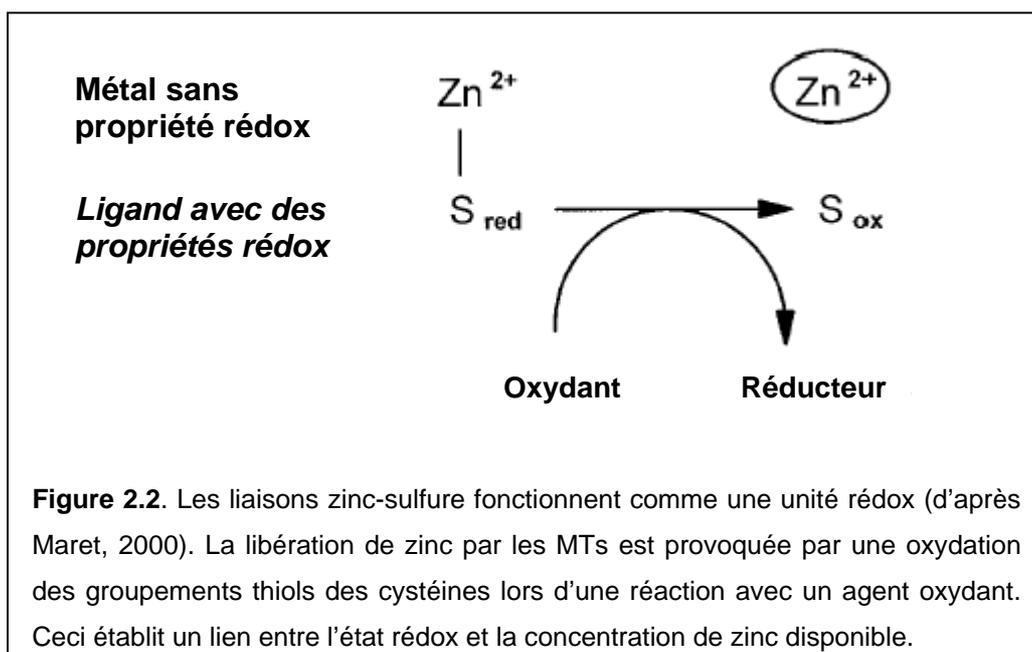
- Chez les mammifères, la démonstration du rôle de protection des MTs vis-à-vis de la toxicité des métaux dérive de l'utilisation de souris MT-/- et MT-Tg. Ainsi, l'administration répétée de cadmium à des souris MT-/- génère une néphrotoxicité à une dose dix fois plus faible que dans le cas des souris contrôle MT+/+ (Klaassen et Liu, 1998). De plus, des souris MT-Tg chez lesquelles les MTs sont surexprimées, présentent une plus forte résistance que les souris contrôle (Liu *et al.*, 1995) .

- La relation entre l'induction des MTs et le niveau de cytotoxicité a été testée *in vitro* sur des hémocytes d'huître (*Crassostrea virginica*), exposés au cadmium, au cuivre et au zinc (Butler et Roesijadi, 2001). Ces trois métaux induisent la formation de MTs, mais le cadmium a le plus fort pouvoir d'induction. Le niveau de cytotoxicité est visualisé par une diminution de la rétention du rouge neutre par les lysosomes. En effet, leur membrane fragilisée par les métaux ne permet plus de retenir ce colorant. Lorsque la même expérience est réalisée mais cette fois en empêchant l'expression de MT grâce à des oligonucléotides antisens anti-MT, la rétention du rouge neutre est alors réduite de 41% par rapport au contrôle. Ce résultat montre ainsi que l'expression des MTs confère une protection contre le cadmium chez un mollusque.

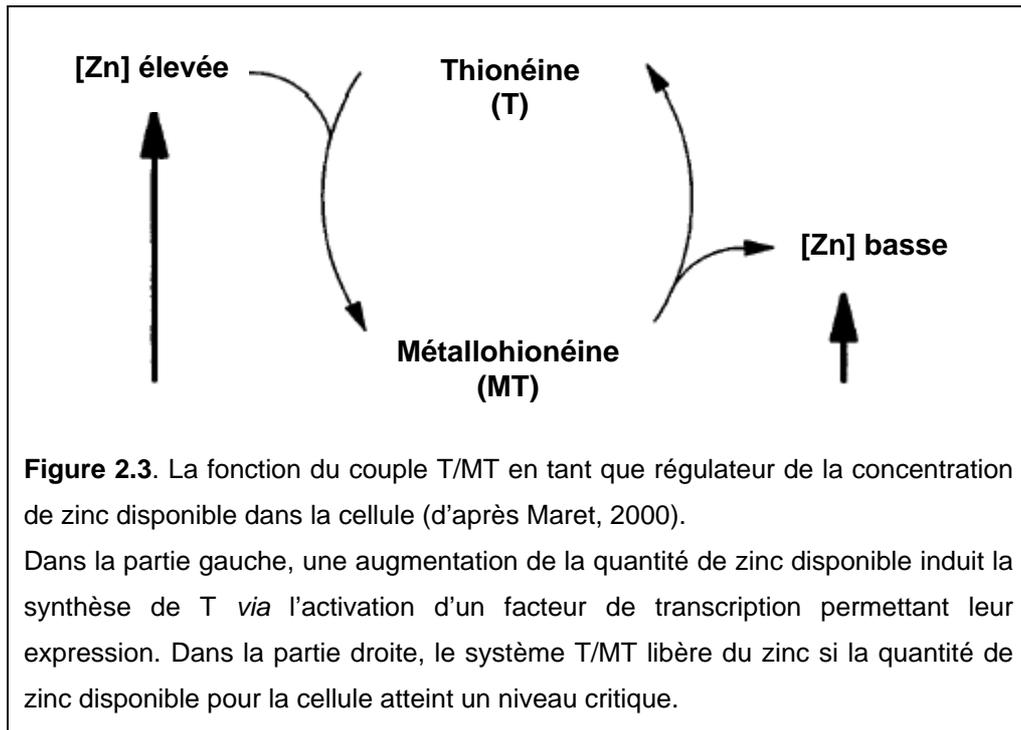
### Propriétés rédox des MTs et rôle dans l'homéostasie du zinc

La structure particulière des MTs en clusters et leur composition liée à la présence de groupements cystéine confèrent à ces protéines des propriétés rédox qui peuvent intervenir dans de nombreux processus cellulaires impliquant des métaux.

Un nouveau concept a été développé (Maret et Vallee, 1998) pour décrire la relation entre la structure et la fonction des MTs. Dans ce mécanisme, soulignant l'importance des Zn-MT, les motifs Zn-S peuvent être oxydés ou réduits ce qui s'accompagne de libération ou de liaison de zinc (Figure 2.2). Les MTs présentent ainsi des propriétés rédox, qui ne sont pas dues au métal lui-même (puisque le zinc n'a pas de propriétés rédox) mais plutôt à son environnement de coordination.



Dans ce mécanisme, la fonction du groupe rédox Thionéine/Métallothionéine (où T correspond à la forme de MT non liée au métal) apparaît comme un régulateur du zinc disponible dans la cellule (Figure 2.3). De ce fait, les composés oxydants entraînent la libération de zinc, tandis que les composés réducteurs ou antioxydants rétablissent la capacité des groupements thiols à lier le zinc. Les oxydants biologiques incluent les disulfures (comme le glutathion oxydé) et les composés contenant du sélénium. Par exemple, les enzymes à sélénium, telles que la glutathion peroxydase, ont la possibilité d'oxyder des MTs ou de réduire leur forme oxydée (Jacob *et al.*, 1999; Chen et Maret, 2001).



La régulation des niveaux de zinc intracellulaire exercée par les MTs joue également un rôle dans la régulation métabolique, *via* la donation ou la séquestration du zinc dans des enzymes à zinc ou de facteurs de transcription à doigts de zinc. Certaines enzymes, comme la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase par exemple, sont inhibées par le zinc et réactivées par ajout de thionéine (Maret *et al.*, 1999).

### Rôle des MTs dans le contrôle de l'activité respiratoire mitochondriale

La concentration en zinc dans les mitochondries de foie de rat est plus faible que dans le cytosol (Thiers et Vallee, 1957), indiquant qu'un mécanisme maintient ce gradient et régule la quantité de zinc dans la mitochondrie. Comme nous venons de le voir, les MTs sont impliquées dans la régulation et dans la distribution du zinc dans la cellule et des réactions rédox modulent le transfert de zinc (Maret et Vallee, 1998).

Le rejet de zinc du domaine  $\beta$  N-terminal des MTs présentes dans l'espace intermembranaire (IMS) des mitochondries inhibe la respiration. En effet le zinc inhibe la respiration mitochondriale (Skulachev *et al.*, 1967) par altération de la chaîne de transport des électrons (Kleiner, 1974). L'ajout de thionéine restaure la respiration. Ces résultats (Ye *et al.*, 2001) suggèrent que parmi d'autres fonctions possibles, le système T/MT est capable de contrôler la respiration en régulant la libération de zinc au niveau des complexes de la chaîne respiratoire.

### **Propriétés antioxydantes et réponse au stress**

Les propriétés rédox des MTs sont donc à l'origine de réponses physiologiques, comme la régulation du zinc disponible dans la cellule ou la modulation de la respiration mitochondriale, mais jouent également un rôle dans des réponses à un stress oxydant.

En effet, le potentiel rédox du couple T/MT est si bas ( $E_0' < -340$  mV) que les MTs peuvent être oxydées par de nombreux oxydants cellulaires (Maret et Vallee, 1998).

Beaucoup de résultats concernant les propriétés antioxydantes des MTs ont été obtenus *in vitro* et proviennent d'expériences sur des cellules en culture exposées à des composés oxydants. Dans celles-ci, le niveau d'expression des gènes de MT, ou la quantité de protéine, est plus élevé que dans les cellules contrôle (Sato et Bremner, 1993 ; Kiningham et Kasarskis, 1998 ; Viarengo *et al.*, 2000).

Plusieurs études ont montré que les MTs neutralisaient les radicaux libres comme le radical hydroxyle ou l'anion superoxyde (Thornalley et Vasak, 1985 ; Kumari *et al.*, 1998). De même, les MTs de *Crassostrea virginica* et de lapin neutralisent le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  (Anderson *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent que les MTs peuvent être impliquées dans des mécanismes d'immunorégulation chez l'huître en neutralisant des ROS antimicrobiens générés par les macrophages.

D'autres exemples chez les mammifères ont été publiés : les cellules V79 de hamster chinois, sélectionnées pour leur résistance au cadmium, sont significativement plus résistantes à un stress oxydant que les cellules contrôles. Cette augmentation de résistance a été attribuée aux MTs, car les cellules V79 présentent une concentration de MTs supérieure à celle des cellules contrôle (Mello-Filho *et al.*, 1988).

D'autres résultats démontrant les propriétés antioxydantes des MTs ont été obtenus *in vivo* et la concentration de MT est inversement corrélée à la sensibilité à un stress oxydant.

Les propriétés antioxydantes de MTs ont été testées du niveau moléculaire à celui de l'organisme entier chez la moule *Mytilus edulis*. Dans un groupe de bivalves, l'induction des

MTs a été provoquée par une pré-exposition au cadmium puis un stress oxydant a été déclenché par une exposition au fer. La production de radicaux hydroxyle est seulement observée dans le lot de bivalves contrôles où les MTs n'ont pas été induites au préalable (Viarengo *et al.*, 1999).

Chez les souris, les lignées MT<sup>-/-</sup> sont en général plus sensibles au stress oxydant généré par des radiations ou des xénobiotiques que les souris contrôle (Sato et Kondoh, 2002).

La démonstration la plus fine des propriétés antioxydantes des MTs a pu se faire grâce à un mutant de levure: *sod1*. Cette souche est hypersensible au stress oxydant car elle ne possède pas de superoxyde-dismutase (SOD), enzyme permettant la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène qui peut à son tour être transformé en eau et en oxygène. Les MTs de levure ou de mammifère exprimées chez ce mutant peuvent compléter fonctionnellement la SOD et protègent la levure du stress oxydant (Tamai *et al.*, 1993).

Il apparaît donc que ces protéines peuvent intervenir à plusieurs niveaux lors d'une contamination par des métaux lourds. De plus, même si la relation entre l'expression de MTs et la résistance accrue à un métal est parfois démontrée, la protection contre les métaux lourds n'est certainement pas leur seule fonction et leurs propriétés rédox peuvent potentiellement intervenir dans de nombreux mécanismes biochimiques.

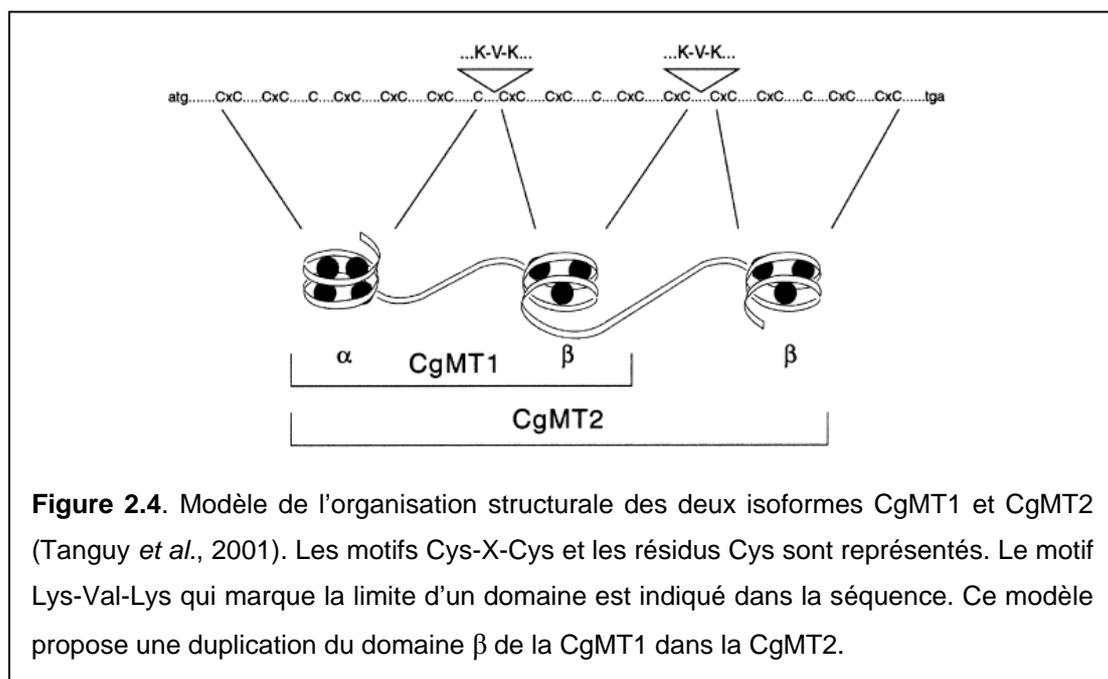
D'une façon générale, pour étudier la fonction d'une protéine, l'idéal est de pouvoir disposer d'organismes dans lesquels celle-ci est ou n'est pas exprimée et c'est ce qui nous a amené à choisir des bactéries modifiées ou non avec des gènes de MTs pour le travail présenté dans ce chapitre.

## II- METHODOLOGIE :

### EXPRESSION DE MÉTALLOTHIONÉINES CHEZ *E. COLI*

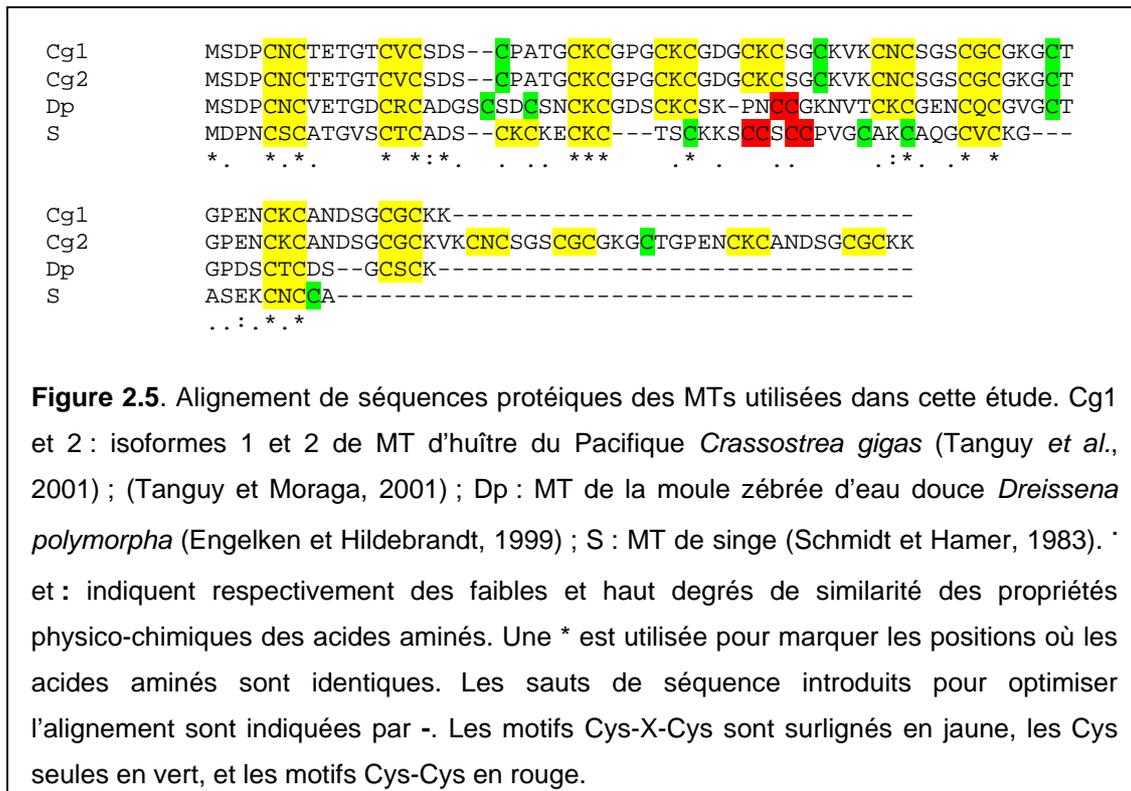
#### 1- LES MÉTALLOTHIONÉINES (MTs) CHOISIES

Des ADNc codant pour des MTs de plusieurs espèces [levure (Berka *et al.*, 1988), huître (Tanguy et Moraga, 2001), truite (Kille *et al.*, 1990), souris (Hou *et al.*, 1988), singe (Murooka et Nagaoka, 1987), et homme (Odawara *et al.*, 1995)] ont déjà été exprimées chez *E. coli*. Dans notre étude, différentes souches d'*E. coli* ont été transformées avec des plasmides porteurs d'un ADNc codant pour une des quatre MTs choisies en fonction de leur différence de structure : une de mammifère (singe), et trois de mollusques (*Dreissena polymorpha*, et isoformes 1 et 2 de *Crassostrea gigas*). En effet, pour chaque espèce, les MTs peuvent exister sous plusieurs isoformes : c'est le cas par exemple de l'huître *Crassostrea gigas* qui en possède plusieurs (trois connues). L'isoforme CgMT1 contient 75 aa dont 21 Cys arrangées en motifs Cys-X<sub>(1-3)</sub>-Cys alors que l'isoforme CgMT2 correspond à une chaîne de 107 aa qui présente une structure tri modulaire inhabituelle  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$  et contient 30 groupements Cys (Figure 2.4) (Tanguy *et al.*, 2001 ; Tanguy et Moraga, 2001). Ces deux isoformes ne présentent pas les motifs Cys-Cys trouvés habituellement dans le domaine  $\alpha$  des MTs de mammifères. Enfin la MT de la moule zébrée *Dreissena polymorpha* ne correspond pas aux autres séquences connues de MT de bivalves puisqu'elle contient justement ce motif Cys-Cys (Engelken et Hildebrandt, 1999).



**Figure 2.4.** Modèle de l'organisation structurale des deux isoformes CgMT1 et CgMT2 (Tanguy *et al.*, 2001). Les motifs Cys-X-Cys et les résidus Cys sont représentés. Le motif Lys-Val-Lys qui marque la limite d'un domaine est indiqué dans la séquence. Ce modèle propose une duplication du domaine  $\beta$  de la CgMT1 dans la CgMT2.

Les quatre séquences de MTs utilisées pour notre étude sont présentées dans la figure 2.5.



Dans la suite de notre étude, nous utiliserons les abréviations indiquées dans le tableau 2.1 pour faire référence à ces quatre métallothionéines.

**Tableau 2.1.** Notations utilisées dans ce chapitre.

Notation	Signification	Organisation
MTD	MT de <i>Dreissena polymorpha</i>	$\alpha$ - $\beta$
MTC1	Isoforme 1 de MT de <i>Crassostrea gigas</i>	$\alpha$ - $\beta$
MTC2	Isoforme 2 de MT de <i>Crassostrea gigas</i>	$\alpha$ - $\beta$ - $\beta$
MTS	MT de singe	$\beta$ - $\alpha$

## 2- LES CONSTRUCTIONS PLASMIDIQUES

Les constructions plasmidiques ont été réalisées au laboratoire à partir d’ADNc codant pour les MTs selon la procédure générale schématisée au chapitre 1 (Figure 1.2, § II.2.2). Deux plasmides, pGEMT ou pET20b, ont été utilisés pour transformer les bactéries selon que nous souhaitions faire exprimer les MTs dans leur cytoplasme ou leur périplasme. Notons que dans toutes les bactéries modifiées, l’ADNc de MT est sous le contrôle du promoteur

*lac*. Une conséquence importante est donc que, contrairement par exemple à un mollusque, l'expression des MTs chez la bactérie, n'est pas modifiée par les contaminants métalliques. Des plasmides porteurs des ADNc nous ont été gentiment fournis par les auteurs ayant publié les séquences de MT de singe (Thiele *et al.*, 1986), et de l'isoforme 2 de MT de *C. gigas* (Tanguy *et al.*, 2001). Le plasmide porteur de l'ADNc de MTC2 permet l'aplication de deux fragments correspondant à MTC1 et MTC2 avec le même couple d'amorces puisque l'amorce antisens s'hybride à l'extrémité des deux modules  $\beta$  de MTC2. Concernant *D. polymorpha*, nous avons dû cloner l'ADNc car les auteurs (Engelken et Hildebrandt, 1999), ayant changé de domaine de recherche, n'ont pas pu nous en faire bénéficier. Les conditions expérimentales sont résumées dans l'encadré 2.1.

#### **Clonage de l'ADNc de MT de *D. polymorpha* dans le pGEM-T : pMA10**

Des moules zébrées *D. polymorpha* ont été placées pendant deux mois dans une des stations contaminées par du cadmium et du zinc (station Bouillac, Figure 1.4, Chapitre 1, § II.3.1). Les ARN totaux sont extraits des branchies avec le réactif RNAXEL (Eurobio) selon les indications du fournisseur, puis quantifiés par lecture de la DO<sub>260</sub>. 1  $\mu$ g d'ARN est utilisé pour l'étape de rétro-transcription. Les ARN sont d'abord chauffés 5 min à 72°C en présence d'1  $\mu$ g de l'amorce PT-Race (5'-GGCCACGCGTCTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTT-3') dans un volume final de 14  $\mu$ L puis refroidis dans la glace. La synthèse du premier brin est ensuite effectuée en présence de dNTPs (250  $\mu$ M), de Rnasine (Promega, 1U), de la reverse transcriptase M-MLV RNase H- (Promega, 1U), de tampon M-MLV (1x) et d'eau pour compléter jusqu'à 40  $\mu$ L. La réaction se fait pendant 1h à 42°C puis est stoppée en chauffant le mélange 10 min à 65°C. Les produits de rétro-transcription sont dilués deux fois avant l'étape de PCR. Les amorces cDNA<sub>dpm</sub>t (5'-GCATTCAACATGAGTGATCC-3') et PCR Race (5'-GGCCACGCGTCTCGACTAGTAC-3') sont utilisées. Le mélange réactionnel contient le tampon de réaction (1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), la polymérase *Taq* (Promega, 1U), 200 nM de chaque amorce, 1  $\mu$ L d'ARNc, les dNTPs (250  $\mu$ M), et de l'eau pour compléter jusqu'à 40  $\mu$ L. Après une étape de dénaturation initiale de 3 min à 94°C, 30 cycles d'amplification sont réalisés (30s à 94°C, 30s à 55°C, 30s à 72°C), suivis par une étape finale de 3 min à 72°C.

Les produits de PCR sont ensuite séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1%. Le fragment d'intérêt, visualisé sous lumière UV, est alors excisé et extrait du gel avec le kit QIA-quick gel extraction (Qiagen) en suivant les indications du fournisseur. Le fragment purifié est inséré dans le plasmide pGEM-T-Easy (Promega) grâce à l'ADN ligase T4. Les cellules JM109 (Promega) compétentes sont transformées avec 3  $\mu$ L du mélange de ligature et les transformants positifs sont sélectionnés sur un milieu (Luria Bertani: 5 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure, 10 g.L<sup>-1</sup> de bactotryptone, et 10 g.L<sup>-1</sup> de NaCl) contenant 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> d'ampicilline, et les vecteurs recombinants séquencés. Les séquences sont déterminées par la société Millegen Biotechnologies (Labège, France) en utilisant les amorces universelles T7 et SP6.

#### **Encadré 2.1**

- **Pour l'expression des MTs dans le cytoplasme**

Les ADNc codant pour les quatre MTs ont été amplifiés par PCR (une étape de 5 min à 95°C, suivie de 40 cycles de 30 s à 95 °C, 30 s à 52 °C et 30 s à 72 °C, et pour terminer une étape d'élongation de 10 min à 72 °C) en utilisant des couples d'amorces apportant un site de restriction *NdeI* dans l'amorce sens et dans l'amorce antisens un site *XhoI* (pour MTD) ou *BamHI* (pour MTC1, MTC2 et MTS). Les sites de restriction *NdeI*, *XhoI* and *BamHI* sont soulignés dans les séquences dans le tableau suivant :

<b>MTD</b>	MTD5 (5'-GCATTCC <u>CATATG</u> AGTGATCCATGTAAGTGC-3')
	MTD3 (5'-GACACC <u>CTCGAGT</u> CACTTGCAAGAGCAGCC-3')
<b>MTC1, MTC2</b>	MTG5 (5'-GATATGAAGGAGATATAC <u>CATATG</u> TCTGATCCATGTAAGTGCAC-3')
	MTG3 (5'- <u>GGATCCT</u> CATTTCTTACAGCCACATCCGG-3')
<b>MTS</b>	MTS5 (5'-GATATGAAGGAGATATAC <u>CATATG</u> GACCCCAACTGCTCCTGCGC-3')
	MTS3 (5'- <u>GGATCCT</u> CAGGCACAACAGTTGCACTTCTC-3')

Les produits de PCR ont été concentrés par précipitation dans l'éthanol, puis purifiés sur gel d'agarose, extraits du gel avec le kit d'extraction commercial (Qiaquick gel extraction kit, Qiagen), et ligaturés au vecteur pGEM-T-Easy (Promega). Les produits de ligature ont été utilisés pour transformer les cellules compétentes *E. coli* JM109 (Promega). Les clones positifs ont ensuite été sélectionnés sur milieu Luria-Bertani (LB) contenant 100 µg.mL<sup>-1</sup> d'ampicilline. Les plasmides recombinants dans lesquels l'ADNc de MT était orienté sous le contrôle du promoteur *lac* (inductible par l'isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG)) ont été isolés par minipréparation.

Les plasmides obtenus sont **pGEMT-MTD**, **pGEMT-MTC1**, **pGEMT-MTC2**, et **pGEMT-MTS**.

- **Pour l'expression des MTs dans le périplasme**

Les amorces utilisées pour amplifier les ADNc codant pour les MTs contiennent un site de restriction *NcoI* dans l'amorce sens et un site *XhoI* dans l'amorce antisens. Leur séquence est indiquée dans le tableau suivant et les sites de restriction *NcoI* et *XhoI* sont soulignés :

<b>MTD</b>	MTU-F (5'-ATCAAGACT <u>CCATGGG</u> CTCTGATCCATGTAAGTGC-3')
	MTD-R (5'-TGACACCATC <u>CTCGAG</u> CTTGCAAGAGCAGCCGCT-3')
<b>MTC1, MTC2</b>	MTU-F (5'-ATCAAGACT <u>CCATGGG</u> CTCTGATCCATGTAAGTGC-3')
	MTC-R (5'-TCCTTTGACG <u>CTCGAG</u> TTTCTTACAGCCACATCC-3')
<b>MTS</b>	MTS-F (5'-CGTCGCTCG <u>CCATGG</u> ACCCCAACTGCTCC-3')
	MTS-R (5'-ACATTGACAC <u>CTCGAG</u> GGCACAACAGTTGCACTT-3')

Le programme de PCR est le même que précédemment décrit. Les plasmides pMA10, pGEMT-MTC1, pGEMT-MTC2, pGEMT-MTS, ont été utilisés respectivement pour amplifier l'ADNc de MTD, MT1, MT2 et MTS. Les amplifications par PCR ont été réalisées sur des

mélanges de 50  $\mu\text{L}$  contenant 200  $\mu\text{M}$  de dNTP, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , du tampon 1x de l'ADN polymérase *Taq*, 200 nM de chaque amorce, 1  $\mu\text{L}$  de plasmide et 1U d'ADN-polymérase *Taq* (Promega). Les produits de PCR ont été séparés sur gel d'agarose, purifiés avec le kit de purification Qiaquick gel extraction (Qiagen) puis digérés avec *NcoI* et *XhoI*. Les produits de digestion ont ensuite été séparés sur un gel d'agarose à 1,5%, extrait du gel et liés entre les sites *NcoI* et *XhoI* du vecteur pET20b (Novagen) en utilisant l'ADN-ligase T4 (New England BioLabs). Les produits de ligature ont été utilisés pour transformer des cellules compétentes *E. coli* DH5 $\alpha$ . Les clones positifs ont été sélectionnés sur milieu Luria-Bertani (LB) contenant 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  d'ampicilline. Les plasmides recombinants ont été isolés par minipréparation et sont notés **pET20b-MTD**, **pET20b-MTC1**, **pET20b-MTC2**, et **pET20b-MTS**.

### 3- LES SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES ET LES CONDITIONS DE CULTURE

Comme nous venons de le voir, les souches JM109 et DH5 $\alpha$  ont été utilisées comme hôtes pour les constructions plasmidiques basées sur les plasmides pGEM-T et pET20b.

Plusieurs souches bactériennes d'*E. coli* ont été transformées avec les plasmides de type pGEM-T ou pET20b porteurs d'ADNc de MT :

- QC1726 est un mutant  $\Delta\text{sodA}$  *sodB* et QC1301 est la souche sauvage correspondante. Ces souches nous ont été fournies par Danièle Touati (Institut Jacques Monod, Paris). Les bactéries QC1726 ont la particularité de ne pas posséder de superoxyde dismutase.
- BL21(DE3)pLysS a été utilisée comme vecteur d'expression permettant la synthèse de l'ARN-polymérase T7 par induction avec de l'IPTG.

Les phénotypes de ces souches bactériennes sont indiqués dans le tableau 2.2

**Tableau 2.2.** Les souches d'*E. coli* utilisées.

Souche	Phénotype	Plasmide
JM109	( <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> ( $r_K^-$ , $m_K^-$ ), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , $\Delta(\textit{lac-proAB})$ , [ $F^+$ , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> $\Delta\text{M15}$ ])	pGEM-T
DH5 $\alpha$	( $\phi\text{80d}\textit{lacZ}\Delta\text{M15}$ , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> ( $r_K^-$ , $m_K^-$ ), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>deoR</i> , $\Delta(\textit{lacZYA-argF})$ U169, <i>phoA</i> )	pET20b
QC1726	( $\Delta\textit{sodA}$ , <i>sodB</i> : $\text{Cm}^r$ )	pGEM-T
QC1301	(souche sauvage)	pGEM-T
BL21(DE3) pLysS	( $F^-$ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> ( $r_B^-$ , $m_B^-$ ), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , $\lambda(\text{DE3})$ , pLysS ( $\text{Cm}^r$ ))	pET20b

Toutes ces bactéries ont été cultivées à 37°C en milieu LB contenant de l'ampicilline ou sur milieu gélifié LB-agar.

Comme nous le verrons plus loin, nous avons été amenés à tester la résistance aux métaux de bactéries en absence d'oxygène. Ces cultures anaérobies ont été réalisées dans des sacs hermétiques dans lesquels l'oxygène était enlevé par formation de CO<sub>2</sub> grâce à la poudre AnaerocultP (Merck). L'anaérobiose est contrôlée avec des bandelettes Anaerotest (Merck).

A ce niveau, nous disposons donc de plusieurs souches de bactéries transformées avec des plasmides porteurs d'ADNc de MT. Dans ces bactéries, l'expression des MTs est induite par l'IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside). Nous avons vérifié par transfert western la présence de MTs dans les bactéries en utilisant l'anticorps anti-MT de *C. gigas* marqué à la biotine (Boutet *et al.*, 2002).

Nous allons à présent regarder l'effet de l'expression des MTs dans des bactéries exposées aux métaux (chlorure de cadmium et de zinc). Dans la suite nous appellerons « contrôle » les bactéries transformées avec le pGEM-T ou le pET20b ne contenant pas d'ADNc de MT.



### III- RESULTATS

#### 1- EFFET DES MTs CHEZ *E. COLI* LORS D'UNE CONTAMINATION MÉTALLIQUE

##### 1.1- Expression des MTs dans la souche QC1301

###### ▪ Test de résistance

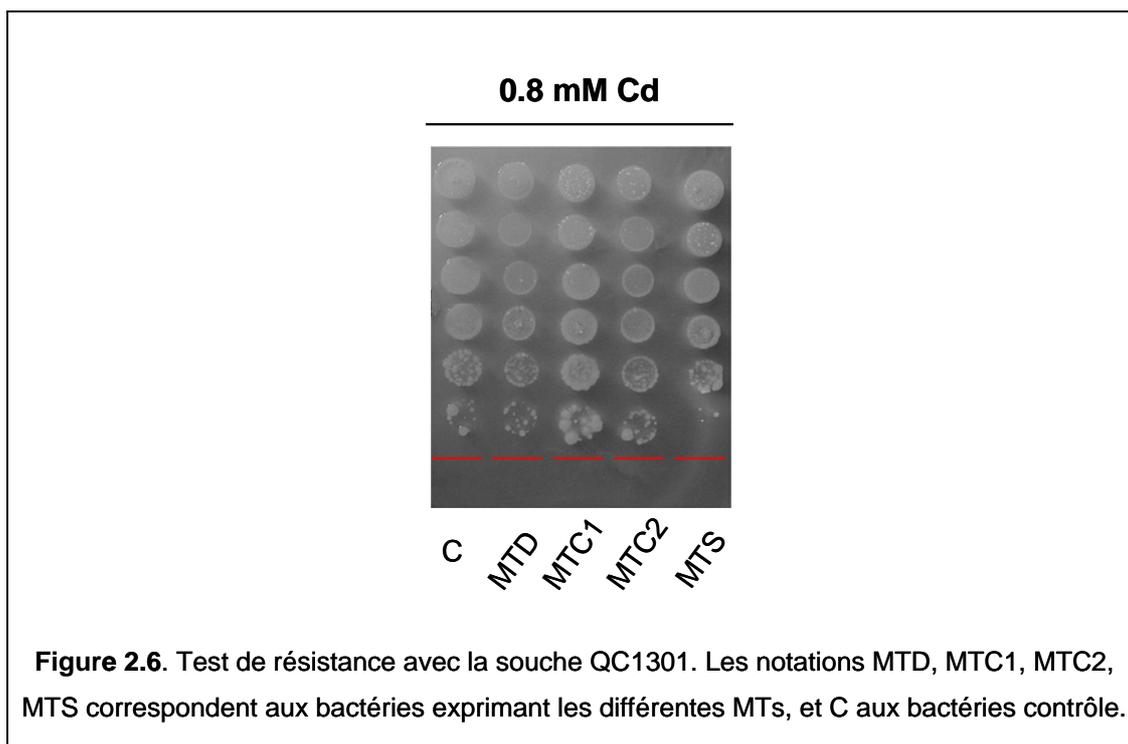
L'expression de MTs dans les souches bactériennes nous laisse attendre une résistance des bactéries aux métaux accrue. C'est ce que nous avons tout d'abord voulu visualiser en effectuant des tests en goutte (les détails du protocole sont donnés dans l'encadré 2.2). Pour cette première série d'expériences, la souche sauvage QC1301 exprimant les MTs dans le cytoplasme a été utilisée.

###### **Test en goutte**

Des cultures sur nuit de cultures de bactéries contrôle ou possédant une des quatre MTs sont diluées dans du milieu LB (1% v/v) contenant 100 µg.mL<sup>-1</sup> d'ampicilline et incubées à 37°C. Lorsque la DO<sub>660</sub> atteint 0,3, 0,5 mM d'IPTG (Promega) est ajouté dans chacune des cultures afin d'induire l'expression des MTs pendant 1h à 37°C. Ensuite la DO<sub>660</sub> de chaque culture est ajustée à 1 et des dilutions de 10 en 10 sont effectuées dans du milieu LB contenant 0,5 mM d'IPTG. 5 µL de chaque dilution sont alors déposés sur milieu LB-agar contenant 0,5 mM d'IPTG supplémenté du composé indiqué sur la figure (zinc, cadmium, ou ménadione). Les milieux sont incubés une nuit à 37°C avant d'être photographiés. A chaque test, une goutte de chaque dilution est aussi déposée sur milieu LB-agar contenant 0,5 mM d'IPTG afin de contrôler que la croissance de toutes les cultures est identique en absence de composé toxique (Figure 1.5, Chapitre1 § II.4.4).

###### **Encadré 2.2**

La figure 2.6 montre le résultat d'un test en goutte après contamination par le cadmium. D'une façon surprenante, les bactéries exprimant une des quatre MTs (MTD, MTC1, MTC2, MTS) poussent de la même façon que le contrôle (C), jusqu'à la sixième dilution. Sans cadmium dans le milieu, elle croissent toutes jusqu'à la septième. Ces tests sur milieu gélifié ne montrent donc pas d'effet visible de protection puisque l'expression des MTs ne favorise pas la croissance des bactéries. Pourtant, comme nous allons le voir, les MTs présentes dans les bactéries séquestrent bien les métaux.



- **Capacité de séquestration des métaux par les MTs**

Nous avons contaminé la souche sauvage d'*E. coli* QC1301 avec des concentrations sub-létales de cadmium ou de zinc (Figure 2.7) et mesuré la quantité de métal associé aux bactéries comme cela est décrit dans l'encadré 2.3.

**Pourcentage de survie et dosage des métaux dans les bactéries**

La préparation des cultures est la même que pour les test de résistance sur milieu gélatiné. La  $DO_{660}$  est ajustée à 0,1 après 1h d'induction par l'IPTG. La culture est alors divisée en trois, une partie pour le contrôle, une partie est contaminée par 0,6 mM de cadmium et la troisième par 0,8 mM de zinc. Les cultures sont ensuite incubées 3 h à 37°C.

Le pourcentage de survie est déterminé de la façon suivante : une fraction de chaque culture est diluée et étalée sur milieu gélatiné sans composé toxique. Le nombre de colonies formées après une nuit d'incubation, correspondant au nombre de bactéries étalées avant l'incubation, est ensuite compté et permet de calculer le nombre de bactéries dans les volumes de culture utilisés pour doser les métaux. Le pourcentage de survie est défini comme le rapport du nombre de bactéries vivantes dans la culture contaminée au zinc sur le nombre de bactéries vivantes dans la culture non contaminée.

Le dosage de cadmium ou de zinc: les bactéries présentes dans 30 mL de culture sont récupérées par centrifugation (15 min, 6000xg, 6 °C), rincées avec une solution contenant 10 mM Tris, HCl, pH 7.4, et 0,15 M NaCl. Les culots sont traités à l'acide nitrique (3 mL d' $HNO_3$ ,

65%) dans un milieu pressurisé (tubes de verre borosilicaté) à 100°C pendant 3 heures. Les échantillons sont dilués avec 18 mL d'eau ultrapure (MilliQ plus), et la concentration en cadmium ou en zinc est déterminée par SAA en flamme (Varian SpectrAA 220 FS). La limite de détection est 5 µg de Cd.L<sup>-1</sup> (44 nM) et 10 µg de Zn.L<sup>-1</sup> (153 nM). Les résultats sont exprimés en nmol de Cd<sup>2+</sup> ou de Zn<sup>2+</sup> pour 10<sup>9</sup> bactéries. La validité de la méthode est contrôlée périodiquement à l'aide d'échantillons de référence (Tort-2: pancreas de langouste; Dolt-2: foie de roussette – NRC-CNRS, Ottawa, Canada) (Andres *et al.*, 1999).

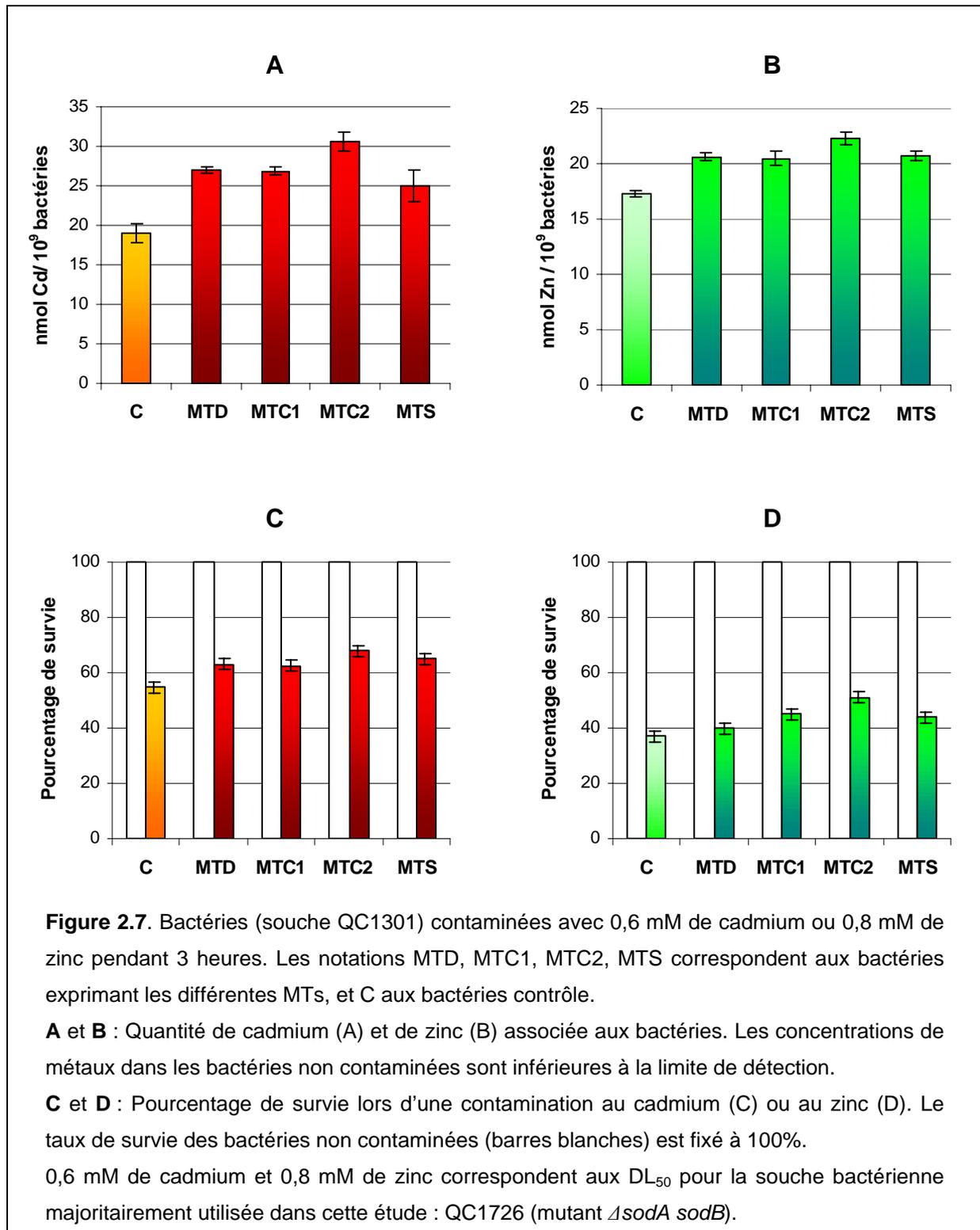
### **Encadré 2.3.**

Ces dosages montrent la capacité de séquestration des MTs puisque les bactéries transformées avec un plasmide portant un ADNc de MT accumulent plus de métal que les bactéries contrôle transformées avec le même plasmide « vide » (Figure 2.7 A et B).

On observe ainsi un accroissement de la quantité de cadmium qui est de 32% pour MTS, 42% pour MTC1, 43% pour MTD, et 61% pour les bactéries exprimant MTC2. De même, les concentrations en zinc dans les bactéries exprimant la MTC1, MTD, MTS, et MTC2 sont respectivement supérieures de 19, 20, 20 et 29% à celles dans les bactéries contrôles (C).

Dans les deux cas, MTC2 fixe environ 1,5 fois plus de métaux que MTC1 ce qui est en accord avec sa structure trimodulaire.

En parallèle de ces dosages, la figure 2.7 C et D montre les pourcentages de survie en présence de cadmium ou de zinc très légèrement supérieurs chez les bactéries exprimant une MT par rapport aux bactéries contrôle. Cet effet bénéfique n'avait pas été détecté lors des tests sur milieu gélifié.



Dans la figure 2.7, on peut considérer que le surplus de métal accumulé dans les bactéries exprimant des MTs par rapport aux bactéries contrôles, correspond à une séquestration par les MTs. En faisant l'hypothèse que les MTs sont saturées par les métaux, on peut évaluer la quantité de MT par bactérie en considérant 7 sites de fixation pour MTD, MTC1, et MTS, et 10 pour MTC2. Comme le montre le tableau 2.3, cette quantité de MT est relativement constante pour les différentes formes de MT.

**Tableau 2.3.** Evaluation de la quantité de MT par bactérie à partir des dosages de métaux.

$$\text{Nombre de molécules de MT / bactérie} = \frac{\text{Moles de métal par bactérie} - \text{Moles de métal par bactérie contrôle}}{\text{Nombre de sites de fixation du métal sur la MT exprimée}} \times \mathcal{N}_A$$

$\mathcal{N}_A$  : nombre d'Avogadro

Métallothionéine exprimée	molécules de MT/ bactérie contaminée par le Cd	molécules de MT / bactérie contaminée par le Zn
MTD	$6,9 \cdot 10^5$	$2,9 \cdot 10^5$
MTC1	$6,8 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^5$
MTC2	$7,0 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^5$
MTS	$5,2 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^5$

Par contre, il est intéressant de remarquer que la quantité de MT déterminée grâce au dosage du cadmium est dans tous les cas environ deux fois supérieure à la détermination faite après dosage du zinc. Comme nous l'avons vu, les ADNc de MT sont sous le contrôle du promoteur *lac*. La présence de cadmium ou de zinc ne peut donc pas faire varier leur niveau d'expression. Par contre la présence de cadmium peut stabiliser les MTs et limiter ainsi leur dégradation. En effet, une augmentation de la concentration en MTs dans des bactéries contaminées au cadmium a déjà été décrite et expliquée par une stabilisation des MTs par liaison du cadmium (Kille *et al.*, 1990).

Pour confirmer cet effet, un dosage indirect des MTs a été réalisé par saturation au mercure (Encadré 2.4). Cette méthode détermine la quantité de mercure lié par les MTs solubles libérées lors de la sonication des bactéries, quantité proportionnelle au nombre de MTs. Les résultats de ces dosages (Tableau 2.4 A) montrent une quantité de MT plus élevée après contamination par le cadmium que par le zinc, confirmant l'effet stabilisant du cadmium. Il est également intéressant de souligner que l'expression cytoplasmique des MTs testées chez *E. coli* n'empêche pas leur capacité à fixer le cadmium, le zinc, et le mercure, contrairement à ce qui a pu être observé dans le cas de l'isoforme 2 humaine : exprimée chez *E. coli*, cette MT fixe bien le cadmium mais pas le zinc ni le cuivre (Odawara *et al.*, 1995).

A l'exception de MTC1 dans le cas du cadmium, les dosages de MTs indiquent une capacité de fixation des métaux inférieure à celle observée lors du dosage des métaux (Tableau 2.4 B et Figure 2.7 A et B). Ceci peut être expliqué par une agrégation des MTs sous forme de corps d'inclusion insolubles après qu'elles ont fixé les métaux à saturation (ces corps d'inclusion échappant donc au dosage des MTs dans le surnageant, (Couillard *et al.*, 1993)).

**Tableau 2.4.A** Dosage des MTs exprimé en nmol de sites de Hg pour  $10^9$  bactéries.

MT exprimée	Contamination		
	Aucune	0,6 mM Cd	0,8 mM Zn
Aucune (C)	0	0	0
MTD	0,5 ± 0,02	1,9 ± 0,11	0,4 ± 0,01
MTC1	3,6 ± 0,11	15,9 ± 0,05	2,4 ± 0,10
MTC2	2,6 ± 0,04	8,7 ± 0,65	2,2 ± 0,06
MTS	0,2 ± 0,01	1,8 ± 0,36	0,5 ± 0,03

**Tableau 2.4.B** Calcul de la quantité de cadmium (ou de zinc) fixé par les MTs d'après les données de la figure 2.7 : nmol de métal pour  $10^9$  bactéries - nmol de métal pour  $10^9$  bactéries contrôle.

MT exprimée	Contamination	
	0,6 mM Cd	0,8 mM Zn
Aucune (C)	0	0
MTD	8,1	3,3
MTC1	7,9	3,2
MTC2	11,6	5,0
MTS	6,0	3,5

#### Dosage des MTs

La préparation des cultures est la même que pour le dosage des métaux. Après 3h d'incubation à 37°C, les bactéries présentes dans 50 mL de culture non contaminée ou contaminée avec 0,6 mM de cadmium ou 0,8 mM de zinc sont récupérées par centrifugation (15 min, 6.000xg, 6 °C). Les culots bactériens sont rincés deux fois avec 1 mL de Tris 25 mM pH 7.2, resuspendus dans 500 µL de ce même tampon, puis soniqués afin de casser les bactéries (6 cycles de 30s, fréquence 25 Hz, 4°C). Les échantillons ainsi obtenus sont centrifugés (1h, 20.000xg, 4°C) puis 100 µL de chaque surnageant, contenant les MTs, sont prélevés et mélangés à 100 µL de Tris 25 mM pH 7.2. Un excès de mercure est ajouté (200 µL d'HgCl<sub>2</sub> 50 mg.L<sup>-1</sup>, TCA 10%) dans les échantillons et ceux-ci sont vortexés et incubés 10 minutes à température ambiante pour saturation. Afin de récupérer le mercure fixé non spécifiquement aux MTs, 400 µL d'une solution d'hémoglobine [hémoglobine de

bœuf lyophilisée 25 g.L<sup>-1</sup> (Sigma, H-2500), Tris 30 mM pH 8.0] sont ensuite mélangés rapidement à la préparation qui est alors centrifugée (20 min, 20.000xg, température ambiante). La quantité de mercure présente dans le surnageant final ne contenant plus que les complexes MT- Hg est dosée par spectrométrie d'absorption atomique en vapeur froide (AMA 254) (Baudrimont *et al.*, 1997). La limite de détection est de 1 ng de mercure. Après dosage du mercure, la concentration de MTs est exprimée en nmol de sites de fixation de mercure par 10<sup>9</sup> bactéries, un atome de mercure correspondant à un site de fixation.

En parallèle des échantillons bactériens, deux types d'échantillons sont préparés :

- les échantillons sans MT ou « blancs » (200 µL de tampon Tris 25 mM pH 7.2 + 200 µL d'HgCl<sub>2</sub> 50 mg.L<sup>-1</sup>, TCA 10% + 400 µL de la solution d'hémoglobine). Leur teneur en mercure est déterminée puis soustraite à celle de tous les échantillons.

- les échantillons de référence [200 µL de MTs de foie de lapin (10 µg.mL<sup>-1</sup> de MTs -Sigma M-7641-, Tris 25 mM pH 7.2) + 200 µL d'HgCl<sub>2</sub> 50 mg.L<sup>-1</sup>, TCA 10% + 400 µL de la solution d'hémoglobine). La concentration en métaux (Cd, Zn, Cu) de ces MTs avant l'ajout de mercure est connue. Le dosage du mercure dans les échantillons de référence permet de vérifier l'efficacité de l'étape de saturation. Le pourcentage de récupération (concentration en mercure mesurée après saturation / concentration en métaux initiale x 100) est calculé et doit être égal à 100 ± 20 %.

#### Encadré 2.4

### 1.2- Expression des MTs dans la souche QC1726 (mutant *ΔsodA sodB*)

Ainsi, l'expression de MTs dans la souche QC1301 n'apporte que peu ou pas de protection aux bactéries lors d'une contamination par le cadmium ou le zinc et ceci malgré la mise en évidence de la séquestration des métaux par les MTs. Nous avons donc voulu tester une autre souche bactérienne, et des résultats évoqués dans l'introduction de ce chapitre (Tamai *et al.*, 1993) ont guidé notre choix.

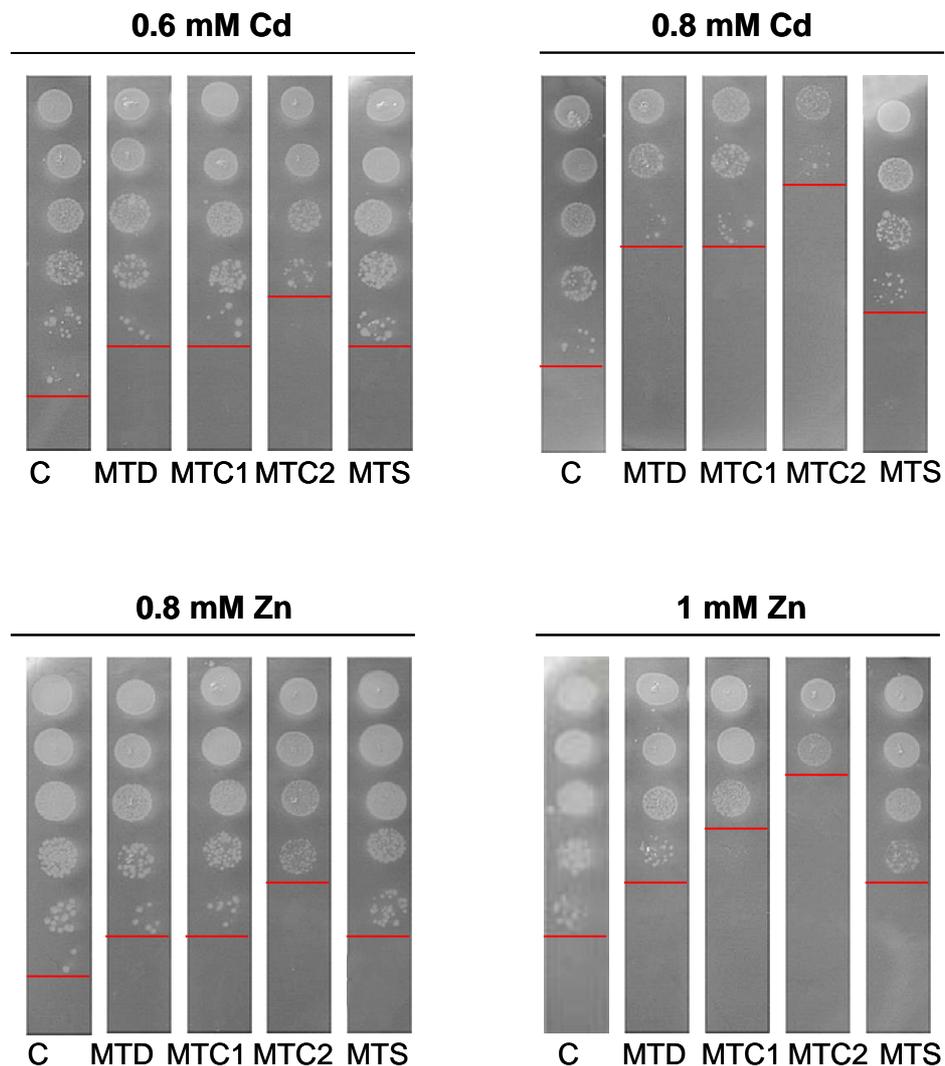
Ces auteurs ont étudié un mutant de levure *Saccharomyces cerevisiae* ne possédant pas de superoxyde-dismutase à cuivre et zinc (SOD-CuZn), qui est une enzyme clef dans la protection contre le stress oxydant. En effet, cette enzyme catalyse la conversion d'une espèce réactive de l'oxygène, l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), autre ROS mais transformé à son tour par la catalase en dioxygène (O<sub>2</sub>). En absence de SOD-CuZn, les levures ne croissent pas sur lactate (le lactate est un substrat respiratoire obligatoire chez la levure, et ce défaut de croissance est dû à l'accumulation de ROS), mais l'expression d'une MT de singe rétablit cette croissance. Ces données suggèrent que les MTs « fonctionnent » comme antioxydants.

Pour poursuivre cette étude, une souche d'*E. coli* ne possédant pas de superoxyde-dismutase a été utilisée : le mutant  $\Delta sodA sodB$  (souche d'*E. coli* QC1726), transformé par des plasmides porteurs de MTs, afin de vérifier si les MTs pouvaient protéger les bactéries  $\Delta sodA sodB$  contre le cadmium et le zinc.

- **Toxicité paradoxale des MTs dans la souche  $\Delta sodA sodB$  contaminée par le cadmium ou le zinc**

Les tests de résistance sur milieu gélifié (Figure 2.8) montrent un résultat surprenant avec les bactéries  $\Delta sodA sodB$  exprimant les quatre MTs : une augmentation de la sensibilité aux métaux pour les bactéries exprimant des MTs ! Il a bien sûr été vérifié que cet effet disparaissait lorsque l'expression des MTs n'était pas induite par l'addition d'IPTG, et la croissance des bactéries exprimant les MTs étaient identique à celle des bactéries contrôles en l'absence de métal.

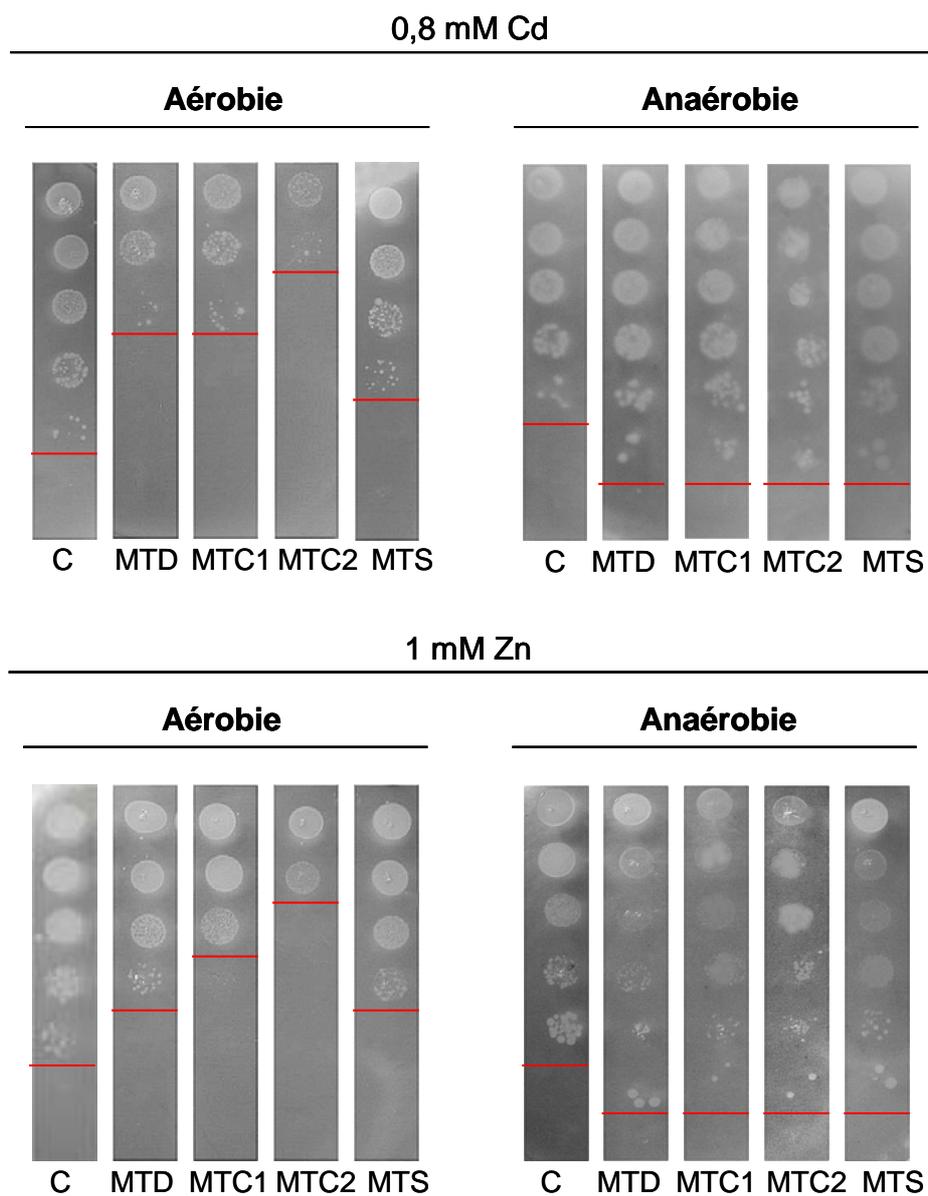
Nous pouvons d'autre part remarquer que l'effet néfaste de l'expression des MTs dans ce fond génétique est d'autant plus marqué que la concentration de cadmium ou de zinc augmente dans le milieu. C'est MTC2 qui séquestre le plus de métaux (Figure 2.7) et qui se révèle être la plus toxique dans ces conditions. Ces deux dernières remarques suggèrent qu'il y a un lien entre la toxicité observée lors de l'expression des MTs et la fixation à saturation des métaux par celles-ci. Comme cette toxicité des MTs n'a été détectée que dans le fond génétique  $\Delta sodA sodB$  (*E. coli* QC1726) et pas dans la souche sauvage (*E. coli* QC1301) nous avons émis l'hypothèse que cette toxicité pouvait être liée à une augmentation de la formation d'anion surperoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ) due aux complexes Cd- ou Zn-MTs. Les résultats montrent également que dans la souche sauvage la superoxyde dismutase protège la bactérie des effets toxiques des MTs.



**Figure 2.8.** Tests de croissance sur milieu gélifié avec les bactéries *E. coli* QC1726 (mutant  $\Delta sodA sodB$ ) en présence de cadmium ou de zinc : C signifie bactéries contrôles et MTD, MTC1, MTC2, et MTS désignent les bactéries exprimant l'une des MTs. Ces tests montrent que les bactéries exprimant les MTs sont plus sensibles au cadmium et au zinc que les bactéries contrôles. Cet effet négatif sur la croissance est d'autant plus marqué que la dose de métal est plus élevée. Les bactéries MTC2 possédant plus de sites de fixation des métaux de part leur structure présentent une croissance plus faible que MTC1. En absence de métal, les bactéries poussent toutes jusqu'à la 7<sup>e</sup> dilution. Lorsque l'expression des MTs n'est pas induite par l'IPTG, la sensibilité aux métaux des bactéries porteuses d'un « plasmide MT » et des bactéries contrôle est identique.

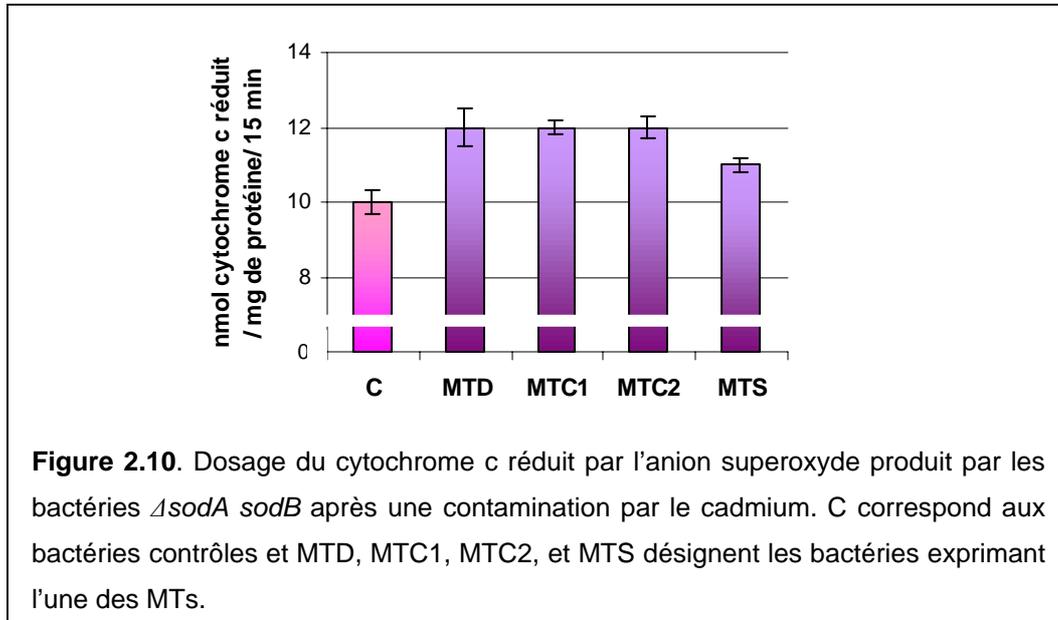
- **Les MTs génèrent un stress oxydant en présence de métal dans la souche *ΔsodA sodB***

Les tests de résistance en aérobiose et anaérobiose sont présentés sur la figure 2.9. En condition anaérobie, non seulement la toxicité liée à l'expression de MTs en présence de cadmium ou de zinc disparaît mais de plus, un effet bénéfique des quatre MTs est observé. Par exemple, dans le cas MTC2 en présence de cadmium ou de zinc, les bactéries poussent jusqu'à la dilution 6 en condition anaérobie alors qu'en présence d'oxygène leur croissance s'arrête à la dilution 2 ; dans les deux cas, les bactéries contrôle poussent jusqu'à la cinquième dilution.



**Figure 2.9.** Tests en goutte montrant une toxicité paradoxale des MTs en condition aérobie en présence de cadmium (0,8 mM) ou de zinc (1 mM) et une protection sous anaérobiose. Les MTs sont exprimées dans la souche QC1726. C signifie bactéries contrôle et MTD, MTC1, MTC2, et MTS désignent les bactéries exprimant l'une des MTs. Que ce soit sous aérobiose ou anaérobiose, les bactéries poussent toutes jusqu'à la 7<sup>e</sup> dilution en absence de métal.

La production d'anion superoxyde  $O_2^{\cdot -}$  a été confirmée et quantifiée par dosage du cytochrome c sous forme réduite (cf. encadré 2-5) après 1h30 de contamination des bactéries  $\Delta sodA sodB$  avec 0,6 mM de cadmium. Comme le montre la figure 2.10, la production d'anion superoxyde dans les bactéries exprimant une MT en présence de cadmium est de 10 à 20 % supérieure à celle des bactéries contrôles.



**Mesure de la production d'anion superoxyde** (Bagchi *et al.*, 1993; Bagchi *et al.*, 1999).

La production d'anion superoxyde est déterminée en dosant le cytochrome c réduit par  $O_2^{\cdot -}$ . Des cultures sur nuit de bactéries QC1726 contrôle ou possédant une des quatre MTs sont diluées dans du milieu LB (1% v/v) contenant 100  $\mu g \cdot mL^{-1}$  d'ampicilline et incubées à 37°C. Lorsque la  $DO_{660}$  atteint 0,3, 0,5 mM d'IPTG est ajouté dans chacune des cultures afin d'induire l'expression des MTs pendant 1h à 37°C. Ensuite la  $DO_{660}$  de chaque culture est ajustée à 0,5 avec du milieu LB contenant 0,5 mM d'IPTG. Toutes les cultures sont divisées en trois tubes dans lesquels 0,6 mM de cadmium est ajouté, puis incubées à 37°C pendant 1h30. Le volume permettant d'extraire 1 mg de protéine (7 mL pour une culture de  $DO_{660}$  égale à 1) pour chaque culture est centrifugé (10 min, 6000g, 6°C). Les culots bactériens sont remis en suspension dans 1 mL de tampon contenant 50 mM de phosphate, pH 7.8 et 20 mM de cytochrome c. Ces mélanges sont ensuite incubés 15 min à 37°C puis placés dans la glace. Les bactéries sont enlevées par centrifugation (10 min, 6000g, 6°C). Les surnageants sont alors transférés dans des cuves de spectrophotomètre et leur absorbance à 550 nm mesurée. Ces valeurs sont ensuite converties en nmol de cytochrome c réduit en 15 min par mg de protéine en utilisant le coefficient d'extinction molaire du cytochrome c réduit : 21.000  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

**Encadré 2.5.**

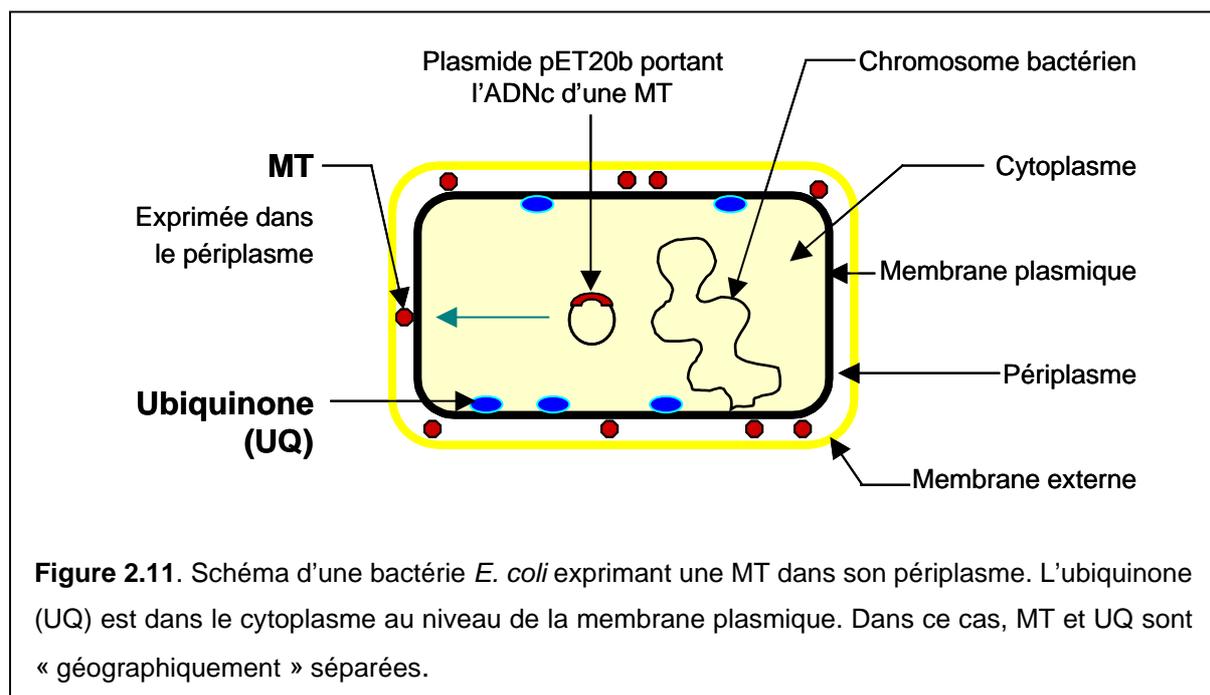
## 2- MODÈLE DE GENERATION DE ROS EN PRÉSENCE DE MTs, DE MÉTAL, ET D'OXYGENE

Par les expériences que nous venons de décrire, nous avons mis en évidence une fonction prooxydante des MTs chez les bactéries *E. coli*  $\Delta sodA sodB$ , ce qui semble en désaccord avec les propriétés antioxydantes de MTs chez le mutant de levure  $\Delta sod1$  (Tamai *et al.*, 1993). Comment réconcilier ces deux résultats? Une réponse possible est qu'il existe une molécule rédox présente dans le cytoplasme de la bactérie, mais absente du cytosol chez la levure, qui génère des anions superoxydes par interaction avec des MTs saturées de métaux.

### ▪ Rôle possible de l'ubiquinone (UQ):

Un bon candidat pourrait être l'ubiquinone (UQ). L'ubiquinone est une molécule de la chaîne respiratoire qui est localisée au niveau de la membrane plasmique côté cytoplasme chez la bactérie, et au niveau de la membrane interne de la mitochondrie chez la levure. Lors de la respiration, elle peut être transformée en radical semiquinone, qui peut à son tour réduire l' $O_2$  en  $O_2^{\cdot-}$ , point de départ d'un stress oxydant (Sun et Trumpower, 2003 ; Vinogradov et Grivennikova, 2005).

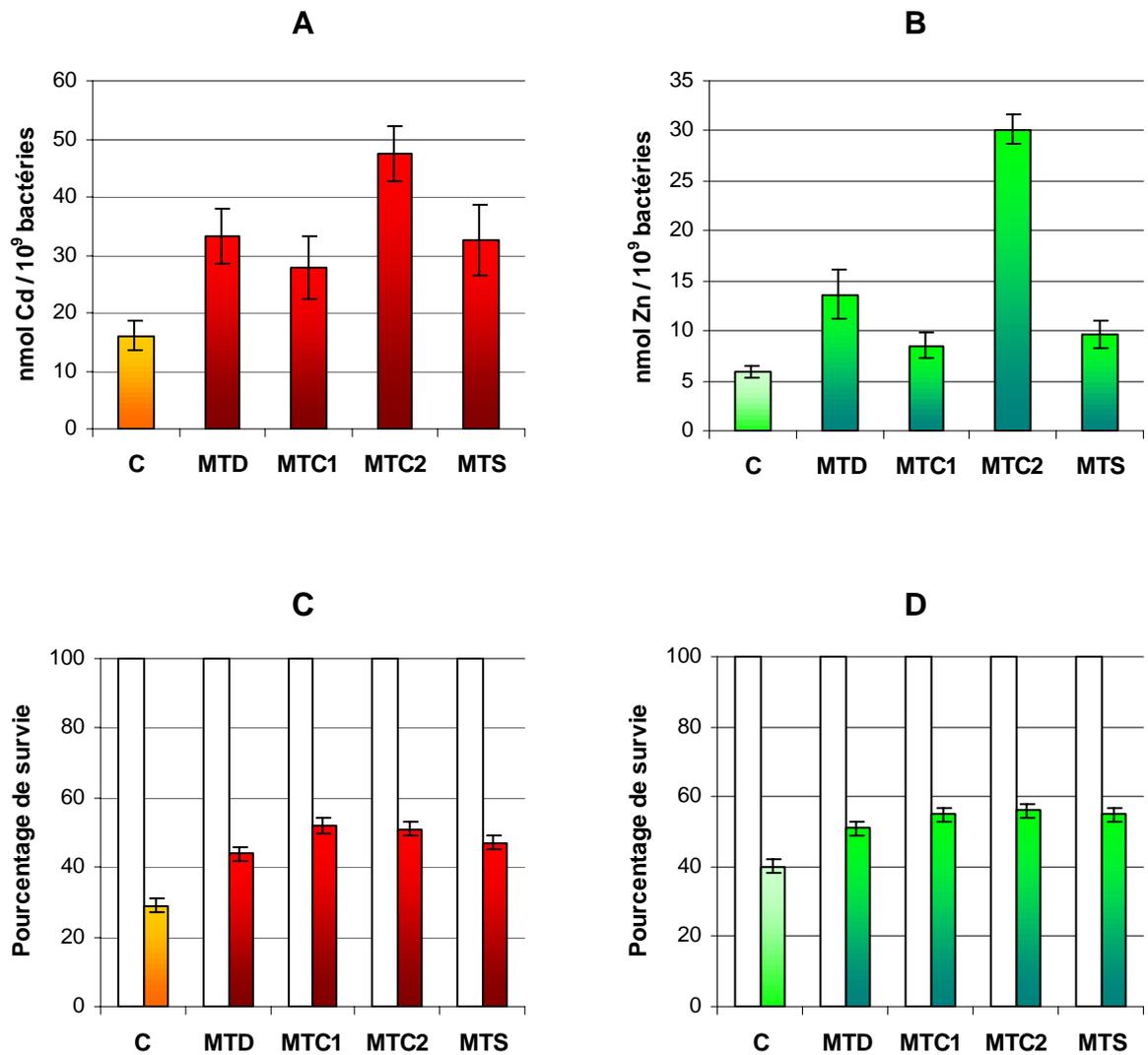
Un moyen de vérifier si c'est bien l'interaction UQ – MT qui est liée à l'effet toxique observé dans la souche *E. coli* QC1726, est de séparer physiquement les MTs et l'UQ. Nous avons donc utilisé une nouvelle souche d'*E. coli* BL21(DE3) et un nouveau plasmide (pET20b) permettant l'expression des MTs dans le périplasma (Figure 2.11).



- L'expression périplasmique des MTs conduit à une séquestration importante de cadmium et de zinc (Figure 2.12 A et B). Ainsi, après 3h de contamination par 0.7 mM de cadmium, les bactéries BL21(DE3) exprimant MTD, MTC1, MTC2 et MTS accumulent respectivement 2,1, 1,7, 2,9, et 2 fois plus de métal que les bactéries contrôles.

Dans le cas d'une contamination par 0.9 mM de zinc, l'accumulation de zinc est de 2,3, 1,5, 5,2, et 1,6 fois supérieure dans les bactéries exprimant respectivement MTD, MTC1, MTC2 et MTS que dans les bactéries contrôles. Notons que MTC2 est toujours la MT qui présente la meilleure capacité de séquestration des métaux parmi celles testées.

Comme dans le cas de l'expression cytoplasmique, les MTs exprimées dans le périplasma ont la capacité de lier le cadmium et le zinc et l'effet stabilisant du cadmium est à nouveau observé.



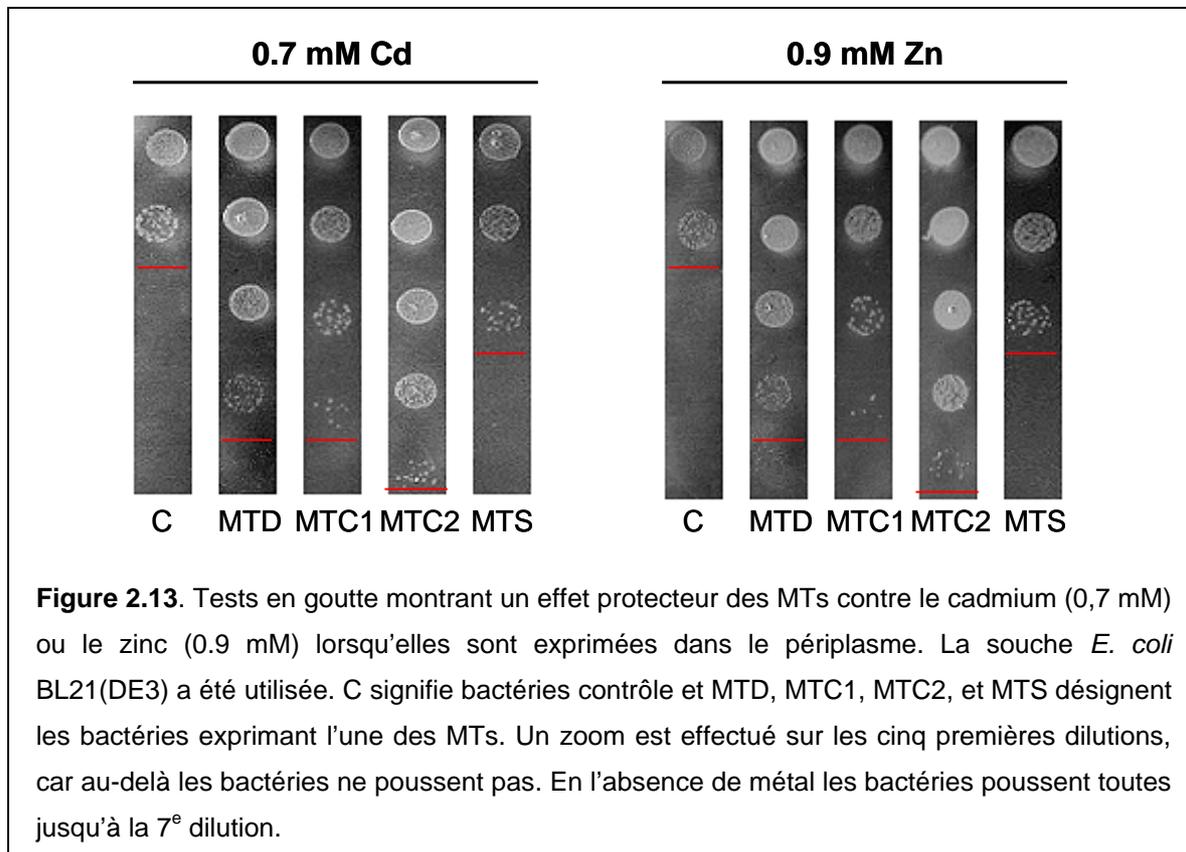
**Figure 2.12.** Bactéries *E. coli* BL21(DE3) contaminées avec 0,7 mM de cadmium ou 0,9 mM de zinc pendant 3 heures. Les notations MTD, MTC1, MTC2, MTS correspondent aux bactéries exprimant les différentes MTs et C aux bactéries contrôle.

**A et B :** Quantité de cadmium (A) et de zinc (B) associé aux bactéries. Les concentrations de métaux dans les bactéries non contaminées sont inférieures à la limite de détection.

**C et D :** Pourcentage de survie lors d'une contamination au cadmium (C) ou au zinc (D). Le taux de survie des bactéries non contaminées (barres blanches) est fixé à 100%.

Les concentrations de cadmium et de zinc utilisées correspondent à la DL<sub>50</sub> pour la souche BL21(DE3).

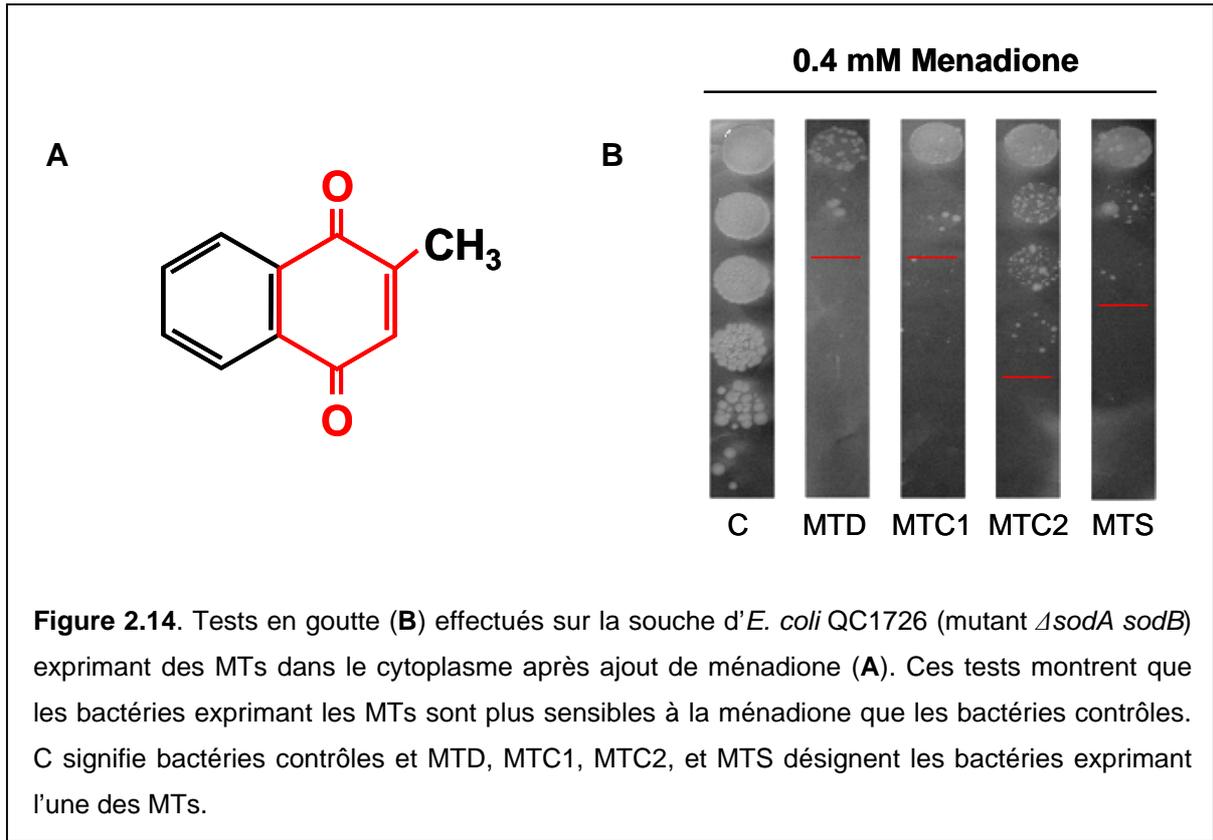
Par contre, contrairement au cas du cytoplasme, les taux de survie (Figure 2.12 C et D) tout comme les tests en goutte (Figure 2.13) montrent sans ambiguïté possible l'effet protecteur attendu des MTs, lorsqu'elles sont exprimées dans le périplasma. Cet effet est plus important chez les bactéries exprimant MTC2 qui séquestrent le plus de métaux.



**Figure 2.13.** Tests en goutte montrant un effet protecteur des MTs contre le cadmium (0,7 mM) ou le zinc (0.9 mM) lorsqu'elles sont exprimées dans le périplasma. La souche *E. coli* BL21(DE3) a été utilisée. C signifie bactéries contrôle et MTD, MTC1, MTC2, et MTS désignent les bactéries exprimant l'une des MTs. Un zoom est effectué sur les cinq premières dilutions, car au-delà les bactéries ne poussent pas. En l'absence de métal les bactéries poussent toutes jusqu'à la 7<sup>e</sup> dilution.

- Une deuxième expérience permet de vérifier que l'interaction MT– ubiquinone (UQ) génère un effet toxique.

Pour cela nous avons à nouveau travaillé avec la souche d'*E. coli* QC1726 (mutant  $\Delta sodA$   $sodB$ ) mais en remplaçant le métal par de la ménadione (vitamine K3) qui est un composé soluble qui contient, comme l'ubiquinone, un noyau quinonique (en rouge sur la figure 2.14 A). Le but est de mimer des concentrations intracellulaires en ubiquinone plus importantes. Nous observons alors, comme dans le cas de la contamination par les métaux, que les bactéries QC1736 exprimant des MTs deviennent hypersensibles à la ménadione bien qu'aucun métal n'ait été ajouté (Figure 2.14 B).



## IV- DISCUSSION

Les résultats expérimentaux présentés soulignent le rôle complexe des MTs exprimées dans des bactéries *E. coli* lors d'une contamination par le cadmium ou le zinc.

En particulier, les quatre MTs testées, trois de mollusques et une de singe, ne confèrent pas la protection attendue quand elles sont exprimées dans le cytoplasme de bactéries *E. coli* de phénotype « sauvage ». Et même au contraire, une toxicité paradoxale est observée pour des bactéries mutées  $\Delta sodA\ sodB$ . Ceci suggère que la toxicité des MTs est contrebalancée par l'activité superoxyde-dismutase dans les bactéries « sauvages » et ceci quelle que soit la structure ( $\alpha$ - $\beta$ ,  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$  ou  $\beta$ - $\alpha$ ) de ces protéines. Ces résultats apparaissent *a priori* en contradiction avec les effets obtenus avec la levure dans laquelle MTS complémente la SOD-CuZn (Tamai *et al.*, 1993).

Pour concilier ces données nous proposons un **premier modèle** basé sur une **interaction directe ou indirecte entre MT et ubiquinone (UQ) générant des anions superoxydes** (Figure 2.16). Ceci est biochimiquement possible puisque beaucoup de composés de la cellule ayant des propriétés rédox peuvent être réduits par les MTs. Parmi eux nous trouvons l'ascorbate dont la forme oxydée présente deux groupes cétoniques pouvant être réduits comme ceux de l'UQ (Maret et Vallee, 1998).

Toutes nos données expérimentales sont compatibles avec ce modèle :

- la toxicité des MTs n'est observée que dans un fond génétique  $\Delta sodA\ sodB$  en présence de métal.
- les MTs protègent le mutant  $\Delta sodA\ sodB$  du cadmium et du zinc en milieu anaérobie.
- des bactéries mutantes  $\Delta sodA\ sodB$  contaminées par du cadmium et exprimant une MT produisent 10 à 20% d'anions superoxydes de plus que celles n'en exprimant pas.
- la ménadione est hypertoxyque pour le mutant  $\Delta sodA\ sodB$  exprimant une MT.
- quand les MTs sont exprimées dans le périplasme, là où une interaction MT-UQ est géographiquement impossible, les MTs protègent les bactéries du cadmium et du zinc.

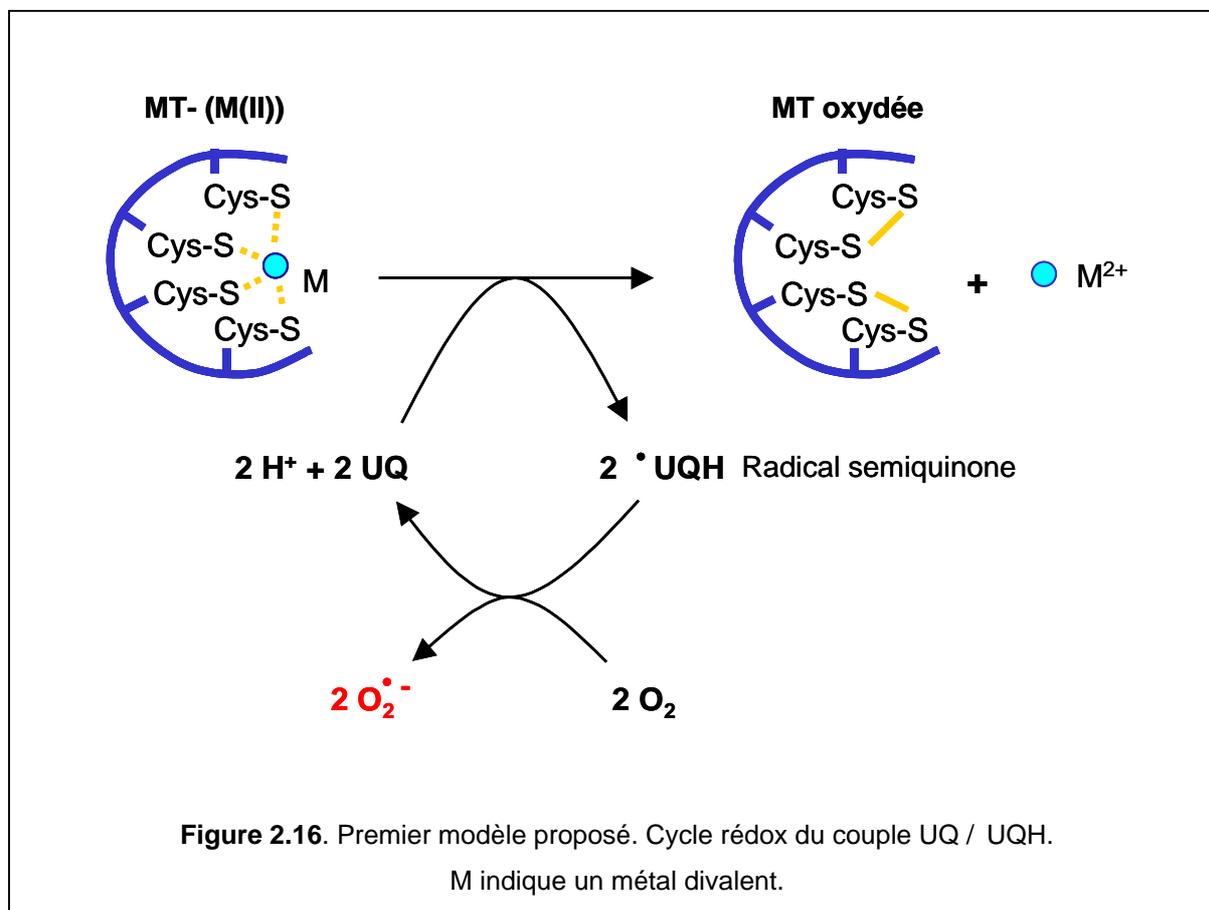
De plus, plusieurs études réalisées *in vitro* n'attribuent pas un rôle antioxydant aux MTs. Par exemple :

- des MT-(Cu,Zn) stimulent la peroxydation lipidique initiée par la xanthine ou la xanthine-oxydase *via* la production d'anion superoxyde (Arthur *et al.*, 1987).

- des cassures de l'ADN sont induites par des MT-(Cu,Zn) et MT-Cu (Müller *et al.*, 1991 ; Oikawa *et al.*, 1995).
- les MT-Cu, MT-(Cd,Cu), et MT-(Cu,Zn) réagissent avec le peroxyde d'hydrogène pour produire des radicaux hydroxyle (Suzuki *et al.*, 1996 ; O'Brien et Salacinski, 1998).
- la MT-(Cd,Zn,Cu) dans le foie de lapin réagit avec  $\text{Cd}^{2+}$  pour former des radicaux hydroxyles (O'Brien et Salacinski, 1998).

Toutes ces observations montrent un rôle pro-oxydant des MTs mais ont été obtenues *in vitro*. Les résultats présentés dans ce chapitre constituent des indications sur la toxicité des MTs (chez la bactérie) *in vivo*, tout en restant compatibles avec des propriétés antioxydantes des MTs.

Dans notre modèle, le fort potentiel réducteur des MTs conduit à la réduction d' $\text{O}_2$  et par conséquent à la génération d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ . En accord avec ceci, la SOD permet une réduction significative de la production de radicaux hydroxyles quand une MT-(Cd, Zn, Cu) réagit avec du  $\text{Cd}^{2+}$ . Ces radicaux ne sont pas générés sous anaérobiose, indiquant l'implication des radicaux superoxydes en tant qu'intermédiaires de réaction (O'Brien et Salacinski, 1998).



Nos résultats ont été obtenus chez *E. coli* mais il est légitime de se demander s'ils sont également **valables chez les eucaryotes**. Plusieurs données bibliographiques suggèrent la toxicité potentielle des MTs dans certaines conditions chez les eucaryotes :

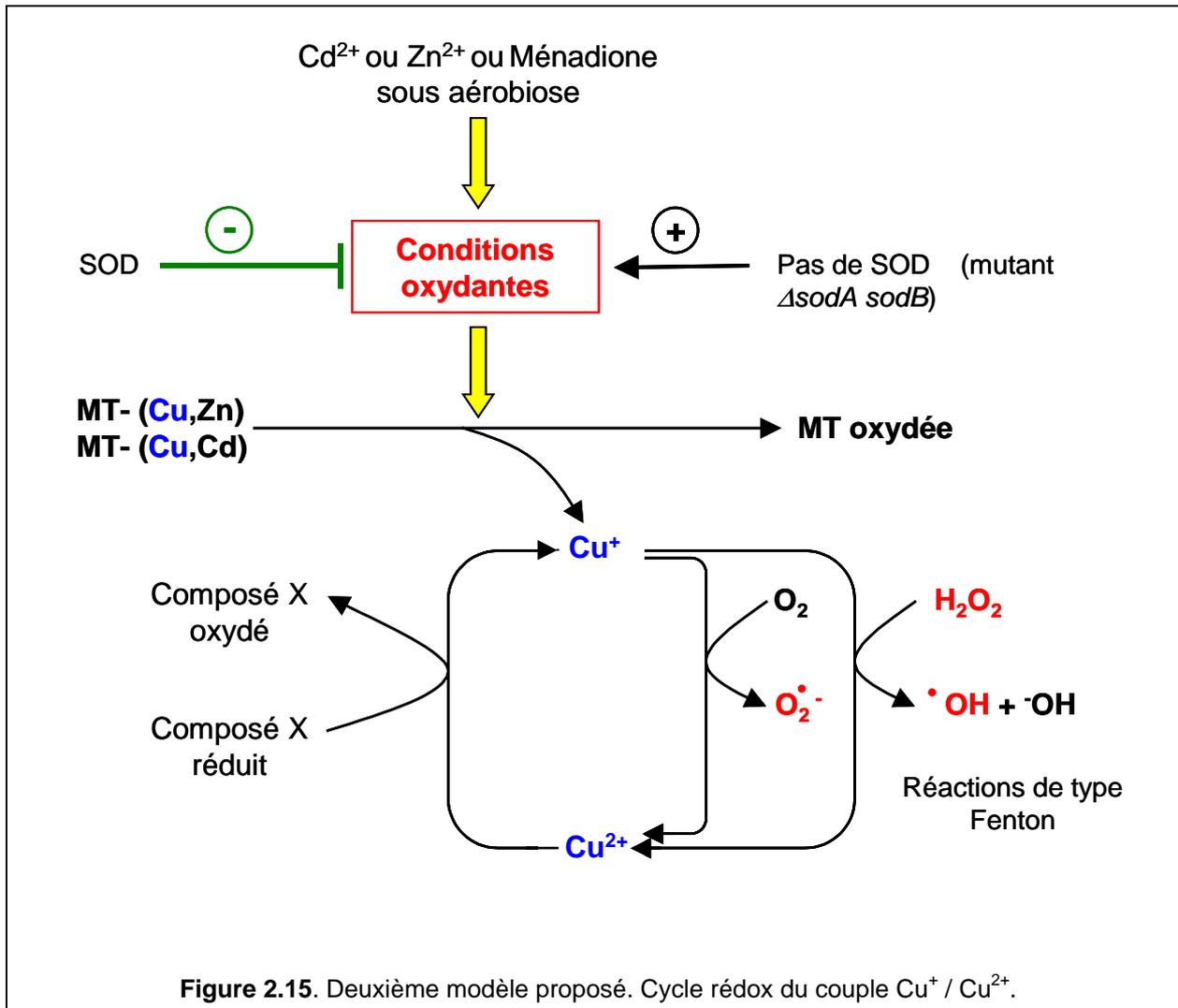
- Chez les rats LEC (rats « Long Evans » avec un pelage couleur cannelle) qui souffrent d'hépatites et de cancer du foie héréditaires, des concentrations hépatiques de MT-Cu 140 fois plus élevées que chez les rats sains sont observées (Sugawara *et al.*, 1992 ; Sakurai *et al.*, 1992). Il a été montré que cette concentration élevée de MT-Cu joue un rôle dans les pathologies observées car elle entraîne la génération de radicaux hydroxyles quand du peroxyde d'hydrogène est formé dans les cellules lors de la respiration (Sakurai *et al.*, 1994).
- L'idée que les MTs protègent les cellules du cadmium en formant des complexes MT-Cd qui seraient non toxiques est communément acceptée. Cependant, la néphrotoxicité liée au cadmium est causée par les complexes MT-Cd formés dans le foie, libérés quand celui-ci est endommagé, et récupérés par les reins (Chan *et al.*, 1993). De plus, une simple injection de complexes MT-Cd produit des dommages rénaux similaires à ceux observés après une exposition chronique au cadmium (Nordberg *et al.*, 1975 ; Cherian *et al.*, 1976).
- Des souris mutantes MT<sup>-/-</sup> sont plus résistantes aux radiations  $\gamma$  que les souris contrôles lorsque l'irradiation est précédée d'un traitement au zinc. Cela signifie que les propriétés antioxydantes et bénéfiques du zinc sont contrebalancées par l'expression de MTs (Conrad *et al.*, 2000).
- La biosynthèse de MTs initiée par le cadmium a été associée à une augmentation du risque de transformation néoplasique dans les cellules pulmonaires (Hart *et al.*, 2001).
- Des plantes transgéniques *Arabidopsis thaliana* surexprimant leur propre gène de phytochélatine-synthase présentent une hypersensibilité paradoxale au cadmium et au zinc. Les plantes les plus sensibles au cadmium et au zinc sont celles qui produisent la plus grande quantité de phytochélatines, qui du fait de leur richesse en cystéines sont également capables de lier les métaux (Lee *et al.*, 2003).

En accord avec nos résultats et avec tous les travaux cités ci-dessus, nous suggérons qu'une « situation de crise » puisse être déclenchée dans les cellules quand les MTs sont saturées de métal, ou plus précisément quand toutes les thionéines (T, forme de MT qui n'a pas lié de métal) ont fixé du métal. En effet, dès sa synthèse une T ne fixe pas forcément des ions zinc, les formes T représentant environ 50% de la concentration en MT totales dans de nombreux tissus (Yang *et al.*, 2001). De ce fait, quand des tissus sont contaminés par des métaux, les T représentent un pouvoir tampon, évitant ainsi l'augmentation de la

concentration en métaux libres dans les cellules. Les T n'ayant pas fixé de métaux gardant leurs fonctions anti-oxydantes. D'autre part, il est maintenant avéré que le **couple T/MT contrôle également la distribution du zinc** en fonction de l'état rédox et énergétique de la cellule.

- En effet, le couple rédox GSSG/GSH (glutathion oxydé/ réduit) module le transfert du zinc des MTs aux enzymes nécessitant du zinc (Jiang *et al.*, 1998a). T est capable d'inactiver des enzymes à zinc en extrayant le zinc de leur poche catalytique (Jacob *et al.*, 1998) ou d'activer des enzymes inhibées par le zinc en le fixant (Maret *et al.*, 1999). Les MTs sont capables de lier l'ATP, ce qui stimule le transfert du zinc à des enzymes déficientes en zinc (Jiang *et al.*, 1998b).
- Les MTs localisées dans l'espace intermembranaire des mitochondries de foie inhibent la respiration, tandis que T restaure la respiration inhibée par les MT (Ye *et al.*, 2001).
- Les T inhibent la liaison de facteurs contenant du zinc à l'ADN (Zeng *et al.*, 1991 ; Roesijadi *et al.*, 1998). Comme les MTs peuvent aussi être localisées dans le noyau (Tsujiikawa *et al.*, 1991), le couple T/MT pourrait aussi contrôler l'état des facteurs de transcription à doigts de zinc.

De ce fait, **un changement dans le rapport T/MT peut certainement modifier l'homéostasie cellulaire, et dans certaines conditions, faire basculer la cellule dans un état pathologique.** Ceci pourrait arriver lors d'une contamination métallique aiguë conduisant à une saturation des MTs et une titration des T, et lors d'une contamination par un xénobiotique provoquant un stress oxydant. Dans le cas d'un xénobiotique, la toxicité des MTs pourrait provenir de la libération de  $\text{Cu}^+$  provoqué par un stress oxydant. Une fois libéré,  $\text{Cu}^+$  peut réagir avec l' $\text{O}_2$ , l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , ou du déhydroascorbate pour produire respectivement des radicaux superoxydes, hydroxyles, ou ascorbyles (Fabisiak *et al.*, 1999). En conséquence, nous proposons un second modèle susceptible d'expliquer nos résultats et qui d'ailleurs n'exclut pas nécessairement le premier (Figure 2.17). En effet, le composé X pourrait être l'ubiquinone.



**Ce deuxième modèle** prend en compte la libération de Cu<sup>+</sup> par les MTs-Cu lors d'un stress oxydant généré par une contamination métallique ou par la ménadione. Ensuite, une boucle rédox Cu<sup>+</sup>/Cu<sup>2+</sup> est maintenue *via* des réactions de type Fenton mettant en jeu l'O<sub>2</sub>, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et l'UQ réduite et entraîne la génération de radicaux superoxydes, hydroxyles, et semi-quinoniques.

Une concentration de cuivre physiologique dans les cellules est suffisante pour rendre compte d'une toxicité due aux MTs. En effet, il a été montré que des complexes MT-(Cd, Zn, Cu) contenant aussi peu que 0,33 nmole de Cu par mole de protéine réagissent avec du peroxyde d'hydrogène pour former des radicaux hydroxyles (O'Brien et Salacinski, 1998). Par conséquent, on peut naturellement prévoir la survenue de dommages cellulaires dans les tissus riches en complexes MT-Cu. Un exemple est celui des rats LEC chez lesquels la concentration en MT-Cu(I) était la plus concentrée dans le cytosol, suivi du noyau, des mitochondries, et des fractions microsomales (Sakurai *et al.*, 1993). La localisation des

formes de MT pro-oxydantes dans les mitochondries et le noyau peut vraisemblablement expliquer les cas de carcinomes hépatiques (HCC, hepatocellular carcinoma). Il a été aussi montré que les petits HCC humains accumulaient du Cu sous la forme MT-Cu et il a été conclu que l'accumulation de Cu-MT dans le foie pouvait être liée à la carcinogenèse des HCC (Ebara *et al.*, 2000). De plus, les concentrations en Cu-MT dans les mélanomes et les tumeurs pulmonaires sont beaucoup plus élevées que dans les tissus sains, le cuivre étant le métal majoritairement associé aux MTs (Krauter *et al.*, 1989 ; Hart *et al.*, 1993).

Les résultats que nous avons présentés dans ce chapitre, remettent parfois en cause les idées sur le rôle des métallothionéines qui est très probablement plus complexe que ce qui est couramment évoqué et sont donc dans ce sens importants pour avancer dans la compréhension des fonctions de ces protéines.

Notre système, dans lequel *E. coli* constitue simplement un réacteur cellulaire pourrait être utilisé pour étudier *in vivo* les possibles impacts néfastes des MTs après addition dans le milieu de culture de polluant environnementaux ou de composés pharmaceutiques. En effet, le niveau d'expression des MTs dans le système bactérien utilisé (environ 0,5 à 1 nmol de MT pour  $10^9$  bactéries soit environ 50 et 100 nmol/g de bactéries après contamination au zinc et au cadmium respectivement) est du même ordre de grandeur que ceux rencontrés dans les tissus de mammifère (30 nmol/ g de foie ; Sato et Bremner, 1993) Ce système pourrait donc reproduire des processus conduisant éventuellement à des états pathologiques. Par exemple, la saturation des MTs par le Cd se produit vraisemblablement dans les macrophages alvéolaires (MAs) des fumeurs de cigarettes. Dans ces cellules, le rapport molaire du cadmium sur celui des MTs est respectivement égal à 2 et à 0,66 dans les MAs de fumeurs et de non fumeurs (Grasseschi *et al.*, 2003). Il est donc légitime de se demander si l'augmentation de cadmium pourrait faire basculer le comportement des MTs d'anti- à pro-oxydant, contribuant ainsi au développement de maladies du poumon chez les fumeurs de cigarette.

## RÉFÉRENCES DU CHAPITRE 2

- Anderson RS, Patel KM, Roesijadi G. 1999. Oyster metallothionein as an oxyradical scavenger: implications for hemocyte defense responses. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 443-449.
- Andres S, Baudrimont M, Lapaquellerie Y, *et al.* 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France). I. Geochemical characteristics of the sampling site and cadmium and zinc bioaccumulation kinetics. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2462-2471.
- Andrews GK. 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem. Pharmacol.* 59, 95-104.
- Arthur JR, Bremner I, Morrice PC, Mills CF. 1987. Stimulation of peroxidation in rat liver microsomes by (copper, zinc)-metallothioneins. *Free Radic. Res. Commun.* 4, 15-20.
- Bagchi D, Carryl OR, Tran MX, *et al.* 1999. Acute and chronic stress-induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate. *Mol. Cell. Biochem.* 196, 109-116.
- Bagchi M, Hassoun EA, Bagchi D, Stohs J, S. 1993. Production of reactive oxygen species by peritoneal macrophages and hepatic mitochondria and microsomes from endrin-treated rats. *Free Radic. Biol. Med.* 14, 149-155.
- Baudrimont M, Andres S, Metivaud J, *et al.* 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France) - Part II: Metallothionein response to metal exposure: a field illustration of the metal spillover theory. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2472-2477.
- Baudrimont M, Metivaud J, Maury-Brachet R, Ribeyre F, Boudou A. 1997. Bioaccumulation and metallothionein response in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2096-2105.
- Berka T, Shatzman A, Zimmerman J, Strickler J, Rosenberg M. 1988. Efficient expression of the yeast metallothionein gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170, 21-26.
- Boutet I, Tanguy A, Auffret M, Riso R, Moraga D. 2002. Immunochemical quantification of metallothioneins in marine mollusks: characterization of a metal exposure bioindicator. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1009-1014.
- Butler RA, Roesijadi G. 2001. Disruption of metallothionein expression with antisense oligonucleotides abolishes protection against cadmium cytotoxicity in molluscan hemocytes. *Toxicol. Sci.* 59, 101-107.

- Carginale V, Scudiero R, Capasso C, *et al.* 1998. Cadmium-induced differential accumulation of metallothionein isoforms in the Antarctic icefish which exhibits no basal protein but high endogenous mRNA levels. *Biochem. J.* 332., 475-481.
- Chan HM, Zhu LF, Zhong R, Grant D, Goyer RA, Cherian MG. 1993. Nephrotoxicity in rats following liver transplantation from cadmium-exposed rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 123, 89-96.
- Chen Y, Maret W. 2001. Catalytic selenols couple the redox cycles of metallothionein and glutathione. *Eur. J. Biochem.* 268, 3346-3353.
- Cherian MG, Goyer RA, Delaquerriere-Richardson L. 1976. Cadmium-metallothionein-induced nephropathy. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 38, 399-408.
- Chowdhury MJ, Baldisserotto B, Wood CM. 2005. Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in rainbow trout chronically acclimated to waterborne or dietary cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 381-390.
- Conrad CC, Grabowski DT, Walter CA, Sabia M, Richardson A. 2000. Using MT(-/-) mice to study metallothionein and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 447-462.
- Cosson R, Amiard JC. 1998. Utilisation des métallothionéines comme biomarqueurs d'exposition aux métaux. *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement: Technique et documentation*, 77-103.
- Couillard Y, Campbell PG, Tessier C. 1993. Response of metallothionein concentrations in a freshwater bivalve (*Anodonta grandis*) along an environmental cadmium gradient. *Limnol. Oceanogr.* 38, 299-313.
- Coyle P. 2002. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol. Life. Sci.* 59, 627-647.
- Ebara M, Fukuda H, Hatano R, *et al.* 2000. Relationship between copper, zinc and metallothionein in hepatocellular carcinoma and its surrounding liver parenchyma. *J. Hepatol.* 33, 415-422.
- Engelken J, Hildebrandt A. 1999. cDNA cloning and cadmium-induced expression of metallothionein mRNA in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Biochem. Cell Biol.* 77, 237-241.
- Fabisiak JP, Tyurin VA, Tyurina YY, *et al.* 1999. Redox regulation of copper-metallothionein. *Arch. Biochem. Biophys.* 363, 171-181.
- Fischer EH, Davie EW. 1998. Recent excitement regarding metallothionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 3333-3334.
- Geret F, Cosson RP. 2002. Induction of specific isoforms of metallothionein in mussel tissues after exposure to cadmium or mercury. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 36-42.
- Grasseschi RM, Ramaswamy RB, Levine DJ, Klaassen CD, Wesselius LJ. 2003. Cadmium accumulation and detoxification by alveolar macrophages of cigarette smokers. *Chest.* 124, 1924-1928.

- Hamer DH. 1986. Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 913-951.
- Haq F, Mahoney M, Koropatnick J. 2003. Signaling events for metallothionein induction. *Mutat. Res.* 533, 211-226.
- Hart BA, Potts RJ, Watkin RD. 2001. Cadmium adaptation in the lung - a double-edged sword? *Toxicology* 160, 65-70.
- Hart BA, Voss GW, Vacek PM. 1993. Metallothionein in human lung carcinoma. *Cancer Lett.* 75, 121-128.
- Hou YM, Kim R, Kim SH. 1988. Expression of the mouse metallothionein-I gene in *Escherichia coli*: increased tolerance to heavy metals. *Biochim. Biophys. Acta.* 951, 230-234.
- Isani G, Andreani G, Kindt M, Carpena E. 2000. Metallothioneins (MTs) in marine molluscs. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 46, 311-330.
- Iszard MB, Liu J, Liu Y, et al. 1995. Characterization of metallothionein-I-transgenic mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 133, 305-312.
- Jacob C, Maret W, Vallee BL. 1998. Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 3489-3494.
- Jacob C, Maret W, Vallee BL. 1999. Selenium redox biochemistry of zinc-sulfur coordination sites in proteins and enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 1910-1914.
- Jiang LJ, Maret W, Vallee BL. 1998b. The ATP-metallothionein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 9146-9149.
- Jiang LJ, W. M, Vallee BL. 1998a. The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 3483-3488.
- Kille P, Stephens P, Cryer A, Kay J. 1990. The expression of a synthetic rainbow trout metallothionein gene in *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1048, 178-186.
- Kinningham K, Kasarskis E. 1998. Antioxidant function of metallothioneins. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 11, 219-226.
- Klaassen CD, J. L, Choudhuri S. 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 267-294.
- Klaassen CD, Liu J. 1998. Metallothionein transgenic and knock-out mouse models in the study of cadmium toxicity. *J. Toxicol. Sci.* 23 suppl. 2, 97-102.
- Kleiner D. 1974. The effect of Zn<sup>2+</sup> ions on mitochondrial electron transport. *Arch. Biochem. Biophys.* 165, 121-125.
- Krauter B, Nagel W, Hartmann HJ, Weser U. 1989. Copper-thionein in melanoma. *Biochim. Biophys. Acta.* 1013, 212-217.
- Kumari MV, Hiramatsu M, Ebadi M. 1998. Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II. *Free Radic. Res.* 29, 93-101.

- Lecoœur S, Videmann B, Berny P. 2004. Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*. *Environ. Res.* 94, 184-191.
- Lee S, Moon JS, Ko TS, Petros D, Goldsbrough PB, Korban SS. 2003. Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress. *Plant Physiol.* 131, 656-663.
- Lemoine S, Bigot Y, Sellos D, Cosson RP, Laulier M. 2000. Metallothionein isoforms in *Mytilus edulis* (mollusca, bivalvia): complementary cDNA characterization and quantification of expression in different organs after exposure to cadmium, zinc, and copper. *Mar. Biotechnol.* 2, 195-203.
- Liu YP, Liu J, Iszard MB, Andrews GK, Palmiter RD, Klaassen CD. 1995. Transgenic mice that overexpress metallothionein-I are protected from cadmium lethality and hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 135, 222-228.
- Luther GW, Rickard D, Theberge SM, Olroyd A. 1996. Determination of metal (bi)sulfide stability constants of  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  by voltammetric methods. *Env. Sci. Tech.* 30, 671-679.
- Maret W. 2000. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *J. Nutr.* 130, 1455S-1458S.
- Maret W, Jacob C, Vallee BL, Fischer EH. 1999. Inhibitory sites in enzymes: zinc removal and reactivation by thionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 1936-1940.
- Maret W, Vallee BL. 1998. Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 3478-3482.
- Margoshes M, Vallee BL. 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* 79.
- Masters BA, Kelly EJ, Quaife CJ, Brinster RL, Palmiter RD. 1994. Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 584-588.
- Mello-Filho AC, Chubatsu LS, Meneghini R. 1988. V79 Chinese-hamster cells rendered resistant to high cadmium concentration also become resistant to oxidative stress. *Biochem. J.* 256, 475-479.
- Michalska AE, Choo KH. 1993. Targeting and germ-line transmission of a null mutation at the metallothionein I and II loci in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90, 8088-8092.
- Müller T, Schuckelt R, Jaenicke L. 1991. Cadmium/zinc-metallothionein induces DNA strand breaks in vitro. *Arch. Toxicol.* 65, 20-26.
- Murooka Y, Nagaoka T. 1987. Expression of cloned monkey metallothionein in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 204-207.

- Nordberg GF, Goyer R, Nordberg M. 1975. Comparative toxicity of cadmium-metallothionein and cadmium chloride on mouse kidney. *Arch. Pathol.* 99, 192-197.
- O'Brien P, Salacinski H. 1998. Evidence that the reactions of cadmium in the presence of metallothionein can produce hydroxyl radicals. *Arch. Toxicol.* 72, 690-700.
- Odawara F, Kurasaki M, Suzuki-Kurasaki M, *et al.* 1995. Expression of human metallothionein-2 in *Escherichia coli*: cadmium tolerance of transformed cells. *J. Biochem. Tokyo* 118, 1131-1137.
- Oikawa S, Kurasaki M, Kojima Y, Kawanishi S. 1995. Oxidative and nonoxidative mechanisms of site-specific DNA cleavage induced by copper-containing metallothioneins. *Biochemistry* 34, 8763-8770.
- Palmiter RD. 1998. The elusive function of metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 8428-8430.
- Roesijadi G, Bogumil R, Vasak M, Kagi JH. 1998. Modulation of DNA binding of a tramtrack zinc finger peptide by the metallothionein-thionein conjugate pair. *J. Biol. Chem.* 273, 17425-17432.
- Sakurai H, Fukudome A, Tawa R, *et al.* 1992. Unusual accumulation of copper related to induction of metallothionein in the liver of LEC rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 1393-1397.
- Sakurai H, Nakajima K, Kamada H, *et al.* 1993. Copper-metallothionein distribution in the liver of Long-Evans cinnamon rats: studies on immunohistochemical staining, metal determination, gel filtration and electron spin resonance spectroscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 993-998.
- Sakurai H, Satoh H, Hatanaka A, *et al.* 1994. Unusual generation of hydroxyl radicals in hepatic copper-metallothionein of LEC (Long-Evans cinnamon) rats in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 313-318.
- Sato M, Bremner I. 1993. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic. Biol. Med.* 14, 325-337.
- Sato M, Kondoh M. 2002. Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *Tohoku J. Exp. Med.* 196, 9-22.
- Schmidt CJ, Hamer DH. 1983. Cloning and sequence analysis of two monkey metallothionein cDNAs. *Gene* 24, 137-146.
- Silvestre F, Duchene C, Trausch G, Devos P. 2005. Tissue-specific cadmium accumulation and metallothionein-like protein levels during acclimation process in the Chinese crab *Eriocheir sinensis*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 140, 39-45.
- Skulachev VP, Chistyakov VV, Jasaitis AA, Smirnova EG. 1967. Inhibition of the respiratory chain by zinc ions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26, 1-6.

- Sugawara N, Sugawara C, Sato M, Takahashi H, Mori M. 1992. Excessive accumulation of hepatic copper in LEC rats aged 80 days without hepatitis and 130 days with hepatitis. *Pharmacol. Toxicol.* 71, 321-324.
- Sun J, Trumpower BL. 2003. Superoxide anion generation by the cytochrome bc1 complex. *Arch. Biochem. Biophys.* 419, 198-206.
- Suzuki KT, Rui M, Ueda J, Ozawa T. 1996. Production of hydroxyl radicals by copper-containing metallothionein: roles as prooxidant. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141, 231-237.
- Tamai KT, Gralla EB, Ellerby LM, Valentine JS, Thiele DJ. 1993. Yeast and mammalian metallothioneins functionally substitute for yeast copper-zinc superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 8013-8017.
- Tanguy A, Moraga D. 2001. Cloning and characterization of a gene coding for a novel metallothionein in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT2): a case of adaptive response to metal-induced stress? *Gene* 273, 123-130.
- Tanguy A, Mura C, Moraga D. 2001. Cloning of a metallothionein gene and characterization of two other cDNA sequences in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT1). *Aquatic Toxicol.* 55, 35-47.
- Tessier C, Blais JS. 1996. Determination of cadmium-metallothionein in zebra mussels exposed to subchronic concentrations of Cd. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 33, 246-252.
- Thiele DJ, Walling MJ, Hamer DH. 1986. Mammalian metallothionein is functional in yeast. *Science* 271, 854-846.
- Thiers RE, Vallee BL. 1957. Distribution of metals in subcellular fractions of rat liver. *J. Biol. Chem.* 226, 911-920.
- Thornalley PJ, Vasak M. 1985. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys. Acta.* 827, 36-44.
- Tsujikawa K, Imai T, Kakutani M, *et al.* 1991. Localization of metallothionein in nuclei of growing primary cultured adult rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 283, 239-242.
- Viarengo A, Burlando B, Cavaletto M, Marchi B, Ponzano E, Blasco J. 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am. J. Physiol.* 277, R1612-1619.
- Viarengo A, Burlando B, Ceratto N, Panfoli I. 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 46, 407-417.
- Vinogradov AD, Grivennikova VG. 2005. Generation of superoxide-radical by the NADH:ubiquinone oxidoreductase of heart mitochondria. *Biochemistry (Mosc.)* 70, 120-127.

- Yang Y, Maret W, Vallee BL. 2001. Differential fluorescence labeling of cysteinyl clusters uncovers high tissue levels of thionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 5556-5559.
- Ye B, Maret W, Vallee BL. 2001. Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 2317-2322.
- Zeng J, Heuchel R, Schaffner W, Kagi JH. 1991. Thionein (apometallothionein) can modulate DNA binding and transcription activation by zinc finger containing factor Sp1. *FEBS Lett.* 279, 310-312.

## *Chapitre 3*

### *Sous-unité I de la cytochrome-c-oxydase et stress oxydant*



La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) est une conséquence inévitable de la respiration aérobie. En effet, 1 à 2 % de l'oxygène consommé est réduit de façon incomplète et conduit à la formation de ROS (Boveris *et al.*, 1972 ; Boveris et Chance, 1973). Cela se produit au niveau des sites redox de la chaîne respiratoire mitochondriale, lorsqu'un électron est occasionnellement transféré à l'oxygène et non à l'accepteur suivant de la chaîne, générant alors un anion superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ), précurseur d'autres ROS tels que le peroxyde d'hydrogène ou le radical hydroxyle. Cela constitue la source majeure de ROS dans la plupart des tissus. En temps « normal », cette production est maîtrisée grâce aux enzymes antioxydantes (superoxyde-dismutase, catalase, etc.) mais l'équilibre entre défenses antioxydantes et production de ROS peut être déplacé en raison d'une inhibition de la chaîne de transport des électrons, ou encore d'une exposition à des xénobiotiques. Ce déséquilibre apparaît comme le dénominateur commun de nombreuses pathologies dans lesquelles le stress oxydant cause des dommages, et parfois la mort cellulaire.

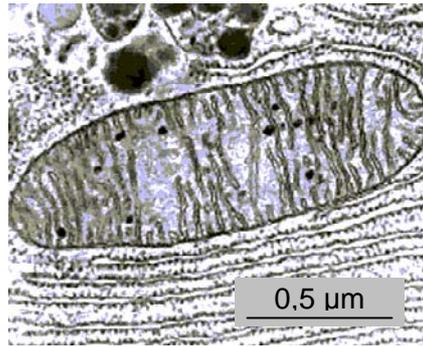
Nous avons vu dans le chapitre 1 qu'un des effets du cadmium était la génération de ROS. La question est donc : cette production accrue de ROS interfère-t-elle au niveau de la chaîne respiratoire ? Pour tenter de répondre, nous avons étudié l'effet du cadmium sur le niveau d'expression d'un gène mitochondrial codant pour une sous-unité de la cytochrome-c-oxydase (COX) qui constitue le complexe IV de cette chaîne. Avant d'aborder les résultats qui seront présentés sous forme d'une publication dans *Biometals*, nous allons situer plus précisément le gène que nous allons étudier.

## **1- LA CYTOCHROME-C-OXYDASE : COMPLEXE IV DE LA CHAÎNE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE**

### **1-1 Mitochondrie et chaîne respiratoire**

La respiration cellulaire est le processus d'oxydation de composés organiques avec l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électrons. Elle permet la production d'ATP. Chez les eucaryotes, le processus est localisé au niveau d'organites particuliers : les mitochondries.

Examinée au microscope électronique (Figure 3.1), une mitochondrie ressemble étrangement à une bactérie et selon une théorie actuellement acceptée, son origine est endosymbiotique, c'est à dire qu'elle est le résultat d'une ancienne invasion de la cellule par une  $\alpha$ -protéobactérie (Margulis, 1981 ; Gray *et al.*, 1999).



**Figure 3.1.** Photographie d'une coupe de mitochondrie vue au microscope électronique.

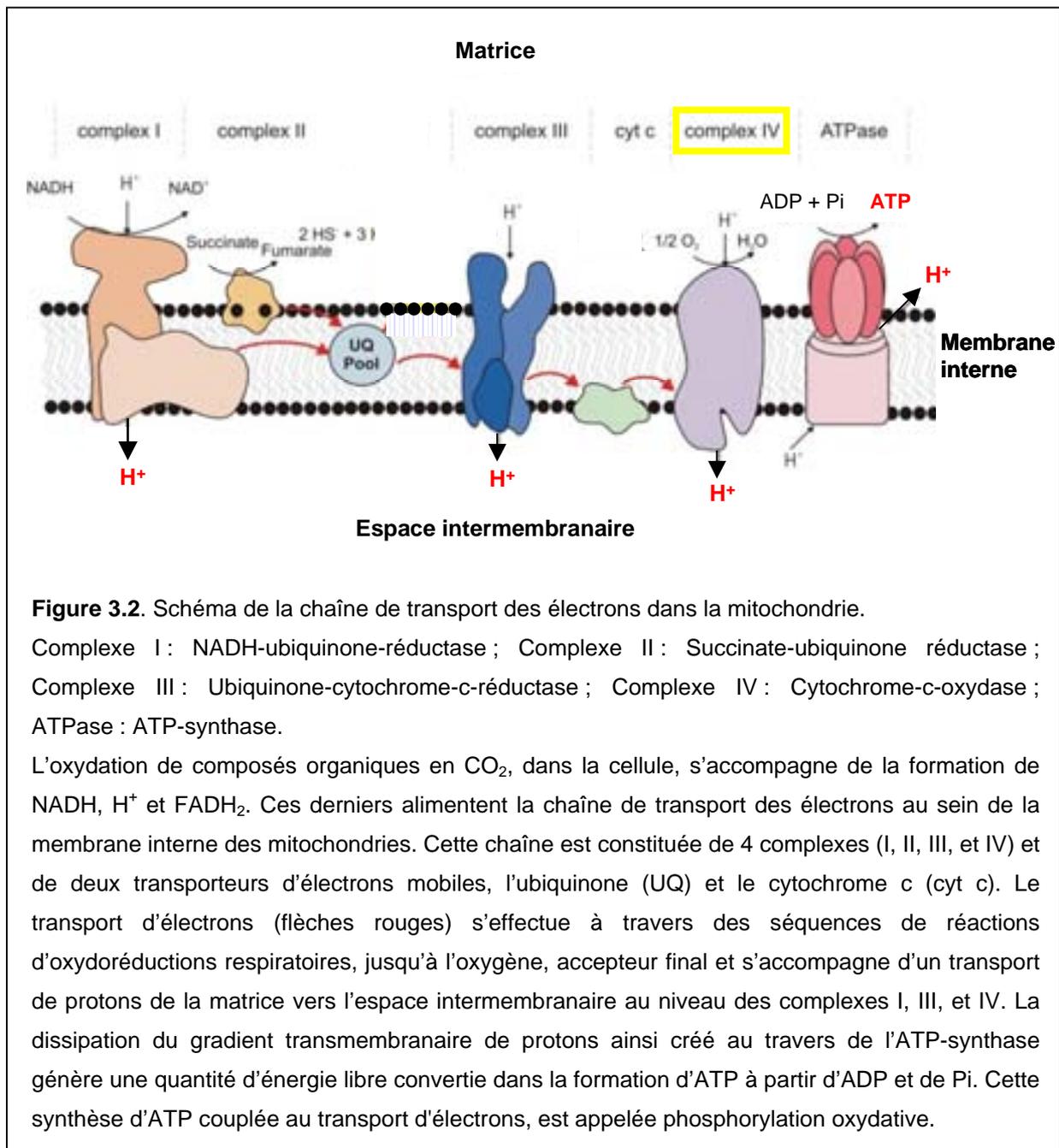
Au cours du temps, une relation étroite s'est établie entre ces deux éléments. La cellule fournit protection et nutriments et la mitochondrie est spécialisée dans la production d'énergie directement utilisable par la cellule (ATP).

Les mitochondries sont entourées par deux membranes comme les bactéries Gram -. La membrane externe les sépare du cytoplasme cellulaire et la membrane interne délimite leur matrice (Figure 3.1). La membrane interne montre des différences de composition importantes avec les autres membranes de la cellule et ceci constitue d'ailleurs un des arguments en faveur de l'hypothèse de l'endosymbiose.

Un autre argument fort est que les mitochondries possèdent leur propre ADN (ADNmt), localisé dans la matrice, qui est sous forme circulaire et donc radicalement différent de l'ADN du noyau cellulaire. On suppose que la symbiose entre la cellule eucaryote primitive et l'organe s'est accompagnée d'un transfert de gènes mitochondriaux dans le noyau. Ces gènes auraient ensuite en partie disparu du génome mitochondrial, ce qui expliquerait le fait que celui-ci soit si réduit. Chez l'homme, par exemple cet ADNmt ne comprend que 37 gènes répartis sur 16 569 paires de base ce qui est très faible par rapport à la taille de l'ADN du noyau qui en compte environ 3 milliards. La plupart des protéines de la mitochondrie sont donc codées par l'ADN du noyau et seules quelques protéines de la membrane interne essentielles à la chaîne respiratoire sont codées par l'ADN mitochondrial. Ainsi, la cellule ne peut plus se passer de la mitochondrie et réciproquement.

Une bonne illustration de cette symbiose entre cellule et mitochondrie est la cytochrome-c-oxydase, une enzyme de la chaîne respiratoire mitochondriale, puisque qu'elle est codée par des gènes mitochondriaux et nucléaires.

La chaîne respiratoire mitochondriale est schématisée sur la figure 3.2.

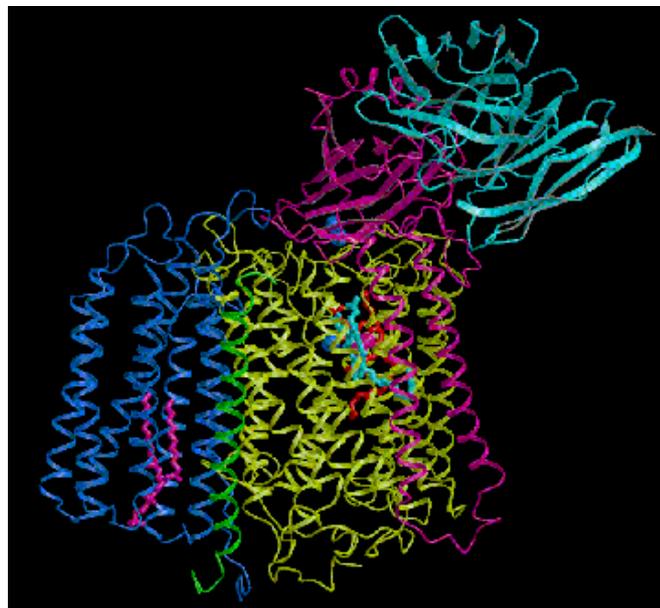


La cytochrome-c-oxydase constitue le complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale. Elle catalyse le transfert d'électrons du ferrocyclochrome c à l'oxygène moléculaire qui est alors réduit pour former de l'eau et utilise l'énergie ainsi libérée pour pomper des protons  $\text{H}^+$  dans l'espace intermembranaire.

## 1-2 Structure de la cytochrome-c-oxydase

La cytochrome-c-oxydase se présente sous la forme d'un dimère chez les mammifères (Malatesta *et al.*, 1995). Chaque monomère contient 13 sous unités formées de chaînes polypeptidiques. Les sous-unités I (CoxI), II, et III sont codées par l'ADN mitochondrial et sont synthétisées dans la matrice. Les dix autres sous-unités sont codées par l'ADN nucléaire et synthétisées dans le cytoplasme.

Chez les procaryotes, la cytochrome-c-oxydase est constituée de trois à quatre sous-unités et est localisée dans la membrane plasmique (Figure 3.3). Les sous-unités I à III sont homologues des sous-unités I à III de mammifères.



**Figure 3.3:** Exemple de structure de la cytochrome-c-oxydase de la bactérie *Paracoccus denitrificans* (Iwata *et al.*, 1995).

De gauche à droite: sous-unité III (bleu) avec un phospholipide piégé (rose). Sous-unité IV (vert). Sous-unité I (jaune). Sous-unité II (rose). Fragment d'anticorps utilisé pour la cristallisation (cyan).

Malgré l'éloignement phylogénétique entre les bactéries et les mammifères, les trois sites catalytiques de la cytochrome-c-oxydase sont très conservés (Ostermeier *et al.*, 1997 ; Yoshikawa *et al.*, 1998). Chez ces deux règnes, la sous unité II contient le site à cuivre  $Cu_A$  qui reçoit les électrons du cytochrome c. La sous-unité I possède les sites d'accueil de l'hème a, du cytochrome  $a_3$ , et d'un ion  $Cu_B$  : site où l'oxygène est réduit (Malatesta *et al.*, 1995).

La sous-unité III qui est également conservée entre mammifères et eucaryotes ne possède pas de site catalytique mais est essentielle au bon repliement des sous-unités I et II. En effet, la suppression de la sous-unité III chez la bactérie *Paracoccus denitrificans* affecte la possibilité de réduction de l'oxygène dans la sous-unité I (Echabe *et al.*, 1995).

En ce qui concerne le mécanisme de transport des protons par la cytochrome-c-oxydase différentes explications sont proposées pour les enzymes mammifères (Yoshikawa, 2002) et bactériennes (Michel, 1999).

## **2- RÉSULTATS : CYTOCHROME-C-OXYDASE ET CADMIUM**

Le cadmium peut inhiber la chaîne de transport des électrons et de ce fait induire la production de ROS (Wang *et al.*, 2004). Un moyen développé par la cellule pour lutter contre cette augmentation est d'éliminer les ROS formés grâce à une batterie d'enzymes antioxydantes. Cependant, dans le cas d'une augmentation de ROS due au cadmium ces enzymes peuvent être inhibées (Company *et al.*, 2004; Ikediobi *et al.*, 2004). Un autre moyen d'éviter les atteintes toxiques des ROS est de limiter directement la production de ceux-ci en consommant plus rapidement l'oxygène moléculaire. L'étape limitante de la respiration cellulaire étant au niveau du complexe IV, nous nous sommes intéressés à la cytochrome c oxydase (COX) (Villani et Attardi, 2000).

Plus précisément, ce sont deux résultats obtenus par Campian *et al.* (2004) qui ont motivé ce choix :

- dans les cellules en culture tolérantes à l'oxygène, l'activité de COX est deux fois supérieure à celle mesurée sur des cellules témoins.
- une inhibition de COX conduit à une augmentation de la production de ROS.

Le but du travail présenté dans l'article 3-1 est d'étudier, chez trois espèces de bivalves, l'impact du cadmium sur le métabolisme mitochondrial *via* l'analyse du niveau d'expression du gène mitochondrial codant pour la sous-unité I de la cytochrome-c-oxydase (*CoxI*).

La première raison qui nous a poussé à choisir le gène de la sous-unité I est que, chez les trois espèces étudiées, au moins une partie de sa séquence est connue et accessible dans GenBank. Comme on peut le voir sur la figure 3.4, les séquences protéiques sont hautement conservées d'une espèce à l'autre.

La deuxième raison est que la séquence de *CoxI*, est hautement conservée non seulement chez les trois espèces de mollusques étudiées mais aussi des eucaryotes inférieurs aux



## Cytochrome *c* oxidase subunit I gene is up-regulated by cadmium in freshwater and marine bivalves

Maud Achard-Joris, Patrice Gonzalez, Véronique Marie, Magalie Baudrimont & Jean-Paul Bourdineaud\*

Laboratoire d'Ecophysiologie et d'Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques (LEESA), Université Bordeaux1/UMR CNRS 5805, Place du Dr. Peyneau, 33120, Arcachon, France; \*Author for correspondence (Tel: +33-556-22-39-26; Fax: +33-556-54-93-83; E-mail: jp.bourdineaud@epoc.u-bordeaux1.fr)

Received 28 January 2005; Accepted 18 April 2005; Published online: ■

**Key words:** biomarker, bivalves, cadmium, *CoxI* gene, quantitative real-time PCR, zinc

### Abstract

Inhibition of the mitochondrial electron transfer chain and induction of reactive oxygen species (ROS) production are one of the roots of cadmium (Cd) toxicity. To appreciate the impact of Cd on mitochondria, we focused on the expression of *CoxI* gene which encodes the subunit I of the Cytochrome *c* oxidase (complex IV of the respiratory chain). *CoxI* gene expression was studied by real-time quantitative PCR in three species: two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) and one marine bivalve (diploid or triploid *Crassostrea gigas*). Bivalves were exposed for 10 or 14 days to 0.13  $\mu\text{M}$  Cd<sup>2+</sup> and 15.3  $\mu\text{M}$  Zn<sup>2+</sup> in controlled laboratory conditions. We demonstrate that in the three mollusk species *CoxI* gene was up-regulated by Cd. Zinc (Zn), which is known to have antioxidant properties, had no effect on *CoxI* gene expression. In the presence of Cd and Zn, *CoxI* gene inducibility was lower than after a single Cd exposure, in each species; result that could not be fully explained by a decreased Cd accumulation. *CoxI* gene induction by Cd was 4.8-fold higher in triploid oysters than in diploid ones, indicating a possible influence of triploidy on animal responses to Cd contamination.

### Introduction

Heavy metals, depending on their oxidation states, can be highly reactive and hence toxic to most organisms. Metals such as copper (Cu) and zinc (Zn) are essential for life, whereas others, such as mercury (Hg) and cadmium (Cd), are not known to perform any useful biochemical function. Cd in particular is very toxic and is considered a serious occupational and environmental health threat since it is a metal with many industrial uses which is continuously introduced into the atmosphere, into aquatic and terrestrial environments. Toxicological responses of Cd exposure include kidney damage, respiratory diseases, neurological disorders and several kinds of cancer (Waalkes *et al.* 1992).

To counter Cd toxicity, living organisms use several metal resistance mechanisms. Cells respond by increasing the expression of genes encoding a variety of proteins (Carginale *et al.* 2002); toxic ions can be segregated by thiol-containing molecules like metallothioneins (Roesijadi *et al.* 1996) or pumped out of the cell via a membrane protein (Li *et al.* 1997; Achard-Joris *et al.* 2005). A variety of mechanisms have been attributed to Cd toxicity. It interferes with the intracellular signaling network and gene regulation at multiple levels (Beyersmann & Hechtenberg 1997) and may be associated with the production of reactive oxygen species (ROS, molecules and free radicals such as superoxide anion and hydrogen peroxide derived from molecular oxygen) (Szuster-Ciesielska *et al.* 2000). Under normal conditions the production

	Journal : <b>BIOM</b>	Dispatch : <b>18-5-2005</b>	Pages : <b>8</b>
	CMS No. : <b>DO00015671</b>	<input type="checkbox"/> LE	<input type="checkbox"/> TYPESET
	MS Code : <b>BIOM 96R1</b>	<input checked="" type="checkbox"/> CP	<input checked="" type="checkbox"/> DISK

60 and destruction of ROS is well regulated in cell  
61 metabolism, but under environmental oxidative  
62 stress the balance between prooxidative and anti-  
63 oxydative reactions is shifted in favor of the  
64 former.

65 As mitochondria are a major source of super-  
66 oxide and hydrogen peroxide production in cells  
67 (Turrens 1997) several studies have focused on the  
68 effect of Cd on mitochondrial metabolism: Cd has  
69 been shown to inhibit the mitochondrial electron  
70 transfer chain and to induce ROS production  
71 (Wang *et al.* 2004). Moreover, Cd-promoted oxi-  
72 dative stress leads to DNA strand damage –  
73 especially mitochondrial ones (Yakes & Van  
74 Houten 1997) – and to apoptotic cell death (Bag-  
75 chi *et al.* 2000). This suggests that enhanced ROS  
76 production may be at the root of Cd toxicity. Two  
77 more ways in which cells might avoid Cd toxicity  
78 can then be proposed: hypertrophied antioxidant  
79 defenses or increased consumption of molecular  
80 oxygen. As Cd can induce alterations in the  
81 activity of antioxidant enzymes such as superoxide  
82 dismutase, catalase, glutathione reductase, and  
83 glutathione peroxidase after only a few hours  
84 exposure (Company *et al.* 2004; Ikediobi *et al.*  
85 2004), we focused on the second way and espe-  
86 cially on Complex IV (Cytochrome *c* oxidase  
87 (COX)) of the mitochondrial respiratory chain.  
88 This transfers electrons from reduced Cytochrome  
89 *c* to molecular oxygen, and contributes to the  
90 production of an electrochemical proton gradient  
91 across the mitochondrial inner membrane that  
92 drives the synthesis of ATP (Capaldi *et al.* 1983;  
93 Capaldi 1990). Complex IV is particularly  
94 interesting because it has been shown that oxygen-  
95 tolerant strain of HeLa cells had twice the Cyto-  
96 chrome *c* oxydase activity of the wild-type ones,  
97 and inhibition of Cytochrome *c* oxydase enhanced  
98 ROS production (Campian *et al.* 2004). Assuming  
99 that cell damage does arise from exaggerated  
100 mitochondrial ROS production, the site of elec-  
101 tron leak from the electron transport chain  
102 becomes an important question.

103 To study the impact of Cd toxicity on mito-  
104 chondria we looked at *Cox* subunit I mitochon-  
105 drial gene (*CoxI*) expression. An advantage of  
106 using COX to study the impact of Cd on mito-  
107 chondrial metabolism is that *CoxI* gene sequence is  
108 highly conserved between lower and higher  
109 eukaryotes (Capaldi 1990). Thus a similar *CoxI*  
110 gene regulation between species can be expected.

111 Many aquatic organisms are of potential  
112 interest as ecologically sensitive targets of metallic  
113 pollution. Among them, bivalve mollusks are  
114 regularly used as bioindicators of water metal  
115 pollution because of their high bioaccumulation  
116 capacities for heavy metals (Inza *et al.* 1997) and  
117 because they are well represented in aquatic eco-  
118 systems. In this study, three aquatic species were  
119 chosen: two freshwater bivalves (the Asiatic clam  
120 *Corbicula fluminea* and the zebra mussel *Dreissena*  
121 *polymorpha*) and one seawater bivalve (the Pacific  
122 oyster *Crassostrea gigas*). Triploid *C. gigas*, oys-  
123 ters developed to enhance the production and  
124 selling period of commercial bivalves, were also  
125 used to investigate whether a third set of chro-  
126 mosomes could influence *CoxI* gene expression  
127 after metal contamination. *CoxI* gene expression  
128 level was studied in gill tissues because gills are the  
129 organ at the interface with the polluted environ-  
130 ment and are thus the main tissues from which the  
131 metal loading in the organism will proceed (Mar-  
132 igoomez *et al.* 2002). Cd concentration was set to  
133 0.13  $\mu\text{M}$  which is close to that found in a Cd  
134 contaminated river used for field contaminations  
135 (Achard *et al.* 2004). Since Zn has antioxidant  
136 properties (Bray & Bettger 1990), bivalves were  
137 also contaminated with Zn and a mix of Cd and  
138 Zn.

## 139 **Materials and methods**

### 140 *Animals*

141 *C. fluminea* ( $2 \pm 0.2$  cm shell length) were col-  
142 lected from a reference site in Cazaux-Sanguinet  
143 freshwater lake (Aquitaine region, south-west  
144 France). *D. polymorpha* ( $2.7 \pm 0.2$  cm shell  
145 length) were collected in the Garonne river, close  
146 to Agen (Aquitaine region, France).

147 Diploid and triploid *C. gigas* oysters  
148 (12 months old,  $5.7 \pm 0.1$  cm shell length) were  
149 obtained from an oyster farmer in Arcachon Bay  
150 (Aquitaine region, France).

### 151 *Metal contaminations*

152 For freshwater bivalves, laboratory experiments  
153 were carried out using experimental units (EUs)  
154 based on glass tanks lined with plastic bags con-  
155 taining pure sand and dechlorinated tap water

156 permanently aerated by a diffuser connected to an  
157 air pump (Achard *et al.* 2004). Groups of 20  
158 *C. fluminea* and 20 *D. polymorpha* were exposed  
159 for 10 days to ZnCl<sub>2</sub> (15.3 μM Zn<sup>2+</sup>), CdCl<sub>2</sub>  
160 (0.13 μM Cd<sup>2+</sup>) and ZnCl<sub>2</sub> + CdCl<sub>2</sub> (15.3 μM  
161 Zn<sup>2+</sup> and 0.13 μM Cd<sup>2+</sup>). Metal concentrations  
162 were maintained constant during the whole  
163 experiment by daily additions of aqueous Cd and  
164 Zn solutions, adjusted according to the decrease in  
165 metal concentration in each EU (determined by  
166 atomic absorption spectrometry – VARIAN AA  
167 400, Victoria, Australia). The bivalves were fed  
168 every two days with 3 × 10<sup>5</sup> green algae  
169 (*Scenedesmus subspicatus*) per ml culture.

170 Experiments on oysters were performed using  
171 EUs based on polyethylene tanks containing aer-  
172 ated (281 μM of dissolved O<sub>2</sub>) artificial seawater  
173 prepared by mixing Instant Ocean synthetic sea  
174 salt (Mentor, OH, USA; 25 ± 0.5‰) with de-  
175 chlorinated tap water. Groups of 36 *C. gigas* dip-  
176 loid and 36 *C. gigas* triploid were exposed for  
177 14 days to ZnCl<sub>2</sub> (15.3 μM Zn<sup>2+</sup>), CdCl<sub>2</sub> (0.13 μM  
178 Cd<sup>2+</sup>) and ZnCl<sub>2</sub> + CdCl<sub>2</sub> (15.3 μM Zn<sup>2+</sup> and  
179 0.13 μM Cd<sup>2+</sup>). The contaminated water was  
180 changed daily to maintain Zn and/ or Cd con-  
181 centrations constant. Oysters were contaminated  
182 4 days longer than freshwater bivalves in order to  
183 obtain an equivalent Cd concentration in tissues.  
184 Indeed, for a given metal concentration, levels of  
185 free metal ions are much less in seawater than in  
186 tap water due to the presence of metal chloride  
187 species which are less available (Campbell 1995).  
188 Oysters were fed every two days with 0.05 g green  
189 algae (*Isochrysis galbana*) per oyster.

190 All the experiments were performed at  
191 20 ± 0.3 °C, pH 8.5 ± 0.3 and with 12 h light  
192 per day according to a protocol already described  
193 (Achard *et al.* 2004). Cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>)  
194 and zinc chloride (ZnCl<sub>2</sub>) were purchased from  
195 Merck.

#### 196 Cadmium and zinc determinations

197 The whole soft body of one bivalve was taken  
198 from each of the three replicates for each condi-  
199 tion, then dissected, dried on absorbent paper and  
200 weighed (fresh weight, f.w.). Tissues and water  
201 samples were then analyzed for metal bioaccu-  
202 mulation by atomic absorption spectrophotometry  
203 as previously described (Achard *et al.* 2004).

204 Inter-individual variability for each experi-  
205 mental condition was defined by mean ± stan-  
206 dard error (SE). Significant differences between  
207 metal concentrations in the whole soft body were  
208 determined using the nonparametric Mann–Whit-  
209 ney *U*-test (*P* < 0.05).

#### *cDNA fragment production and SYBR green real-time PCR* 210 211

212 Total RNA were extracted from gills of bivalves  
213 (two animals per reaction) using the Absolutely  
214 RNA RT-PCR Miniprep kit (Stratagene) accord-  
215 ing to the manufacturer's instructions. Three  
216 microgram of RNAs from laboratory bivalves  
217 were retrotranscribed in 50 μl reaction using the  
218 ProStar First-Strand RT-PCR kit (Stratagene).

219 Primers COXI5 5'-GGAATACCACGACG-  
220 GTACTCT-3' and COXI3 5'-AGGGCAGCC-  
221 GTGTAAT-3' were used on cDNA prepared from  
222 *D. polymorpha* and *C. gigas* RNA and primers  
223 CFCOXI5 5'-GATGGGTGGTTTTGGAAATT-  
224 GAC-3' and CFCOXI3 5'-ACTGACGGGCCA-  
225 GAATG-3' on cDNA prepared from *C. fluminea*  
226 RNA. *CoxI* gene sequence from these three species  
227 were available in GenBank (*D. polymorpha*:  
228 AF120663; *C. gigas*: AF280608; *C. fluminea*:  
229 AF120666) and primers were designed according to  
230 the LightCycler probe design software (version 1.0,  
231 Roche). Normalization was carried out detecting  
232 cDNA 28S with the following primers: 5'-CCA  
233 AGG AGT CTA ACA TGT GC-3' and 5'-GAT  
234 GGT TCG ATT AGT CTT TC-3'. Quantitative  
235 real-time PCR assay was carried out in 20 μl PCR  
236 mixture volume consisting of 1 μl LightCycler  
237 FastStart reaction mix SYBR Green I (containing  
238 FastStart *Taq* DNA polymerase, 0.3 μM of each  
239 oligonucleotide; Roche), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.3 μM of  
240 each primer and 3 μl of cDNA. Gene amplification  
241 was carried out as follows: initial activation of  
242 HotStart *Taq* DNA Polymerase at 95 °C for  
243 10 min; 50 cycles in three steps: 95 °C for 5 s, 60 °C  
244 for 5 s, 72 °C for 20 s. At the end of amplification  
245 cycles, melting temperature analysis was carried  
246 out by slow increase in temperature (0.05 °C s<sup>-1</sup>)  
247 from 65 up to 95 °C. Amplification, data acquisi-  
248 tion and analysis were carried out with a Light-  
249 Cycler instrument (Roche, Mannheim, Germany)  
250 using LightCycler 5.3.2 software (Roche). Three  
251 replicates were performed, meaning three inde-

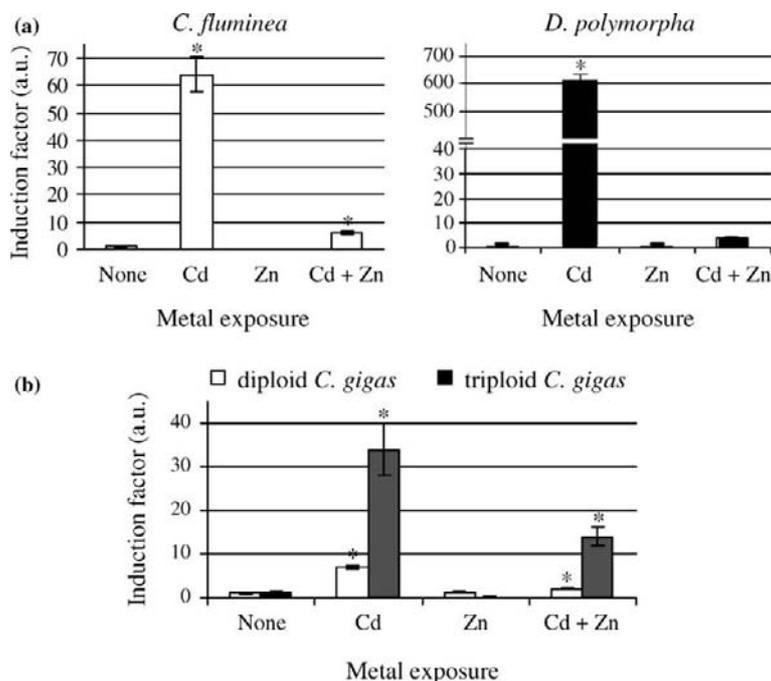


Figure 1. (a) Expression levels ( $\pm$ SE) after normalization for *CoxI* transcript in gills of *C. fluminea* and *D. polymorpha* exposed for 10 days to cadmium ( $0.13 \mu\text{M Cd}^{2+}$ ), zinc ( $15.3 \mu\text{M Zn}^{2+}$ ), or cadmium and zinc ( $0.13 \mu\text{M Cd}^{2+}$  and  $15.3 \mu\text{M Zn}^{2+}$ ). (b) Expression levels ( $\pm$ SE) after normalization for *CoxI* transcript in gills of diploid and triploid *C. gigas* exposed for 14 days to cadmium, zinc, or both metals at the same concentrations as in a. Expression ratio between *CoxI* and 28S genes in control bivalves was set to one. a.u. stands for arbitrary units. Measurements were done in triplicate. \*Statistically different compared to control ( $P < 0.05$ ).

252 pendent RNA extractions and retrotranscriptions  
 253 for each contamination condition. Relative quan-  
 254 tifications of *CoxI* gene expression levels were  
 255 normalized according to the 28S rRNA gene  
 256 expression. Expression ratio between *CoxI* and 28S  
 257 genes in control bivalves was set to one. Inter-  
 258 individual variability for each experimental condi-  
 259 tion was defined by mean  $\pm$  SE ( $n = 3$ ). Signifi-  
 260 cant differences between *CoxI* gene expression  
 261 levels in the gills were determined using the non-  
 262 parametric Kruskal–Wallis method ( $P < 0.05$ ) for  
 263 more than two samples comparisons. If the test was  
 264 rejected, we performed the Mann–Whitney *U*-test  
 265 ( $P < 0.05$ ).

## 266 Results

267 Bivalves were exposed to Cd, Zn, or both metals in  
 268 controlled conditions. After Cd exposure, no  
 269 mortality was observed and bivalves accumulated  
 270 Cd well. The Cd accumulation factor (defined as  
 271 Cd concentration in Cd-contaminated bivalve  
 272 versus Cd concentration in control bivalve) was 79

in *C. fluminea*, 56 in *D. polymorpha*, 15 in dip-  
 273 loid *C. gigas*, and 16 in triploid *C. gigas*. Cd con-  
 274 centration in the whole soft body of bivalves was  
 275 similar in each species (around  $48 \text{ nmol Cd g}^{-1}$   
 276 fw.) (Table 1). After Cd and Zn exposure, a dif-  
 277 ference in Cd accumulation was observed only in  
 278 *D. polymorpha*: Cd concentration was 2.4 times  
 279 lower in mussels exposed to Cd and Zn than in the  
 280 one exposed to Cd (Table 1); the 2.2 times lower  
 281 Cd concentration observed in *C. fluminea* was not  
 282 statistically significant.  
 283

Zn concentration in the whole soft body of  
 284 control bivalves was different for each species.  
 285 Indeed, in *C. gigas*, it was 13 and 53 times  
 286 higher than in *C. fluminea* and *D. polymorpha*,  
 287 respectively (Table 2). Although Zn basal levels  
 288 were different for each species, similar Zn accu-  
 289 mulation factors (defined as Zn concentration in  
 290 Zn-contaminated bivalve versus Zn concentra-  
 291 tion in control bivalve) were observed between  
 292 diploid *C. gigas*, triploid *C. gigas*, and *C. fluminea*  
 293 after Zn exposure. Zn accumulation factor in *D.*  
 294 *polymorpha* was calculated to be 18 and was six  
 295 times higher than in the other bivalves (Table 2).  
 296

Table 1. Cadmium concentrations (measured in nanomol per gram fresh weight  $\pm$  SE) in the whole soft body of bivalves after exposure to Cd, Zn, or Cd and Zn.

Species	Metal exposure, nmol Cd g <sup>-1</sup> (fw)			
	None	Cd	Zn	Cd + Zn
<i>C. fluminea</i> <sup>a</sup>	0.6 $\pm$ 0.1	47.3 $\pm$ 23.1 <sup>c</sup>	0.9 $\pm$ 0.04	20.9 $\pm$ 10.4 <sup>c</sup>
<i>D. polymorpha</i> <sup>a</sup>	1 $\pm$ 0.2	55.5 $\pm$ 7.4 <sup>c</sup>	1.1 $\pm$ 0.2	23.6 $\pm$ 5.2 <sup>c</sup>
<i>C. gigas</i> diploid <sup>b</sup>	3.4 $\pm$ 0.2	52.4 $\pm$ 9 <sup>c</sup>	3.2 $\pm$ 0.4	40.7 $\pm$ 3.8 <sup>c</sup>
<i>C. gigas</i> triploid <sup>b</sup>	2.6 $\pm$ 0.3	41.4 $\pm$ 7.5 <sup>c</sup>	2.4 $\pm$ 0.1	61.2 $\pm$ 5.2 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>*C. fluminea* and *D. polymorpha* were contaminated for 10 days. <sup>b</sup>Diploid or triploid *C. gigas* were contaminated for 14 days. <sup>c</sup>Significantly different to control ( $P < 0.05$ ). Cadmium determination was done in triplicate for each condition.

Table 2. Zinc concentrations (measured in nanomol per gram fresh weight  $\pm$  SE) in the whole soft body of bivalves after exposure to Cd, Zn, or Cd and Zn.

Species	Metal exposure, nmol Zn g <sup>-1</sup> (fw)			
	None	Cd	Zn	Cd + Zn
<i>C. fluminea</i> <sup>a</sup>	309 $\pm$ 34	323 $\pm$ 16	1067 $\pm$ 158 <sup>c</sup>	696 $\pm$ 195 <sup>c</sup>
<i>D. polymorpha</i> <sup>a</sup>	72 $\pm$ 20	98 $\pm$ 69	1326 $\pm$ 595 <sup>c</sup>	1154 $\pm$ 249 <sup>c</sup>
<i>C. gigas</i> diploid <sup>b</sup>	4165 $\pm$ 310	3871 $\pm$ 368	13499 $\pm$ 171 <sup>c</sup>	15266 $\pm$ 955 <sup>c</sup>
<i>C. gigas</i> triploid <sup>b</sup>	3424 $\pm$ 1042	4015 $\pm$ 797	9266 $\pm$ 847 <sup>c</sup>	11006 $\pm$ 1540 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>*C. fluminea* and *D. polymorpha* were contaminated for 10 days. <sup>b</sup>Diploid or triploid *C. gigas* were contaminated for 14 days. <sup>c</sup>Significantly different to control ( $P < 0.05$ ). Zinc determination was done in triplicate for each condition.

297 In *C. fluminea*, *D. polymorpha*, and diploid *C.*  
 298 *gigas*, there was a slight decrease in Zn accu-  
 299 mulation factor after Cd and Zn exposure  
 300 compared to that obtained after a single Zn  
 301 exposure.

302 *CoxI* gene expression profiles of control and  
 303 metal contaminated bivalves were then compared  
 304 by quantitative real-time RT-PCR.

#### 305 *Effects of cadmium on CoxI gene expression*

306 As shown in Figure 1, our experiments demon-  
 307 strated for the first time that *CoxI* gene expression  
 308 was up-regulated by Cd in the three different  
 309 species. However, the induction factors were dif-  
 310 ferent between each mollusk: although freshwater  
 311 bivalves accumulated the same amount of Cd  
 312 (Table 1), *CoxI* induction was 9.5-fold higher in  
 313 Cd-exposed *D. polymorpha* than in Cd-exposed *C.*  
 314 *fluminea* (Figure 1a). *CoxI* expression level also  
 315 differed between diploid and triploid *C. gigas*,  
 316 whereas the Cd concentration in tissues was simi-  
 317 lar: a 4.8 ratio of triploid versus diploid *CoxI* gene  
 318 expression was observed (Figure 1b).

#### *Effects of cadmium on CoxI gene expression in presence of zinc*

319  
 320  
 321 In each species, Zn alone did not significantly  
 322 affect *CoxI* gene expression level; indeed induc-  
 323 tion factors in *C. fluminea*, *D. polymorpha*, dip-  
 324 loid *C. gigas*, and triploid *C. gigas* were  
 325 0.1  $\pm$  0.1, 1  $\pm$  0.2, 1.3  $\pm$  0.3, and 0.1  $\pm$  0.1,  
 326 respectively. When Cd and Zn were present in  
 327 the water column, *CoxI* gene expression level  
 328 was increased and induction factors in *C. flumi-*  
 329 *nea*, *D. polymorpha*, diploid *C. gigas*, and trip-  
 330 loid *C. gigas* were equal to 6  $\pm$  0.6, 4  $\pm$  0.2,  
 331 2  $\pm$  0.2, and 14  $\pm$  2, respectively (Figure 1).  
 332 Nevertheless, gene induction was significantly  
 333 lower than after a single Cd contamination; it  
 334 had decreased by 10- and 200-fold in *C. fluminea*  
 335 and *D. polymorpha*, respectively (Figure 1a).  
 336 *CoxI* gene expression was still higher in triploid  
 337 oysters than in diploid (sevenfold) but *CoxI* gene  
 338 induction level underwent a 3.5- and 2.4-fold  
 339 decrease in diploid and triploid *C. gigas*  
 340 (respectively) as compared with single Cd  
 341 contamination (Figure 1b).

342 **Discussion**

343 We designed this study to establish a possible  
344 relationship between Cd contamination and  
345 expression of the mitochondrial gene *CoxI*. COXI  
346 is the subunit one of the Cytochrome *c* oxydase  
347 which provides a critical function during respira-  
348 tion by transferring electrons from Cytochrome *c*  
349 to oxygen and contributing to ATP generation  
350 (Malatesta *et al.* 1995). Indeed it has been dem-  
351 onstrated that a reduced level of COX activity  
352 causes functional reduction in Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase  
353 capacity, an important factor responsible for  
354 neuronal death in the mammalian brain (Greena-  
355 myre *et al.* 1999), and that complex IV inhibitors  
356 cause a rapid and severe depletion of cellular ATP  
357 content, resulting in acute cell death (Zhang *et al.*  
358 2001).

359 In the present study, the first result of our  
360 experiments showed that *CoxI* gene expression  
361 was up-regulated in different aquatic organisms  
362 after Cd exposure. Overexpression of *CoxI* has  
363 been demonstrated associated with a pyrethroid  
364 insecticide resistant strain of *Blatella germanica*  
365 (German cockroach) (Pridgeon & Liu 2003) and in  
366 *Danio rerio* (zebrafish) fed with diets contaminated  
367 by methyl mercury (Gonzalez *et al.* 2005), but to  
368 our knowledge, the direct relation between *CoxI*  
369 expression and Cd contamination has never been  
370 reported before. Although *CoxI* gene induction by  
371 Cd is clear, no direct link was established between  
372 Cd concentration in tissues and *CoxI* gene  
373 expression level. Indeed, *CoxI* gene expression  
374 level was 10 times higher in *D. polymorpha* than in  
375 *C. fluminea*, whereas the Cd accumulation factor  
376 was lower in *D. polymorpha* than in *C. fluminea*.  
377 The finding of 4.8-times higher up-regulation of  
378 *CoxI* gene expression in triploid than in diploid *C.*  
379 *gigas* cannot be explained in a simple way by the  
380 presence of an extra structural gene copy, as a  
381 quantitative effect alone would be expected to be  
382 in the order of 1.5, or even less if the background  
383 expression is higher in the triploid due to the extra  
384 gene copy. The expression level of a single gene in  
385 a polyploid organism as compared to the diploid  
386 one is hardly predictable. For instance, in cotton  
387 (*Gossypium hirsutum*) the alcohol dehydrogenase  
388 A (*adhA*) gene expression level in tetraploid leaves  
389 is two times higher than in diploid ones whereas it  
390 is two times lower in tetraploid roots than in dip-  
391 loid ones. And the *adhD* gene is 10 times more

expressed in the diploid leaves and roots than in 392  
tetraploid ones (Adams *et al.* 2003). This high- 393  
lights the non-Mendelian mechanisms than often 394  
occurs for gene expressions in polyploid organ- 395  
isms. 396

As COX is considered as the rate-limiting step 397  
for mitochondrial respiration (Villani & Attardi 398  
2000), *CoxI* gene overexpression could be a com- 399  
pensating mechanism to restore the decrease in 400  
mitochondrial activity and to efficiently consume 401  
O<sub>2</sub>, thus limiting Cd induced damage in the cell. 402  
Some of this damage is a consequence of increased 403  
ROS production. Indeed, Cd stimulates ROS for- 404  
mation in mitochondria because it blocks electron 405  
transport, especially electron transfer through the 406  
complex III which is considered as the principal 407  
site for ROS generation (Chen *et al.* 2003; Wang 408  
*et al.* 2004). Prevention of the slowing electron 409  
flow can thus be considered as a mechanism to 410  
avoid ROS production. For instance, an 411  
increased activity of complex IV, causing the 412  
depletion of electron rich intermediates, could 413  
prevent Cd-promoted oxidative stress. Moreover, 414  
Cytochrome *c* oxydase activity has been shown to 415  
be higher in oxygen-tolerant HeLa cells than in the 416  
control cells (Campian *et al.* 2004). 417

Another result of this study showed that *CoxI* 418  
gene inducibility was lowered when bivalves were 419  
contaminated with Cd and Zn compared with 420  
single Cd contamination. Even for *D. polymorpha*, 421  
this reduction of *CoxI* gene expression level could 422  
not be explained only by a decrease in intracellular 423  
Cd accumulation. Indeed, the ratio of *CoxI* gene 424  
induction levels after Cd exposure versus after Zn 425  
+ Cd exposure was 200 in *D. polymorpha* and 10 426  
in *C. fluminea*, whereas the decrease in Cd accu- 427  
mulation was similar for the two species. 428

Whereas Cd induced ROS production, Zn 429  
was shown to have antioxidant properties. For 430  
instance, it protected cultured skin cells against the 431  
cytotoxic effects of UV irradiation and decreased 432  
the production of ROS (Parat *et al.* 1997). More- 433  
over, Zn added to a cell culture medium inhibited 434  
Cd-induced ROS production (Szuster-Ciesielska 435  
*et al.* 2000). These findings suggest that at least 436  
one of the mechanisms involved in the protective 437  
role of Zn against Cd-induced toxicity is connected 438  
with inhibition of Cd-induced ROS formation in 439  
cells. In our study, the decreased *CoxI* gene 440  
expression level in bivalves contaminated with Cd 441  
and Zn compared to those contaminated only with 442

443 Cd could be explained by a lower toxic effect of  
 444 Cd. In any case, *CoxI* gene expression level was  
 445 reduced in the presence of Zn but remained at least  
 446 two times higher than in control animals (Fig-  
 447 ure 1). Thus, *CoxI* gene expression level might  
 448 constitute a new tool, in addition to metallothi-  
 449 oneins and heat shock proteins levels, for detecting  
 450 Cd contamination of both freshwater and marine  
 451 sentinel organisms or for detecting Cd pollution  
 452 from the river to the sea.

#### 453 Acknowledgements

454 We would like to thank Gilles Durrieu for his help  
 455 in statistical analysis.

#### 456 References

- 457 Achard M, Baudrimont M, Boudou A, Bourdineaud J-P. 2004  
 458 Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in  
 459 the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals  
 460 exposure. *Aquatic Toxicol* **67**, 347–357.
- 461 Achard-Joris M, van den Berg van Saparoea HB, Driessen  
 462 AJM, Bourdineaud J-P. 2005 Heterologously expressed  
 463 bacterial and human multidrug resistance proteins confer  
 464 cadmium resistance to *Escherichia coli*. *Biochemistry* **44**,  
 465 5916–5922.
- 466 Adams KL, Cronn R, Percifield R, Wendel JF. 2003 Genes  
 467 duplicated by polyploidy show unequal contributions to the  
 468 transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proc*  
 469 *Natl Acad Sci USA* **100**, 4649–4654.
- 470 Bagchi D, Joshi SS, Bagchi M, et al. 2000 Cadmium- and  
 471 chromium-induced oxidative stress, DNA damage, and  
 472 apoptotic cell death in cultured human chronic myelogenous  
 473 leukemic K562 cells, promyelocytic leukemic HL-60 cells,  
 474 and normal human peripheral blood mononuclear cells.  
 475 *J Biochem Mol Toxicol* **14**, 33–41.
- 476 Beyersmann D, Hechtenberg S. 1997 Cadmium, gene regula-  
 477 tion, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol Appl*  
 478 *Pharmacol* **144**, 247–261.
- 479 Bray TM, Bettger WJ. 1990 The physiological role of zinc as an  
 480 antioxidant. *Free Radical Biol Med* **8**, 281–291.
- 481 Campbell PGC. 1995 Interactions between trace metals and  
 482 aquatic organisms a critique of the free-ion activity model.  
 483 In: Tessier A, Turner DR, eds. *Metal Speciation and Bio-*  
 484 *availability in Aquatic Systems*. John Wiley & Sons; Chich-  
 485 ester: pp. 45–102.
- 486 Campian JL, Qian M, Gao X, Eaton JW. 2004 Oxygen toler-  
 487 ance and coupling of mitochondrial electron transport.  
 488 *J Biol Chem* **279**, 46580–46587.
- 489 Capaldi RA. 1990 Structure and assembly of Cytochrome *c*  
 490 oxidase. *Arch Biochem Biophys* **280**, 252–262.
- 491 Capaldi RA, Malatesta F, Darley-USmar VM. 1983 Structure  
 492 of Cytochrome *c* oxidase. *Biochim Biophys Acta* **726**,  
 493 135–148.
- 494 Carginale V, Capasso C, Scudiero R, Parisi E. 2002 Identifi-  
 495 cation of cadmium-sensitive genes in the Antarctic fish  
*Chionodraco hamatus* by messenger RNA differential dis-  
 496 play. *Gene* **299**, 117–124.
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. 498  
 2003 Production of reactive oxygen species by mitochondria:  
 499 central role of complex III. *J Biol Chem* **278**, 36027–36031.  
 500
- Company R, Serafim A, Bebianno MJ, Cosson R, Shillito B. 501  
 Fiala-Medioni A. 2004 Effect of cadmium, copper and  
 502 mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxi-  
 503 dation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathy-*  
 504 *modiolus azoricus*. *Mar Environ Res* **58**, 377–381.  
 505
- Gonzalez P, Dominique Y, Massabuau J-C, Boudou A. 506  
 Bourdineaud J-P. 2005 Comparative effects of dietary  
 507 methylmercury on gene expression in liver, skeletal muscle,  
 508 and brain of the zebra fish (*Danio rerio*). *Environ Sci Technol*  
 509 (in press). **3** 510
- Greenamyre JT, MacKenzie G, Peng TI, Stephans SE. 1999 511  
 Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochem*  
 512 *Soc Symp* **66**, 85–97.
- Ikediobi CO, Badisa VL, Ayuk-Takem LT, Latinwo LM, West 514  
 J. 2004 Response of antioxidant enzymes and redox metab-  
 515 olites to cadmium-induced oxidative stress in CRL-1439  
 516 normal rat liver cells. *Int J Mol Med* **14**, 87–92.  
 517
- Inza B, Ribeyre F, Maury-Brachet R, Boudou A. 1997 Tissue 518  
 distribution of inorganic mercury, methylmercury and cad-  
 519 mium in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) in relation to  
 520 the contamination levels of the water column and sediment.  
 521 *Chemosphere* **35**, 2817–2836.  
 522
- Li ZS, Lu YP, Zhen RG, Szczypka M, Thiele DJ, Rea PA. 1997 A 523  
 new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccha-*  
 524 *romyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(gluta-  
 525 thionato)cadmium. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 42–47.  
 526
- Malatesta F, Antonini G, Sarti P, Brunori M. 1995 Structure 527  
 and function of a molecular machine: Cytochrome *c* oxidase.  
 528 *Biophys Chem* **54**, 1–33.  
 529
- Marigomez I, Soto M, Cajaraville MP, Angulo E, Giamberini 530  
 L. 2002 Cellular and subcellular distribution of metals in  
 531 molluscs. *Microsc Res Tech* **56**, 358–392.  
 532
- Parat MO, Richard MJ, Pollet S, Hadjir C, Favier A, Beani 533  
 JC. 1997 Zinc and DNA fragmentation in keratinocyte  
 534 apoptosis: its inhibitory effect in UVB irradiated cells.  
 535 *J Photochem Photobiol* **37**, 101–106.  
 536
- Pridgeon JW, Liu N. 2003 Overexpression of the Cytochrome *c* 537  
 oxidase subunit I gene associated with a pyrethroid resistant  
 538 strain of German cockroaches, *Blattella germanica* (L.).  
 539 *Insect Biochem Mol Biol* **33**, 1043–1048.  
 540
- Roesijadi G, Hansen KM, Unger ME. 1996 Cadmium-induced 541  
 metallothionein expression during embryonic and early lar-  
 542 val development of the mollusc *Crassostrea virginica*. *Toxicol*  
 543 *Appl Pharmacol* **140**, 356–363.  
 544
- Szuster-Ciesielska A, Stachura A, Slotwinska M, et al. 2000 545  
 The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell  
 546 apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in  
 547 cell cultures. *Toxicology* **145**, 159–171.  
 548
- Turrens JF. 1997 Superoxide production by the mitochondrial 549  
 respiratory chain. *Biosci Rep* **17**, 3–8.  
 550
- Villani G, Attardi G. 2000 In vivo control of respiration by 551  
 Cytochrome *c* oxidase in human cells. *Free Radical Biol Med*  
 552 **29**, 202–210.  
 553
- Waalkes MP, Coogan TP, Barter RA. 1992 Toxicological 554  
 principles of metal carcinogenesis with special emphasis on  
 555 cadmium. *Crit Rev Toxicol* **22**, 175–201.  
 556
- Wang Y, Fang J, Leonard SS, Krishna Rao KM. 2004 Cadmium 557  
 inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxy-  
 558 gen species. *Free Radical Biol Med* **36**, 1434–1443.  
 559

560	Yakes FM, Van Houten B. 1997 Mitochondrial DNA damage	Zhang J-G, Tirmenstein MA, Nicholls-Grzemeski FA, Fariss MW.	565
561	is more extensive and persists longer than nuclear DNA	2001 Mitochondrial electron transport inhibitors cause lipid	566
562	damage in human cells following oxidative stress. <i>Proc Natl</i>	peroxidation-dependent and -independent cell death: protec-	567
563	<i>Acad Sci USA</i> <b>94</b> , 514-519	tive role of antioxidants. <i>Arch Biochem Biophys</i> <b>393</b> , 87-96.	568
564	.		569

## Faits marquants

Chez les trois espèces de bivalves, l'expression du gène *CoxI* est induite par le cadmium (Figure 1, Article 3-1). Ceci pourrait être interprété comme un mécanisme de résistance à une contamination par le cadmium et plus particulièrement à l'augmentation de ROS qui en découle. En effet, si cette induction a pour conséquence une augmentation de la quantité de cytochrome c, cela compenserait le ralentissement du flux d'électrons dû au cadmium et limiterait la formation de ROS.

Une autre hypothèse est que l'induction du gène *CoxI* permet de maintenir constante la quantité protéique de la sous unité I dont le renouvellement est rapide en raison de son inhibition par le cadmium (résultat vérifié au laboratoire chez le poisson zèbre, *Danio rerio* ; non publié).

Toujours chez les trois espèces, le niveau d'expression du gène *CoxI* en présence de cadmium et de zinc est diminué par rapport à celui obtenu lors d'une contamination par le cadmium seul. Par contre le zinc n'a aucun effet sur le niveau d'expression du gène quelle que soit l'espèce étudiée (Figure 1, Article 3-1).

Cette diminution du niveau d'expression du gène *CoxI* en présence de cadmium et de zinc pourrait s'expliquer par les propriétés antioxydantes du zinc qui limite les effets toxiques du cadmium. Il a en effet été montré que l'ajout de zinc dans un milieu de culture cellulaire inhibe la production de ROS induite par le cadmium (Szuster-Ciesielska *et al.*, 2000).

### COMPLÉMENTS DE RÉFÉRENCES DU CHAPITRE 3

- Boveris A, Chance B. 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134, 707-716.
- Boveris A, Oshino N, Chance B. 1972. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 128, 617-630.
- Campian JL, Qian M, Gao X, Eaton JW. 2004. Oxygen tolerance and coupling of mitochondrial electron transport. *J. Biol. Chem.* 279, 46580-46587.
- Capaldi RA. 1990. Structure and assembly of cytochrome c oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 280, 252-262.
- Company R, Serafim A, Bebianno MJ, Cosson R, Shillito B, Fiala-Medioni A. 2004. Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Mar. Environ. Res.* 58, 377-381.
- Echabe I, Haltia T, Freire E, Goni FM, Arrondo JL. 1995. Subunit III of cytochrome c oxidase influences the conformation of subunits I and II: an infrared study. *Biochemistry* 34, 13565-13569.
- Gray MW, Burger G, Lang BF. 1999. Mitochondrial evolution. *Science* 283, 1476-1481.
- Ikedioji CO, Badisa VL, Ayuk-Takem LT, Latinwo LM, West J. 2004. Response of antioxidant enzymes and redox metabolites to cadmium-induced oxidative stress in CRL-1439 normal rat liver cells. *International journal of molecular medicine* 14, 87-92.
- Iwata S, Ostermeier C, Ludwig B, Michel H. 1995. Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* 376, 660-669.
- Malatesta F, Antonini G, Sarti P, Brunori M. 1995. Structure and function of a molecular machine: cytochrome c oxidase. *Biophys. Chem.* 54, 1-33.
- Margulis L. 1981. Symbiosis in cell evolution, San Francisco: Freeman.
- Michel H. 1999. Cytochrome c oxidase: catalytic cycle and mechanisms of proton pumping-- a discussion. *Biochemistry* 38, 15129-15140.
- Ostermeier C, Harrenga A, Ermler U, Michel H. 1997. Structure at 2.7 Å resolution of the *Paracoccus denitrificans* two-subunit cytochrome c oxidase complexed with an antibody FV fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 10547-10453.
- Szuster-Ciesielska A, Stachura A, Slotwinska M, et al. 2000. The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. *Toxicology* 145, 159-171.
- Villani G, Attardi G. 2000. In vivo control of respiration by cytochrome c oxidase in human cells. *Free Rad. Biol. Med.* 29, 202-210.

- Wang Y, Fang J, Leonard SS, Krishna Rao KM. 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Rad. Biol. Med.* 36, 1434-1443.
- Yoshikawa S. 2002. Cytochrome c oxidase. *Adv. Protein Chem.* 60, 341-395.
- Yoshikawa S, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, *et al.* 1998. Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase. *Science* 280, 1723-1729.



## *Chapitre 4*

### *Expulsion des métaux par des protéines de type MDR*



## I- LES PROTEINES DE TYPE MDR TRANSPORTEURS DE LA FAMILLE ABC

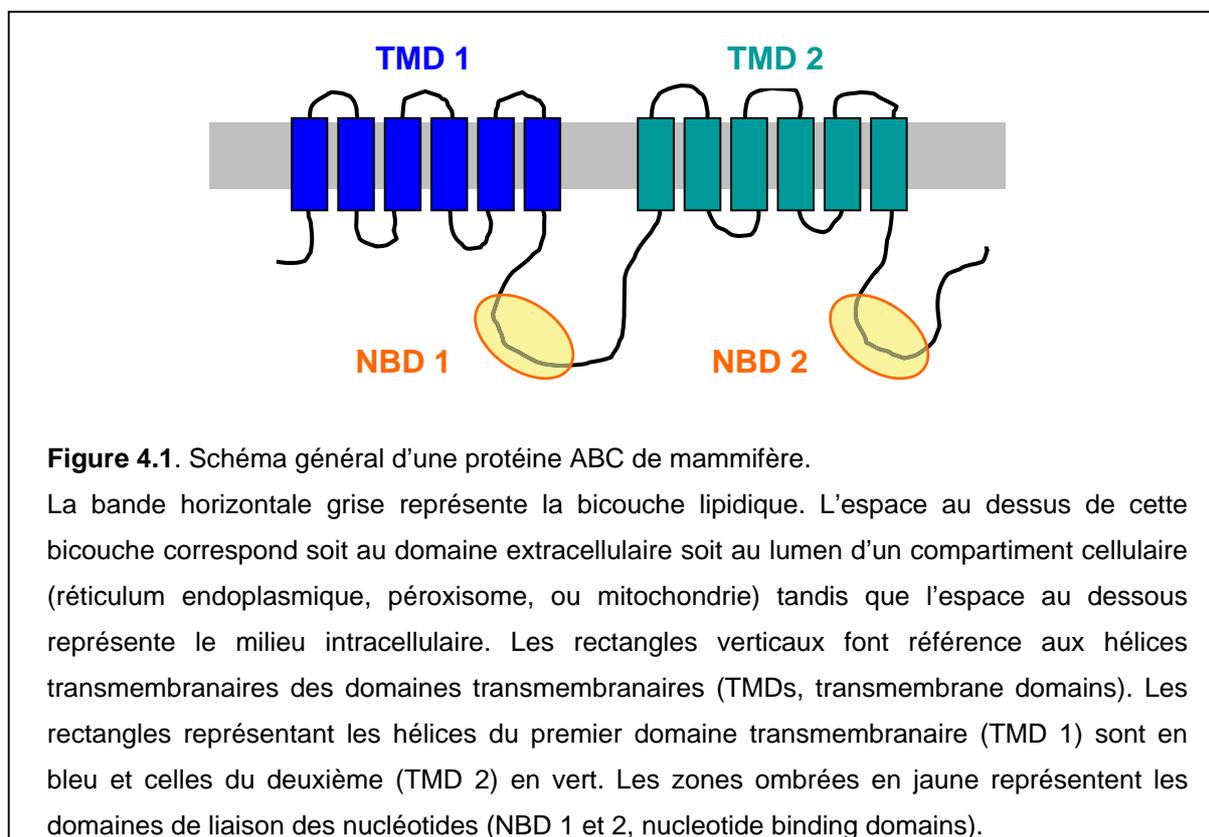
Une cellule doit faire transiter des molécules à travers sa membrane plasmique pour maintenir la composition de son cytoplasme distincte de celle du milieu environnant. De nombreuses protéines transmembranaires remplissant cette fonction appartiennent à la famille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette). Ces protéines, rencontrées dans tout le règne vivant (Higgins, 1992 ; Fath et Kolter, 1993) utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter des substrats à travers les membranes cellulaires. La surexpression de certains de ces transporteurs ABC a fréquemment pour conséquence une résistance à des agents cytotoxiques n'ayant pas de caractéristiques communes, parmi eux, les antibiotiques, les antifongiques, les herbicides, et les médicaments anticancéreux. Ce phénomène est appelé « Multidrug resistance » (MDR). Il a été observé pour la première fois sur des lignées de cellules tumorales (Kessel *et al.*, 1968 ; Nielsen et Skovsgaard, 1992) et est toujours largement étudié car il est un obstacle majeur au succès des chimiothérapies. Dans ce cas, le phénotype MDR est dû à la surexpression des gènes *hMDR1* et *MRP1* codant pour deux protéines ABC : la P-glycoprotéine (P-gp) ou protéine hMDR1 et MRP1 (Gottesman *et al.*, 1995 ; Keppler *et al.*, 1997).

Malgré des années de travail sur les transporteurs ABC, et en particulier sur la P-gp, le fonctionnement exact de ces protéines n'est pas complètement élucidé. Outre les xénobiotiques, les protéines ABC permettent le transport de substrats extrêmement variés tels que les ions, les sucres, les acides aminés, les vitamines, les peptides, les polysaccharides, les hormones, ou les lipides. Elles sont de plus impliquées dans divers processus cellulaires comme la maintenance de l'homéostasie osmotique, ou le transport des nutriments, des lipides et du cholestérol (Higgins, 1992 ; Martinoia *et al.*, 2002 ; Hegele et Robinson, 2005 ; Pohl *et al.*, 2005). Malgré la diversité de leurs substrats et de leurs rôles, la séquence des transporteurs ABC est largement conservée au niveau des domaines appelés Walker A, Walker B, et ABC signature. C'est d'ailleurs grâce à cette homologie de séquence que certains modèles structuraux de ces protéines sont proposés. Par contre, comme nous allons le voir, très peu de structures cristallographiques ont été obtenues pour des protéines ABC.

## 1- STRUCTURE DES TRANSPORTEURS ABC

Un transporteur ABC typique chez les mammifères est constitué quatre domaines (Hyde *et al.*, 1990). Deux domaines transmembranaires (TMDs, transmembrane domains) possèdent un ou plusieurs sites de liaison des substrats et forment une voie par laquelle ils vont traverser la membrane. Ces domaines sont constitués de plusieurs segments hydrophobes qui traversent la membrane plasmique plusieurs fois. Les deux autres domaines, hydrophiles, constituent des domaines de liaison des nucléotides (NBDs, nucleotide binding domains). Ils sont situés du côté cytoplasmique de la membrane et possèdent deux régions hautement conservées de liaison de l'ATP : Walker A et B. Ce sont les moteurs moléculaires du transport de substrats car ils transforment l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP en changements de conformation de la protéine (Figure 4.1).

Les transporteurs ABC bactériens ne possèdent qu'un TMD et un NBD mais fonctionnent sous forme de dimère (Higgins *et al.*, 1986).

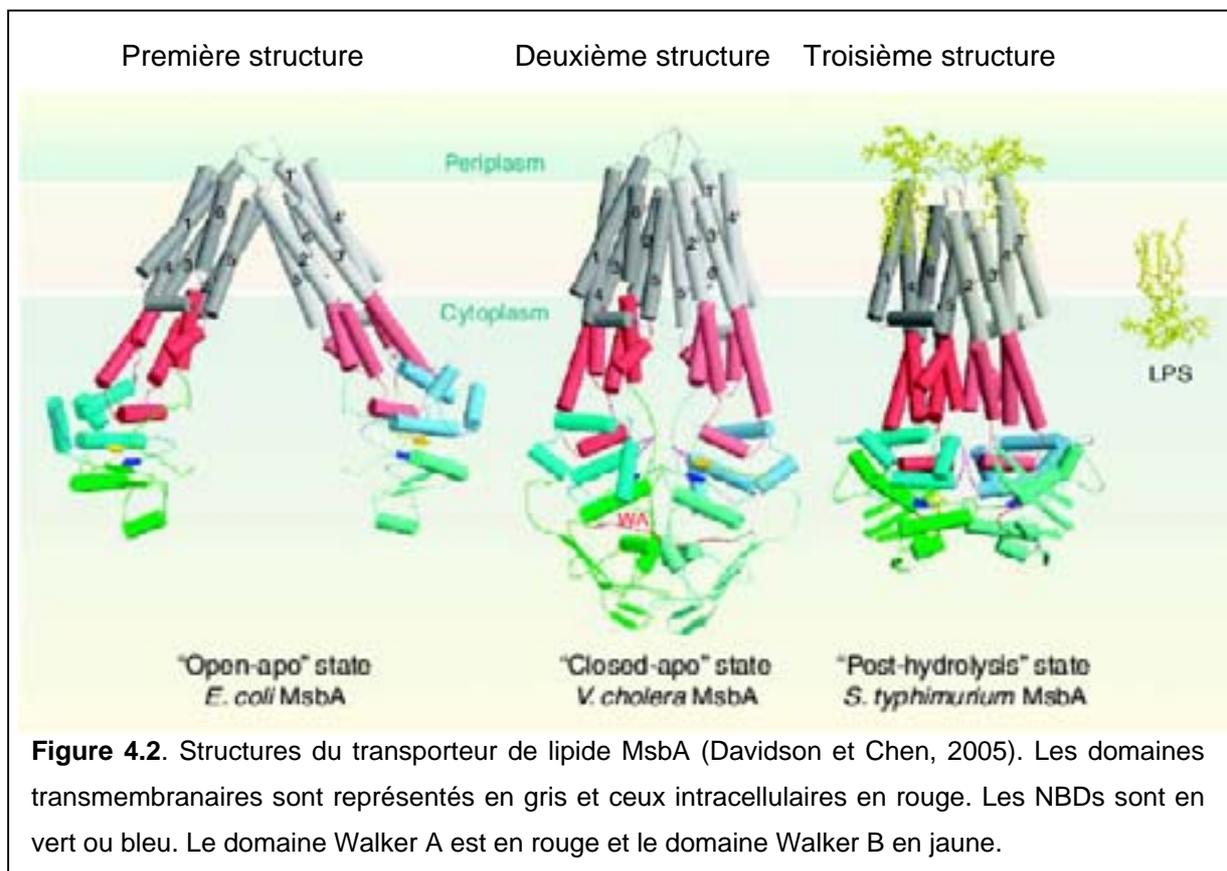


D'une façon générale, la connaissance d'une structure détaillée et l'identification de domaines impliqués dans la reconnaissance du substrat, est importante pour tenter de comprendre les mécanismes de transport des différentes protéines ABC. Malheureusement, encore peu de données sont disponibles dans la littérature, en particulier concernant les transporteurs ABC des mammifères. Ce manque de données est dû essentiellement à la

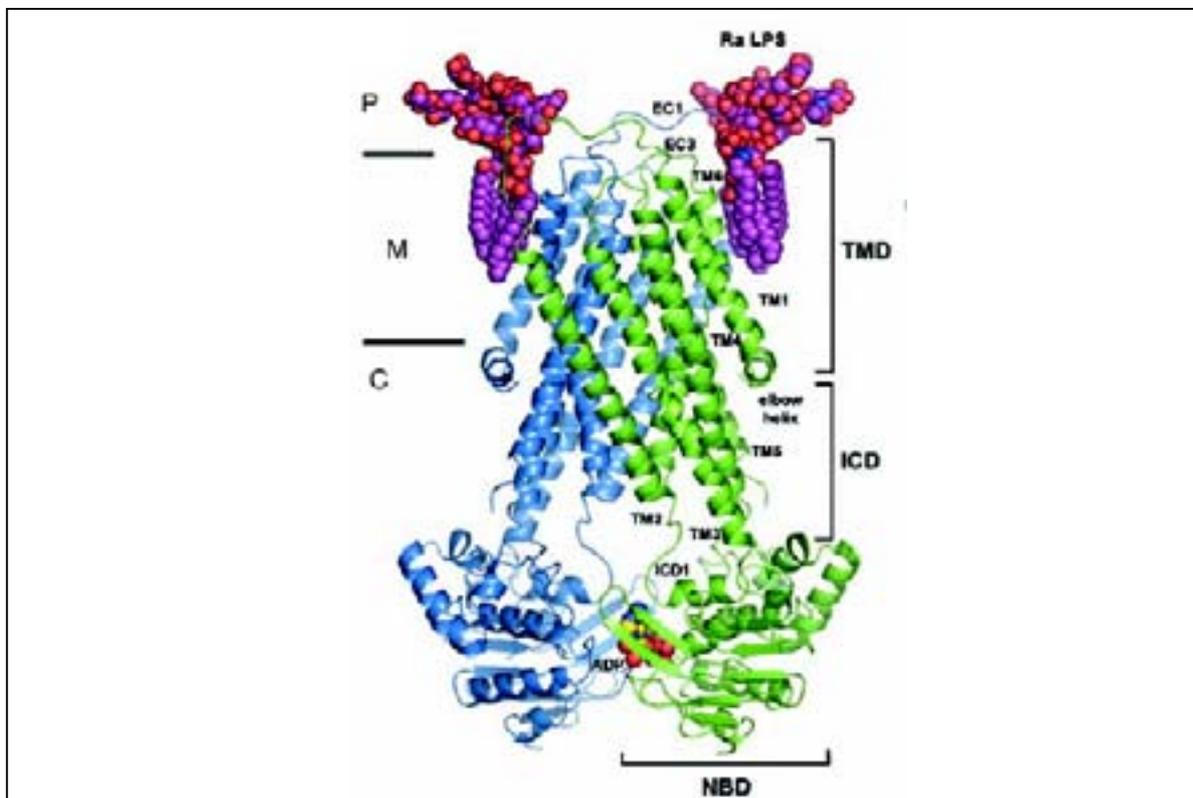
difficulté de cristalliser ces protéines. En effet, les clichés de diffraction des rayons X nécessitent un cristal de qualité pour obtenir une résolution suffisante et déduire une structure tridimensionnelle détaillée du transporteur.

En l'absence de structure cristallographique, des modélisations par homologie de séquence peuvent être réalisées pour certaines protéines, à condition bien sûr de disposer de données cristallographiques d'une protéine ABC voisine. Comme nous allons le voir, le transporteur de lipides MsbA joue ce rôle de modèle pour plusieurs calculs par homologues de séquence, en particulier pour la P-gp. En effet les seules structures cristallographiques haute résolution de protéine ABC obtenues jusqu'à présent sont celles de MsbA de trois espèces bactériennes différentes, *E. coli* (Chang et Roth, 2001), *Vibrio cholera* (Chang, 2003), *Salmonella typhimurium* (Reyes et Chang, 2005), et du transporteur de la vitamine B12 d'*E. coli* (BtuCD) (Locher *et al.*, 2002 ; Oloo et Tieleman, 2004).

L'analyse de la structure de MsbA a mis en évidence les deux domaines d'une protéine ABC bactérienne et a confirmé la conformation en hélices alpha des domaines transmembranaires. Notons que MsbA est en fait un « demi transporteur » possédant un seul NBD et un seul TMD. Sa structure cristallographique révèle que le transporteur complet est un homodimère. Les trois structures de MsbA obtenues montrent des conformations de l'homodimère différentes (Figure 4.2).



La première obtenue à partir de MsbA d'*E. coli* (Chang et Roth, 2001) correspond à une conformation ouverte dans laquelle les extrémités extracellulaires des TMDs sont en interaction formant une molécule en V inversé et dans laquelle les NBDs sont éloignés. La deuxième, obtenue à partir de MsbA de *V. cholera* (Chang, 2003), est une structure fermée dans laquelle les TMDs et les NBDs sont fortement resserrés. Ces deux premières structures ont été obtenues en absence de nucléotide et sont critiquées pour leur caractère non physiologique dû à un positionnement des NBDs apparemment non compatibles avec des résultats biochimiques. Dans la troisième structure, obtenue à partir de MsbA de *S. typhimurium*, les NBDs apparaissent repliés face à face dans un positionnement plus compatible avec des données biochimiques (Reyes et Chang, 2005). Cette dernière est détaillée dans la figure 4.3.



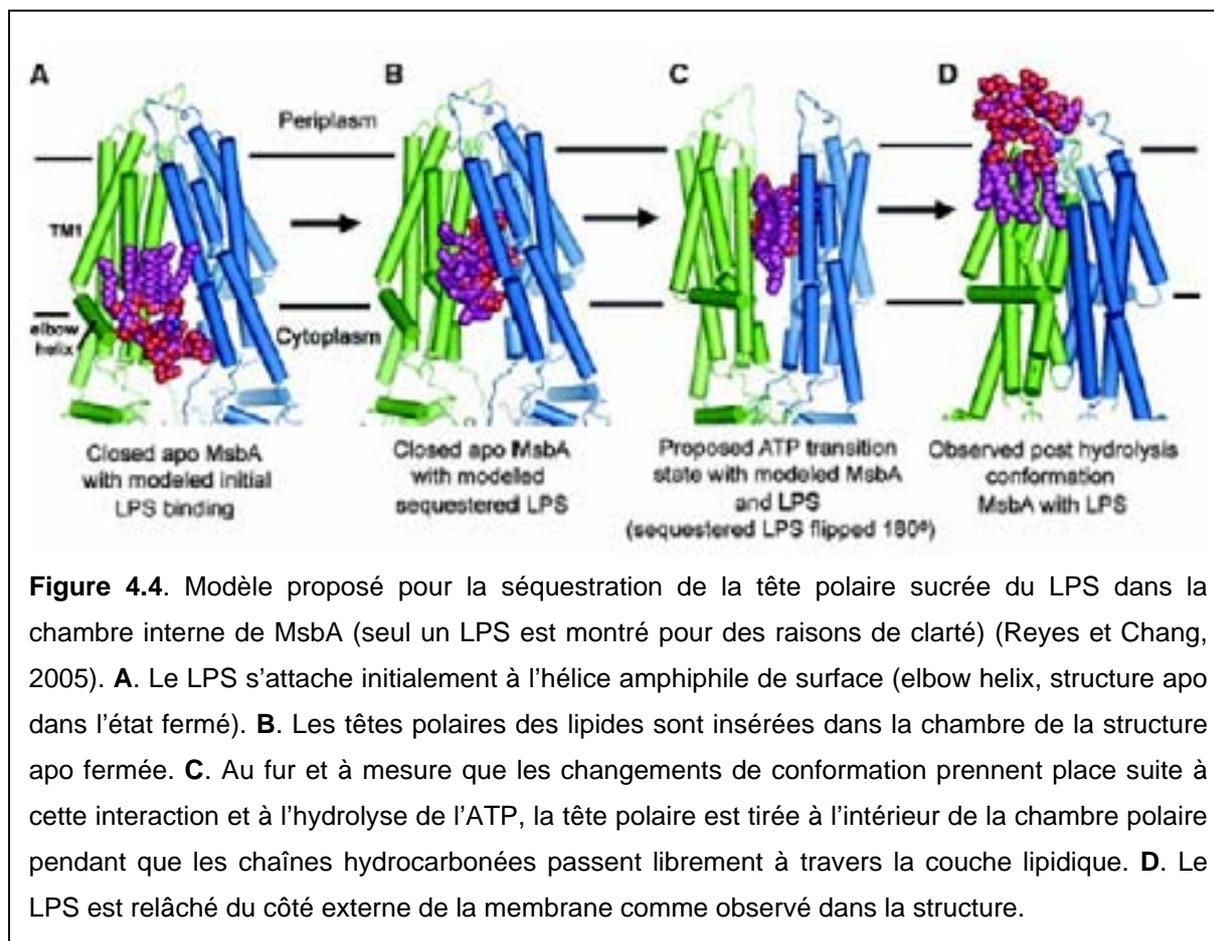
**Figure 4.3.** Structure du transporteur de lipide MsbA de *Salmonella typhimurium* avec complexe magnésium, adénosine triphosphate, vanadate inorganique et lipopolysaccharide (Reyes et Chang, 2005). L'homodimère MsbA est représenté dans un plan perpendiculaire à la bicouche lipidique. Le bleu et le vert permettent de distinguer les deux monomères. Les hélices transmembranaires (TMDs) traversent la bicouche lipidique (M) et se prolongent dans le cytoplasme (ICD intracellular domain). Les NBDs forment une interface dans le cytoplasme (C). Deux molécules de LPS (carbone en violet, oxygène en rouge, et azote en bleu) sont liées côté périplasmique (P) des TMDs. Une seule molécule d'ADP (carbone en jaune, oxygène en rouge, azote en bleu, et phosphate en violet) est séquestrée dans le site actif d'un NBD. Des boucles extracellulaires relient les hélices.

Concernant les autres transporteurs ABC, une structure tridimensionnelle de la P-gp a été obtenue par microscopie électronique mais à très basse résolution (25Å) (Rosenberg *et al.*, 1997 ; Rosenberg *et al.*, 2001). Récemment, deux autres structures de la Pgp ont été proposées en utilisant la modélisation par homologie de séquence avec la protéine MsbA de *V. cholera* (Stenham *et al.*, 2003 ; Pleban *et al.*, 2005). La P-gp est un dimère constitutif de 170 kDa et chaque « demie P-gp » est alors comparée au monomère MsbA. Une démarche semblable a été développée pour un autre transporteur ABC dont nous parlerons plus loin, la protéine LmrA, dont la structure est proche de celle de MsbA (Ecker *et al.*, 2004). La comparaison a également été effectuée avec la deuxième structure obtenue pour MsbA (Pleban *et al.*, 2004).

## 2- MÉCANISMES DE TRANSPORT PROPOSÉS

### 2.1- Les différents modèles

La connaissance de la structure d'une protéine peut donc permettre de proposer un modèle de fonctionnement. C'est ce qui a été fait pour le transporteur de lipides MsbA (Figure 4.4).



Cependant, il n'est absolument pas sûr que ce modèle obtenu pour le MsbA puisse être transposé aux autres transporteurs ABC et ainsi, d'une façon générale le (ou les mécanismes) par lesquels les transporteurs ABC font passer un substrat à travers la membrane n'est pas clair et de nombreuses questions subsistent.

Une première question est comment la liaison et l'hydrolyse de l'ATP par les NBDs peut-elle être couplée aux changements de conformation qui permettent le transport des substrats par les TMDs ? Tous les modèles proposés mettent en avant le rôle de l'ATP et des NBDs dans le transport de composés hors de la cellule, certains suggèrent un mécanisme alterné concernant successivement les deux NBDs (« two-cylinder engine model »), alors que d'autres sont basés sur un fonctionnement simultané d'un « dimère » NBDs (« ATP-switch model »).

La deuxième importante question concerne la nature de la voie transmembranaire, des sites de liaison du substrat et les changements de conformation induits pendant le cycle de transport. En particulier comment un transporteur fait-il passer un substrat hydrophile comme les sucres ou les ions inorganiques : cela suppose en effet que le soluté puisse traverser la membrane lipidique *via* une chambre aqueuse. Dans le cas de LmrA et hMDR1, il a été montré par des études biochimiques que le soluté passait directement de la face interne de la membrane lipidique à la phase aqueuse, suggérant une ouverture vers le milieu extracellulaire (Bolhuis *et al.*, 1996 ; Loo *et al.*, 2004).

Plusieurs modèles ont été proposés dont le « two-cylinder engine model » et « l'ATP switch model ».

- **Modèle de transport alterné « two-cylinder engine model » (van Veen *et al.*, 2000) (van Veen *et al.*, 2001)**

Des études sur des transporteurs bactériens ont montré que les NBDs lient et hydrolysent l'ATP et que cette hydrolyse est indispensable au transport (Hobson *et al.*, 1984 ; Higgins *et al.*, 1985 ; Bishop *et al.*, 1989 ; Mimmack *et al.*, 1989). Le modèle alterné est proposé pour expliquer le transport de substrats par un homologue bactérien de la P-gp, LmrA.

Deux sites de liaison au substrat sont considérés, l'un de haute affinité côté intracellulaire et l'autre de faible affinité orienté du côté extracellulaire. Dans le modèle à deux cylindres, ces deux sites alternent en position et en affinité («two-cylinder engine» mechanism). Le cycle de transport est initié par l'interaction d'un substrat avec le domaine transmembranaire côté cytoplasme. Le site de liaison du substrat, qui présente alors une forte affinité pour celui-ci, est alors réorienté pour être exposé au milieu extracellulaire. Ce changement de conformation a pour conséquence une diminution de l'affinité pour le substrat et une libération immédiate de celui-ci. Le transporteur reprend ensuite sa conformation initiale : le

site de liaison du substrat se retrouve du côté cytoplasmique et présente à nouveau une forte affinité pour le substrat.

Ce type de modèle considère donc que l'hydrolyse de l'ATP est le moteur du transport et que les deux NBDs opèrent alternativement et peuvent donc être liés à des étapes différentes du cycle de transport. Cependant des données biochimiques suggèrent que la liaison de l'ATP, plutôt que son hydrolyse peut être la clef du transport (Higgins et Linton, 2004). D'autre part dans certains transporteurs, en particulier la P-gp, les deux NBDs ne sont pas équivalents pour lier et hydrolyser l'ATP. De plus, des données cristallographiques concernant spécifiquement les NBDs montrent que les deux "ATP-binding pockets" sont localisés sur un dimère NBD (van Veen *et al.*, 2000 ; Sauna et Ambudkar, 2001). Le concept d'une **dimérisation** des NBDs pourrait être la clef de la compréhension du transport des ABC. Ceci implique donc probablement que ces deux NBDs agissent simultanément plutôt qu'à des étapes différentes du cycle de transport.

▪ **Le deuxième modèle proposé : ATP-switch model (Higgins et Linton, 2004)**

Dans ce modèle, la liaison de l'ATP et l'hydrolyse de l'ATP induisent respectivement la formation et la dissociation d'un dimère NBD. Ceci induit un basculement régulier des conformations des TMDs qui génèrent le transport.

Le mécanisme proposé comporte quatre étapes :

- 1- La liaison du substrat aux TMDs démarre le cycle de transport en facilitant la formation d'un dimère dépendant de l'ATP
- 2- La liaison de l'ATP induit la formation d'un dimère
- 3- L'ATP est hydrolysé
- 4- Rejet de Pi et d'ADP

Malgré les similitudes de séquence entre les transporteurs, rien ne garantit que les chemins empruntés par les substrats soient les mêmes d'un transporteur à l'autre et donc que les mécanismes de transport soient identiques. A l'heure actuelle, et malgré les nombreux mécanismes proposés, le «chemin» qu'un substrat emprunte est encore loin d'être élucidé.

## **2.2- Enjeu de la compréhension du mécanisme de transport de la P-gp**

La compréhension du mécanisme de transport a une importance toute particulière dans le cas des protéines de type MDR. En effet, la surexpression de la P-gp étant une cause majeure de l'échec de traitements anticancéreux, la limitation du transport de composés cytotoxiques hors des cellules tumorales par la P-gp est un point essentiel. Les premières stratégies développées ont été la recherche de substrats de la P-gp qui pouvaient entrer en

compétition avec l'agent cytotoxique. Un de ces inhibiteurs compétitifs est le vérapamil. Il empêche le transport d'autres substrats car il est très lipophile : une fois expulsé hors de la cellule, il diffuse à nouveau dans la membrane avant d'être de nouveau expulsé et ainsi de suite. Il bloque également les canaux calciques et son utilisation sur des patients a été abandonnée car cela provoquait des problèmes cardiovasculaires graves. Au niveau médical, les espoirs se sont tournés vers des inhibiteurs non compétitifs qui provoquent des changements de conformation de la P-gp empêchant le transport des agents cytotoxiques hors de la cellule (Thomas et Coley, 2003). L'élaboration d'un inhibiteur puissant et hautement spécifique de la P-gp repose ainsi sur la compréhension du mécanisme de transport et sur la structure du transporteur.

### **3- LES PROTÉINES DE TYPE MDR EN TOXICOLOGIE**

Depuis sa découverte par Juliano et Ling (1976), la P-gp (protéine hMDR1) a largement été étudiée dans le cadre du cancer ; cependant les substrats connus de la P-gp ne se limitent pas aux médicaments anticancéreux (Gottesman et Pastan, 1998) et incluent des régulateurs endogènes tels que les glucocorticoïdes (Udea *et al.*, 1992), et des contaminants de l'environnement tels que les pesticides (Bain et LeBlanc, 1996).

Il faut également souligner que la P-gp n'est pas uniquement localisée dans les cellules tumorales mais qu'elle est aussi présente dans la membrane plasmique du côté apical ou du côté lumen des cellules épithéliales polarisées (ex : cellules intestinales, cellules du tubule proximal dans le rein, hépatocytes côté lumière du canalicule biliaire) et au niveau des barrières pharmacologiques (ex : barrière hémato-encéphalique, barrière hémato-testiculaire) (Fojo *et al.*, 1987 ; Thiebaut *et al.*, 1987 ; Fromm, 2002).

L'expression du gène *hMDR1* peut être induite par une exposition à des composés d'origine naturelle ou anthropique (Chin *et al.*, 1990 ; Fardel *et al.*, 1996). Ceci, en plus de sa localisation stratégique et de sa capacité à pomper un grand nombre de métabolites et de composés exogènes potentiellement toxiques, suggère que la P-gp peut avoir un rôle physiologique de protection des cellules.

D'autres protéines, homologues de la P-gp ont été identifiées dans de nombreux organismes allant des procaryotes aux eucaryotes. On les notera par la suite protéines de type MDR.

Ces protéines de type MDR ont été détectées en particulier dans les organismes aquatiques (Bard, 2000) tels qu'éponges (Kurelec *et al.*, 1992), huîtres (Minier *et al.*, 1993 ; Keppler et Ringwood, 2001), et poissons (Bard *et al.*, 2002 ; Tutundjian *et al.*, 2002). La possibilité qu'une protéine de type MDR puisse être impliquée dans l'apparition d'un phénotype MXR

(multixenobiotic resistance) chez des organismes aquatiques vivant près de sites pollués a été pour la première fois proposée par Kurelec et Pivcevic (1991). Des travaux sur des modèles invertébrés, comme les moules, les éponges, et les vers, ont montré l'implication de protéines de type MDR dans l'efflux de polluants d'origine anthropique (Minier et Moore, 1996) ou naturelle (Eufemia *et al.*, 2000).

Une seule étude porte sur le cadmium (Eufemia et Epel, 2000). Ces auteurs ont montré une augmentation de la quantité de protéine de type MDR chez la moule *Mytilus californianus* après une exposition aiguë de 100 à 500  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de chlorure de cadmium pendant 2 jours. Cette dose est très largement supérieure à la concentration que l'on peut rencontrer sur le terrain dans une eau contaminée par le cadmium (Chapitre 1, § II.3.1). De ce fait, ces conditions ne sont pas adaptées pour une étude de toxicologie environnementale. En effet, même si l'induction de protéines de type MDR est une stratégie possible de résistance aux métaux, cette augmentation peut être un artefact lié aux conditions de contamination et ne refléter en rien la réponse physiologique au stress métallique rencontré dans l'environnement naturel. C'est cette interrogation qui a motivé le début de notre étude.



## II- RÉSULTATS

### 1- PREMIÈRE PARTIE : INDUCTION D'UNE PROTÉINE DE TYPE MDR CHEZ *C. FLUMINEA* APRÈS EXPOSITION AUX MÉTAUX

L'objectif du premier article de ce chapitre (Article 4-1) est d'étudier chez *C. fluminea* la possible induction d'une protéine de type MDR après une contamination par le cadmium représentative des conditions du terrain.

Pour cela, des bivalves d'eau douce *C. fluminea* ont été transplantés au niveau de plusieurs stations d'études situées dans le bassin hydrologique du Lot (Figure 1, Article 4-1) plus ou moins polluées par du cadmium et du zinc (Tableau 1, Article 4-1). Après plusieurs mois de contamination, la quantité de protéine de type MDR dans leurs branchies a été analysée par transfert western en utilisant un anticorps monoclonal anti-protéine MDR1 humaine (C219). Cet anticorps reconnaît une séquence protéique près du domaine de liaison de l'ATP qui est hautement conservée et commune à toutes les isoformes de séquence connues de la P-gp (Kartner *et al.*, 1985 ; Georges *et al.*, 1990).

Dans une deuxième étape, afin de limiter les paramètres incontrôlables rencontrés sur le terrain, des contaminations métalliques ont été effectuées en laboratoire de différentes durées et avec différentes concentrations de cadmium.

Cette étude a été étendue à une contamination de *C. fluminea* par d'autres métaux tels que le zinc, le mercure, et le cuivre.





ELSEVIER

Aquatic Toxicology 67 (2004) 347–357

**AQUATIC  
TOXICOLOGY**

www.elsevier.com/locate/aquatox

## Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure

M. Achard, M. Baudrimont, A. Boudou, J.P. Bourdineaud\*

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

Received 26 October 2003; received in revised form 5 January 2004; accepted 27 January 2004

### Abstract

Multixenobiotic resistance mechanisms (MXR) related to the mammalian P-glycoprotein multidrug transporter protein (P-gp) are known to occur in several marine invertebrates. In the present work, we report on the induction of an MXR protein by various heavy metals in the gills of the freshwater clam *Corbicula fluminea*. The evaluation of the MXR protein level was assessed by Western blot using a specific monoclonal antibody raised against the human P-gp (C219). A field transplantation experiment, where clams were caged in a gradient relative to an industrial site, demonstrated a positive relationship between MXR levels and (a) metal pollution (Cd and Zn) in the environment and (b) metal bioaccumulation in the gills. To establish this correlative relationship, clams were exposed to different levels of cadmium ( $15\text{--}60\ \mu\text{g l}^{-1}$ ) for up to 15 days in a controlled laboratory experiment. MXR protein levels increased in time for all treatments (including the control). However, the highest levels of MXR protein titer were expressed in clams that had been exposed to the lowest dose of cadmium. The causes for this observed inverse relationship between the exposure dose and the MXR induction is discussed. MXR protein titer was also shown to be induced by other heavy metals (zinc, inorganic mercury, and copper).  
© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** MXR; P-glycoprotein; *Corbicula fluminea*; Cadmium; Heavy metals

### 1. Introduction

Exposure to drugs or pollutants frequently results in the acquisition of resistance mechanisms. Many aquatic species are able to survive in environments which contain high levels of multiple anthropogenic pollutants or natural product toxins and their resistance

to pollution may be due, at least in part, to the function of their membrane glycoprotein extrusion pumps. The mechanism of this 'multixenobiotic resistance' (MXR) (Kurelec and Pivcevic, 1989) is similar to the mechanism involved in multidrug resistance (MDR) found in tumor cells (Juliano and Ling, 1976) and associated with P-glycoprotein (P-gp). P-gp acts as an energy-dependent pump to translocate a wide variety of structurally and functionally diverse compounds.

P-gp-like proteins have been described as first lines of defense against toxins (Epel, 1998) and detected in a variety of aquatic organisms including sponges,

\* Corresponding author. Tel.: +33-556-22-39-26;  
fax: +33-556-54-93-83.  
E-mail address: jp.bourdineaud@epoc.u-bordeaux1.fr  
(J.P. Bourdineaud).

mussels, oysters, clams, worms, and fish (Bard, 2000). Elements attesting the presence of MXR have been found in marine mollusc species (*Mytilus galloprovincialis*, Kurelec and Pivcevic, 1991; *Mytilus edulis*, *Crassostrea gigas*, Minier et al., 1993) as well as in freshwater mollusc organisms (*Corbicula fluminea*, Waldmann et al., 1995; *Dreissena polymorpha*, Smital and Kurelec, 1997). MXR activity in molluscs has been measured via capacity to decrease accumulation of rhodamine or vincristine from gill cells. In this type of assay, the competitive inhibition of rhodamine or vincristine efflux by the addition of verapamil, a well-known P-gp inhibitor, is considered to be indicative of P-gp activity. For example, tissues from molluscs exposed to river sediments or to water polluted with organic compounds accumulated significantly less rhodamine or vincristine than tissues from unexposed molluscs (Kurelec et al., 1996; Minier and Moore, 1996a). MXR in bivalves has been shown to confer effective protection against deleterious effects caused by the exposure to various organic toxic compounds (Waldmann et al., 1995; McFadzen et al., 2000).

Besides these competitive transport assays, direct detection of proteins which are immunologically related to the mammalian P-glycoproteins has been performed by Western blotting in several molluscs: in the clam *C. fluminea* (Waldmann et al., 1995); in the gills of oysters *Crassostrea virginica* and *C. gigas* (Minier et al., 1993; Keppler, 1997) and in the gills of *Mytilus californianus*, *M. galloprovincialis*, and *M. edulis* mussels (Cornwall et al., 1995; Galgani et al., 1995; Minier and Moore, 1996a,b). Moreover, elevated MXR level in marine mussels exposed to pesticides was detected by Western blotting with a P-gp specific monoclonal antibody (Eufemia and Epel, 1998, 2000).

All these studies showed that the P-gp induction occurs in response to a variety of organic pollutants. However, only one example reported an increase in P-gp level in *M. californianus* after acute exposure to very high metal concentrations (sodium arsenite and cadmium chloride) (Eufemia and Epel, 2000). To our knowledge, this is the first demonstration of a relationship in invertebrates between multixenobiotic resistance mechanisms and metal pollution.

Some heavy metals, such as cobalt, copper, iron, nickel or zinc are required nutrients which are essen-

tial for life. Others, such as cadmium and mercury, have no biological role and are not essential. Essential or not, all forms of heavy metals are toxic at high concentrations and their intracellular levels have to be tightly controlled. To achieve this aim, an organism may develop several, probably coexisting, metal resistance mechanisms. First, a metal ion can be segregated by thiol-containing molecules as for example metallothioneins (MTs) (Roesijadi, 1996). Second, an active transport out of the cell via a membrane protein which includes the P-gp, may occur. Among the aquatic organisms, bivalve molluscs which filter large amounts of water are particularly exposed to environmental contaminants and thus need to develop several defense mechanisms. Numerous studies have focused on freshwater bivalves such as *C. fluminea* which are able to bioaccumulate contaminants (Inza et al., 1997; Narbonne et al., 1999) and heavy metals in particular. Metallothioneins are involved in the detoxification process of toxic metals like cadmium or mercury (Hamer, 1986) and play a predominant role in Cd depuration (Baudrimont et al., 2003). In addition to metallothioneins, the clam *C. fluminea* is provided with a P-gp-like protein (Waldmann et al., 1995). Nevertheless, no study concerning the possible induction of P-gp activity in response to metallic stress has been reported so far in this species.

What could be the mechanistic action behind the increased levels of MXR proteins in response to metallic stress? Maybe a cadmium efflux catalysis. It is commonly accepted that P-gp is a transmembrane ATPase pumping cytotoxic endogenous and xenobiotic organic compounds out of the cells. However, divalent metals are excluded from the set of known substrates of P-gp. Do we therefore have any reason to think that mollusc P-gp is involved in resistance to Cd toxicity through cadmium efflux catalysis? The answer is yes.

- (a) The induction of the human *MDR1* gene was observed in human cells exposed to sodium arsenite or cadmium chloride and these exposures led to an eight-fold increase in *MDR1* mRNA levels, and a cadmium responsive element was found in the *MDR1* gene promoter region (Chin et al., 1990). Presently, no sequence information is available for *C. fluminea*, so it is not known whether metal responsive elements are associated with MXR gene induction.

- (b) P-gp belongs to the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily that also contains the multidrug resistance-associated protein (MRP1), another molecular device involved in the resistance of tumor cells to chemotherapy, the *Leishmania* LtpgpA transporter and the yeast cadmium resistance factor 1 (Ycf1). These last three proteins, which are genuine xenobiotic pumps, are also involved in heavy metal detoxification. LtpgpA pumps out arsenite and antimony (Dey et al., 1996). The Ycf1 transporter catalyzes the pumping of bis(glutathionato)cadmium (Li et al., 1997) and the human MRP1 protein functionally complements the Ycf1 factor (Tommasini et al., 1996). Also, MRP1 is overexpressed in human heavy metal-selected tumor cells (Vernhet et al., 1999). This means that a xenobiotic pump can also be a metal pump, provided that the metal ion forms a complex with glutathion.
- (c) It is already known that P-gp is not only a xenobiotic pump and that it can have unusual roles, it is also a lipid translocase (van Helvoort et al., 1996), and a chloride channel (Valverde et al., 1992).
- (d) It has been shown that rat *MDR1* gene overexpression protects the kidney cells against cadmium-mediated apoptosis. The authors proposed a mechanism according to which cadmium detoxification occurs through the released Cd-ATP complex by virtue of the nucleotide channel activity of P-gp (Thévenod et al., 2000).

The aim of the present work is to detect and quantify MXR levels and heavy metal concentrations (cadmium, zinc, copper, and inorganic mercury) in gills of *C. fluminea* during exposure to metals in the field and in the laboratory. This was done in order to establish if a dose-dependent relationship between MXR expression and metallic stress existed in this organism.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Cadmium chloride, copper chloride, mercury chloride, and zinc chloride were purchased from Merck. The MDR1-specific C219 mouse monoclonal antibody was purchased from Signet Laboratories (local

supplier: Coger, Paris, France) and the goat anti-mouse peroxidase-conjugated secondary antibody was purchased from Jackson ImmunoResearch (local supplier: Perbio Science, Brebières, France).

### 2.2. Animals

Adult bivalves (*C. fluminea*) were collected from a reference site on Cazaux-Sanguinet freshwater lake (Aquitaine region, France). The clams were calibrated and the average shell length was  $2 \pm 0.2$  cm. This benthic species lives buried within the superficial sediment layers, filtering large volumes of water via the current through the inhalant and exhalant siphons, for respiratory and nutritive purposes (Tran et al., 2001).

### 2.3. Field polymetallic exposure of transplanted animals

The P-gp level was studied in *C. fluminea* under two conditions of metallic exposure: field transplantations and controlled laboratory experiments.

The in situ contaminations of the molluscs were based on a caging procedure on the river Lot and its small tributary (Riou-Mort). Three stations were selected along a polymetallic pollution gradient (Andrès et al., 1999) originating from an old factory which has produced Zn for over a century (Fig. 1). Clams were transplanted into the three field sites according to a protocol already described (Andrès et al., 1999) for a period of 2 months (February–April 2002). Site 1, located upstream on the Riou-Mort, above the confluence with the Riou-Viou, was selected as the reference site because of the relatively low metal concentrations in the water column and sediment compartments. Site 2 was located downstream on the Riou-Mort, just before its confluence with the river Lot. It is through this stream that the majority of metal inputs arrive from the Vieille Montagne industrial site. The Bouillac station (site 3) is located on the left bank of the river Lot, about 300 m downstream from the confluence with the Riou-Mort. As can be seen in Table 1, analysis of the water showed that Cd and Zn concentrations differed among the three sites due to the pollution source (Table 1). In the Bouillac station, contamination conditions were less severe (approximately 15 times lower) than in the Riou-Mort downstream site due to dilution by the Lot stream.

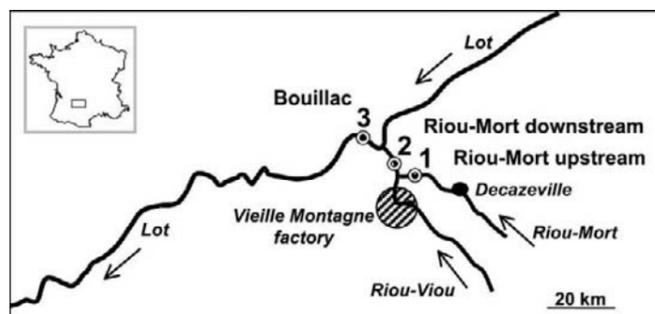


Fig. 1. Location of the sampling sites in the river Lot basin, near Decazeville (the Midi-Pyrénées region, France). See the map of France in the upper left corner of the figure for the location of the Decazeville region which is enlarged in the figure. Metallic pollution originates from the Vieille Montagne factory (zinc ore treatment). The numbered sites, where cages containing the animals were deposited, are described in the text.

#### 2.4. Laboratory exposure

##### 2.4.1. Experimental designs

Two laboratory experiments were carried out using experimental units (EUs), based on glass tanks lined with plastic bags (Plastiluz, alimentary standard), containing 3 kg of pure sand (3 cm deep), and 10 l of dechlorinated and aerated tap water. Pure sand (98% silica—granulometry: 0.8–1.4 mm, SILAQ, France) was selected rather than natural sediment in order to minimize the possibility of an indirect contamination source. The water column was permanently aerated by a diffuser connected to an air pump (Rena 301), and placed in the upper layers of the EUs: the dissolved oxygen concentration was maintained close to the saturation rate during the whole experiment (Oxymeter Mettler Toledo, MO128). Temperature was fixed at  $20 \pm 0.2$  °C in experiment 1 and at  $15 \pm 0.2$  °C in experiment 2. These temperature regimes corresponded

Table 1  
Analysis of dissolved metals (<0.45 mm) in the water sampled at three different sites

Site	Cadmium ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Zinc ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )
1. Riou-Mort upstream	<d.l.	<d.l.
2. Riou-Mort downstream	15 (2–28)	900 (200–2200)
3. Bouillac	1 (0.05–2.60)	60 (6–210)

Concentrations are expressed in micrograms per liter; d.l.: detection limit. These data correspond to the means of cadmium and zinc concentrations measured daily during the exposure duration (February–April 2002). Minimum and maximum values are indicated in parenthesis.

to that of the Cazaux-Sanguinet lake at the time of animal retrieval. The photoperiod was fixed at 12 h light per day. The pH was not regulated but periodic measurements in the EUs (pH-meter Mettler Toledo, MP1 20) revealed very small variations during the experiment ( $8.4 \pm 0.2$ ).

**2.4.1.1. Experiment 1.** Field sampling of uncontaminated bivalves was done in September 2002. 180 individuals were selected and 15 from this group were randomly allocated to each EU. A period of 2 weeks then followed before the beginning of the contamination phase to ensure that the organisms were fully acclimatized to the experimental conditions. During both acclimatization and exposure periods, the bivalves were fed with green algae (*Scenedesmus subspicatus*) added twice a week from dense cultures at the rate of 5  $\mu\text{g}$  of chlorophyll a per EU. Algae conditions were determined via optical density measurements in the culture medium at 750 nm (Spectrophotometer Safas Monaco), 0.01 optical density unit corresponding to 18.4  $\text{ng ml}^{-1}$  of chlorophyll a and around  $10^5$  cells  $\text{ml}^{-1}$ .

**2.4.1.2. Experiment 2.** Slightly different conditions were used in order to make a comparative study of four metals, during a 3-day exposure period: inorganic mercury, zinc, copper, and cadmium. Field sampling was done in June 2003 and bivalves (nine individuals per EU) were fed only during the acclimatization period (10 days) but not dur-

ing the experiment. In addition, the bivalves were collected from a site in l'Isle river (Dordogne department, France) instead of from the Cazaux-Sanguinet lake.

#### 2.4.2. Toxicant exposures

**2.4.2.1. Experiment 1.** Groups of 15 bivalves were exposed to three concentrations of CdCl<sub>2</sub> in the water: 15, 30, and 60 µg l<sup>-1</sup>. The lowest concentration corresponded to the cadmium levels which were detected in the field during the transplantation phase. Three exposure durations were studied: 3, 8, and 15 days. Controls were run for each exposure time. Two replicates were set up for each condition (24 EUs). Constant contamination conditions were maintained throughout the whole exposure periods. The procedure adopted was based on daily additions of aqueous metal solution, adjusted according to the decrease in Cd concentration in each EU, as determined from metal concentrations measured on water samples collected at the end of the 24 h cycles. Metal additions were made from a CdCl<sub>2</sub> stock solution containing 100 mg Cd l<sup>-1</sup>. At the end of each exposure duration, the 15 bivalves from each EU were collected, dried on absorbent paper sheets, and sealed in polyethylene bags. The organisms were then stored at -80 °C. Among the different tissues, the gills were chosen for this study since they have characteristically high cadmium concentration after exposure via the water (Inza et al., 1997).

**2.4.2.2. Experiment 2.** In this experiment, groups of bivalves (nine individuals per group), were exposed for 3 days to ZnCl<sub>2</sub> (500 µg Zn l<sup>-1</sup>, corresponding to zinc levels found during the field transplantation phase), CuCl<sub>2</sub> (40 µg Cu l<sup>-1</sup>), HgCl<sub>2</sub> (5 µg Hg l<sup>-1</sup>) and CdCl<sub>2</sub> (30 µg Cd l<sup>-1</sup>). Hg concentration was chosen in order to obtain an equivalent bioconcentration factor (BCF) in the organisms as Cd (Baudrimont et al., 1997a). For Cu, the exposure pressure was determined more arbitrarily due to the lack of relevant data concerning its toxicity towards *C. fluminea*. After verification of the nominal concentrations by metal analysis in the water column at time zero, the contaminated water was changed daily in order to maintain the contamination pressure throughout 3 days of the experiment.

#### 2.5. Cadmium, copper, zinc, and inorganic mercury determination

Gills of one *C. fluminea* from each replicate of each condition were dissected, dried on absorbent paper and weighed (fresh weight (fw)). Tissue samples were then analyzed for metal bioaccumulation. They were first digested by nitric acid (3 ml of pure HNO<sub>3</sub>) in a pressurized medium (borosilicate glass tubes) at 100 °C for 3 h. After dilution of the digestates to 20 ml with ultrapure water (MilliQ plus), cadmium concentrations were measured by atomic absorption spectrophotometry with Zeeman correction, using a graphite tube atomizer (AAS, Thermoptec M6Solaar). The detection limit was 0.1 µg Cd l<sup>-1</sup> (3 × S.D. of the reagent blanks). Copper and zinc concentrations were determined by flame AAS (Varian SpectrAA 220 FS). The detection limits were 5 µg Zn l<sup>-1</sup> and 20 µg Cu l<sup>-1</sup>.

Total Hg determination was carried out by flameless atomic absorption spectrometry directly on gill samples (Leco Ama 254). The detection limit was 0.01 ng Hg.

The validity of the analytical method was checked periodically by means of two biological reference materials (Tort-2: lobster hepatopancreas; Dolt-2: dogfish liver—NRC-CNRC, Ottawa, Canada) (Andrès et al., 1999).

#### 2.6. Western blotting for MXR

To prepare tissues for Western blotting, clams were dissected on ice, gill tissues from nine animals within an exposure group were pooled and 400–600 mg of tissue were homogenized with an Ultra-Turrax tissue homogenizer in 1 ml of fresh lysis buffer (10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, and 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)). Sodium dodecyl sulfate (SDS) (2% final concentration) was added, samples were sonicated in a water bath for 10 min and then centrifuged for 10 min at 1000 × g. Supernatants were kept at -20 °C. Protein concentration was determined with the bicinchoninic acid (BCA) assay (Pierce, BCA Protein Assay kit). Thirty micrograms of protein from each protein extract were resolved on 7.5% polyacrylamide gels and transferred to Immun-blot PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (Bio-Rad) with a semi-dry transfer cell (Bio-Rad) according to the

manufacturer's instructions. Immunolabeling was performed using the P-glycoprotein specific monoclonal antibody C219 (1:500) (which recognizes a highly conserved amino acid sequence common to all MDR protein; Endicott and Ling, 1989) and goat anti-mouse peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10 000). Bands were detected by chemiluminescence (ECL) according to the Amersham protocols. Digitized photos of the gels were used for subsequent image analysis with the Scion Image program (Scion Corporation). A total of five different Western blots were carried out for each analysis.

### 3. Results

#### 3.1. MXR induction in field contamination experiments

During the first experiment, we studied the MXR protein level in field populations of clams exposed to heavy metals in the three stations described in Section 2.3.

Fig. 2 depicts a Western blot, using the C219 monoclonal antibody, of clams' gills after 2 months of in situ exposure. A band at 135 kDa corresponding to MXR, consistently showed the strongest staining in the lanes loaded with protein from bivalves exposed to polluted sites. Semi-quantitative analysis of the bands (corresponding to the integrated intensity determined with the Scion Image program) showed differential protein levels between the three sites: a significant increase in MXR protein was observed in sites 2 and 3 in comparison with the reference site (1) and MXR induction

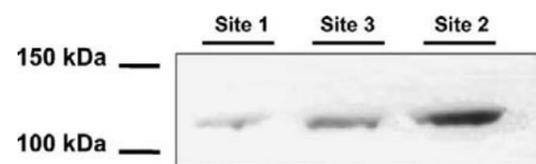


Fig. 2. Semi-quantitative Western blot showing MXR protein levels in *C. fluminea* gills for the three sites under study. A five-fold induction is observed at site 2 (Riou-Mort downstream) by comparison with the reference site (site 1: Riou-Mort upstream). At site 3 (Bouillac station), a two-fold induction is observed, as determined with Scion Image program. This pattern is representative of five different Western blots.

Table 2

Cadmium and zinc concentrations (measured in nanograms or micrograms per gram fresh weight) in the gills of *C. fluminea* after a 2-month transplantation period at the three stations (Riou-Mort upstream, Riou-Mort downstream and Bouillac, see Fig. 1)

Site	Cadmium (ng g <sup>-1</sup> fw)	Zinc (μg g <sup>-1</sup> fw)
1. Riou-Mort upstream	394 (253–536)	34 (34–35)
2. Riou-Mort downstream	4038 (3756–4320)	104 (78–130)
3. Bouillac	990 (971–1010)	62 (62–63)

Means of cadmium and zinc determinations are given. Minimum and maximum values are indicated in parenthesis.

was predominant in the most polluted site (2). Thus, these results reveal a link between MXR protein synthesis and metal pollution levels in the natural sites (Table 1).

Correlatively to this MXR induction, a significant accumulation of cadmium and zinc was observed in the gills of the clams transplanted into the polluted sites (2 and 3) in comparison with clams of reference site 1, and Cd and Zn concentrations are higher for bivalves transplanted into site 2 than into site 3 (Table 2). Thus, these field experiments revealed a relationship between MXR level and metal bioaccumulation for clam populations sampled at different sites. Nevertheless, since many factors are known to affect levels of MXR expression under field conditions, we needed to add consistency to these results by conducting a controlled laboratory exposure experiments to heavy metals, and essentially to cadmium.

#### 3.2. MXR induction in laboratory contamination experiments

##### 3.2.1. Kinetics of MXR induction by cadmium chloride (experiment 1)

*C. fluminea* clams were submitted to controlled exposures to cadmium chloride. Three doses of cadmium were chosen: 15 μg l<sup>-1</sup> (which is similar to the concentration determined in natural site 2), and two higher doses, 30 and 60 μg l<sup>-1</sup>. The higher doses were included since the MXR induction which was detected in the field samples may have resulted from exposure to additional heavy metals or other pollutants. Fig. 3A depicts a Western blot of gill tissues of animals exposed to the three cadmium concentrations for 3, 8 or 15 days. Controls correspond to untreated clams. The

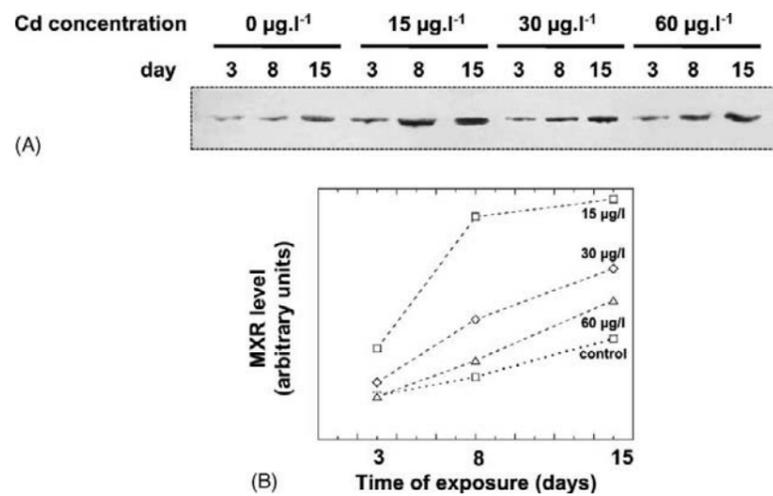


Fig. 3. Western blot showing MXR protein levels in *C. fluminea* gills for three cadmium concentrations (15, 30, and 60 µg.l<sup>-1</sup>) and three exposure durations (3, 8, and 15 days) is shown in panel A. This pattern is representative of five different Western blots. Panel B shows the evolution of MXR protein level in the gills of *C. fluminea* exposed to cadmium chloride vs. the exposure time. MXR protein levels correspond to the integrated band intensities taken from the blot, as determined with Scion Image program (in arbitrary units). This numeric treatment of the blot's band intensities does not pretend to be quantitative but helps the reader to better and more easily see the evolution of MXR protein patterns.

intensity of the bands corresponding to MXR protein detected for exposed clams was always higher than for unexposed animals, for a given time of exposure. Thus an increase in MXR titer resulted from the exposure to cadmium chloride. The Western blot showed an increase in the MXR protein level with contamination duration, whatever the cadmium dose (Fig. 3B). Correlatively, the cadmium concentration in the gill tissues increased significantly ( $P < 0.05$ ) with the exposure duration (Fig. 4).

Nevertheless, two unexpected results were observed:

- first, an increase in time of the intensity of the band for unexposed clams (Fig. 3B) while the cadmium concentration in tissues remained constant (Fig. 4); and
- at a given exposure duration, the highest levels of MXR protein titer were expressed in clams that had been exposed to the lowest dose of cadmium (Fig. 3B). Nevertheless, as shown in Fig. 4, the cadmium concentration in gills still increased significantly ( $P < 0.05$ ) with the cadmium dose in the water.

### 3.2.2. Metals other than cadmium induce the MXR protein (experiment 2)

In addition to cadmium, the effects of zinc, copper, and mercury on MXR induction in clams were tested.

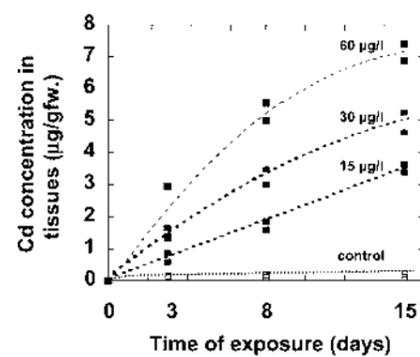


Fig. 4. Evolution of the cadmium concentration in *C. fluminea* gills vs. the time of exposure to cadmium chloride for different cadmium concentrations in water. Two replicates were carried out for each time and concentration condition. Significant effects of time of exposure, and cadmium concentration in water were observed (two-way ANOVA,  $P < 0.05$ ) on cadmium bioaccumulation in gills.

Table 3

Copper, cadmium, mercury, and zinc concentrations (measured in nanograms or micrograms per gram fresh weight) in the gills of *C. fluminea* after 3 days of exposure

Bivalves	Cu ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Cd ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Hg ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Control	122 (113–132)	176 (166–187)	29 (28–31)	16 (15–18)
Metal exposed	274 (236–312)	2928 (1758–4595)	556 (473–639)	117 (80–155)

Means of metal determinations are given. Minimum and maximum values are indicated in parenthesis.

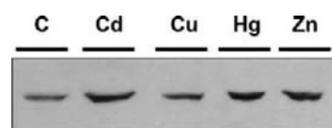


Fig. 5. Western blot showing MXR protein levels in *C. fluminea* gills exposed to different heavy metals: cadmium at  $30 \mu\text{g l}^{-1}$  ( $260 \text{ nmol l}^{-1}$ ), copper at  $40 \mu\text{g l}^{-1}$  ( $317 \text{ nmol l}^{-1}$ ), inorganic mercury at  $5 \mu\text{g l}^{-1}$  ( $25 \text{ nmol l}^{-1}$ ), and zinc at  $500 \mu\text{g l}^{-1}$  ( $7690 \text{ nmol l}^{-1}$ ) for 3 days. 'C' represents control animals. This pattern is representative of five different Western blots.

The toxicities of these divalent heavy metal cations are very different (Stohs and Bagchi, 1995) and the concentrations used were chosen to avoid lethal doses. Under these different conditions, MXR induction was observed for the four metals (Fig. 5), although the induction caused by copper was the least intense among those observed. Metal determinations in the gill tissues showed a significant accumulation after 3 days of exposure to the chosen metal concentrations (Table 3). The ratios of metal concentrations in the gills of contaminated bivalves to the uncontaminated ones were 2.2, 17, 19, and 7.3 for copper, cadmium, mercury, and zinc, respectively (as calculated from Table 3). It is worth noting that the weakest ratio corresponds to copper, which also displayed the weakest MXR induction.

#### 4. Discussion and conclusion

Using the C219 monoclonal antibody, a 135 kDa immunoreactive band had previously been detected in the gills of *C. fluminea* clams without toxic exposure (Waldmann et al., 1995). Here, we detect the same MXR band at 135 kDa in control clams but our results show that this proteinaceous signal is induced by metal contamination.

The molecular weight of the protein detected in *C. fluminea* is lower than in other aquatic invertebrate species: 200 kDa in the gills of *C. gigas* and *C. virginica* oysters (Minier et al., 1993; Keppler, 1997); 170 kDa (plus a faint signal at 200 kDa) in the gills of *M. californianus*, *M. galloprovincialis*, and *M. edulis* mussels (Cornwall et al., 1995; Galgani et al., 1995; Minier and Moore, 1996a,b). The range of molecular weights detected for P-gp-like proteins in different aquatic species is not inconsistent with the mammalian studies. Depending on the state of glycosylation, mammalian P-gps can range from a molecular weight of 130–170 kDa (Kartner et al., 1985). In *C. fluminea*, the low molecular weight of the cognate protein could correspond to a lower state of glycosylation.

In *M. californianus*, a 170 kDa band induced by very high  $\text{CdCl}_2$  concentrations was detected, and until the present study, it was the only example of MXR protein induction by metals in invertebrates (Eufemia and Epel, 2000). Gill tissues from mussels exposed for 2 days to seawater spiked with  $100 \mu\text{g l}^{-1}$  or  $500 \mu\text{g l}^{-1}$  cadmium chloride showed lower accumulation of rhodamine dye than gill tissues from control mussels (Eufemia and Epel, 2000). In the present study, the induction of MXR is observed for lower cadmium chloride concentrations ( $15\text{--}30 \mu\text{g l}^{-1}$ ) which are more consistent with cadmium levels found in the environment, and over a longer duration of toxicant exposure (15 days in laboratory or 2 months for field transplanted bivalves, against 2 days). In these conditions, a relationship between the MXR expression in *C. fluminea* and the cadmium concentration in water and gill tissues could be established.

Among heavy metals, cadmium was initially chosen because of the relatively high bioconcentration factor displayed by *C. fluminea* tissues (Graney et al., 1983; Inza et al., 1997). Within the time scale of our experimental study (15 days), the MXR protein level increased with time but seemed to reach a

maximum after 8 days for the lower cadmium exposure condition ( $15 \mu\text{g l}^{-1}$ ). The MXR basal level also increased with time in the non-exposed clams but remained clearly lower than for bivalves exposed to heavy metal contamination. This unexpected increase may originate from the environmental conditions in the EUs since the water was not changed during the 15 days. This may cause an accumulation of organic waste, which in turn may generate an alteration of the physiological conditions of the clams and induce the production of the MXR protein. In addition, the present studies showed the highest protein levels in clams exposed to the lowest cadmium concentration at all sampling occasions. This could be due to a lower resistance of the clams and a lower protein synthesis metabolism as the accumulation level approaches the lethal concentration. Indeed, during the experiment three animals died between days 13 and 15 in 1 EU contaminated with cadmium at  $60 \mu\text{g l}^{-1}$ . Another factor to bear in mind is the cadmium bioconcentration factor which was found to decrease in *M. edulis*, for example, as the cadmium concentration increased (Phillips, 1976). In the present study, the bioconcentration factor ( $\text{BCF} = (\text{accumulated Cd in exposed animals} - \text{accumulated Cd in controls}) / \text{water Cd concentration}$ ) decreases as the water cadmium levels increase (BCF values of 223, 160, 116 for clams exposed for 15 days to 15, 30,  $60 \mu\text{g l}^{-1}$  Cd, respectively, as calculated from Fig. 4).

Three other metal ions were also tested and this study established a clear relationship between multixenobiotic defense mechanism induction and contamination by cadmium, mercury, zinc, and copper. Indeed, the strongest MXR inductions were observed for Hg, Cd, and Zn in correlation with bioaccumulation ratios between the contaminated and the uncontaminated organisms of 19, 17, and 7.3, respectively, despite the low exposure pressure in the water column applied for Hg ( $5 \mu\text{g l}^{-1}$ ). In the same way, the least intense MXR induction obtained for Cu corresponds to the lowest bioaccumulation ratio (2.2).

Could MXR be used as a biomarker of metal contamination under specific environmental conditions? One has to be cautious with regard to other unknown physiological factors that can affect the MXR production, as reported for instance for metallothioneins (low molecular weight metal-binding proteins) that are inducible during reproductive cycle and consequently

conceal the specific response to metals (Baudrimont et al., 1997b; Serra et al., 1999). Other factors, such as temperature (Minier et al., 2000) or organic pollutants, can affect the MXR protein level, as was observed in *M. galloprovincialis*. In these conditions, MXR can be considered as an early and general biomarker of environmental stress, but not specific to metal exposure as already discussed (Eufemia and Epel, 1998,2000).

As was reported for the human *MDR1* gene, the MXR protein of *C. fluminea* was also found induced by various metals. This is compatible with the MDR/MXR-catalyzed cadmium efflux hypothesis. However, no resistance to Cd has been observed in cells overexpressing P-gp (Chin et al., 1990). Thus, how can we reconcile the hypothesis of the direct involvement of P-gp proteins in Cd toxicity resistance with this result? A plausible explanation is that the effect of P-gp would be masked by the activity of MRP protein. Indeed, it has been found that the nematode *Caenorhabditis elegans* was hypersensitive to heavy metals when both the MRP homologue and a member of the P-gp gene family were deleted (Broeks et al., 1996). These results are the most conspicuous to date in favor of our hypothesis.

#### Acknowledgements

We wish to thank Marion Debien for her assistance in metal determination and Western blotting.

#### References

- Andrès, S., Baudrimont, M., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C., Boudou, A., 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France). I. Geochemical characteristics of the sampling site and cadmium and zinc bioaccumulation kinetics. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2462–2471.
- Bard, S.M., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defence mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 48, 357–389.
- Baudrimont, M., Métivaud, J., Maury-Brachet, R., Ribeyre, F., Boudou, A., 1997a. Bioaccumulation and metallothionein response in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2096–2105.
- Baudrimont, M., Lemaire-Gony, S., Ribeyre, F., Métivaud, J., Boudou, A., 1997b. Seasonal variations of metallothionein

- concentrations in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*). Comp. Biochem. Physiol. 118C, 361–367.
- Baudrimont, M., Andrès, S., Durrieu, G., Boudou, A., 2003. The key role of metallothionein in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase, after in situ exposure to Cd and Zn. Aquat. Toxicol. 63, 89–102.
- Broeks, A., Gerrard, B., Allikmets, R., et al., 1996. Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. EMBO J. 15, 6132–6143.
- Chin, K.-W., Tanaka, S., Darlington, G., Pastan, I., Gottesmann, M., 1990. Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (*MDR1*) gene in human renal carcinoma cells. J. Biol. Chem. 265, 221–226.
- Cornwall, R., Holland, J., Toomey, B., Bard, S., Bacon, C., Jarman, W.M., Epel, D., 1995. Characterization of multixenobiotic/multidrug transport in the gills of the mussel *Mytilus californianus* and identification of environmental substrates. Aquat. Toxicol. 31, 277–296.
- Dey, S., Ouellette, M., Lightbody, J., Papadopoulou, B., Rosen, B.P., 1996. An ATP-dependent As(III)-glutathione transport system in membrane vesicles of *Leishmania tarentolae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 2192–2197.
- Endicott, J.A., Ling, V., 1989. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. Annu. Rev. Biochem. 58, 137–171.
- Epel, D., 1998. Use of multidrug transporters as first lines of defense against toxins in aquatic organisms. Comp. Biochem. Physiol. A 120, 23–28.
- Eufemia, N.A., Epel, D., 1998. The multixenobiotic defense mechanism in mussels is induced by substrates and nonsubstrates: implications for a general stress response. Mar. Environ. Res. 46, 401–405.
- Eufemia, N.A., Epel, D., 2000. Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein, in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stresses. Aquat. Toxicol. 49, 89–100.
- Galgani, F., Cornwall, R., Holland Toomey, B., Epel, D.D., 1995. Interaction of environmental xenobiotics with a multixenobiotic defense mechanism in the bay mussel *Mytilus galloprovincialis* from the coast of California. Environ. Toxicol. Chem. 15, 325–331.
- Graney Jr., R.L., Donald, S., Cairns, C., Cairns Jr., J., 1983. Heavy metal indicator potential of the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) in artificial stream systems. Hydrobiologia 102, 81–88.
- Hamer, D.H., 1986. Metallothionein. Ann. Rev. Biochem. 55, 913–951.
- Inza, B., Ribeyre, F., Maury-Brachet, R., Boudou, A., 1997. Tissue distribution of inorganic mercury, methyl mercury and cadmium in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) in relation to the contamination levels of the water column and sediment. Chemosphere 35, 2817–2836.
- Juliano, R.L., Ling, V., 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochim. Biophys. Acta 455, 152–162.
- Kartner, N., Evernden-Porelle, D., Bradley, G., Ling, V., 1985. Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. Nature 316, 820–823.
- Keppler, C., 1997. Expression of multixenobiotic resistance proteins and total protein in the gills of the oyster *Crassostrea virginica*. Master Thesis, Department of Biology, University of Charleston, Charleston, SC.
- Kurelec, B., Pivcevic, B., 1989. Distinct glutathione dependent enzyme activities and a verapamil-sensitive binding of xenobiotics in a freshwater mussel *Anodonta cygnea*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 164, 934–940.
- Kurelec, B., Pivcevic, B., 1991. Evidence for a multixenobiotic resistance mechanism in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Aquat. Toxicol. 19, 291–302.
- Kurelec, B., Waldmann, P., Zahn, R.K., 1996. The modulation of protective effects of the multixenobiotic resistance mechanism in clam *Corbicula fluminea*. Mar. Environ. Res. 42, 383–387.
- Li, Z.-S., Lu, Y.-P., Zhen, R.-G., Szczypka, M., Thiele, D.J., Rea, P.A., 1997. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 42–47.
- McFadzen, I., Eufemia, N.A., Heath, C., Epel, D., Moore, M.N., Lowe, D.M., 2000. Multidrug resistance in the embryos and larvae of the mussel *Mytilus edulis*. Mar. Environ. Res. 50, 319–323.
- Minier, C., Moore, M.N., 1996a. Rhodamine B accumulation and MXR protein expression in mussel blood cells: effects of exposure to vincristine. Mar. Ecol. Prog. Ser. 142, 165–173.
- Minier, C., Moore, M.N., 1996b. Induction of multixenobiotic resistance in mussel blood cells. Mar. Environ. Res. 43, 389–392.
- Minier, C., Akcha, F., Galgani, F., 1993. P-glycoprotein expression in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* in polluted seawater. Comp. Biochem. Physiol. 106B, 1029–1036.
- Minier, C., Borghi, V., Moore, M.N., Porte, C., 2000. Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel *Mytilus galloprovincialis*. Aquat. Toxicol. 50, 167–176.
- Narbonne, J.F., Djomo, J.E., Ribera, D., Ferrier, V., Garrigues, P., 1999. Accumulation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed to sediment by the mollusc *Corbicula fluminea*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 42, 1–8.
- Phillips, D.J.H., 1976. The common mussel *Mytilus edulis* as a bioindicator of pollution by zinc, cadmium, lead, copper. I. Effects of environmental variables on uptake of metals. Mar. Biol. 38, 59–69.
- Roesijadi, G., 1996. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. Comp. Biochem. Physiol. 113C, 117–123.
- Serra, R., Isani, G., Tramontano, G., Carpené, E., 1999. Seasonal dependence of cadmium accumulation and Cd-binding proteins in *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. Comp. Biochem. Physiol. 123C, 165–174.
- Smital, T., Kurelec, B., 1997. Inhibitors of the multixenobiotic resistance mechanism in natural waters: in vivo demonstration of their effects. Environ. Toxicol. Chem. 16, 2164–2170.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free Radic. Biol. Med. 18, 321–336.

- Thévenod, F., Friedmann, J.M., Katsen, A.D., Hauser, I.A., 2000. Up-regulation of multidrug resistance P-glycoprotein via nuclear factor- $\kappa$ B activation protects kidney proximal tubule cells from cadmium- and reactive oxygen species-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275, 1887–1896.
- Tommasini, R., Evers, R., Vogt, E., Mornet, C., Zaman, G.J.R., Schinkel, A.H., Borst, P., Martinola, E., 1996. The human multidrug resistance-associated protein functionally complements the yeast cadmium resistance factor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 6743–6748.
- Tran, D., Boudou, A., Massabuau, J.C., 2001. How oxygenation level influences cadmium accumulation pattern in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*: a laboratory and field study. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2073–2080.
- Valverde, M.A., Diaz, M., Sepulveda, F., Gill, D.R., Hyde, S.C., Higgins, C.F., 1992. Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature* 355, 830–833.
- van Helvoort, A., Smith, A.J., Sprong, H., Fritzsche, I., Schinkel, A.H., Borst, P., van Meer, G., 1996. MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* 87, 507–517.
- Vernhet, L., Courtois, A., Allain, N., Payen, L., Anger, J.P., Guillouzo, A., Fardel, O., 1999. Overexpression of the multidrug resistance-associated protein (MRP1) in human heavy metal-selected tumor cells. *FEBS Lett.* 443, 321–325.
- Waldmann, P., Pivcevic, B., Müller, W.E.G., Zahn, R.K., Kurelec, B., 1995. Increased genotoxicity of acetylamino-fluorene by modulators of multixenobiotic resistance mechanism: studies with the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Mutat. Res.* 342, 113–123.



## Faits marquants

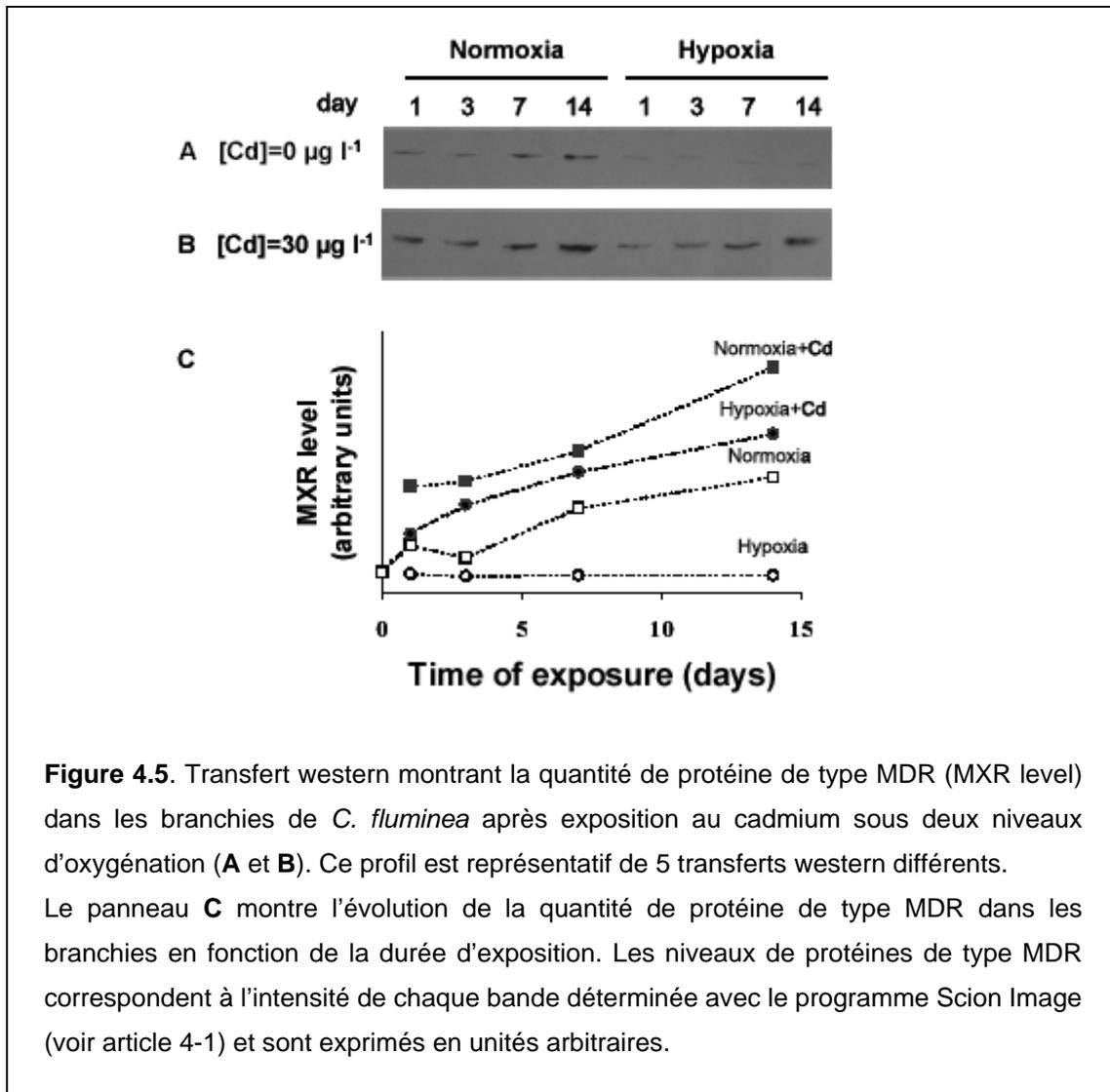
Grâce à ce travail, l'augmentation du niveau de protéine de type MDR chez *C. fluminea* suivant une contamination par le cadmium a été clairement mise en évidence. En effet, les bivalves exposés à une contamination métallique que ce soit sur le terrain ou en laboratoire, présentent des quantités de protéine de type MDR dans leurs branchies plus élevées que chez les animaux témoins. Il existe de plus une corrélation entre la quantité de protéine de type MDR, la concentration en métal dans les branchies, et le temps de contamination puisque pour une concentration en cadmium donnée, le taux de protéine MDR, tout comme le taux de cadmium dans les branchies augmente avec la durée de contamination (Figures 3 et 4, article 4-1) .

Par contre, un résultat inattendu a été observé (Figures 3 et 4, Article 4-1) : pour un temps de contamination donné, lorsque la dose de cadmium augmente de 15 à 60  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , le niveau de protéine diminue alors que la concentration en Cd des tissus augmente. Ce phénomène a été attribué à une détérioration de l'état physiologique des bivalves lors d'une contamination trop sévère. Notons cependant que la concentration maximale en cadmium n'était que 4 fois supérieure à celle rencontrée dans l'eau de la station la plus contaminée. Il se peut également que l'expression du gène codant pour la protéine de type MDR ne soit pas directement linéaire avec les concentrations de métal et qu'aux concentrations les plus élevées, d'autres réponses génétiques soient déclenchées.

## Résultats complémentaires

Un autre résultat inattendu dans l'article 4-1 concerne l'augmentation de la quantité de protéine de type MDR observée au cours du temps dans les branchies de bivalves non exposés au cadmium (Figure 3). Cette augmentation n'était bien sûr pas due à une contamination accidentelle comme le montre la figure 4 du même article mais plutôt la conséquence de l'altération de l'état physiologique des animaux provoquée par une augmentation de la concentration en déchets organiques dans les aquariums. Une étude pluridisciplinaire ayant pour but d'analyser les réponses de *C. fluminea* face à un stress métallique sous normoxie ou sous hypoxie (Legeay *et al.*, sous presse) (Annexe 1) nous a conduit à formuler une nouvelle explication.

Ainsi la quantité de protéine de type MDR a été déterminée dans les branchies de bivalves exposés à  $30 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cadmium soit sous normoxie ( $\text{PO}_2 = 21 \text{ kPa}$ ) soit sous hypoxie ( $\text{PO}_2 = 4 \text{ kPa}$ ) (Figure 4.5).



Comme précédemment, les bivalves non exposés au cadmium sous normoxie présentent une augmentation de la quantité de protéine de type MDR au cours du temps. Par contre chez les animaux non exposés au cadmium sous hypoxie, la quantité de cette protéine ne varie pas (Figure 4.5). Ceci suggère que l'expression du gène codant pour cette protéine peut également être influencée par les produits d'oxydation générés par les espèces réactives de l'oxygène.

Dans le cas des bivalves contaminés, la figure 4.5 montre que quelque soit le niveau d'oxygénation, la quantité de protéine de type MDR augmente au cours du temps.

En résumé, les résultats présentés dans le premier article de ce chapitre indiquent que la quantité de protéine de type MDR dans un tissu et la contamination métallique sont étroitement liées. Cependant, à ce stade, rien ne permet d'affirmer que l'augmentation de la quantité d'une protéine de type MDR constitue un mécanisme de résistance aux métaux. C'est pourquoi la suite de ce travail s'est focalisée sur le lien qu'il pouvait exister entre l'expression du gène codant pour cette protéine et la résistance accrue aux métaux.



## **2- DEUXIÈME PARTIE : DES PROTÉINES DE TYPE MDR EXPRIMÉES CHEZ *E. COLI* CONFÈRENT UNE RÉSISTANCE AUX MÉTAUX**

Pour tester l'hypothèse selon laquelle une protéine de type MDR pouvait (en plus de tous les polluants d'origine anthropique ou d'origine naturelle) permettre une résistance accrue des cellules aux métaux, un modèle simplifié a été utilisé : la bactérie *E. coli* transformée avec un plasmide permettant l'expression d'un tel gène. Nous avons choisi plutôt *E. coli* qu'une cellule eucaryote telle que *Saccharomyces cerevisiae* car il a pu être montré des localisations de protéine membranaires illégitimes chez cet organisme. Par exemple, la protéine CadA, une pompe à cadmium de *Listeria monocytogenes*, est localisée dans la membrane du réticulum endoplasmique de la levure et non pas dans la membrane plasmique comme il était attendu. Ceci se traduit pas une exacerbation de la toxicité du cadmium, expliquée par un pompage dans la lumière du réticulum (Wu *et al.*, 2004).

Pour cette étude, le cas idéal aurait été de posséder une souche d'*E. coli* exprimant une protéine de type MDR d'un des mollusques modèle de cette étude. Malheureusement, le clonage d'une protéine de type MDR chez *C. fluminea* fait toujours partie des perspectives de ce travail. Pour poursuivre l'étude présente, une souche d'*E. coli* exprimant fonctionnellement la protéine MDR1 humaine (P-gp) ou des homologues bactériens (LmrA de *Lactococcus lactis* ou OmrA d'*Oenococcus oeni*) ont été utilisés.

### **2.1- Les transporteurs MDR et les souches bactériennes utilisées**

LmrA est une protéine de la bactérie *L. lactis* qui intervient dans la fermentation lactique du fromage. C'est une pompe à xénobiotiques de la famille ABC (van Veen *et al.*, 1996) en plusieurs points comparable à la P-gp (hMDR1) :

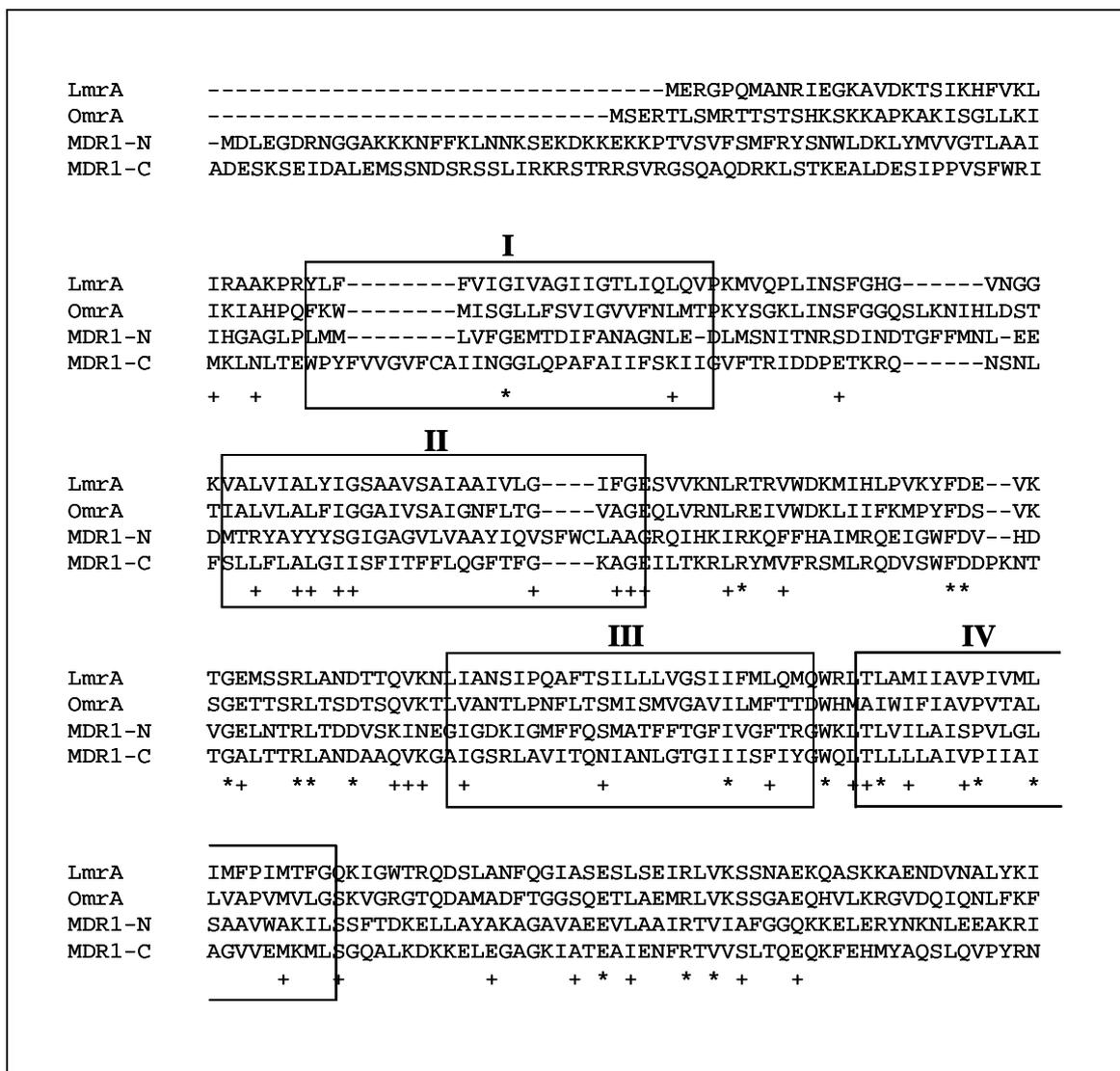
- les profils hydrophatiques des deux transporteurs sont quasiment identiques
- la séquence protéique de LmrA présente 32% d'identité et 48% de similarité avec celle d'une « demie » P-gp et parmi les régions où les séquences protéiques sont identiques, on trouve des régions définies comme essentielles pour la reconnaissance et la liaison du substrat chez la P-gp (Figure 4.6)
- la spécificité de substrat des deux transporteurs est similaire et ils sont inhibés par les même types inhibiteurs (ex : vérapamil).

L'argument essentiel pour affirmer que la P-gp et LmrA peuvent jouer les mêmes rôles est que LmrA est fonctionnellement interchangeable avec la protéine MDR1 humaine dans des cellules humaines (van Veen *et al.*, 1998).

OmrA est également une protéine ABC. Elle a été clonée à partir de la bactérie *O. oeni* qui intervient dans la fermentation malolactique, processus indispensable dans la fabrication du vin. Elle a été définie comme un homologue de LmrA (Bourdineaud *et al.*, 2004) car :

- la séquence protéique de OmrA présente 54% d'identité avec celle de LmrA. Au niveau des TMDs on note 39% d'identité et 72% au niveau des NBDs. De plus, OmrA présente 30% d'identité avec un module de la P-gp (Figure 4.6)

- OmrA présente la même spécificité de substrat que LmrA et est également inhibée par le vérapamil.



		<b>V</b>		<b>VI</b>
LmrA	GVKEAVFDGLMSH	VMLLMMMLIFGLLAYGIYLI	STGVMSLGT	LLGMMYLMNLIGVVPT
OmrA	GRREAIVDGVMGE	IMTMVMMGLFALILVVGSLRVAK	GESSMGT	LFSFIMYLFQIMPALVS
MDR1-N	GIKKAITANISIG	AAFLLIYASYALAFWYGTTLVLS	GEYSIGQ	VLTVFFSVLIGAFSVGQ
MDR1-C	SLRKAHIFGITFS	FTQAMMYFSYAGCFRFGAYLVAH	KLMSFED	VLLVFSAVVFGAMAVGQ
	+ * +	+ * +	+ * +	+ +

LmrA	VATFFTELA	KASGSTGRLTELLDEEQEVLHQGDSL	DLDE-----	GKTLSAHHVDFAYD
OmrA	VGTFGSTFAKT	QGATHRLITLLEDFVEELNKG	ENIDIE-----	ELTLTADHVDFAYE
MDR1-N	ASPSIEAFANAR	GAAEIFKIIDNKPSI---	DSYKSGHKPDNIKGNLEFRNVHFSYPSR	
MDR1-C	VSSFAPDYAKAK	ISAHHIIMIIEKTPLI---	DSYSTEGLMPNTLEGVNTFGEVVFNYPTR	
	+ + *++ +	+		+ +

### Walker A

LmrA	DSEQILHDISFEA	QPNSSIIAFAGPSGGKSTIF	SLLERFYQPTAGEITIGGQPIDSVSLE
OmrA	GDQPILHNVSF	EAKPNTIVAFAGPSGGKSTIF	QLLERFYQPDRGTIYIGNHNINISLN
MDR1-N	KEVKILKGLNLK	VQSGQTVLVGNSGCGKSTTV	QLMQRLYDPTGEMVSVGDQDIRTINVR
MDR1-C	PDIPVLQGLSLE	VKKGQTLALVGS GCGKSTV	VQLLERFYDPLAGKVLLDGKEIKRLNVQ
	+* + +	* * * * *	+*+*+* * * + *

LmrA	NWRSQIGFVSQDS	AIMAGTIRENLTYGLEGNFT	DEDLWQVLDLA-FA-----	RSFVE
OmrA	SWRSQIGFVSQDS	SIMAGTIRDNLTYGLKKEFS	DERLWQVLQLA-YA-----	DKFVD
MDR1-N	FLREIIGVVSQEP	VLFATTIAENIRYGRE-----	NVTMDE--	IEKAVKEANAYDFIM
MDR1-C	WLRHLGIVSQEP	ILFDCSIAENIAYGDN-----	SRVVSQEEIVRAAKEANI	HAFIE
	* +* ***	+ +* +* **	+	*

### ABC

### Walker B

LmrA	NMPDQLNTEVGER	GVKISGGQRQLAIARAFLRNPK	ILMLDEATASLDSESESMVQRALD
OmrA	NMPKLDLTVGER	GKVS GGQRQLAIARAFLRDPK	ILMLDEATASLDSESEAMVQRALD
MDR1-N	KLPHKFDLTVGER	GQAQLSGGQQRIAIARALVRNPK	ILLLDEATSALDTESEAVVQVALD
MDR1-C	SLPNKYSTKVGDK	GTQLSGGQQRIAIARALVRQPH	ILLLDEATSALDTESEKVVQEALD
	* + * +*+*	***** ** *****	* *+* * * * * * * * * * * * * * *

LmrA	SLMKGRITLVIAH	RLSTIVDADKIYFIEKGEIT	SGKHNELVATHPLYAKYVSEQLTVGQ
OmrA	QLMKNRITLVIAH	RLSTIVDADKIYFIEHGEVT	SGTHQELLKSHELYAEYVSEQFVTK-
MDR1-N	KARKGRITLVIAH	RLSTVRNADVIAGFDDGVIVE	KGNHDELMKEKGIYFKLVMTQTAGNE
MDR1-C	KAREGRITLVIAH	RLSTIQNADLIVVFQNGRVKE	HGTHQQLLAQKGIYFSMVSVAQGTKR
	+++++ *****+	** * * * * *	* * * +* * * * * * * * * * * * * * *

LmrA	-----
OmrA	-----
MDR1-N	VELENA
MDR1-C	Q-----

**Figure 4.6.** Comparaison de la séquence protéique de OmrA, LmrA, et des deux parties de la P-gp, côté N- et C-terminal. MDR1-N et MDR1-C représentent les résidus 1 à 640 et 641 à 1280 de MDR1, respectivement. Les chiffres romains au dessus des cadres font référence aux domaines transmembranaires. Le motif ABC et la localisation des domaines Walker A et B sont indiqués. Une \* sous les séquences indique que les acides aminés en cette position sont identiques pour les quatre séquences et un + que les acides aminés sont identiques pour trois des séquences. Les sauts de séquence introduits pour optimiser l'alignement sont indiquées par - .

Les plasmides utilisés pour exprimer fonctionnellement *lmrA*, *hMDR1*, et *omrA* chez *E. coli* sont listés dans le tableau 4.1.

**Tableau 4.1.** Plasmides utilisés pour une expression fonctionnelle des transporteurs MDR chez *E. coli*. Contrairement aux plasmides utilisés dans le chapitre 2, ceux-ci ne permettent pas de surexpression. L'expression des transporteurs est constitutive et ne nécessite aucune induction. Les plasmides nous ont été gentiment fournis par les auteurs indiqués dans la dernière ligne du tableau que je remercie ici.

Transporteur MDR	LmrA	hMDR1	OmrA
Plasmide vide (contrôle)	pGK13	pSF	pCR-XL-TOPO
Plasmide portant l'ADNc du transporteur	pGKLmrA	pSF-MDR	pJPB66
Référence	(van Veen <i>et al.</i> , 1996)	(Baum <i>et al.</i> , 1995)	(Bourdineaud <i>et al.</i> , 2004)

Plusieurs souches d'*E. coli* ont été transformées avec ces six plasmides. La souche CS1562 caractérisée par une hypersensibilité aux xénobiotiques due à une déficience en porine TolC (Otsuji *et al.*, 1982) est celle principalement utilisée pour les études décrites dans ce chapitre. D'autres souches non mutées pour *tolC* (JM109, BL21(DE3), et W31210) ont été utilisées ponctuellement. Tous les phénotypes sont détaillés dans la section matériel et méthodes de l'article 4-2.

La figure 1A de l'article 4-2, montre l'importance du choix de la souche d'*E. coli* pour étudier l'effet d'un transporteur de type MDR. En effet, l'effet protecteur de hMDR1 contre le bromure d'éthidium (EtBr), substrat connu de ce transporteur, n'est visualisable que dans la souche hypersensible aux xénobiotiques : CS1562 (*tolC*). Le panneau B de cette même figure montre que CS1562 est également un bon choix pour une étude utilisant le cadmium car la concentration inhibitrice 50 ( $CI_{50}$ ) est déplacée de 1,1 mM à 0,35 mM  $CdCl_2$  en l'absence de la protéine TolC.

L'hypersensibilité de la souche CS1562, s'étend aussi à d'autres métaux. La même expérience menée avec du zinc ou du mercure révèle qu'en absence de TolC la  $CI_{50}$  passe de 1 mM à 0,8 mM pour le zinc et de 24  $\mu M$  à 12,5  $\mu M$  pour le mercure. Ce sont ces caractéristiques qui ont motivé notre choix pour visualiser une résistance potentielle aux métaux conférée par des transporteurs de type MDR.

Deux études successives ont été menées. La première concerne le cadmium (Article 4-2) et la deuxième le mercure et le zinc.

## 2.2- Première étude : bactéries contaminées avec du cadmium

Le but du travail présenté dans le deuxième article de ce chapitre (Article 4-2) est triple :

- mettre en évidence une résistance accrue au cadmium chez les bactéries exprimant chacun des trois transporteurs ABC (hMDR1, LmrA, OmrA).  
Pour cela la technique des tests en goutte (Chapitre 1, § II.4.4) a été utilisée pour comparer la résistance des bactéries *toIC* exprimant un des trois transporteurs avec celles n'exprimant aucune pompe exogène.
- démontrer que cette résistance est due au pompage du cadmium hors des bactéries. Le dosage du Cd par spectrométrie d'absorption atomique a constitué une méthode indirecte pour quantifier le cadmium associé à des bactéries contaminées et exprimant ou n'exprimant pas un des trois transporteurs. Pour établir une démonstration plus directe, j'ai eu la chance de travailler quelques mois au sein de l'équipe de microbiologie moléculaire au Groningen Biomolecular Science and Biotechnology Institute (Pays Bas). Grâce à des vésicules membranaires inversées (Figure 1.6, Chapitre 1 § II.4.5) possédant le transporteur LmrA et du cadmium radioactif, nous avons pu confirmer son transport.
- s'intéresser à la forme sous laquelle le cadmium est pompé par ces transporteurs ABC grâce à l'outil constitué par les vésicules membranaires inversées.



## Heterologously Expressed Bacterial and Human Multidrug Resistance Proteins Confer Cadmium Resistance to *Escherichia coli*<sup>†</sup>

Maud Achard-Joris,<sup>‡</sup> H. Bart van den Berg van Saparoea,<sup>§</sup> Arnold J. M. Driessen,<sup>§</sup> and Jean-Paul Bourdineaud<sup>\*;‡</sup>

Laboratoire d'Ecophysiologie et d'Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques (LEESA), Université Bordeaux 1/UMR CNRS 5805, Place du Dr. Peyneau, 33120 Arcachon, France, and Department of Microbiology, Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute, University of Groningen, Kerklaan 30, 9751 NN Haren, The Netherlands

Received October 28, 2004; Revised Manuscript Received March 1, 2005

**ABSTRACT:** The human *MDR1* gene is induced by cadmium exposure although no resistance to this metal is observed in human cells overexpressing *hMDR1*. To access the role of MDR proteins in cadmium resistance, human *MDR1*, *Lactococcus lactis lmrA*, and *Oenococcus oeni omrA* were expressed in an *Escherichia coli tolC* mutant strain which proved to be hypersensitive to cadmium. Both the human and bacterial MDR genes conferred cadmium resistance to *E. coli* up to 0.4 mM concentration. Protection was abolished by 100  $\mu$ M verapamil. Quantification of intracellular cadmium concentration by atomic absorption spectrometry showed a reduced cadmium accumulation in cells expressing the MDR genes. Inside-out membrane vesicles of *L. lactis* overexpressing *lmrA* displayed an ATP-dependent <sup>109</sup>Cd<sup>2+</sup> uptake that was stimulated by glutathione. An evolutionary model is discussed in which MDR proteins have evolved independently from an ancestor protein displaying both organic xenobiotic- and divalent metal-extrusion abilities.

Multidrug resistance (MDR) is one of the major causes of failure of chemotherapy employed for the treatment of cancer (1). Among others, MDR is caused by the overexpression of a 170 kDa membrane protein called MDR1 or P-glycoprotein (P-gp). MDR1 is a member of the ATP binding cassette (ABC) superfamily of transporters, whose functions include the ATP-dependent extrusion of amphiphilic compounds out of the cell (1). In addition to MDR1, other ABC transporters<sup>1</sup> have been implicated in MDR in mammalian cells such as the multidrug resistance associated protein, MRP1 (2, 3).

Like cancer cells, many organisms have the ability to develop resistance to a variety of toxic compounds through ATP-dependent extrusion mechanisms. Indeed, MDR also occurs in lower eukaryotes and bacteria. For instance, MDR1-like proteins have been identified in a variety of aquatic organisms (4) where they can account for the protection against a broad variety of toxic compounds such as xenobiotics and naturally occurring toxins, as well as endogenous toxic compounds. Such transporters can be relatively specific for a given substrate range or can handle a wide variety of structurally unrelated compounds. Among the xenobiotics, heavy metals pose a serious threat to the

environment. Several ABC transporters such as MRP1, *Leishmania* LtpgpA, and the yeast cadmium resistance factor 1 (YCF1) may take part in metal resistance. Indeed, these genuine xenobiotic pumps are also involved in heavy-metal detoxification: LtpgpA pumps out arsenite and antimony (5), YCF1 pumps out arsenite, and human MRP1 and YCF1 catalyze the extrusion of bis(glutathionato)cadmium conjugates (6, 7).

In our laboratory, we focus on the problem of long-term pollution in aquatic species by heavy metals such as cadmium and mercury. In particular, we study resistance mechanisms against metal contamination displayed by a biological model, the Asiatic clam *Corbicula fluminea*. In this bivalve, a gene encodes a multixenobiotic resistance protein (MXR) that is homologous to the mammalian P-gp. The MXR protein level was considerably elevated in the tissues of bivalves living in a cadmium-contaminated environment (8). Similar observations have been made in the mussel *Mytilus californianus* exposed to arsenite and cadmium (9). Moreover, *MRP1* is overexpressed in human heavy-metal-selected tumor cells (10), while *MDR1* is induced by cadmium and arsenite ions although no resistance to cadmium ions has been observed in cells overexpressing P-gp (11). These different examples suggest that ABC transporters of the MDR group are induced in the presence of metal contaminants. This raises the question as to whether these proteins are directly involved in cellular extrusion of metals in addition to their role as xenobiotic extruders.

Herein we have analyzed the role of MDR-like proteins in metallic resistance. Three transporters were tested: the human *hMDR1* and two bacterial ABC-type multidrug extrusion systems, *LmrA* and *OmrA*. *LmrA* is an ABC transporter of *Lactococcus lactis* (12) that is functionally and

<sup>†</sup> This work was supported in part by an EMBO short-term fellowship to M.A.-J.

\* Corresponding author. Tel: +33-556-22-39-26. Fax: +33-556-54-93-83. E-mail: jp.bourdineaud@epoc.u-bordeaux1.fr.

<sup>‡</sup> Université Bordeaux 1/UMR CNRS 5805.

<sup>§</sup> University of Groningen.

<sup>1</sup> Abbreviations: ABC transporter, ATP binding cassette transporter; Cd<sup>2+</sup>, cadmium; <sup>109</sup>Cd<sup>2+</sup>, radioactive cadmium; LB medium, Luria-Bertani broth medium; GSH, glutathione; AMP-PNP, adenosine 5'-[ $\beta$ , $\gamma$ -imino]triphosphate; OD<sub>660</sub>, optical density at 660 nm; MIC, minimal inhibitory concentration.

structurally related to the human MDR1 (13). It uses the free energy of ATP hydrolysis to drive the export of toxic compounds from the inner leaflet of the cytoplasmic membrane (14). Homologues of LmrA have been detected in other lactic acid bacteria, like the *Oenococcus oeni omrA* gene (15). OmrA confers protection to bacteria grown on high-salt medium. It also triggered bacterial resistance to sodium laurate, wine, and ethanol toxicity.

To test their ability to provide resistance to toxic metals, the proteins were expressed in *Escherichia coli*. All three systems provided cadmium resistance to *E. coli*. Transport assays with inside-out membrane vesicles isolated from *L. lactis* suggest an LmrA-mediated cadmium extrusion activity.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Reagents.** Cadmium chloride ( $\text{CdCl}_2$ ) was purchased from Merck; reduced glutathione, adenosine 5'-[ $\beta,\gamma$ -imino]triphosphate (AMP-PNP), nisin, and verapamil were from Sigma.  $^{109}\text{Cd}^{2+}$  was purchased from Amersham (Pharmacia, Amersham).

**Bacterial Strains, Growth Conditions, and Plasmid Constructions.** Bacterial strains used were *E. coli* CS1562 (F- $\lambda$ -*tolC6::Tn10 his leu proA argT his thi galK lacY trpE non mtl xyl ara rpsL sup<sup>+</sup>*) (16), *E. coli* JM109 (e14<sup>-</sup>(McrA<sup>-</sup>)*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1  $\Delta$ (lac-proAB) [F' *traD36 proAB lacI<sup>r</sup>  $\Delta$ AM15]*), *E. coli* W3110 (F- $\lambda$ -*thyA36*), *E. coli* BL21(DE3) (B F<sup>-</sup> *dcm ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal  $\lambda$*  (DE3)), and *L. lactis* NZ9000 ( $\Delta$ *lmrA*, MG1363 derivative, *pepN::nisRK*) (17). *E. coli* was grown at 37 °C (or 28 °C when transformed with pSF or pSF-MDR) in LB medium (5 g·L<sup>-1</sup> yeast extract, 10 g·L<sup>-1</sup> bactotryptone, 10 g·L<sup>-1</sup> NaCl) supplemented with the appropriate antibiotic (ampicillin, kanamycin, or chloramphenicol). *L. lactis* was grown at 30 °C in M17 medium (Difco) supplemented with 0.5% glucose and 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  chloramphenicol.*

The human gene (*hMDR1*) and two bacterial homologues, *lmrA* and *omrA*, of *L. lactis* (12) and *O. oeni* (15), respectively, were expressed in *E. coli* strains JM109, W3110, and BL21 and in strain CS1562, which is hypersensitive to drugs (16) and cadmium (this work, Figure 1B) due to a deficiency in the TolC protein.

Plasmids used are pSF and pSF-MDR containing an ampicillin resistance gene (18), pGK13 and pGKLMrA containing a chloramphenicol resistance gene (12), and pCR-XL-TOPO (Invitrogen) and pJPB66 (pCR-XL-TOPO) which harbors the *O. oeni omrA* gene containing a kanamycin resistance gene (15).

For the isolation of inside-out membrane vesicles, *L. lactis* NZ9000 was transformed with either pNZ8048 (control) or pNHLmrA (overexpressing *lmrA*).

**Resistance Assays on Agar Media.** Overnight cultures with the appropriate antibiotic were adjusted to an OD<sub>660</sub> of 2. Then, serial 10-fold dilutions were performed, and 5  $\mu\text{L}$  of each dilution was spotted on the agar medium with or without cadmium, verapamil, or cadmium and verapamil. The plates were incubated overnight at 28 or 37 °C and photographed.

**Bacterial Survival and Metal Quantification.** Overnight cultures were diluted into fresh LB medium (1% v/v) containing the appropriate antibiotic and grown up to an OD<sub>660</sub> of 0.1. Each culture was divided in three: a control and two cultures containing 0.25 and 0.4 mM  $\text{CdCl}_2$ ,

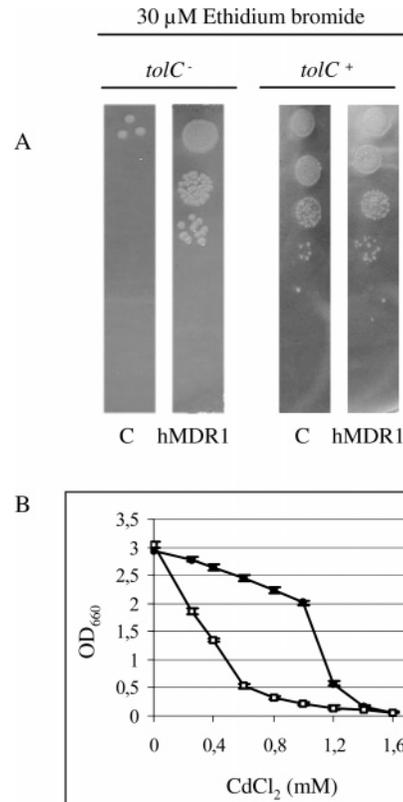


FIGURE 1: *E. coli tolC* mutant: a suitable strain to study xenobiotic and metal resistance conferred by expression of MDR transporters. (A) Effect of TolC on the ethidium bromide resistance introduced by expression of the hMDR1 transporter. *E. coli* CS1562 (*tolC<sup>-</sup>*) and JM109 (*tolC<sup>+</sup>*) were transformed with plasmids pSF (C) or pSF-MDR (hMDR1). An equivalent growth pattern was observed between control and hMDR1-expressing bacteria when the medium was devoid of ethidium bromide. (B) TolC is involved in cadmium resistance. Overnight cultures of *E. coli* CS1562 (*tolC<sup>-</sup>*) (open squares) and JM109 (*tolC<sup>+</sup>*) (filled circles) were diluted to an OD<sub>660</sub> of 0.06 into LB medium containing various concentrations of cadmium. Cell growth was monitored as the absorbance at 660 nm after 12 h of incubation at 37 °C. Measurements were done in triplicate. Several other *tolC<sup>+</sup>* strains [W3110 and BL21(DE3)] were tested with similar results for both panels A and B.

respectively. Cultures were further incubated for 3 h at 37 °C (or 28 °C for *hMDR*-transformed bacteria and the corresponding control). Bacterial survival was determined as follows: after 3 h, 100  $\mu\text{L}$  of each culture was taken, serial 10-fold dilutions were plated on LB solid medium, and colonies were counted after an overnight incubation. Survival ratios were calculated as the colony-forming units (cfu) observed in the presence of the metal to that observed without toxic compound. Cell-associated cadmium levels were determined as follows: after 3 h of incubation, cells from 30 mL of culture were collected by centrifugation (15 min, 6000g, 6 °C) and washed with a buffer containing 10 mM Tris·HCl, pH 7.4, and 0.15 mM NaCl. Pellets were destructed by nitric acid [3 mL of pure  $\text{HNO}_3$ , 65% (v/v)] in a pressurized medium (borosilicate glass tubes) at 100 °C for 3 h. Samples were diluted with 18 mL of ultrapure water (MilliQ plus), and cadmium concentrations were determined by atomic absorption spectrometry with Zeeman correction, using a graphite tube atomizer (AAS, Thermoptec M6Solaar). The detection limit was 0.1  $\mu\text{g}$  of  $\text{Cd}\cdot\text{L}^{-1}$  (3  $\times$  standard deviation of the reagent blanks). Results were expressed in nanograms of  $\text{Cd}^{2+}/10^6$  bacteria.

**Isolation of Inside-Out Membrane Vesicles from *L. lactis*.** Inside-out membrane vesicles were isolated from *L. lactis* NZ9000 ( $\Delta lmrA$ ) cells harboring either pNZ8048 or pNHLmrA. Cells were grown at 30 °C to an OD<sub>660</sub> of about 0.7, whereupon *lmrA* expression was induced for 1 h by addition of 0.5 ng·mL<sup>-1</sup> nisin (Sigma). Cells were cooled on ice for 30 min and harvested by centrifugation (6000g for 8 min) at 4 °C. All subsequent steps were carried out at the same temperature. Cells were washed twice in 1 L of ice-cold 100 mM HEPES–KOH, pH 7.4. Pellets were resuspended in 42 mL of the same buffer. *N*-Ethylmaleimide (NEM; Sigma), MgSO<sub>4</sub>, DNase I (Sigma), and lysozyme were added to a concentration of 1 mM, 10 mM, 0.1 mg·mL<sup>-1</sup>, and 10 mg·mL<sup>-1</sup>, respectively. The cell suspension was incubated for 45 min at 30 °C, cooled on ice, and lysed by two successive passages through a French press (20000 psi; Basic Z Model Cell Disrupter, Constant Cell Disruption Systems). The lysed cells were diluted to a volume of 70 mL with ice-cold HEPES–KOH, pH 7.4, and 1 mM NEM. Unbroken cells and debris were removed by centrifugations (13000g for 45 min followed by 25000g for 30 min, 4 °C), whereupon the membranes were collected from the supernatant by high-speed centrifugation (125000g for 1 h, 4 °C). Pellets were resuspended in 1.5 volumes of a buffer containing 50 mM HEPES–KOH, pH 7.4, 10% glycerol, and 1 mM NEM, frozen in small aliquots in liquid nitrogen, and stored at –80 °C.

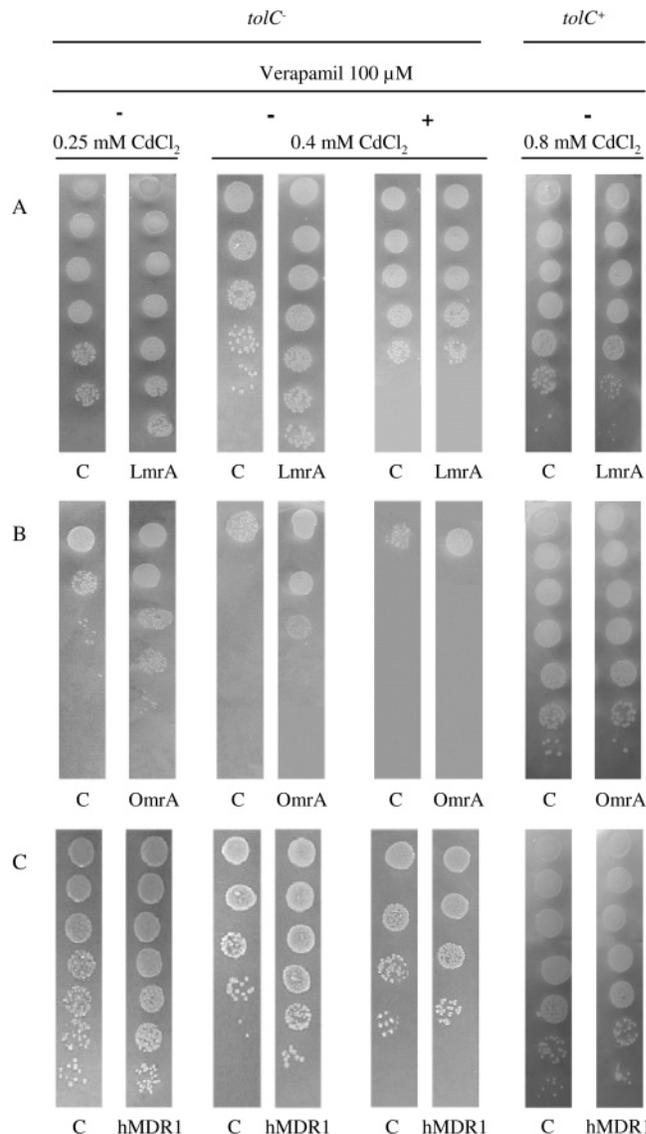
Protein was assayed according to the method of Lowry (DC Protein Assay, Bio-Rad), using bovine serum albumin as a standard.

**Transport Assays with <sup>109</sup>Cd<sup>2+</sup>.** Membrane vesicles were added to 1.5 mL of 50 mM HEPES–KOH, pH 7.4, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 8.5 mM NaCl, 5 mM phosphocreatine, 0.1 mg/mL creatine kinase, and 50 μM <sup>109</sup>Cd<sup>2+</sup> (9.08 μCi·μmol<sup>-1</sup> specific activity) in a 5 mL plastic tube to a final concentration of 0.5 mg of protein/mL. After 1 min incubation at 30 °C, transport was initiated by the addition of 2 mM ATP. When indicated, 650 μM reduced glutathione and/or 2 mM AMP-PNP instead of ATP were (was) included in the reaction mixture. The transport was monitored over 14 min, and at each time point, 200 μL of the reaction mixture was passed over cellulose nitrate filters (0.2 μm pore size; BA 83 Schleicher and Schuell) using a vacuum manifold (Trivac B; Leybold AG, Koln, Germany) under a pressure of 400 millibar. Filters were washed twice with 2 mL of ice-cold 0.1 M LiCl and assayed for radioactivity using a liquid scintillation analyzer, Tri-carb 2000 CA.

Uptake rates were determined by means of a linear regression model. In the statistical analysis, a probability of  $P < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

***hMDR1*, *LmrA*, and *OmrA* Proteins Protect Bacteria against Metal Stress.** The difference in in vivo metal ion susceptibility between *E. coli* cells harboring the *hMDR1*-, *lmrA*-, or *omrA*-containing plasmids and bacterial cells harboring a control plasmid was first studied on solid media. *hMDR1*, *lmrA*, and *omrA* expression in a *tolC*<sup>-</sup> background resulted in an increased resistance to cadmium chloride which was manifested by the colony formation at the highest dilution in the presence of 0.4 mM CdCl<sub>2</sub> relative to control.



**FIGURE 2:** Heterologously expressed ABC MDR transporters in *E. coli* confer protection against cadmium toxicity. The *E. coli* CS1562 (*tolC*<sup>-</sup>) and JM109 (*tolC*<sup>+</sup>) strains were transformed with *omrA*-, *hMDR1*-, and *lmrA*-harboring plasmids and the relevant control plasmids. (A) pGK13 (C) or pGKLmrA (LmrA). (B) pCR-XL-TOPO (C) or pJPB66 (OmrA). (C) pSF (C) or pSF-MDR (hMDR1). An equivalent growth pattern was observed between control bacteria and transporter-expressing bacteria when the medium was devoid of CdCl<sub>2</sub>, while verapamil (100 μM) alone exerted no influence on bacterial growth. Several other *tolC*<sup>+</sup> strains [W3110 and BL21(DE3)] were tested and gave similar results.

Verapamil is a well-known inhibitor of MDR-type transporters. It has been shown that verapamil alone exerted no influence on bacterial growth at 100 μM concentration (19). In the presence of verapamil all resistance was abolished (Figure 2), suggesting a MDR-dependent resistance mechanism. This resistance phenotype against Cd<sup>2+</sup> conferred by these ABC transporters could only be observed in a *tolC*<sup>-</sup> background. In a *tolC*<sup>+</sup> strain, which resists higher levels of Cd<sup>2+</sup> concentrations than a *tolC* mutant (Figure 1B), expression of the ABC transporters did not afford an additional Cd<sup>2+</sup> resistance (Figure 2).

***hMDR1*, *lmrA*, and *omrA* Expression Results in a Lowered Metal Concentration in Bacteria.** Atomic absorption spectrometry was used to quantify the cadmium level associated with Cd-exposed *E. coli tolC*<sup>-</sup> cells that were transformed

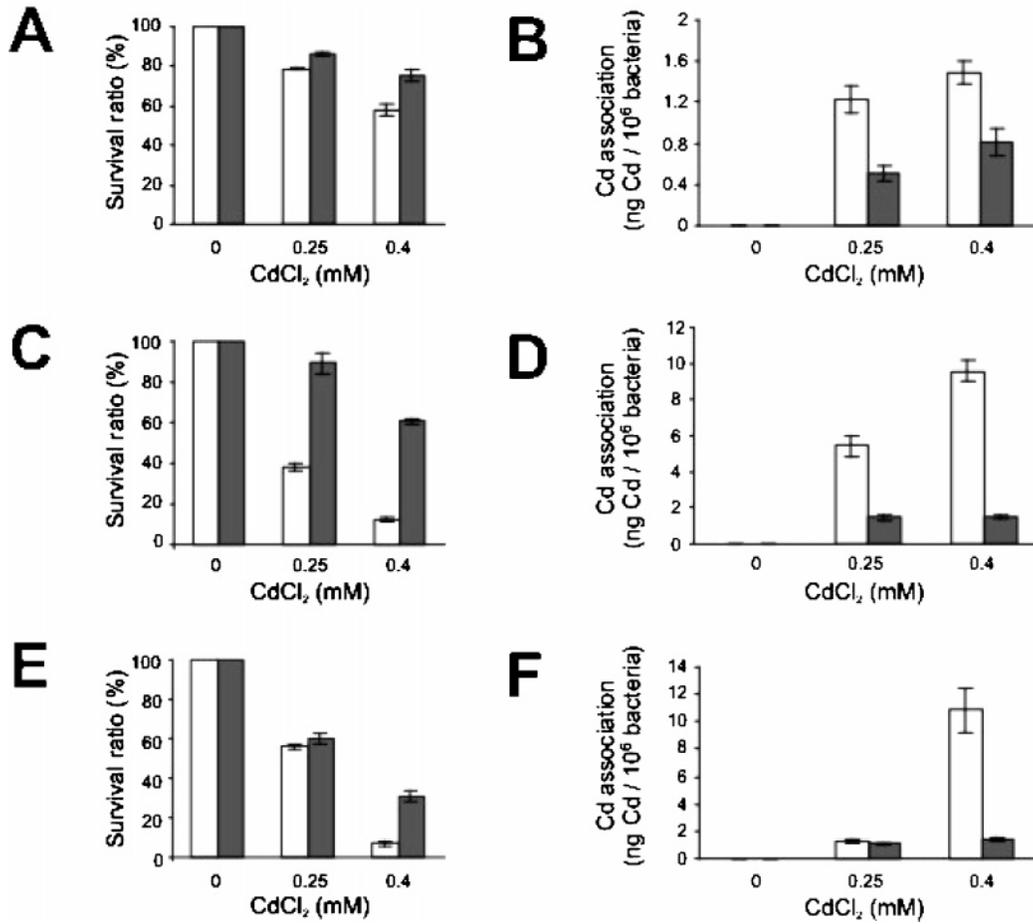


FIGURE 3: Heterologously expressed ABC MDR transporters in the *E. coli tolC* mutant reduce the cell-associated level of cadmium. *E. coli* CS1562 (*tolC* mutant) was transformed with control plasmids and *lmrA*-, *omrA*-, and *hMDR1*-containing plasmids. After 3 h of incubation with the indicated amount of cadmium, the bacterial cultures were either serially diluted and plated or used for metal quantification. Colonies were counted, and the survival ratios were calculated as the colony-forming units observed at a given concentration of cadmium to that observed without added toxic compound (A, C, E). Cell-associated cadmium concentrations were determined by atomic absorption spectrometry, and results were expressed in ng of Cd<sup>2+</sup>/10<sup>6</sup> bacteria (B, D, F). The number of bacteria per digested pellet was determined by cell numeration. (A, B) Bacteria were transformed with either pGK13 or pGK*LmrA*. (C, D) Bacteria were transformed with either pCR-XL-TOPO or pJPB66 (containing the *omrA* gene). (E, F) Bacteria were transformed with either pSF or pSF-MDR. White bars stand for survival ratio or Cd<sup>2+</sup> associated with control bacteria and black ones for survival ratio or Cd<sup>2+</sup> associated with bacteria expressing one of the ABC transporters.

with either *hMDR1*-, *lmrA*-, *omrA*-containing plasmids or a control plasmid. When the culture medium contained 0.25 or 0.4 mM CdCl<sub>2</sub>, a marked decrease in cell-associated Cd<sup>2+</sup> was observed in cells expressing *hMDR1*, *lmrA*, or *omrA* as compared to the control (Figure 3A,C,E). At 0.4 mM CdCl<sub>2</sub>, an 8-, 2-, and 6-fold decrease in cell-associated Cd<sup>2+</sup> was observed with cells expressing *hMDR1*, *lmrA*, and *omrA*, respectively. This reduction in cell-associated cadmium correlated with the 4.4-, 1.3-, and 5-fold increases in survival observed in the cells expressing *hMDR1*, *lmrA*, and *omrA*, respectively (Figure 3B,D,F). Some differences in cadmium accumulation were observed among the control cells (bacteria transformed with empty vectors, Figure 3). However, these differences likely reflect differences in growth temperature (in the case of pSF transformed bacteria) or plasmid copy number (high for pCR-XL-TOPO and low for pGK13). These data suggest that MDR1, LmrA, and OmrA provide cadmium resistance to cells through metal pumping.

***LmrA*-Mediated Cadmium Transport.** The increased resistance of cells to cadmium upon expression of MDR transporters is most likely due to an increased cellular extrusion of the cadmium. To establish a direct biochemical

demonstration of the ability of the MDR transporter to extrude cadmium, radioactive cadmium transport experiments were conducted with inside-out vesicles derived from *L. lactis* cells expressing LmrA. The cadmium concentration used in these experiments was set to 50 μM to facilitate the detection of the transport activity. This concentration is in the range of xenobiotic concentrations used in LmrA mechanistic studies (20). Control membrane vesicles were prepared from *L. lactis* NZ9000 ( $\Delta$ *LmrA*) cells harboring the control plasmid pNZ8048. Before the addition of ATP, nonspecific cadmium adsorption was observed with the membrane vesicles. This behavior is characteristic of divalent metal/membrane interaction, since we could also observe Cd<sup>2+</sup> binding on dead or alive *E. coli* cells within seconds using a cadmium-specific electrode (data not shown).

<sup>109</sup>Cd<sup>2+</sup> transport was initiated by the addition of 2 mM ATP. LmrA-containing inside-out vesicles accumulated more cadmium than the control membranes (Figure 4A). This difference was calculated to be 30 ± 7 pmol of Cd·min<sup>-1</sup>·(mg of protein)<sup>-1</sup> (*P* < 0.05). To test if cadmium accumulation is dependent on the hydrolysis of ATP, the same experiment was performed with the nonhydrolyzable ATP analogue,

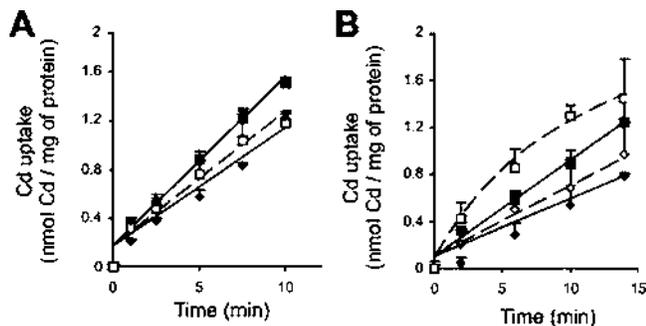


FIGURE 4: (A) LmrA-mediated ATP-dependent  $^{109}\text{Cd}^{2+}$  uptake in inside-out membrane vesicles. The uptake of  $^{109}\text{Cd}^{2+}$  by inside-out vesicles derived from cells that overexpressed LmrA (squares) or that were devoid of LmrA (diamonds) was measured in the presence of ATP (filled square/diamond, solid line) or AMP-PNP (open square, dotted line). Values shown are the means with the indicated standard deviation ( $n = 3$ ).  $^{109}\text{Cd}^{2+}$  was added at time  $-1$ , and reactions were started at time 0 by the addition of ATP or AMP-PNP. At time 0, the cadmium level was set to 0 to avoid background related to a nonspecific binding of cadmium to the membrane vesicles. (B) LmrA-catalyzed uptake of  $^{109}\text{Cd}^{2+}$  is stimulated by glutathione. The uptake of  $^{109}\text{Cd}^{2+}$  by inside-out vesicles derived from cells that overexpressed LmrA (filled and open squares) or control vesicles that were devoid of LmrA (filled and open diamonds) was measured in the presence of ATP in the presence (open symbols, thick line) or absence (filled symbols, thin line) of GSH. Values shown are means  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ).  $^{109}\text{Cd}^{2+}$  and GSH were added 1 min before starting the reaction by the addition of ATP. At time 0, the cadmium level was set to 0 to avoid background related to a nonspecific binding of cadmium to the membrane vesicles. The transport activity was defined as the amount of cadmium taken up during the first 2 min.

AMP-PNP. Again, the difference of  $^{109}\text{Cd}^{2+}$  uptake kinetics by LmrA-containing vesicles with ATP compared to AMP-PNP was  $30 \pm 10$  pmol of  $\text{Cd} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg of protein})^{-1}$  ( $P < 0.05$ ). Moreover, no significant difference of  $\text{Cd}^{2+}$  uptake kinetics was observed between the LmrA-containing vesicles in the presence of AMP-PNP as compared to the control membranes with ATP. Taken together, these data suggest that LmrA mediates a low transport activity of  $\text{Cd}^{2+}$ .

The transport assays were carried out in the absence of glutathione, cysteine, or other molecules that may form a thiolate complex with  $\text{Cd}^{2+}$ . Nevertheless, the assay contains ATP to drive the LmrA function. ATP may also function as a cadmium ion vehicle as ABC transporters such as CFTR or hMDR1 have been shown to pump  $\text{Mg-ATP}$  (21, 22). YCF1-catalyzed cadmium extrusion is dependent on glutathione (GSH) and more precisely on the bis(glutathionato)-cadmium complex (6). Therefore, we addressed the possible influence of GSH on LmrA-mediated cadmium transport.  $^{109}\text{Cd}^{2+}$  transport by LmrA containing inside-out vesicles was measured in the presence of ATP with or without  $625 \mu\text{M}$  GSH and compared with control vesicles (Figure 4B). In the absence and presence of glutathione, the difference in transport activity between the LmrA and control membranes was  $28 \pm 7$  and  $124 \pm 42$  pmol of  $\text{Cd} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg of protein})^{-1}$ , respectively ( $P < 0.05$ ). This demonstrates that glutathione stimulates the LmrA-mediated cadmium transport activity by more than 4-fold.

## DISCUSSION

Here we report on the ability of the heterologous expression of human *MDR1* and the bacterial *lmrA* and *omrA* genes

to confer resistance in *E. coli* to cadmium. This study reveals a novel function of these proteins and provides a mechanistic explanation for the observation that rat *mdr1* overexpression protects kidney cells against cadmium-mediated apoptosis (23). Surprisingly, overexpression of human P-gp in renal carcinoma cells does not result in an increased resistance to cadmium (11). However, in these cells the activity of P-gp might have been masked by the activity of MRP proteins. Indeed, the nematode *Caenorhabditis elegans* becomes hypersensitive to heavy metals when both the MRP homologue and a member of the P-pg gene family are deleted (24).

We noted that the MDR protein mediated cadmium resistance was only evident in an *E. coli* strain lacking the outer membrane protein TolC. Loss of TolC is known to increase sensitivity to detergents and drugs, but it was unknown that a *tolC* mutation also results in an increased  $\text{Cd}^{2+}$  sensitivity. It has been suggested that residual metal resistance in a strain disrupted in both *zntA*, a P-type zinc ATPase, and *zitB*, a zinc/ $\text{H}^+$  antiporter of the major facilitator superfamily, is caused by additional factors or systems (25). Our studies suggest that one of these factors is TolC (and possibly associated inner membrane transporters such as AcrAB) since the MIC for  $\text{Cd}^{2+}$  was shifted from 1.1 to 0.35 mM in *tolC*<sup>+</sup> and *tolC*<sup>-</sup> strains, respectively. Alternatively, the pleiotropic effects displayed by the *tolC* mutant could explain its increased sensitivity. Resistance to  $\text{Cd}^{2+}$  and to ethidium bromide conferred by MDR transporters was only observed in a *tolC*<sup>-</sup> genetic background (Figure 1A). This loss of a detectable MDR function in the *tolC*<sup>+</sup> strains suggests that TolC impedes or masks the ability of these heterologously expressed MDR proteins to resist Cd. The latter may be due to the presence of functional and efficient endogenous cadmium scavenging systems in the TolC-containing strain.

The present observed cadmium resistance associated with the three exogenous ABC protein expressions is unlikely the result of an interaction between these proteins and endogenous *E. coli* metal transporters such as the P-type ATPase ZntA (26). First, the observed bacterial resistance is abolished by verapamil, while verapamil is not a known inhibitor of P-type ATPase. Furthermore, verapamil inhibition of ZntA would lead to a lack of growth at high  $\text{Cd}^{2+}$  concentrations [MIC 0.03 mM (27)] whereas growth in the presence of verapamil was observed at 0.4 mM  $\text{CdCl}_2$ . In addition, at the concentration used, verapamil exerted no effect on the colony formation of the control *E. coli* strains on solid media, demonstrating that the observed reversal of metal resistance is not due to inhibition of an endogenous *E. coli* system but rather to the inhibition of LmrA, OmrA, and hMDR1. Second, the LmrA activity is independent from accessory proteins (20), and murine and human MDR1 genes have previously been expressed functionally in *E. coli* without requirement of an endogenous system or factor (28, 29).

Bacterial resistance to cadmium effected by LmrA, OmrA, and hMDR1 is also unlikely to be due to a physicochemical modification of the inner membrane which may in turn decrease the efficiency of the divalent metal ion uptake system ZupT (30). First, such an influence on ZupT activity would have a strong impact on bacterial systems requiring an optimal supply in  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  and thus would affect

cell activity or growth. We found no difference between the growth curves of bacteria expressing or devoid of heterologously expressed MDR-like transporters (data not shown). Second, it has already been shown that the expression of the murine *MDR1* gene in *E. coli* is not accompanied by a dissipation of the protonmotive force as lactose transport by LacY remained fully functional (28). Also, *hMDR1* does not affect the levels of the protonmotive force when expressed in mammalian cells (31). Finally, the cellular ATP levels, as measured by a luminescent assay, were not affected in the transformed bacteria (data not shown), which shows that the energy status of the cell is not significantly influenced. Third, contrary to previous adopted strategies to express the human and murine *MDR1* genes in *E. coli* (28, 29), we did not use a strong *E. coli* promoter to drive the expression of *lmrA*-, *omrA*-, and *hMDR1* genes in order to avoid membrane perturbation by high-level protein expression. Finally, the sodium dodecyl sulfate sensitivity of MDR-expressing bacteria was similar to that of control cells, indicating no major alterations of the cell envelope and membrane (data not shown).

Quantification of the cadmium level associated with cadmium-exposed *tolC*<sup>-</sup> bacteria (Figure 3) showed that cells expressing one of the three transporters contained 2 to 8 times less cadmium than control cells. This strongly suggests that the ABC proteins extrude Cd–glutathione complexes and, in the absence of glutathione, Cd–ATP complexes. Direct evidence for cadmium transport was obtained with membrane vesicles derived from *L. lactis*, despite an important LmrA nonspecific Cd<sup>2+</sup> binding. This high background might be due to the presence of the CadA-like P-type ATPase YuiA. In the absence of glutathione, LmrA-containing membranes showed a cadmium uptake rate of 28 pmol·min<sup>-1</sup>·(mg of protein)<sup>-1</sup> above that of control membranes. This transport rate is in the same order as previously shown for LmrA-catalyzed transport of daunomycin into inside-out *E. coli* membrane vesicles [7.8 pmol·min<sup>-1</sup>·(mg of protein)<sup>-1</sup>] (12). When glutathione was added to the medium, a more than 4-fold increase in the rate of cadmium transport was observed up to 124 pmol·min<sup>-1</sup>·(mg of protein)<sup>-1</sup>. Although much higher rates of cadmium transport have been reported for the yeast YCF1 (6) in the presence of glutathione [3.3 nmol·mg<sup>-1</sup>·(mg of protein)<sup>-1</sup>], it is difficult to directly compare these rates as they have been determined in vastly different experimental systems. Unlike YCF1, cadmium detoxification is likely not the primary function of LmrA. Among the superfamily of ABC transporters several systems seem to have evolved to function as efficient metal ion detoxification devices, such as MRP1, LtpgpA, and YCF1, while others have retained this activity with only a lower efficiency.

A weak ATP-dependent LmrA-mediated Cd<sup>2+</sup> transport activity occurred without added glutathione. Under those conditions, Cd<sup>2+</sup> may be complexed with ATP (32) which was present in large excess. Murine and *Drosophila* P-gp homologues have been shown to serve as ATP-conducting channels in the plasma membrane (21, 33). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), a chloride channel that belongs to the ABC superfamily, has also been demonstrated to conduct ATP movements (22). Finally, the ZntA ATPase accumulates Cd<sup>2+</sup> in inside-out membrane vesicles 5-fold more efficiently in the presence of cysteine

than in its absence (26). Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, and Zn<sup>2+</sup> form complexes with thiolates with affinities that are several orders of magnitude greater than complexes with ATP (26). This may explain the increased LmrA-mediated Cd<sup>2+</sup> transport activity in the presence of glutathione.

A high, nonspecific Cd<sup>2+</sup> binding and transport activity of *E. coli* membrane vesicles precluded an accurate analysis of OmrA- and hMDR1-mediated <sup>109</sup>Cd transport. However, given the structural and functional relatedness of OmrA and hMDR1 with LmrA, and the observation that these systems render *E. coli* cells more resistant to Cd<sup>2+</sup> with a concomitant decrease in intracellular cadmium concentrations, it is likely that OmrA and hMDR1 also extrude Cd<sup>2+</sup>. These systems have more in common. First, both LmrA and OmrA were shown to protect bacteria against sodium laurate toxicity and ethanol and wine shocks (15). Second, both CFTR and MDR proteins share ATP- and chloride-channel activity (21, 22, 34). Third, CFTR is able to release glutathione into airway surface fluid (35) and then displays functional similarity with the ABC proteins MRP1, MRP2, and YCF1 (2, 3, 6). Fourth, overexpression of CFTR leads to a multidrug resistance phenotype (36). And vice versa, induction by antitumoral drugs of *hMDR1* and *hMRP1* complements CFTR function (37). These results raise the possibility that ABC transporters may be interchanged, as outlined by the complementary patterns of expression of the *CFTR* and *hMDR1* genes observed in vivo (38). The common functional features in ABC transporters are likely to be explained by an early evolutionary event. ABC genes may have evolved separately and acquired a more specialized activity, while maintaining their general function with low efficiency. For instance, hMDR1, LmrA, and OmrA proteins are specialized in xenobiotic scavenging but still are able to confer some resistance against metals. In the future, it would be valuable to determine the selectivity of such proteins among heavy metals.

## REFERENCES

- Gottesman, M. M., and Pastan, I. (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter, *Annu. Rev. Biochem.* 62, 385–427.
- Keppler, D., Leier, I., and Jedlitschky, G. (1997) Transport of glutathione conjugates and glucuronides by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2, *Biol. Chem.* 378, 787–791.
- Zaman, G. J., Lankelma, J., van Tellingen, O., Beijnen, J., Dekker, H., Paulusma, C., Oude Elferink, R. P., Baas, F., and Borst, P. (1995) Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 7690–7694.
- Bard, S. M. (2000) Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms, *Aquat. Toxicol.* 48, 357–389.
- Dey, S., Ouellette, M., Lightbody, J., Papadopolou, B., and Rosen, B. P. (1996) An ATP-dependent As(III)-glutathione transport system in membrane vesicles of *Leishmania tarentolae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 2192–2197.
- Li, Z. S., Lu, Y. P., Zhen, R. G., Szczyzka, M., Thiele, D. J., and Rea, P. A. (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 42–47.
- Tommasini, R., Evers, R., Vogt, E., Mornet, C., Zaman, G. J., Schinkel, A. H., Borst, P., and Martinoia, E. (1996) The human multidrug resistance-associated protein functionally complements the yeast cadmium resistance factor 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 6743–6748.
- Achard, M., Baudrimont, M., Boudou, A., and Bourdineaud, J. P. (2004) Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR)

- in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure, *Aquat. Toxicol.* 67, 347–357.
9. Eufemia, N. A., and Epel, D. (2000) Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein, in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stresses, *Aquat. Toxicol.* 49, 89–100.
  10. Vernhet, L., Courtois, A., Allain, N., Payen, L., Anger, J.-P., Guillouzo, A., and Fardel, O. (1999) Overexpression of the multidrug resistance-associated protein (MRP1) in human heavy metal-selected tumor cells, *FEBS Lett.* 443, 321–325.
  11. Chin, K. V., Tanaka, S., Darlington, G., Pastan, I., and Gottesman, M. M. (1990) Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (*MDR1*) gene in human renal carcinoma cells, *J. Biol. Chem.* 265, 221–226.
  12. van Veen, H. W., Venema, K., Bolhuis, H., Oussenko, I., Kok, J., Poolman, B., Driessen, A. J. M., and Konings, W. N. (1996) Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 10668–10672.
  13. van Veen, H. W., Callaghan, R., Soceneantu, L., Sardini, A., Konings, W. N., and Higgins, C. F. (1998) A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multidrug-resistance P-glycoprotein gene, *Nature* 391, 291–295.
  14. van Veen, H. W., Margolles, A., Muller, M., Higgins, C. F., and Konings, W. N. (2000) The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism, *EMBO J.* 19, 2503–2514.
  15. Bourdineaud, J.-P., Nehme, B., Tesse, S., and Lonvaud-Funel, A. (2004) A bacterial gene homologous to ABC transporters protect *Oenococcus oeni* from ethanol and other stress factors in wine, *Int. J. Food Microbiol.* 92, 1–14.
  16. Austin, E. A., Graves, J. F., Hite, L. A., Parker, C. T., and Schnaitman, C. A. (1990) Genetic analysis of lipopolysaccharide core biosynthesis by *Escherichia coli* K-12: insertion mutagenesis of the *rfa* locus, *J. Bacteriol.* 172, 5312–5325.
  17. Gajic, O., Buist, G., Kojic, M., Topisirovic, L., Kuipers, O. P., and Kok, J. (2003) Novel mechanism of bacteriocin secretion and immunity carried out by lactococcal multidrug resistance proteins, *J. Biol. Chem.* 278, 34291–34298.
  18. Baum, C., Hegewisch-Becker, S., Eckert, H. G., Stocking, C., and Ostertag, W. (1995) Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug resistance (*mdr-1*) gene in early hematopoietic cells, *J. Virol.* 69, 7541–7547.
  19. Tisa, L. S., Sekelsky, J. J., and Adler, J. (2000) Effects of organic antagonists of Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, and K<sup>+</sup> on chemotaxis and motility of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 182, 4856–4861.
  20. Margolles, A., Putman, M., van Veen, H. W., and Konings, W. N. (1999) The purified and functionally reconstituted multidrug transporter LmrA of *Lactococcus lactis* mediates the transbilayer movement of specific fluorescent phospholipids, *Biochemistry* 38, 16298–16306.
  21. Abraham, E. H., Prat, A. G., Gerweck, L., Seneveratne, T., Arceci, R. J., Kramer, R., Guidotti, G., and Cantiello, H. F. (1993) The multidrug resistance (*mdr1*) gene product functions as an ATP channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 312–316.
  22. Reisin, I. L., Prat, A. G., Abraham, E. H., Amara, J. F., Gregory, R. J., Ausiello, D. A., and Cantiello, H. F. (1994) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel, *J. Biol. Chem.* 269, 20584–20591.
  23. Thevenod, F., Friedmann, J. M., Katsen, A. D., and Hauser, I. A. (2000) Up-regulation of multidrug resistance P-glycoprotein via nuclear factor-kappaB activation protects kidney proximal tubule cells from cadmium- and reactive oxygen species-induced apoptosis, *J. Biol. Chem.* 275, 1887–1896.
  24. Broeks, A., Gerrard, B., Allikmets, R., Dean, M., and Plasterk, R. H. (1996) Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*, *EMBO J.* 15, 6132–6143.
  25. Grass, G., Fan, B., Rosen, B. P., Franke, S., Nies, D. H., and Rensing, C. (2001) ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 183, 4664–4667.
  26. Sharma, R., Rensing, C., Rosen, B. P., and Mitra, B. (2000) The ATP hydrolytic activity of purified ZntA, a Pb(II)/Cd(II)/Zn(II)-translocating ATPase from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 275, 3873–3878.
  27. Rensing, C., Mitra, B., and Rosen, B. P. (1997) The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 14326–14331.
  28. George, A. M., Davey, M. W., and Mir, A. A. (1996) Functional expression of the human *MDR1* gene in *Escherichia coli*, *Arch. Biochem. Biophys.* 333, 66–74.
  29. Bibi, E., Gros, P., and Kaback, H. R. (1993) Functional expression of mouse *mdr1* in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 9209–9213.
  30. Grass, G., Wong, M. D., Rosen, B. P., Smith, R. L., and Rensing, C. (2002) ZupT is a Zn(II) uptake system in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 184, 864–866.
  31. Luker, G. D., Flagg, T. P., Sha, Q., Luker, K. E., Pica, C. M., Nichols, C. G., and Pivnicka-Worms, D. (2001) MDR1 P-glycoprotein reduces influx of substrates without affecting membrane potential, *J. Biol. Chem.* 276, 49053–49060.
  32. Sigel, H. (1987) Isomeric equilibria in complexes of adenosine 5'-triphosphate with divalent metal ions. Solution structures of M(ATP)<sup>2-</sup> complexes, *Eur. J. Biochem.* 165, 65–72.
  33. Bosch, I., Jackson, G. R. J., Croop, J. M., and Cantiello, H. F. (1996) Expression of *Drosophila melanogaster* P-glycoproteins is associated with ATP channel activity, *Am. J. Physiol.* 271, C1527–C1538.
  34. Valverde, M. A., Diaz, M., Sepulveda, F. V., Gill, D. R., Hyde, S. C., and Higgins, C. F. (1992) Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein, *Nature* 355, 830–833.
  35. Linsdell, P., and Hanrahan, J. W. (1998) Glutathione permeability of CFTR, *Am. J. Physiol.* 275, C323–C326.
  36. Wei, L. Y., Stutts, M. J., Hoffman, M. M., and Roepe, P. D. (1995) Overexpression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in NIH 3T3 cells lowers membrane potential and intracellular pH and confers a multidrug resistance phenotype, *Biophys. J.* 69, 883–895.
  37. Lallemand, J. Y., Stoven, V., Annereau, J. P., Boucher, J., Blanquet, S., Barthe, J., and Lenoir, G. (1997) Induction by antimicrobial drugs of proteins that functionally complement CFTR: a novel therapy for cystic fibrosis?, *Lancet* 350, 711–712.
  38. Breuer, W., Slotki, I. N., Ausiello, D. A., and Cabantchik, I. Z. (1993) Induction of multidrug resistance downregulates the expression of CFTR in colon epithelial cells, *Am. J. Physiol.* 265, C1711–C1715.

BI047700R



## Faits marquants

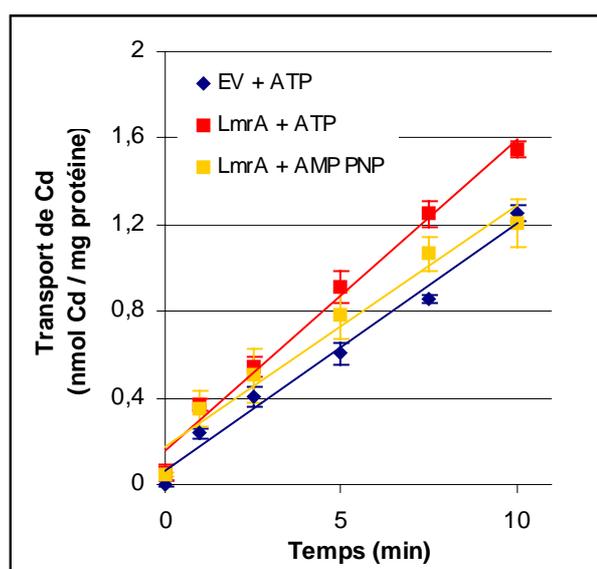
Grâce à l'outil bactérien utilisé dans cette étude, trois résultats essentiels ont été obtenus :

- Les tests de résistance en milieu gélifié ou liquide montrent que l'expression des trois transporteurs ABC, hMDR1, LmrA, et OmrA, confère aux bactéries une résistance au cadmium (Figure 2, Article 4-2).
- Cette augmentation de résistance est systématiquement associée à une concentration en cadmium intracellulaire plus faible que dans le cas de bactéries n'exprimant aucun de ces transporteurs (Figure 3, Article 4-2), démontrant de façon indirecte l'expulsion du cadmium.
- Les vésicules membranaires inversées préparées à partir de bactéries *L. lactis* sur-exprimant *lmrA* et le cadmium radioactif ont été des outils essentiels pour démontrer que le cadmium était bien expulsé.

Tout d'abord l'expérience décrite dans la figure 4 A de l'article 4-2 (reproduite en couleur ci-dessous) a permis :

- de visualiser ce pompage par la différence d'accumulation de cadmium entre les vésicules contrôle (bleu) et celles possédant LmrA (rouge).

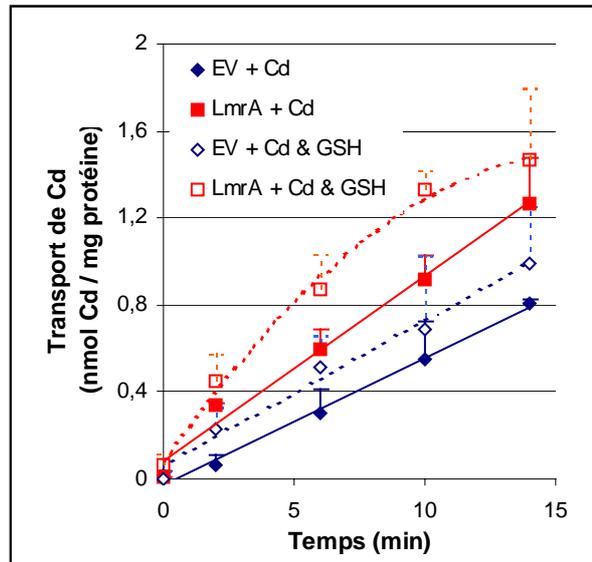
- de confirmer que LmrA était bien la pompe impliquée : en utilisant un analogue non hydrolysable de l'ATP (AMP-PNP), LmrA ne peut plus fonctionner (jaune) et l'accumulation du cadmium est identique à celle dans les vésicules contrôle (bleu).



**Figure 4 A, article 4-2.** LmrA : vésicules membranaires inversées possédant LmrA.

EV (Empty Vector) : vésicules membranaires inversées ne possédant pas LmrA.

Lors de l'expérience décrite dans la figure 4 B de l'article 4-2 (reproduite en couleur ci-dessous) nous nous sommes intéressés à l'influence du glutathion (GSH) sur le transport du cadmium par LmrA. Nous avons effectué ces expériences car il a été montré que YCF1 (Yeast cadmium resistance factor1), un autre transporteur de type MDR (Tommasini *et al.*, 1996), expulse le cadmium sous forme de complexe bis(glutathionato)-cadmium (Li *et al.*, 1997).



**Figure 4 B, article 4-2.** LmrA : vésicules membranaires inversées possédant LmrA.  
EV (Empty Vector) : vésicules membranaires inversées ne possédant pas LmrA.

L'écart entre les vitesses de pompage du cadmium dans les vésicules contenant LmrA (rouge) et dans celles contrôle (bleu) étant plus important en présence de GSH (courbes en pointillé) qu'en absence (courbe en trait plein) cela suggère que le cadmium est préférentiellement pompé associé au glutathion. Cependant, la formation de complexes ATP-cadmium n'est pas exclue.

### 2.3- Deuxième étude : bactéries contaminées avec du zinc ou du mercure

Comme nous le montre le transfert western de la figure 5 de l'article 4-1, la contamination des bivalves par le zinc et le mercure entraîne, comme dans le cas du cadmium, l'augmentation de la quantité d'une protéine de type MDR dans les tissus de l'animal. Pour terminer ce chapitre, nous avons voulu déterminer, en utilisant le même modèle bactérien, si l'expression de ce type de protéines conférerait également une résistance au zinc et au mercure.

La démarche expérimentale utilisée est la même que pour l'article précédent : en particulier, la même souche bactérienne (CS1562, mutant *tolC*) transformée par les mêmes plasmides (tableau 4.1) a été utilisée. Les protocoles de tests en goutte, de détermination des pourcentages de survie et de quantité de métaux dans les bactéries sont les mêmes. Dans le cas du zinc, la limite de détection est de 10 µg de Zn.L<sup>-1</sup> (153 nM) avec le spectromètre d'absorption atomique utilisé (Varian SpectrAA 220 FS). Dans le cas du mercure, les dosages ont été effectués par spectrométrie d'absorption atomique sans flamme (Leco Ama 254) sur des échantillons bactériens non traités à l'acide nitrique (comme c'est le cas pour le cadmium et le zinc) mais juste lavées avec un tampon de rinçage (10 mM Tris HCl, pH 7,4, et 0,15 mM NaCl). La limite de détection est de 0,01 ng de Hg.

#### **Choix des gammes de concentrations de zinc et de mercure**

La détermination des concentration inhibitrices 50 (CI<sub>50</sub>) permet de choisir des concentrations en zinc ou en mercure adéquates pour contaminer les différentes bactéries transformées par chacun des plasmides, (Tableau 4.2). La mesure des CI<sub>50</sub> permet déjà de mettre en évidence l'effet bénéfique qu'a l'expression d'un transporteur MDR lors d'une contamination par le zinc ou le mercure, puisqu'elles sont systématiquement plus élevées pour les bactéries transformées avec un plasmide permettant l'expression d'une protéine MDR.

**Tableau 4.2.** CI<sub>50</sub> du zinc et du mercure pour la souche *E. coli* CS1562 transformée avec les plasmides du tableau 1.4. Dans une même case, le chiffre de gauche indique la CI<sub>50</sub> pour les bactéries transformées avec un plasmide contrôle et celui de droite la CI<sub>50</sub> pour les bactéries transformées avec un plasmide permettant l'expression d'OmrA, hMDR1, ou LmrA.

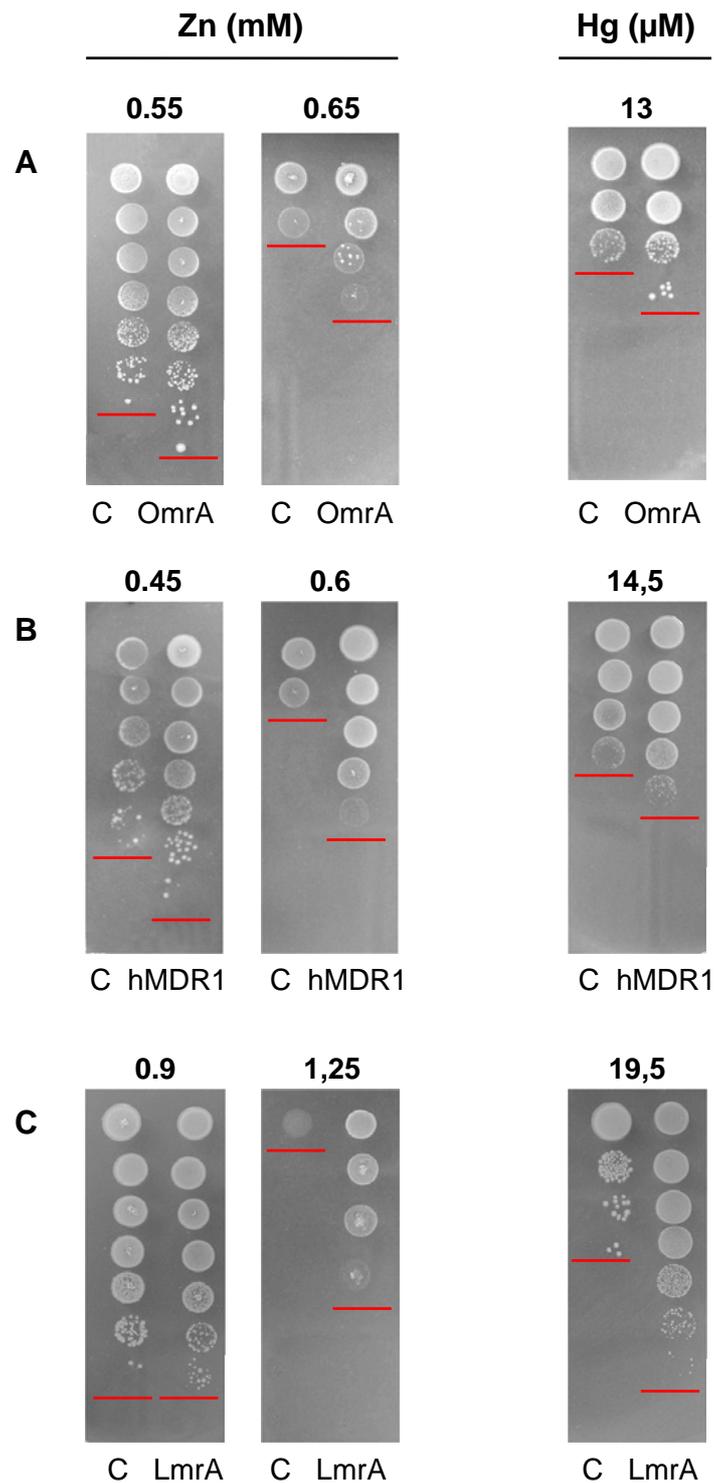
Plasmide présent dans la bactérie	IC <sub>50</sub> pour le zinc (mM)	IC <sub>50</sub> pour le mercure (µM)
pCR-XL-TOPO / pJPB66 (OmrA)	0,55 / 0,65	9 / 11,5
pSF / pSF-MDR1	0,45 / 0,6	11,5 / 13
pGK13 / pGKLmrA	0,9 / 1,25	12,5 / 16

Comme nous l'avons noté lors de l'étude précédente avec le cadmium, parmi les bactéries contrôles, les bactéries transformées avec pGK13 sont moins sensibles au zinc et au mercure que celles possédant pSF ou pCR-XL-TOPO. Ces disparités peuvent être une conséquence des différences dans le nombre de copie des plasmides contrôles (haut pour pSF et pCR-XL-TOPO, bas pour pGK13) et dans la température de croissance des bactéries (28°C pour celles possédant pSF et 37°C pour les autres).

### **Tests de résistance en milieu gélifié ou liquide**

- Des tests de résistance ont été effectués en milieu gélifié (tests en goutte). Les concentrations de chlorure de zinc sont celles indiquées dans le tableau 4.2 ; par contre dans le cas du chlorure de mercure des concentrations supérieures aux  $CI_{50}$  déterminées en milieu liquide ont dû être utilisées pour observer un effet toxique du métal. Ceci suggère une plus faible biodisponibilité des ions  $Hg^{2+}$  dans le gel que dans le milieu liquide. Aucune explication n'est réellement satisfaisante, mais cette différence pourrait peut être s'expliquer par le mode de préparation des milieux. Le mercure doit être ajouté à du LB-agar encore chaud pour pouvoir couler le milieu dans une boîte de Pétri. Deux hypothèses peuvent être envisagées : soit une partie du mercure pourrait se complexer avec des composés présents dans le milieu LB-agar, soit la gélification du milieu entraîne une diminution importante de la diffusion passive ce qui, dans les deux cas, le rendrait moins biodisponible qu'en milieu liquide.

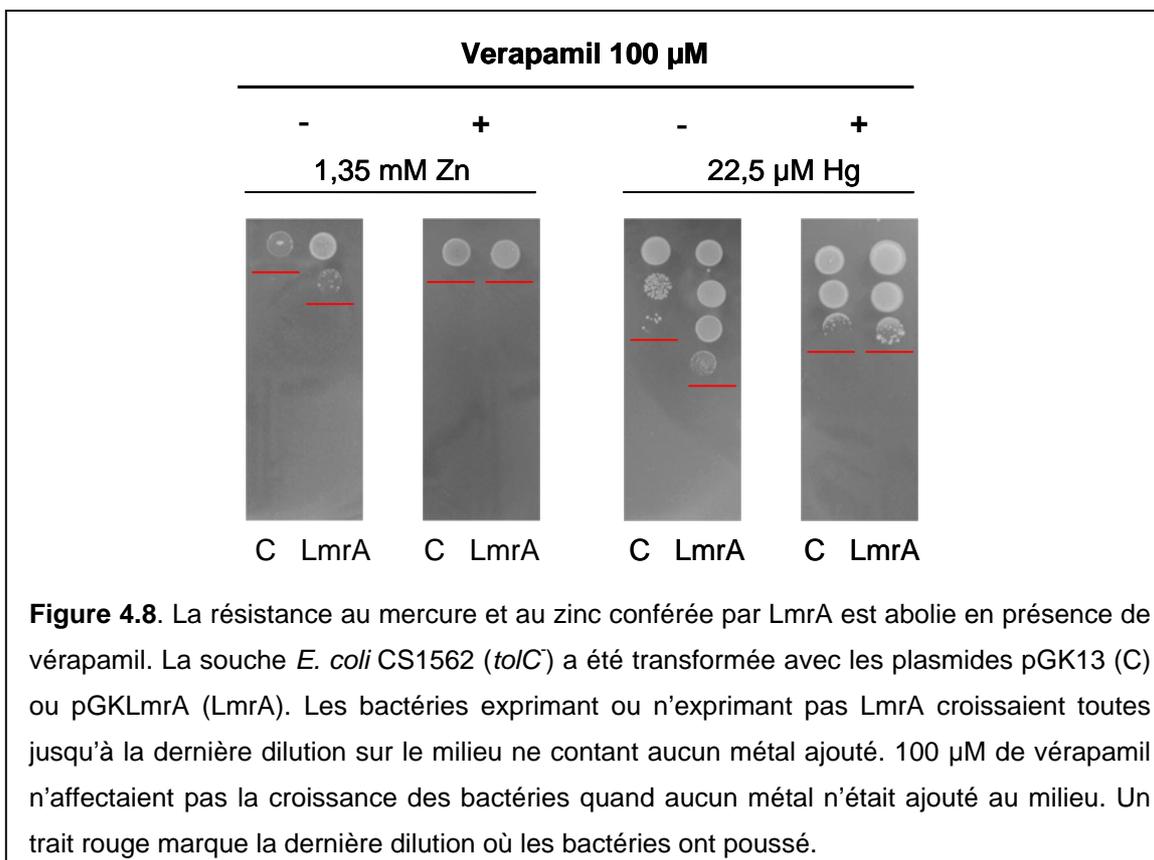
Comme avec le cadmium, l'expression de *omrA*, *hMDR1*, et *ImrA* dans la souche *E. coli* CS1562 (*tolC*) se manifeste par une résistance accrue au chlorure de zinc et de mercure. Cette résistance se visualise par une croissance de colonies bactériennes exprimant l'un des trois transporteurs à une plus forte dilution que celles possédant le plasmide contrôle correspondant (Figure 4.7).



**Figure 4.7.** OmrA, hMDR1, et LmrA confèrent une protection supplémentaire par rapport aux bactéries contrôle vis à vis du zinc et du mercure.

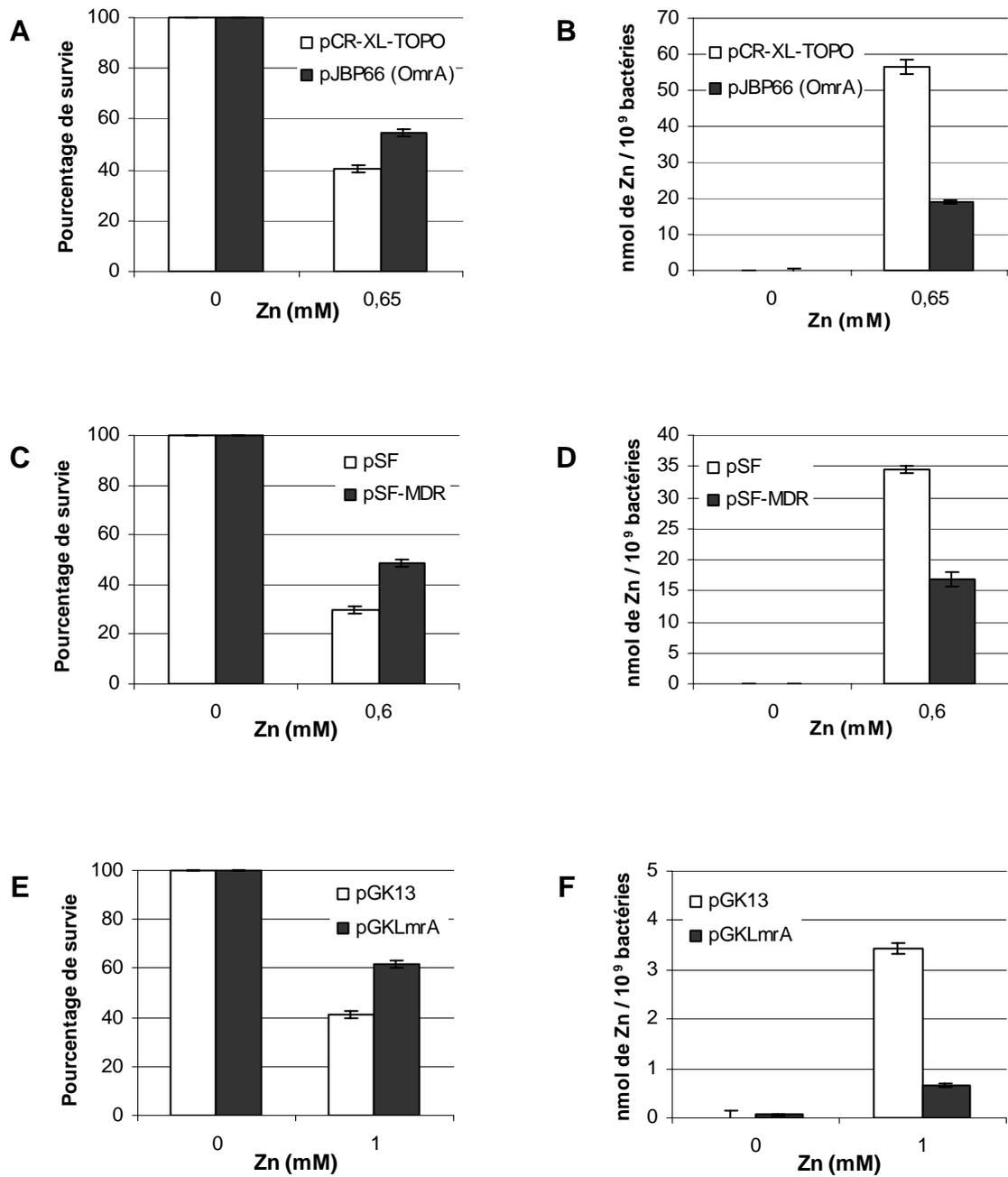
La souche *E. coli* CS1562 (*tolC*) a été transformée avec les plasmides portant *omrA*, *hMDR1*, *lmrA*, et avec les plasmides contrôles correspondant. **A.** pCR-XL-TOPO (C) ou pJPB66 (OmrA). **B.** pSF (C) ou pSF-MDR (hMDR1). **C.** pGK13 (C) ou pGKLmrA (LmrA). Notons que les bactéries exprimant ou n'exprimant pas un des trois transporteurs croissaient toutes jusqu'à la 8<sup>ième</sup> dilution sur le milieu ne comptant aucun métal ajouté.

- Afin de vérifier si les effets protecteurs observés en présence de zinc ou de mercure sont bien dus à un mécanisme de résistance MDR-dépendant, des tests en goutte ont été effectués en ajoutant ou non dans le milieu un inhibiteur des protéines MDR : le vérapamil. Quel que soit le transporteur exprimé, l'ajout de 100  $\mu\text{M}$  de vérapamil supprime toute résistance supplémentaire par rapport aux bactéries contrôles. L'exemple de LmrA est détaillé dans la figure 4.8.



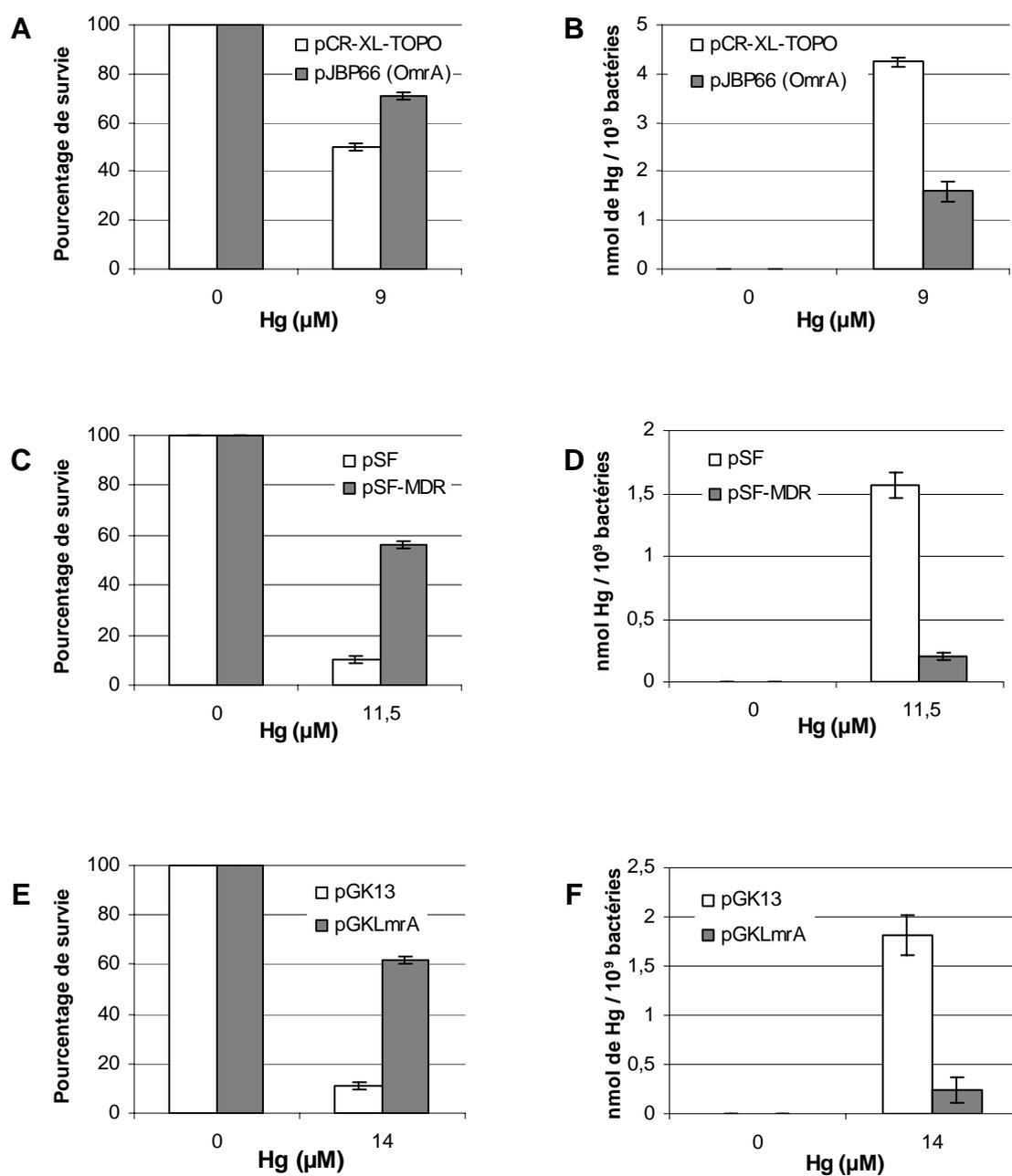
#### Détermination de la quantité de métal associé aux bactéries

- L'utilisation du vérapamil permet de démontrer que le mécanisme de protection contre le zinc et le mercure est MDR-dépendant mais pas d'affirmer qu'il s'agit d'un pompage des métaux hors de la cellule. La quantité de zinc ou de mercure accumulée dans des bactéries exprimant ou non l'un des trois transporteurs permet d'apporter un élément de réponse. Brièvement, les bactéries ont été contaminées avec des doses de zinc ou de mercure indiquées dans les figures 4.9 et 4.10. Après 3 heures, une partie des cultures a été diluée et étalée sur milieu gélosifié sans composé toxique et l'autre partie utilisée pour doser le zinc ou le mercure associé aux bactéries. Le nombre de colonies formées après une nuit d'incubation, correspondant au nombre de bactéries étalées avant l'incubation, a été compté.



**Figure 4.9.** L'expression d'un transporteur MDR dans la souche *E. coli* CS1562 (mutant *tolC*) conduit à une réduction de la concentration en zinc dans les cellules.

(A, C, E). Le pourcentage de survie est défini comme le rapport du nombre de bactéries vivantes dans la culture contaminée au zinc sur le nombre de bactéries vivantes dans la culture non contaminée (B, D, F). La quantité de zinc associée est exprimée en nmol de Zn<sup>2+</sup>/10<sup>9</sup> bactéries.



**Figure 4.10.** L'expression d'un transporteur MDR dans la souche *E. coli* CS1562 (mutant *tolC*) conduit à une réduction de la concentration en mercure dans les cellules.

(A, C, E). Le pourcentage de survie est définie comme le rapport du nombre de bactéries vivantes dans la culture contaminée au mercure sur le nombre de bactéries vivantes dans la culture non contaminée (B, D, F). La quantité de mercure associée aux cellules est exprimée en nmol de  $\text{Hg}^{2+}/10^9$  bactéries.

Deux résultats ressortent des figures 4.9 et 4.10:

- L'augmentation du taux de survie lorsque les bactéries sont porteuses d'un plasmide permettant l'expression de l'un des trois transporteurs ABC, lors d'une contamination par le zinc ou le mercure
- Cette augmentation du taux de survie est clairement corrélée à la diminution de la quantité de métal dans les bactéries, et ceci aussi bien pour le zinc que pour le mercure.

En effet, la quantité de Zn diminue pour les bactéries exprimant *omrA* (3 fois moins), *hMDR1* (2,1 fois moins) et *lmrA* (5,1 fois moins) (Figure 4.9 B, D, F). Ceci est en accord avec les pourcentages de survie augmentés de 14% pour *OmrA*, 19% pour *hMDR1*, et de 21% pour *LmrA* (Figure 4.9 A, C, E).

Dans le cas du mercure, la corrélation entre le taux de survie et la diminution de la quantité de métal dans les bactéries est également très nette : les bactéries exprimant *omrA*, *hMDR1*, ou *lmrA* présentent moins de mercure que les contrôles (respectivement 2,7, 7,5 et 7,5 fois moins) (Figure 4.10 B, D, F) et le taux de survie est augmenté de 21%, 46%, et 51% pour les bactéries exprimant *omrA*, *hMDR1*, et *lmrA* respectivement (Figure 4.10 A, C, E).

En conclusion, ces études ont permis d'établir une relation entre l'expression accrue d'une protéine de type MDR et la résistance bactérienne aux métaux. Nous avons pu démontrer, dans le cas du cadmium, que cette résistance est due à un pompage du métal hors de la cellule.

Dans le cas du zinc et du mercure seules des corrélations entre l'expression du transporteur, la résistance accrue par rapport aux bactéries contrôles, et la diminution de la quantité de métal dans les bactéries ont été établies. Mais compte tenu des résultats obtenus avec le cadmium, on peut raisonnablement supposer que les transporteurs MDR étudiés peuvent également expulser le zinc et le mercure. Pour en apporter une preuve définitive, nous souhaiterions pouvoir effectuer des expériences avec des vésicules membranaires inversées de *L. lactis* possédant ou non *LmrA* afin de confirmer ce transport, de voir s'il est dépendant de l'ATP, et de montrer sous quelles formes le zinc et le mercure peuvent être transportés.

#### COMPLÉMENTS DE RÉFÉRENCES DU CHAPITRE 4

- Bain L, LeBlanc G. 1996. Interaction of structurally diverse pesticides with the human *MDR1* gene product P-glycoprotein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141, 288-298.
- Bard SM. 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 48, 357-389.
- Bard SM, Bello SM, Hahn ME, Stegeman JJ. 2002. Expression of P-glycoprotein in killifish (*Fundulus heteroclitus*) exposed to environmental xenobiotics. *Aquat. Toxicol.* 59, 237-251.
- Baum C, Hegewisch-Becker S, Eckert HG, Stocking C, Ostertag W. 1995. Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug resistance (*mdr-1*) gene in early hematopoietic cells. *J. Virol.* 69, 7541-7547.
- Bishop L, Agbayani R, Ambudkar SV, Malolney PC, Ames GFL. 1989. Reconstitution of bacterial periplasmic permease in proteoliposomes and demonstration of ATP hydrolysis concomitant with transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 6953-6957.
- Bolhuis H, van Veen HW, Molenaar D, Poolman B, Driessen AJ, Konings WN. 1996. Multidrug resistance in *Lactococcus lactis*: evidence for ATP-dependent drug extrusion from the inner leaflet of the cytoplasmic membrane. *EMBO J.* 15, 4239-4245.
- Bourdineaud J-P, Nehme B, Tesse S, Lonvaud-Funel A. 2004. A bacterial gene homologous to ABC transporters protect *Oenococcus oeni* from ethanol and other stress factors in wine. *Int. J. Food Microbiol.* 92, 1-14.
- Chang G. 2003. Structure of MsbA from *Vibrio cholera*: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation. *J. Mol. Biol.* 330, 419-430.
- Chang G, Roth CB. 2001. Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporter. *Science* 293, 1793-1800.
- Chin KV, Tanaka S, Darlington G, Pastan I, Gottesman MM. 1990. Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (*MDR1*) gene in human renal carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 265, 221-226.
- Davidson AL, Chen J. 2005. Flipping lipids: is the third time the charm? *Science* 308, 963-965.
- Ecker GF, Pleban K, Kopp S, et al. 2004. A three-dimensional model for the substrate binding domain of the multidrug ATP binding cassette transporter LmrA. *Mol. Pharmacol.* 66, 1169-1179.
- Eufemia N, Girshick S, Epel D. 2000. Algal products as naturally occurring modulators for the multidrug resistance (MDR) transporter. *Mar. Environ. Res.* 50, 332-333.

- Eufemia NA, Epel D. 2000. Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein, in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stresses. *Aquat. Toxicol.* 49, 89-100.
- Fardel O, Lecreur V, Corlu A, Guillouzo A. 1996. P-glycoprotein induction in rat liver epithelial cells in response to acute 3-methylcholanthrene treatment. *Biochem. Pharmacol.* 51, 1427-1436.
- Fath MJ, Kolter R. 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* 57, 995-1017.
- Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I. 1987. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 265-269.
- Fromm MF. 2002. The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 1295-1310.
- Georges E, Bradley G, Garipey J, Ling V. 1990. Detection of p-glycoprotein isoforms by gene specific monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 87, 152-156.
- Gottesman MM, Hrycyna CA, Schoenlein PV, Germann UA, Pastan I. 1995. Genetic analysis of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Genet.* 29, 607-649.
- Gottesman MM, Pastan I. 1998. Resistance to multiple chemotherapeutic agents in human cancer cells. *TIPS* 9, 54-58.
- Hegele RA, Robinson JF. 2005. ABC transporters and sterol absorption. *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* 5, 31-37.
- Higgins CF. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 67-113.
- Higgins CF, Hiles ID, Salmond GPC, *et al.* 1986. A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* 323, 448-450.
- Higgins CF, Hiles ID, Whalley K, Jamieson DL. 1985. Nucleotide binding by membrane components of bacterial periplasmic binding protein dependant transport systems. *EMBO J.* 4.
- Higgins CF, Linton KJ. 2004. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 918-926.
- Hobson AC, Weatherwax R, Ames GFL. 1984. ATP-binding sites in the membrane components of histidine permease, a periplasmic transport system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 7333-7337.
- Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, *et al.* 1990. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346, 362-365.
- Juliano RL, Ling V. 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta.* 455, 152-162.

- Kartner N, Evernden-Porelle D, Bradley G, Ling V. 1985. Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature* 316, 820-823.
- Keppler CJ, Ringwood AH. 2001. Expression of P-glycoprotein in southeastern oysters, *Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.* 52, 81-96.
- Keppler D, Leier I, Jedlitschky G. 1997. Transport of glutathione conjugates and glucuronides by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Biol. Chem.* 378, 787-791.
- Kessel D, Botterill V, Wodinsky I. 1968. Uptake and retention of daunomycin by mouse leukemic cells as factors in drug response. *Cancer Res.* 28, 938-941.
- Kurelec B, Krca S, Pivcevic B, et al. 1992. Expression of P-glycoprotein gene in marine sponges. Identification and characterization of the 125 kDa drug-binding glycoprotein. *Carcinogenesis* 13, 69-76.
- Kurelec B, Pivcevic B. 1991. Evidence for a multixenobiotic resistance mechanism in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 19, 291-302.
- Legeay A, Achard-Joris M, Baudrimont M, Massabuau JC, Bourdineaud JP. sous presse. Impact of cadmium contamination and oxygenation levels on biochemical responses in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*. *Aquat. Toxicol.* In press.
- Li ZS, Lu YP, Zhen RG, Szczypka M, Thiele DJ, Rea PA. 1997. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 42-47.
- Locher KP, Lee AT, Rees DC. 2002. The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* 296, 1091-1098.
- Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM. 2004. The drug-binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein is accessible to the aqueous medium. *Biochemistry* 43, 12081-12089.
- Martinoia E, Klein M, Geisler M, et al. 2002. Multifunctionality of plant ABC transporters more than just detoxifiers. *Planta* 214, 345-355.
- Mimmack ML, Gallagher MP, Pearce SR, Hyde SC, Booth IR, Higgins CF. 1989. Energy coupling to periplasmic binding protein-dependent transport systems: stoichiometry of ATP hydrolysis during transport *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 8257-8261.
- Minier C, Akcha F, Galgani F. 1993. P-glycoprotein expression in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* in polluted seawater. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B, 1029-1036.
- Minier C, Moore MN. 1996. Rhodamine B accumulation and MXR protein expression in mussel blood cells: effects of exposure to vincristine. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 142, 165-173.
- Nielsen D, Skovsgaard T. 1992. P-glycoprotein as multidrug transporter: a critical review of current multidrug resistant cell lines. *Biochim. Biophys. Acta* 1139, 169-183.

- Oloo EO, Tieleman DP. 2004. Conformational transitions induced by the binding of MgATP to the vitamin B12 ATP-binding cassette (ABC) transporter BtuCD. *J. Biol. Chem.* 279, 45013-45019.
- Otsuji N, Soejima T, Maki S, Shinagawa H. 1982. Cloning of colicin E1 tolerant tolC (*mtcB*) gene of *Escherichia coli* K12 and identification of its gene product. *Mol. Gen. Genet.* 187, 30-36.
- Pleban K, Kopp S, Csaszar E, *et al.* 2005. P-glycoprotein substrate binding domains are located at the transmembrane domain/transmembrane domain interfaces: a combined photoaffinity labeling-protein homology modeling approach. *Mol. Pharmacol.* 67, 365-374.
- Pleban K, Macchiarulo A, Costantino G, Pellicciari R, Chiba P, Ecker GF. 2004. Homology model of the multidrug transporter LmrA from *Lactococcus lactis*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 5823-5826.
- Pohl A, Devaux PF, Herrmann A. 2005. Function of prokaryotic and eukaryotic ABC proteins in lipid transport. *Biochim. Biophys. Acta.* 1733, 29-52.
- Reyes CL, Chang G. 2005. Structure of ABC transporter MbsA in complex with ADP.vanadate and lipopolysaccharide. *Science* 308, 1028-1031.
- Rosenberg MF, Callaghan R, Ford RC, Higgins CF. 1997. Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. *J. Biol. Chem.* 272, 10685-10694.
- Rosenberg MF, Velarde G, Ford RC, *et al.* 2001. Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport of ATP-ase cycle. *EMBO J.* 20, 5615-5625.
- Sauna ZE, Ambudkar SV. 2001. Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. The two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different functional outcomes. *J. Biol. Chem.* 276, 11653-11661.
- Stenham DR, Campbell JD, Sansom MSP, Higgins CF, Kerr ID, Linton KJ. 2003. An atomic detail model for the human ATP binding cassette transporter P-glycoprotein derived from disulphide cross-linking and homology modeling. *FASEB J.* 17, 2287-2289.
- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. 1987. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 7735-7738.
- Thomas H, Coley HM. 2003. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein. *Cancer control* 10, 159-165.
- Tommasini R, Evers R, Vogt E, *et al.* 1996. The human multidrug resistance-associated protein functionally complements the yeast cadmium resistance factor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 6743-6748.

- Tutundjian R, Cachot J, Leboulenger F, Minier C. 2002. Genetic and immunological characterisation of a multixenobiotic resistance system in the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. and Mol. Biol.* 132, 463-471.
- Ueda K, Okamura N, Hirai M, *et al.* 1992. Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J. Biol. Chem.* 267, 24248-24252.
- van Veen HW, Callaghan R, Soceneantu L, Sardini A, Konings WN, Higgins CF. 1998. A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multidrug-resistance P-glycoprotein gene. *Nature* 391, 291-295.
- van Veen HW, Higgins CF, Konings WN. 2001. Multidrug transport by ATP binding cassette transporters: a proposed two-cylinder engine mechanism. *Res. Microbiol.* 152, 365-364.
- van Veen HW, Margolles A, Muller M, Higgins CF, Konings WN. 2000. The homodimeric ATP-binding cassette transporters LmrA mediate multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism. *EMBO J.* 19, 2503–2514.
- van Veen HW, Venema K, Bolhuis H, *et al.* 1996. Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 10668-10672.
- Wu C, Bal N, Perard J, *et al.* 2004. A cloned prokaryotic Cd<sup>2+</sup> P-type ATPase increases yeast sensitivity to Cd<sup>2+</sup>. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 1034-1040.

## *Chapitre 5*

*Gène codant pour une protéine ribosomique dont l'expression est stimulée par le cadmium*



Pour identifier des gènes ou des protéines impliqués dans la réponse cellulaire à une contamination métallique, deux approches peuvent être envisagées. La première est de choisir un gène (une protéine) dont la fonction laisse supposer qu'il (elle) est impliqué(e) dans la résistance aux métaux, puis de vérifier si ce gène est surexprimé en condition de contamination métallique, et d'analyser le rôle de la protéine correspondante dans un mécanisme de résistance. Cependant, cette démarche nécessite d'avoir déjà des informations sur le gène candidat.

Lorsque ce n'est pas le cas, une deuxième approche qui conduit à rechercher « au hasard » plusieurs gènes dont l'expression varie en condition de la contamination métallique, peut être mise en oeuvre. Pour cela, une technique couramment utilisée est le « differential display ». Cette méthode consiste à comparer le profil électrophorétique obtenu après amplification par PCR avec des amorces aléatoires de deux populations d'ADNc : l'une provenant d'animaux témoins et l'autre d'animaux ayant subi un stress, une contamination métallique dans notre cas. Les bandes dont l'intensité entre les deux populations est différente sont alors prélevées, et le fragment est identifié après clonage et séquençage. Cette méthode est couramment utilisée et peut, grâce à l'étape de PCR, permettre la détection de transcrits peu abondants. Cependant, un des inconvénients de cette technique est la génération de « faux positifs ». Nous avons été confrontés à ce problème en clonant un fragment d'ADNc codant pour la partie C terminale d'une protéine. La séquence obtenue présentait 47% d'identité avec la pré-protéase à sérine de type chymotrypsine d'un autre mollusque : l'abalone rouge de Californie (*Haliotis rufescens*). Cependant, le niveau d'expression du gène codant pour cette protéine s'est avéré, après PCR quantitative en temps réel avec des amorces spécifiques, ne pas être modifié en condition de contamination métallique en milieu naturel et en laboratoire. La technique de « differential display » est donc très utile, mais il convient d'être prudent et de confirmer les résultats par PCR quantitative en temps réel en utilisant un couple d'amorces spécifiques du fragment d'intérêt. C'est la démarche qui a été adoptée dans la suite de ce chapitre.

Les résultats ci-dessous sont présentés dans un article accepté pour publication dans *Environmental Toxicology and Chemistry* (Annexe 2). Pour éviter d'inévitables répétitions, en particulier avec les articles 3-1 et 4-1, ce travail est présenté de façon plus synthétique en français. Les conditions expérimentales sont regroupées dans le tableau 5.1.

**Tableau 5.1.** Les conditions expérimentales utilisées dans les diverses étapes de l'étude.

### **1- Synthèse des ADNc et PCR**

Les ARN totaux sont extraits des branchies de *C. fluminea* (2 animaux par réaction) avec le kit Absolutely RNA RT-PCR Miniprep (Stratagen) selon les indications du fournisseur, puis quantifiés par lecture de la DO<sub>260</sub>.

6 µg d'ARN sont utilisés pour l'étape de rétro transcription. La synthèse du premier brin est effectuée avec l'amorce 5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC TTT TTT TTT TTT TTT-3', des dNTPs, et la M-MLV Transcriptase inverse (Promega).

L'amorce aléatoire 5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3' est ensuite utilisée pour l'étape de PCR. Le mélange réactionnel contient le tampon de réaction (1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), la *Taq* polymérase (Promega, 1U), 200 nM de chaque amorce, 1 µL d'ARN rétro transcrits, les dNTPs (250 µM), et de l'eau pour compléter jusqu'à 40 µL. Après une étape de dénaturation initiale de 3 min à 94°C, 40 cycles d'amplification sont réalisés (30s à 94°C, 30s à 48°C, 30s à 72°C), suivis par une étape finale de 3 min à 72°C. La normalisation par rapport à la quantité d'ADNc 28S est effectuée avec le couple d'amorces suivant: 5'-CCA AGG AGT CTA ACA TGT GC-3' et 5'-GAT GGT TCG ATT AGT CTT TC-3'.

Les produits de PCR sont ensuite séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1%. Les fragments d'intérêt, visualisés sous lumière UV, sont alors excisés et extraits du gel avec le kit QIAquick gel extraction (Qiagen) en suivant les indications du fournisseur. Chaque fragment purifié est inséré dans le plasmide pGEM-T-easy Vector System (Promega) grâce à la T4 DNA ligase. Les cellules compétentes JM109 (Promega) sont transformées avec 3 µL du mélange de ligature et les transformants positifs sont sélectionnés sur un milieu (Luria Bertani : 5 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure, 10 g.L<sup>-1</sup> de bactotryptone, et 10 g.L<sup>-1</sup> de NaCl) contenant 100 µg.mL<sup>-1</sup> d'ampicilline et les vecteurs recombinants séquencés. Les séquences sont déterminées par la société Millegen Biotechnologies (Labège, France) en utilisant les amorces universelles T7 et SP6.

### **2- Obtention de la partie 5' d'un ADNc cloné par PCR de type 5'-RACE**

La partie 5' de la séquence de l'ADNc a été obtenue en utilisant le kit SMART RACE (Clontech). Le premier brin d'ADNc est synthétisé par rétro transcription de 3 µg d'ARN totaux. L'ADNc est ensuite amplifié en utilisant comme amorce sens l'amorce universelle UMP du kit (Universal Primer mix) et comme amorce anti-sens l'amorce spécifique rpS9 (5'-CTT CAG CAG CGC CAC CAG ATC CC-3'). L'amplification par PCR se fait avec 2,5 µL d'ADNc, avec tout d'abord une étape de 5 cycles (30s à 94°C, 60 s à 72°C), suivie d'une autre étape de 5 cycles (30 s à 94°C, 30 s à 70°C, 60 s à 72°C), et enfin de 25 cycles (30 s à 94°C, 30 s à 68°C, 60 s à 72°C); et pour finir une étape d'extension de 60s à 72°C.

### **3- PCR quantitative en temps réel**

3 µg d'ARN totaux sont rétro-transcrits en utilisant le kit ProStar First-Strand RT-PCR (Stratagene). Pour l'amplification d'une partie de l'ADNc de rpS9, des amorces spécifiques CfrS95' 5'-TCA GAG TGC GTA AGC AGG T-3' et CfrS93' 5'-ACA CGA TAT ACA GGG AGA CAT GA-3' ont été choisies grâce au programme LightCycler probe design software (version 1.0, Roche). La normalisation est effectuée par rapport à l'ADNc 28S en utilisant les amorces déjà mentionnées. La PCR en temps réel est effectuée à partir d'un mélange de 20 µL comprenant 1 µL de mélange réactionnel SYBR Green LightCycler FastStart (contenant la *Taq* DNA polymérase FastStart, 0,3 µM de dNTP, et la sonde fluorescente SYBRGreen; Roche), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,3 µM de chaque amorce et 3 µL d'ADNc. L'amplification du gène s'effectue selon le processus suivant: activation initiale de la HotStart *Taq* DNA Polymerase 10 min à 95°C ; 50 cycles de trois étapes: 5s à 95°C, 5 s à 60°C, 20s à 72°C. A la fin de l'amplification, l'analyse de la température de fusion est effectuée en augmentant lentement la température (0.05°C.s<sup>-1</sup>) de 65 à 95°C. L'amplification, l'acquisition des données et l'analyse sont effectuées avec un appareil LightCycler (Roche, Mannheim, Germany) et le logiciel LightCycler 5.3.2 (Roche). Pour chaque condition de contamination, trois répliques sont effectuées donnant trois extractions d'ARN et trois rétro-transcriptions indépendantes.

## 1- IDENTIFICATION ET CLONAGE D'UN GÈNE DE *C. FLUMINEA* SUR-EXPRIMÉ EN CONDITION DE CONTAMINATION MÉTALLIQUE

Un gène de *C. fluminea* dont l'expression est potentiellement influencée par la présence de cadmium a été détecté en comparant des populations de bivalves transplantés dans trois stations du bassin hydrologique du Lot définies au chapitre 1 (Figure 1.4, Chapitre 1 § II.3.1) : Boisse-Penchat constitue le site de référence non pollué et les stations de Riou-Viou et Riou-Mort correspondent aux sites contaminés par du cadmium et du zinc (Tableau 5.2).

**Tableau 5.2.** Concentrations moyennes de métaux dans l'eau pendant 24 jours (mi-mai à juin 2004) pour les trois sites de transplantation des bivalves utilisés dans la présente étude.

Site	Cadmium (nM)	Zinc (nM)
Boisse-Penchat (A)	0,18 (0.02 µg.L <sup>-1</sup> )	30 (2 µg.L <sup>-1</sup> )
Riou-Viou (B)	53 (6 µg.L <sup>-1</sup> )	4128 (270 µg.L <sup>-1</sup> )
Riou-Mort (C)	115 (13 µg.L <sup>-1</sup> )	7186 (470 µg.L <sup>-1</sup> )

Une bande correspondant à un ADNc de 670 pb apparaît plus intense lorsque les ARNm initiaux proviennent de bivalves du site Riou-Mort (site C). Cette bande a été extraite et clonée selon la procédure décrite dans le tableau 5.1 section 1. En utilisant les méthodes décrites dans le tableau 5.1 section 2, la séquence complète du gène (699 pb) codant pour une protéine de 192 acides aminés a été obtenue (Figure 5.1).

Après comparaison de la séquence protéique aux bases de données (GenBank, programme de comparaison BLATX) les meilleurs alignements obtenus correspondent à une protéine ribosomique S9 de poissons (*Ictalurus punctatus* et *Danio rerio*; 88% d'identité, 95% de similarité) et de mammifères (*Homo sapiens* et *Rattus norvegicus*; 87% d'identité, 94% de similarité) (Figure 5.2). Cette très forte similarité avec des protéines rS9 de mammifères est assez inattendue. Elle ne peut cependant pas être due à une contamination puisque les régions 5'- et 3'-non codantes sont très différentes de celles de *H. sapiens*.

La séquence de l'ADNc rpS9 de *C. fluminea* a été déposée dans GenBank sous le numéro d'accèsion AY571758.

<i>A CGC AGG GCT TTC TCA CGT GGT TGT CAA AGA GGG CAT TGA AGC AAA</i>																		
M	P	R	L	A	L	V	Q	H	K	T	Y	T	T	P	R	R	P	18
<u>ATG</u>	<u>CCA</u>	<u>CGC</u>	<u>TTA</u>	<u>GCT</u>	<u>CTA</u>	<u>GTA</u>	<u>CAG</u>	<u>CAC</u>	<u>AAA</u>	<u>ACC</u>	<u>TAC</u>	<u>ACA</u>	<u>ACT</u>	<u>CCG</u>	<u>AGA</u>	<u>CGT</u>	<u>CCT</u>	54
F	E	K	E	R	L	D	Q	E	L	K	L	I	G	E	Y	G	L	36
<u>TTT</u>	<u>GAA</u>	<u>AAA</u>	<u>GAA</u>	<u>CGT</u>	<u>CTA</u>	<u>GAT</u>	<u>CAG</u>	<u>GAG</u>	<u>TTG</u>	<u>AAA</u>	<u>TTG</u>	<u>ATC</u>	<u>GGT</u>	<u>GAA</u>	<u>TAT</u>	<u>GGA</u>	<u>TTG</u>	108
R	N	K	R	E	V	W	R	V	K	Y	A	V	A	K	I	R	K	54
<u>AGG</u>	<u>AAC</u>	<u>AAG</u>	<u>CGT</u>	<u>GAA</u>	<u>GTG</u>	<u>TGG</u>	<u>AGA</u>	<u>GTC</u>	<u>AAG</u>	<u>TAC</u>	<u>GCT</u>	<u>GTC</u>	<u>GCC</u>	<u>AAG</u>	<u>ATC</u>	<u>AGA</u>	<u>AAG</u>	162
S	A	R	E	L	L	T	L	E	E	K	D	P	K	R	L	F	E	72
<u>TCT</u>	<u>GCA</u>	<u>AGA</u>	<u>GAA</u>	<u>CTT</u>	<u>CTC</u>	<u>ACC</u>	<u>TTG</u>	<u>GAA</u>	<u>GAA</u>	<u>AAA</u>	<u>GAT</u>	<u>CCT</u>	<u>AAA</u>	<u>AGA</u>	<u>TTA</u>	<u>TTT</u>	<u>GAG</u>	216
G	N	A	L	L	R	R	L	V	R	I	G	V	L	D	E	S	K	90
<u>GGT</u>	<u>AAC</u>	<u>GCT</u>	<u>CTT</u>	<u>CTG</u>	<u>CGT</u>	<u>CGT</u>	<u>TTG</u>	<u>GTG</u>	<u>AGG</u>	<u>ATT</u>	<u>GGT</u>	<u>GTG</u>	<u>TTG</u>	<u>GAC</u>	<u>GAG</u>	<u>TCC</u>	<u>AAG</u>	270
M	K	L	D	F	V	L	G	L	R	T	E	D	F	L	E	R	R	108
<u>ATG</u>	<u>AAG</u>	<u>CTC</u>	<u>GAT</u>	<u>TTC</u>	<u>GTG</u>	<u>TTA</u>	<u>GGT</u>	<u>CTT</u>	<u>CGA</u>	<u>ACT</u>	<u>GAA</u>	<u>GAT</u>	<u>TTC</u>	<u>TTG</u>	<u>GAG</u>	<u>AGA</u>	<u>CGT</u>	324
L	Q	T	Q	V	F	K	L	G	L	A	K	S	I	H	H	A	R	126
<u>CTA</u>	<u>CAG</u>	<u>ACA</u>	<u>CAG</u>	<u>GTG</u>	<u>TTC</u>	<u>AAA</u>	<u>CTT</u>	<u>GGA</u>	<u>TTG</u>	<u>GCC</u>	<u>AAG</u>	<u>AGT</u>	<u>ATT</u>	<u>CAT</u>	<u>CAT</u>	<u>GCT</u>	<u>CGT</u>	378
I	L	I	R	Q	R	H	I	R	V	R	K	Q	V	V	N	I	P	144
<u>ATA</u>	<u>TTG</u>	<u>ATC</u>	<u>CGT</u>	<u>CAG</u>	<u>AGG</u>	<u>CAC</u>	<u>ATC</u>	<u>AGA</u>	<u>GTG</u>	<u>CGT</u>	<u>AAG</u>	<u>CAG</u>	<u>GTG</u>	<u>GTG</u>	<u>AAC</u>	<u>ATT</u>	<u>CCA</u>	432
S	F	V	V	R	L	D	S	Q	R	H	I	D	F	A	L	S	S	162
<u>TCA</u>	<u>TTT</u>	<u>GTA</u>	<u>GTA</u>	<u>CGT</u>	<u>TTG</u>	<u>GAC</u>	<u>TCC</u>	<u>CAG</u>	<u>AGG</u>	<u>CAC</u>	<u>ATT</u>	<u>GAC</u>	<u>TTC</u>	<u>GCC</u>	<u>CTA</u>	<u>TCC</u>	<u>TCG</u>	486
P	Y	G	G	G	R	A	G	R	V	K	R	K	N	A	K	K	G	180
<u>CCA</u>	<u>TAT</u>	<u>GGT</u>	<u>GGT</u>	<u>GGC</u>	<u>AGA</u>	<u>GCT</u>	<u>GGA</u>	<u>CGT</u>	<u>GTC</u>	<u>AAG</u>	<u>AGG</u>	<u>AAG</u>	<u>AAC</u>	<u>GCC</u>	<u>AAG</u>	<u>AAG</u>	<u>GGA</u>	540
S	G	G	G	A	A	E	E	E	D	E	D	*						198
<u>TCT</u>	<u>GGT</u>	<u>GGT</u>	<u>GGC</u>	<u>GCT</u>	<u>GCT</u>	<u>GAA</u>	<u>GAG</u>	<u>GAA</u>	<u>GAC</u>	<u>GAA</u>	<u>GAT</u>	<u>TAA</u>	<u>ACA</u>	<u>TCA</u>	<u>TGT</u>	<u>CTC</u>	<u>CCT</u>	594
<i>GTA TAT CGT GTT TAC TAT ATA CAG ACA ATA AAG AAA GAA AAA TTA AAA AAA AAA</i>																	648	
<i>AAA AA</i>																	653	

**Figure 5.1.** Séquence de l'ADNc *rpS9* de *C. fluminea*.

La séquence en nucléotides est indiquée avec au dessus la séquence traduite en acides aminés. Les régions 5'- et 3'- non traduites sont indiquées en italique. Le premier fragment cloné est souligné. La séquence complémentaire de l'amorce choisie pour la PCR 5'-RACE est indiquée en gras.

```

D.rerio      MPVAKTWVCSKTYVTPRRPF EKSR LDQELRLIG EYGLRNKREVWRVKFTLAKIRKAAREL
I.punctatus MPVARTWVCSKTYVTPRRPF EKSR LDQELK LIG EYGLRNKREVWRVKFTLAKIRKAAREL
H.sapiens    MPVARSWVCRKTYVTPRRPF EKSR LDQELK LIG EYGLRNKREVWRVKFTLAKIRKAAREL
R.norvegicus MPVARSWVCRKTYVTPRRPF EKSR LDQELK LIG EYGLRNKREVWRVKFTLAKIRKAAREL
C.fluminea   MP-RLALVQHKT YTT PRRPF EKSR LDQELK LIG EYGLRNKREVWRVKYAVAKIRKSAREL
              **      : *   *** .***** .***** :***** :***** :*

D.rerio      LTLDEKDPKRLFEGNALLRRLVRI GVLDEGKM KLDYILGLKVEDFLERRLQTQVFKLGLA
I.punctatus LTLDEKDPKRLFEGNALLRRLVRI GVLDEGKM KLDYILGLKVEDFLERRLQTQVFKLGLA
H.sapiens    LTLDEKDPKRLFEGNALLRRLVRI GVLDEGKM KLDYILGLKIEDFLERRLQTQVFKLGLA
R.norvegicus LTLDEKDPKRLFEGNALLRRLVRI GVLDEGKM KLDYILGLKIEDFLERRLQTQVFKLGLA
C.fluminea   LTLEEKDPKRLFEGNALLRRLVRI GVLDESKM KLDYILGLRTEDFLERRLQTQVFKLGLA
              *** :**** :***** .***** :**** : *****

D.rerio      KSIHHARVLIRQRHIRVRKQV VNI PSFVVR LDSQKHIDFSLRSPYGGGRPGRVKRKNACK
I.punctatus KSIHHARVLIRQRHIRVRKQV VNI PSFVVR LDSQKHIDFSLRSPYGGGRPGRVKRKNACK
H.sapiens    KSIHHARVLIRQRHIRVRKQV VNI PSFIVR LDSQKHIDFSLRSPYGGGRPGRVKRKNACK
R.norvegicus KSIHHARVLIRQRHIRV LKQV VNI PSFIVR LDSQKHIDFSLRSPYGGGRPGRVKRKNACK
C.fluminea   KSIHHARILIRQRHIRVRKQV VNI PSFVVR LDSQRHIDFALSSPYGGGRAGRVKRKNACK
              ***** :***** ***** :***** :**** :* *****

D.rerio      AQQGGGGGDDEEED
I.punctatus  GQGGGGGDDEEED
H.sapiens    GQGGAGAGDDEEED
R.norvegicus GQGGAGAGDDEEED
C.fluminea   GSGG-GAAEEDED
              ..** ...:***

```

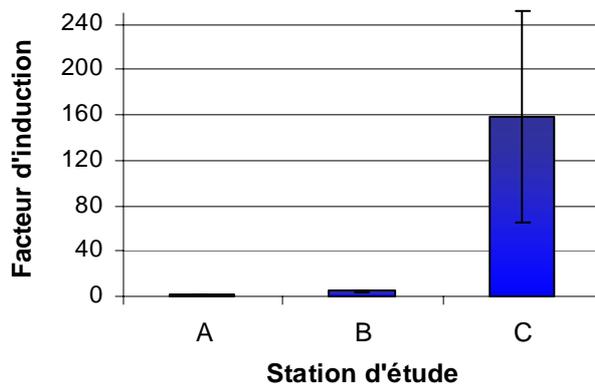
**Figure 5.2.** La séquence de la protéine rpS9 de *C. fluminea* a été alignée avec les homologues rpS9 d'autres espèces en utilisant le programme BLASTX. Les numéros d'accèsion à GenBank sont les suivants : *D. rerio* (NP957146), *I. punctatus* (AAK95191), *H. sapiens* (P46781), et *R. norvegicus* (NP112370). ` et : indiquent respectivement des faibles et haut degrés de similarité des propriétés physico-chimiques des acides aminés. Une \* est utilisée pour marquer les positions où les acides aminés sont identiques.

## 2- ETUDE DE L'EXPRESSION DU GÈNE *rpS9* EN FONCTION DE LA CONTAMINATION MÉTALLIQUE

Grâce aux amorces spécifiques définies à partir de la séquence du gène identifié (Tableau 5.1, section 3), son expression a été étudiée par PCR quantitative en temps réel à la fois après une contamination des bivalves sur le terrain (Tableau 5.2) et en laboratoire.

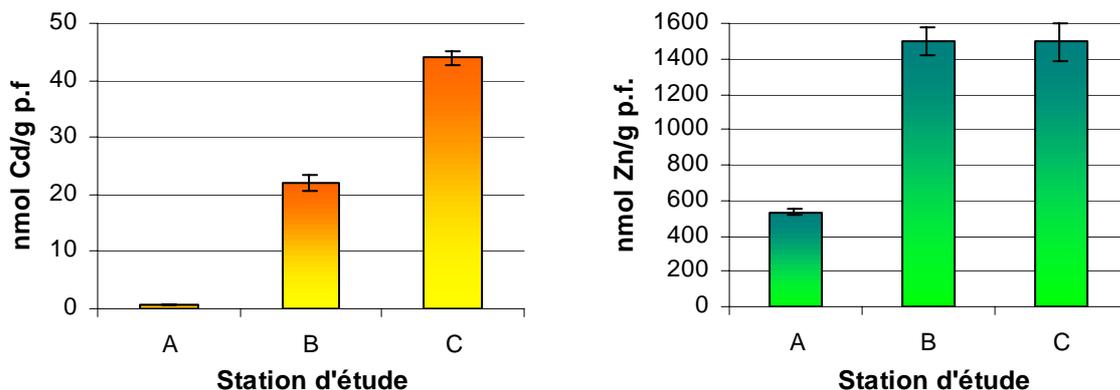
### 2.1- Contamination sur le terrain

Au bout de 24 jours de contamination sur le terrain, le niveau d'expression du gène *rpS9* augmente d'environ 5 fois chez les bivalves du site B et de 158 fois chez ceux du site C par rapport à ceux du site de référence (A) (Figure 5.3).



**Figure 5.3.** Niveau d'expression du gène *rpS9* dans les branchies des bivalves transplantés pendant 24 jours sur les trois sites prédéfinis. Le niveau d'expression du gène *rpS9* a été normalisé par rapport à celui du gène codant pour l'ARN 28S. Le rapport entre l'expression des gènes *rpS9* et 28S chez les bivalves du site A est fixé à 1. Les mesures ont été effectuées à partir de trois extractions d'ARN différentes.

Cette surexpression peut être reliée à la concentration en métaux dans l'eau puisque le site C présente à la fois plus de cadmium et de zinc que le site B (Tableau 5.2). Cependant, malgré une forte différence de la teneur en zinc dans l'eau, la concentration dans les tissus reste la même pour les deux sites pollués, alors que la concentration en cadmium double du site B au site C (Figure 5.4) : cela suggère que la surexpression de *rpS9* est plutôt due à la présence de cadmium qu'à celle de zinc.



**Figure 5.4.** Concentration en cadmium (gauche) et en zinc (droite) dans les bivalves (exprimée en  $\mu\text{g}$  par gramme de poids frais (p.f.)) après 24 jours de transplantation sur les trois sites. Les mesures ont été effectuées sur 5 répliques par spectrométrie d'absorption atomique, comme décrit au chapitre 1 et dans les articles 3-1 et 4-1.

## 2.2- Contamination en laboratoire

Afin de vérifier cette hypothèse, les bivalves ont été soumis à des contaminations contrôlées en laboratoire. Comme nous l'avons déjà vu, la contamination en laboratoire permet de se limiter à une seule variable : la concentration en cadmium ou en zinc dans l'eau. Le protocole de contamination est en tout point identique à celui décrit dans l'article 3-1 (Chapitre 3). Cette démarche permet de déterminer l'influence spécifique de chaque métal sur le niveau d'expression du gène *rpS9*.

Ces expériences démontrent clairement que le gène *rpS9* est surexprimé lors d'une contamination par le cadmium (environ 16 fois plus après 10 jours de contamination à 133 nM) (Tableau 5.3).

**Tableau 5.3.** Niveau d'expression du gène *rpS9* dans les branchies des bivalves exposés pendant 10 jours au cadmium (133 nM, 15 µg.L<sup>-1</sup>), au zinc (15,3 µM, 1 mg.L<sup>-1</sup>), ou conjointement au cadmium et au zinc aux mêmes concentrations. Le niveau d'expression du gène *rpS9* a été normalisé par rapport à celui du gène codant pour l'ARN 28S. Le rapport entre l'expression des gènes *rpS9* et 28S chez les bivalves non contaminés fixé à 1. + indique que le gène est surexprimé et – que le gène est réprimé par rapport au niveau de référence.

Métal ajouté dans l'eau de l'aquarium	Facteur d'induction du gène <i>rpS9</i>
<b>Aucun</b>	1 ± 1,4
<b>Cadmium</b> (133 nM)	+ 16,5 ± 10,3
<b>Zinc</b> (15,3 µM)	- 120 ± 20,7
<b>Cadmium</b> (133 nM) & <b>zinc</b> (15,3 µM)	+1,5 ± 1,4

Un résultat assez inattendu concerne l'expression de ce gène après une contamination par le zinc (15,3 µM pendant 10 jours) : elle est environ 120 fois moindre par rapport à celle chez les bivalves témoin.

Par contre lors d'une contamination combinée par les deux métaux aux mêmes concentrations que lors des contaminations mono-métalliques, l'expression du gène reste à son niveau basal. La comparaison de la concentration en cadmium dans les tissus de bivalves contaminés soit avec du cadmium, soit avec du cadmium et du zinc, permet d'écartier une explication de ce phénomène par une simple différence d'accumulation en cadmium (Tableau 5.4). Cela laisse ainsi supposer que l'influence positive du cadmium est masquée par l'effet du zinc.

**Tableau 5.4.** Concentration en cadmium et en zinc dans les bivalves (exprimée en nmol par gramme de poids frais (p.f.)) après 10 jours d'expérimentation. Les mesures ont été effectuées sur 5 échantillons par spectrométrie d'absorption atomique, comme décrit au chapitre 1 et dans les articles 3-1 et 4-1.

Métal ajouté dans l'eau de l'aquarium	Cd (nmol/g p.f.)	Zn (nmol/g p.f.)
Aucun	0,5 ± 0,9	306 ± 3
<b>Cadmium</b> (133 nM)	47 ± 23	321 ± 15
<b>Zinc</b> (15,3 µM)	0,9 ± 0,9	1070 ± 153
<b>Cadmium</b> (133 nM) & <b>zinc</b> (15,3 µM)	21 ± 10	703 ± 199

D'une façon générale, de nombreux gènes de plusieurs organismes « répondent » à une contamination métallique. Cependant jusqu'à présent, assez peu d'études ont été menées conjointement sur plusieurs métaux et il n'y a que peu d'exemples pour lesquels un gène est spécifiquement induit par un métal. C'est le cas par exemple du gène *cdr-1* chez le nématode *Caenorhabditis elegans* dont l'expression n'est modifiée que par le cadmium (Liao *et al.*, 2002). Nous présentons ici un autre exemple original, puisque le gène *rpS9* est non seulement induit par le cadmium mais aussi réprimé par le zinc.

### 3- DISCUSSION

Qu'un gène codant pour une protéine ribosomique puisse être sur-exprimé en présence de cadmium peut sembler *a priori* assez surprenant puisque les protéines ribosomiques sont supposées être synthétisées de façon constitutive et ne sont en général pas associées à une réponse à un stress provoqué par les métaux. Cependant, un déséquilibre dans l'expression de certaines protéines ribosomiques a déjà été rapporté dans le cas de cancers chez l'homme (Frigerio *et al.*, 1995). De plus, la répression de gènes codant pour différentes protéines ribosomiques a également été rapportée lors d'une exposition au 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine (Kurachi *et al.*, 2002).

Malheureusement, peu d'informations sur le rôle potentiel d'une protéine ribosomique dans la résistance des cellules à une contamination par le cadmium sont disponibles. Seul un exemple chez *Saccharomyces cerevisiae*, établit une relation avec le cadmium puisque le gène *YST2* codant pour une protéine ribosomique est induit par ce métal (Vido *et al.*, 2001). Cependant deux hypothèses peuvent être avancées grâce aux données suivantes. Tout d'abord, chez la bactérie *Escherichia coli*, la protéine ribosomique S9 est impliquée dans le système de réparation SOS de l'ADN (Wool, 1996), et chez la truite arc-en-ciel

*Oncorhynchus mykiss*, les protéines ribosomiques S17 et S3 sont non seulement impliquées dans la traduction des protéines mais aussi dans la réparation de l'ADN (Hogstrand *et al.*, 2002). Nous avons vu également dans le premier chapitre (§ 1.2.2.1) que le cadmium peut inhiber la réparation de lésions de l'ADN en interférant avec des enzymes antioxydantes (Hartwig et Schwerdtle, 2002). Chez *C. fluminea*, la protéine rpS9 pourrait donc être impliquée dans la résistance au cadmium en intervenant dans la réparation de l'ADN. D'autre part, une étude *in vitro* a mis en évidence une sensibilité accrue au stress oxydant chez des cellules où l'expression du gène codant pour la protéine S9 était empêchée *via* des ARNm antisens (Kim *et al.*, 2003). Chez *C. fluminea*, la protéine rpS9 pourrait aussi être impliquée dans la résistance au cadmium en limitant le stress oxydant généré par celui-ci.

Enfin, les résultats présentés ici soulignent clairement la dualité entre les deux métaux, cadmium et zinc. Cela nous a conduit à postuler que le cadmium pouvait influencer le niveau d'expression du gène *rpS9* agissant sur un facteur de transcription à doigts de zinc. En effet, dans certains cas, des métaux de transition tels que le cadmium peuvent prendre la place du zinc dans ce type de facteurs de transcription. Cette substitution peut entraîner un mauvais repliement de la protéine ou une oxydation de ses résidus cystéine et a pour conséquence une altération voire une perte de la fonction de la protéine (Hartwig, 2001). Un exemple est celui du facteur de transcription IIIA (TFIIIA) isolé à partir d'ovaires immatures de *Xenopus laevis*. Il se lie à la région de contrôle interne (internal control region, ICR) du gène codant pour l'ARN ribosomique 5S et stimule sa transcription. Par contre, en présence de cadmium il a été montré que  $Cd^{2+}$  déplace le  $Zn^{2+}$  de TFIIIA et que cela entraîne une inhibition de l'interaction spécifique de TFIIIA avec la ICR du gène codant pour l'ARN 5S (Hanas et Gunn, 1996 ; Petering *et al.*, 2000).

Chez *C. fluminea*, il est donc possible qu'un facteur de transcription à doigts de zinc qui limite l'expression du gène *rpS9* soit plus efficace lors d'une contamination de l'animal par du zinc et qu'il soit au contraire désactivé en présence de cadmium.

## RÉFÉRENCES DU CHAPITRE 5

- Frigerio JM, Dagorn JC, Iovanna JL. 1995. Cloning, sequencing and expression of the L5, L21, L27a, L28, S5, S9, S10 and S29 human ribosomal protein mRNAs. *Biochim. Biophys. Acta.* 1262, 64-68.
- Hanas JS, Gunn CG. 1996. Inhibition of transcription factor IIIA-DNA interactions by xenobiotic metal ions. *Nucleic Acids Res.* 24, 924-930.
- Hartwig A. 2001. Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions: differential effects on structure and function. *Antioxid. Redox Signal.* 3, 625-634.
- Hartwig A, Schwerdtle T. 2002. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol. Lett.* 127, 47-54.
- Hogstrand C, Balesaria S, Glover CN. 2002. Application of genomics and proteomics for study of the integrated response to zinc exposure in a non-model fish species, the rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.* 133, 523-535.
- Kim SY, Lee MY, Cho KC, *et al.* 2003. Alterations in mRNA expression of ribosomal protein S9 in hydrogen peroxide-treated neurotumor cells and in rat hippocampus after transient ischemia. *Neurochem. Res.* 28, 925-931.
- Kurachi M, Hashimoto S, Obata A, *et al.* 2002. Identification of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-responsive genes in mouse liver by serial analysis of gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292, 368-377.
- Liao VH, Dong J, Freedman JH. 2002. Molecular characterization of a novel, cadmium-inducible gene from the nematode *Caenorhabditis elegans*. A new gene that contributes to the resistance to cadmium toxicity. *J. Biol. Chem.* 277, 42049-42059.
- Petering DH, Huang M, Moteki S, Shaw CFr. 2000. Cadmium and lead interactions with transcription factor IIIA from *Xenopus laevis*: a model for zinc finger protein reactions with toxic metal ions and metallothionein. *Mar. Environ. Res.* 50, 89-92.
- Vido K, Spector D, Lagniel G, Lopez S, B. TM, Labarre J. 2001. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 276, 8469-8474.
- Wool IG. 1996. Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem. Sci.* 21, 164-165.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

L'impact de la pollution sur les écosystèmes et la santé humaine est une question mondiale urgente. Développer des outils de détection précoce et de prédiction des conséquences d'un stress environnemental constitue des objectifs essentiels. Une solution probable à ce problème réside dans la détection de modifications au niveau moléculaire et cellulaire qui précèdent les effets directement observables sur une population.

Parmi les polluants toxiques, d'origine naturelle ou anthropique, les métaux lourds posent un sérieux problème environnemental, en particulier au niveau des écosystèmes aquatiques.

Au cours de ce travail, nous avons essayé de comprendre comment les espèces aquatiques, ici les bivalves, « réagissent » à un environnement pollué par le cadmium, en étudiant certaines de leurs réponses au niveau moléculaire et cellulaire, face à ce stress métallique. Comme on pouvait l'imaginer, ces réponses sont multiples, simultanées ou en cascade, et toujours complexes. Nous avons tenté, tout au long de cette étude, d'« isoler » des mécanismes de résistance en utilisant les bactéries comme réacteurs cellulaires simplifiés. Nous nous sommes également attachés à reproduire des conditions de pollution environnementale en utilisant, lors des contaminations de bivalves en laboratoire, des concentrations en métaux proches de celles rencontrées dans les sites d'études en milieu naturel. Nous avons de plus réalisé des études dans des conditions de contamination par plusieurs métaux, en particulier pour des mélanges zinc-cadmium qui sont souvent associés dans l'environnement.

L'une des premières réponses lors d'une contamination par le cadmium est la sur-expression (ou la répression) de certains gènes. La littérature fait mention de dizaines de gènes induits par le cadmium chez différentes espèces, à travers de nombreuses études indépendantes. Dans ce travail nous nous sommes intéressés à plusieurs gènes codant pour des protéines potentiellement impliquées dans un mécanisme de résistance au cadmium, notamment les métallothionéines qui peuvent séquestrer les ions métalliques, et les pompes dépendant de l'ATP de type MDR (Multidrug resistance) qui peuvent les expulser hors de la cellule.

S'il est assez « simple », même si cela correspond souvent à un travail assez lourd, d'identifier des gènes induits (ou réprimés) en réponse au cadmium, il devient souvent plus difficile d'attribuer un rôle à la protéine correspondante. C'est le cas de l'exemple, développé dans le chapitre 5, du gène *rpS9* codant pour une protéine ribosomale pour lequel des observations sont rapportées mais sans certitude quant à la fonction de la protéine correspondante. Ce gène de *C. fluminea* a la particularité d'être surexprimé après une

exposition au cadmium, et clairement réprimé après une exposition au zinc. Nous avons émis l'hypothèse que le cadmium pouvait influencer son niveau d'expression en se substituant aux atomes de zinc d'un facteur de transcription.

Contrairement à la protéine rpS9, les métallothionéines (MTs), des protéines riches en cystéines, sont très largement et depuis longtemps étudiées. Les gènes de MTs sont induits par divers stimuli et en particulier par le cadmium. Leur structure et les motifs cystéines sont largement conservés entre les espèces comme celles de mollusques et de singe utilisées dans le chapitre 2. Compte tenu de leur ubiquité, à la fois dans les tissus et dans les organismes, il est difficile d'attribuer une seule fonction aux MTs et surtout une fonction « première ». La plupart des études montrent que les MTs jouent un rôle dans l'homéostasie du zinc et que ces protéines peuvent être induites comme réponse adaptatives à des stress environnementaux, en particulier liés au cadmium. L'étude présentée dans le chapitre 2 souligne l'importance de leurs propriétés redox et de la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Il apparaît à la fin de notre étude que les MTs peuvent présenter, dans certaines conditions expérimentales, des propriétés oxydantes et devenir ainsi toxiques. Nos résultats suggèrent le possible rôle des CuMT, que les études négligent souvent au profit des CdMT ou ZnMT : en effet l'état d'oxydation du cuivre peut changer après son expulsion des MTs, liée par exemple à un déplacement par le cadmium, générant des espèces réactives de l'oxygène comme des radicaux superoxydes ou hydroxyles et des radicaux semi-quinones.

D'une façon générale, l'importance des espèces réactives de l'oxygène est mise en évidence tout au long de ce travail. Outre le cas des MTs, un autre exemple est présenté dans le chapitre 3 qui montre l'induction par le cadmium d'un gène codant la sous unité I de la cytochrome-c-oxydase (*CoxI*) chez trois espèces de bivalves. Cette induction de *CoxI* peut s'interpréter comme un mécanisme de défense limitant les effets des espèces réactives de l'oxygène générées par le cadmium. Par contre une contamination par le zinc seul, dont les propriétés antioxydantes sont connues, n'entraîne aucun effet sur le niveau d'expression du gène quelle que soit l'espèce étudiée. Une contamination simultanée par les deux métaux montre une induction plus faible que dans le cas du cadmium seul. Cette dernière observation met en évidence le rôle du zinc qui limite probablement les effets toxiques du cadmium en diminuant la production de ROS induite par le cadmium.

Enfin, une grande partie de ce travail a concerné des protéines associées à un phénomène appelé « Multidrug Resistance » (MDR) lié à la surexpression de pompes transmembranaires dépendantes de l'ATP et appartenant à la famille ABC. La mise en

évidence et l'induction d'une protéine de type MDR chez *C. fluminea* lors d'une contamination métallique a constitué le point de départ de cette étude. L'expression dans des bactéries de la protéine humaine hMDR1 et de deux homologues bactériens LmrA et OmrA, a montré l'effet protecteur de ces transporteurs face à une contamination par les métaux lourds, cadmium, zinc et mercure. Corrélativement à la protection observée chez les bactéries, le transport de cadmium  $^{109}\text{Cd}$  a été mis en évidence grâce à des vésicules inversées. Cet outil nous a permis de confirmer que ce transport est bien dépendant de l'ATP. Néanmoins la vitesse du transport observé se révèle assez faible, mais cela n'exclut pas que de telles protéines puissent jouer un rôle non négligeable dans la détoxification du cadmium en complément d'autres mécanismes de résistance décrits dans ce mémoire.

Enfin, il est important de souligner l'intérêt des systèmes bactériens transformés par un plasmide porteur du gène d'intérêt. Leur utilisation permet d'une part de tester les effets de très nombreux paramètres de contamination car leur culture est simple et leur temps de génération court. Un autre avantage de ces systèmes est l'utilisation de vecteurs d'expression qui assurent une production « constante » des protéines étudiées, indépendante du niveau de contamination de la culture. Les bactéries peuvent constituer des réacteurs cellulaires pour analyser le rôle de nombreuses protéines vis à vis des métaux mais aussi d'autres composés toxiques.

Les vésicules inversées constituent également un outil de choix. Grâce à de telles vésicules préparées à partir de *L. lactis* exprimant le transporteur trans-membranaire *ImrA*, un transport de cadmium radioactif a pu être mis en évidence. Cette étude pourrait être étendue à d'autres métaux radioactifs.

Le clonage complet du gène codant pour une protéine de type MDR chez *C. fluminea* n'a pas encore été obtenu. Son expression fonctionnelle dans des bactéries *E. coli* permettrait de mettre en évidence le rôle protecteur de cette protéine de mollusque lors de contaminations par le cadmium et d'analyser son rôle lors de contaminations par d'autres métaux ou xénobiotiques. De même, son expression chez *L. lactis* permettrait, *via* les vésicules inversées, d'étudier le transport des métaux.

A l'issue de ce travail, il semble possible que plusieurs gènes étudiés ici puissent être exploités comme indicateurs précoces de pollution par le cadmium. D'une façon générale, il est difficile de trouver un biomarqueur spécifique de la pollution par les métaux et d'un métal en particulier.

En ce qui concerne le gène *rpS9*, la potentialité de marqueur de pollution métallique semble encore limitée puisque la réponse au cadmium peut être masquée en présence de zinc. Il faut donc d'abord analyser la région promotrice et étudier la régulation de ce gène en présence de plusieurs métaux.

La relation entre quantité de protéine de type MDR et contamination métallique est établie, cependant le niveau de protéine MDR apparaît d'après plusieurs études dans la littérature, plutôt comme un marqueur de stress global. Ce gène peut donc être utile dans le cadre d'études multiparamétriques comme celle décrite dans l'annexe 1 où l'induction de la protéine de type MDR est corrélée à la modification d'autres biomarqueurs.

Enfin, outre les métallothionéines qui sont déjà largement utilisées en tant que biomarqueurs de stress métallique, le gène *CoxI* dont la séquence est très conservée d'une espèce à l'autre peut constituer un bon candidat, en particulier si différents organismes sentinelles, d'eau douce ou d'eau salée, sont utilisés. Il est cependant bien sûr nécessaire de poursuivre et systématiser son étude en multipliant les conditions de contamination en particulier avec d'autres métaux.

*Annexe 1*

*Impact of cadmium contamination and oxygenation levels  
on biochemical responses in the Asiatic clam  
Corbicula fluminea*





ELSEVIER

Aquatic Toxicology 74 (2005) 242–253

**AQUATIC  
TOXICOLOGY**

www.elsevier.com/locate/aquatox

## Impact of cadmium contamination and oxygenation levels on biochemical responses in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*

Alexia Legeay\*, Maud Achard-Joris, Magalie Baudrimont,  
Jean-Charles Massabuau, Jean-Paul Bourdineaud

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

Received 6 December 2004; received in revised form 11 May 2005; accepted 11 May 2005

### Abstract

The aim of this work was to evaluate the potential utility of several biochemical parameters as indicators of the toxic effects of cadmium in the freshwater clam *Corbicula fluminea* under two levels of oxygenation (normoxia 21 kPa and hypoxia 4 kPa). These variations in oxygenation are representative of the natural environments of bivalves living at the bottom of the water column, where hypoxic episodes may occur regularly. Cadmium accumulation, metallothionein synthesis, MXR protein induction, lipoperoxidation and antioxidant enzyme activities (catalase, glutathione reductase and total and selenium-dependent glutathione peroxidases) were assessed in the gills of *C. fluminea* in four experimental conditions: normoxia, hypoxia, normoxia with cadmium and hypoxia with cadmium ( $[Cd] = 30 \mu\text{g l}^{-1}$ ) over a 14-day period. Behavioural reactions were also followed for the duration of the experiment by monitoring clam activity and valve movements. This study is a first report on biochemical responses under cadmium contamination and hypoxia and will enable us to determine better biomarkers for *C. fluminea* as they were measured simultaneously. In metal-exposed animals, we found an increasing accumulation of cadmium in the gills with time, and this was more severe in hypoxic conditions. Metallothionein synthesis occurred in contaminated clams and was precocious in hypoxic conditions. MXR protein induction appeared promising due to its quick and significant response to metal with a strong impact from hypoxic contamination. On the other hand, in our experimental conditions, antioxidant parameters did not show decisive responses to contamination and hypoxia, except glutathione peroxidases which decreased systematically with time in a cadmium-independent manner. Lipid peroxidation, expressed as malondialdehyde content, was not stimulated by normoxic contamination, as has been shown in other studies, but was stimulated under hypoxic cadmium contamination. Our study confirms the importance of a multi-biomarker approach in environmental studies as some are not appropriate to all organisms.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Antioxidant enzymes; Lipid peroxidation; Metallothionein; MXR; Cadmium; Hypoxia; *Corbicula fluminea*

### 1. Introduction

Aquatic systems are contaminated by different pollutants, including metals, as a result of man's activities.

\* Corresponding author. Tel.: +33 556 223 920;

fax: +33 556 549 383.

E-mail address: a.legeay@epoc.u-bordeaux1.fr (A. Legeay).

Bivalve molluscs are known to accumulate high concentrations of heavy metals in their tissue and are widely used as bioindicators for pollution in marine (Regoli and Orlando, 1994; Geret et al., 2003) and freshwater (Cossu et al., 1997; Doyotte et al., 1997; Vidal et al., 2001) environments. They usefully complement chemical analyses as they provide a time-integrated indication of environmental contamination. A panel of different parameters is in current use in field studies including behavioural analyses or measurements of biochemical biomarkers. Among these biomarkers, the evaluation of oxygen reactive species (ROS) has been well developed in the past 2 decades. In fact, a consequence of aerobic life is the production of ROS as a result of normal oxygen metabolism. To protect themselves against the possible ravages of oxyradical production, aerobic organisms have evolved a complex system of defences including antioxidant enzyme catalase (CAT), glutathione reductase (GRD) and glutathione peroxidases (GPX). In the environment, numerous anthropogenic pollutants, including metals, provoke oxidative stress in aquatic organisms resulting, among other things, in lipid peroxidation (LPO), through oxidation of polyunsaturated fatty acids, DNA damage and altered calcium homeostasis (Brennan and Schiestl, 1996; Stohs and Bagchi, 1995; Stohs et al., 2000). Cadmium (Cd) is one of the metals which is known to increase ROS formation and promote oxidative stress in organisms ranging from yeast (Brennan and Schiestl, 1996) to vertebrates (Stohs et al., 2000) and several studies deal with antioxidant systems in response to cadmium contamination (Almeida et al., 2002; Geret et al., 2002b; Siraj Basha and Usha Rani, 2003; Company et al., 2004). As described in Livingstone et al. (1990), the enzymatic antioxidant system can be enhanced as an adaptation or a compensatory reaction to ROS formation, or impaired indicating a toxic effect of ROS.

Metallothioneins (MTs) are also currently measured in response to cadmium contamination. These low molecular weight, cystein-rich proteins are known for their protective action against toxic metals. Their induction following cadmium exposure in molluscs is well documented (Bebianno and Langston, 1991; Baudrimont et al., 1997; Bebianno and Serafim, 1998; Geret et al., 2002b). Otherwise, antioxidant enzymes seem to act as the first defence mechanism against an

excess of Cd in the cells, while MTs intervene later (Geret et al., 2002b).

A new biochemical marker has recently been studied on *Corbicula fluminea* in relation to metal contamination. Specifically, the induction of a multi-xenobiotic resistance (MXR) protein was measured to establish if a dose-dependent relationship existed between MXR expression and metallic stress (Achard et al., 2004).

The aim of the present work was to study several biochemical responses to cadmium contamination in *C. fluminea* and assess and compare their potential use as biomarkers. This freshwater bivalve is a burrowing species living in the upper layers of sediments (Britton and Morton, 1982). Due to its position at the bottom of the water column, this species can be naturally submitted to hypoxic episodes. Under two oxygenation levels in the water (normoxia 21 kPa and hypoxia 4 kPa), we measured several parameters, such as cadmium accumulation, metallothionein synthesis, MXR protein induction, lipoperoxidation and antioxidant enzyme activities (catalase, glutathione reductase and glutathione peroxidases), in *C. fluminea* gills. Furthermore, during the whole experiment, one batch of clams was equipped for valvometric studies to estimate behavioural response to cadmium contamination in these oxygenation conditions. This study, the first on biochemical responses under cadmium contamination and hypoxia, will allow us to improve biomarker choice for *C. fluminea* as both sets of responses were measured simultaneously.

From various different tissues, the gills were chosen as they represent the main barrier involved in metal uptake via the direct route of exposure, with a large exchange area in contact with the surrounding environment. Moreover, they are known to accumulate large amounts of cadmium (Baudrimont et al., 1997).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Adult *C. fluminea* bivalves were collected manually in June 2003 from the L'Isle River at Saint-Seurin (Aquitaine region, France). On arrival at the laboratory, the clams were calibrated and the average shell length was  $27.5 \pm 0.1$  mm (mean  $\pm$  standard error) corresponding to a mean wet weight of  $0.51 \pm 0.01$  g for

the whole soft bodies. Before experiments, clams were kept in large tanks (volume: 200 l) filled with aerated tap water over a 10 cm quartz sand layer (SILAQ, Mios, France) where they could reproduce natural behaviour (burying). They were fed twice a week with a suspension of unicellular algae (*Scenedesmus subspicatus*) over a 1-month maintenance period allowing acclimation.

## 2.2. Experimental design

Experiments were performed on acclimated freshwater bivalves in four experimental units (EU) consisting of polyvinyl chloride tanks (80 cm × 60 cm × 30 cm) lined with plastic bags (Plastiluz, alimentary standard). The bottom of the tanks was covered with a 5 cm layer of quartz sand, rather than natural substrate which could introduce indirect contamination, and they were filled with 120 l of dechlorinated tap water. The water column was permanently controlled for temperature ( $15 \pm 0.5$  °C), pH ( $7.00 \pm 0.05$ , pH-CO<sub>2</sub>-stat) and oxygenation levels (either normoxia, partial pressure of oxygen,  $P_{O_2} = 21$  kPa, or hypoxia,  $P_{O_2} = 4$  kPa; corresponding O<sub>2</sub> concentrations, 10 and 2 mg l<sup>-1</sup>) and some water was added to compensate for evaporation in these closed systems. Experiments occurred under natural light conditions and animals were fed twice a day with 500 ml of an algae suspension of *S. subspicatus* ( $2 \times 10^5$  cells l<sup>-1</sup>). Each tank contained 127 bivalves and four experimental conditions were applied, combining different oxygenation levels and cadmium concentrations (0 or 30 µg l<sup>-1</sup>). Hypoxia was obtained by bubbling a N<sub>2</sub>/air gas mixture via mass flow controllers (Tylan, Model FC-260) driven by a laboratory-constructed control unit. To maintain cadmium contamination, daily additions of aqueous metal solution compensated for the decrease in Cd concentration in each EU, determined from measuring metal concentrations in water samples collected each morning. Metal additions were made from a CdCl<sub>2</sub> stock solution (100 mg l<sup>-1</sup> Cd). At days 1, 3, 7 and 14, some clams were removed and replaced by others to maintain the same density over the 14-day period of the experiment. Sampled clams were either immediately dissected for MXR determination or stored at -80 °C for further measurements and under nitrogen atmosphere for MT determination. In addition, five randomly

selected animals per tank were equipped for valvometry and their valve activity monitored during the entire experiment.

## 2.3. Valvometry

To evaluate the impact of hypoxic stress on clam behaviour, with or without cadmium contamination, we recorded their body activity and valve movements throughout the experiment with an impedance valvometer (Tran et al., 2003). This was performed on clams equipped with two light platinum electrodes (Ø 3 mm; weight 20 mg) fixed on each valve. This allowed the animal to position itself in the sand and move freely without experimental constraint. The measurement principle was based on the application of Ohm's Law,  $U = RI$ , since the apparatus measured a current which varied according to the distance between the electrodes. A total of 317 h (13.2 days) of signal was analyzed per condition.

## 2.4. Cadmium determination

At days 1, 3, 7 and 14, gills from five individuals in each tank were dissected, dried on absorbent paper before being weighed (fw). Tissue samples were digested with nitric acid in a pressurized medium at 100 °C for 3 h. After dilution of the digestates in 20 ml ultrapure water (MilliQ plus), cadmium concentrations were determined by atomic absorption spectrophotometry with Zeeman correction, using graphite tube atomizer (AAS Thermoptec M6Solaar). The detection limit was 0.1 µg l<sup>-1</sup> Cd. All metal concentrations were expressed as ng g<sup>-1</sup> wet weight tissue. The validity of the method was checked periodically against measurements of certified biological reference materials (Tort-2: lobster hepatopancreas and Dolt-2: dogfish liver from NRCC-CNRC, Ottawa, Canada).

## 2.5. Biochemical analyses

### 2.5.1. Metallothionein determination

As MTs are known to occur belatedly in response to cadmium contamination (Rosijadi and Klerks, 1989), we determined MT concentrations at days 7 and 14 only, in gills from nine *C. fluminea* per condition (three replicates of three pooled samples). Tissue samples were homogenized in Tris-HCl 25 mM, pH 7.2,

with a blender (Ultra-Turrax T-25), centrifuged at  $20,000 \times g$  for 1 h at  $4^\circ\text{C}$  and quantified with the mercury-saturation assay (MSA, Baudrimont et al., 1997). This technique, using cold inorganic mercury, is based on the quantification of mercury (Hg) bound to the saturated-MT after protein denaturation with trichloroacetic acid (MTs are not denatured) and the scavenging of excess Hg not bound to the MT with lyophilized beef hemoglobin ( $25 \text{ g l}^{-1}$ , Sigma H-2500) prepared in Tris-HCl 30 mM, pH 8.2. After  $20,000 \times g$  centrifugation for 20 min, the final supernatant was then quantitatively recovered and analyzed for Hg determination by flameless atomic absorption spectrometry (AMA 254, Altec, Prague, Czech Republic). The detection limit was estimated at 1 ng Hg.

Reference samples or “blanks” (200  $\mu\text{l}$  Tris-HCl homogenization buffer + 200  $\mu\text{l}$  trichloroacetic 10%  $\text{HgCl}_2$  50  $\text{mg l}^{-1}$  solution + 200  $\mu\text{l}$  beef hemoglobin solution) were prepared to monitor the Hg complexation efficiency of the hemoglobin. Under our experimental conditions, an average burden of 1.2 ng Hg was measured in these reference samples, compared with the 10,000 ng initially added (0.01%). The mean of the three blank values measured in each analytical run was deducted from the Hg burdens measured in each tissue sample replicate.

Simultaneously, a standard of purified rabbit liver MT (Sigma M-7641) was used to check the validity of the saturation assay by determining the ratio between the binding sites measured after Hg-saturation and the potential binding sites indicated by the supplier and previously verified by Hg, Cd, Zn and Cu determinations on purified MT solution ( $10 \mu\text{g MT ml}^{-1}$  in the homogenization buffer). In our experimental conditions, the average value of the recovery percentage was  $100.17 \pm 4.6\%$ . MT concentrations in the clams' gills were expressed in nanomoles of Hg-binding sites per gram  $\pm$  S.E. (wet weight). Owing to the fact that the exact quantity of Hg binding sites per MT molecule is unknown for this species, MT concentrations cannot be expressed in  $\text{nmol MT g}^{-1}$  (wet weight).

#### 2.5.2. Western blotting for MXR

After each exposure time, nine clams were removed from each of the four conditions for Western blotting. Animals were dissected on ice, gills from the nine individuals were pooled and 400–600 mg of tissue was homogenized with a blender (Ultra-Turrax

T-25) in 1 ml of fresh lysis buffer (10 mM KCl, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM Tris-HCl pH 7.4 and 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF). Sodium dodecyl sulfate (2% final concentration) was added, samples were then sonicated in a water bath for 10 min and centrifuged at  $1000 \times g$  for 10 min. Protein concentrations from the supernatants, kept at  $-20^\circ\text{C}$ , were determined with the bicinchoninic acid assay (Pierce, BCA Protein Assay kit). Thirty micrograms of proteins from each protein extract were resolved on 7.5% polyacrylamide gels and transferred to Immun-blot polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad) with a semi-dry transfer cell (Bio-Rad), according to manufacturer's instructions. Immunolabelling was performed using the P-glycoprotein-specific monoclonal antibody C219 (dilution: 1/500; Signet, Dedham, MA, USA), which recognizes a highly conserved amino acid sequence common to all MDR-protein (Endicott and Ling, 1989), and goat anti-mouse peroxidase-conjugated secondary antibody (dilution: 1/10,000, Jackson ImmunoResearch, local supplier: Perbio Science, Brebières, France). Bands were detected by chemiluminescence according to Amersham protocols. Digitalised photos of the gels were used for subsequent image analysis with the Scion Image program (Scion corporation).

#### 2.5.3. Antioxidant enzyme assays

The study of enzymatic activities and malondialdehyde (MDA) concentration was carried out on three pools of four clams' gills from the four conditions. Gills were weighed and homogenized with a blender (Ultra-Turrax T-25) in 2 ml of 50 mM phosphate buffer containing 1 mM PMSF as serine protease inhibitor. The homogenates were centrifuged at  $100,000 \times g$  for 80 min. Enzyme activities were measured using a spectrophotometer (Shimadzu UV-1601) by continuous registration at  $25^\circ\text{C}$ .

Catalase (EC 1.11.1.6.). CAT activity was measured according to Greenwald (1985) by the decrease in absorbance at 240 nm due to  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumption ( $\epsilon = -0.0436 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). A final volume of 3 ml consisted of 2900  $\mu\text{l}$  50 mM K-phosphate buffer and 0.1 mM EDTA, 70  $\mu\text{l}$  protein sample and 30  $\mu\text{l}$  1 M  $\text{H}_2\text{O}_2$ . CAT activity in the gills was expressed as  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  total protein.

Glutathione reductase (EC 1.6.4.2.). GRD activity was measured by following the decrease in absorbance

at 340 nm ( $\epsilon = -6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) due to the oxidation of NADPH (Ramos-Martinez et al., 1983). The assay mixture contained in a final volume of 1 ml 930  $\mu\text{l}$  50 mM K-phosphate buffer and 0.1 mM EDTA, 10  $\mu\text{l}$  12 mM NADPH, 50  $\mu\text{l}$  protein sample and 10  $\mu\text{l}$  20 mM oxidized glutathion. Activities were expressed as  $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ .

Glutathione peroxidases (EC 1.11.1.9. and EC 2.5.1.18.). Glutathione peroxidase activities were measured following the formation of GSSG in an enzyme system coupled with glutathione reductase (Lawrence and Burk, 1976). The decrease in NADPH due to its oxidation was followed at 340 nm ( $\epsilon = -6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Se-dependent (SeGPX) and total peroxidase (total GPX) activities were measured using  $\text{H}_2\text{O}_2$  and cumene hydroperoxide as substrates, respectively. A final volume of 1 ml contained 930  $\mu\text{l}$  50 mM K-phosphate buffer and 0.1 mM EDTA, 33  $\mu\text{l}$  150 mM reduced glutathione, one unit glutathione reductase, 10  $\mu\text{l}$  12 mM NADPH, 3.3  $\mu\text{l}$  1.125 M sodium azide, 50  $\mu\text{l}$  protein sample or blank, and 10  $\mu\text{l}$  20 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  or 200 mM cumene hydroperoxide.

#### 2.5.4. Lipid peroxidation determination

Polyunsaturated fatty acid peroxides generate MDA on decomposition. The determination method used was designed to measure thiobarbituric acid reactives (TBARs), including MDA, by spectrophotometry using the thiobarbituric acid method (Esterbauer and Cheeseman, 1990). Briefly, 450  $\mu\text{l}$  of 5% cold trichloroacetic acid was added to 150  $\mu\text{l}$  homogenates to precipitate proteins. The precipitate was pelleted by centrifugation ( $10,000 \times g$  for 15 min) and 550  $\mu\text{l}$  of supernatant was reacted with an equal volume of 1% thiobarbituric acid in a boiling water bath for 10 min. After cooling, TBAR levels were estimated at 532 nm (spectrophotometer Shimadzu UV-

1601) against a blank consisting of 1.5 ml 5% cold trichloroacetic acid mixed with 1.5 ml 1% thiobarbituric acid, and using malondialdehyde bis acetal (tetramethoxypropan, 10838-3, Sigma) as standard. Concentrations of lipid peroxidation compounds in the gills were expressed as  $\mu\text{mol mg}^{-1}$  protein.

#### 2.5.5. Total protein determination

For each homogenate, total protein concentrations were measured by the Lowry method (Lowry et al., 1951) using bovine serum albumin as reference standard material. Protein concentrations were expressed as  $\text{mg ml}^{-1}$  or  $\text{mg g}^{-1}$  wet weight.

#### 2.6. Statistics

The data were analyzed by non-parametric Kruskal–Wallis ANOVA and Mann–Whitney test with the Statistica 5.0 and Sigma Stat 2.0 programs. The level of significance was set at 0.05.

### 3. Results

#### 3.1. Animal behaviour and valve activity

No difference in body movements, burrowing activity or displacement was noticed as a function of experimental condition. In bivalves, valve opening time represents a behavioural response to variations in environmental parameters. Table 1 focuses on the valve closure responses during the 14-day period in each experimental condition. We show that, in our experimental conditions, opening time decreased significantly in hypoxia. In normoxia, cadmium contamination induced a decrease in opening time (from  $48.5 \pm 6.2$  to  $38.8 \pm 5.4\%$ ), whereas we did not observe this effect under hypoxia ( $27.8 \pm 5.1$  and  $31.0 \pm 3.7\%$

Table 1

Valve opening behaviour of *C. fluminea* in response to cadmium exposure and oxygenation level (normoxia 21 kPa and hypoxia 4 kPa)

	Normoxia		Hypoxia	
	[Cd] = 0 $\mu\text{g l}^{-1}$	[Cd] = 30 $\mu\text{g l}^{-1}$	[Cd] = 0 $\mu\text{g l}^{-1}$	[Cd] = 30 $\mu\text{g l}^{-1}$
Opening time ( $\text{ind}^{-1}$ )	153 h 49 min	127 h 19 min	88 h 21 min	88 h 14 min
Opening time ( $\text{ind}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ) (%)	$48.5 \pm 6.2$	$38.8 \pm 5.4$	$27.8 \pm 5.1$	$31.0 \pm 3.7$
Opening events ( $\text{ind}^{-1} \text{ day}^{-1}$ )	$0.86 \pm 0.05$	$0.83 \pm 0.19$	$0.65 \pm 0.07$	$1.10 \pm 0.15$

Valve closure activity was monitored and analyzed for 13.2 days (317 h). Five clams per condition were equipped for valvometric studies.

opening time without or with cadmium). These results suggest that animals are able to detect Cd in water and modify their behaviour as a protective response in normoxia. In turn, this adaptative response was not observed under hypoxia presumably due to the constraint imposed by the O<sub>2</sub>-supply requirement. In fact, when cadmium contamination was performed in hypoxia, the number of valve movements doubled ( $1.1 \pm 0.15$  instead of  $0.65 \pm 0.07 \text{ ind}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ) but the daily opening time remained constant in comparison with the uncontaminated hypoxic condition. As *C. fluminea* is known to hyperventilate in hypoxia, we thought that different Cd accumulation rates in the animals and thus different cellular responses between normoxia and hypoxia may occur. Consequently, we first characterized the metal tissue contamination levels in each condition.

### 3.2. Cadmium accumulation

Cadmium concentrations in the gills of clams exposed to different oxygenation and cadmium levels for 14 days are reported in Fig. 1. Cd levels in the gills of normoxic and hypoxic uncontaminated clams did not change during the course of the experiment and remained around  $118 \pm 11 \text{ ng g}^{-1}$  (normoxic) and  $132 \pm 14 \text{ ng g}^{-1}$  (hypoxic) wet weight. In Cd-exposed clams, Cd levels increased regularly with time of exposure. At day 14, significantly, the hypoxic contaminated clams accumulated around 30% more Cd than

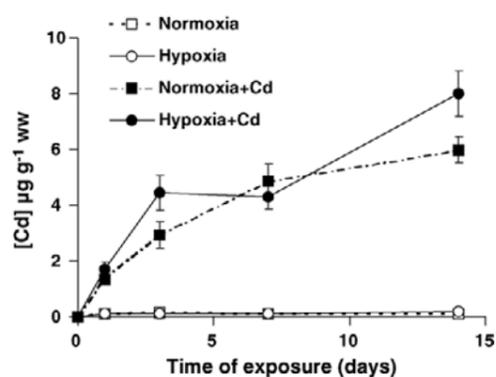


Fig. 1. Evolution of the cadmium concentration (mean  $\pm$  S.E.) with time in gills of *C. fluminea* under two levels of oxygenation (normoxia 21 kPa and hypoxia 4 kPa).

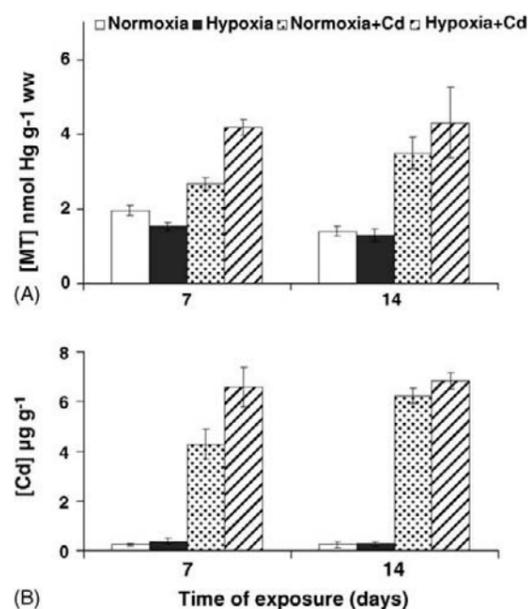


Fig. 2. Metallothionein concentrations (mean  $\pm$  S.E.) in gills of Cd-exposed and non-exposed clams *C. fluminea*, under two levels of oxygenation, after 7 and 14 days of treatment.

normoxic contaminated animals ( $8001 \pm 827 \text{ ng g}^{-1}$  against  $5970 \pm 469 \text{ ng g}^{-1}$ ).

### 3.3. Metallothionein concentrations

Due to the late response of MT, this parameter was only measured after 7 and 14 days of exposure (Fig. 2A) together with the cadmium concentration in the soluble fraction of the gills (just before the MT Hg-saturation, Fig. 2B). After 7 days of metal exposure, a significant induction of MT synthesis in the gills was observed compared with normoxic and hypoxic controls (+37 and +173% in normoxic- and hypoxic-exposed clams, respectively). This synthesis was significantly higher in hypoxic contaminated bivalves than in normoxic contaminated ones. Note that the MT induction appeared well correlated to Cd concentration in the soluble fraction but not in the whole gill (compare Fig. 1 and Fig. 2B). Indeed, at this time, cadmium concentration in the soluble fraction of gills under hypoxic conditions was significantly higher than under normoxia ( $6.16 \pm 0.8 \text{ µg Cd g}^{-1}$  against  $4.28 \pm 0.6 \text{ µg Cd g}^{-1} \text{ ww}$ ). No difference

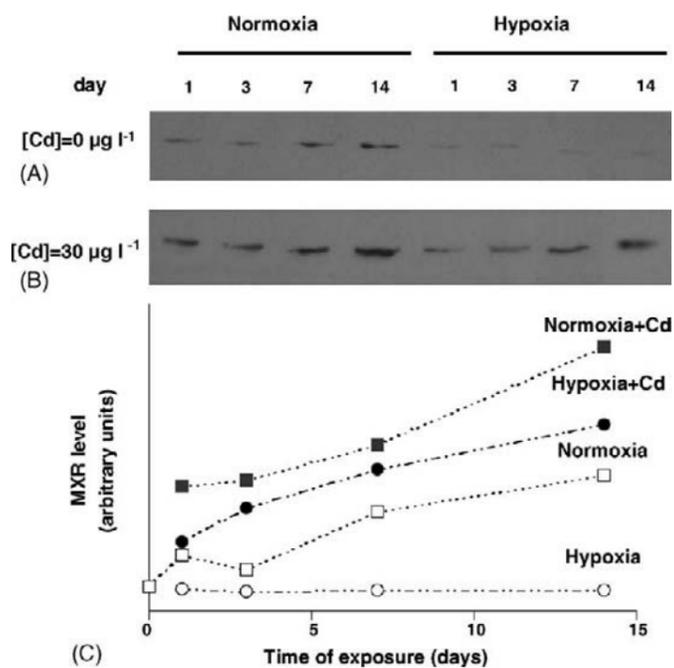


Fig. 3. Western blot showing MXR protein levels in *C. fluminea* gills after cadmium exposure under two levels of oxygenation (panels A and B). This pattern is representative of five Western blots. Panel C shows the evolution of MXR protein level in the gills as a function of exposure time. MXR protein levels correspond to the integrated band intensities taken from the blot, as determined with Scion Image program (in arbitrary units). This digital treatment of the blot's band intensities does not pretend to be quantitative but helps readers see the evolution of MXR protein pattern.

was observed between days 7 and 14 in hypoxic Cd-exposed clams ( $4.18 \pm 0.22 \text{ nmol Hg g}^{-1}$  against  $4.31 \pm 0.95 \text{ nmol Hg g}^{-1}$ ) whereas a slight increase occurred in normoxic ones ( $2.68 \pm 0.17$  to  $3.5 \pm 0.41$ ). We suggest that a plateau value could have been reached at day 7 in hypoxic conditions.

#### 3.4. MXR induction

Fig. 3 shows Western blots of clams' gills after 1, 3, 7 and 14 days of experiment. A band at 135 kDa, corresponding to MXR, consistently shows the strongest staining in the lanes loaded with protein from bivalves exposed to cadmium (panel B). Semi-quantitative analysis of the bands (panel C) shows differential protein levels between (i) normoxic and hypoxic clams in exposed and non-exposed clams and (ii) uncontaminated and contaminated clams (compare panels A and B) suggesting that MXR protein levels are induced both by cadmium and oxygenation. Surprisingly, MXR pro-

tein levels were higher in normoxic than in hypoxic clams. As shown in a previous study carried out in similar experimental conditions (Achard et al., 2004), in uncontaminated bivalves, we observed an increase with time in normoxia whereas hypoxic levels remained constant (Fig. 3C). Under Cd exposure, a pronounced MXR induction was observed (Fig. 3B and C). MXR levels increased with time in normoxic and hypoxic metal-exposed clams and highest levels were reached under normoxic conditions. Despite these lower MXR levels under hypoxia, note that normoxic induction was twice that observed at day 14 compared with the control animals, whereas a nine-fold induction was reached under hypoxia.

#### 3.5. Antioxidant enzyme activities and MDA contents

The antioxidant enzyme activities in gills of the four groups of clams are presented in Fig. 4. No difference

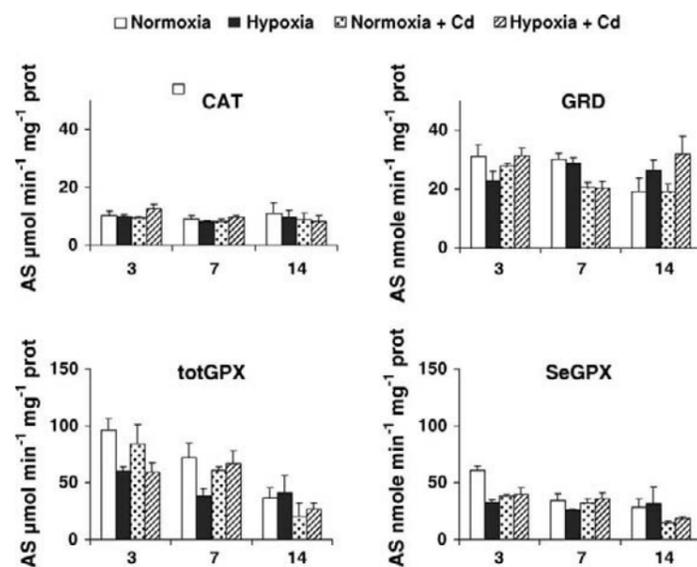


Fig. 4. Responses of catalase (CAT), glutathione reductase (GRD), total glutathione peroxidase (totGPX) and selenium-dependent peroxidase (SeGPX) in gills of Cd-exposed and non-exposed *C. fluminea* clams, under two levels of oxygenation, after 3, 7 and 14 days of treatment. Enzymatic activities are expressed as mean  $\pm$  S.E.

was observed for catalase activities in the four conditions. In this experiment, neither hypoxia nor cadmium induced an effect on this enzyme in *C. fluminea*.

For GRD activity we observed a significant decrease between days 3 and 14 in normoxic conditions. This decrease reached 38% without cadmium and 31% with cadmium. In hypoxic conditions, we noted a relative stability of the activity from 3 to 14 days without cadmium, whereas a decrease occurred at day 7 in Cd-hypoxic conditions before a recovery at day 14.

A significant decrease in total GPX activities was observed in the two normoxic groups. This decrease was continuous from 3 to 14 days and more severe in the presence of Cd (–76% of activity between days 3 and 14 instead of –62% without metal). Under hypoxic conditions, total GPX activity decreased slightly in the absence of Cd (–32% between days 3 and 14) whereas it fell between days 7 and 14 in the presence of Cd (–60%). In brief, total GPX activities decreased with time in all conditions, with an acute effect under metal exposure. The greatest decrease took place in normoxic contaminated clams.

The kinetics of SeGPX activities were quite similar to total GPX ones. A decrease with time was

also observed for all groups except the uncontaminated hypoxic one. This decrease was more marked in normoxic contaminated clams: –53% in normoxic uncontaminated clams; –60 and –53% with Cd under normoxia and hypoxia.

Cadmium effects on lipid peroxidation are illustrated in Fig. 5. Apart from the control group, where

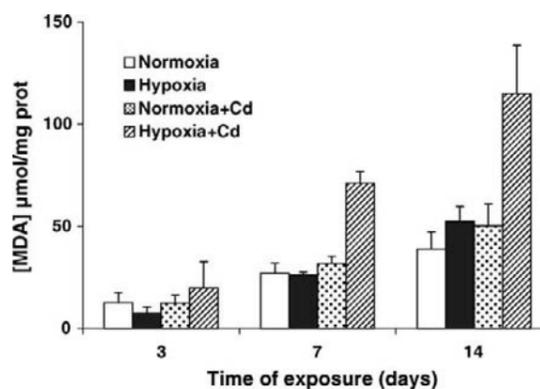


Fig. 5. Malondialdehyde concentrations (MDA, mean  $\pm$  S.E.) in gills of Cd-exposed and non-exposed *C. fluminea* clams, under two levels of oxygenation, after 3, 7 and 14 days of treatment.

the increase was not significant, MDA concentrations increased significantly from days 3 to 14 in the other three conditions. However, note that under normoxic conditions the presence of Cd exerted no influence on MDA generation at the three exposure times. However, the greatest quantities of Cd accumulated in hypoxic conditions stimulated lipid peroxidation ( $\times 2.7$  and  $2.2$  at days 7 and 14, respectively).

#### 4. Discussion

Laboratory studies are useful for evaluating the response to metal contamination and for a better understanding of cellular impact in order to choose the most useful parameters to follow up in field experimentations. The aim of this experiment was to investigate the responses of several biomarkers to cadmium exposure ( $30 \mu\text{g l}^{-1}$ ) under normoxic and hypoxic conditions (21 and 4 kPa in the water) in gills of the freshwater bivalve *C. fluminea*, and to determine which are the most efficient.

In metal-exposed animals, we showed an increasing accumulation of Cd in gills with time. This accumulation was more severe under hypoxic conditions. In fact, a decrease in water oxygenation induced ventilatory stimulation which enhanced the biological availability of Cd in *C. fluminea* (Tran et al., 2001). Despite a lower total opening time in hypoxic contaminated clams in our experimental conditions ( $31.0 \pm 3.7\%$  against  $38.8 \pm 5.4\%$  in normoxic conditions, Table 1), this increase in ventilation allowed a greater influx of metal into the gills. This rise in Cd induced an increase in MT synthesis in contaminated clams, as they play a key role in metal detoxication (Baudrimont et al., 2003). Indeed, cadmium is known to induce MT synthesis in *C. fluminea* (Baudrimont et al., 1997) as well as in other molluscs, such as the marine clam *Ruditapes decussatus* (Bebianno and Serafim, 1998), mussels (Bebianno and Langston, 1991) and oysters (Rosijadi and Klerks, 1989; Geret et al., 2002a), where the induction of MT synthesis started only 4 days after Cd exposure ( $200 \mu\text{g l}^{-1}$ , Rosijadi and Klerks, 1989). In our study, after 7 days exposure, MT concentrations were multiplied by a factor of 1.4 under normoxia and 2.7 under hypoxia and at day 14 by 2.5 under normoxia and 3.3 under hypoxia. MTs appeared to be a good biomarker in *C. fluminea*, as

they are in many other molluscs. Indeed, MT concentrations showed a significant correlation with Cd bioaccumulation in the soluble fraction taking into account all our experimental data ( $R_{\text{spearman}} = 0.87$ ). Moreover, we showed in this study that hypoxic Cd contamination stimulates their synthesis. We should also bear in mind that MTs may have an antioxidant role in molluscs as the highly toxic hydroxyl radical can be scavenged by MTs (Viarengo et al., 1999, 2000).

As shown in previous studies, cadmium induces MXR in molluscs (Eufemia and Epel, 2000; Achard et al., 2004). Our experiment demonstrated that this response is very precocious since after one day's exposure we observed a significant induction in three groups of organisms out of four (no induction in the hypoxic uncontaminated group). Surprisingly, the MXR basal level increased with time in the control normoxic group although it remained lower than in the two groups of Cd-exposed clams. In accordance with Achard et al.'s (2004) findings, we suggest that the accumulation of organic waste resulting from the 14 days experimental period without water renewal, could contribute to this MXR induction. Interestingly, the basal level of MXR stayed constant under hypoxic conditions in uncontaminated clams, suggesting that the gene expression encoding for the MXR protein should be triggered to ambient oxygen level. The underlying mechanisms are presently unclear and obviously require further experiments. Note finally that, following metal exposure, the ratio of MXR induction was widely exacerbated under hypoxia as compared with normoxia. This shows that monitoring MXR induction is of great interest for ecotoxicological studies. This is especially true as we observed the highest inductions under hypoxia, a pertinent environmental parameter for *C. fluminea* in the wild.

Several authors have dealt with the antioxidant system in response to cadmium contamination (Almeida et al., 2002; Geret et al., 2002b; Siraj Basha and Usha Rani, 2003; Company et al., 2004). Almeida et al. (2002) showed that acute exposure to cadmium ( $0.35\text{--}3.0 \text{ mg l}^{-1}$ ) over a 60-day period induced an increase in antioxidant defenses (superoxide dismutase and GPX) in survival fish *Oreochromis niloticus* and no significant alteration in lipid peroxidation compounds. The same results were observed in *Oreochromis mossambicus* after 15 days Cd-exposure ( $5 \text{ mg l}^{-1}$ ) but

this was followed by a decrease in antioxidant enzyme activities after 30 days of exposure (Siraj Basha and Usha Rani, 2003). On the other hand, Cd produced an inhibitory effect in the enzymatic defence system in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* with a significant decrease in CAT and total GPX activities and an increase in LPO levels (Company et al., 2004). Inhibition of GPX activities has also been reported in the gills of Cd-contaminated marine clams *R. decussatus* concomitant with an increase in MDA levels (Geret et al., 2002b). Such effects have also been seen under various toxicant situations, as in the freshwater bivalve *Unio tumidus* when exposed to thiram (a dithiocarbamate known to induce oxidative stress in mammals) where SeGPX activities were also markedly lower compared with controls in the gills of treated mussels (–66%). The same pattern was found for GRD activity with a loss of 63% (Doyotte et al., 1997). In the same study, some field experiments were conducted in a complex industrial effluent where polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorobiphenyls and metals were mixed. Once again lower SeGPX and GRD activities were observed, whereas CAT was not particularly modified under these stressful conditions (Doyotte et al., 1997). These results show that Cd contamination does not necessarily lead to the induction of antioxidant enzymes but rather to their depletion. In keeping with this, we here report a lack of influence of oxygenation levels and Cd on CAT, a normoxic Cd-independent decrease in GRD, and an oxygen- and Cd-independent time decrease in both types of GPX activities. In contrast, a study of the influence of abiotic factors on oxidative stress indicators in *C. fluminea* showed a slight increase in CAT activity in the entire soft bodies under hypoxia from 6 to 8  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$  (Vidal et al., 2002). Although the authors recognize that it would have been more coherent if a decrease in CAT activity were observed, they suggest that an increase in ventilation could cope with the low oxygen concentration within the 5 days of the experiment. Nevertheless, we have to keep in mind that, like many water breathers, *C. fluminea* maintains its arterial blood  $P_{\text{O}_2}$  at 3 kPa whatever the water  $P_{\text{O}_2}$  within the range 4–40 kPa (Tran et al., 2000) so the pool of free radicals should not increase in hypoxia.

In conclusion, the induction of oxidative stress biomarkers is hardly predictable, especially in complex

environmental conditions when pollutant concentrations are low. Clear-cut inductible responses are only obtained with very high concentrations of metal, but which are environmentally irrelevant ( $0.35\text{--}3 \text{ mg l}^{-1}$  Cd in Almeida et al., 2002;  $5 \text{ mg l}^{-1}$  Cd in Siraj Basha and Usha Rani, 2003).

The MDA results showed a small increase with time in the control group, probably related to waste accumulation. Although several studies have shown a LPO increase under normoxic cadmium contamination in molluscs (Geret et al., 2002b; Company et al., 2004), no significant change in TBARs compared with control appeared at any of our experimental times except at days 7 and 14 in hypoxic contaminated clams. At these times, no significant differences were observed between normoxic and hypoxic antioxidant enzyme activities (CAT, GRD and GPX) in contaminated animals. Thus, the increase in TBARs in hypoxic bivalves is not due to a lower antioxidant enzyme levels. We suggest that in this group, where the MXR levels are lower than in normoxic contaminated clams, xenobiotics, such as MDA, accumulated rapidly. Otherwise, a study on *C. fluminea* showed that during valve closure clams depressed their energy metabolism to less than 10% of the standard metabolic rate measured when the valves are open (Ortmann and Grieshaber, 2003). We suggest that under our hypoxic conditions less ATP would be produced, and less would therefore be available for the various ATPase which could be implied in detoxicant mechanisms.

*C. fluminea* is a tool currently used as a biomarker for water contamination, for instance in the national French program ECODYN which assesses water quality in the Lot-Garonne continuum. Our study confirms the importance of a multi-biomarker approach in environmental studies as some are not appropriate to all organisms. Cadmium accumulation and MT remain indispensable biomarkers in *C. fluminea* and MXR appears to be promising with a quick and significant response under contamination and hypoxia. Antioxidant enzymes did not live up to our expectations as no clear results were seen in our experimental conditions.

## References

- Achard, M., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.P., 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the

- Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquat. Toxicol.* 67, 347–357.
- Almeida, J.A., Diniz, Y.S., Marques, S.F.G., Faine, L.A., Ribas, B.O., Burneiko, R.C., Novelli, E.L.B., 2002. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environ. Int.* 27, 673–679.
- Baudrimont, M., Andres, S., Durrieu, G., Boudou, A., 2003. The key role of metallothioneins in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase, after in situ exposure to Cd and Zn. *Aquat. Toxicol.* 63, 89–102.
- Baudrimont, M., Metivaud, J., Maury-Brachet, R., Ribeyre, F., Boudou, A., 1997. Bioaccumulation and metallothionein response in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2096–2105.
- Bebianno, M.J., Serafim, M.A., 1998. Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*. *Sci. Total Environ.* 214, 123–131.
- Bebianno, M.J., Langston, W.J., 1991. Metallothionein induction in *Mytilus edulis* exposed to cadmium. *Mar. Biol.* 108, 91–96.
- Brennan, R.J., Schiestl, R.H., 1996. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. *Mutat. Res.* 356, 171–178.
- Briton, J.C., Morton, B., 1982. A dissection guide, field and laboratory manual for the introduced bivalve *Corbicula fluminea*. *Malacol. Rev.* 3 (Suppl.), 1–82.
- Company, R., Serafim, A., Bebianno, M.J., Cosson, R., Shillito, B., Fiala-Médioni, A., 2004. Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Mar. Environ. Res.* 58, 377–381.
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 1997. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotox. Environ. Saf.* 38, 122–131.
- Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M.C., Babut, M., Vasseur, P., 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquat. Toxicol.* 39, 93–110.
- Endicott, J.A., Ling, V., 1989. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 137–171.
- Esterbauer, H., Cheeseman, K.H., 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 186, 407–421.
- Eufemia, N.A., Epel, D., 2000. Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein, in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stresses. *Aquat. Toxicol.* 49, 89–100.
- Geret, F., Jouan, A., Turpin, V., Bebianno, M.J., Cosson, R.P., 2002a. Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquat. Living Resour.* 15, 61–66.
- Geret, F., Serafim, A., Barreira, L., Bebianno, M.J., 2002b. Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. *Biomarkers* 7, 242–256.
- Geret, F., Serafim, A., Bebianno, M.J., 2003. Antioxidant enzyme activities, metallothioneins and lipid peroxidation as biomarkers in *Ruditapes decussatus*? *Ecotoxicol.* 12, 417–426.
- Greenwald, R.A., 1985. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Lawrence, R.A., Burk, F.B., 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 952–958.
- Livingstone, D.R., Garcia Martinez, P., Michel, X., Narbonne, J.F., O'Hara, S., Ribera, C., Winston, G.W., 1990. Oxyradical production as pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other molluscs. *Funct. Ecol.* 4, 415–424.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Ortmann, C., Grieshaber, M.K., 2003. Energy metabolism and valve closure behaviour in the Asian clam *Corbicula fluminea*. *J. Exp. Biol.* 206, 4167–4178.
- Ramos-Martinez, J.I., Bartolomé, T.R., Pernas, R.V., 1983. Purification and properties of glutathione reductase from hepatopancreas of *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 75 B, 689–692.
- Regoli, F., Orlando, E., 1994. Accumulation and subcellular distribution of metals (Cu, Fe, Mn, Pb and Zn) in the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* during a field transplant experiment. *Mar. Pollut. Bull.* 28, 592–600.
- Rosijadi, G., Klerks, P.L., 1989. Kinetic analysis of cadmium binding to metallothionein and other intracellular ligands in oyster gills. *J. Exp. Zool.* 251, 1–12.
- Siraj Basha, P., Usha Rani, A., 2003. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotox. Environ. Saf.* 56, 218–221.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free. Radic. Biol. Med.* 18, 321–336.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., Hassoun, E., Bagchi, M., 2000. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 19, 201–213.
- Tran, D., Boudou, A., Massabuau, J.C., 2000. Mechanism for maintaining oxygen consumption under varying oxygenation levels in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Can. J. Zool.* 78, 2027–2036.
- Tran, D., Boudou, A., Massabuau, J.C., 2001. How water oxygenation level influences cadmium accumulation pattern in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*: a laboratory and field study. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2073–2080.
- Tran, D., Ciret, P., Ciutat, A., Durrieu, G., Massabuau, J.-C., 2003. Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: application to cadmium. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 116–122.

- Viarengo, A., Burlando, B., Cavaletto, M., Marchi, B., Ponzano, E., Blasco, J., 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am. J. Physiol. (Regul. Integr. Comp. Physiol. 46)* 277, R1612–R1619.
- Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfoli, I., 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell. Mol. Biol.* 46, 407–417.
- Vidal, M.L., Bassères, A., Narbonne, J.F., 2001. Potential biomarkers of trichloroethylene and toluene exposure in *Corbicula fluminea*. *Environ. Toxicol. Pharm.* 9, 87–97.
- Vidal, M.L., Bassères, A., Narbonne, J.F., 2002. Influence of temperature, pH, oxygenation, water-type and substrate on biomarker responses in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Comp. Biochem. Physiol.* 132C, 93–104.

## *Annexe 2*

*cDNA cloning and gene expression of  
ribosomal S9 protein gene in the mollusc Corbicula fluminea:  
a new potential biomarker of metal contamination  
up-regulated by cadmium and repressed by zinc*



**cDNA cloning and gene expression of ribosomal S9 protein gene in the mollusc *Corbicula fluminea*: a new potential biomarker of metal contamination up-regulated by cadmium and repressed by zinc**

Maud ACHARD-JORIS, Patrice GONZALEZ, Véronique MARIE, Magalie BAUDRIMONT, Jean-Paul BOURDINEAUD \*

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

\* corresponding author

## ABSTRACT

Biological indicators can be used to assess polluted sites, but their success depends on their specificity. The aim of this study was to identify a specific cadmium biomarker of the fresh water bivalve, *Corbicula fluminea*. Differential display technique was used to identify new molecular indicators for cadmium exposure. Gene expression of *C. fluminea* transplanted into a cadmium- and zinc-contaminated river was compared to gene expression of bivalves from a reference site. One differentially expressed band was identified and the entire cDNA sequence, coding for the ribosomal protein S9, was cloned. *rpS9* gene expression was studied by real-time RT-PCR. After controlled cadmium ( $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) and/or zinc ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) laboratory contaminations of the bivalves, this gene was shown to be up-regulated by cadmium and down-regulated by zinc. A 48-day transplantation of animals into a polymetallic field contamination in the Lot river basin showed that *rpS9* gene regulation was correlated with the fluctuating cadmium and zinc water contents. To our knowledge, the existence of a gene that is up-regulated by cadmium and repressed by zinc is demonstrated here for the first time.

Key words: *Corbicula fluminea*, ribosomal protein S9, cadmium, zinc, real-time RT-PCR.

## INTRODUCTION

The survival of an organism is constantly challenged by exposure to chemical toxicants. To inhibit pollutant-induced damage, cells increase the production of a variety of defence and repair mechanisms changing the expression of numerous genes (Eide, 2001). Several metal ions are necessary nutrients as they play an essential role in a variety of biochemical processes. However, others, such as cadmium and mercury, are very highly toxic and are considered a serious environmental health threat. Humans are exposed to cadmium via inhalation and ingestion of cadmium-containing foods. Toxicological responses to cadmium exposure include kidney damage, respiratory diseases, neurological disorders and cancers (Pinot *et al.*, 2000; Gerhardsson *et al.*, 2002). Cadmium has been found to be carcinogenic, mutagenic, and teratogenic for a large number of animal species (Waalkes, 2000), and can modify the expression of different classes of genes (Carginale *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2004). It stimulates the expression of immediate early genes like the tumor suppressor gene *p53* and genes coding for the synthesis of protective molecules, including metallothioneins, glutathione and heat shock proteins (Beyersmann et Hechtenberg, 1997). The induction of a multixenobiotic resistance protein following cadmium, zinc, copper, and mercury exposures has recently been reported in the Asiatic clam, *Corbicula fluminea* (Achard *et al.*, 2004).

Pollution of aquatic ecosystems by heavy metals is of environmental concern worldwide. Aquatic organisms in general are of interest as sensitive targets of environmental stress. Molluscs and in particular bivalves, which filter a large amount of water, are particularly exposed to environmental contaminants. They have developed a number of sub-cellular systems for accumulation, regulation and immobilization of metals and can sometimes be used as bioindicators to detect early signs of water pollution. Biological indicators can be used to assess polluted sites but their success essentially depends on their specificity. In this context, the aim of this study was to find a specific cadmium biomarker of the fresh water bivalve, *C. fluminea*. This bivalve provides an excellent model system to study the effects of heavy metal contamination since it can bioaccumulate heavy metals and survive in a heavy metal contaminated environment (Inza *et al.*, 1997). In the present report, we searched for genes whose expression could be affected by cadmium exposure at sub-lethal doses using the differential display technique. We describe the isolation and characterisation of the cDNA of such a gene whose coding sequence appeared to be homologous to ribosomal S9 proteins from fish and mammalian species. The expression of this gene was studied by real time quantitative PCR following both field and controlled laboratory metal exposure.

## MATERIALS AND METHODS

### ***Animals***

Adult bivalves (*Corbicula fluminea*) were collected from a reference site in Cazaux-Sanguinet freshwater lake (Aquitaine region, France). The average shell length was  $2 \pm 0.2$  cm.

### ***Field polymetallic exposure of transplanted animals***

The *in situ* contamination of the molluscs was based on caging procedure on small tributaries of the river Lot (Midi-Pyrénées region, France). Three stations were selected (Figure 1) along a polymetallic pollution gradient (Andrès *et al.*, 1999) originating from an old factory (Vieille Montagne) which has produced Zn for over a century. Station 1 was located on the river Lot, upstream from the confluence with the cadmium and zinc polluted Riou-Mort river (Andrès *et al.*, 1999). Station 2 was located on the Riou-Viou and station 3 on the Riou-Mort, downstream from the confluence with the Riou-Viou river. Station 1 was selected as a reference site because of the relatively low metal concentration in the water column and sediment compartments, and Station 2 and Station 3 were considered as polluted sites (Table 1, (Audry *et al.*, 2004)). Clams were transplanted into the three sites (50 animals per site) according to a protocol already described (Andrès *et al.*, 1999) for 24 or 48 days starting in May 2004.

### ***Laboratory exposure***

Laboratory experiments were carried out using experimental units (EUs) based on glass tanks lined with plastic bags (Plastiluz, alimentary standard) containing 3 kg of pure sand (3 cm deep ; 98% silica – granulometry 0.8-1.4 mm, SILAQ, France) and 10 L of dechlorinated tap water permanently aerated by a diffuser connected to an air pump according to a protocol already described (Achard *et al.*, 2004). Groups of 20 bivalves were exposed for 10 days to zinc chloride ( $\text{ZnCl}_2$ :  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ), cadmium chloride ( $\text{CdCl}_2$ :  $15 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ ) and  $\text{ZnCl}_2 + \text{CdCl}_2$  ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$  and  $15 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ , respectively). Cadmium chloride and zinc chloride were purchased from Merck. Water was not changed during whole experiment and metal concentrations were maintained constant by daily additions of aqueous Cd and Zn solutions, adjusted according to the decrease in metal concentration in the water. Means values were  $1.33 \pm 0.02 \text{ }\mu\text{g of Cd.L}^{-1}$  and  $15.3 \pm 1.8 \text{ }\mu\text{g of Zn.L}^{-1}$  during the whole experiment. The photoperiod was set at 12 h light per day. Temperature was fixed at  $20 \pm 0.2^\circ\text{C}$ . The pH was not regulated but periodic measurements in the EUs (pH-meter Mettler Toledo, MP1 20)

revealed only very small variations during the experiment ( $8.5 \pm 0.3$ ). The bivalves were fed every two days with  $3 \times 10^5$  green algae.mL<sup>-1</sup> culture (*Scenedesmus subspicatus*).

### ***Cadmium and zinc determination***

Whole soft body of one *C. fluminea* was taken from each replicate (five in the field or three in the laboratory) for each station and condition then dissected, dried on absorbent paper and weighed (fresh weight (f.w.)). Tissues and water samples were then analysed for metal bioaccumulation by atomic absorption spectrophotometry as previously described by Achard *et al.* (Achard *et al.*, 2004).

### ***cDNA fragment production and polymerase chain reaction***

Total RNA was extracted from gills of *C. fluminea* (2 animals per reaction) using the Absolutely RNA RT-PCR Miniprep kit (Stratagene, Canada and U.S.A.) according to the manufacturer's instructions.

RNA from field transplanted bivalves was quantified by OD<sub>260</sub> reading and 6 µg were used for the retrotranscription. First strand synthesis was performed using the 5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC TTT TTT TTT TTT TTT-3' primer, dNTP, and M-MLV Reverse Transcriptase (Promega). The random primer 5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3', which was complementary to the oligo-dT tail, was then used for subsequent PCR amplification, leading to the amplification of the coding sequence but also all the 3' non coding region. Polymerase chain reactions were performed in 40 µl using buffer (1.5 mM MgCl<sub>2</sub>), Taq polymerase (Promega, 1U), primers (200 nM each), 1 µl reverse transcription products, dNTPs (250 µM each), and water. After an initial 3 min denaturation at 94°C, 40 amplification cycles were performed (30s at 94°C, 30s at 48°C, 30s at 72°C), followed by a final 3 min at 72°C. Normalisation was carried out by detection of *C. fluminea* 28S with the following primers: 5'-CCA AGG AGT CTA ACA TGT GC-3' and 5'-GAT GGT TCG ATT AGT CTT TC-3'.

The generated fragments were separated by electrophoresis on a 1% agarose gel. The fragments of interest were excised under UV-light, and extracted with the QIA-quick gel extraction kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. Purified products were ligated into the pGEM-T-easy Vector System (Promega) with T4 DNA ligase. JM109 High Efficiency Competent Cells (Promega) were transformed with 3 µl of the ligation mixture and positive transformants were selected on ampicillin-containing medium (Luria Broth: 5 g.L<sup>-1</sup> yeast extract, 10 g.L<sup>-1</sup> bactotryptone, 10 g.L<sup>-1</sup> NaCl) and recombinant vectors were sequenced. Sequences were determined by Millegen Biotechnologies (Labège, France) on both strands using T7 and SP6 universal primers.

### **Rapid amplification of 5'-cDNA ends (5'-RACE)**

The 5' end of the cDNA sequences was obtained using the SMART RACE kit (Clontech). First strand cDNA was synthesized by reverse-transcription of 3 µg total RNA from Station 2 bivalves according to the manufacturer's instructions. The cDNA was then amplified using the UMP (Universal Primer mix from the kit) as the sense primer and a specific rpS9 primer as antisense (5'-CTT CAG CAG CGC CAC CAC CAG ATC CC-3'). The PCR amplifications were performed with 2.5 µl of cDNA according to the manufacturer's instructions. Reaction mixtures were subjected first to 5 cycles through the following temperature profile for high stringency annealing of primer: 94°C for 30 s, 72°C for 60 s. Then to 5 cycles through the following temperature profile: 94°C for 30 s, 70°C for 30 s, 72°C for 60 s; followed by 25 lower stringency cycles: 25 cycles 94°C for 30 s, 68°C for 30 s, 72°C for 60 s; and finally an additional extension step at 72°C for 60 s.

The sequence of *C. fluminea* rpS9 cDNA was deposited in GenBank under accession number AY571758.

### **SYBR green real-time PCR**

RNA from laboratory and river bivalves (3µg) was retrotranscribed in 50 µl reaction using the ProStar First-Strand RT-PCR kit (Stratagene).

To amplify part of *rpS9* cDNA, the specific primers CfrS95' 5'-TCA GAG TGC GTA AGC AGG T-3' and CfrS93' 5'-ACA CGA TAT ACA GGG AGA CAT GA-3' were designed according to the LightCycler probe design software (version 1.0, Roche). More details? Normalisation was carried out detecting cDNA 28S with the primers used for the PCR. SYBR green real-time PCR assay was carried out in 20 µl PCR mixture volume consisting of 1 µl LightCycler FastStart reaction mix SYBR Green I (containing FastStart *Taq* DNA polymerase, 0.3 µM of each oligonucleotide, and SYBRGreen I fluorescent dye; Roche), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.3 µM of each primer and 3 µl of cDNA. Gene amplification was carried out as follows: initial activation of HotStart *Taq* DNA Polymerase at 95°C for 10 min; 50 cycles in three steps: 95°C for 5 s, 60°C for 5 s, 72°C for 20 s. At the end of amplification cycles, melting temperature analysis was carried out by slowly increasing temperature (0.05°C/s) from 65 up to 95°C. Amplification, data acquisition and analysis were carried out with a LightCycler instrument (Roche, Mannheim, Germany) using LightCycler 5.3.2 software (Roche). Three replicates were done giving three independent RNA extractions and retrotranscriptions for each contamination condition. Relative quantification of each gene expression level was normalized according to the 28S gene expression.

The reaction specificity was determined for each reaction from the dissociation curve of the PCR product. This dissociation curve was obtained by following the SyberGreen fluorescence level during a gradual heating of the PCR products from 60 to 95 °C.

## RESULTS

### ***Identification and cloning of a metal-responsive gene by cDNA differential display***

The use of differential display allowed comparison of the gene expression profile of *C. fluminea* bivalves transplanted into the reference station (Station 1) with those of bivalves transplanted into a cadmium and zinc contaminated station (Station 3). This experiment was performed with a random primer (see the 5<sup>th</sup> section in materials and methods), and enabled us to identify a gene whose transcription was apparently up-regulated by the metal exposure. Figure 2 shows a differential display gel with the band of interest corresponding to a 670 bp cDNA fragment. The entire gene sequence (corresponding to 699 bp) encoding for a protein containing 192 amino acids, was obtained by rapid amplification of 5'-cDNA ends (5'-RACE) and sequenced (Figure 3A). The protein sequence was compared with the GenBank database using the BLASTX program, and the most significant alignments were found to correspond to ribosomal protein S9 from fish (*Ictalurus punctatus* and *Danio rerio*; 88% identity, 95% similarity) and mammals (*Homo sapiens* and *Rattus norvegicus*; 87% identity, 94% similarity) (Figure 3B). The very high identity rate with mammals may at first appear unexpected. Nevertheless, this identity cannot be due to contamination from human DNA since the 5'- and 3'-non coding regions were highly divergent compared to the *H. sapiens* ones.

### ***Study of rpS9 gene expression after cadmium and/or zinc contamination***

Confirmation of changes in *rpS9* gene expression level after metallic contamination was obtained by quantitative real-time RT-PCR experiments on RNA extracted from river-contaminated bivalves using specific primers designed according to the cDNA sequence (see the 6<sup>th</sup> section in materials and methods). 24 days after the bivalves were transplanted into the reference site and the two polluted sites, quantitative PCR showed a significant increase in *rpS9* gene expression level compared to the expression in Site 1 bivalves: 4.8-fold for Station 2 and 158-fold for Station 3, even if a large inter-individual variability was observed at Station 3 (table 2). This up-regulated expression could be correlated with cadmium and zinc concentrations in the water since Station 3 contained 2.2- times more

cadmium and 1.7- times more zinc than Station 2 (table 1). Nevertheless, zinc concentration in tissues of the bivalves transplanted in the two polluted sites was the same, while the cadmium concentration at Station 3 was double that at Station 2 (table 3). This suggests that the observed relative increase of the *rpS9* gene expression between Stations 2 and 3 animals could originate from an increase in the cadmium concentration. For longer exposures (24 to 48 days), the water metal concentrations increased considerably (table 1) and none of the animals survived at Station 3 while a 60% survival rate was observed at Station 2. While cadmium and zinc concentrations in the water at Station 2 increased 6- and 4-fold, respectively, during the period from day 24 to day 48 (table 1), a 2.5-fold decrease in *rpS9* gene expression was observed (table 2). This pattern suggests that either the balance between cadmium and zinc or the excess in one metal or both controlled *rpS9* gene activity negatively.

To clarify the effect of each metal on the *rpS9* gene expression level, bivalves were submitted to controlled laboratory exposures as described in the 3<sup>rd</sup> section in material and methods and quantitative real-time PCR was performed. These experiments demonstrated that the *rpS9* gene is up-regulated by cadmium and down-regulated by zinc (table 4). The positive influence of cadmium was masked by zinc when both metals were present in the water column and only a slight increase of *rpS9* expression was observed when compared to control animals.

## DISCUSSION

In the present study, differential display analysis was used to identify genes whose expression levels would be affected by cadmium and/or zinc. From this analysis, a cDNA corresponding to a gene induced after field transplant of the biological model, *C. fluminea*, was obtained. It encodes the S9 ribosomal protein. The finding that a gene encoding a ribosomal protein is up-regulated by cadmium may at first appear intriguing since ribosomal proteins are supposedly synthesised on an equimolar basis and are not usually associated with a metal-induced stress response. Unbalanced expression of ribosomal protein genes has however already been reported in several human cancers (Frigerio *et al.*, 1995). In *Saccharomyces cerevisiae*, the YST2 gene coding for a S0 ribosomal protein is induced by cadmium (Vido *et al.*, 2001). On the other hand, expression of the genes encoding for different ribosomal proteins was down-regulated by 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (Kurachi *et al.*, 2002).

In the present work, the gene was shown to be up-regulated by cadmium and down-regulated by zinc. A growing number of metal-responsive genes have been identified in several organisms. Among these, genes coding for heat shock proteins (Hsp) (Nadeau *et al.*, 2001) and multixenobiotic resistance protein (MXR) (Achard *et al.*, 2004) are up-regulated by several metals. There are fewer cases where a gene can be specifically induced by one metal. For example, the expression of the *cdr-1* gene of the nematode *Caenorhabditis elegans* is not influenced by metals other than cadmium (Liao *et al.*, 2002). In our study, the ribosomal protein S9 gene is not only induced by cadmium but also repressed by zinc. The biological significance of this effect is not yet known. Nevertheless, many ribosomal proteins display a secondary function apart from both ribosome assembly and protein synthesis. For instance, in *Escherichia coli*, the S9 ribosomal protein is involved in the SOS repair system (Wool, 1996) and in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, the S17 and S3 ribosomal proteins, induced by zinc, are involved in translation and DNA repair (Hogstrand *et al.*, 2002). Because one of the consequences of cadmium toxicity is DNA damage, the *C. fluminea* S9 ribosomal protein could also be implicated in DNA repair.

When bivalves were exposed simultaneously to the cadmium and zinc concentration used for single-metal exposure experiments, up-regulation of the *rpS9* gene disappeared. Nevertheless, this lack of induction of *rpS9* gene in presence of both metals is not due to a reduced intracellular cadmium level or to an increased intracellular zinc level, as shown by cadmium and zinc concentrations in tissues (table 5). Thus, our result underlines the competition between the two metals. The fact that *rpS9* synthesis is transcriptionally controlled leads us to postulate that cadmium may influence *rpS9* gene repression by substituting zinc atoms in specific zinc finger transcription factor. Indeed, the inhibitory effect of some transition metals such as cadmium may be attributed to an improper folding of zinc finger domains and/or oxidation of the cysteine residues (Hartwig, 2001). The transcription factor IIIA (TFIIIA), isolated from the immature ovary of *Xenopus laevis*, binds to the internal control region (ICR) of the 5 S ribosomal RNA gene and stimulates its transcription. Cd<sup>2+</sup> has been shown to displace Zn<sup>2+</sup> from TFIIIA and inhibit the specific interaction of TFIIIA with the ICR of the 5S RNA gene (Hanas et Gunn, 1996; Petering *et al.*, 2000). Moreover, it has also been evidenced a disruption of the protein-DNA binding at high zinc concentrations (Roesijadi *et al.*, 1998) From these results, in *C. fluminea* it could be hypothesized that a possible zinc finger transcription factor inhibiting *rpS9* gene transcription could possibly be deactivated by cadmium.

The ribosomal S9 gene whose expression is clearly up-regulated after a rather short exposure to environmentally-relevant concentrations of cadmium can be proposed as a potential biomarker of cadmium pollution. However, zinc down-regulates this gene and could limit its use as a biomarker. Nevertheless, no linear relationship was observed between

water metal concentration and *rpS9* gene expression. The same holds true with tissue metal loading versus *rpS9* gene expression. For instance, between days 1 to 24, the ratio of tissue concentration in cadmium over zinc was 0.025 at Station 2 and 0.05 at Station 3, yet the *rpS9* gene induction factor increased from 4.5 at Station 2 to 159 at Station 3. Although zinc decreased *rpS9* gene expression, down-regulation was only observed at zinc concentrations equal to or higher than 1 mg.L<sup>-1</sup> which are rarely found in natural sites. The expression level of the *C. fluminea* ribosomal S9 gene is therefore suggested as a potential tool for cadmium detection in ecotoxicological and biomonitoring programs.

*Acknowledgements* – The authors would like to thank Henri Bouillard, Bruno Etcheverria, and Véronique Roques-Duflo for their technical assistance.

## REFERENCES

- Achard M, Baudrimont M, Boudou A, Bourdineaud J. 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquatic Toxicol.* 67, 347-357.
- Andrès S, Baudrimont M, Lapaquellerie Y, *et al.* 1999. Field transplantation of the fresh water bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France): I. Geochemical characteristics of the sampling site and cadmium and zinc bioaccumulation kinetics. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2462-2471.
- Audry S, Blanc G, Schafer J. 2004. Cadmium transport in the Lot-Garonne River system (France) - temporal variability and a model for flux estimation. *Sci. Total Environ.* 319, 197-213.
- Beyersmann D, Hechtenberg S. 1997. Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144, 247-261.
- Carginale V, Capasso C, Scudiero R, Parisi E. 2002. Identification of cadmium-sensitive genes in the Antarctic fish *Chionodraco hamatus* by messenger RNA differential display. *Gene* 299, 117-124.
- Eide DJ. 2001. Functional genomics and metal metabolism. *Genome Biol.* 2, 12028.1-12028.3.
- Frigerio JM, Dagorn JC, Iovanna JL. 1995. Cloning, sequencing and expression of the L5, L21, L27a, L28, S5, S9, S10 and S29 human ribosomal protein mRNAs. *Biochim. Biophys. Acta.* 1262, 64-68.
- Gerhardsson L, Englyst V, Lundstrom NG, Sandberg S, Nordberg G. 2002. Cadmium, copper and zinc in tissues of deceased copper smelter workers. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 16, 261-266.
- Hanas JS, Gunn CG. 1996. Inhibition of transcription factor IIIA-DNA interactions by xenobiotic metal ions. *Nucleic Acids Res.* 24, 924-930.
- Hartwig A. 2001. Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions: differential effects on structure and function. *Antioxid. Redox Signal.* 3, 625-634.
- Hogstrand C, Balesaria S, Glover CN. 2002. Application of genomics and proteomics for study of the integrated response to zinc exposure in a non-model fish species, the rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.* 133, 523-535.
- Inza B, Ribeyre F, Maury-Brachet R, Boudou A. 1997. Tissue distribution of inorganic mercury, methylmercury and cadmium in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) in relation to the contamination levels of the water column and sediment. *Chemosphere* 35, 2817-2836.

- Kurachi M, Hashimoto S, Obata A, *et al.* 2002. Identification of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-responsive genes in mouse liver by serial analysis of gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292, 368-377.
- Liao VH, Dong J, Freedman JH. 2002. Molecular characterization of a novel, cadmium-inducible gene from the nematode *Caenorhabditis elegans*. A new gene that contributes to the resistance to cadmium toxicity. *J. Biol. Chem.* 277, 42049-42059.
- Nadeau D, Corneau S, Plante I, Morrow G, Tanguay RM. 2001. Evaluation for Hsp70 as a biomarker of effect of pollutants on the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Cell Stress Chaperones* 6, 153-163.
- Petering DH, Huang M, Moteki S, Shaw CFr. 2000. Cadmium and lead interactions with transcription factor IIIA from *Xenopus laevis*: a model for zinc finger protein reactions with toxic metal ions and metallothionein. *Mar. Environ. Res.* 50, 89-92.
- Pinot F, Kreps SE, Bachelet M, Hainaut P, Bakonyi M, Polla BS. 2000. Cadmium in the environment: sources, mechanisms of biotoxicity, and biomarkers. *Rev. Environ. Health* 15, 299-323.
- Roesijadi G, Bogumil R, Vasak M, Kägi JHR. 1998. Modulation of DNA binding of Tramtrack zinc finger peptide by the metallothionein-thionein conjugate pair. *J. Biol. Chem.* 273, 17425-17432.
- Vido K, Spector D, Lagniel G, Lopez S, B. TM, Labarre J. 2001. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 276, 8469-8474.
- Waalkes MP. 2000. Cadmium carcinogenesis in review. *J. Inorg. Biochem.* 79, 241-244.
- Wool IG. 1996. Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem. Sci.* 21, 164-165.
- Zhou T, Jia X, Chapin RE, *et al.* 2004. Cadmium at a non-toxic dose alters gene expression in mouse testes. *Toxicol. Lett.* 154, 191-200.

**Table 1:** Analysis of dissolved metals in the water at different sites.

Site	Cadmium ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )		Zinc ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	
	day 1 to day 24	day 24 to day 48	day 1 to day 24	day 24 to day 48
1. Boisse-Penchot	0.02 (0.013-0.038)	0.02 (0.013-0.038)	2 (1.2-2.6)	2 (1.2-2.6)
2. Riou-Viou	5.9 (2.5-8.3)	36.3 (36.3-36.3)	270.5 (158-373)	1100 (1100-1100)
3. Riou-Mort	12.95 (7.9-17.1)	16.9 (14.3-21.5)	467.5 (270-594)	762.5 (560-860)

These data correspond to the mean of cadmium and zinc concentrations measured weekly from exposure day 1 to 24, and 24 to 48 (mid May to June 2004), as described by Audry *et al.* (Audry *et al.*, 2004). Minimum and maximum values are indicated in parentheses.

**Table 2:** Expression levels of *rpS9* transcript in gills of bivalves transplanted for 24 or 48 days at the three field sites.

Site	Induction factor	
	24 days exposure	48 days exposure
1	$1 \pm 0.1$	$1 \pm 0.2$
2	$+ 4.8 \pm 0.7$	$- 2.5 \pm 0.4$
3	$+ 159 \pm 93$	n.a.d.

Expression ratio between *rpS9* and 28S genes in station 1 bivalves (control animals) was set to one. + and - stand for an increased and decreased expression of the gene compared to reference level, respectively. Measurements were done in triplicate. n.a.d : no available data.

**Table 3:** Cadmium and zinc concentrations (in micrograms per gram fresh weight  $\pm$  SE) in the whole soft body of *C. fluminea* after 24 days transplantation at the three stations.

Site	Metal concentration in molluscs ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )	
	Cadmium	Zinc
1	$0.08 \pm 0.01$	$35 \pm 1$
2	$2.46 \pm 0.15$	$98 \pm 5$
3	$4.90 \pm 0.14$	$98 \pm 7$

Cadmium and zinc determination was done on five replicates for each site.

**Table 4:** Expression levels of *rpS9* transcript in gills of bivalves exposed for 10 days to cadmium (Cd) ( $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), zinc (Zn) ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ), or cadmium and zinc ( $15 \mu\text{g.L}^{-1}$  and  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectively).

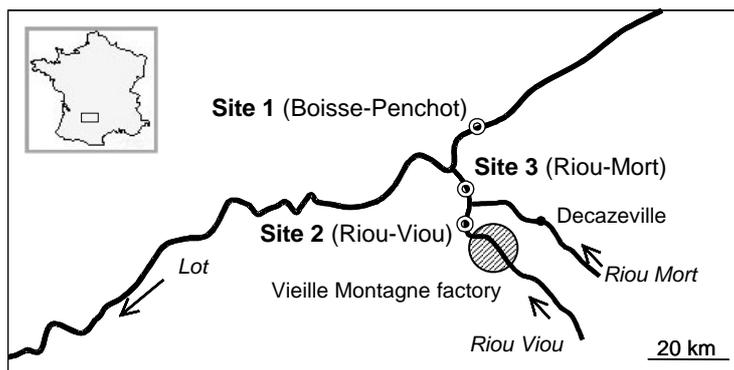
Metal exposure	Induction factor
none	$1 \pm 1.4$
Cd	$+ 16.5 \pm 10.3$
Zn	$- 120 \pm 20.7$
Cd + Zn	$+ 1.5 \pm 1.4$

Expression ratio between *rpS9* and 28S genes in control bivalves was set to one. + and - stand for an increased and decreased expression of the gene compared to reference level, respectively. Measurements were done in triplicate.

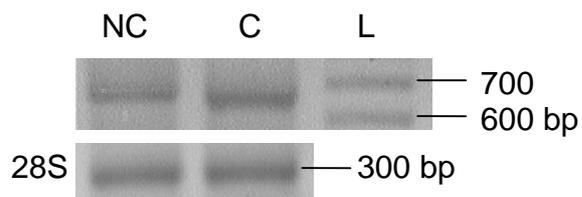
**Table 5:** Cadmium and zinc concentrations (measured in micrograms per gram fresh weight  $\pm$  SE) in the whole soft body of *C. fluminea* after 10 days laboratory exposure to cadmium (Cd), zinc (Zn), or both metals.

Metal exposure	Metal concentration in molluscs	
	Cadmium ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )	Zinc ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )
none	$0.06 \pm 0.01$	$20 \pm 2$
Cd	$5.31 \pm 2.60$	$21 \pm 1$
Zn	$0.10 \pm 0.01$	$70 \pm 10$
Cd + Zn	$2.34 \pm 1.17$	$46 \pm 13$

Cadmium and zinc determination was done in triplicate for each condition.



**Figure 1.** Location of the sampling sites in the river Lot basin, near Decazeville (the Midi-Pyrénées region, France). See the map of France in the upper left corner of the figure for the location of the Decazeville region which is enlarged in the figure.



**Figure 2.** Identification of a differentially displayed band corresponding to cDNA fragments. RNA samples from unexposed (NC) or cadmium and zinc (Cd+Zn) exposed bivalves (C) were retrotranscribed and amplified with random primers as described in section 2.4 and analysed by agarose gel electrophoresis. Primers for 28S were used for normalisation. L: ladder.

*A CGC AGG GCT TTC TCA CGT GGT TGT CAA AGA GGG CAT TGA AGC AAA*

M P R L A L V Q H K T Y T T P R R P 18  
ATG CCA CGC TTA GCT CTA GTA CAG CAC AAA ACC TAC ACA ACT CCG AGA CGT CCT 54

F E K E R L D Q E L K L I G E Y G L 36  
TTT GAA AAA GAA CGT CTA GAT CAG GAG TTG AAA TTG ATC GGT GAA TAT GGA TTG 108

R N K R E V W R V K Y A V A K I R K 54  
AGG AAC AAG CGT GAA GTG TGG AGA GTC AAG TAC GCT GTC GCC AAG ATC AGA AAG 162

S A R E L L T L E E K D P K R L F E 72  
TCT GCA AGA GAA CTT CTC ACC TTG GAA GAA AAA GAT CCT AAA AGA TTA TTT GAG 216

G N A L L R R L V R I G V L D E S K 90  
GGT AAC GCT CTT CTG CGT CGT TTG GTG AGG ATT GGT GTG TTG GAC GAG TCC AAG 270

M K L D F V L G L R T E D F L E R R 108  
ATG AAG CTC GAT TTC GTG TTA GGT CTT CGA ACT GAA GAT TTC TTG GAG AGA CGT 324

L Q T Q V F K L G L A K S I H H A R 126  
CTA CAG ACA CAG GTG TTC AAA CTT GGA TTG GCC AAG AGT ATT CAT CAT GCT CGT 378

I L I R Q R H I R V R K Q V V N I P 144  
ATA TTG ATC CGT CAG AGG CAC ATC AGA GTG CGT AAG CAG GTG GTG AAC ATT CCA 432

S F V V R L D S Q R H I D F A L S S 162  
TCA TTT GTA GTA CGT TTG GAC TCC CAG AGG CAC ATT GAC TTC GCC CTA TCC TCG 486

P Y G G G R A G R V K R K N A K K G 180  
CCA TAT GGT GGT GGC AGA GCT GGA CGT GTC AAG AGG AAG AAC GCC **AAG AAG GGA** 540

S G G G A A E E E D E D \* 198  
**TCT GGT GGT GGC GCT GCT GAA** GAG GAA GAC GAA GAT TAA ACA TCA TGT CTC CCT 594

*GTA TAT CGT GTT TAC TAT ATA CAG ACA ATA AAG AAA GAA AAA TTA AAA AAA AAA* 648

*AAA AA* 217  
653

**Figure 3. A.** Sequence of *C. fluminea* *rpS9* cDNA and protein. The nucleotide sequence of the *rpS9* cDNA is shown with the derived amino acid sequence presented below the corresponding codons. The 5'- and 3'-untranslated regions are shown in italics. The first cloned fragment is underlined. The location of the random primer used for the original PCR is indicated with a broken underline. The complementary sequence of the primer chosen for 5'-RACE PCR is indicated in bold letters.

```

D.rerio      MPVAKTWVCSKTYVTPRRPF EKSR LDQELRLIG EYGLRNKREVWRVKFTLAKIRKAAREL
I.punctatus  MPVARTWVCSKTYVTPRRPF EKSR LDQELKLI GEYGLRNKREVWRVKFTLAKIRKAAREL
H.sapiens    MPVARSWVCRKTYVTPRRPF EKSR LDQELKLI GEYGLRNKREVWRVKFTLAKIRKAAREL
R.norvegicus MPVARSWVCRKTYVTPRRPF EKSR LDQELKLI GEYGLRNKREVWRVKFTLAKIRKAAREL
C.fluminea   MP-RLALVQHKT YTT PRRPF EKER LDQELKLI GEYGLRNKREVWRVKYAVAKIRKSAREL
             **      : *      *** .***** .***** :*****:*****:*****:*****

D.rerio      LTLDEKDPKRLFEGNALLRRLV RIGVLDEGKM KLDYILGLKVEDFLERRLQTQVFKLG LA
I.punctatus  LTLDEKDPKRLFEGNALLRRLV RIGVLDEGKM KLDYILGLKVEDFLERRLQTQVFKLG LA
H.sapiens    LTLDEKDPKRLFEGNALLRRLV RIGVLDEGKM KLDYILGLKIEDFLERRLQTQVFKLG LA
R.norvegicus LTLDEKDPKRLFEGNALLRRLV RIGVLDEGKM KLDYILGLKIEDFLERRLQTQVFKLG LA
C.fluminea   LTLEEKDPKRLFEGNALLRRLV RIGVLDESKM KLD FVLGLRTEDFLERRLQTQVFKLG LA
             ***:***:***** .*****:***: *****

D.rerio      KSIHHARVLIRQRHIRVRKQV VNI PSFVRLDSQKHIDFSLRSPYGGGRPGRVKRKNACK
I.punctatus  KSIHHARVLIRQRHIRVRKQV VNI PSFVRLDSQKHIDFSLRSPYGGGRPGRVKRKNACK
H.sapiens    KSIHHARVLIRQRHIRVRKQV VNI PSFIVRLDSQKHIDFSLRSPYGGGRPGRVKRKNACK
R.norvegicus KSIHHARVLIRQRHIRV LKQV VNI PSFIVRLDSQKHIDFSLRSPYGGGRPGRVKRKNACK
C.fluminea   KSIHHARILIRQRHIRVRKQV VNI PSFVRLDSQRHIDFALSSPYGGGRAGRVRKRNACK
             *****:***** *****:*****:****:* ***** .*****

D.rerio      AQGGGGGGDDEEED
I.punctatus  GQGGLGGGDDEEED
H.sapiens    GQGGAGAGDDEEED
R.norvegicus GQGGAGAGDDEEED
C.fluminea   GSGG-GAAEEDED
             ..** ...:***

```

**Figure 3. B.** *C. fluminea* *rpS9* gene was aligned with *rpS9* genes from other species using the BLASTX program. The GenBank accession numbers of the proteins are as follows: *D. rerio* (NP957146), *I. punctatus* (AAK95191), *H. sapiens* (P46781), and *R. norvegicus* (NP112370). Amino acids that are identical in the aligned proteins (asterisks), residues conserved (dot), and highly conserved (double dot) are marked.





## **RESUME**

Ce travail consiste à étudier au niveau biochimique et génétique la réponse adaptative des mollusques face aux contaminations métalliques et au stress oxydant qui en découle : il s'agit de mettre en évidence des gènes impliqués dans la résistance métallique, d'étudier leur expression et leur régulation, et de déterminer le rôle des protéines correspondantes. Essentiellement deux types de stratégies de défense au niveau cellulaire sont étudiées : l'une consiste à séquestrer le métal dans la cellule grâce à des métallothionéines (MT), l'autre à l'expulser grâce à des protéines transmembranaires, telles que les protéines MDR (multidrug resistance). Outre les bivalves, des systèmes bactériens ont été exploités pour évaluer l'importance de ces protéines dans la défense contre une contamination métallique. Des bactéries exprimant des MTs ont été utilisés pour analyser le rôle dans la séquestration des métaux mais aussi les propriétés oxydoréductrices de ces protéines. Il fut révélé un rôle pro-oxydant des MTs dans certaines conditions. Des vésicules inversées préparées à partir d'un de ces systèmes bactériens ont permis de mettre en évidence une expulsion du cadmium dépendante de l'ATP par une protéine MDR.

## **ABSTRACT**

This work consisted in making biochemical and genetic studies of molluscs adaptive response to metallic contamination and to oxidative stress attributable to such contamination. The objectives were to identify genes involved in metal resistance, to study their expression and regulation, and to determine the role of corresponding proteins in metallic and/or oxidative stress resistance mechanism.

Two kinds of resistance strategies were mainly studied: metal sequestration by metallothioneins (MTs) and active extrusion of metals by MDR (multidrug resistance) proteins which are present in the cell membrane. Besides bivalve molluscs, bacteria were used as a cell reactor in order to evaluate the importance of such proteins in metal resistance. Bacteria expressing MTs were used to study the metal sequestration capability and the antioxidant properties of MTs. A pro-oxidant role of MTs has been observed in certain conditions. Inside-out membrane vesicles isolated from bacteria overexpressing an MDR protein gene were used to show the ability of these proteins to transport cadmium in an ATP-dependent way.