
Développement de biomarqueurs d'exposition aux métaux chez un organisme test : l'Annélide Oligochète *Eisenia fetida*

Franck Brulle*, Claude Cocquerelle*, Francis Douay, Sébastien Lemièrre***, Alain Leprêtre* & Franck Vandebulcke*****

* Laboratoire d'Ecologie Numérique et d'Ecotoxicologie, Université Lille 1.
59655 Villeneuve d'Ascq, France

** Laboratoire Sols et Environnement, Institut Supérieur d'Agriculture
59000 Lille, France

*** IUTA – Université Lille 1, Département Génie Biologique
Boulevard Langevin-BP 179, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex

franck.vandebulcke@univ-lille1.fr

Sections de rattachement : 68
Secteur : Secondaire

*RÉSUMÉ. Les activités métallurgiques entraînent l'accumulation d'éléments traces métalliques dans les couches superficielles des sols, où l'on peut observer des concentrations largement supérieures au fond pédogéochimique et aux normes en vigueur. La contamination des sols est une menace pour la santé publique et la présence de grandes quantités d'éléments traces métalliques peut générer un stress susceptible d'affecter les organismes exposés à des sols pollués. Les Annélides Oligochètes vivent en contact étroit avec ces sols pollués et sont parmi les organismes vivants présentant une sensibilité exacerbée aux métaux. Très peu de choses sont connues quant à l'identification et la mise en place des mécanismes de réponse à ces métaux au niveau moléculaire. En exploitant, la conservation phylogénique observée entre espèces nous avons été capables de cloner et de caractériser un ensemble de biomarqueurs potentiels de pollution à partir des cœlomocytes de l'Annélide Oligochète *Eisenia fetida*, une espèce modèle recommandée en écotoxicologie. Deux approches ont été mises en place. Premièrement, une approche qualifiée de ciblée, consistant à identifier tous les effecteurs parmi des protéines fortement conservées pour lesquels une variation lors d'une exposition métallique était reportée dans la littérature. Deuxièmement, nous avons entrepris une approche qualifiée de globale consistant en la construction de banques soustractives pour identifier chez *Eisenia fetida*, les gènes dont l'expression est affectée lors d'une exposition à un mélange complexe de métaux, représentatif d'un site naturel fortement contaminé. Ces deux approches ont permis l'identification de 4 candidats biomarqueurs de pollution métallique.*

MOTS-CLÉS : Eisenia fetida, Cœlomocytes, Eléments Traces Métalliques, Expression génique, Banque soustractive, Biomarqueurs.

1. Introduction

Pendant plus d'un siècle, la région Nord/Pas-de-Calais a été le siège d'une activité métallurgique intense. La région de Noyelles-Godault en est le parfait exemple. En effet, la fonderie de zinc (Zn) située à Auby, Umicore, est l'une des plus grande usine d'Europe. Créée en 1869, elle produit aujourd'hui encore environ 220 000 tonnes de Zn par an. Localisée à moins de 4 km d'Umicore, la fonderie de Metaleurop Nord de Noyelles-Godault était la seule usine productrice de plomb primaire en France et l'une des plus grandes d'Europe. Cette usine a arrêté son activité en 2003 pour des raisons économiques, mais pendant plus d'un siècle, elle aura entraîné le rejet dans l'atmosphère de grandes quantités de poussières métalliques du fait de l'utilisation du procédé pyrométallurgique. Les activités métallurgiques de ces 2 usines ont entraîné l'émission de poussières métalliques affectant une aire d'environ 120 km² où plus de 55 000 personnes résident (Douay *et al.*, 2008).

La présence d'une quantité importante d'ETMs peut aussi générer un stress environnemental susceptible d'affecter les organismes exposés aux sols pollués. De fortes teneurs en métaux sont susceptibles d'affecter Les populations animales, et en particulier les populations de macroinvertébrés. L'un des groupes faunistiques les plus étudiés est celui des Annélides Oligochètes. Depuis les premiers travaux de Darwin (1883), les vers de terre (Embranchement des Annélides, sous-classe des Oligochètes) sont considérés comme les ingénieurs des écosystèmes du fait de leurs effets directs et indirects sur l'eau, les nutriments et le cycle du carbone dans les sols sous les climats tempérés et tropicaux. Les vers ont ainsi été adoptés par la communauté internationale pour le diagnostic des écosystèmes et pour l'étude de l'impact potentiel de contaminants, tels que les pesticides, les hydrocarbures et les métaux provenant de sources anthropiques (Spurgeon *et al.*, 2003). La quantification de la toxicité des éléments chimiques pour les Annélides est couramment réalisée via la mesure des principaux traits de vie (survie, croissance et reproduction) dans les conditions contrôlées au laboratoire avec des organismes tests (*Eisenia fetida*, *Eisenia andrei* et *Lumbricus rubellus*). Ces organismes considérés comme prioritaires en écotoxicologie (Spurgeon *et al.*, 2003) sont souvent fortement affectés par la pollution métallique. Par conséquent, l'exposition métallique de certains Annélides Oligochètes pourrait engendrer des modifications exploitables permettant de dresser un état des lieux et de mesurer les risques provoqués par la présence de métaux polluants dans le sol.

Ces dix dernières années, l'analyse des profils d'expression génique a permis l'identification de biomarqueurs candidats chez les Annélides Oligochètes. La présence de métaux constitue un stress majeur susceptible de perturber les grandes fonctions physiologiques des animaux (Labrot *et al.*, 1996). Une stratégie alternative à la

recherche de protéines fixatrices des métaux (Métallothionéines (MTs) et Métalloprotéines (MPs)) consiste en l'identification de biomarqueurs moléculaires impliqués dans de grandes fonctions biologiques, communs à plusieurs macroinvertébrés et dont l'expression est affectée par un stress métallique. Ainsi, il apparaît intéressant d'identifier et de constituer une batterie de biomarqueurs impliqués dans les grandes fonctions biologiques, révélant la nature et l'amplitude des stress.

Très peu de choses étant connues quant à l'identification et la mise en place des mécanismes de réponse à ces métaux au niveau moléculaire, le travail de caractérisation des candidats biomarqueurs de pollution a été réalisé à partir des cellules immunitaires du ver *Eisenia fetida*, une espèce modèle recommandée en écotoxicologie. Deux approches ont été mises en place. Une première approche, qualifiée de ciblée et basée sur la conservation phylogénique observée entre espèces, a permis l'identification de plusieurs candidats. Une deuxième approche, dite globale et consistant en la construction de banques soustractives a permis d'identifier des gènes dont l'expression est affectée lors d'une exposition à un mélange complexe de métaux.

2. Approche ciblée

2.1. Etude sur cœlomocytes

Un important travail bibliographique nous a permis d'identifier plusieurs effecteurs présents chez la plupart des macroinvertébrés continentaux dont l'expression est affectée par une pollution métallique. Le choix de ces effecteurs a été guidé en partie par les travaux de Liao et Freedman (1998). Nombre de ces effecteurs sont impliqués dans des mécanismes de défense des organismes et présentent un fort degré de conservation phylogénique. Ce haut degré de conservation est lié au rôle physiologique essentiel exercé par ces effecteurs. Ainsi, nous nous sommes focalisés sur le clonage de ces effecteurs par RT-PCR chez notre modèle *Eisenia fetida*. Puis, l'analyse du niveau d'expression de ces effecteurs lors d'une exposition à un contaminant métallique a été entreprise par PCR en temps réel. Concrètement, les 14 effecteurs sélectionnés étaient : la calmoduline, les HSP 60 et 70, la superoxide dismutase Cu/Zn, la catalase, la Cd-métallothionéine, la β -adrenergic receptor kinase, la pyruvate carboxylase, la TCTP, la protéine kinase C, et l'ubiquitine. Du fait de leur implication dans des mécanismes de défense, leur clonage a été entrepris sur le tissu ayant un rôle immunitaire majeur chez notre modèle, les cellules circulantes de la cavité cœlomique : les cœlomocytes.

Le niveau d'expression de ces candidats a été analysé lors d'expositions *in vivo* à des sols artificiels contaminés par différentes concentrations de Cd au moyen de la PCR en temps-réel. Lors de ces intoxications expérimentales la plupart des effecteurs n'ont pas montré de variations intéressantes de leur niveau d'expression. Seuls les gènes

catalase et *Cd-mt* présentent des variations intéressantes. Le gène de la catalase se caractérisait par une diminution significative de son niveau d'expression après 14 heures et 1 jour d'exposition à 80 et 800 mg Cd/kg, alors que le gène de la Cd-MT était caractérisé par une augmentation dose et temps dépendante quelque soit le niveau de contamination étudié (induction après 1 jour et 14 heures pour des intoxications de 80 et 800 mg Cd/kg respectivement). À la vue de ces résultats, la *catalase* et la *Cd-mt* peuvent donc être considérées comme des biomarqueurs d'exposition précoces au Cd (Brulle *et al.*, 2006).

2.2. *Etude sur animal entier*

Une variation d'expression dans d'autres organes et plus particulièrement dans les épithélia de contact avec le sol contaminé, *i.e.* principalement l'épiderme, le tractus digestif ou le tissu chlorogène, qui entourent le tractus digestif ne pouvant pas être négligé, nous avons entrepris l'analyse du niveau d'expression des candidats sélectionnés sur individus entiers. Ainsi, des groupes de 6 individus ont été exposés aux mêmes concentrations de Cd que celles utilisées lors de l'étude sur coelomocytes. A cela s'ajoute le clonage et l'analyse du niveau d'expression d'un nouveau candidat biomarqueur. En effet, le gène codant la cyclophiline-A, une enzyme appartenant à la superfamille des immunophilines, a été identifié dans la littérature comme variant chez *Lumbricus rubellus*, une espèce proche d'*Eisenia fetida*, lors d'un stress métallique (Stürzenbaum *et al.*, 1999). Les résultats de cette étude ont montré que parmi tous les effecteurs étudiés seul le gène *Cd-mt* était caractérisé par une induction précoce et massive de son niveau d'expression quelque soit le niveau de contamination considéré lors d'expositions aux sols contaminés par le Cd (plus de 5 fois après 14 heures d'exposition à 80 mg Cd/kg et plus de 3 fois après 6 heures d'exposition à 800 mg Cd/kg). Ces résultats sont similaires à ceux observés sur les coelomocytes, cependant l'induction de *Cd-mt* observée au niveau de l'individu entier est plus précoce. Cette synthèse massive de protéines impliquées dans les mécanismes de détoxification telle que la Cd-MT permettrait de rendre les individus tolérants à une contamination métallique. Au-delà des résultats non informatifs obtenus pour la plupart des effecteurs, il est intéressant de noter une diminution significative du niveau d'expression de 13 des 15 effecteurs étudiés après 14 heures d'exposition à 800 mg Cd/kg. Une telle répression a également été observée pour 9 effecteurs chez les individus exposés depuis 2 jours à 80 mg Cd/kg. Cette répression peut être mise en relation avec l'induction massive de *Cd-mt* se produisant aux mêmes moments. Lors d'un stress métallique intense, la synthèse de la Cd-MT pourrait se faire temporairement au détriment d'autres protéines non-essentiels. Ainsi, l'énergie détournée pour la synthèse accrue de Cd-MT protégerait les organismes des effets toxiques du Cd. Ce phénomène nommé Trade-off constituerait une réponse globale des organismes à une situation de stress intense (Brulle *et al.*, 2007).

2.3. Identification d'une nouvelle voie de détoxication des ETMs chez *E. fetida*

L'identification d'une phytochelatine synthase (PCS) fonctionnelle chez le Nématode *Caenorhabditis elegans*, fournissait la première preuve de l'existence de ce peptide liant les ETMs chez les animaux (Vatamaniuk *et al.*, 2001). En exploitant la conservation observée entre espèces, nous avons cloné et caractérisé au niveau transcriptionnel le gène codant la PCS à partir des cœlomocytes de l'Annélide *Eisenia fetida*, ce qui constitue la première preuve de son existence dans un phylum appartenant aux lophotrochozoaires. Le clonage de la séquence codante complète du gène de cette enzyme a été réalisé. De plus, sa relation phylogénique avec des séquences de pcs provenant de plantes, d'une levure et de nématodes a été étudiée. Les niveaux d'expression des gènes de la PCS (Figure 1) et de la métallothionéine de type II ont également été analysés par PCR en temps réel lors d'expositions à 3 doses de Cd (Brulle *et al.*, 2008).

L'analyse de la séquence obtenue chez notre modèle a montré, tant au point de vue protéique et phylogénétique que nous avons bien cloné l'ADN complémentaire de la phytochelatine synthase. Puis, l'étude du niveau d'expression des gènes codant la PCS et la Cd-MT a permis de mettre en évidence une induction significative du niveau d'expression de pcs pour des concentrations faibles de Cd quelque soit le temps d'exposition (6 à 5 fois respectivement après 2 et 14 jours d'exposition à 8 mg Cd/kg). Pour des concentrations considérées comme fortes (80 et 800 mg Cd/kg), pcs ne montrait pas de variations de son niveau d'expression. La Cd-mt pour sa part montrait un profil d'expression totalement différent puisque caractérisé par une induction faible à 8 mg Cd/kg (1,5 à 2,5 fois) et massive à 80 et 800 mg Cd/kg (50 à 90 fois) quelque soit le temps d'exposition.

Ces résultats suggèrent que la PCS est impliquée dans la détoxication du Cd de manière dose-dépendante. De plus, les réponses comparées de la pcs et de la Cd-mt suggèrent que ces 2 gènes peuvent agir de conserve dans les processus de détoxication, avec une PCS qui aurait un rôle dans les réponses immédiates ou pour de faibles concentrations et la Cd-MT qui participerait plus tardivement ou pour des concentrations plus importantes. Ainsi, le clonage de l'ADN complémentaire codant la PCS chez notre modèle et l'analyse de son niveau d'expression fait de la PCS un nouveau candidat biomarqueur pour des faibles contaminations par le Cd.

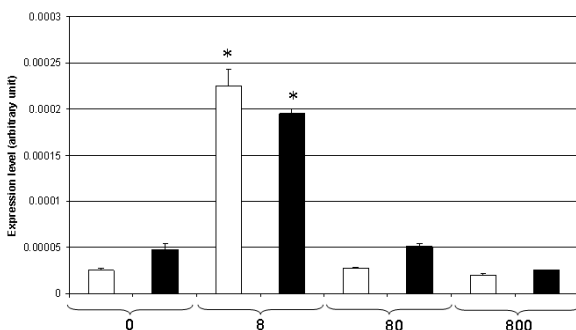


Figure 1 . Niveau d'expression de la phytochelatine synthase chez des vers exposés à un sol témoin ou à un sol contaminé par le Cd (8, 80 or 800 mg/kg) pendant 2 (barres blanches) ou 14 jours (barres noires). *: différence significative ($p < 0.05$).

3. Approche globale

La faiblesse de l'approche « ciblée » décrite précédemment (étude de candidats-biomarqueurs dont le rôle est documenté) réside dans le fait que nous dépendons de données publiées ou disponibles dans les banques de données. De plus, cette approche ciblée ne nous a pas permis d'identifier d'aussi bons candidats que la *Cd-mt*. Ainsi, en complément de l'approche ciblée, nous avons mis en œuvre une approche écotoxicogénomique en écotoxicologie des invertébrés qualifiée de globale, par la réalisation de banques soustractives. Le but de ce travail était d'identifier chez *Eisenia fetida*, les gènes montrant des variations de leur niveau d'expression lors d'expositions à un mélange complexe d'ETMs représentatif d'un site pollué de longue date par des activités métallurgiques. Cette technique de biologie moléculaire a été utilisée pour construire des banques d'ADN complémentaires enrichies en transcrits sur- ou sous-exprimés dans les cellules immunitaires de vers exposés à une pollution métallique. Nous avons identifié 764 séquences uniques correspondant chacune à un gène unique. 18 candidats ont fait l'objet d'une analyse de leur niveau d'expression, par PCR en temps réel, lors de 2 étapes de validation successives. La première étape consistait à mesurer le niveau d'expression des 18 candidats chez des vers exposés aux mêmes conditions de réalisation des banques soustractives, *i.e.* des vers exposés à un sol artificiel contaminé par 40 mg/kg de cadmium, 500 mg/kg de plomb et 700 mg/kg de zinc. La deuxième étape consistait à mesurer le niveau d'expression des candidats lors d'exposition d'*Eisenia fetida* à un sol contaminé, collecté proche de l'ancien site métallurgique de Metaleurop Nord (ME). Ces 2 étapes nous ont permis de mettre en évidence que 3 gènes étaient fortement induits chez des vers exposés au sol contaminé par l'activité de ME. Ces candidats sont : la métallothionéine de type II et 2 candidats biomarqueurs originaux, la lysénine (Figure 2) et la Coactosin-like protein (Brulle *et al.*, 2008).

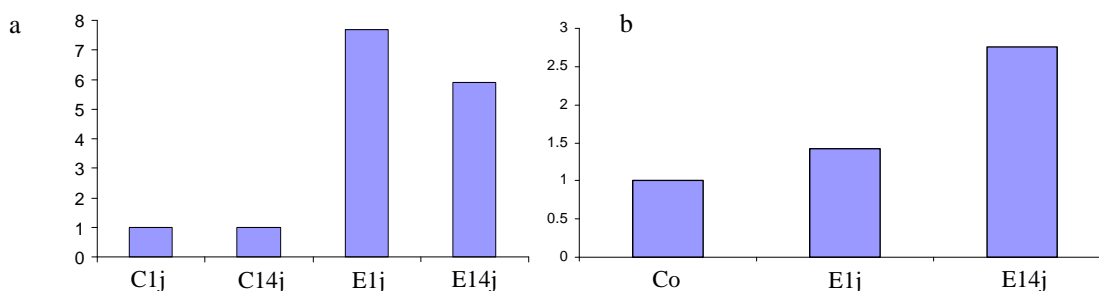


Figure 2 . Niveau d'expression du gène de la lysénine lors d'expositions de groupes d'*Eisenia fetida* (a) à un sol artificiel contaminé par un mélange complexe d'ETMs, (b) à un sol collecté proche de l'ancien site de Metaleurop Nord. Ces vers étaient exposés 1 et 14 jours à un sol témoin (C) ou contaminé (E).

4. Conclusion

Les résultats exposés ici contribuent, 1- à l'identification de gènes différentiellement exprimés chez l'Annélide Oligochète *Eisenia fetida*, en réponse à une contamination d'origine métallique ; 2- à l'identification de gènes dont les variations d'expression pourraient être indicatrices d'exposition métallique. Ces travaux ont été initiés sur la base de plusieurs constats, 1- la nécessité de rassembler l'ensemble des candidats potentiels identifiés chez divers macroinvertébrés, chez une seule et même espèce, 2- la nécessité d'identifier de nouveaux candidats biomarqueurs d'exposition et d'effets toxiques des métaux, 3- le manque de données génétiques disponibles pour une espèce pourtant recommandée comme modèle en écotoxicologie

L'approche qualifiée de ciblée, basée sur l'observation d'une forte conservation phylogénique entre espèces, a permis d'identifier et de tester 16 candidats biomarqueurs chez ce modèle de laboratoire. Cette approche s'est révélée quelque peu décevante. En effet, malgré le grand nombre de gènes identifiés comme variant potentiellement lors d'une contamination d'origine métallique, seule l'étude de l'expression du gène *Cd-mt* a apporté de nouvelles informations concernant sa cinétique d'induction. En effet, ce gène se caractérise par sa précocité d'induction et une réponse de type dose- et temps-dépendante. Il apparaît que l'analyse de l'expression de ce gène est utilisable comme biomarqueur d'exposition métallique. Les autres candidats testés même s'ils apportent de l'information sur leurs variations d'expression lors d'une exposition métallique, notamment avec la mise en évidence d'un phénomène de Trade-off, ne semblent pas utilisables en tant que biomarqueurs. Cette approche nous a également permis de mettre en évidence l'existence d'une nouvelle voie de détoxification des ETMs chez *Eisenia fetida*. En effet, en exploitant la conservation observée entre les espèces, nous avons été capables de cloner le gène *pcs* à partir des coelomocytes d'*E. fetida*. Ce travail est la première preuve de son existence dans un phylum appartenant aux Lophotrochozoaires. Les résultats obtenus suggèrent l'existence d'une action coordonnée des gènes *pcs* et *Cd-mt*. Le gène *pcs* semble être un gène à réponse immédiate pour des contaminations en Cd de faible amplitude tandis que le gène *Cd-mt* prendrait le relais lors d'exposition à de plus fortes concentrations en Cd.

L'approche qualifiée de globale a été mise en œuvre afin d'identifier sans *a priori* les gènes différentiellement exprimés et donc biomarqueurs potentiels avec des conditions d'exposition métallique proches de celles que l'on peut retrouver sur des sites naturels pollués. Cette étude nous a permis de générer un grand nombre de séquences uniques (764 au total) ayant pour particularité d'être toutes issues des cellules immunitaires, les coelomocytes. Une analyse du niveau d'expression de 18 candidats sur sol artificiel et sur sol naturel contaminé a permis de mettre en lumière deux nouveaux candidats impliqués dans l'immunité et particulièrement intéressants du fait de leurs variations lors d'épisodes de contamination métallique : la lysénine et la coactosin-like protein. L'analyse de l'ensemble de ces séquences doit se poursuivre et pourrait être envisagée au moyen de la réalisation d'une puce à ADN. Certains auteurs pensent que

l'utilisation de ces outils moléculaires permettant l'étude des profils d'expression du plus grand nombre possible de gènes peuvent constituer une « signature » de perturbation des changements induits par un composé chimique (Lettieri, 2006). On entend par « signature » de perturbation, l'identification des gènes ou d'un groupe de gènes représentatif d'une voie physiologique dont l'expression est perturbée par un polluant donné. Selon nous, il est difficile de faire reposer un diagnostic uniquement sur la variation d'expression d'un ou plusieurs gènes considérés comme biomarqueurs d'exposition, même s'il s'agit de gènes majeurs (ex : la *Cd-mt*). A l'heure actuelle, dans les études de génomique disponibles, les puces à ADN n'établissent pas une signature pour un polluant donné. En revanche, elles permettent d'identifier des gènes ou un groupe de gènes représentatif d'une voie physiologique dont l'expression est perturbée par un polluant donné. Nous pensons que l'élaboration puis l'utilisation de puces à ADN composées d'une batterie de gènes sélectionnés (impliqués dans certaines voies métaboliques ou fonctions physiologiques idéalement communes à plusieurs espèces sentinelles) seraient plus à même de fournir une « signature » de perturbation.

Bibliographie

Brulle F., Mitta G., Cocquerelle C., Vieau D., Lemièrre S., Leprêtre A. & Vandebulcke F. Cloning and Real-Time PCR testing of 14 potential biomarkers in *Eisenia fetida* following cadmium exposure. *Environmental Science & Technology*, vol. 40, 2006, p. 2844-2850.

Brulle F., Mitta G., Leroux R., Lemièrre S., Leprêtre A. & Vandebulcke F. The strong induction of metallothionein gene following cadmium exposure transiently affects the expression of many genes in *Eisenia fetida*: A trade-off mechanism? *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, vol. 144, n° 4, 2007, p. 334-341.

Brulle F., Cocquerelle C., Wamalah A. N., Morgan, A. J., Kille P., Leprêtre A., Vandebulcke F., cDNA cloning and expression analysis of *Eisenia fetida* (Annelida; Oligochaeta) phytochelatin synthase under cadmium exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 71, 2008, p. 47-55.

Brulle F., Cocquerelle C., Mitta G., Castric V., Douay F., Leprêtre A. & Vandebulcke F. Identification and expression profile of gene transcripts differentially expressed during metallic exposure in *Eisenia fetida* coelomocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 32, 2008, p. 1441-1453.

Darwin C. R. The formation of vegetable mould, through the action of worms with observations on their habitats. Londres, John Murray, 1883.

Douay F., Pruvost C., Roussel H., Ciesielski H., Fourrier H., Proix N. & Waterlot C. Contamination of urban soils in an area of northern France polluted by dust emissions of two smelters. *Water, Air and Soil Pollution*, vol. 188, 2008, p. 247-260

Labrot F., Ribera D., Saint-Denis M. & Narbonne J. F. In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxydation, acetylcholinesterase and

glutathione peroxydase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers*, vol. 1, 1996, p. 21-28.

Lettieri T. Recent applications of DNA microarray technology to toxicology and ecotoxicology. *Environmental health perspectives*. 2006, vol. 114, n° 1, p. 4-9.

Liao V. L. C. & Freedman J. H. Cadmium-regulated Genes from the Nematode *Caenorhabditis elegans*. Identification and cloning of new cadmium-responsive genes by differential display. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, 1998, p. 31962-31970.

Spurgeon D. J., Weeks J. M. & van Gestel C. A. M. A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology. *Pedobiologia*, vol. 47, n° 5-6, 2003, p. 588-606.

Stürzenbaum S. R., Morgan A. J. & Kille P. Characterisation and quantification of earthworm cyclophilins: identification of invariant and heavy metal responsive isoforms. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1489, 1999, p. 467-473.

Vatamaniuk O. K., Bucher E. A., Ward J. T. & Rea P. A. A new pathway for heavy metal detoxification in animals. phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, n° 24, 2001, p. 20817-20820.