



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITÉ PAUL VERLAINE (METZ) – UFR Sci F.A.
ECOLE DOCTORALE RP2E
Laboratoire des Interactions Écotoxicologie, Biodiversité, Écosystèmes
CNRS UMR 7146

THÈSE

En vue de l'obtention du grade de Docteur ès *sciences*
Mention « Toxicologie de l'Environnement »

Présentée par

Aurélie BIGOT

**Identification et étude de l'expression de gènes de détoxication
chez les bivalves d'eau douce *Unio tumidus* et *Corbicula fluminea* :
Approches en laboratoire et en milieu naturel**

Soutenue le 27 octobre 2009 devant la commission d'examen :

Directeur de thèse : **Paule VASSEUR** – Professeur, Université Paul Verlaine
Co-Directeur de thèse : **François RODIUS** – Maître de Conférences, Université Paul Verlaine
Rapporteurs : **François LEBOULENGER** – Professeur, Université du Havre
Alain GEFFARD – Maître de Conférences, Université de Reims
Examineurs : **Pascale BAUDA** – Professeur, Université Paul Verlaine
Brigitte BERTHET – Maître de Conférences, Université de Nantes

*À mes parents,
dont le soutien a permis l'accomplissement de ce travail.*

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Madame Paule Vasseur, Professeur à l'Université de Metz, pour son expérience et sa disponibilité. Je tiens à exprimer ici mon profond respect et ma gratitude pour m'avoir encadré durant cette thèse.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à Monsieur François Rodius, Maître de Conférences à l'Université de Metz, et co-encadrant de ma thèse, pour sa disponibilité et ses précieux conseils ainsi que pour son soutien et sa confiance. Merci pour tout.

Je remercie Monsieur Jean-François Ferard, Directeur du LIEBE, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Toute ma reconnaissance va à Monsieur François Leboulenger, Professeur à l'Université du Havre et Monsieur Alain Geffard, Maître de Conférences de l'Université de Reims, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Mes remerciements s'adressent également à Madame Brigitte Berthet, Maître de Conférences de l'Université de Nantes et Madame Pascale Bauda, Professeur à l'Université Paul Verlaine, pour avoir accepté de juger la qualité cette recherche en tant que membres du jury.

Mes remerciements vont également à tous les membres du LIEBE qui rendent ce laboratoire accueillant.

Je voudrais remercier plus particulièrement:

Maryline, pour toutes les démarches administratives (et il y en a eu ...). Anne-Marie, Claudine, Mireille et Rosy, pour leur gentillesse et leur disponibilité. Simon, pour son aide précieuse en statistique. Philippe R., pour le dosage de métaux. Laure et Laetitia, pour notre collaboration et leurs précieux conseils sur les IBR.

Philippe W., pour nos sorties sur le terrain toujours récompensées par un délicieux café. Merci pour ta rigueur et ta bonne humeur sans faille.

Chantal, le bruit chantant de tes talons va me manquer (ainsi que tes muffins). Nous avons partagé beaucoup de choses toutes les deux, que ce soit nos expéditions azote ou nos nombreuses confidences.

Christophe, pour avoir partagé ton expérience et pris du temps pour répondre à mes questions, mais également pour avoir porté mes cartons en chantant la chanson des Minipouces...merci pour tes conseils et ton humour.

Un ancien du labo : Eric B., qui venait à pas feutrés en R5 rien que pour me faire peur (et ça marchait à tous les coups !). Je n'oublierai pas toutes nos discussions et tes conseils avisés.

Gandalf le blanc, diantre ! J'ai beaucoup appris à tes côtés, que ce soit par le biais de la communauté de l'Unio mais également de Frodon et Rincevent. Fichtre alors !

Pierre J., tu as toujours cru en moi, je n'oublierai jamais ton soutien et ton incroyable générosité. Merci pour tout.

Mes camarades pour les bons moments partagés, Anatole, Anne-So, Apolline, Cécile, Karen, Marc, Pierre, Renaud, Yann (tes grognements vont me manquer).

Un remerciement tout particulier à :

Audrey (strapontin !) pour ta folie et tes lapsus qui ont largement contribué à la bonne humeur générale. C'est sûr, la pomme de pin te revient ! Emilie, pour tes phrases du jour. Eric pour nos sorties terrain à chercher les petites bêtes, pour notre complicité. Merci pour ta présence et ton soutien dans les moments plus ou moins difficiles ...

Un énorme clin d'œil à Alex et Nono, mes amies toujours à l'écoute.

Merci pour votre amitié et tous les moments de convivialité passés ensemble qui ont beaucoup comptés.

Hugues, pour ta confiance, ton soutien de tous les jours, et pour tous ces moments privilégiés et fabuleux à tes côtés.

Mes parents, sans l'influence desquels cette thèse n'aurait pas vu le jour. Vous m'avez apporté soutien, écoute et encouragements qui ont été essentiels pendant ces années.



SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. Mollusques bivalves	3
1.1. Description	3
1.2. Choix des mollusques bivalve	4
1.3. <i>Unio tumidus</i>	5
1.4. <i>Corbicula fluminea</i>	6
2. Espèces réactives de l'oxygène	7
2.1. Sources de production	7
2.2. Anion superoxyde	8
2.3. Peroxyde d'hydrogène	9
2.4. Radical hydroxyle	10
3. Protéines de défense contre le stress oxydant	11
3.1. Superoxydes dismutases	11
3.1.1. Caractéristiques et répartition	12
3.1.2. Régulation de l'expression	13
3.2. Catalase	13
3.3. Glutathion peroxydases	14
3.3.1. Classes des GPx	14
3.3.1. Mécanisme catalytique	15
3.4. Glutathion réductase	15
4. Glutathion S-transférases	16
4.1. Classification des GST	16
4.1.1. GST cytosoliques	16
4.1.2. GST kappa	18
4.1.3. GST microsomales	18
4.2. Mécanisme catalytique	18
5. Métallothionéines	19
5.1. Définition	20
5.2. Propriétés biochimiques et physiques	20
5.2.1. Composition en acides aminés	20
5.2.2. Composition en ions métalliques	20
5.2.3. Classification	21
5.2.4. Structure	21
5.3. Rôle des métallothionéines	22
5.4. Isoformes	22
5.5. Régulation de l'expression	23
6. Utilisation des gènes de détoxification en biomonitoring	25
6.1. Utilisation des gènes de détoxification en tant que biomarqueurs potentiels	25
6.2. Profils d'expression tissulaire de ces gènes	27



6.3. Effets de la saison sur les xénobiotiques et les défenses antioxydantes.....	28
6.3.1. Effets de la saison sur les polluants environnementaux.....	28
6.3.2. Effets de la saison sur les défenses antioxydantes	29
7. Toxicité du cuivre et du cadmium.....	30
7.1. Le cuivre.....	30
7.2. Le cadmium.....	30
7.3. Réponses des organismes aquatiques à une intoxication au cuivre et au cadmium...	31
8. Identification de séquences codantes	33
8.1. Principe de la PCR	33
8.2. Paramètres de la PCR.....	33
8.3. Choix et utilisation d'amorces dégénérées.....	34
8.4. Identification d'une séquence codante complète par RACE-PCR.....	35
9. PCR en temps réel	36
9.1. Principe.....	36
9.2. Détection des amplicons grâce aux agents se liant à l'ADN double brin	37
9.3. Cycle seuil (Threshold cycle).....	38
9.4. Avantages de la PCR en temps réel	39
9.5. Calcul de l'expression transcriptionnelle relative	39

MATERIELS ET METHODES

1. Purification des acides nucléiques et synthèse des ADNc	42
1.1. Prélèvement des tissus.....	42
1.2. Purification de l'ADN génomique et des ARN totaux.....	42
1.3. Transcription-inverse.....	42
2. Identification de séquences codantes	43
2.1. Choix des amorces	43
2.2. PCR avec amorces dégénérées	43
2.3. Extraction de fragments d'ADN de gels d'agarose et clonage	43
2.4. Transformation et sélection des bactéries	44
2.5. Purification de l'ADN plasmidique.....	46
2.6. Identification des extrémités 3' et 5' par RACE-PCR	46
2.7. Séquençage et analyse des séquences nucléiques	48
3. Mesure du niveau d'expression par PCR en temps réel.....	49
3.1. Choix et test des amorces	49
3.2. Conditions d'amplification.....	49
4. Etudes en laboratoire et sur le terrain.....	50
4.1. Exposition de <i>Corbicula fluminea</i> au Cu et au Cd en laboratoire	50
4.2. Etude de l'expression saisonnière des gènes de détoxification chez <i>Corbicula fluminea</i> et <i>Unio tumidus</i>	51
4.3. Etude du niveau d'expression des gènes de détoxification chez <i>Unio tumidus</i> transférés au niveau de la Moselle.	51



RESULTATS ET DISCUSSION

PARTIE 1 : Identification de séquences codantes chez les bivalves *Corbicula fluminea* et *Unio tumidus*

1. Identification de la séquence codante de MT chez <i>Corbicula fluminea</i> et <i>Unio tumidus</i> ..	54
1.1. Séquences codantes obtenues.....	54
1.2. Analyse des séquences codantes de MT obtenues	55
1.3. Discussion	56
2. Identification des séquences codantes de SOD et CAT chez <i>Unio tumidus</i>	57
2.1. Séquences codantes obtenues.....	57
2.2. Analyse des séquences codantes de SOD et CAT obtenues	57
2.3. Discussion	58

PARTIE 2 : Etude de l'expression saisonnière des gènes de détoxification

Publication 1 : Metallothionein coding sequence identification and seasonal mRNA expression of detoxification genes in the bivalve <i>Corbicula fluminea</i>	59
--	----

Etude de l'expression saisonnière des ARNm de gènes de détoxification chez le bivalve d'eau douce <i>Unio tumidus</i>	67
---	----

PARTIE 3 : Etude du niveau d'expression des gènes de détoxification chez des bivalves soumis à différentes perturbations

Publication 2 : Early defence responses in the freshwater bivalve <i>Corbicula fluminea</i> exposed to copper and cadmium: transcriptional and histochemical studies.....	72
---	----

Publication 3 : SOD and CAT cDNA cloning and expression pattern of detoxification genes in the freshwater bivalve <i>Unio tumidus</i> transplanted into the Moselle River	94
---	----

CONCLUSION ET PERSPECTIVES	115
----------------------------------	-----

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	120
----------------------------------	-----



LISTE DES ABRÉVIATIONS

-A-

ACP : analyse en composantes principales

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADNg : ADN génomique

AP2 : protéine activatrice-2

ARE : *antioxidant responsive element*

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ATP : adénosine triphosphate

-B-

B(a)P : benzo(a)pyrène

BLAST : *basic local alignment search tool*

-C-

CAT : catalase

CCD : *charge-coupled device*

CL₅₀ : concentration létale pour 50 % des individus

CREB : *cAMP response element-binding* (AMP : adénosine monophosphate cyclique)

Ct : *threshold cycle*

-D-

DBT : di-butyl-étain

dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate

-E-

EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique

-F-

FADH₂ : 5,10-Méthylènetetrahydrofolate réductase

FLAP : *5-lipoxygenase-activating protein*



-G-

GATC : guanidium isothiocyanate
GPx : glutathion peroxydase
GRd : glutathion réductase
GRE : *glucocorticoid responsive element*
GSH : glutathion réduit
GSSG : glutathion oxydé
GST : glutathion S-transférases

-H-

HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique
HSF : *heat shock factor*
HSP : *heat shock protein*

-I-

IL-1 : interleukine 1
IL-6 : interleukine 6
IUB : *International Union of Biochemistry*

-L-

LB : Luria-Bertani
LTC4S : leukotriène synthase C4

-M-

MAPEG : *membrane associated proteins in eicosanoid and glutathione*
MLTF : *major late transcription factor*
MT : métallothionéine
MTF-1 : *metal transcription factor 1*
MRE : *metal responsive element*
MULTALIN : *multiple sequence alignment*
MXR : *multi-xenobiotic resistance*



-N-

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NCBI : *National Center for Biotechnology Information*

NF-kB : *nuclear factor-kappa B*

-P-

PCB : polychlorobiphényle

PCR : *polymerase chain reaction*

PGES1 : prostaglandine-E syntase 1

PVC : poly-chlorure de vinyle

-R-

RACE : *rapid amplification of cDNA ends*

ROS : espèces réactives de l'oxygène

RT : *reverse-transcription*

-S-

Se-GPx : GPx sélénium dépendante

SOD : superoxyde dismutase

-T-

TAE : tris acétate EDTA

TBT : tri-butyl-étain

T_m : *melting temperature*

TNF α : *tumor necrosis factor alpha*

-U-

UV : ultra violet

-X-

X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-B-D-galactoside



LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Anatomie générale d'un mollusque bivalve.

Figure 2 : Aspect général et morphologique d'*Unio tumidus*.

Figure 3 : Aspect général et morphologique de *Corbicula fluminea*.

Figure 4 : Schéma des défenses antioxydantes impliquant la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx), les glutathion S-transférases (GST) et la glutathion réductase (GR).

Figure 5 : Cycle catalytique de la GPx.

Figure 6 : Mécanisme de détoxification des glutathion S-transférases (GST).

Figure 7 : Structure tripartite des gènes de métallothionéine.

Figure 8 : Organisation des séquences de régulation localisées en amont des gènes responsables de la synthèse des métallothionéines.

Figure 9 : Représentation schématique des modes d'induction du gène MT-1.

Figure 10 : Le triangle écotoxicologique.

Figure 11 : Etapes de la PCR.

Figure 12 : Choix des amorces dégénérées par alignement de séquences.

Figure 13 : Etapes de la RACE-PCR.

Figure 14 : Etapes de la PCR en temps réel.

Figure 15 : Formule du colorant cyanine asymétrique : SYBR Green I.

Figure 16 : Phases de la PCR en temps réel.

Figure 17 : Courbe standart.

Figure 18 : Détermination du cycle seuil (Ct) et du nombre de molécules d'amplimères au seuil de fluorescence (Nt).

Figure 19 : Etapes de l'extraction de l'ADN génomique à partir du kit DNeasy (Qiagen).

Figure 20 : Etapes de l'extraction des ARN totaux à partir du kit RNeasy (Qiagen).

Figure 21 : Etapes de la purification des produits PCR à partir du kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega).

Figure 22 : Etapes de ligation de l'insert au vecteur de transformation bactérienne.



Figure 23 : Sélection des bactéries ayant intégré le vecteur avec ou sans insert

Figure 24 : Etapes de la purification d'ADN plasmidique à partir du kit WIZARD *Plus* Minipreps DNA Purification System (PROMEGA).

Figure 25 : Localisation de la station sur la Moselle en amont de la confluence avec la Fensch.

Figure 26 : Localisation des étangs de La Maxe.

Figure 27 : Localisation des stations étudiées sur le site de la rivière de la Moselle.

Figure 28 : Séquences codantes et protéiques de MT de *Corbicula fluminea* et d'*Unio tumidus*.

Figure 29 : Comparaison des séquences protéiques de MT de *Corbicula fluminea* et d'*Unio tumidus* avec les séquences de MT de différents bivalves disponibles dans GenBank.

Figure 30: Arbre phylogénétique de séquences protéiques de métallothionéine de plusieurs invertébrés (*Mytilus edulis*, *Bathymodiolus azoricus*, *Perna viridis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea angulata*, *Crassostrea virginica*, *Dreissena polymorpha*, *Drosophila melanogaster*, *Unio tumidus*, *Crassostrea gigas*, *Corbicula fluminea*, *Meretrix lusoria*) et vertébrés (*Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Danio rerio*, *Xenopus laevis*).

Figure 31 : Séquences codantes et protéiques de SOD et de CAT d'*Unio tumidus*.

Figure 32 : Comparaison des séquences protéiques de SOD d'*Unio tumidus* avec les séquences de SOD de différents organismes disponibles dans GenBank.

Figure 33 : Comparaison des séquences protéiques de CAT d'*Unio tumidus* avec les séquences de CAT de différents organismes disponibles dans GenBank.

Figure 34 : Alignements multiples de la séquence de Mn-SOD d'*Unio tumidus* avec les séquences protéiques Mn-SOD de vertébrés (*Danio rerio*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus Norvegicus*, *Xenopus laevis*) et d'invertébrés (*Corbicula fluminea*, *Crassostrea gigas*, *Mizuhopecten yessoensis*, *Argopecten irradians*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Haliotis cracherodii*, *Hyriopsis schlegelii*).

Figure 35 : Alignements multiples de la séquence de CAT d'*Unio tumidus* avec les séquences protéiques CAT de vertébrés (*Danio rerio*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus Norvegicus*, *Xenopus laevis*) et d'invertébrés (*Corbicula fluminea*, *Crassostrea gigas*, *Chlamys farreri*, *Drosophila melanogaster*, *Litopenaeus vannamei*, *Fenneropenaeus chinensis*).

Figure 36 : Niveaux d'expression transcriptionnelle normalisée saisonniers des transcrits de SOD, CAT, Se-GPx, GST-pi et MT dans les glandes digestives d'*Unio tumidus* et de *Corbicula fluminea*



Figure 37 : Analyses en composantes principales des expressions d'ARNm de SOD, CAT, Se-GPx, GST-pi et MT, des températures (T), du pH, de l'oxygène dissous (O₂) et de la conductivité (Cond) de l'eau chez *Corbicula fluminea*. (a) Le cercle des corrélations des variables analysées. (b) La carte factorielle présentant les variations saisonnières selon les axes sélectionnés.

Figure 38 : Analyses en composantes principales des expressions d'ARNm de SOD, CAT, Se-GPx, GST-pi et MT, des températures (T) et du pH de l'eau chez *Unio tumidus*. (a) Le cercle des corrélations des variables analysées. (b) La carte factorielle présentant les variations saisonnières selon les axes sélectionnés.

Figure 39 : Analyses en composantes principales des expressions d'ARNm de SOD, CAT, Se-GPx, GST-pi et MT des deux bivalves. (a) Le cercle des corrélations des variables analysées. (b) La carte factorielle présentant les niveaux d'expression des gènes de détoxification des deux études combinées : *Unio tumidus* en rouge et *Corbicula fluminea* en bleu, selon les axes sélectionnés.

Figure 40 : Résumé des travaux réalisés chez les bivalves *C. fluminea* et *U. tumidus*.



LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1 : Exemples de variations saisonnières de concentrations de polluants dans l'environnement et dans les tissus de bivalves.
- Tableau 2 : Modification d'activités des enzymes antioxydantes en fonction de la saison chez des bivalves.
- Tableau 3 : Modification de l'activité des enzymes antioxydantes chez des organismes exposés au cadmium (Cd) ou au cuivre (Cu).
- Tableau 4 : Séquences des amorces dégénérées forward (F) et reverse (R) utilisées pour les RT-PCR.
- Tableau 5 : Séquences des amorces forward (F) et reverse (R) utilisées pour les RT-PCR et RACE-PCR.
- Tableau 6 : Conditions testées pour amplifier les ADNc de MT de *Corbicula fluminea* et *Unio tumidus* par RT-PCR.
- Tableau 7 : Conditions testées pour amplifier les ADNc de SOD et CAT d'*Unio tumidus* par RT-PCR.
- Tableau 8 : Conditions testées pour amplifier les extrémités 3' des ADNc de MT de *Corbicula fluminea* et *Unio tumidus* par RACE-PCR.
- Tableau 9 : Conditions testées pour amplifier les extrémités 5' des ADNc de MT de *Corbicula fluminea* et *Unio tumidus* par RACE-PCR.
- Tableau 10 : Séquences et quantités d'amorces forward (F) et reverse (R) utilisées pour les PCR en temps réel.
- Tableau 11 : Taille des *Unio tumidus*, pH et température de l'eau mesurés lors des prélèvements.
- Tableau 12 : Récapitulatif des niveaux d'expression des ARNm de SOD, CAT, Se-GPx, GST-pi et MT dans la glande digestive (GD) et les branchies (BR) de *Corbicula fluminea*, après intoxication à 2, 10 ou 50 µg/L de cuivre et/ou cadmium pendant 12h.
- Tableau 13 : Récapitulatif des niveaux d'expression des ARNm de SOD, CAT, Se-GPx, GST-pi et MT chez *Unio tumidus* transférés sur les sites M1, M2, M3 et M4 de la Moselle, pendant 8 et 21 jours.



LISTE DES ARTICLES ET COMMUNICATIONS

■ Publications internationales

Doyen Périne, Bigot Aurélie, Vasseur Paule, Rodius François, 2008. Molecular cloning and expression study of pi-class glutathione S-transferase (pi-GST) and selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) transcripts in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 147, 69-77.

Bigot Aurélie, Doyen Périne, Vasseur Paule, Rodius François, 2009. Metallothionein coding sequence identification and seasonal mRNA expression of detoxification genes in the bivalve *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 382-387.

Bigot Aurélie, Vasseur Paule, Rodius François. SOD and CAT cDNA cloning and expression pattern of detoxification genes in the freshwater bivalve *Unio tumidus* transplanted into the Moselle River. *Ecotoxicology* (Article accepté).

Bigot Aurélie, Minguez Laëtita, Giambérini Laure, Rodius François. Early defence responses in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* exposed to copper and cadmium: transcriptional and histochemical studies. (Article soumis à *Environmental Toxicology*).

■ Communications orales :

Bigot Aurélie, Vasseur Paule, Rodius François, 2008. Identification et étude de l'expression de gènes de détoxification chez le bivalve d'eau douce *Corbicula fluminea*. Séminaire de la Zone Atelier Moselle, Nancy, 29 mai 2008.

Bigot Aurélie, Vasseur Paule, Rodius François, 2009. Identification de séquences et étude du niveau d'expression de gènes de détoxification chez le bivalve *Unio tumidus* transplanté en milieu pollué. 9^{èmes} Journées Internationales de Limnologie, Centre Culturel de Rencontre de Neumünster, Luxembourg, 6-9 avril 2009.

■ Communications affichées :

Bigot Aurélie, Vasseur Paule, Rodius François, 2008. Identification et étude de l'expression saisonnière de l'ARNm de la métallothionéine chez le bivalve d'eau douce *Corbicula fluminea*. Séminaire de l'école doctorale RP2E, Nancy, 17 janvier 2008.

Bigot Aurélie, Vasseur Paule, Rodius François, 2008. Antioxidant response in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea*, experimentally exposed to copper and cadmium. 7^{ème} Congrès International de Limnologie-Océanographie, Rouen, 14-16 octobre 2008.

Bigot Aurélie, Vasseur Paule, Rodius François, 2009. Identification and expression pattern of detoxification genes in the freshwater bivalve *Unio tumidus* transplanted into the Moselle river. 14th International Symposium on Toxicity Assessment, Metz, 30 août-4 septembre 2009.

INTRODUCTION



INTRODUCTION

Les milieux aquatiques sont soumis à de nombreuses agressions si bien que la qualité de l'eau s'est largement altérée sur notre planète. Ces dernières années une réelle prise de conscience du problème de la pollution environnementale s'est par conséquent développée.

Les facteurs de stress d'origine environnementale peuvent induire des changements au niveau génétique, biochimique et physiologique chez les individus exposés. Pour se protéger contre le stress oxydant, les organismes aquatiques possèdent des défenses. Les premières barrières sont mises en place au niveau de l'organisme entier et constituent des protections physiques contre la pénétration des xénobiotiques (coquille, peau). Si ces défenses s'avèrent inefficaces, d'autres systèmes se mettent en place, comme le système antioxydant, pour protéger les organes et les cellules contre les attaques d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées à la suite d'un stress oxydant. Parmi ces défenses figurent (1) des protéines comme les métallothionéines (MT) qui sont impliquées dans les mécanismes de détoxification en liant certains métaux essentiels et non essentiels, (2) des enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD) qui convertit l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, la catalase (CAT) et la glutathion peroxidase sélénium-dépendante (Se-GPx) qui dégradent le peroxyde d'hydrogène, et les glutathion S-transférases (GST) qui catalysent la conjugaison d'un substrat électrophile avec le glutathion.

Le but de cette étude est de contribuer à la compréhension des mécanismes de détoxification chez les bivalves d'eau douce *Unio tumidus* et *Corbicula fluminea* et de caractériser des gènes de détoxification permettant la détection de polluants dans le milieu aquatique.

Les bivalves constituent des organismes sentinelles pour la surveillance de la qualité de l'environnement aquatique. En effet, ce sont des organismes filtreurs vivant à l'interface eau-sédiment ou enfouis dans les sédiments et qui peuvent accumuler les polluants.

De nombreux travaux ont été réalisés sur l'activité des enzymes de détoxification ou sur la concentration en MT, mais peu ont été réalisés sur l'expression des ARNm.

La première partie de ce travail porte sur l'identification des séquences codantes de MT des bivalves *Corbicula fluminea* et *Unio tumidus*, ainsi que celles de SOD et de CAT d'*Unio tumidus*. La technique employée est la RT-PCR (reverse-transcription polymérase chain



reaction) en utilisant des amorces dégénérées obtenues par comparaison de séquences conservées du gène recherché chez différents bivalves.

Les séquences codantes de SOD, CAT, Se-GPx et GST-pi de *Corbicula fluminea* et celles de Se-GPx et GST-pi d'*Unio tumidus* étaient déjà connues lorsque ces expérimentations ont été initiées. La première partie de nos travaux nous a donc permis d'étudier le niveau d'expression de ces gènes de détoxification au niveau transcriptionnel chez les deux bivalves.

La deuxième partie de ce travail porte sur l'étude de l'expression saisonnière de la MT, la SOD, la CAT, la Se-GPx et la GST-pi chez *Corbicula fluminea* et *Unio tumidus* par la technique de RT-PCR.

Différentes études ont montré que le cycle saisonnier peut causer des variations du niveau d'expression des gènes de détoxification chez les bivalves. C'est dans ce contexte que l'expression saisonnière de ces gènes a été mesurée chez les deux bivalves, dans le but de discriminer les effets de la saison des effets d'une contamination sur l'induction de ces gènes.

Dans la dernière partie de nos travaux, le niveau d'expression des gènes de détoxification a été étudié par RT-PCR en temps réel chez des bivalves soumis à différentes perturbations.

Une intoxication de *Corbicula fluminea* au cuivre et au cadmium pendant 12h a été réalisée en laboratoire. Le but de cette étude est de déterminer si les gènes de détoxification peuvent être considérés comme des biomarqueurs précoces à une exposition métallique chez ces bivalves.

Le niveau transcriptionnel des gènes de détoxification a également été mesuré chez *Unio tumidus* transférés au niveau de la Moselle. Les sites choisis couvrent une zone soumise à des perturbations d'origines domestique, agricole et industrielle. Des analyses physico-chimiques ont été réalisées sur les sédiments de chaque site. Cette étude a pour but de déterminer si la mesure du niveau d'expression des gènes de détoxification permet de déceler des perturbations qui n'auraient pas été mises en évidence via le dosage des contaminants.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE



1. Mollusques bivalves

1.1. Description

L'embranchement des mollusques compte plus de 40 000 espèces. Le corps mou de l'animal est partiellement protégé par une coquille calcaire sécrétée par la face dorsale du manteau (ou *pallium*) qui délimite la cavité palléale dans laquelle se localisent les branchies (Figure 1).

Le pied ventral musculeux souvent cilié assure la reptation, un mode de locomotion propre aux mollusques. Ils possèdent un manteau qui enveloppe la masse viscérale dorsale et qui sécrète la coquille composée principalement de carbonate de calcium. La coquille protège l'animal mais ne l'entoure pas entièrement.

Le manteau forme généralement un repli vers l'intérieur de la coquille à la jonction du pied, la cavité formée par ce repli appelée cavité palléale renferme typiquement les organes respiratoires (Tachet et al., 2000).

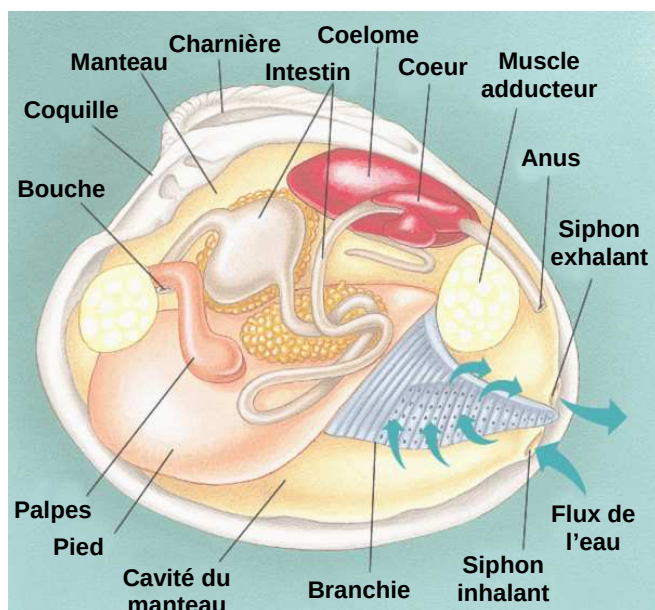


Figure 1 : Anatomie générale d'un mollusque bivalve (Moyes et Schulte, 2007).

Les bivalves lamellibranches sont des mollusques aquatiques, généralement fousseurs, à symétrie bilatérale dont le corps est protégé par deux valves reliées dorsalement par un ligament élastique qui tend à les écarter et souvent engrenées par des dents constituant une charnière. La fermeture des valves est assurée par deux muscles adducteurs qui les relient l'une à l'autre. Le muscle adducteur antérieur peut s'atrophier ou quelquefois disparaître au cours du développement.



Les branchies consistent en deux lames branchiales suspendues à un axe pouvant s'étendre de la bouche à l'anus, vers le haut de la cavité palléale. Ces lames branchiales sont le plus souvent formées chacune par deux séries de longs filaments repliés sur eux-mêmes en U, de sorte que l'ensemble de leurs parties proximales forme deux feuillets descendants voisins. La ciliation assure la filtration de l'eau au niveau des branchies qui est rejetée par un orifice exhalant postérieur et effectue la capture puis le tri des particules alimentaires qui sont dirigées vers la bouche.

Les bivalves sont des microphages et se nourrissent par filtration de particules en suspension comprenant le phytoplancton, le zooplancton et les résidus organiques ou seston. Les bivalves d'eau douce appartiennent à l'ordre des Eulamellibranches. Ils sont représentés par trois superfamilles : Dreissenacea, Corbiculacea et Unionacea.

1.2. Choix des mollusques bivalves

Les mollusques bivalves sont des organismes filtreurs vivant à l'interface eau-sédiment ou enfouis dans les sédiments. Ils peuvent ainsi être exposés à de nombreux polluants chimiques et bioaccumuler les xénobiotiques.

Ils sont ainsi largement utilisés comme espèces sentinelles dans les programmes de biosurveillance. En effet, ces organismes sont des bioindicateurs utilisés pour révéler précocement la présence et la toxicité d'un ou plusieurs polluants dans le milieu (Berthet, 2008).

Différents critères sont pris en compte pour le choix des mollusques bivalves en tant qu'espèces sentinelles :

- leur large distribution géographique, qui permet les comparaisons entre différents sites ;
- leur abondance, qui permet de réduire l'impact des prélèvements sur la structure et la densité de la population mais également de faciliter les prélèvements ;
- leur sédentarité, afin que l'état des individus puisse être directement corrélé avec le niveau de pollution du site.

Les mollusques bivalves *Unio tumidus* et *Corbicula fluminea* ont été utilisés pour la réalisation de nos travaux.



1.3. *Unio tumidus*

L'espèce *Unio tumidus* (Figure 2) (embranchement : Mollusques, classe : Bivalves, ordre : Eulamellibranches, superfamille : Unionacea, famille : Unionidae) est largement répandue dans le Nord Est de la France et jusqu'en Europe centrale et septentrionale.



Figure 2 : Aspect général et morphologique d'*Unio tumidus*

Elle vit au niveau des cours d'eau et des étangs, plus particulièrement dans les écosystèmes dulçaquicoles à l'interface eau-sédiment ou enfouie dans le sédiment.

Elle se nourrit par filtration ou à partir des particules déplacées par les mouvements de son pied. Sa coquille, fortement nacrée à l'intérieur et recouverte d'une épaisse cuticule de couleur brun-vert, a une taille moyenne de 6 à 7 cm de long et 3 à 4 cm de large. La longévité de cette espèce est comprise entre 10 et 30 ans.

Unio tumidus étant une espèce polluo-sensible (plus particulièrement aux pollutions biodégradables), une population stable et diversifiée indique généralement une eau douce de bonne qualité et un environnement aquatique sain. Sa sensibilité est d'autant plus marquée par sa maturité sexuelle qui n'est atteinte qu'au bout 6 à 12 ans et par sa production d'une seule génération par an.

La période de reproduction commence à la fin de la période hivernale et se poursuit jusqu'à l'automne. Les Unionidés sont unisexués à fécondation interne et ovipares. Les œufs (0,25-0,3 mm de diamètre) sont en nombre important : jusqu'à 200 000. Ces œufs donnent des larves (glochidies) qui se développent entre les feuillets branchiaux de la femelle (marsupium). Les glochidies sont libérés à la fin du printemps ou pendant l'été, cet événement pouvant être consécutif à l'augmentation de la température de l'eau. Après avoir été rejetés dans l'eau, les glochidies doivent se fixer à un poisson hôte et passer par un stade de parasitisme, nécessaire pour la métamorphose en moule juvénile. Selon que les larves possèdent ou non un crochet, elles se fixeront au niveau des écailles ou des branchies (moins dures) de leur hôte. L'embryon mettra 3 ans pour atteindre la taille adulte.



Cette espèce présente une grande résistance aux variations des paramètres environnementaux tels que la température, l'oxygène et la disponibilité de la nourriture (Tachet et al., 2000).

1.4. *Corbicula fluminea*

Corbicula fluminea (Figure 3) (embranchement : Mollusques, classe : Bivalves, ordre : Eulamellibranches, superfamille : Corbiculacea, Famille : Corbiculidea) est une espèce opportuniste pouvant facilement coloniser différentes niches écologiques.



Figure 3 : Aspect général et morphologique de *Corbicula fluminea*

Elle a ainsi été retrouvée dans des cours d'eau, des canaux, des lacs et des retenues d'eau, et occupe essentiellement les habitats composés de gravier fin, de sable et de vase.

La répartition naturelle de *Corbicula fluminea* s'étend aux régions tropicales et sub-tropicales d'Asie, d'Afrique, d'Australie, et de la Nouvelle-Guinée (McMahon, 1982). Le continent américain et l'Europe de l'ouest ont été rapidement colonisés.

Sur le continent américain le premier recensement aux Etats-Unis date de 1924 sur l'île de Vancouver où l'espèce aurait été introduite d'Asie par les immigrants chinois qui l'utilisaient comme aliment. L'espèce a été signalée en Amérique du sud, en particulier en Argentine et au Venezuela entre 1985 et 1987 (Dubois, 1995). En Europe occidentale, *Corbicula fluminea* a été détecté pour la première fois en France en 1980, dans le bassin de la Dordogne. L'espèce a été observée dans l'estuaire du Tage, au Portugal (Mouthon, 1981), en 1987 aux Pays-Bas (Biz de Vaate et Greijdanus-Klaas, 1990) puis en Allemagne (Biz de Vaate, 1991), en 1989 en Espagne (Araujo et al., 1993) et en 1992 en Belgique (Swinnen et al., 1998).

C. fluminea est signalée dans la Moselle en 1994 (Bachmann et al., 1995). En vingt ans, l'espèce a colonisé la totalité des bassins hydrographiques français, elle est présente dans la majorité des cours d'eau, dans certains lacs, ainsi que dans de nombreux canaux de navigation.



Corbicula fluminea est un mollusque bivalve dont la durée de vie est de 2 à 3 ans. Sa coquille, de forme triangulaire à base arrondie, est de couleur jaune-verdâtre laissant apparaître des stries concentriques. L'intérieur de chaque valve est gris-violacé mettant en évidence des lignes palléales ainsi que des insertions musculaires bien marquées. Le ligament de la charnière forme une protubérance saillante. La charnière de chaque valve est munie de 3 dents cardinales et de 2 dents latérales crénelées, simples dans la valve gauche, doubles dans la valve droite (Araujo et al., 1993; Mouthon, 1981). La taille moyenne de ces bivalves varie entre 3 et 4 cm mais un diamètre maximal de coquilles d'environ 6 cm a été mesuré chez des individus asiatiques.

Ces bivalves possèdent un pied musculeux très développé permettant leur déplacement ainsi que leur enfouissement. Les bords du manteau sont soudés avec une ouverture pédieuse et deux ouvertures pour les siphons (Britton et Morton, 1986). Ils vivent ainsi à l'interface sédiment-eau et se nourrissent d'algues, de bactéries et de matières en suspension n'excédant pas 20 μm .

Ce mollusque est hermaphrodite simultané. Les larves sont incubées au niveau des hémibranchies des adultes jusqu'à une taille d'environ 250 μm . La stratégie de reproduction allie une forte fécondité (de 34 500 à 47 500 juvéniles libérés en moyenne par adulte et par saison de reproduction, à une mortalité élevée durant la phase planctonique (au moins 99 %) (Dubois, 1995).

2. Espèces réactives de l'oxygène

L'oxygène, nécessaire à toute forme de vie aérobie, peut se révéler toxique lors de sa transformation en espèces radicalaires très réactives. Ces composés sont formés par voie endogène en petite quantité (moins de 5 %) au cours de la respiration cellulaire; ils peuvent également être générés à la suite d'un stress oxydant ou au cours de toute réaction mettant en jeu un transfert d'électrons.

2.1. Sources de production

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produites par le métabolisme cellulaire basal et également sous différentes conditions environnementales en présence de xénobiotiques.



L'oxygène moléculaire (O_2) est essentiel pour la survie de tous les organismes aérobies. Pourtant, il a été estimé qu'environ 1 à 3 % de l' O_2 consommé par les animaux est converti en ROS. Le métabolisme énergétique aérobie dépend de la phosphorylation oxydative, un processus par lequel l'ATP est formé. Une grande partie de l'énergie produite dans les voies cataboliques se retrouve contenue dans le NADH et le $FADH_2$; elle sera convertie en ATP dans la mitochondrie : les coenzymes réduits mitochondriaux cèdent leurs deux électrons à un système de transporteurs qui, par une cascade de réactions d'oxydo-réduction, amène ces électrons jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène moléculaire. Des métabolites de l' O_2 fortement réactifs peuvent se former pendant ces réactions de transfert d'électrons. Ces métabolites partiellement réduits de l' O_2 sont souvent désignés sous le nom « d'espèces réactives de l'oxygène » (ROS) dues à leur plus haute réactivité relative à l' O_2 moléculaire (Thannickal et Fanburg, 2000).

Différents xénobiotiques peuvent initier la formation de ROS : les contaminants organiques tels que les composants du cycle redox (quinones, nitroaromatiques, nitroamines), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (benzène, produits d'oxydation des HAP), hydrocarbures halogénés (bromobenzène, dibromométhane, polychlorobiphényles (PCB), lindane), dioxines et pentachlorophénol ; métaux (aluminium, arsenic, cadmium, chrome, mercure, nickel, vanadium) ; contaminants volatiles (NO_2 , O_3 , SO_2), peroxydes ; radiation UV ; hypoxie et hyperoxie. Ces contaminants peuvent stimuler la production de ROS par différents mécanismes, directs ou indirects, incluant le cycle redox catalysé par les flavoprotéines réductases (telles que les quinones), les réactions redox, l'auto oxydation (cytochrome P450 et PCB), l'induction enzymatique (flavoprotéines réductases), rupture des membranes de transport d'électrons et saturation des défenses antioxydantes (glutathion réduit (GSH) impliqué dans la phase II de biotransformation des contaminants organiques) (Arumugam et al., 1999; Halliwell et Gutteridge, 1999; Schlezinger et al., 1999; Strolin-Benedetti et al., 1999).

2.2. Anion superoxyde

L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) résulte de la capture d'un électron par la molécule O_2 lors de réactions endergoniques (Halliwell et Gutteridge, 1984). Il est formé dans plusieurs processus physiologiques : chez les animaux par des cellules phagocytaires pour la destruction des particules étrangères et des complexes immuns (Babior, 1978), chez les plantes dans la chaîne



de transport d'électrons du chloroplaste (Cleland et Grace, 1999; Mehler, 1951). L'anion superoxyde est formé essentiellement au niveau des membranes biologiques, du fait de la solubilité beaucoup plus élevée de l'oxygène en milieu hydrophobe qu'en milieu aqueux (Luchette et al., 2002). Ce n'est pas la plus réactive des formes activées de l'oxygène mais l'est cependant suffisamment pour endommager certaines cibles cellulaires. Très stable en milieu hydrophobe, l'anion superoxyde contribue à la peroxydation lipidique, c'est-à-dire à la destruction des phospholipides membranaires par attaques nucléophiles des liaisons esters entre les acides gras et le glycérol. Il est chimiquement incapable d'endommager l'ADN mais il peut accélérer les attaques sur l'ADN en augmentant les niveaux de fer libre (Keyer et Imlay, 1996). Le fer ainsi libéré des ferritines peut également participer aux réactions de peroxydation des membranes cellulaires.

L'anion superoxyde se dismute en formant du peroxyde d'hydrogène ; cette réaction est fortement accélérée en présence des superoxydes dismutases (Fridovich, 1975)

2.3. Peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est formé par dismutation de l'anion superoxyde est modérément réactif (Halliwell et Gutteridge, 1985). Il participe à la production d'espèces très réactives comme le radical hydroxyle ($OH^\bullet$) et son action est plus importante comme initiateur de la cytotoxicité des radicaux libres plutôt qu'en tant qu'espèce réactive (Yu, 1994). Il peut diffuser et franchir les barrières membranaires. Sa concentration intracellulaire est très faible, de l'ordre de 0,001 à 0,1 μM (Sies et William, 1981). Par contre, dans les mitochondries et les peroxysomes, sa concentration peut atteindre des niveaux plus élevés, entre 0,1 à 1 μM (Boveries et al., 1972). La réactivité connue du peroxyde d'hydrogène a été impliquée dans les phénomènes de mort cellulaire (Whittemore et al., 1994; Yoneda et al., 1995).

Les niveaux de peroxyde d'hydrogène dans le corps humain peuvent être contrôlés non seulement par le catabolisme mais également par l'excrétion, il va ainsi être impliqué dans la régulation de la fonction rénale et comme un agent antibactérien dans les urines (Halliwell et al., 2000).

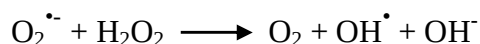


2.4. Radical hydroxyle

Le radical hydroxyle ($\text{OH}^\bullet$) résulte de la fission homolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène (Halliwell et Gutteridge, 1984). Il est produit par les réactions thermiques, par les radiations ionisantes ou en présence de métaux de transition tel que le fer sous forme réduite selon la réaction de Fenton *in vitro* :



La production du radical hydroxyle *in vivo* à partir d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène est réalisée selon la réaction d'Haber Weiss catalysée par des métaux de transition (fer, cuivre). La première étape est la réduction du métal par l'anion superoxyde, la deuxième étape fait intervenir le peroxyde d'hydrogène par la réaction de Fenton. Le bilan est le suivant :



Cette réaction est inhibée par chélation du métal, notamment par la desferrioxamine dans le cas du fer III (Denicola et al., 1993). Dans les systèmes biologiques, la biodisponibilité des ions ferreux limite la réaction, mais le recyclage du fer de la forme ferrique à la forme ferreuse par un agent réducteur peut maintenir en cours une réaction de Fenton provoquant la génération du radical hydroxyle.

Le radical hydroxyle réagit avec diverses molécules biologiques telles que les sucres, les acides aminés, les phospholipides, les bases de l'ADN et les acides organiques (Halliwell et Gutteridge, 1984). Il existe trois types de réaction de ce radical (Willson, 1978) :

- la substitution d'un atome d'hydrogène,
- l'addition : ajout au cercle aromatique de structures telles que des bases puriques et pyrimidiques de l'ADN,
- le transfert d'électron.

La réactivité du radical hydroxyle est importante *in situ*, il réagira immédiatement avec les molécules biologiques proches de son lieu de formation et produira des radicaux secondaires à réactivité variable.



Pour se protéger contre le stress oxydant, les organismes possèdent des défenses telles que les superoxydes dismutases (SOD), la catalase (CAT), les glutathion peroxydases (GPx), les glutathion S-transférases (GST) (Figure 4) et les métallothionéines (MT).

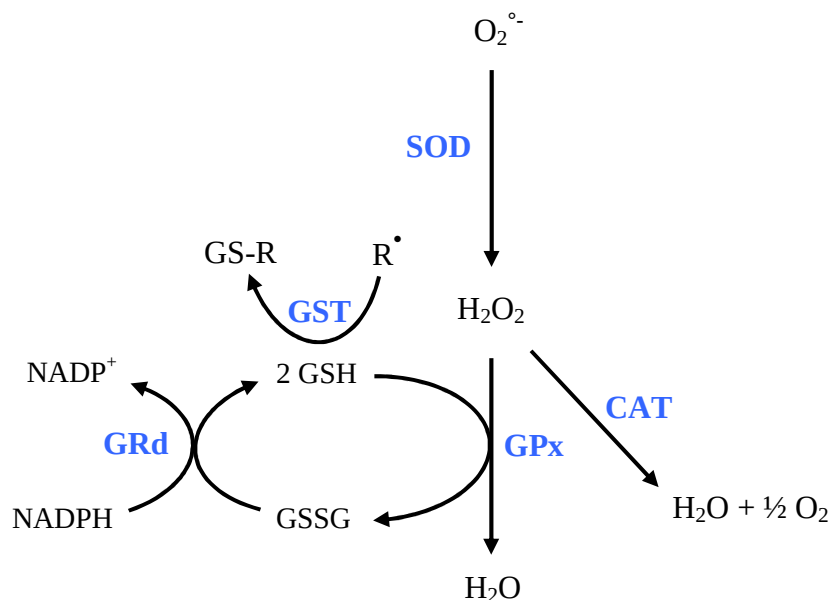
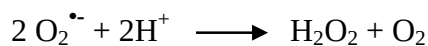


Figure 4 : Schéma des défenses antioxydantes impliquant la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx), les glutathion S-transférases (GST) et la glutathion réductase (GRd).

3. Protéines de défense contre le stress oxydant

3.1. Superoxydes dismutases

Les superoxyde dismutases (SOD) constituent une famille d'enzyme du stress oxydant qui catalysent la première étape en convertissant le superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène divalent (Fridovich, 1989).



Leur activité catalytique a été découverte en 1969 par McCord et Fridovich qui avaient isolé la CuZn-SOD à partir d'érythrocytes bovins (McCord et Fridovich, 1969).

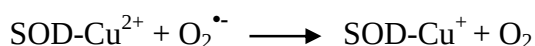


3.1.1. Caractéristiques et répartition

Les superoxydes dismutases sont des métalloenzymes que l'on peut classer en plusieurs familles selon le métal contenu dans le site actif :

- La CuZn-SOD, est une enzyme dimérique, de masse moléculaire de 32,5 kDa et contenant un atome de cuivre et un atome de zinc par sous unité. Elle est présente dans le cytosol au niveau de la matrice des peroxysomes, dans les lysosomes, ainsi que dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Beyer et al., 1991). On la retrouve chez les organismes vivants aquatiques et terrestres vertébrés et invertébrés ainsi que chez les plantes

La dismutation des $O_2^{\bullet-}$ par la CuZn-SOD se décompose en deux étapes (mécanisme pingpong) (Goldstein et Czapski, 1991).



Le cuivre est successivement réduit et oxydé en présence de $O_2^{\bullet-}$. Le site catalytique de la CuZn-SOD comporte un atome de cuivre, stabilisé par quatre résidus histidine dont l'un sert de lien entre les deux métaux. Le site est stabilisé par deux autres histidines et par un résidu aspartate (Banci et al., 1994). Les radicaux $O_2^{\bullet-}$ sont dirigés vers le cuivre grâce à une région électrostatique dont certains acides aminés sont très conservés (Djinovic et al., 1992). L'activité enzymatique dépend de l'accessibilité du cuivre aux radicaux, elle peut être diminuée en présence de fortes forces ioniques (De Freitas et Valentine, 1984).

- La Mn-SOD est une enzyme tétramérique de masse moléculaire de 80 kDa. Chaque sous unité contient environ 200 résidus. Elle est présente chez les archéobactéries, et chez les eucaryotes au niveau de la matrice mitochondriale, mais également au niveau membranaire dans les peroxysome (Dhaunsi et al., 1993).

- La Fe-SOD possède une structure très proche de celle de la Mn-SOD mais sa distribution est plus restreinte. Elle est retrouvée chez les plantes et les bactéries (Lynch et Kuramitsu, 2000).



- La SOD extracellulaire, tétramérique, contient du cuivre et du zinc. Son rôle serait de protéger les parois endothéliales vis à vis de $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 produits par les phagocytes (Marklund et al., 1982).

3.1.2. Régulation de l'expression

La régulation de la synthèse ou de l'expression de la Mn-SOD a surtout été étudiée chez les mammifères et les plantes. Le gène de la Mn-SOD possède un promoteur activable par le facteur de transcription NF-kB (nuclear factor-kappa B). Dans certains types de cellules, H_2O_2 agirait comme second messenger entre TNF α (tumor necrosis factor alpha), IL-1 (interleukine 1) ou IL-6 (interleukine 6) et NF-kB, pour l'activation du gène de la Mn-SOD (Ichikawa et al., 1994; Wan et al., 1994; Yoshioka et al., 1994).

Le gène de la CuZn-SOD a été isolé chez le rat, il est formé de 5 exons et 4 introns. En amont du gène se trouvent des sites de liaison pour les facteurs de transcriptions AP2 (protéine activatrice-2) (activable par les esters de phorbol), CREB (cAMP response element-binding) (activable par la voie des protéines kinases A), HSF (Heat Shock Factor). Ces sites pourraient permettre un contrôle du niveau d'expression du gène grâce à des signaux externes tels qu'un choc de température ou l'induction d'hormones (Kim et al., 1993).

3.2. Catalase

La catalase (CAT) est une hémoprotéine tétramérique qui possède un atome de fer par sous unité, chacune des sous unités est liée à une molécule de NADPH qui stabilise l'enzyme. Sa masse moléculaire est d'environ 240 kDa chez les mammifères (Fita et Rossmann, 1985). Elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.

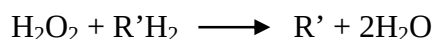


La CAT est localisée majoritairement dans les peroxysomes, organites contenant des enzymes génératrices de peroxyde d'hydrogène telles que la glycolate oxydase, l'urate oxydase et les déshydrogénases impliquées dans la β -oxydation des acides gras (Aebi, 1984).

Elle a un rôle complémentaire de celui de la glutathion peroxydase sélénium-dépendante contre la lipoperoxydation induite par H_2O_2 .



La CAT peut également catalyser la détoxification de substrats tels que les alcools et les phénols dans le cadre de la réaction de réduction de peroxyde d'hydrogène (Akyilmaz et Dinçkaya, 2003).



3.3. Glutathion peroxydases

Deux types de glutathion peroxydases (GPx) ont été identifiés : la glutathion peroxydase sélénium dépendante (Se-GPx) et la glutathion peroxydase sélénium indépendante (non Se-GPx). Les activités de ces deux enzymes constituent l'activité GPx totale.

Sept classes sont connues : les GPx-1 à 4 sont sélénium dépendantes, les GPx-5 et 7 sont sélénium indépendantes et la GPx-6 est sélénium dépendante chez l'Homme et sélénium indépendantes chez la souris. Toutes ces classes sont tétramériques sauf la GPx-4 et la GPx-7.

3.3.1. Classes des GPx

La GPx-1, découverte en 1957 dans les érythrocytes bovins, catalyse la réduction glutathion-dépendante de peroxydes organiques (ROOH) et inorganiques (H_2O_2) (Mills, 1957).

Cette enzyme est une métalloenzyme tétramérique de 80 kDa, dont chaque sous unité contient, au niveau de son site actif, un atome de sélénium sous forme d'un résidu sélénocystéine (Tappel et al., 1982). L'enzyme est localisée dans le cytosol et la matrice mitochondriale. Elle est retrouvée dans la plupart des tissus animaux et apparaît comme un système protecteur contre le processus de lipoperoxydation endogène et exogène.

La GPx-2, décrite en 1993 (Chu et al., 1993) est également tétramérique et intervient dans le cytosol. Elle est spécifique du glutathion en tant que substrat réduit.

La GPx-3 est une glutathion peroxydase plasmatique découverte en 1987 (Takahashi et al., 1987) et également spécifique du glutathion en tant que substrat réduit. Sa fonction est extracellulaire, le rein est le tissu possédant les plus hauts niveaux d'ARNm de la GPx-3.

La GPx-4 est un monomère caractérisé en 1982 (Ursini et al., 1982). Partiellement fixée à la membrane, elle est capable de réduire les hydroperoxydes phospholipidiques et n'est pas strictement spécifique du glutathion (Roveri et al., 1994).

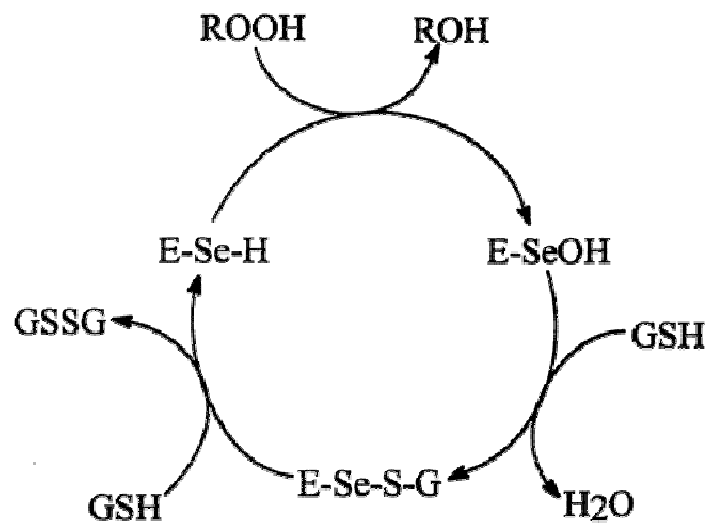


Figure 5 : Cycle catalytique de la GPx. E-Se-H : sélénol, E-SeOH : acide sélénique, GSH : glutathion réduit, E-Se-S-G : adduit sélénosulfide, GSSG : glutathion oxydé (Mugesh et al., 2001).



Les trois classes suivantes sont connues chez les mammifères :

La GPx-5 fut découverte dans les tissus épидидymiaux de la souris (Ghyselinck et Dufaure, 1990). Elle ne possède pas une selenocystéine mais une cystéine au niveau de son site actif.

La GPx-6 a été identifiée chez l'Homme et le porc comme étant une Se-GPx possédant des similarités structurales avec la GPx-4 (Kryukov et al., 2003).

La GPx-7 a été découverte dans les fibroblastes embryonnaires de souris. Elle réduit les hydroperoxydes phospholipidiques (Utomo et al., 2004).

3.3.2. Mécanisme catalytique

Les glutathion peroxydases présentent une activité enzymatique antioxydante. Elles protègent les membranes ainsi que les autres composants cellulaires contre le stress oxydant. Ces enzymes réduisent de nombreux ROS, tels que le peroxyde d'hydrogène ou encore divers hydroperoxydes comme les hydroperoxydes lipidiques.

La réaction catalysée par les GPx peut s'écrire :



Le site catalytique de l'enzyme comprend un résidu sélénocystéine dans lequel le sélénium subit un cycle redox impliquant le sélénol (E-Se-H) correspondant à la forme active qui réduit les peroxydes d'hydrogène ou des peroxydes organiques. Le sélénol est oxydé en acide sélénique (E-SeOH), qui réagit avec le glutathion réduit (GSH), pour former un adduit sélénosulfide (E-Se-S-G). Un deuxième glutathion régénère ensuite la forme active de l'enzyme en attaquant le E-Se-S-G pour former le glutathion oxydé (GSSG) (Mugesh et al., 2001) (Figure 5).

3.4. Glutathion réductase

Le glutathion oxydé (GSSG), produit pendant la réduction des peroxydes, est pris en charge par la glutathion réductase (GRd) dont l'activité est NADPH-dépendante. La réduction du GSSG permet de maintenir le glutathion réduit (GSH) à un niveau constant.



La GRd est une flavoprotéine dimérique de 100 kDa localisée dans le cytosol et les mitochondries (Meister et Anderson, 1983). Au niveau bactérien elle est contrôlée par le régulon *oryR* (Harris, 1992), alors que chez les eucaryotes elle peut être autorégulée par des espèces rédox comme le NADPH (Lopez-Barea et al., 1990).

4. Glutathion S-transférases

Les glutathion S-transférases (GST) sont des enzymes de biotransformation de phase II dont la fonction est de conjuguer le glutathion réduit, GSH, à des composés électrophiles afin de les rendre plus solubles pour qu'ils puissent ensuite être excrétés par des enzymes de phase III (Ketterer et al., 1983) (Figure 6).

Ces enzymes ont été purifiées pour la première fois en 1974 chez le rat (Habig et al., 1974). Elles sont principalement cytosoliques et comprennent deux sous-unités identiques (homodimérique) ou non-identiques (hétérodimérique) avec une masse moléculaire comprise entre 23 et 27 kDa.

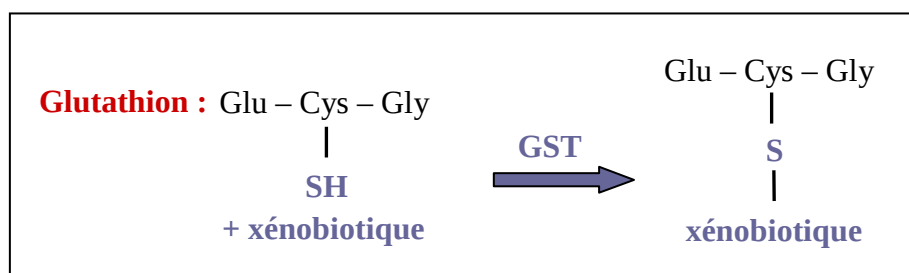


Figure 6 : Mécanisme de détoxification des glutathion S-transférases (GST).

4.1. Classification des GST

Chez les eucaryotes, les GST sont divisés en trois familles : les GST cytosoliques, kappa et microsomaux.

4.1.1. GST cytosoliques

Les GST cytosoliques sont trouvées de façon ubiquitaire chez les organismes aérobies et correspondent à la sous-famille la plus abondante. Chez les mammifères, sept classes de GST



cytosoliques sont connues : alpha, mu, pi, sigma, theta, zeta et omega (Armstrong, 1997; Board et al., 1997; Board et al., 2000; Hayes et al., 2005; Hayes et McLellan, 1999; Hayes et Pulford, 1995; Sheehan et al., 2001; Tong et al., 1998). D'autres classes de GST cytosoliques appelées beta, delta, epsilon, lambda, phi, tau et rho ont été identifiées chez d'autres espèces non-mammaliennes telles que des plantes, des insectes, des bactéries, des champignons ou des poissons (Ding et al., 2003; Dixon et al., 2002; Konishi et al., 2005a; Konishi et al., 2005b; Sheehan et al., 2001).

Bien qu'il n'existe pas de critères clairement établis concernant la mesure de similarité des séquences requises pour le classement des GST, il est généralement admis que les GST possédant plus de 60% d'homologie appartiennent à la même classe. La structure N-terminale de cette région est la mieux conservée et comprend une partie importante du site actif. Cette région contient une tyrosine (catalyseur essentiel), un résidu sérine ou cystéine qui interagit avec le groupement thiol du GSH (Sheehan et al., 2001).

Chez les vertébrés, deux isoformes de la classe pi ont été décrites (GST P1 et GST P2), et six pour les classes alpha et mu (A1 à A6 et M1 à M6). Chez les mammifères, il a été montré qu'en plus de leur fonction de conjugaison, les GST contribuent à la défense contre le stress oxydant. Il a été montré que la classe alpha peut présenter une activité enzymatique peroxydase sélénium indépendante au niveau du foie humain (Zhao et al., 1999). La classe pi peut intervenir dans la protection des cellules contre le peroxyde d'hydrogène (Sluis-Cremer et Dirr, 1995).

La classe theta ne présente que 7 % d'identité avec les classes alpha, mu et pi (Pemble et Taylor, 1992) et ne possède pas le même résidu essentiel au niveau du site catalytique de l'enzyme : la tyrosine est remplacée par une sérine (Board et al., 1995).

La classe sigma est impliquée dans la synthèse de prostaglandines. Une activité d'isomérisation de la prostaglandine H2 en prostaglandine D2 chez l'homme a été identifiée (Pahl et al., 2007).

La classe zeta a une faible activité catalytique pour la plupart des substrats des GST. Cette protéine a également la fonction d'isomérase du maleylacétoacétate, une enzyme de la voie catabolique de la tyrosine (Dixon et al., 2000).

La classe omega peut agir comme une transférase de thiol glutathion-dépendante. En réponse à un stress oxydant, cette GST est capable de transférer les adduits S-thiol d'une protéine sur le glutathion, ce transfert étant facilité par le site de fixation du substrat hydrophobe de ces enzymes (Board et al., 2000).



4.1.2. GST kappa

La classe kappa a été identifiée en 1991 chez le rat Wistar (Harris et al., 1991) et a été reconnue comme une classe distincte de GST en 1996 (Pemble et al., 1996). Ces enzymes sont localisées au niveau des mitochondries et des peroxysomes, et présentent des activités de conjugaison GSH-dépendante ainsi que des activités peroxydasiques. Elles ont donc des propriétés catalytiques communes aux GST cytosoliques.

4.1.3. GST microsomaux

Les GST microsomaux appartiennent à la superfamille des MAPEG (protéines associées à la membrane impliquées dans le métabolisme des eicosanoides et du glutathion). Elles sont moins nombreuses que les cytosoliques et sont moins caractérisées (Jakobsson et al., 1999). Six MAPEG ont été identifiées : la MGST1 (microsomal GST-1), MGST2, MGST3, la leukotriène synthase C4 (LTC4S), la protéine activant la lipoxygénase-5 (FLAP) et la prostaglandine-E synthase 1 (PGES1).

4.2. Mécanisme catalytique

Deux sites catalytiques ont été mis en évidence pour chacune des sous-unités des GST : un site de liaison au GSH, nommé site G, et un site hydrophobe de liaison aux substrats électrophiles, le site H (Tsuchida et Sato, 1992).

Le site G, commun à toutes les sous-unités des GST, s'avère hautement spécifique. Il présente quatre feuillets β séparés par trois hélices α . Le GSH va se lier aux feuillets β et interagir avec la protéine via des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogènes. Parmi les enzymes cytosoliques, la région la plus conservée est formée de deux feuillets β et d'une hélice α ($\beta\beta\alpha$), et est impliquée dans la reconnaissance de la portion γ -glutamyl du GSH. La différence la plus importante parmi les sites de fixation du GSH des différentes classes de GST se trouve au niveau de l'interaction de la protéine avec le sulfure du GSH. Par exemple, la classe theta va utiliser le groupe hydroxyle d'un résidu sérine localisé près de l'extrémité N-terminale pour activer le groupe sulfhydryl impliqué dans la liaison du GSH (Board et al., 1995). Dans le cas des classes alpha, mu, pi et sigma, il s'agira de l'hydroxyle d'un résidu tyrosine (Liu et al., 1992).



Le site H est impliqué dans la reconnaissance des xénobiotiques par la GST et est moins conservé entre les GST que le site G. Par exemple, le site H est constitué de cinq hélices α dans le cas des classes pi et mu, tandis que la classe alpha en contient six (Sinning et al., 1993). Les variations au niveau du site H peuvent être responsables des différences de spécificité de substrat entre les différentes classes (Wilce et Parker, 1994).

Le glutathion (GSH) sous sa forme thiolate (GS^-) est le substrat nucléophile des nombreuses réactions catalysées par les glutathion S-transférases. La GST lie le substrat électrophile et le glutathion au niveau de ses deux sites catalytiques (G et H) puis elle active le groupement sulfhydryle du GSH, ce dernier pouvant alors attaquer le centre électrophile du substrat (R-X) (Armstrong, 1991). Le composé résultant de cette réaction est un conjugué thioéther généralement moins réactif et plus hydrosoluble (Beckett et al., 1993).



avec E : enzyme

GS^- : glutathion sous sa forme thiolate

R-X : substrat possédant un centre électrophile

5. Métallothionéines

Les métallothionéines (MT) ont été découvertes en 1957 par Margoshes et Vallee lorsqu'ils ont identifié, à partir du cortex de rein de cheval, une protéine fixant le cadmium, responsable de l'accumulation naturelle de cadmium dans les tissus (Margoshes et Vallee, 1957).

En 1961, Kägi et Vallee caractérisèrent la protéine isolée par Margoshe et Vallee et la nommèrent « métallothionéine » du fait de sa richesse en métaux et en cystéine, un acide aminé contenant un atome de soufre (Kägi et Vallee, 1961).

En 1964, il a été démontré que la synthèse de MT est inductible par le cadmium (Piscator, 1964). Depuis, l'inductibilité de la synthèse de métallothionéines a été reconnue pour d'autres métaux, comme le cuivre (Howard et Nickless, 1977), le mercure (Roesijadi et al., 1982), l'argent (Bray et al., 1983) et le fer (Viarengo et al., 1999).

A ce jour, les MT ont été identifiées chez environ 50 espèces d'invertébrés aquatiques différents, la majorité étant des mollusques et des crustacés.



5.1. Définition

Les métallothionéines sont des protéines non-enzymatiques, riches en soufre et en métaux et possédant les propriétés suivantes (Fowler et al., 1987):

- Faible masse moléculaire (environ 10 kDa)
- 60 à 75 acides aminés
- Forte teneur en cystéine (30% des acides aminés)
- Absence d'acides aminés aromatiques et d'histidine
- Absence de ponts disulfures
- Forte inductibilité par les métaux
- Localisation cytoplasmique
- Présence de motifs Cys – X – Cys, Cys – X – X – Cys et Cys – Cys où X est un acide aminé autre que la cystéine
- Présence de complexe métal-thiolate tétraédrique

5.2. Propriétés biochimiques et physiques

5.2.1. Composition en acides aminés

La caractéristique principale des MT est leur forte teneur en cystéines qui correspondent aux sites de fixation des métaux (Hamza-Chaffai et al., 2000; Sadhu et Gedamu, 1989). L'alignement multiple des séquences MT d'espèces phylogénétiquement proches montre que les positions des cystéines sont très conservées tout au long de la chaîne protéique.

Les MT de mollusques bivalves présentent 71 à 75 acides aminés (Mackay et al., 1993).

Les séquences protéiques des MT sont dépourvues d'acides aminés aromatiques, ce qui se traduit par une absorbance très faible des MT à 280 nm. La liaison SH-métal entraîne une absorbance à des longueurs d'onde qui sont fonction du métal associé (Zn : 230 nm, Cd : 250 nm, Cu : 270 nm et Hg : 310 nm) (Amiard et Cosson, 1997).

5.2.2. Composition en ions métalliques

Les cations métalliques peuvent être complexés par les groupements thiols des MT. La fixation des métaux s'effectue selon la valence des ions métalliques. La stabilité de la liaison avec le cuivre est 100 fois plus élevée que celle avec le cadmium, elle-même 1000 fois plus



forte que celle avec le zinc. Le mercure et l'argent ont une affinité pour la MT plus grande encore que le cuivre (Hamza-Chaffai et al., 2000; Romero-Isart et Vasak, 2002).

5.2.3. Classification

Le critère retenu pour classer les différentes MT est l'alignement des séquences Cys-Cys, Cys-X-Cys et Cys-X-X-Cys, où X représente un acide aminé autre que la cystéine. Il a ainsi été défini trois classes de MT (Kägi et al., 1984):

- la classe I qui comprend toutes les MT mises en évidence chez les vertébrés et présentant des régions conservées riches en cystéines ;
- la classe II qui regroupe des protéines présentant plusieurs propriétés communes aux MT mais pas ou très peu d'homologie de séquence avec les MT mammaliennes. Cette classe inclut en particulier les MT isolées chez la drosophile, les oursins, les nématodes, les champignons et les cyanobactéries ;
- la classe III qui rassemble des molécules non protéiques fixant des métaux grâce à des composés soufrés, construits par répétition de fragments oligopeptidiques. Ces composés ne sont pas directement produits par un gène, mais synthétisés à partir du glutathion, et n'ont aucune relation génotypique avec les MT connues.

5.2.4. Structure

Deux domaines globulaires sont à distinguer dans la molécule de MT. Le premier β peut fixer 3 ions métalliques par l'intermédiaire de 9 cystéines, dont aucune n'est immédiatement voisine d'une autre. Le deuxième α permet la fixation de 4 ions métalliques par l'intermédiaire de 11 cystéines, dont certaines sont associées en doublet Cys-Cys. Les deux domaines sont repliés autour des métaux directement liés aux atomes de soufre des cystéines. Ils sont de taille équivalente (1,5 à 2 nm de diamètre) et séparés par un coude lorsque les ions métalliques sont fixés sur la chaîne. Le zinc et le cadmium se lient plus fortement au domaine α qu'au domaine β , alors que le cuivre et l'argent présentent une affinité inverse (Stillman, 1995).



5.3. Rôle des métallothionéines

Leur ubiquité et le caractère hautement conservatif de leur structure suggèrent que les MT jouent un rôle essentiel dans des processus physiologiques fondamentaux.

La fonction première des MT est de réguler les concentrations intracellulaires de certains métaux essentiels à l'organisme, tels que le cuivre et le zinc, en les séquestrant afin d'éviter leur circulation à l'état libre dans les tissus et leur fixation sur d'autres protéines vitales. La fixation covalente des métaux divalents avec les groupements thiols des MT est dynamique puisque les métaux prisonniers peuvent être libérés à tout moment pour l'approvisionnement de processus métaboliques divers. Par exemple chez les mammifères, les MT comportant du zinc sont capables d'activer plusieurs enzymes dépendantes du zinc dont l'anhydrase carbonique, l'aldolase et la phosphatase alcaline (Winge et Miklossy, 1982).

Les MT interviennent également dans la détoxification des métaux lourds, des agents alkylants et des espèces radicalaires (Andrews, 2000). Lors d'une étude sur des lignées cellulaires de souris transgéniques, les cellules contenant le plus de MT sont mieux protégées contre la toxicité du cadmium et les effets du stress oxydant. Au contraire, une sous-expression de MT a pour effet une sensibilité élevée au cadmium et aux radicaux libres tels que l'ion superoxyde, l'hydroxyle, et l'oxyde nitrique (Romero-Isart et Vasak, 2002).

5.4. Isoformes

Les moules possèdent des isoformes monomériques (MT-10) et dimériques (MT-20) (Lemoine et Laulier, 2003). L'étude de 2 isogènes MT-10 et MT-20 chez *Mytilus galloprovincialis* a montré que le gène MT-10 joue un rôle dans l'homéostasie des cations métalliques et que le gène MT-20 intervient dans la défense contre la toxicité des métaux. Le niveau basique des MT-10 est plus élevé que celui des MT-20 dont l'induction est dépendante de la présence de métaux. Le haut niveau d'expression des MT-10 pourrait être dû à la présence intracellulaire en zinc et cuivre qui sont contenus dans les cellules des glandes digestives à des taux physiologiques relativement élevés (Dondero et al., 2005).



5.5. Régulation de l'expression

Les gènes fonctionnels des MT contiennent trois exons séparés par deux introns situés au niveau des codons 10 et 32 (Figure 7). Les séquences de régulation sont situées en amont des séquences transcrites (Amiard et Cosson, 1997).

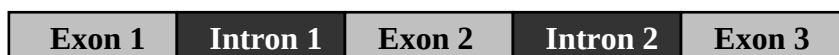


Figure 7 : Structure tripartite des gènes de métallothionéine.

Les séquences capables de réguler l'activité transcriptionnelle des gènes de MT sous l'effet d'ions métalliques sont appelées MRE (Metal Responsive Element : TGCRNC) (Culotta et Hamer, 1989; Varshney et al., 1986). Les séquences régulatrices des gènes de MT contiennent une région de type TATA box (TATAAAA) et une région de type GC box (GGGGCGGGG) (Figure 8).

Il existe également une région répondant à la stimulation par des hormones stéroïdes appelée GRE (Glucocorticoid Responsive Element) et une région répondant aux radicaux libres et autres agents oxydants appelée ARE (Antioxidant Responsive Element : TGACNNNGC) (Jaiswal, 1994; Rushmore et al., 1991). Ces motifs permettent une augmentation du taux de transcription des gènes de métallothionéines en cas de stimulation hormonale ou de stress oxydant.



Figure 8 : Organisation des séquences de régulation localisées en amont des gènes responsables de la synthèse des métallothionéines. GRE : Glucocorticoid Responsive Element, MRE : Metal Responsive Element, ARE : Antioxydant Responsive Element, GC : GC box, TATA : TATA box.

Les métaux induisent l'initiation de la transcription des gènes de MT par la fixation sur les motifs MRE d'un facteur de transcription appelé MTF-1 (Metal Transcription Factor 1). MTF-1 est une protéine ubiquiste à doigt de zinc qui est essentielle à l'expression basale et à l'expression induite par les métaux des gènes de MT (Radtke et al., 1995).

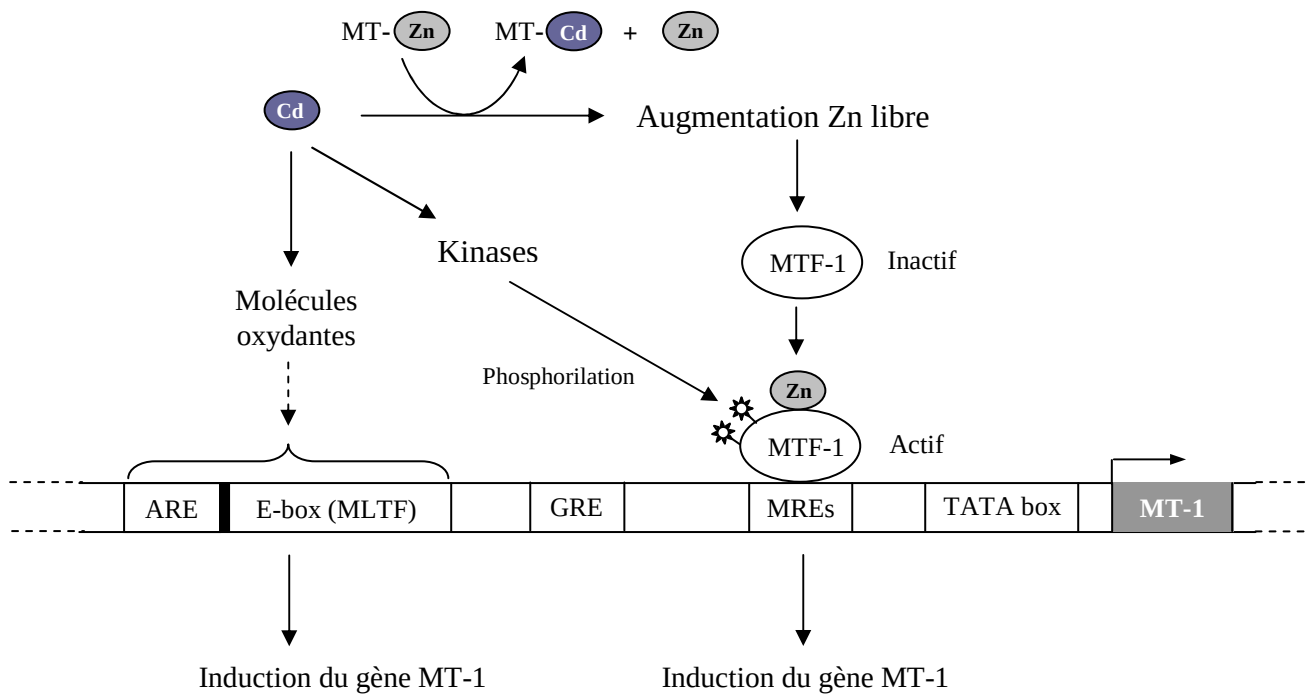


Figure 9 : Représentation schématique des modes d'induction du gène MT-1. ARE : Antioxidant response element, MLTF : Major late transcription factor, GRE : Glucocorticoïde response element, MRE : Metal response elements, MTF-1: Zinc-responsive transcription factor.



MTF-1 a une localisation cytoplasmique en conditions non stressantes pour la cellule et est transféré dans le noyau en cas de stress (Saydam et al., 2001; Smirnova et al., 2000). Une exposition aux métaux tels que le Cd induit une suite de phosphorylations de MTF-1 par l'intermédiaire de kinases. Il semblerait que la phosphorylation soit essentielle pour l'activité transcriptionnelle de MTF-1 (LaRoche et al., 2001) (Figure 9).

L'induction de la synthèse des MT a été obtenue dans des cultures cellulaires *in vivo*, par une grande variété de stress, par des antibiotiques, des vitamines, des agents inflammatoires, des cytokines (Haq et al., 2003), des promoteurs tumoraux, des oncogènes, des facteurs de croissance et des hormones stéroïdes (Sadhu et Gedamu, 1989). Cependant, l'amplitude de l'induction est généralement moindre que celle provoquée par l'action des métaux tels que le cadmium, le zinc, le cuivre, le mercure, l'or, l'argent, le cobalt et le nickel.

Un modèle d'induction a présenté le zinc comme le principal inducteur du niveau d'expression des gènes MT (Roesijadi, 1996). D'autres éléments possédant une forte affinité pour les MT tels que le cadmium, le cuivre, l'argent et le mercure, pourraient prendre la place de zinc sur la métallothionéine (Frayssé et al., 2006; Yang et al., 2000). Ce déplacement du zinc, devenant alors libre, permettrait d'initier une nouvelle fois l'expression des MT. Cette propriété démontre une des fonctions essentielles des MT : l'homéostasie du zinc (Berthet et al., 2005; Viarengo et al., 1985; Viarengo et Nott, 1993), qui pourrait alors être échangé avec d'autres ligands.

Seul 0,3 % du zinc total présent dans les cellules est lié aux MT.

Une étude de l'induction des ARNm de MT chez des larves du poisson zèbre *Danio rerio* exposées à des concentrations en métaux correspondant à leur CL₅₀ 24h a été réalisée. Il a été montré que le mercure induit fortement la synthèse des ARNm de MT avec un niveau d'induction de l'ordre de 40 à 50, le cadmium provoque une augmentation de l'induction de 20 fois. Le cuivre et le zinc ont de plus faibles effets avec un niveau d'induction de 5 fois (Chan et al., 2006).

Chez *Dreissena polymorpha* exposée à 5, 10 ou 20 µg/L de cuivre, aucune modification significative du taux de MT n'a été observée. Par contre, le taux de MT augmente rapidement après une exposition à 2 ou 20 µg/L de Cd. L'addition de 5 ou 10 µg/L de cuivre ne modifie pas significativement le taux de MT. Les niveaux de MT apparaissent donc comme plus



influencés par les concentrations d'exposition en cadmium que par celles de cuivre (Lecoeur et al., 2004).

Chez la Dreissène, l'exposition à 0,2 et 2 µg/L de cadmium pendant 5, 8, 12, 16, 18, 24, et 28 jours n'a aucun effet sur l'induction de la biosynthèse des MT. Par contre, elle est observée chez les organismes exposés à 20 µg/L de cadmium (Tessier et Blais, 1996).

6. Utilisation des gènes de détoxification en biomonitoring

6.1. Utilisation des gènes de détoxification en tant que biomarqueurs d'exposition potentiels

Un biomarqueur est un changement biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental qui peut être mesuré dans des tissus ou des fluides corporels ou au niveau de l'organisme entier en réponse à un/des polluant(s) ou à un/des stress naturel(s) (Livingstone, 1993).

Le rôle principal des biomarqueurs dans les études de biomonitoring est de fournir une réponse précoce à des effets délétères sur les systèmes biologiques et d'estimer les effets biologiques dus à des contaminants (Lam et Gray, 2003).

Les activités de la SOD et de la CAT ont montré une induction chez des bivalves exposés à 0,5 et 5 µg/L d'Aroclor 1254 pendant 18 jours (Cheung et al., 2004) et chez des moules provenant de sites pollués en HAP (entre 450 et 990 ng/g de poids sec) et PCB (entre 490 et 590 ng/g de poids sec) (Rocher et al., 2006). Il a également été observé une augmentation de l'activité de la SOD chez des invertébrés exposés pendant 14 jours à 0,5 et 2,5 µg Cu/L (Geret et al., 2002b) et pendant 7 jours à 25 µg Cu/L (Manduzio et al., 2003), ainsi qu'après 6 semaines d'exposition à une pollution urbaine (Nasci et al., 2002). Une augmentation de l'activité de la CAT a été démontrée en réponse à une exposition pendant 14 et 28 jours à des organochlorines (entre 30 et 40 ng/g de lipide) et des PCB (entre 160 et 440 ng/g de lipide) (De Luca-Abbott et al., 2005). Ces deux enzymes ont été proposées comme biomarqueurs d'exposition dans des programmes de surveillance environnementale (Jena et al., ; Jena et al., 2009; Richardson et al., 2008).



Chez différents invertébrés il a été observé une induction de l'activité de la GPx après 28 jours d'exposition à des sédiments contaminés en PCB (entre 0,01 et 0,74 mg/kg de sédiment) et en HAP (entre 0,01 et 66,77 mg/kg de sédiment) (Martín-Díaz et al., 2007; Martín-Díaz et al., 2008). Une augmentation de l'activité de la GST a été notée chez la truite *Oncorhynchus mykiss* 20 semaines après une injection intrapéritonéale de 100 mg PCB/kg (Förlin et al., 1996) ainsi que 48 heures après une injection de 50 mg PCB/kg (Machala et al., 1998). Une augmentation de l'activité de la GST a également été démontrée chez *Mytilus galloprovincialis* après une intoxication à 200 µg Cd/L pendant 7 jours (Hoarau et al., 2006), ainsi que chez le poisson *Sparus aurata* 2 jours après une injection intrapéritonéale de 500 mg Aroclor 1254/kg et de 0,2 mg CuCl₂/kg (Martínez-Lara et al., 1996). Ces résultats indiquent que la GPx et la GST peuvent être utilisés en temps que biomarqueurs lors d'études environnementales.

Le rôle des MT dans la protection de l'organisme par la séquestration des métaux est bien établi (Viarengo et al., 1987). La relation qui existe entre l'accumulation dans l'organisme de polluants métalliques et l'induction des MT, permet de les utiliser comme biomarqueurs d'exposition aux métaux lourds (Lionetto et al., 2001; Mourgaud et al., 2002; Petrovic et al., 2001; Viarengo et al., 1980). L'utilisation des MT en tant que biomarqueur de pollution métallique environnementale a été proposée chez divers organismes incluant vertébrés et invertébrés : chez la souris *Mus spretus* (Marques et al., 2008), le poisson *Scatophagus argus* (Nikpour et al., 2008), le crabe *Carcinus maenas* (Pedersen et al., 1997), la moule *Mytilus edulis* (Geffard et al., 2005) et la palourde *Ruditapes decussatus* (Hamza-Chaffai et al., 1999).

L'induction des MT est considérée comme une réponse précoce à l'exposition à des micropolluants aquatiques, et peut ainsi être utilisée comme des indicateurs d'exposition (Livingstone, 1993). Par exemple, l'induction de la MT a été observée au niveau des branchies de l'huître *Crassostrea virginica* après 4 jours d'exposition à 50 µg Cd/L (Roesijadi et Klerks, 1989). Il a été noté une augmentation de la quantité de MT chez l'amphipode *Echinogammarus echinosetosus* après 24 h d'exposition à 100 µg Cd/L (Martinez et al., 1996). Une augmentation de la quantité de MT a également été observée chez le phyllopode *Artemia* sp. et chez l'écrevisse *Procambarus clarkii* après 12 h d'exposition à 10 mg Cd/L (Del Ramo et al., 1995; Martínez et al., 1993).



6.2. Profils d'expression tissulaire de ces gènes

Certaines études ont montré que l'induction des biomarqueurs chez des bivalves témoins ou exposés à des contaminants pouvait avoir une spécificité tissulaire d'expression.

Lors d'une étude réalisée pendant une période de 1 an chez la moule *Perna viridis*, il a été démontré que les activités de la CAT et des GST sont plus élevées dans la glande digestive par rapport aux branchies tout au long de l'année. Par contre, les activités de la SOD et de la GPx sont identiques au niveau des deux tissus (Verlecar et al., 2007). Il a également été observé des activités identiques de la GPx dans la glande digestive et les branchies de *Perna perna* témoins. Les activités de la SOD et des GST sont supérieures dans les banchies, au contraire l'activité de la CAT se révèle plus élevées dans les glandes digestives (Almeida et al., 2005).

Une spécificité de tissu a également été décrite pour la GST-pi chez *Mytilus galloprovincialis*. Le niveau de transcrit le plus élevé a été trouvé dans les glandes digestives, puis dans les branchies, et aucun transcrit n'a été détecté dans le pied. Après une exposition pendant 7 jours à 200 µg Cd/L et à 100 µg B(a)P /L, le niveau d'expression de la GST-pi est plus élevé dans les branchies que dans la glande digestive (Hoarau et al., 2006). Les auteurs ont émis l'hypothèse que les branchies reflètent une exposition à court terme puisqu'ils sont en contact direct avec l'environnement. Au contraire, la glande digestive correspond au principal site d'absorption des xénobiotiques et de localisation d'enzymes de biotransformation (Livingstone et al., 1992).

Il a été observé un niveau de MT significativement plus élevé dans les branchies de la palourde *Ruditapes decussatus* et de la coque *Cerastoderma glaucum* par rapport au manteau, au muscle adducteur et au pied (Ladhar-Chaabouni et al., 2009). Il a également été noté une quantité de MT plus importante au niveau des branchies de *Mytilus edulis* par rapport à la glande digestive et au manteau (Lemoine et al., 2000). Les branchies, étant exposées au milieu extérieur, sont affectées par les variations environnementales telles que la température, la salinité et l'exposition à des contaminants. Cet organe absorbe les métaux et correspond également à un important réservoir pour le stockage des métaux (Smaoui-Damak et al., 2004).

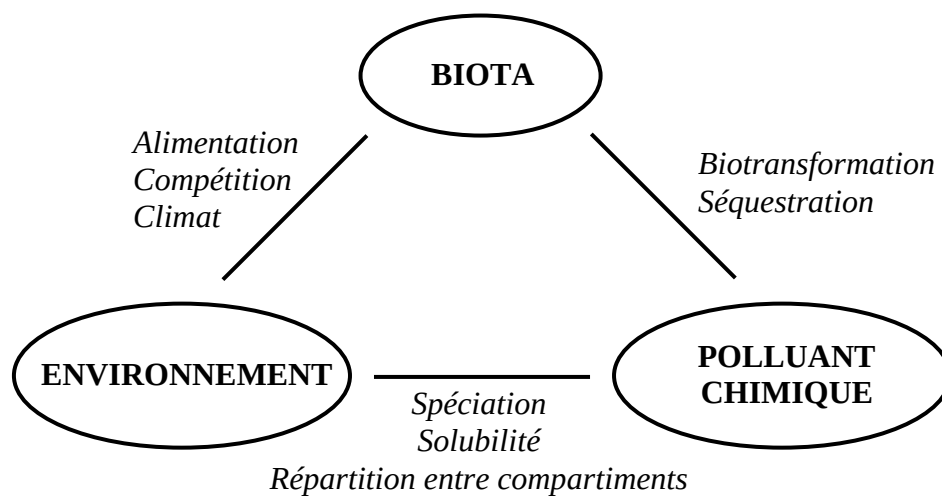


Figure 10 : Le triangle écotoxicologique.



6.3. Effets de la saison sur les xénobiotiques et les défenses antioxydantes

6.3.1. Effets de la saison sur les polluants environnementaux

Le triangle ecotoxicologique (Figure 10) résume les interactions entre les niveaux et le type de polluants chimiques, les organismes vivant au sein de l'environnement et l'environnement lui-même (Sheehan et al., 1995).

Les niveaux de polluants spécifiques trouvés dans l'environnement et les tissus d'espèces bioindicatrices pourraient varier de façon saisonnière. Certains organismes aquatiques sont saisonniers au niveau de leur physiologie, de leurs activités de détoxification ainsi qu'au niveau de la quantité de xénobiotiques détectés dans les tissus (Hellou et al., 1997). Certaines études portant sur les variations saisonnières du niveau de polluants environnementaux sont résumées dans le tableau 1.

Polluant	Concentration	Facteur incriminé	Référence
HAP	Augmentation des dépôts en juillet dans la baie de Chesapeake (USA)	Niveaux atmosphériques	(Dickhut et Gustafson, 1995)
HAP et pesticides dissous	Diminution en septembre et janvier par rapport à avril et juin dans la colonne d'eau de l'estuaire Humber (UK)	Ruissellement agricole	(Zhou et al., 1996)
PCB	Diminution en automne par rapport au printemps dans les tissus de <i>Mytilus edulis</i>	Variation saisonnière de la matrice lipidique	(Hühnerfuss et al., 1995)
TBT, DBT	Diminution du TBT d'avril à octobre et du DBT d'octobre à avril dans les tissus de <i>Mytilus edulis</i>	Variation de débit d'eau et dépôt de sédiments	(Page, 1995)
Métaux	Augmentation de juin à septembre dans les tissus de <i>Sunetta scripta</i>	Ruissellement et salinité, variations au cours de la mousson	(Pillai et Valsala, 1995)
Cd, Pb, Cu, Zn	Augmentation du Cd et du Pb en hiver, et du Cu et du Zn en été dans les tissus d' <i>Arctica islandica</i>	Frai, variation du poids des organismes	(Swaileh, 1996)

Tableau 1 : Exemples de variations saisonnières de concentrations de polluants dans l'environnement et dans les tissus de bivalves

Organismes	Tissus	Paramètres	Variations		Interprétation	Références
			Activité max	Activité mini		
<i>Perna perna</i>	GD	SOD, CAT, GST	Mai, décembre		↑ T° et ↑ activité de reproduction donc ↑ consommation en O2 : génération de ROS	Wilhelm Filho et al., 2001
				Mars, septembre		
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	BR	SOD, CAT, GPx	Février, novembre	Mai, août	Dans BR : T° de l'eau baisse en février et novembre donc ↑ respiration et ↑ ROS	Santovito et al., 2005
	GD	CAT, GPx	Février, novembre	Mai, août	Dans GD : activités enzymes varient avec le statut physiologique (reproduction et disponibilité nourriture)	
		SOD	Février, novembre, mai	Août	Quand ↑ de la demande en oxygène, ↑ activités de SOD, CAT, GPx	
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	BR et manteau	SOD	Printemps	Eté, automne et hiver	Activités de SOD et CAT plus élevées dans BR que dans manteau	Vlahogianni et al, 2007
		CAT	Hiver et printemps	Eté et automne		
<i>Perna viridis</i>	BR	SOD, CAT, GST	Janvier, avril, novembre		Taille des moules : facteur mineur	Lau et al., 2004
				Juillet	Faible salinité	
<i>Mytilus edulis</i>	GD	MT	Printemps (max en Mai)		Eté: compétition des ressources alimentaires, production de phytoplancton faible: perte de poids	Geffard et al., 2005
	BR		Pas de variations			
<i>Corbicula fluminea</i>	Tissus mous	MT	Mars, avril, mai		T° la plus basse, période de maturation des gonades (printemps), sécrétion d'hormones	Baudrimont et al., 1997
				Juillet, août, septembre	T° la plus élevée, période d'incubation des œufs	
<i>Mytilus edulis</i>	GD	CAT	Mai, juin		L'activité de la catalase est 4 fois plus ↑ dans la GD que dans les BR	Power et Sheehan, 1996
				Déc, avril		
<i>Mytilus sp.</i>	GD	SOD, CAT	Eté		↑ peroxydation lipidique durant l'hiver	Viarengo et al, 1991
				Hiver (nov à mars)		
<i>Saccostrea cucullata</i>	GD	SOD, CAT, GPx	Mars à juin		↑ du stress oxydant en hiver : huitres plus sensibles Gamétogenèse commence en octobre / novembre, maturation en février / mars	Niyogi et al., 2001
				Novembre à février		

<i>Mytilus galloprovincialis</i> <i>Crassostrea</i> sp.	GD	SOD, CAT GPx	Juillet Pas de variation	Février	Orbea et al., 2002
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Tissus mous	SOD, GST CAT	Février Mai Février	Mai	Borkovic et al., 2005
<i>Mytilus edulis</i>	GD et BR	GPx GST SOD	Juin, novembre Novembre, décembre, janvier Pas de variation	Janvier, décembre Juin	Manduzio et al., 2004
<i>Mytilus galloprovincialis</i> <i>Crassostrea</i> sp.	GD	SOD, CAT GPx	Juillet Pas de variation	Février	Orbea et al., 2002
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Tissus mous	SOD, GST CAT	Février Mai Février	Mai	Borkovic et al., 2005
<i>Mytilus edulis</i>	GD et BR	GPx GST SOD	Juin, novembre Novembre, décembre, janvier Pas de variation	Janvier, décembre Juin	Manduzio et al., 2004

<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Tissus mous	SOD, GST CAT	Février Mai Février	Mai	Borkovic et al., 2005
<i>Mytilus edulis</i>	GD et BR	GPx GST SOD	Juin, novembre Novembre, décembre, janvier Pas de variation	Janvier, décembre Juin	Manduzio et al., 2004

Tableau 2 : Modification d'activités des enzymes antioxydantes en fonction de la saison chez des bivalves : augmentation (↑), diminution (↓). GD : glande digestive, BR : branchies, T° : température.



Les études menées sur les polluants suggèrent que les facteurs géographiques et climatiques pourraient avoir un effet sur les cycles naturels biologiques et pourraient modifier considérablement le niveau des polluants chimiques tels que les PCB, les HAP et les métaux (Sheehan et Power, 1999).

6.3.2. Effets de la saison sur les défenses antioxydantes

L'utilisation de ces gènes de détoxification en tant que biomarqueurs lors d'étude de biomonitoring doit être réalisée avec précautions. En effet, différentes études ont montré que des facteurs physiologiques et naturels tel que le cycle saisonnier peuvent causer des variations de l'expression ou de l'activité des biomarqueurs. Certaines études relevées dans la littérature concernant les variations saisonnières de biomarqueurs chez les bivalves sont répertoriées dans le tableau 2. Ces études ont notamment permis de mettre en évidence des variations de l'activité de la SOD, de la CAT, de la GPx et des GST chez *Perna viridis* en fonction de la saison (février, mai, août et novembre). Les activités les plus élevées de la SOD et de la CAT ont été notées en mai et en novembre au niveau de la glande digestive et des branchies. L'activité la plus forte de la GPx a été observée en novembre dans la glande digestive alors que les activités les plus élevées des GST sont notées en février dans les branchies et en août et novembre dans la glande digestive (Verlecar et al., 2008). Chez *Mytilus edulis*, les activités les plus élevées de la CAT et des GST sont observées en mai et pourraient être corrélées avec une augmentation de la formation des ROS. En effet, cette période correspond à une forte activité métabolique : abondance alimentaire, croissance, période de reproduction (Leinio et Lehtonen, 2005). Il a également été démontré que les activités de la SOD, des GST et de la MT ne varient pas en fonction de la saison chez *Nacella (Patinigera) magellanica* (Malanga et al., 2007) et *Mytilus galloprovincialis* (Bocchetti et Regoli, 2006).

Des variations de la concentration en MT ont été observées dans les glandes digestives de *Mytilus edulis* transplantés au niveau d'un site pollué par du cadmium, du cuivre et du zinc. Les concentrations les plus élevées en MT ont été mesurées au printemps (Geffard et al., 2005). Des résultats similaires ont été observés chez *Crassostrea gigas* où des fluctuations saisonnières de la concentration en MT ont été remarquées après une étude menée durant 7 mois sur un site témoin et un site pollué par du cadmium, du cuivre et du zinc (Geffard et al., 2002). Chez *Macoma balthica*, les concentrations en MT varient significativement en fonction



de la saison, avec de plus fortes concentrations en hiver et de plus faibles en été (Bordin et al., 1997).

Les défenses antioxydantes peuvent subir des variations saisonnières liées à des facteurs naturels tels que les modifications climatiques et biologiques. Il paraît donc important de prendre en compte ces variations dans l'interprétation des données de biomonitoring dans le but de discriminer l'effet d'un polluant des variations saisonnières sur la réponse des défenses antioxydantes.

7. Toxicité du cuivre et du cadmium

7.1. Le cuivre

Le cuivre est un oligo-élément essentiel qui fait l'objet d'une homéostasie rigoureusement contrôlée. En revanche, en concentration excessive il peut se révéler toxique.

Du point de vue du transfert dans les réseaux trophiques des écosystèmes, il a été généralement constaté que s'il existe une bioaccumulation non négligeable de ce métal chez les organismes aquatiques (Mouneyrac et al., 2002), il n'existe vraisemblablement pas de biomagnification dans les chaînes alimentaires (Amiard et al., 1980). Les manifestations de la toxicité du cuivre diffèrent également en fonction des espèces et des phyla.

7.2. Le cadmium

Le cadmium est un sous-produit de l'industrie du zinc. Il est extrait lors de la fusion et de la purification des concentrés de zinc. Il est communément utilisé dans les alliages, en galvanisation, dans les pigments, comme stabilisateur pour les plastiques à base de PVC, dans les batteries et pour protéger le fer et l'acier de la corrosion. Bien que l'usage du Cd diminue au niveau mondial, il reste présent dans de nombreux aliments (champignons, blé) et dans certains fongicides (chlorure de cadmium).

Il ne possède aucun rôle biologique connu et s'avère être un toxique capable d'affecter un large spectre de composants cellulaires cibles (petits polypeptides essentiels tels que le glutathion, diverses métalloenzymes, ATPases, membranes lysosomales...). Il est susceptible d'interférer avec le métabolisme du calcium du fait de la similarité de leurs propriétés physico-chimiques (Verbost et al., 1988). Le cadmium est également un mutagène et un cancérigène (Hoffman et Niyogi, 1977).

Métaux	Concentrations	Temps	Organismes	Tissus	Réponses	Références
Cd	0,5 mg/L (CL50)	1, 7, 15, 30 j	<i>Perna viridis</i>	GD, BR, manteau	↑ SOD, CAT et GST SOD plus ↑ dans manteau, CAT et GST plus ↑ dans GD	Prakash et Rao, 1995
Cd	200 µg/L	7 j	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	GD	↑ MT (x10 par rapport au témoin), pas de variation de SOD, CAT, GSH	Viarengo et al., 1999
Cd	10 mg/L	12, 24, 48 h	<i>Artemia et Procambarus clarkii</i>	Tous les tissus	↑ MT entre 12 et 24 h puis stabilisation	Del Ramo et al., 1995
	0,5, 10, 20 mg/L	Après 48 h			↑ MT	
Cd	200 µg/L	6 j	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Cellules	↑ MT-10 (24x), ↑ MT-20 (2200x)	Dondero et al., 2005
Cu	45 µg/L				↑ MT-10 (7x), ↑ MT-20 (2x)	
Cd	200 µg/L	4 et 21 j	<i>Mytilus edulis</i>	BR, hépatopancréas	↑ MT	Lemoine et al., 2000
Cu	40 µg/L			BR, GD, manteau	Pas de variation de MT	
Cd	200 µg/L	6 à 72 h	<i>Mytilus edulis</i>	BR	↑ MT-10 à 12 h, ↑ MT-20 à 6 h	Lemoine et Laulier, 2003
Cu	40 µg/L				Pas de variation de MT	
Cd	0,3 et 3 µM	24 h	Rat	Cellules hépatiques	↑ MT et peroxydation lipidique ↓ SOD, CAT, GPx, GSH	Del Carmen et al., 2002
Cd	4, 40, 100 g/L	28 j	<i>Ruditapes decussatus</i>	BR	↑ SOD cytosolic ↓ SOD mitochondrial, CAT, Se-GPx, GPx	Geret et al., 2002
Cd	0,9 µM	24 h	<i>Bathymodiolus azoricus</i>	BR	Inhibition SOD, CAT et GPx totaux. Pas de variation de Se-GPx	Company et al., 2004
Cu	0,4 µM				Inhibition SOD et CAT	
Cu	0,05 µM	12, 24, 48, 72 h	<i>Pinctada fucada</i>	GD et BR	↑ SOD, ↓ GPx	Jing et al., 2006
	0,5 µM				↓ SOD, ↓ GPx	
Cu	50, 100, 200 µg/L	7 et 15 j	<i>Tubifex tubifex</i>	Tissus totaux	↑ MT, pic à 100 µg/L. Exposition plus longue et concentration en Cu plus importante : ↑ MT moins importante	Mosleh et al., 2006
					↑ CAT en fonction du temps d'exposition et de la concentration ↓ GST après 7 j d'exposition et pas de variation après 15 j	
Cu	0,025 et 0,05 mg/L	3, 6, 9, 15 j	<i>Charybdis japonica</i>	BR, hépatopancréas	↑ MT après 3 j d'exposition puis stabilisation au bout de 9 et 15 j	Pan et Zhang, 2006
					↑ SOD et CAT au bout de 0,5 j, puis ↓ ↑ GPx après 0,5 j d'exposition, pic aux jours 1 et 3, puis ↓	

Tableau 3 : Modification de l’activité des enzymes antioxydantes chez des organismes exposés au cadmium (Cd) ou au cuivre (Cu) : augmentation (↑), diminution (↓) par rapport aux témoins. GD : glande digestive, BR : branchies, h : heure, j : jour.



Ce métal ne semble pas être régulé chez les êtres vivants (Herwig et al., 1989), à l'exception de certains microorganismes possédant un opéron spécifique contrôlé par le cadmium. Le cadmium est doté d'une longue demi-vie biologique (entre 20 et 40 ans) (Ringwood, 1993).

7.3. Réponses des organismes aquatiques à une intoxication au cuivre et au cadmium

Certaines études relevées dans la littérature concernant le stress oxydant des bivalves exposés au cuivre et au cadmium sont répertoriées dans le tableau 3, avec le rappel des conditions d'exposition, des espèces et des tissus étudiés, des paramètres contrôlés et des réponses obtenues.

Le cuivre est un élément trace essentiel, mais il est également un des métaux lourds les plus toxiques qui catalyse la formation des ROS via la réaction d'Haber-Weiss (Kayali et Tarhan, 2003; Livingstone et al., 1990; Stohs et Bagchi, 1995). Les mécanismes conduisant à un stress oxydatif par l'intermédiaire du cadmium sont quant à eux peu connus.

Lors d'une étude réalisée sur le crustacé *Daphnia magna*, il a été noté une augmentation des activités de la CAT, de la GPx et de la GST avec 20 µg Cu/L alors qu'aucun effet n'a été observé sur l'activité de la SOD. Les résultats montrent également une augmentation des activités de la SOD, de la GPx et de la GST, et une diminution de l'activité de la CAT après exposition à 5 µg Cd/L (Barata et al., 2005).

Aucune modification de l'activité de la SOD n'a été notée chez la palourde *Tapes philippinarum* intoxiquée avec 150 à 450 µg Cd/L. Par contre il a été observé une diminution significative de l'activité de la SOD après exposition à 60 et 110 µg Cu/L (Matozzo et al., 2001). La diminution de l'activité de la SOD chez les organismes soumis à une exposition au cuivre peut être due à l'oxydation des groupes –SH de l'enzyme par les ROS (Halliwell et Gutteridge, 1984).

Après une exposition à 150 µg Cd/L, il a été noté une augmentation de l'activité de la CAT et une diminution de l'activité de la GST chez le gastéropode *Hexaplex trunculus*. De plus, il a été observé une augmentation des activités des GST avec 100 et 200 µg Cu/L et de la CAT à partir de 50 µg Cu/L (Roméo et al., 2006). Une augmentation de l'activité des GST a



également était observée après intoxication à 1,3 mg Cd/L chez le gastéropode *Nucella lapillus*, et une diminution a été rapportée après exposition à 0.044 mg Cu/L (Cunha et al., 2007). Différentes hypothèses ont été émises pour expliquer la diminution de l'activité des GST : soit par l'action directe du métal sur l'enzyme ; soit indirectement par la production de ROS qui interagissent avec l'enzyme ou par la déplétion du substrat des GST : le glutathion (GSH).

L'accumulation des métaux dans les cellules peut causer la diminution de la disponibilité des GSH par leur liaison avec les métaux et par oxydation (Canesi et al., 1999). Il a été proposé que les GSH sont capables de chélater les métaux rapidement après leur entrée dans la cellule, avant qu'ils ne soient complexés aux MT (Freedman et al., 1989).

L'augmentation de la synthèse de MT est associée avec la capacité des MT à lier les métaux et à protéger les cellules contre la toxicité des métaux (Roesijadi, 1994). Une induction des MT après exposition au cadmium et une absence d'effet après exposition au cuivre ont été observées chez le bivalve *Pyganodon grandis* (Wang et al., 1999), la palourde *Ruditapes decussatus* (Hamza-Chaffai et al., 2000) et le homard *Nephrops norvegicus* (Canli et al., 1997). Il a également été établi que les MT étaient induites chez le crabe *Cancer pagurus* après exposition au cadmium (Overnell et Trehwella, 1979). Une exposition à 3 µg Cd/L provoque une augmentation de la concentration en MT chez le crabe *Carcinus maenas*, alors qu'une exposition à 15 µg Cu/L n'augmente que très faiblement la concentration en MT (Martín-Díaz et al., 2005). Le cuivre a déjà été noté comme un mauvais inducteur de la quantité de MT chez cet organisme lors d'une précédente étude (Pedersen et al., 1998). Après intoxication de *Carcinus maenas* au mélange Cu + Cd, la quantité de MT mesurée s'avère plus faible que celle mesurée lors d'une intoxication avec les métaux séparés. Ce résultat pourrait être dû à un effet antagoniste engendré par la présence du cuivre (Martín-Díaz et al., 2005).

Par contre, une induction significative des MT a été observée après 7 jours d'exposition à 80 µg Cu/L chez l'huître *Crassostrea virginica* (Ringwood et al., 1998).

Il est possible que le cuivre induise plus de MT que la quantité mesurée. En effet, une grande quantité de MT induite par le cuivre est présente au niveau des fractions insolubles du foie chez le chien (Lerch et al., 1985) et des glandes digestives de la moule *Mytilus galloprovincialis* (Viarengo et al., 1989). De plus, lors d'une étude terrain réalisée sur *Carcinus maenas* exposé à du cuivre, il a été observé qu'avec une augmentation de la contamination en cuivre, le pourcentage de cuivre soluble diminuait, ce qui indique que le

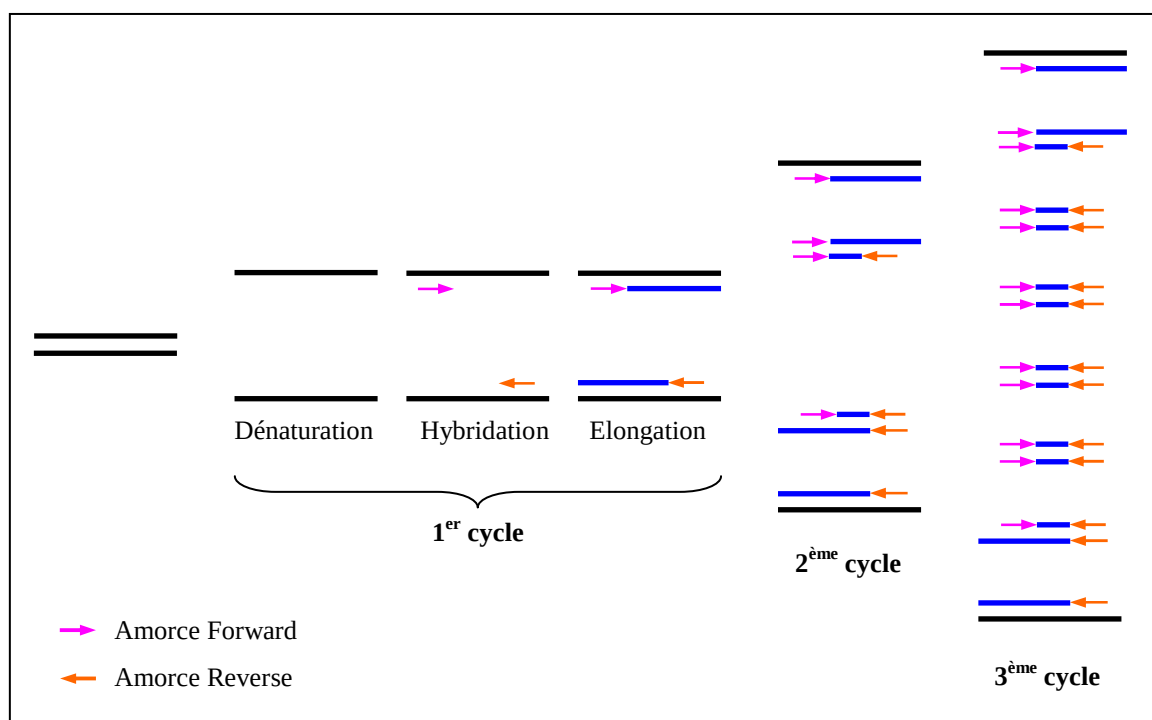


Figure 11 : Etapes de la PCR



cuivre est piégé sous forme de granules insolubles au niveau de la glande digestive et des branchies (Pedersen et al., 1997).

8. Identification de séquences codantes

La mesure de l'expression des ARNm nécessite l'identification de la séquence codante du gène à étudier. Des amorces spécifiques pourront ainsi être choisies pour réaliser les PCR.

La PCR est une technique de biologie moléculaire mise au point en 1983 par Kary Mullis (Saiki et al., 1985), permettant d'amplifier spécifiquement une région d'ADN de plusieurs centaines ou milliers de paires de bases.

La RT-PCR, application de la PCR aux ARN, est une méthode qui permet d'étudier le niveau d'expression d'un gène. La manipulation et l'étude des ARN étant difficile à cause de leur grande sensibilité aux ribonucléases qui les détruisent, la transcription-inverse va permettre de copier la séquence en ADNc plus stable. Une matrice d'ADN est nécessaire puisque la Taq polymérase (ADN polymérase thermostable) amplifie uniquement l'ADN.

8.1. Principe de la PCR

Chaque cycle de PCR est constitué de 3 étapes (Figure 11) :

- la dénaturation : les deux brins complémentaires d'ADN sont maintenus appariés par des liaisons hydrogènes établies entre les bases. L'étape de dénaturation correspond à la rupture de ces liaisons à haute température (94°C). Les deux brins d'ADN sont alors séparés ;
- l'hybridation des amorces complémentaires des deux extrémités de la région à amplifier : en se plaçant en condition de renaturation de l'ADN par une diminution progressive de la température, les amorces viennent s'hybrider sur leurs séquences complémentaires ;
- l'élongation à 72°C, qui permet de synthétiser un brin complémentaire à partir des amorces hybridées grâce à l'activité de la Taq polymérase et l'incorporation des quatre dNTP.

8.2. Paramètres de la PCR

La spécificité de la PCR est définie par la stabilité du complexe d'hybridation entre l'amorce et la séquence d'ADN cible. Cette stabilité est fonction de différents paramètres :

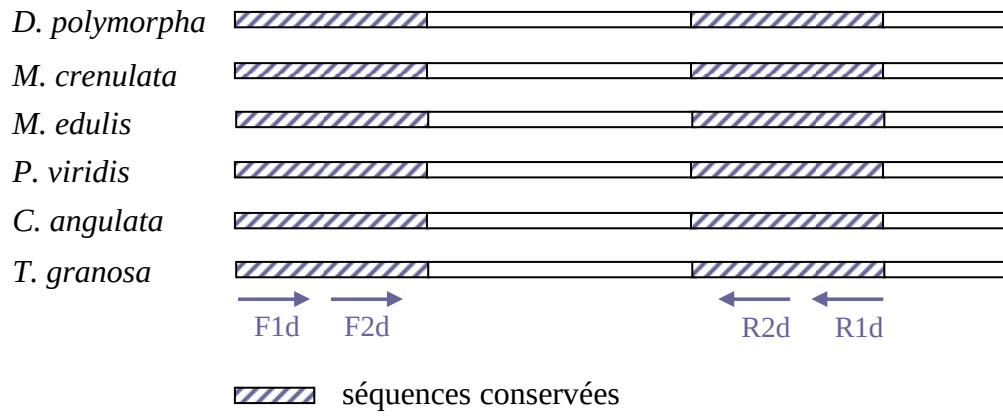


Figure 12 : Choix des amorces dégénérées par alignement de séquences



- la séquence des amorces : la formation de structures secondaires (repliement de l'amorce sur elle-même) et l'appariement des amorces entre elles doivent être évités ;
- la longueur des amorces : elle est généralement comprise entre 18 et 30 nucléotides ;
- la température d'hybridation : elle dépend de la longueur et de la séquence des amorces. Cette température est fonction du T_m (melting temperature) de l'amorce c'est-à-dire de la température à laquelle la moitié des amorces sont hybridées. Une valeur approximative du T_m peut être obtenue par une formule simplifiée tenant compte de la composition en bases:

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 4(\text{G}+\text{C}) + 2(\text{A}+\text{T})$$

- la concentration des réactifs : celle du magnésium apporté sous forme de MgCl_2 . L'ion Mg^{2+} est un cofacteur essentiel de la Taq polymérase. Ce cation bivalent interagit également avec les charges négatives de la chaîne d'ADN, limitant ainsi les forces de répulsion entre les amorces et la matrice ADN et favorisant la stabilité de l'hybridation. Plus sa concentration est importante, plus l'hybridation est facilitée qu'elle soit spécifique ou non. Une trop forte concentration peut alors conduire à une augmentation des signaux aspécifiques. La solution tampon Tris HCl et KCl maintient un pH et une concentration saline optimale pour le fonctionnement de l'enzyme. De plus, l'ion K^+ est capable d'interagir avec les charges négatives de l'ADN de la même manière que Mg^{2+} (Larzul, 1993).

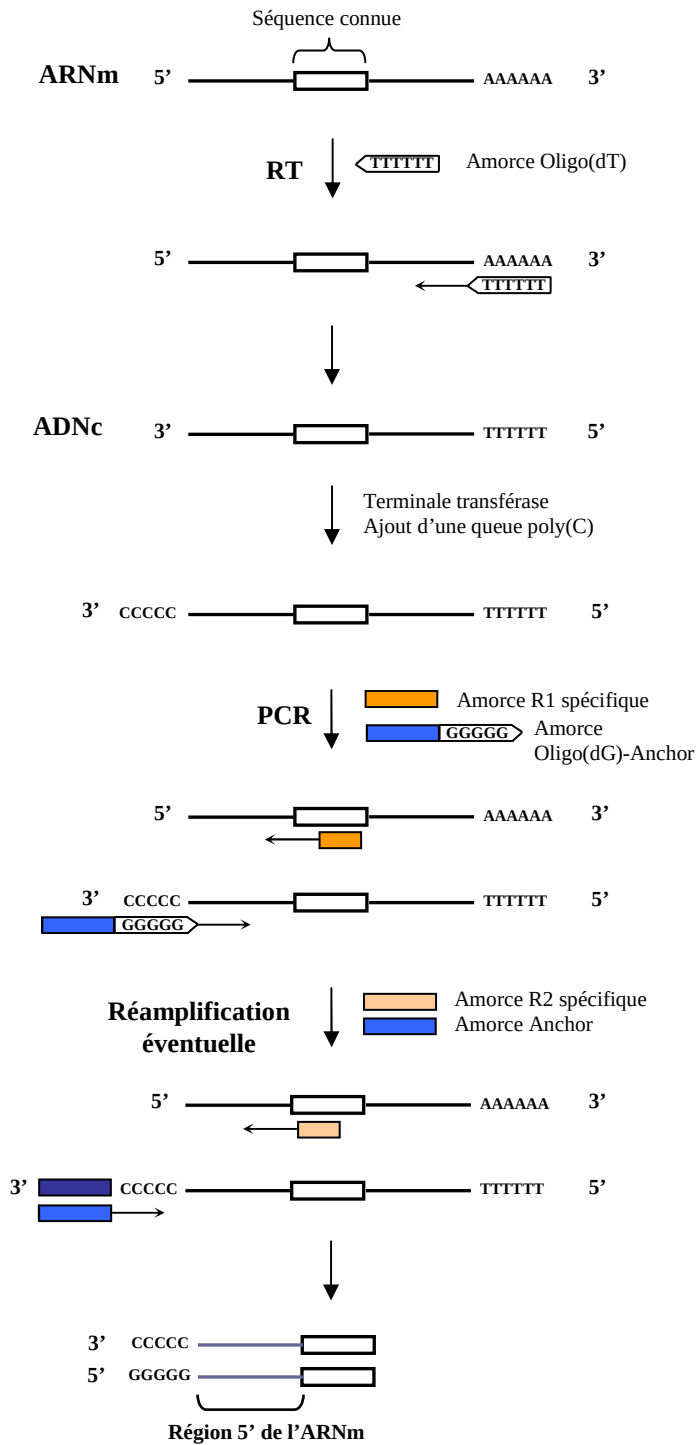
8.3. Choix et utilisation d'amorces dégénérées

Afin d'identifier les séquences de MT, CAT et SOD chez des bivalves d'eau douce, des PCR avec amorces dégénérées ont été réalisées.

La recherche de nouvelles séquences codantes passe tout d'abord par la comparaison de séquences nucléotidiques de MT, CAT et SOD de mollusques présentes dans GenBank, afin d'identifier les régions les mieux conservées chez ces organismes (Figure 12).

Les amorces dégénérées utilisées pour réaliser les RT-PCR sont choisies dans ces régions conservées. Les amorces dégénérées sont un mélange d'amorces correspondant à toutes les séquences possibles. Ce sont des amorces dont une ou plusieurs positions doivent inclure un mélange de nucléotides en accord avec le code IUB.

5' RACE-PCR



3' RACE-PCR

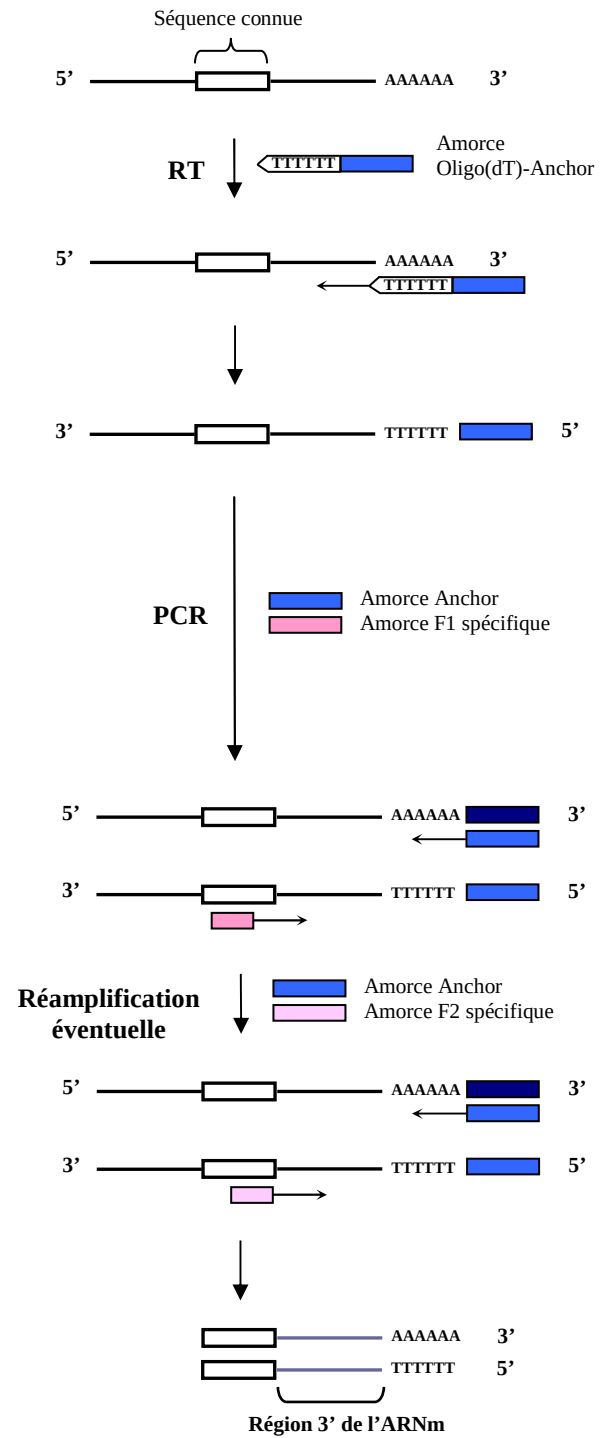


Figure 13 : Etapes de la RACE-PCR.



L'utilisation d'amorces dégénérées ne permet pas de déterminer une température d'hybridation précise puisque ces amorces sont composées d'amorces différentes avec différents T_m . Une concentration en $MgCl_2$ optimale, permettant de minimiser les hybridations non spécifiques amorce/ADN cible et amorce/amorce, doit être établie.

Seule une faible proportion des amorces dégénérées correspond à la séquence recherchée, l'efficacité de l'amplification est donc diminuée. Une possibilité pour accroître l'efficacité de la PCR est d'augmenter la concentration d'amorce, avec l'inconvénient de favoriser en parallèle la formation de produits non spécifiques. Diverses conditions d'amplification doivent donc être testées.

8.4. Identification d'une séquence codante complète par RACE-PCR

Cette technique amplifie un ADNc issu d'un ARNm entre une localisation de séquence connue et l'extrémité inconnue 3' (3'-RACE) ou 5' (5'-RACE) (Figure 13) (Frohman et al., 1988).

Dans la technique 3'-RACE, la queue poly(A) d'un ARNm représente une séquence simple pour une amorce de PCR. L'ARNm est transformé en ADNc par la transcriptase inverse en utilisant une amorce oligo(dT) à laquelle est ajoutée une séquence connue notée « anchor ». L'ADNc est ensuite amplifié par PCR en utilisant une amorce anchor ainsi qu'une amorce spécifique Forward. Si la quantité d'amplimères obtenue est insuffisante, une seconde PCR est réalisée.

Dans la technique 5'-RACE, plusieurs techniques existent selon le kit utilisé. Dans tous les cas, une transcription inverse est réalisée avec une amorce oligo(dT). Notre méthode utilise la terminale transférase qui ajoute des désoxyribonucléotides (dNTP) au niveau de l'extrémité 3' d'une molécule d'ADN. Une queue poly(C) est ajoutée en 3' de l'ADNc purifié. Une amorce oligo(dG)-Anchor va se fixer au niveau de l'extrémité 5' de la queue poly(C) de l'ADNc. L'ADNc est ensuite amplifié par PCR en utilisant une amorce oligo(dG)-Anchor ainsi qu'une amorce spécifique Reverse.



9. PCR en temps réel

9.1. Principe

La PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un composé fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplimères générés pendant la réaction de PCR. Russel Higuchi fut l'un des premiers à faire l'analyse des cinétiques de la PCR en élaborant un système qui détectait le produit de la PCR au fur et à mesure qu'il s'accumulait. Ce système en « temps réel » utilisait le bromure d'éthidium comme agent intercalant dans chacune des réactions d'amplification et un thermocycleur modifié pour stimuler l'émission des échantillons par rayonnements UV. L'émission de la fluorescence était détectée à l'aide d'une caméra CCD (charge-coupled device). Une augmentation de l'émission de la fluorescence était observée lorsque le bromure d'éthidium se fixait à l'ADN double brin produit au cours de l'amplification (Higuchi et al., 1992).

Au début de la réaction PCR, la concentration des réactifs choisie permet d'éviter que la renaturation des amplicons n'entre en compétition avec l'hybridation des amorces (primers). L'amplification est alors réalisée à un taux exponentiel à l'aide d'une ADN polymérase thermostable. Après la phase exponentielle, la réaction d'amplification entre dans une phase linéaire où le taux d'amplification devient extrêmement variable, même au niveau de replicats d'un même échantillon, à cause d'une compétition entre la renaturation des amplicons et l'hybridation des amorces. Suit ensuite une phase plateau où le taux d'amplification décroît à près de zéro, générant très peu d'amplicons.

Afin de recueillir des données quantitatives avec précision, chacun des échantillons doit être analysé dans sa phase exponentielle d'amplification qui est la phase la plus reproductible de la réaction de PCR. La PCR en temps réel fait donc le suivi de la fluorescence émise pendant la réaction avec un indicateur de la production des amplicons durant chaque cycle, à l'opposé de la PCR conventionnelle où les amplicons ne sont détectés qu'à la fin du processus.



9.2. Détection des amplicons grâce aux agents se liant à l'ADN double brin

Les molécules qui se lient à l'ADN double brin peuvent être divisées en deux classes: les agents intercalants comme le bromure d'éthidium (Higuchi et al., 1992), le YO-PRO-1 (Ishiguro et al., 1995), le SYBR Green I (Morrison et al., 1998) et les agents se fixant au sillon mineur (minor groove binders) comme le Hoeschst 33258 (Searle et Embrey, 1990). Leur fluorescence augmente lorsque qu'ils sont liés à l'ADN double brin. Pour être utilisés dans une réaction de PCR en temps réel, ces agents doivent augmenter leur fluorescence lorsqu'ils sont liés à l'ADN double brin et ne pas inhiber la réaction de PCR. Lors de la réaction d'amplification par PCR, le colorant libre en solution émet peu de fluorescence. Durant l'étape d'élongation, une augmentation de la fluorescence est associée à la quantité de colorant se fixant à l'ADN double brin naissant (Figure 14).

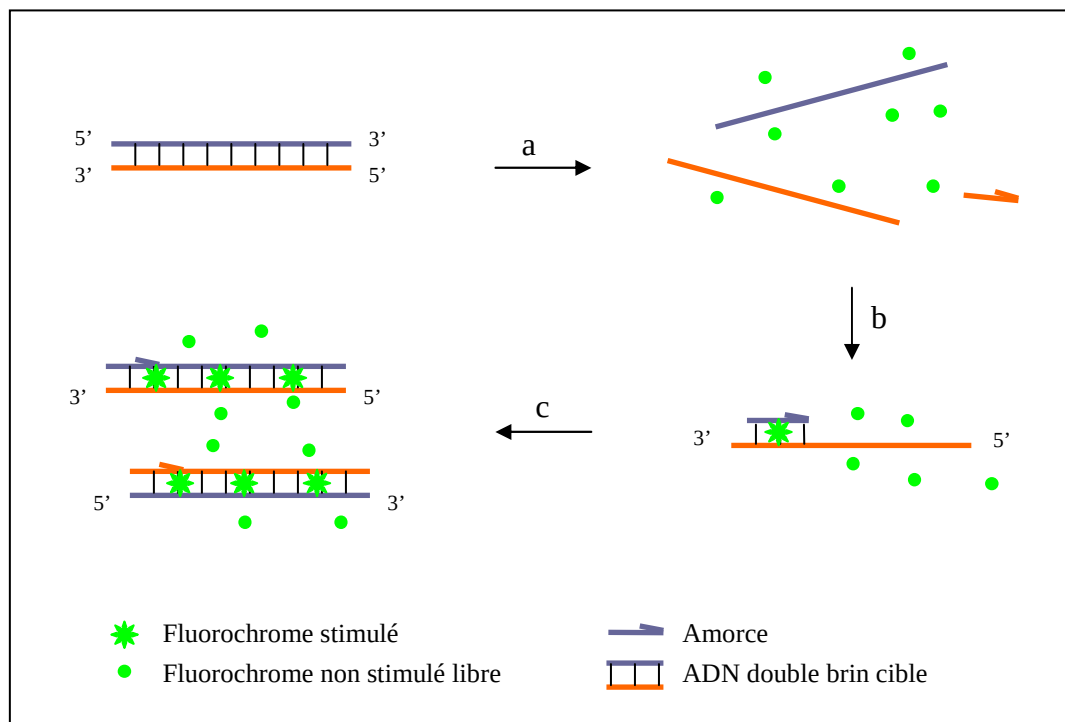


Figure 14 : Etapes de la PCR en temps réel. (a) Dénaturation : le SYBR Green I est libre, la fluorescence est faible. (b) Hybridation des amorces et production des amplimères, la fluorescence augmente (c) Elongation : le SYBR Green I se lie à l'ADN double brin produit, forte augmentation de la fluorescence.

L'augmentation du signal de fluorescence en temps réel est observée pendant l'étape de polymérisation et l'émission fluorescente décroît lorsque l'ADN est dénaturé à l'étape suivante. L'émission de fluorescence est donc mesurée à la fin de chaque étape d'élongation

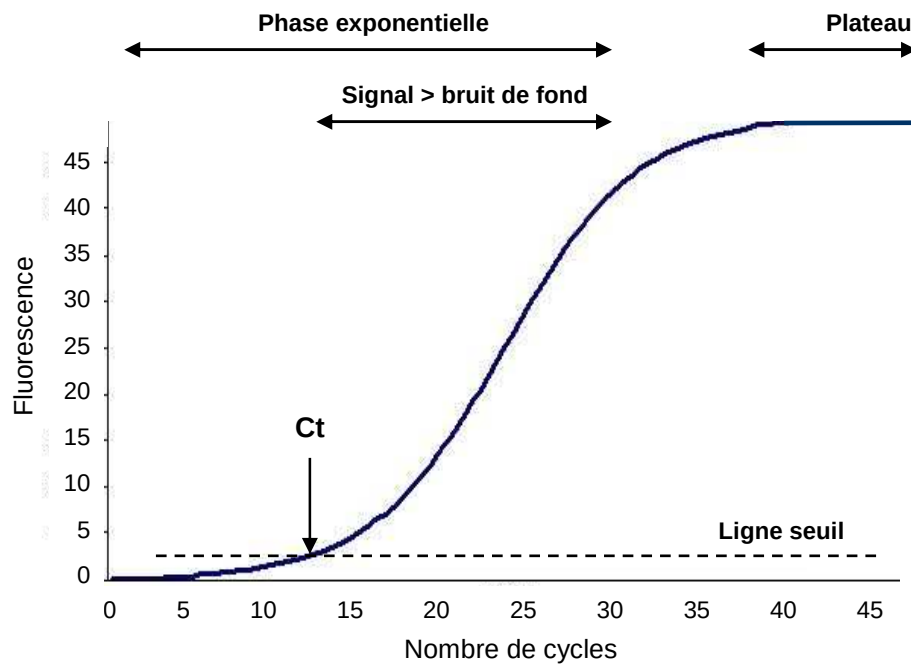


Figure 16 : Phases de la PCR en temps réel.



pour chacun des cycles par un système de lecture intégré à l'appareil de PCR en temps réel qui permet de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié durant la réaction (Bustin, 2000).

La technologie basée sur le SYBR Green I (Figure 15) ne nécessite aucune sonde fluorescente mais sa spécificité repose entièrement sur ses amorces (Bustin, 2000). Elle ne requiert donc aucune expertise particulière pour le choix des sondes fluorescentes et n'est pas affectée par des mutations dans l'ADN cible qui influenceraient l'hybridation des sondes spécifiques (Mackay et al., 2002).

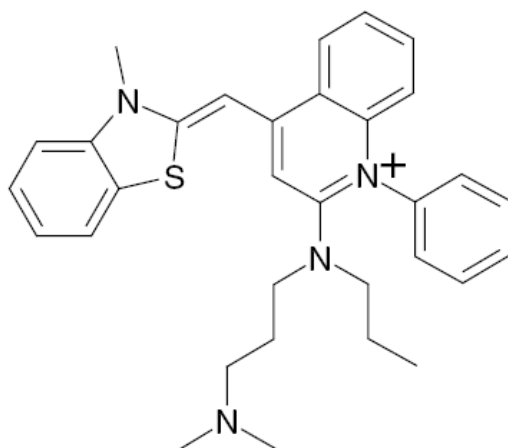


Figure 15 : Formule du colorant cyanine asymétrique : SYBR Green I.

9.3. Cycle seuil (threshold cycle)

Les valeurs de fluorescence sont enregistrées au cours de chaque cycle et représentent la quantité d'amplimères produits en un point précis dans la réaction. Plus il y a de matrices à amplifier au départ de la réaction PCR, moins le nombre de cycle requis sera élevé pour atteindre un point où le signal d'émission de fluorescence sera statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond (Gibson et al., 1992). Ce point est défini comme étant le cycle seuil (C_t) et apparaîtra toujours au début de la phase exponentielle d'amplification (Figure 16). Par conséquent, la quantification n'est pas affectée par l'épuisement d'un des réactifs comme lors de la phase plateau ce qui explique pourquoi le système en temps réel est si reproductible.

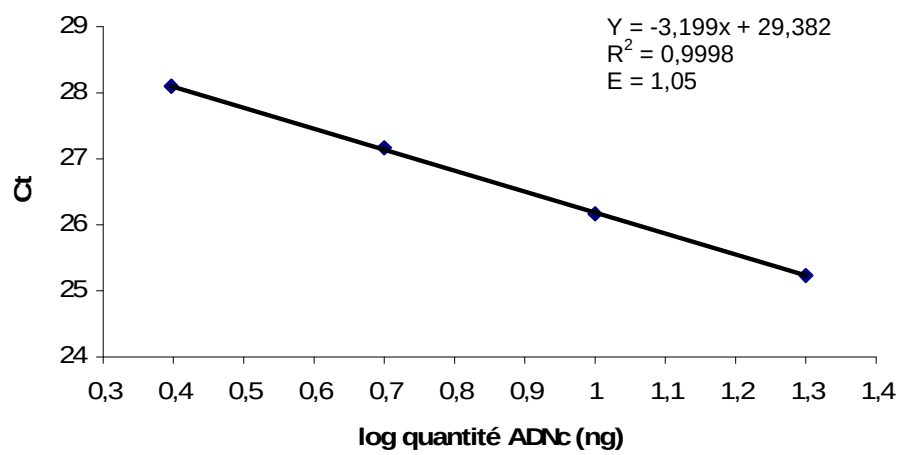


Figure 17 : Courbe standard.



9.4. Avantages de la PCR en temps réel

La PCR en temps réel est dotée de multiples avantages :

- l'absence de manipulation en post-PCR permet de réduire considérablement les risques de contamination par les produits amplifiés,
- l'amplification est rapide,
- différentes caractéristiques ont permis d'augmenter la sensibilité de la PCR en temps réel : les variations de température pour les différentes étapes d'un cycle sont rapides ; les incubations à chaque température sont très courtes sans pour autant modifier le rendement de l'amplification ni la spécificité de la réaction ; les réactions sont effectuées dans des petits volumes (10 à 20 µL) ce qui favorise les échanges thermiques rapides.

9.5. Calcul de l'expression transcriptionnelle relative

L'expression transcriptionnelle relative est calculée à partir de la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak et Schmittgen, 2001) en prenant en compte l'efficacité de la PCR.

L'efficacité (E) de la PCR est estimée grâce à une courbe standard basée sur une gamme de dilutions d'ADNc (par exemple entre 1:10 et 1:160) (Rutledge et Côté, 2003) :

$$E = (10^{1/a}) - 1$$

avec a : pente de la droite C_t en fonction de la quantité d'ADNc (Figure 17).

Chaque cycle produit une augmentation du nombre de molécules d'amplimères (N_C) en fonction de l'efficacité d'amplification : une efficacité de 100 % produit un doublement du nombre de molécules d'amplimères.

L'équation de base décrivant l'amplification de la PCR est donc :

$$N_C = N_0 \cdot (E + 1)^C$$

avec c : nombre de cycle de la PCR

N_C : nombre de molécules d'amplimères

N_0 : nombre initial de molécules cibles.

La quantité d'amplimères, N_C , présente après chaque cycle est dépendante de N_0 , d'où :

$$N_0 = N_C / (E + 1)^C$$



La quantification de N_C , et donc de N_0 , peut être calculée si l'efficacité de la PCR est connue. Un progrès majeur pour la PCR quantitative est l'utilisation de la fluorescence pour mesurer l'accumulation en amplicons (Higuchi et al., 1993; Kang et al., 2000). Basée sur cette technique une méthode a été développée pour simplifier la détermination de N_C : les réactions individuelles d'amplification sont comparées au niveau d'un point où leur quantité d'amplicon d'ADN est identique (Higuchi et al., 1993). Ceci est réalisé en sélectionnant un seuil de fluorescence (F_t) à partir duquel le cycle seuil (C_t) est calculé. Le C_t définit le point théorique pour lequel chaque réaction d'amplification atteint le seuil de fluorescence, qui correspond au début de la phase exponentielle du signal.

De par cette méthode de seuil, N_C devient une constante, ce qui donne l'équation :

$$N_0 = N_t / (E + 1)^{C_t}$$

avec C_t : cycle seuil

N_t : nombre de molécules d'amplicons au seuil de fluorescence (Figure 18).

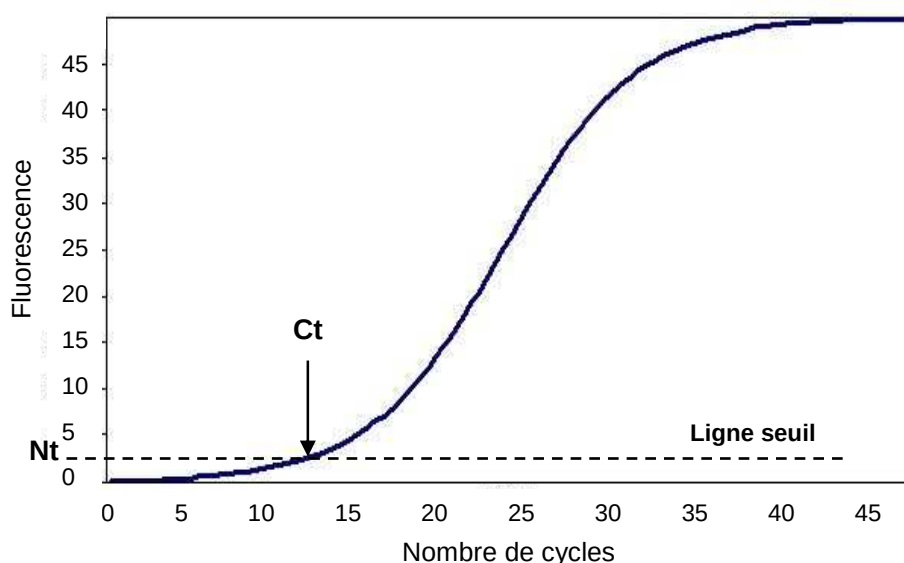


Figure 18 : Détermination du cycle seuil (C_t) et du nombre de molécules d'amplicons au seuil de fluorescence (N_t).



La quantité relative (R) de molécules cibles est calculée par rapport à un gène de référence, la β -actine par exemple :

$$R = N_0(\text{cible}) / N_0(\text{act})$$

avec $N_0(\text{cible})$: nombre initial de molécules d'ARNm cible

$N_0(\text{act})$: nombre initial de molécules d'ARNm de la β -actine.

L'expression transcriptionnelle relative (E) du gène cible d'un échantillon est calculée grâce à la quantité relative d'ARNm du gène cible chez l'échantillon et par rapport à la quantité relative d'ARNm du gène cible chez un témoin :

$$E = R_{\text{éch}} / R_{\text{témoin}} \quad \text{avec :}$$

$$R_{\text{éch}} = [N_0(\text{cible})]_{\text{éch}} / [N_0(\text{act})]_{\text{éch}}$$

$$R_{\text{témoin}} = [N_0(\text{cible})]_{\text{témoin}} / [N_0(\text{act})]_{\text{témoin}}$$

MATÉRIELS ET MÉTHODES



1. Purification des acides nucléiques et synthèse des ADNc

1.1. Prélèvement des tissus

Les glandes digestives et les branchies des bivalves étudiés ont été prélevées puis placées dans une solution dénaturante de protéine : du guanidium isothiocyanate (GATC) à 4M.

Les tissus ont ensuite été conservés à -196°C dans de l'azote liquide dans le but d'éviter la dégradation des ARN.

1.2. Purification de l'ADN génomique (ADNg) et des ARN totaux

L'extraction de l'ADNg et des ARN totaux est divisée en quatre étapes :

- lyse des tissus
- fixation des acides nucléiques sur la membrane de la colonne
- lavages
- élution des acides nucléiques

L'ADNg est extrait à partir de 25 mg de tissus (glande digestive et branchies) grâce au kit DNeasy (Qiagen, MD, USA) (Figure 19).

Les ARN totaux sont extraits à partir de 30 mg de tissus (glande digestive et branchies) grâce au kit RNeasy (Qiagen, MD, USA) (Figure 20).

L'intégrité de l'ADNg et des ARN totaux extraits est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % dans du tampon TAE (Tris 40 mM, acide acétique 1 mM, EDTA 40 mM).

1.3. Transcription-inverse

La transcription-inverse est effectuée sur 1 µg d'ARN totaux grâce au kit Revert Aid MuLV RT (Fermentas Life Sciences). La réaction est réalisée à 42°C pendant 30 min avec 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, 1 mM de dNTP, 2,5 µM d'oligo dT primer, 2,5 U/µL de Revert Aid MuLV RT et 1U/µL de Ribolock RNase Inhibitor.

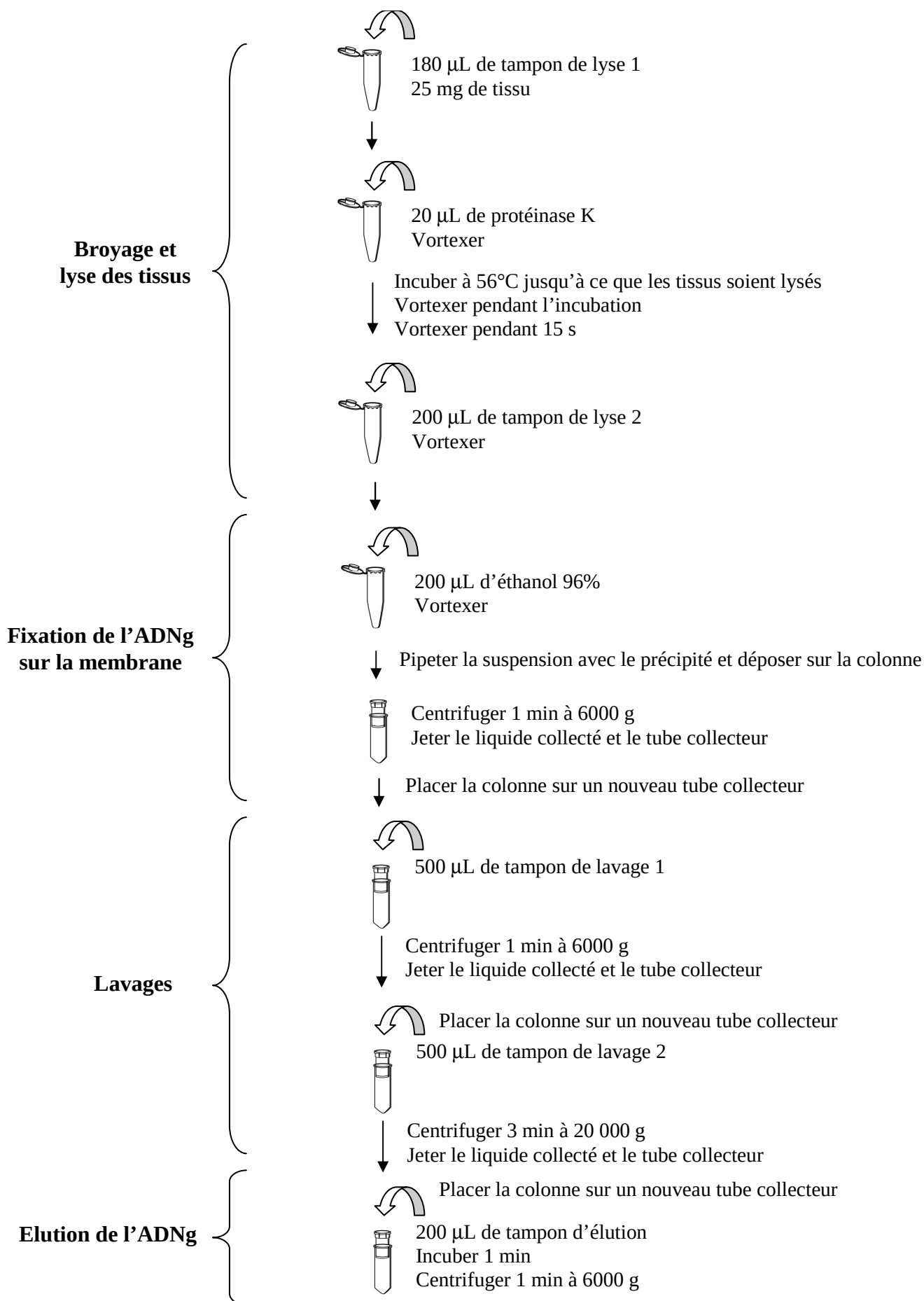


Figure 19 : Etapes de l'extraction de l'ADN génomique à partir du kit DNeasy (Qiagen).

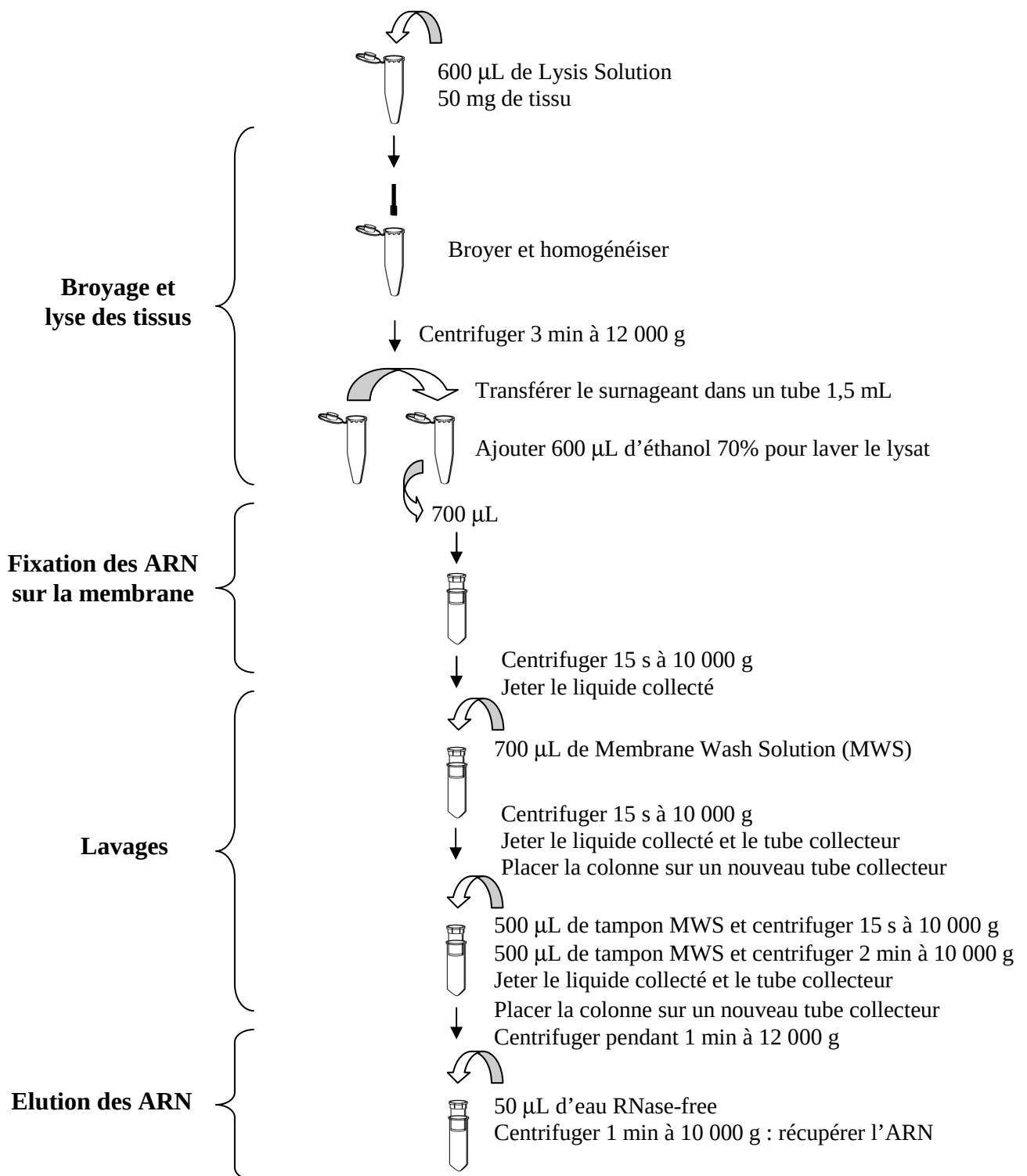


Figure 20 : Etapes de l'extraction des ARN totaux à partir du kit RNeasy (Qiagen).

Amorces	Séquences (5' – 3')
MT.F1d	ATGHSBRRHCAWTGHRAHTRC
MT.F2d	DTTGARRSHVRHRHNTGY
MT.R1d	TGYAMATGTSMHHVHRRHT
MT.R2d	TGYGGHDDDVHRHTGYACDGG
SOD.F4d	AATGGWGGDGGWCATWTBAAN
SOD.F5d	CARGGMTCMGGMTGGRGMTGGN
SOD.R4d	TGYTCCCARACRTCWATHCCN
SOD.R5d	ARWGGRTCYTGRTTTRGCACAN
CAT.F5d	CACCAGGTSTCBTTCCTSTTCN
CAT.F6d	ATGAAYGGHTAYGGHWSBCAN
CAT.R5d	TCDGCYTSYTCVDRBGTCATN
CAT.R6d	CCABGADGGGWADTTBCCN

M: A/C ; R: A/G ; S: G/C ; W: A/T ; Y: C/T ; B: C/G/T ; D: A/G/T ;
H: A/C/T ; V: A/C/G

Tableau 4 : Séquences des amorces dégénérées forward (F) et reverse (R) utilisées pour les RT-PCR

Amorces	Séquences (5' – 3')
MT.CF1	GATCGAAAATGAGTGACCCATG
MT.CF2	CTACAACTGGTACGTGCAAG
MT.CF3	CTGAAGACTGCACTGCGGA
MT.CR2	TCACTTGCAAGAACAGTCGCTCT
MT.CR3	CGCATGAAYCSGAACACTTG
MT.CR4	ACGACTTTACATCCGGGACA
MT.UF1	CCACCGAAGATGTCTGACCCAT
MT.UF2	GGAGAATGTAAATGTTCAAGTG
MT.UF3	TTGTACAGGGGACTGCAGATG
MT.UR2	TCATTTGCATGAACATCCAGA
MT.UR3	CAAGAACTTGAGCACTTGCAG
MT.UR4	CTTTACATCCAGGACACTTGC
MT.DF	ACCTGACTTTACGCATTCAAC
MT.DR	AACTGTGTGACACCATCCCA
MT.DF2	CGTTGCGCCGATGGGAGCTGCA
MT.DR2	CAACAGTTGGGTTTGCTGCACT
SOD.CF1	TTCAATGGTGGTGGTCATAT
SOD.CF2	ACTCAATATTCTGGGAGGTT
SOD.CR1	TTACTGTAGGTAGTAAGCGTGC
SOD.CR2	CATCTATACCGAACAGGGGAAC
CAT.CF1	TCTGACCGTGGAACCCCTGA
CAT.CR2	TTCCATCTGAACTTCTCAGCTT
GPx.CF030	CAAACGTGGCCACGTACTGA
GPx.CR30	GAACAGGGCATAACAGACTTGA
GST.CF2	ATGACTTCATCAAGAGTTTACCAG
GST.CR2	GCATGTTCTTGAACCTTCTGA
ACT.F	GGAYGAYATGGAGAARATCTGG
ACT.R	CCTGYTTGCTGAYCCACATCTG
Anchor	TGCATTGTCCATGGCTTCCGAAG
Oligo(dT)-Anchor	TGCATTGTCCATGGCTTCCGAAG(T)15V
Oligo(dG)-Anchor	TGCATTGTCCATGGCTTCCGAAG(G)15H

Tableau 5 : Séquences des amorces forward (F) et reverse (R) utilisées pour les RT-PCR et RACE-PCR

MT	<i>Corbicula fluminea</i>		<i>Unio tumidus</i>	
	Durée	Température	Durée	Température
Dénaturation initiale	2 min	94°C	2 min	94°C
Amplification Dénaturation Hybridation Elongation	40 cycles			
	30 s	94°C	30 s	94°C
	1 min	45, 50, 55 ou 60°C	1 min	30, 35, 40, 45, 50, 55 ou 60°C
	30 s ou 1 min	72°C	30 s ou 1 min	72°C
Elongation finale	2 min	72°C	2 min	72°C

Tableau 6 : Conditions testées pour amplifier les ADNc de MT de *Corbicula fluminea* et *Unio tumidus* par RT-PCR.

SOD et CAT	<i>Unio tumidus</i>	
	Durée	Température
Dénaturation initiale	2 min	94°C
Amplification Dénaturation Hybridation Elongation	40 cycles	
	30 s ou 1 min	94°C
	1 ou 2 min	30, 35, 40, 45, 50, 55 ou 60°C
	30 s ou 1 min	72°C
Elongation finale	2 min	72°C

Tableau 7 : Conditions testées pour amplifier les ADNc de SOD et CAT d'*Unio tumidus* par RT-PCR.



2. Identification de séquences codantes

2.1. Choix des amorces

Le logiciel MultAlin (Multiple sequence alignment) est un logiciel d'alignement multiple de séquences nucléiques (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>) (Corpet, 1988). Il permet de réaliser des alignements multiples de séquences nucléiques et de mettre en évidence les zones conservées au sein des séquences pour définir les amorces de PCR.

Les amorces dégénérées de MT, CAT et SOD sont choisies dans les régions codantes conservées des six mollusques suivants : *Dreissena polymorpha*, *Megathura crenulata*, *Mytilus edulis*, *Perna viridis*, *Crassostrea angulata* et *Tegillarca granosa* (Tableau 4)

Les amorces spécifiques ont été choisies grâce aux séquences disponibles dans la banque de données GenBank (Tableau 5). Les amorces sont réalisées par Invitrogen (Carlsbad, USA).

2.2. PCR avec amorces dégénérées

Les PCR sont réalisées sur 100 ng d'ADNc et différents milieux réactionnels sont testés :

- 10 mM de Tris-HCl,
- 50 mM de KCl,
- 1, 1,5 ou 2 mM de MgCl₂,
- 200 µM de chaque dNTP,
- 1 ou 2 µM de chaque amorce dégénérée,
- 0,025 U/µL de Taq DNA Polymerase (Fermentas Life Sciences).

Les différents paramètres d'amplification testés pour l'identification d'amplimères de MT chez *Corbicula fluminea* et *Unio tumidus*, ainsi que les paramètres d'amplification testés pour l'identification d'amplimères de SOD et de CAT chez *Unio tumidus* sont présentés dans les tableaux 6 et 7.

2.3. Extraction de fragments d'ADN de gels d'agarose et clonage

Les fragments d'ADN séparés par électrophorèse sont extraits du gel d'agarose en utilisant le kit d'extraction WIZARD SV Gel and PCR clean up system (PROMEGA) (Figure 21). Ce kit permet de purifier des amplimères de taille comprise entre 100 pb et 10 kb. L'ADN est ensuite élué des colonnes par 50 µL d'eau ultrapure et stocké à -20°C.

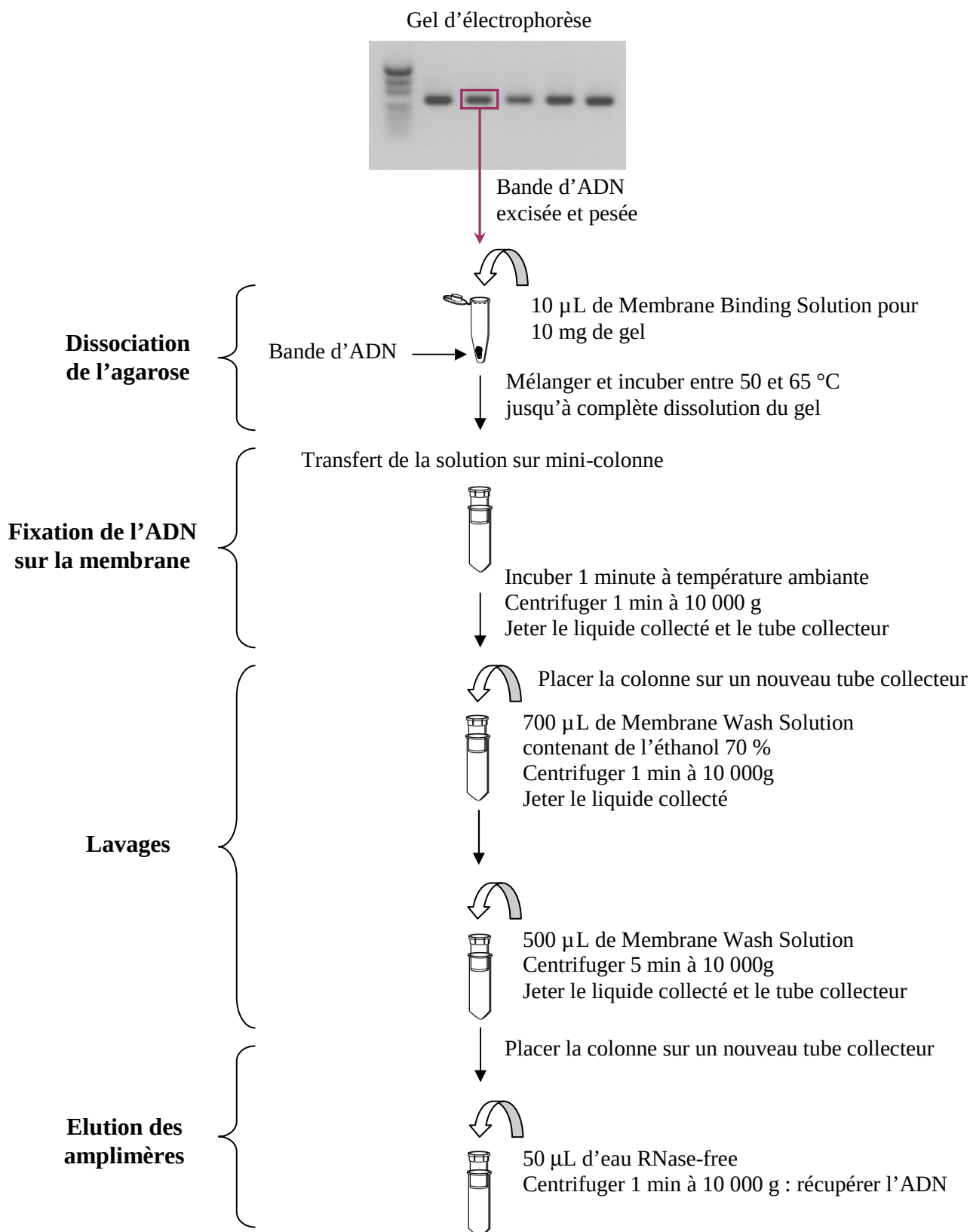


Figure 21 : Etapes de la purification des produits PCR à partir du kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega).



Le plasmide pGEM-T Easy est utilisé pour cloner les fragments d'ADN (Figure 22). Le milieu réactionnel est composé de 6 mM Tris-HCl (pH 7,5), 6 mM MgCl₂, 5 mM NaCl, 0,1 mM ATP, 2 mM dithiothréitol, 25 ng de vecteur linéaire pGEM-T, 3 unités de T4 DNA ligase et 3 µL de produit PCR purifié. Le milieu est homogénéisé et incubé une nuit à 4°C.

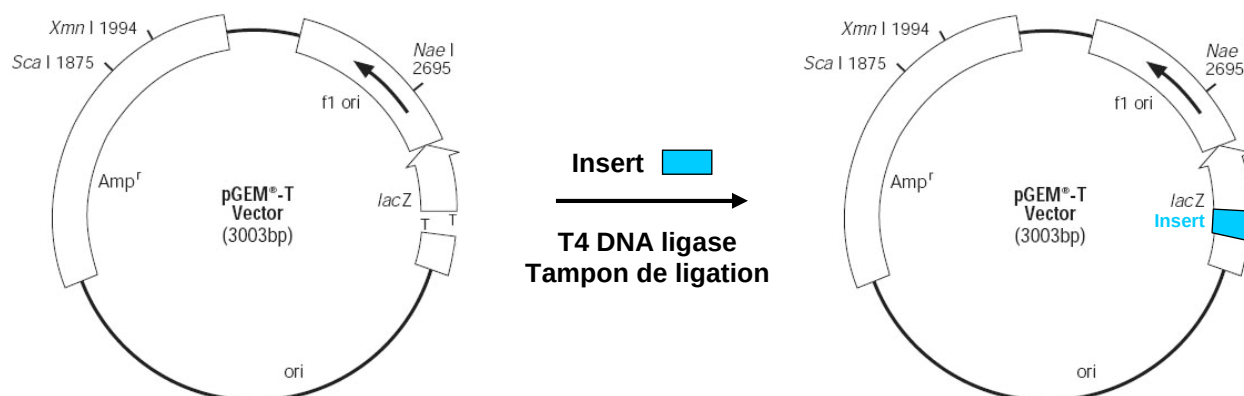


Figure 22 : Etapes de ligation de l'insert au vecteur de transformation bactérienne.

2.4. Transformation et sélection des bactéries

2.4.1. Préparation de bactéries compétentes

- La souche d'*Escherichia coli* (JM109) est mise en culture sur milieu Luria Broth (LB) solide à 50 µg/mL de streptomycine durant une nuit.
- Une préculture de la souche est réalisée dans 2 mL de milieu LB liquide à 50 µg/mL de streptomycine.
- 200 mL de milieu LB sontensemencés au 1/100 avec la préculture et incubé à 37°C sous agitation. Lorsque l'absorbance à 600 nm = 0,5 -0,7, la croissance bactérienne est bloquée dans la glace pendant 15 minutes. La culture est transférée dans des récipients de centrifugation refroidis.
- Centrifugation à 4000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot est mis en suspension dans 25 mL de CaCl₂ glacé à 100 mM.
- Incubation 1 heure dans la glace puis centrifugation à 4000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est mis en suspension dans 2 mL de CaCl₂ à 100 mM-14 % glycérol glacé.
- Les tubes sont aliquotés et conservés à -80°C.



2.4.2. Transformation des bactéries

Trois μL de réaction de ligation sont ajoutés à 100 μL de bactéries compétentes. Une incubation de 30 minutes sur la glace est réalisée. Les cellules bactériennes subissent un choc thermique à 42°C pendant 1 minute avant d'être immédiatement replacées sur la glace pendant 2 minutes. A ce milieu réactionnel sont ajoutés 800 μL de milieu LB et une incubation de 1 heure à 37°C sous agitation est réalisée. 30 μL et 150 μL de solution bactérienne sont étalées sur boîtes de Pétri sélective (ampicilline 50 $\mu\text{g/mL}$). Les boîtes sont incubées pendant 16 à 20 heures à l'étuve à 37°C jusqu'à apparition des colonies.

2.4.3. Sélection de bactéries et criblage de colonies

Le vecteur pGEM-T possède un gène de résistance à l'ampicilline qui permet de sélectionner les bactéries ayant reçu le vecteur et qui sont alors devenues résistantes à l'ampicilline.

Le site d'insertion de l'amplimère est situé au niveau de la partie α du gène de la β -galactosidase. L'insertion va donc interrompre la séquence de ce gène et le rendre non fonctionnel. Si l'enzyme est fonctionnelle, le substrat, c'est à dire le X-Gal, sera clivé et donnera une coloration bleue aux colonies bactériennes. Dans le cas contraire, le substrat ne sera pas clivé et les colonies seront blanches (Figure 23).

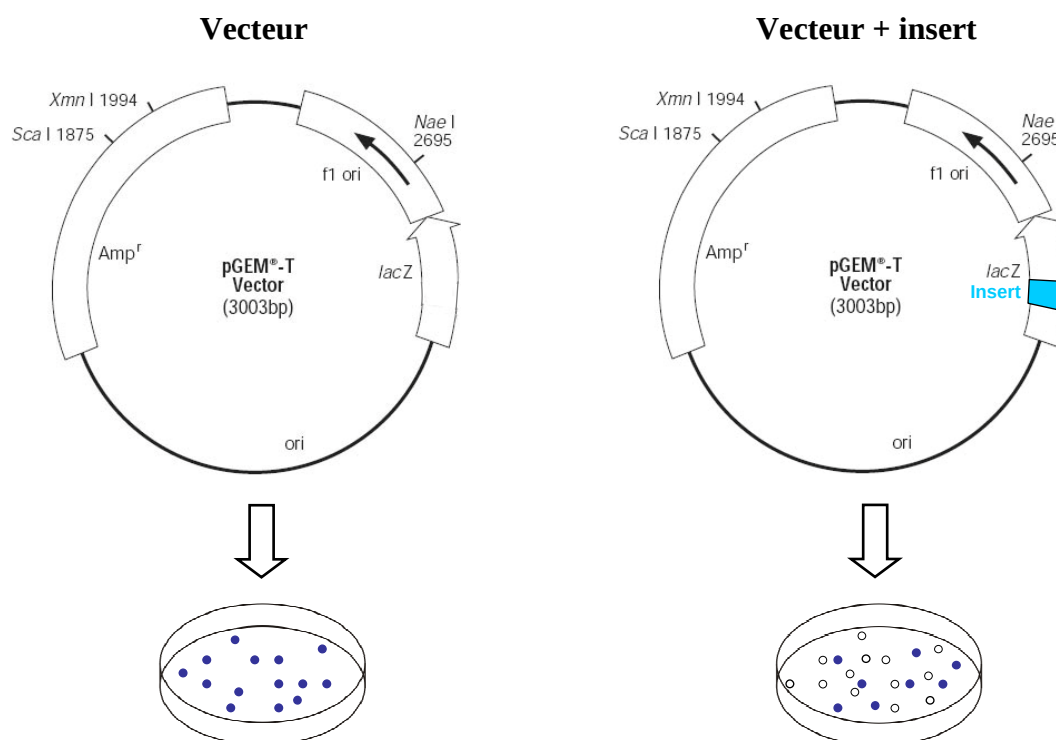


Figure 23 : Sélection des bactéries ayant intégré le vecteur avec ou sans insert.

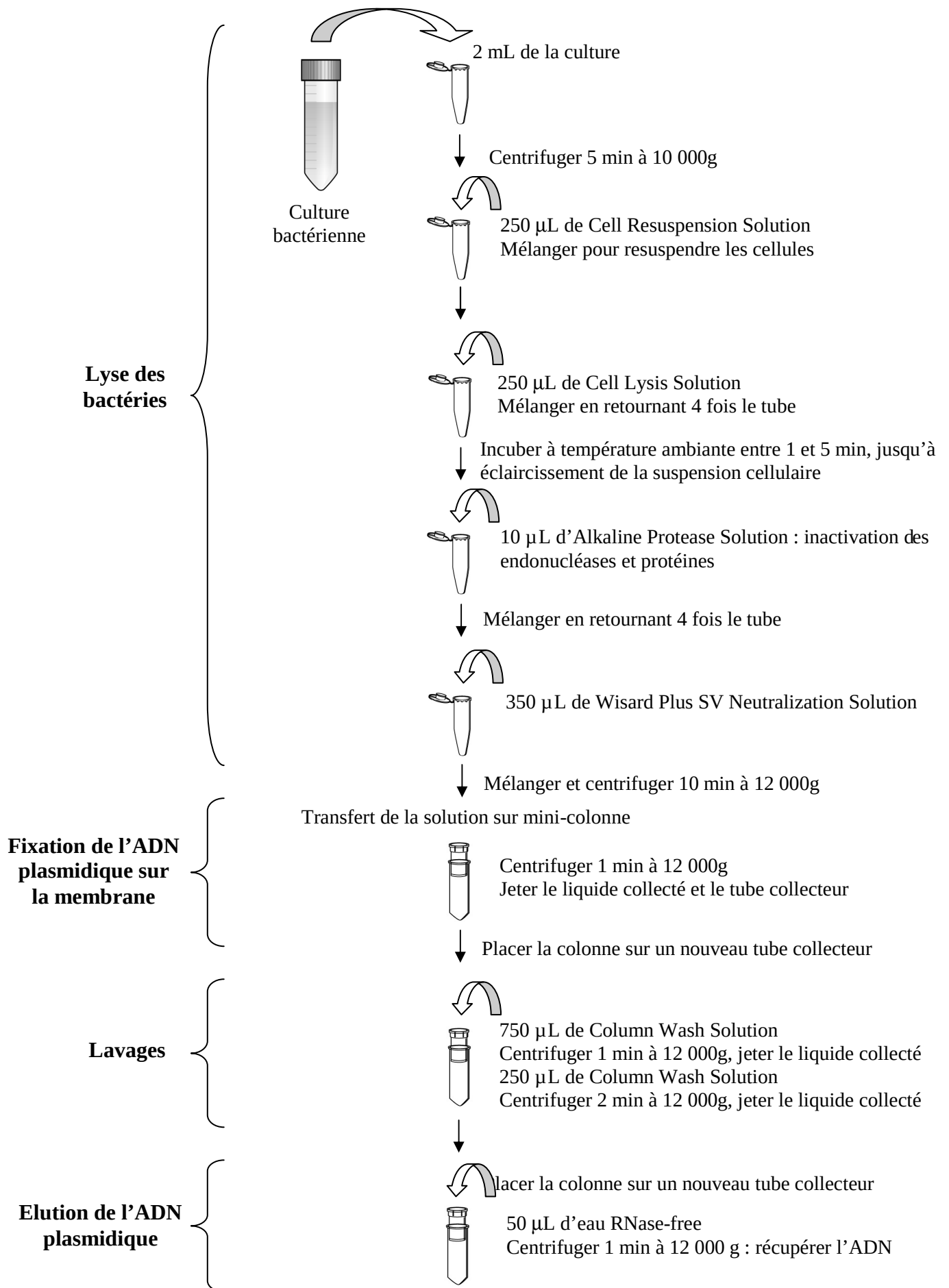


Figure 24 : Etapes de la purification d'ADN plasmidique à partir du kit WIZARD Plus Minipreps DNA Purification System (PROMEGA).



Les boîtes de Pétri sont placées 1 heure à 4°C pour intensifier les couleurs des colonies. Pour chaque clonage, une PCR est réalisée sur l'ADN plasmidique de 5 colonies blanches afin de vérifier si elles contiennent l'amplimère purifié. Les étapes du criblage sont les suivantes :

- Numéroté et transférer la moitié des colonies sélectionnées dans un microtube contenant 50 μ L d'eau ultrapure ;
- placer les tubes 5 min à 99°C afin de lyser les bactéries ;
- centrifuger à 5000 g pendant 5 min et prélever 5 μ L du surnageant contenant l'ADN pour réaliser les PCR.

Les conditions de PCR, le milieu réactionnel et les amorces correspondent aux conditions optimales utilisées pour l'amplification des ADNc.

Pour identifier les clones possédant l'amplimère de taille recherchée, 10 μ L de chaque produit PCR sont déposés sur gel d'agarose à 1,5 %.

2.5. Purification de l'ADN plasmidique

La seconde moitié des colonies sélectionnées durant l'étape de criblage et possédant un amplimère de la taille attendue est prélevée et transférée dans un tube de 15 mL contenant 2 mL de milieu LB liquide supplémenté en ampicilline (50 μ g/mL). Les tubes sont incubés pendant une nuit sous agitation à 37°C.

La purification d'ADN plasmidique est réalisée en utilisant le kit WIZARD *Plus* Minipreps DNA Purification System (PROMEGA) (Figure 24).

Pour vérifier la présence d'ADN plasmidique, 5 μ L de l'ADN plasmidique élué est déposé sur gel d'agarose à 1,5%.

2.6. Identification des extrémités 3' et 5' par RACE-PCR

Les extrémités 3' et 5' des ARNm de MT sont déterminées grâce à la technique de RACE-PCR (rapid amplification of cDNA ends). Des amorces spécifiques ont été choisies d'après les séquences codantes partielles de MT de *Corbicula fluminea* et d'*Unio tumidus* obtenues en utilisant les amorces dégénérées.



Pour la **3'RACE** les amorces forwards utilisées sont :

- MT.CF2, MT.CF3 pour l'ARNm de MT de *Corbicula fluminea*
- MT.UF2, MT.UF3 pour l'ARNm de MT d'*Unio tumidus*

et l'amorce reverse utilisée est l'amorce Anchor (Tableau 5).

Le milieu réactionnel est le suivant :

- 10 mM de Tris-HCl,
- 50 mM de KCl,
- 1 mM de MgCl₂,
- 200 µM de chaque dNTP,
- 0,5 µM de chaque amorce,
- 0,025 U/µL de Taq DNA Polymerase.

Les différents paramètres d'amplification testés pour amplifier les extrémités 3' des ADNc de MT de *Corbicula fluminea* et d'*Unio tumidus* sont présentés dans le tableau 8.

3' MT	<i>Corbicula fluminea</i> et <i>Unio tumidus</i>	
	Durée	Température
Dénaturation initiale	2 min	94°C
Amplification	40 cycles	
Dénaturation	30 s	94°C
Hybridation	30 s	45, 50, 55 ou 60°C
Elongation	1 min	72°C
Elongation finale	2 min	72°C

Tableau 8 : Conditions testées pour amplifier les extrémités 3' des ADNc de MT de *Corbicula fluminea* et *Unio tumidus* par RACE-PCR.

Pour la **5'RACE** les amorces reverse utilisées sont :

- MT.CR3, MT.CR4 pour l'ARNm de MT de *Corbicula fluminea*
- MT.UR3, MT.UR4 pour l'ARNm de MT d'*Unio tumidus*

et l'amorce forward utilisée est l'amorce oligo(dG)-Anchor (Tableau 5).



Les milieux réactionnels sont les suivants :

- 10 mM de Tris-HCl,
- 50 mM de KCl,
- 1, 1,5 ou 2 mM de $MgCl_2$,
- 200 μM de chaque dNTP,
- 0,5 μM d'amorce spécifique reverse,
- 0,25 μM d'amorce oligo(dG)-Anchor
- 0,025 U/ μL de Taq DNA Polymerase.

Les différents paramètres d'amplification testés pour amplifier les extrémités 5' des ADNc de MT de *Corbicula fluminea* et d'*Unio tumidus* sont présentés dans le tableau 9

5' MT	<i>Corbicula fluminea</i> et <i>Unio tumidus</i>	
	Durée	Température
Dénaturation initiale	2 min	94°C
Amplification Dénaturation Hybridation Elongation	40 cycles	
	30 s	94°C
	1 min	57 ou 58°C
	1 min	72°C
Elongation finale	2 min	72°C

Tableau 9 : Conditions testées pour amplifier les extrémités 5' des ADNc de MT de *Corbicula fluminea* et *Unio tumidus* par RACE-PCR.

2.7. Séquençage et analyse des séquences nucléiques

Le séquençage est réalisé sur au moins trois clones par MWG-Biotech.

Afin de vérifier si l'amplimère correspond à l'amplification de l'ADNc recherché d'une MT, d'une SOD ou d'une CAT, la séquence est comparée à celles de la banque de données GenBank en utilisant le logiciel BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ALTSCHUL 97. Le site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) permet l'utilisation de cette application en accès libre.

L'alignement multiple des séquences nucléiques est réalisé grâce au logiciel MultAlin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>) (Corpet, 1988). Ces alignements permettent



de mettre en évidence les zones conservées au sein des séquences pour définir les amorces de PCR.

Les séquences nucléiques sont traduites en séquences protéiques grâce au logiciel ExPASy (Expert Protein Analysis System) (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>).

3. Mesure du niveau d'expression par PCR en temps réel

3.1. Choix et test des amorces

La conception des amorces est une étape primordiale pour la réalisation de PCR en temps réel. La séquence et la structure exon-intron est obtenue dans la base de données NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Il est indispensable d'identifier ces structures et de choisir des amorces s'hybridant sur des exons différents, dans le but d'éviter l'amplification d'ADN génomique résiduel dans l'échantillon. Les amorces doivent mesurer entre 15 et 30 pb et leurs T_m ne doivent pas être différents de plus de 2°C l'un de l'autre.

Des témoins négatifs doivent être réalisés :

- Témoin sans matrice qui permet de contrôler l'absence de contaminations extérieures qui peuvent produire une augmentation non spécifique de la fluorescence.
- Témoin avec ARN qui permet de contrôler l'absence de contaminations par l'ADN
- Témoin avec ADN_g qui permet de contrôler si les amorces se situent sur des exons différents. Un signal d'émission de fluorescence détecté signifie que les amorces s'hybrident sur le même exon ce qui permet l'amplification d'ADN génomique.

Les amorces sont testées grâce à une gamme de concentrations entre 150 et 600 nM et la quantité d'amorces est choisie avec la valeur du C_t la plus faible.

.

3.2. Conditions d'amplification

Le mélange réactionnel est composé de la manière suivante :

- 4 µL d'ADN_c dilué au 1/20 (10 ng),
- 10 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, CA, USA)
- 300 nM ou 600 nM d'amorces.

Amorces	Séquences (5' – 3')	Quantité
ACT.CF100	TTGCCGGCAGAGATCTTACT	300 nM
ACT.CR200	AACCACCGATCCAGACTGAG	
ACT.UF100	TGCTTCTGGTCGTACCACTG	600 nM
ACT.UR200	GGTGCCTCCAGATAATACGG	
MT.CF400	TGCGCTACAACTGGTACGTG	300 nM
MT.CR500	AGTCGCTCTCACATTTGCAC	
MT.UF100	GCCTTGAGACCGGAGAATGT	600 nM
MT.UR100	TTGCATGAACATCCAGAGTCA	
SOD.CF400	TTTGACGAGATGAAGGCAGA	600 nM
SOD.CR400	GTAAGCGTGCTCCCAAACAT	
SOD.UF200	GAAGTGCTTTGTCCGACAGG	600 nM
SOD.UR200	GACCTGTTGTTGGTTCCAATG	
CAT.CF300	GAACCCCTGATGGGTACAGA	600 nM
CAT.CR300	GTTGCCCTCAGCAATAGCAT	
CAT.UF100	TGGCATAATCTGGGTCACTG	300 nM
CAT.UR100	CACCCCAGATGGTTATCGTC	
GPx.CF100	GGAGGGTGTGGCACTATCAT	600 nM
GPx.CR100	CTCGGTGAGAGGAAAGTTCTG	
GPx.UF100	CCATCTTGTACGAGCCCATT	600 nM
GPx.UR100	TCCCATGCCCATGTAAAGTT	
GST.CF100	TGTTTGACCTGTTGGACGAC	600 nM
GST.CR200	TGTAGCAAGCTCGGAAACAA	
GST.UF100	GGAAAGCAGGAGTTCATTGC	600 nM
GST.UR100	GGTGCCAGCAAAAGATGAAT	

Tableau 10 : Séquences et quantités d'amorces forward (F) et reverse (R) utilisées pour les PCR en temps réel.



Les amorces utilisées ainsi que les quantités sont présentées dans le tableau 10.

Les étapes de PCR sont constituées de :

- 3 min de dénaturation initiale à 95 °C,
- 40 cycles d'amplification :
 - 30 s de dénaturation à 95 °C,
 - 30 s d'hybridation à 60°C,
 - 30 s de polymérisation à 72°C
- 10 min d'élongation finale à 72°C.

Une courbe de fusion des produits PCR est ensuite réalisée entre 40 et 98°C pour s'assurer de l'absence d'artefacts.

4. Etudes en laboratoire et sur le terrain

4.1. Exposition de *Corbicula fluminea* au Cu et au Cd en laboratoire

Une intoxication au cuivre et au cadmium a été réalisée au laboratoire afin de vérifier si l'exposition de bivalves à une contamination métallique, génératrice d'un stress oxydant, avait des effets sur l'induction de l'ARNm de la MT, la SOD, la CAT, la Se-GPx et la GST-pi.

Les bivalves ont été prélevés au niveau d'un site de référence se situant au niveau de la rivière de la Moselle, sur le plan d'eau du Saulcy de Metz (Moselle, France), placés en stabulation et acclimatés pendant 48h. Des groupes de 6 bivalves ont ensuite été exposés aux toxiques seuls ou en mélanges, 6 individus ont été conservés en tant que contrôles. L'exposition a été réalisée à 18°C dans des bouteilles de 1 L.

Après 12h d'exposition, les glandes digestives et les branchies de chaque bivalve ont été prélevées. Les niveaux d'expression des gènes de détoxification (MT, SOD, CAT, Se-GPx et GST-pi) ont été mesurés par PCR en temps réel.

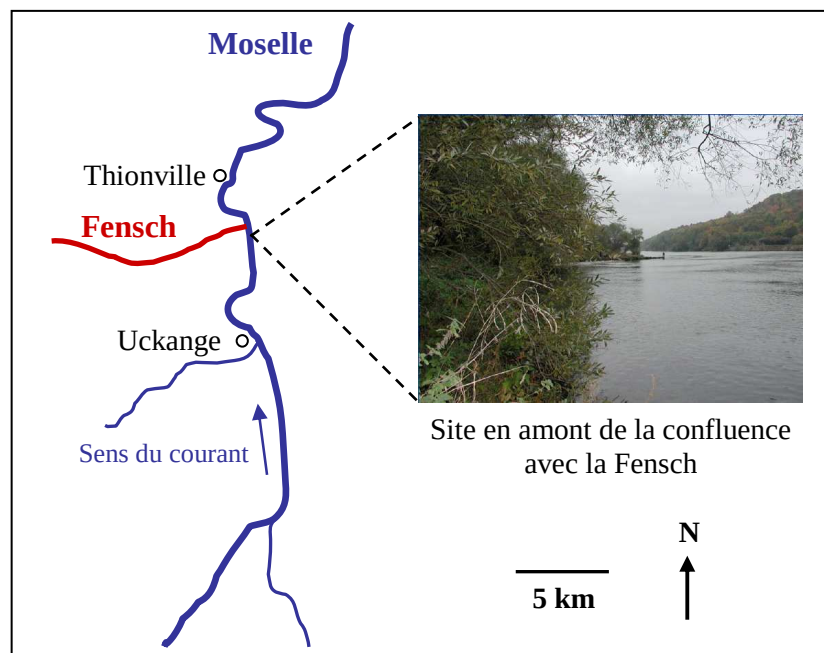


Figure 25 : Localisation de la station sur la Moselle en amont de la confluence avec la Fensch.

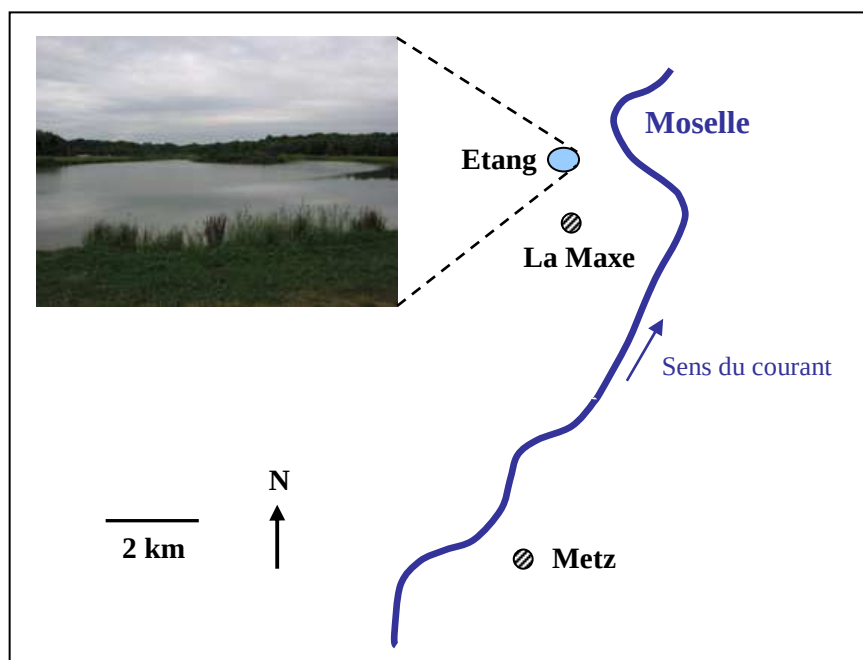


Figure 26 : Localisation des étangs de La Maxe.



4.2. Etude de l'expression saisonnière des gènes de détoxification chez *Corbicula fluminea* et *Unio tumidus*

Afin de déterminer si la saison a un effet sur l'induction des gènes de MT, SOD, CAT, Se-GPx et GST-pi chez les bivalves *Corbicula fluminea* et *Unio tumidus*, le niveau d'expression de ces ARNm ont été mesurés sur une période de 1 an. Les Corbicules ont été prélevées au niveau de la Moselle, en amont de la confluence avec la Fensch, près de Thionville (57) en février, avril, juillet, septembre et décembre 2007 (Figure 25).

Les bivalves *Unio tumidus* ont été prélevés au niveau d'un étang de La Maxe (57) en avril, juillet, septembre et décembre 2008 (Figure 26). En février, l'étang était recouvert de glace et les prélèvements n'ont pas pu être réalisés.

Plusieurs paramètres physico-chimiques ont été mesurés lors de chaque échantillonnage : pH, température, conductivité et oxygène dissous.

Les glandes digestives et les branchies des Corbicules et les glandes digestives des Unio ont été prélevées. Les niveaux d'expression des gènes de MT, SOD, CAT, Se-GPx et GST-pi ont été mesurés par RT-PCR.

4.3. Etude du niveau d'expression des gènes de détoxification chez *Unio tumidus* transférés au niveau de la Moselle

La qualité biologique des écosystèmes aquatiques sur le cours de la Haute Moselle a été évaluée grâce à l'étude de l'expression des ARNm de MT, SOD, CAT, Se-GPx et GST-pi chez le bivalve d'eau douce *Unio tumidus*. Quatre stations ont été étudiées sur un secteur couvrant une soixantaine de kilomètres et situées de part et d'autre de l'agglomération d'Epinal (88), depuis Les Mitreuches en amont, jusqu'à Velle sur Moselle en aval (Figure 27).

Les quatre sites sont caractérisés par un gradient de pollution de l'amont à l'aval. Les micropolluants minéraux et organiques ont été analysés dans les eaux interstitielles et sur la fraction fine des sédiments (<1 mm) prélevés aux mêmes endroits que les bivalves. Les mesures ont été effectuées par le Centre d'analyses et de recherches, Département Hydrologie et Environnement, de l'Université de Strasbourg.

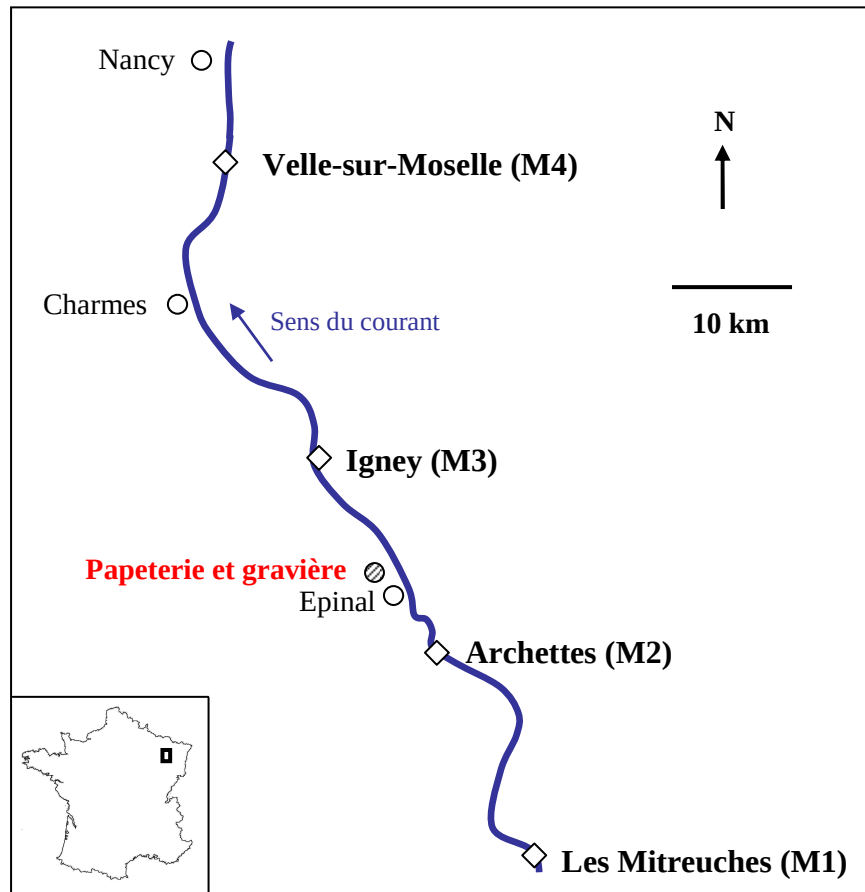


Figure 27 : Localisation des stations étudiées sur le site de la rivière de la Moselle.



Quarante huit bivalves ont été échantillonnés au niveau d'un site témoin situé à Manom (Moselle) localisé à une vingtaine de kilomètre du laboratoire. Ces bivalves ont été répartis dans des cages en 8 lots de 6 moules et placés sur les différents sites immédiatement après la collecte, pendant 8 et 21 jours. Les glandes digestives sont prélevées à la fin des temps d'exposition.

Les niveaux d'expression des gènes de MT, SOD, CAT, Se-GPx et GST-pi ont été mesurés par PCR en temps réel.

RÉSULTATS ET DISCUSSION



Les travaux présentés s'articulent en trois parties :

- 1^{ère} partie : Identification des séquences codantes de MT chez les bivalves *Corbicula fluminea* et *Unio tumidus*, et de SOD et CAT chez *Unio tumidus* (Publications 1 et 3).
- 2^{ème} partie : Etude de l'expression saisonnière de la MT, la SOD, la CAT, la Se-GPx et la GST-pi chez les deux bivalves, par RT-PCR (Publication 1).
- 3^{ème} partie : Etude du niveau d'expression des gènes de détoxification par RT-PCR en temps réel, chez des bivalves soumis à différentes perturbations :
 - Exposition de *Corbicula fluminea* au cuivre et au cadmium pendant 12h (Publication 2),
 - Transfert d'*Unio tumidus* sur quatre sites de la Moselle (Publication 3).

(A)

```
attcaccgagaagacagcaagacgtaaagatcgaaa
1 atgagtgacccatgcgactgcgctacaactgggtacgtgcaagtgttctgaagactgcact
  M S D P C D C A T T G T C K C S E D C T
61 gcggagagtgggtgcagatgcggcaccggatgtaattgtggtgacgactgcaaagtgtccc
  A E S G C R C G T G C N C G D D C K C P
121 ggatgtaaagtcgtatgcaagtgttcgggttcacgactgcggacaaggctgcacggga
  G C K V V C K C S G S C D C G Q G C T G
181 ccaagcacgtgcaaattgtgagagcgactgttcttgcaagtgatgggctaaagtcacgtgg
  P S T C K C E S D C S C K -
atgcaccgctgtaagtcgtcagatcaaagatgggtgggttaacaactttaatcaaactgta
ttgtgtgaaaaactgtttttgtgtgaaaataattgattagaaatggaaaacaacaaagta
tttatccgttttaaaactacttgcgttgttgaaaatttgtactttacactgtttggttctg
ttacagcggcgatagagacacacgttttaataccacacggctatctcccgcatattct
gtaaaagctgttaataaccacgtgactaaccttgatgtcagcagaaagaaatcgaataaa
ttaatagtttatgcaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

(B)

```
attcacataaataggactttttcacgcagcacacga
cgtaccaagacaataagcttctcttgaccagacttgaattcagattttcaaccaccgaag
1 atgtctgacccatgcaactgccttgagaccggagaatgtaaatgttcagggtgattgtaca
  M S D P C N C L E T G E C K C S G D C T
61 ggggactgcagatgtggggatgcctgcaaattgtggaaatgcctgcaagtgtcctggatgt
  G D C R C G D A C K C G N A C K C P G C
121 aaagtagtctgcaagtgtcaagttctgtgactgtggtaagggctgcaccggaccacgc
  K V V C K C S S S C D C G K G C T G P S
181 acatgcaagtgtgactctggatgttcacgaaatgaacaaggaatgacttacattgcga
  T C K C D S G C S C K -
gagaattgggaccaatatgtcagttctggattctagtcagtacaaaaaataaaaaataat
tgaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

Figure 28 : Séquences codantes et protéiques de MT de *Corbicula fluminea* (A) et d'*Unio tumidus* (B). Les résidus cysteines sont surlignés.



PARTIE 1

IDENTIFICATION DE SÉQUENCES CODANTES DE MT, SOD ET CAT CHEZ LES BIVALVES *CORBICULA FLUMINEA* ET *UNIO TUMIDUS*

PUBLICATIONS 1 et 3

1. Identification de la séquence codante de la MT chez *Corbicula fluminea* et *Unio tumidus*

1.1. Séquences codantes obtenues

Grâce à la technique de RT-PCR en utilisant des amorces dégénérées, des amplimères de 181 pb et 175 pb ont été obtenus respectivement chez *Corbicula fluminea* et *Unio tumidus*.

La comparaison des séquences de ces amplimères avec celles disponibles dans GenBank indique qu'elles correspondent à des séquences codantes de métallothionéine.

Les séquences des extrémités 3' et 5' de l'ARNm de MT ont ensuite été déterminées par la technique de RACE-PCR avec les amorces spécifiques MT.CF3 et MT.CR3 pour *Corbicula fluminea* et MT.UF3, MT.UR3 et MT.UR4 pour *Unio tumidus*.

La séquence codante complète de la MT de *Corbicula fluminea* contient 219 pb codant pour une protéine de 73 acides aminés dont 21 cystéines impliquées dans la liaison des ions métalliques (Figure 28). Sa masse moléculaire est de 7,258 kDa (d'après le logiciel Molecular Weight Calculator) et son point isoélectrique est de 4,36 (d'après Sequence Manipulation Suite : http://annotathon.univ-mrs.fr/sms2/protein_iep.html).

La séquence codante complète de la MT d'*Unio tumidus*, contient 213 nucléotides codant pour une protéine de 71 acides aminés dont 21 cystéines (Figure 28). Sa masse moléculaire est de 7,066 kDa et son point isoélectrique est de 7,18.

Les séquences codantes de MT de *Corbicula fluminea* et d'*Unio tumidus* ont été déposées dans la base de données GenBank sous les numéros d'accès EF185126 et EF185127.

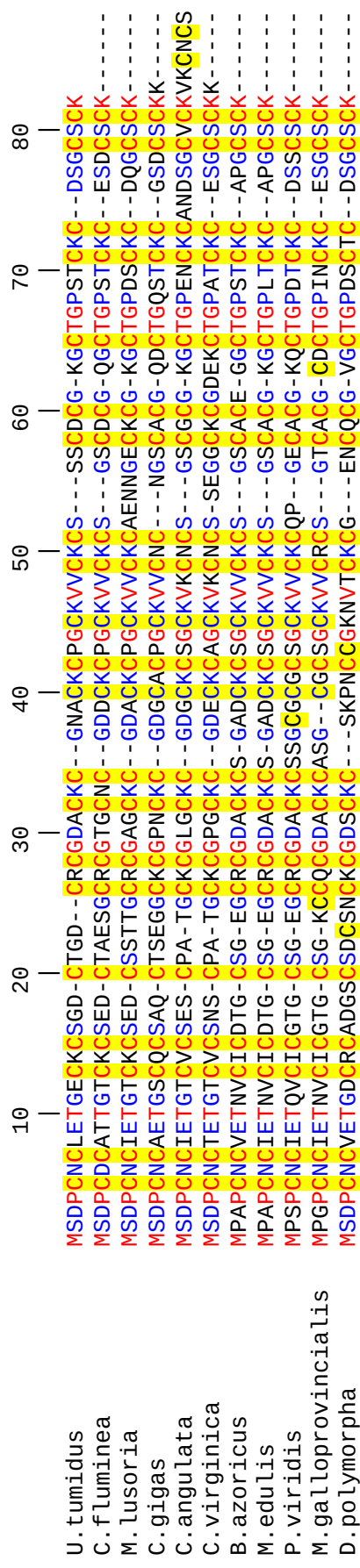


Figure 29 : Comparaison des séquences protéiques de MT de *Corbicula fluminea* et d'*Unio tumidus* avec les séquences de MT de différents bivalves disponibles dans GenBank. Les acides aminés en rouge sont conservés chez tous les organismes. Les acides aminés en bleu sont conservés chez au moins 6 organismes. Les résidus cystéines sont surlignés.



1.2. Analyse des séquences codantes de MT obtenues

Les séquences protéiques déduites ont été comparées à plusieurs séquences de MT de bivalves (Figure 29) en utilisant le programme MULTALIN (Corpet, 1988). Un alignement multiple des séquences de MT de *Corbicula fluminea* et d'*Unio tumidus* avec les séquences de MT connues de plusieurs invertébrés a révélé que les séquences de MT sont fortement conservées, et plus particulièrement au niveau des régions cystéines. Les séquences MT de *Corbicula fluminea* et d'*Unio tumidus* possèdent 75% d'identité entre elles.

Pour déterminer l'évolution de la relation entre les différentes séquences de MT, un arbre phylogénétique a été réalisé. Cette arbre est basé sur les séquences protéiques de MT de 16 organismes invertébrés et vertébrés disponibles dans GenBank, et a été réalisé avec le programme MEGA 4.1 (Figure 30). Deux groupes se discernent: le premier inclut les invertébrés et le second les vertébrés *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Danio rerio* et *Xenopus laevis*.

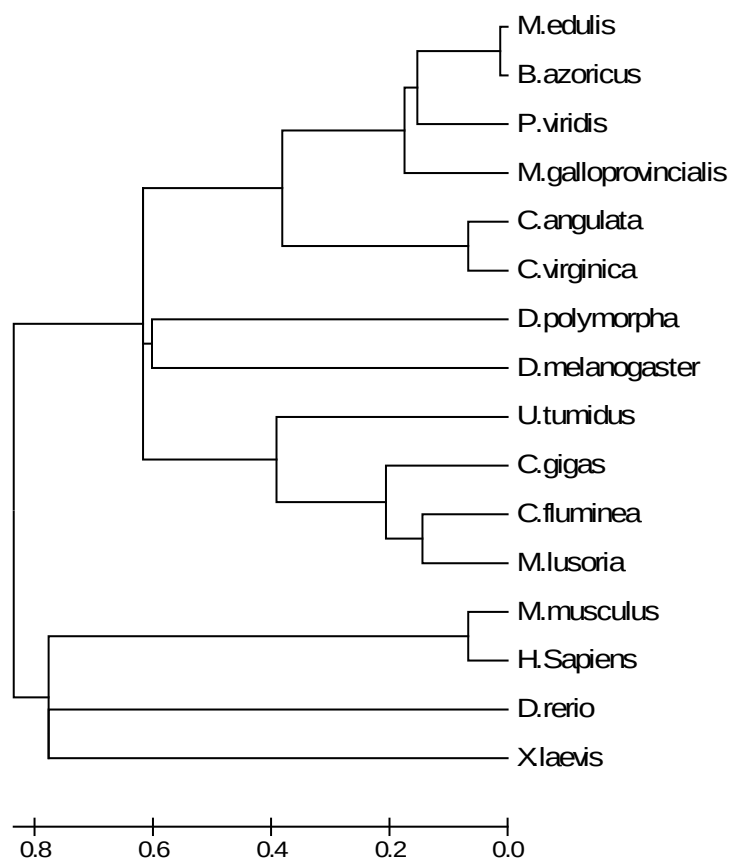


Figure 30: Arbre phylogénétique de séquences protéiques de métallothionéine de plusieurs invertébrés (*Mytilus edulis*, *Bathymodiolus azoricus*, *Perna viridis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea angulata*, *Crassostrea virginica*, *Dreissena polymorpha*, *Drosophila melanogaster*, *Unio tumidus*, *Crassostrea gigas*, *Corbicula fluminea*, *Meretrix lusoria*) et vertébrés (*Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Danio rerio*, *Xenopus laevis*).



1.3. Discussion

Des séquences de MT ont été caractérisées chez divers mollusques : chez les moules telles que *Mytilus edulis* (Mackay et al., 1993), *Perna viridis* (Khoo et Patel, 1999), *Dreissena polymorpha* (Engelken et Hilderbrandt, 1999), chez les palourdes *Meretrix lusoria* (Chang et al., 2007), *Ruditapes decussates* (Simes et al., 2003), et chez l'huître *Crassostrea virginica* (Roesijadi et al., 1989).

La caractéristique principale de la séquence de MT est sa forte teneur en résidus cystéine qui représentent 30 % des acides aminés totaux de la protéine, ainsi que l'alignement des cystéines. Les motifs Cys-Cys montrent deux variations chez *Corbicula fluminea* et *Unio tumidus*: Cys-X-Cys, et Cys-X-X-Cys, où X est un acide aminé autre que la cystéine. Neuf motifs Cys-X-Cys et un motif Cys-X-X-Cys sont présents dans la protéine. Les résidus cystéines sont impliqués dans la formation des groupements thiolates et permettent la fixation des ions métalliques (Stillman et al., 1987).

Les séquences protéiques déduites ne comportent pas d'acides aminés aromatiques, mais contiennent chacune dix résidus glycine, ce qui représente environ 14 % des acides aminés totaux. Ces résidus sont d'abondance équivalente au niveau des séquences de MT de l'huître *Crassostrea virginica* (Roesijadi et al., 1991) et de l'escargot *Helix pomatia* (Dallinger et Berger, 1993), ce qui pourrait correspondre à une caractéristique des séquences de MT de mollusque. Les résidus glycine ne semblent pas avoir de relation avec d'autres acides aminés et sont apparemment distribués au hasard sur l'ensemble de la séquence.

Trois classes de MT, se différenciant par l'alignement des séquences Cys-Cys, Cys-X-Cys et Cys-X-X-Cys, ont été identifiées (Kägi et al., 1984).

La classe I comprend les MT de vertébrés et de mollusques. Les principales caractéristiques de cette classe sont la correspondance entre les localisations de cystéines, la présence de motifs Cys-X-Cys et Cys-X-X-Cys et l'absence d'acides aminés aromatiques. Il paraît donc clair que les séquences MT identifiées appartiennent à la classe I.

Les séquences C-terminale de MT identifiées dans notre étude sont identiques à la séquence C-terminale de l'isoforme monomérique MT-10 de *Mytilus edulis*: Cys Ser Cys Lys (Mackay et al., 1993). La séquence protéique de MT-10 de *Mytilus edulis* possède 21 résidus cystéine et le motif Cys-Cys est absent alors que la séquence protéique de MT-20 possède 23 résidus cystéine avec un motif Cys-Cys. Ces deux cystéines supplémentaires pourraient être

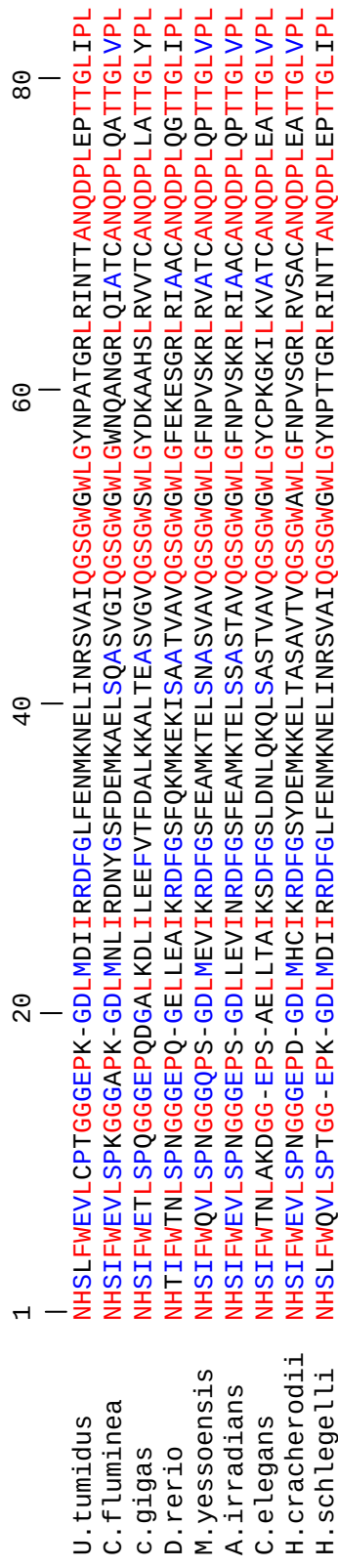


Figure 32 : Comparaison des séquences protéiques de SOD d'*Unio tumidus* avec les séquences de SOD de différents organismes disponibles dans GenBank. Les acides aminés en rouge sont conservés chez tous les organismes. Les acides aminés en bleu sont conservés chez au moins 5 organismes.

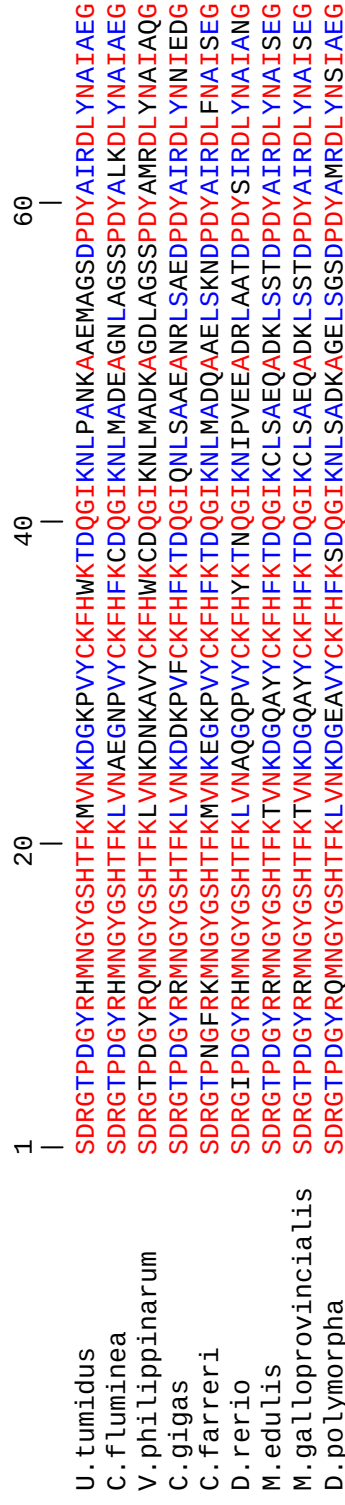


Figure 33 : Comparaison des séquences protéiques de CAT d'*Unio tumidus* avec les séquences de CAT de différents organismes disponibles dans GenBank. Les acides aminés en rouge sont conservés chez tous les organismes. Les acides aminés en bleu sont conservés chez au moins 5 organismes.



impliquées dans la liaison intermoléculaire entre les unités monomériques de la MT-20 (Mackay et al., 1993). Les motifs cystéine et les 21 résidus cystéine suggèrent que les séquences MT de *Corbicula fluminea* et d'*Unio tumidus* correspondent à des isoformes MT-10.

2. Identification des séquences codantes de SOD et CAT chez *Unio tumidus*

2.1. Séquences codantes obtenues

Des séquences codantes partielles de 251 pb et 216 pb de SOD et CAT respectivement ont été identifiées (Figure 31).

Ces deux séquences codantes ont été déposées dans la base de données GenBank sous les numéros d'accès FJ608580 et FJ608579.

SOD

```
aatcactcgttatTTTTGGGAAGTGCTTTGTCCGACAGGAGGTGGGGAACCCAAGGGTGAC
N H S L F W E V L C P T G G G E P K G D
ctgatggacataataagaagagattttggattatttGAAAACATGAAAAATGAATTGATC
L M D I I R R D F G L F E N M K N E L I
aacagatctgtggcaattcaagggtcaggctggggatggcttgggtacaacccagccaca
N R S V A I Q G S G W G W L G Y N P A T
ggcagactgcgaataaacactacagctaatacaggatccattggaaccaacaacaggtctg
G R L R I N T T A N Q D P L E P T T G L
atacctttgtt
I P L
```

CAT

```
tctgaccgtggcaccacagatgggttatcgtcacatgaacggctatggcagtcacacattc
S D R G T P D G Y R H M N G Y G S H T F
aaaatggtgaacaaggacggcaagccagtctactgcaagttccactggaagactgaccag
K M V N K D G K P V Y C K F H W K T D Q
ggtatcaaaaacttgccagcaaaagcagcagaaatggccggcagtgaccagattat
G I K N L P A N K A A E M A G S D P D Y
gccataagagacctgtacaatgccattgctgagggc
A I R D L Y N A I A E G
```

Figure 31 : Séquences codantes et protéiques de SOD et de CAT d'*Unio tumidus*.

2.2. Analyse des séquences codantes de SOD et CAT obtenues

Les séquences protéiques déduites ont été comparées à plusieurs séquences de SOD et CAT connues d'invertébrés (Figures 32 et 33) en utilisant le programme MULTALIN (Corpet, 1988). Cette comparaison nous a révélé une forte conservation de ces séquences.

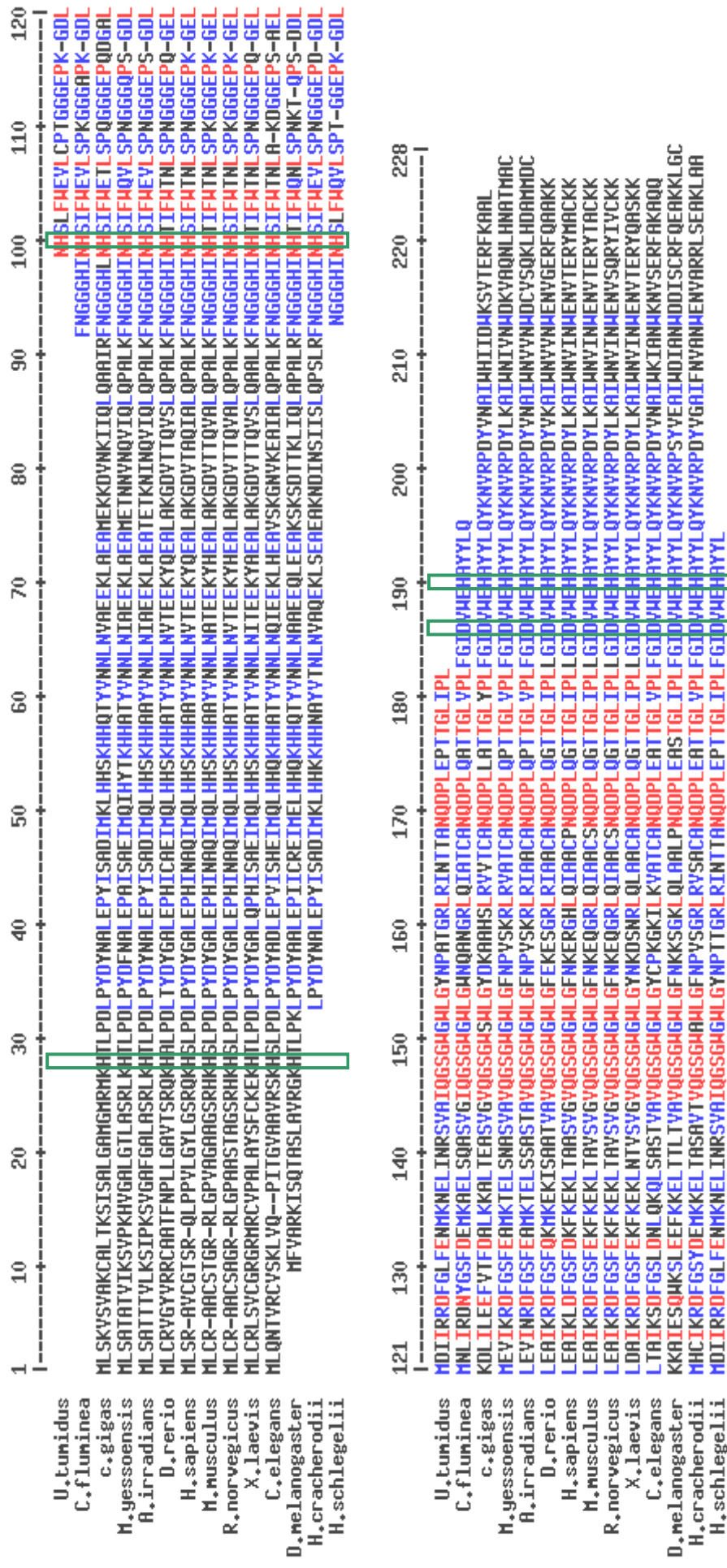


Figure 34 : Alignements multiples de la séquence de Mn-SOD d'*Unio tumidus* avec les séquences protéiques Mn-SOD de vertébrés (*Danio rerio*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus Norvegicus*, *Xenopus laevis*) et d'invertébrés (*Corbicula fluminea*, *Crassostrea gigas*, *Mizuhopecten yessoensis*, *Argopecten irradians*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Haliotis cracherodii*, *Hyriopsis schlegelii*). Les acides aminés en rouge sont conservés chez tous les organismes. Les acides aminés en bleu sont conservés chez au moins 7 organismes. Les résidus rattachés à la coordination de l'ion Mn sont encadrés.

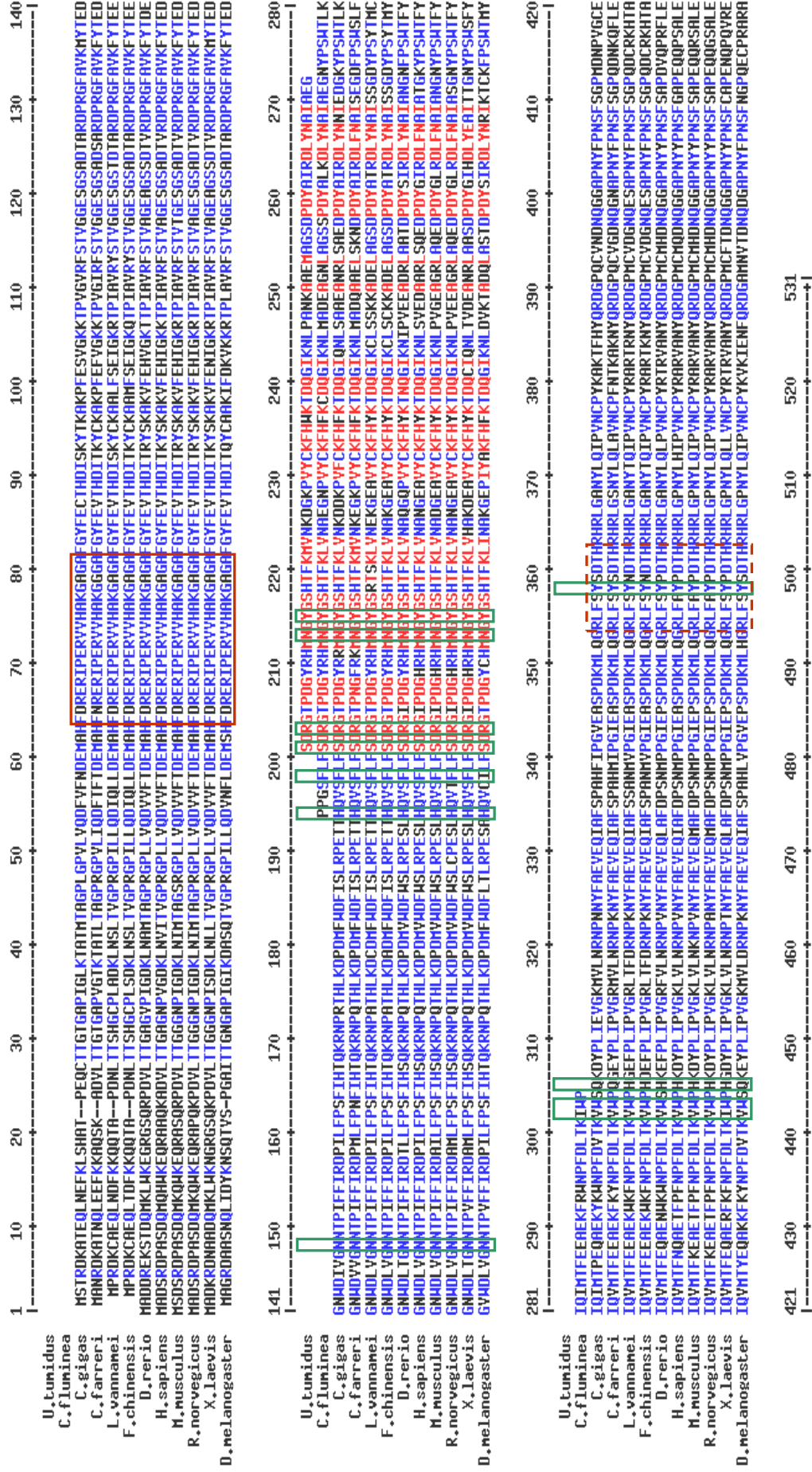


Figure 35 : Alignements multiples de la séquence de CAT d'Unio tumidus avec les séquences protéiques CAT de vertébrés (Danio rerio, Homo sapiens, Mus musculus, Rattus Norvegicus, Xenopus laevis) et d'invertébrés (Corbicula fluminea, Crassostrea gigas, Chlamys farreri, Drosophila melanogaster, Litopenaeus vannamei, Fenneropenaeus chinensis). Les acides aminés en rouge sont conservés chez tous les organismes. Les acides aminés en bleu sont conservés chez au moins 6 organismes. Les résidus du site de liaison du NADPH sont encadrés en vert. Le motif du site actif est encadré en rouge. Le motif du ligand hème est encadré en pointillés rouges.



Les séquences de SOD et de CAT d'*Unio tumidus* montrent respectivement 95% d'identité avec la séquence Mn-SOD de *Hyriopsis schlegelii* et 81% d'identité avec la séquence CAT de *Dreissena polymorpha*.

2.3. Discussion

La Mn-SOD est une enzyme tétramérique dont chaque sous unité est constituée de deux domaines : le premier est composé d'une hélice α alors que le second est constitué de repliements α et β .

Les ligands du manganèse sont trois chaînes latérales d'histidine, une chaîne latérale d'aspartate et une molécule d'eau ou un ion OH^- suivant l'état d'oxydation du manganèse (respectivement II et III). La première histidine est située dans la première hélice du premier domaine et la seconde histidine dans la dernière hélice de ce domaine. Les deux autres ligands sont séparés par trois résidus et se situent juste après le brin β du second domaine (Borgstahl et al., 1992). Ces résidus liés à la coordination du manganèse sont localisés sur la figure 34 : H^{28} , H^{100} , D^{186} , H^{190} . La séquence Mn-SOD d'*Unio tumidus* que nous avons identifiée contient H^{100} .

La CAT est une hémoprotéine tétramérique dont chaque monomère contient un hème et une molécule de NADPH. L'hème est constitué d'un anneau organique appelé protoporphyrine et d'un atome central de fer. La séquence de la signature proximale du ligand hème de la CAT est connue (RLFSYNDTH) (Tavares-Sánchez et al., 2004) ; elle est conservée du point de vue de sa composition et de sa localisation (Figure 35).

La molécule de NADPH est fortement liée à la CAT et protège l'enzyme de l'oxydation par son substrat, le peroxyde d'hydrogène. La structure de la CAT d'érythrocytes humains a été déterminée récemment et 12 résidus ont été identifiés comme étant responsables de la liaison du NADPH (Putnam et al., 2000). La séquence partielle de CAT que nous avons identifiée chez *Unio tumidus* contient 5 de ces résidus : S^{201} , R^{203} , N^{213} , Y^{215} et K^{237} (Figure 35).

La signature du site actif de la CAT (FDRERIPERVVHAKGAGA) est également fortement conservée chez différentes espèces (vertébrés et invertébrés).



PARTIE 2

ETUDE DE L'EXPRESSION SAISONNIÈRE DES GÈNES DE DÉTOXICATION

PUBLICATION 1

Metallothionein coding sequence identification and seasonal mRNA expression of detoxification genes in the bivalve *Corbicula fluminea*

Les gènes de détoxification tels que la MT, la SOD, la CAT, la Se-GPx et la GST-pi ont été utilisés dans de nombreuses études en tant que biomarqueurs. Il est toutefois nécessaire de déterminer les fluctuations saisonnières de ces gènes en réponse à des facteurs biotiques et abiotiques pour l'interprétation des résultats de biomonitoring. La première partie de cette étude porte sur l'identification de la séquence codante de MT de *Corbicula fluminea*. Ces résultats ont été présentés précédemment (partie 1) et nous ont permis de choisir des amorces spécifiques dans le but de mesurer le niveau d'expression de la MT chez la corbicule. Lors de cette étude, les séquences codantes de SOD, CAT, Se-GPx et GST-pi étaient connues et disponibles dans Genbank (numéros d'accension : EF446611, EF446609, EF547366, AY885667). La deuxième partie de cette étude porte donc sur la mesure de l'expression saisonnière des ARNm de MT, de SOD, de CAT, de Se-GPx et de GST-pi chez *Corbicula fluminea*, par RT-PCR.

Les niveaux d'expression saisonniers de ces gènes de détoxification ont été mesurés dans la glande digestive et les branchies de corbicules collectées au niveau d'un site témoin de la Moselle sur une période d'un an (février, avril, juillet, septembre et décembre). Le pH, la température, la conductivité et l'oxygène dissous ont été mesurés à chaque campagne de prélèvement.

Au niveau de la glande digestive, l'expression de la MT est significativement plus élevée au mois de juillet, alors que les expressions les plus faibles sont observées en février et décembre. Les expressions de la SOD et de la CAT montrent des résultats similaires avec une tendance à augmenter en juillet dans la glande digestive. Par contre, aucune variation significative de l'expression des ARNm de Se-GPx et de GST-pi n'a été notée dans les deux tissus.



L'expression plus élevée de la MT en juillet peut résulter d'une augmentation de l'activité métabolique qui peut être liée à la hausse de la température. En effet l'augmentation de la température de l'eau est suivie par une augmentation de la consommation en oxygène des organismes aquatiques, ce qui peut provoquer l'accumulation de ROS.

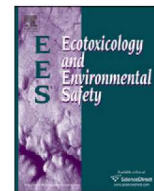
La SOD catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène qui est le substrat de la CAT. L'augmentation de la température induisant un stress pourrait expliquer la tendance des expressions des ARNm de SOD et CAT à augmenter en été.

Nos résultats montrent que les faibles fluctuations des ARNm observées pourraient correspondre à des paramètres saisonniers tels que la température de l'eau. Il paraît donc important de connaître le statut saisonnier des gènes de détoxification du bivalve étudié pour interpréter les résultats d'une étude à long terme.



Contents lists available at ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoenvMetallothionein coding sequence identification and seasonal mRNA expression of detoxification genes in the bivalve *Corbicula fluminea*

Aurélie Bigot, Périne Doyen, Paule Vasseur, François Rodius*

Lab. I.E.B.E-CNRS UMR 7146, Université de Metz, Rue Delestraint, 57070 Metz, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 January 2008

Received in revised form

8 April 2008

Accepted 14 April 2008

Available online 11 June 2008

Keywords:

Corbicula fluminea

Metallothionein

Antioxidant system

Seasonal variation

mRNA level

Biomarkers

ABSTRACT

The aim of this study was to identify a metallothionein (MT) coding sequence from the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* and to measure the seasonal transcriptional pattern of MT in parallel with several detoxification genes: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferases (GST) and glutathione peroxidases (GPx), in the digestive gland and the gills of this bivalve during a 1-year period.

We identified a *C. fluminea* MT complete cDNA sequence using RT-PCR and RACE-PCR. The amino acid sequence deduced from the coding sequence encodes for a protein of 73 amino acids containing 21 cysteine residues. This protein exhibits high identities and similarities with the MT sequences of numerous bivalves.

MT, SOD, CAT, pi-GST and Se-GPx expression patterns did not exhibit major seasonal variations. A slight increase of MT was observed in July. Therefore, the mRNA expression of these five genes could be used as biomarkers for monitoring studies.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Reactive oxygen species (ROS) are produced by the basal cellular metabolism and also under several environmental condition factors. To detoxify ROS, mussels possess detoxification proteins such as metallothionein (MT) and antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferases (GST) and glutathione peroxidases (GPx).

SOD, CAT and GPx are the major components of the antioxidant system. SOD converts superoxide to hydrogen peroxide and divalent oxygen (Fridovich, 1989), then CAT and GPx remove hydrogen peroxide. CAT is a heme-containing protein located in the peroxisomes, which degrades hydrogen peroxide to water and oxygen (Deisseroth and Dounce, 1970). GPx catalyses the reduction of hydrogen peroxide (Epp et al., 1983), two isoforms had been identified: selenium-dependent GPx (Se-GPx) and selenium-independent GPx. Se-GPx catalyses the reduction of organic and inorganic peroxides like hydrogen peroxide (H₂O₂) while selenium-independent GPx reduces only organic peroxide (Almar et al., 1998). GST belongs to a family of multi-functional enzymes involved in phase II of biotransformation (Ketterer et al., 1983). Eight classes of isoenzymes can be distinguished, alpha, mu, pi, theta, sigma, zeta, beta and kappa, based on their substrate

specificity, immunological properties and protein sequence homology (Sheehan et al., 2001).

Metallothioneins (MT) are low molecular weight proteins (6–7 kDa) with high cysteine content (30%). The thiol groups of cysteine residues allow MT to bind heavy metals such as Zn, Cu, Cd, Hg and Ag (Kägi and Schäffer, 1988). MT plays a predominant role in the metabolism and bioavailability of essential metals such as Cu and Zn (Viarengo and Nott, 1993). They are also involved in the detoxification of these elements and of other metals such as Cd, Hg, Ag (Roesijadi, 1996; Vasak, 2005). MT are efficient scavengers of hydroxyl radicals, contributing to protect tissues against oxidative injuries (Thornalley and Vasák, 1985). MT induction was related to metal exposure in many monitoring studies (Amiard et al., 2006): in the clam *Ruditapes philippinarum* and the crab *Carcinus maenas* exposed to metal-contaminated sediments (Martín-Díaz et al., 2007), in *Dreissena polymorpha* exposed to Cu and As (Bouskill et al., 2006) and in *C. fluminea* exposed to Cd (Marie et al., 2006). The reproductive cycle of *Corbicula fluminea* is correlated with variations in MT concentrations. The highest MT concentrations coincide with the gonadal maturation period (Baudrimont et al., 1997). In *Gammarus pulex*, the highest MT levels were observed after the reproduction period, perhaps linked to the metabolic needs of biologically available essential metal such as zinc (Geffard et al., 2007).

Bivalve molluscs are relevant species to study the quality of the aquatic environment. They are sedentary and filter large amounts of water to cope with nutritional and respiratory needs.

* Corresponding author. Fax: +33 387 37 85 12.

E-mail address: rodious@univ-metz.fr (F. Rodius).



C. fluminea is a freshwater bivalve originating from Asia, which has progressively colonised North America and Europe (Britton and Morton, 1979).

Many authors have studied MT concentration in bivalves using differential pulse polarography method, or mercury-saturation method (Bebiano and Serafim, 1998; Lecoeur et al., 2004; Raspot et al., 2004; Marie et al., 2006). The SOD, CAT, pi-GST and Se-GPx enzymatic activities were measured in many studies. However, fewer mRNA expression studies had been performed on these genes. The aim of this study was, in a first step, to identify the MT mRNA of the bivalve *C. fluminea* using RT-PCR (reverse-transcription polymerase chain reaction) performed with degenerate primers. In a second step, we evaluated the mRNA seasonal expression of MT in parallel with other detoxification genes (SOD, CAT, pi-GST and Se-GPx) in the digestive gland and the gills of *C. fluminea*. We used these two tissues because gills are the first structures in contact with the environment and digestive gland is the major site of xenobiotic uptake and oxyradical-generating biotransformation enzymes (Livingstone et al., 1992). A set of biomarkers increases the possibilities to distinguish sites with different degrees of pollution (Dondero et al., 2006). Therefore, the identification of MT, SOD, CAT, pi-GST and Se-GPx fluctuations in *C. fluminea* is important for the interpretation of field results and to discriminate the physiological disturbance from the natural variability.

2. Materials and methods

2.1. Experimental animals

Adult freshwater bivalves *C. fluminea*, between 2.5 and 3 cm in length, were collected over a period of 1 year from the Moselle River (France). Several water parameters were measured: pH, temperature, conductivity and dissolved oxygen (Table 1). Digestive gland and gills from each mussel were dissected immediately after collection, placed in 4 M guanidinium isothiocyanate solution (Fermentas Life Sciences, Vilnius, Lithuania) and conserved in liquid nitrogen to avoid RNA degradation. Five mussels were used to identify MT sequence and five mussels were also used at each collection time to measure the MT, SOD, CAT, pi-GST and Se-GPx mRNA expressions.

2.2. Total RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNAs were extracted from 30 mg of tissue using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, USA). The RNA integrity was estimated by electrophoresis on a 1.5% agarose gel in TAE (Tris 40 mM, Acetic acid 1 mM, EDTA 40 mM) buffer and visualisation under UV light. Reverse transcription was performed on 1 µg of total RNA using the Revert Aid MuLV RT Kit (Fermentas Life Sciences, Vilnius, Lithuania). Reaction was conducted at 42 °C for 30 min with 10 mM Tris–HCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP mix, 2.5 µM of OligodT primer, 2.5 U/µL of Revert Aid MuLV RT and 1 U/µL of Ribolock RNase Inhibitor.

2.3. Primers design

The primers were obtained from Invitrogen (Carlsbad, USA) and their sequences are given in Table 2. Degenerate primers (MT.F1d, MT.R1d, MT.F2d and MT.R2d) were chosen in the MT conserved coding region of the six following molluscs: *Dreissena polymorpha*, *Megathura crenulata*, *Mytilus edulis*, *Perna viridis*, *Crassostrea angulata* and *Tegillarca granosa* (GenBank accession numbers: U67347, AY102647, CAE11861, AF036904, AAK15581, AY568678). We chose specific primers

Table 1
Corbicula fluminea length and water parameters measured in the Moselle River

	February	April	July	September	December
Mussel length (cm)	[2.6–3]	[2.5–3]	[2.5–3]	[2.7–3]	[2.6–3]
pH	7.91	8.05	8.3	7.89	7.94
Temperature (°C)	7.5	14.1	28.2	21.7	4.4
Conductivity (µS/cm)	1173	1349	1610	1555	1446
Dissolve oxygen (mg/L)	9.45	10.5	8.84	9.94	9.75
Dissolve oxygen (%)	79.3	106.7	97.7	114	89.5

Table 2

Sequences of primers used for RT–PCR and RACE–PCR

Primers	Sequences (5'–3')
MT.F1d	ATGHSBRRHCAWTGHRHATRC
MT.F2d	DTTGARRSHVRHRRHTGY
MT.R1d	TGYAMATGTSMHVHRRHT
MT.R2d	TGYGGHDDVRHTGYACDGG
MT.CF3	CTGAAGACTGCACTGCGGA
MT.CR3	CGCATGAAYCSGAACACTTG
SOD.CF2	ACTCAATATTCTGGGAGTT
SOD.CR2	CATCTATACCGAACAGGGGAAC
CAT.CF1	TCTGACCGTGGAAACCCCTGA
CAT.CR2	TTCCATCTGAACITCTCAGCTT
GST.CF2	ATGACTTCATCAAGAGTTACCAG
GST.CR2	GCATGTTCTTGAACITCTCTGA
GPx.CF030	CAAACGTGGCCACGTACTGA
GPx.CR30	GAACAGGGCATAAGACTTGA
ACT.F	GGAYGAYATGGAGAARATCTGG
ACT.R	CCTGYTTGCTGAYCCACATCTG
OligodG–Anchor	GACCACGCGTATCGATGTCGAC(G) ₁₅ H
Anchor	GACCACGCGTATCGATGTCGAC

M: A/C; R: A/G; S: G/C; W: A/T; Y: C/T; B: C/G/T; D: A/G/T; H: A/C/T; V: A/C/G.

according to *C. fluminea* CAT, SOD, pi-GST and Se-GPx sequences available in GenBank (accession numbers: EF446611, EF446609, AY885667, AY885666).

2.4. PCR using degenerate primers

PCR amplifications were conducted on 100 ng of cDNA and different reaction mixtures were tested: 10 mM Tris–HCl, 50 mM KCl, 1.5 or 2 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP, 2 µM of each degenerate primers and 0.025 U/µL of Taq DNA Polymerase (Fermentas Life Sciences). Several amplification conditions were also tested: a 2-min initial denaturation at 94 °C, 40 cycles of heat denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 45, 50, 55 or 60 °C for 1 min, polymerisation at 72 °C for 30 s or 1 min, and a 2-min final extension at 72 °C.

2.5. Rapid amplification of MT cDNA ends

We used the 5'/3' RACE Kit 2nd generation (Roche, Indianapolis, USA), and we designed specific primers (MT.CF3 and MT.CR3) according to the partial coding sequence of the amplimers obtained with degenerate primers.

The specific primer MT.CF3 and the Anchor primer were used for 3'–RACE. Amplification conditions were the following: 10 mM Tris–HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP, 0.5 µM of each primer and 0.025 U/µL of Taq DNA Polymerase (Fermentas Life Sciences). The cycling conditions consisted of 2-min initial denaturation at 94 °C followed by 40 cycles of heat denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 50 °C for 30 s, polymerisation at 72 °C for 1 min, and a 2-min final extension at 72 °C.

The specific primer MT.CR3 was used to perform 5'–RACE. We followed the manufacturer instructions excepted for cDNA tailing extremity: dATP (0.16 mM) were substituted by dCTP (1 mM). Amplification conditions were the following: 10 mM Tris–HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP, 0.5 µM of each specific primer, 0.25 µM of oligodG–Anchor primer and 0.025 U/µL of Taq DNA Polymerase (Fermentas Life Sciences). The PCR steps consisted of a 2-min initial denaturation at 94 °C, 40 cycles of heat denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 58 °C for 1 min, polymerisation at 72 °C for 1 min, and a 2-min final extension at 72 °C.

2.6. Cloning and sequencing

Amplimers were purified using the Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, Madison, USA) and were cloned into pGEM-T Vector system (Promega). *Escherichia coli* cells (JM109) were transformed with the ligation mixture by the heat shock method. Colonies were screened by PCR using specific primers in order to confirm the presence of an insert corresponding to MT cDNA. Plasmidic DNA was extracted and purified from the positive clones with the Wizard Plus SV Minipreps–DNA Purification System (Promega). Three clones were sequenced on both strands by MWG Sequencing Department (Martinsried, Germany).

2.7. Sequence analysis

Amplimer sequences were translated using the six open reading frames (ORF). Nucleotide and amino acid sequences obtained were identified by comparison to databases available on the National Center for Biotechnology Information (NCBI)



site (www.ncbi.nlm.nih.gov) using BLAST programs (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1997).

2.8. MT, SOD, CAT, pi-GST and Se-GPx mRNA expression patterns

Specific primers (MT.CF3, MT.CR3, SOD.CF2, SOD.CR2, CAT.CF1, CAT.CR2, GST.CF2, GST.CR2, GPx.CF030 and GPx.CR30) were used to amplify cDNA of MT, SOD, CAT, pi-GST and Se-GPx; β -actin cDNA was co-amplified as a control using ACT.F and ACT.R primers. PCR was performed in the following mixture: 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M of each dNTP, 1 μ M of each specific primer and 0.025 U/ μ L of Taq DNA Polymerase (Fermentas Life Sciences). The PCR steps consisted of 2-min initial denaturation at 94 °C followed by heat denaturation at 94 °C for 30 s; annealing at 55 °C for ACT and MT, 53 °C for SOD, 56 °C for CAT, 55 °C for pi-GST and 57 °C for Se-GPx for 30 s; polymerisation at 72 °C for 30 s, and a 2-min final extension at 72 °C. In order to amplify the cDNA in the exponential phase of the PCR, we tested several amplification cycles (25–45). Therefore, the number of cycles chosen was 32 for β -actin, MT and SOD, and 40 for CAT, GST and GPx.

Ten microliters of PCR products were separated by electrophoresis on a 1.5% agarose gel in TAE buffer and visualised under UV light. Amplifier intensities were analysed with the Quantity One 4.5 software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). The relative mRNA amount was calculated from the ratio of intensity of MT, SOD, CAT, pi-GST or Se-GPx amplicon to the intensity of β -actin amplicon.

2.9. Statistical analysis

Statistical analyses were carried out to compare MT, SOD, CAT, pi-GST and Se-GPx expressions in the digestive gland and the gills according to the season. The ratios were analysed with the parametric Student test using Statgraphics Plus software (Statgraphics, 1995). Differences were considered as significant if $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Identification of the complete MT coding sequence

An amplicon of the expected size (181 bp) was obtained using degenerate primers for all amplification parameters tested (data

not shown). The deduced amino acid sequence showed high similarities with other invertebrate MT sequences available in the GenBank database. RACE-PCR were, therefore, performed with the specific primers MT.CF3 and MT.CR3 and allowed us to identify the complete MT coding sequence, which was deposited into GenBank database (accession number EF185126). This sequence spans 219 bp and encodes a 73 amino acid protein containing 21 cysteines and no aromatic residue (Fig. 1).

3.2. MT sequence comparison

The deduced amino acid sequence of *C. fluminea* MT was compared to several bivalves MT protein sequences (Fig. 2) using MULTALIN program (Corpet, 1988). Sequence of *C. fluminea* MT displayed highest identity with sequence of *Crassostrea gigas* MT (72%). Cysteine residues are highly conserved among all the MT sequences analysed.

The phylogenetic relationships of MT sequences of some invertebrates and vertebrates organisms available in GenBank were obtained using MULTALIN program (Fig. 3). We can discern two principal groups: the first includes the bivalves and the second includes *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, *Xenopus laevis*, *Homo sapiens* and *Mus musculus*.

3.3. MT, SOD, CAT, pi-GST and Se-GPx mRNA levels

The identification of MT in *C. fluminea* allowed us to study the seasonal expression pattern of this gene in the digestive gland and the gills. In the digestive gland, the highest MT transcript level was observed in July and the minimum expression levels were noted in February and December (Fig. 4). Similar results were observed for SOD and CAT mRNA expressions, which tend to be higher in July. No significant variation of pi-GST and Se-GPx mRNA expressions were observed in the digestive gland.

```

                                attcaccgagaagacagcaagacgtaagatcgaaa
1  atgagtgacccatgacgactgacgctacaactggtagctgcaagtgttctgaagactgcact
   M S D P C D A T T G T C K C S E D T T G T G T C K C S E D T
61  gcggagagtgggtgcagatgacggcaccggatgtaattgtggtgacgactgcaaatgtccc
   A E S G C R C G T G C N C G D D C K C P
121 ggatgtaaaagtcgatgcaagtgttcgggttcacgactgacggacaaagctgcacggga
   G C K V V C K C S G S C D C G Q G C T G
181 ccaagcacgtgcaaatgtgagagcgaactgttcttgcaagtgaagggttaagtcacgtgg
   P S T C K C E S D C S C K -
   atgcaccgctgtaagtgcagatcaaaagatggtggtttaaacaactttaatacaaaactgta
   ttgtgtgaaaaactgtttttgtgtgaaaaataattgattgaaatggaaaaacaacaaagta
   tttatccgttttaaaactacttgctgtgtgaaaattgtactttacactgtttgttctg
   ttacagcggcgtatagagacacacgttttaataccacacggctatctcccgcatattct
   gtaaaagctgttaataaccacgtgactaaccttgatgtcagcagaagaatcgaaataaa
   ttaatagtttatgcaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

Fig. 1. Complete coding sequence and deduced amino acid sequence of *Corbicula fluminea* metallothionein. The cysteine residues are highlighted.

	10	20	30	40	50	60	70	80																		
C.fluminea	MSDP	CDCA	ATTG	TCKC	SESD	CTAESG	CR	CGTG	CNC	--	GDDCK	CPGCK	VVCK	CS	---	GSCDC	CG	QG	GTGP	STCK	C	--	ESDC	CSCK	-----	
M.lusoria	MSDP	CNCI	ETGT	CKC	SESD	CSSTTG	CR	GAG	CKC	--	GDACK	CPGCK	VVCK	CK	CAEN	NNGE	CKG	KG	GTGP	DSCK	C	--	DQGC	CSCK	-----	
C.gigas	MSDP	CNC	CAETG	SCQ	CSAQ	CTSEGG	CK	CGPNC	CKC	--	GDGCA	CPGCK	VVNC	C	---	NGSCA	CG	QD	GTGQ	STCK	C	--	GSDC	CSCK	-----	
C.angulata	MSDP	CNCI	ETGT	CVCS	ES	CPA	TGCK	CGLG	CKC	--	GDGCK	CSGCK	VKNC	CS	---	GSCCG	CG	KG	GTGP	ENCK	CAND	SG	CVCK	VKNC	CNS	
C.virginica	MSDP	CNC	TETGT	CTCV	CNS	CPA	TGCK	CGPG	CKC	--	GDECK	CAGCK	VKNC	CS	---	SEGGCK	CG	GD	EK	GTGP	ATCK	C	--	ESGC	CSCK	-----
B.azoricus	MPAP	CNCV	ETNV	CI	CDTG	CSG	EGCR	CGD	ACKCS	--	GADCK	CSGCK	VVCK	CS	---	GSCACE	CG	GG	GTGP	STCK	C	--	APGC	CSCK	-----	
M.edulis	MPAP	CNCI	ETNV	CI	CDTG	CSG	EGCR	CGD	ACKCS	--	GADCK	CSGCK	VVCK	CS	---	GSCACE	CG	KG	GTGP	LTCK	C	--	APGC	CSCK	-----	
P.viridis	MPSP	CNCI	ETQV	CI	CGTG	CSG	EGCR	CGD	ACKCS	SSG	CGCG	CSGCK	VVCK	Q	CP	--	GEAC	CG	KG	GTGP	DTCK	C	--	DSSC	CSCK	-----
M.galloprovincialis	MPGP	CNCI	ETNV	CI	CGTG	CSG	KCCQ	CGD	ACKCAS	G	CG	CSGCK	VVCR	CS	---	GTCAC	CG	CD	GTGP	INCK	C	--	ESGC	CSCK	-----	
D.polymorpha	MSDP	CNCV	ETGDC	RC	ADGS	CSD	CSNCK	CGDS	CKC	--	SKPNC	CGKNV	TCK	CG	--	ENNCQ	CG	VG	GTGP	DSCT	C	--	DSGC	CSCK	-----	

Fig. 2. Comparison of the deduced MT amino acid sequence of *Corbicula fluminea* with several bivalves MT sequences available in GenBank. Amino acids in red are identical in all species, amino acids in blue are identical in at least five species. The cysteine residues are highlighted.

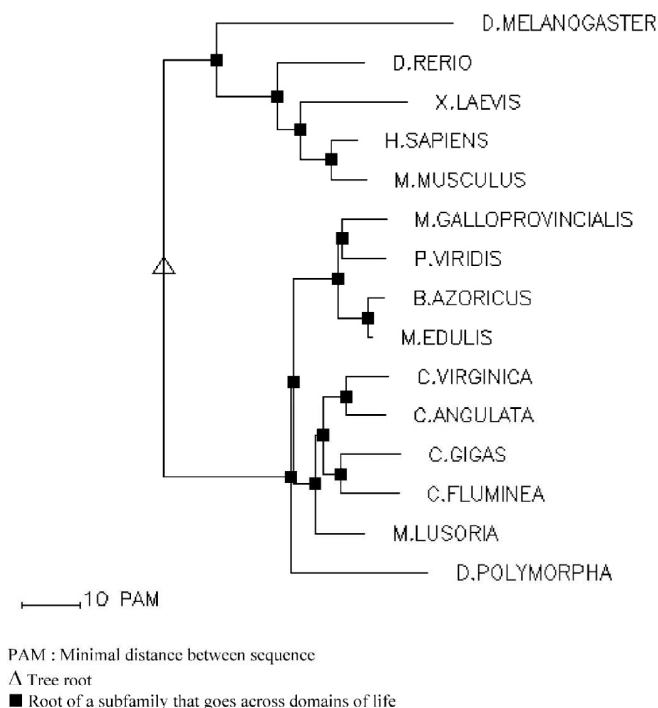


Fig. 3. Phylogenetic tree of metallothionein amino acid sequences of *Corbicula fluminea* and several vertebrates (*Danio rerio*, *Xenopus laevis*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*) and invertebrates (*Drosophila melanogaster*, *Dreissena polymorpha*, *Mytilus galloprovincialis*, *Mytilus edulis*, *Perna viridis*, *Bathymodiolus azoricus*, *Crassostrea virginica*, *Crassostrea angulata*, *Crassostrea gigas*, *Meretrix lusoria*). PAM, minimal distance between sequence; Δ , tree root; $\blacksquare$, root of a subfamily that goes across domains of life.

In the gills, MT and SOD transcript levels tend to be higher in July; CAT and pi-GST transcript levels show faint variations. No Se-GPx transcript level signal was detected in the gills.

The differences in tissue expression were also reported. MT expression is higher in the digestive gland compared to the gills in February, July and December. Similar differences were observed for CAT and Se-GPx for each time studied.

4. Discussion

In the present study, we identified an MT complete coding sequence from the freshwater bivalve *C. fluminea*. The MT cDNA encodes a protein of 73 amino acids, which is the average size (72–74 amino acids) of mollusc and nematode MT (Kägi, 1991). The deduced amino acid sequence shows the characteristic MT features, particularly the 21 cysteines and the absence of aromatic amino acid residues (Engelken and Hilderbrandt, 1999). The comparison between the *C. fluminea* MT sequence and MT of other bivalves revealed highly conserved cysteine positions. The protein exhibits nine Cys–X–Cys motifs, these clusters are involved in the capture of the metallic ions (Viarengo and Nott, 1993).

The identification of MT sequence in *C. fluminea* allowed us to study the seasonal expression of MT in parallel with SOD, CAT, pi-GST and Se-GPx transcripts in the digestive gland and the gills of this bivalve, over a 1-year period. Indeed, a biomarkers battery can be used to evaluate exposure to different contaminants in biomonitoring programmes in order to cover as many groups of toxic compounds as possible (Cajarville et al., 2000). In bivalves, many studies used MT induction to monitor pollutions by heavy

metals (Lionetto et al., 2001), induction of GPx activity to point out PCB (polychloride biphenyls) and PAH (polycyclic aromatic hydrocarbons) exposure (Martín-Díaz et al., 2007), CAT induction to assess the presence of B[a]P (Benzo[a]pyrene) and SOD and GST induction were related to B[a]P and PAH (Cheung et al., 2001).

In our results, MT transcripts were higher in the digestive gland and the gills of bivalves collected in July. This result could be linked to the increasing metabolic activity related to the seasonal temperature elevations. Indeed, temperature elevation is followed by an increase of oxygen consumption resulting in ROS accumulation (Rajagopal et al., 2005; Verlecar et al., 2007). Our results are in correlation with those obtained with *Mytilus galloprovincialis* exposed to different water temperatures (5, 18 and 25 °C) for 34 days: the highest MT levels were obtained at 25 °C (Serafim et al., 2002). *Mytilus edulis* from the northern Baltic Sea also showed a seasonal variability of the MT contents, higher level being reported in summer (Leinio and Lehtonen, 2005). However, studies on the MT seasonal variability provides conflicting results: on the one hand, *Mytilus galloprovincialis* showed higher MT levels in winter and lower in summer (Ivankovic et al., 2005), on the other hand, no MT variations were reported in *M. galloprovincialis* collected in different periods (Petrovic et al., 2001; Bocchetti and Regoli, 2006). Therefore, in the case of *C. fluminea*, it could be interesting to perform monthly sampling between May and August to discriminate the effect of water temperature and to show a possible correlation between the increase of MT expression in July and the necessity of a more efficient protection against peroxidative damage during this period.

SOD and CAT expression also showed a tendency to be higher in July. SOD catalyses the dismutation of superoxide into hydrogen peroxide, which is the substrate of CAT. Therefore, temperature-induced oxidative stress could explain the upward trend of SOD and CAT transcript levels on summer. Enzymatic activities of SOD and CAT showed similar seasonal patterns in *M. galloprovincialis* from two Basque estuaries. Highest and lowest activities were reported in summer and winter, respectively (Orbea et al., 2002). An induction of SOD and CAT activities was reported in the brown mussel *Perna viridis* in correlation with temperature increase (Wilhelm Filho et al., 2001).

pi-GST transcript level showed no significant variation in the digestive gland and the gills of *C. fluminea*. These results are in agreement with those obtained on *M. galloprovincialis*: no statistically significant seasonal variations of GST activity were reported (Bocchetti and Regoli, 2006).

Se-GPx expression did not show a significant change in the digestive gland of *C. fluminea*. Similar results have also been pointed out in *M. galloprovincialis* (Orbea et al., 2002). Moreover, we did not observe any signal in the gills. Very low Se-GPx mRNA level was also reported in the gills in a precedent study performed on the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* (Doyen et al., 2008).

Higher MT, CAT and Se-GPx transcript levels were pointed out in the digestive gland compared to the gills. Similar results have been reported at the protein and enzymatic levels by other authors in the bivalves *Ruditapes decussatus* and *M. edulis* (Power and Sheehan, 1996; Bebianno and Serafim, 2003; Geffard et al., 2005). We observed that SOD and pi-GST transcript levels are generally similar in both digestive gland and gills of *C. fluminea*, in accordance with studies carried out on *Perna perna* (Almeida et al., 2005) and *Perna viridis* (Verlecar et al., 2007).

The assessment of MT, CAT, SOD, GST and GPx seasonal mRNA patterns will be useful prior to using these genes expression in biomonitoring. Our results showed that the few fluctuations observed at the mRNA level are supposed to correspond to seasonal parameter such as water temperature.

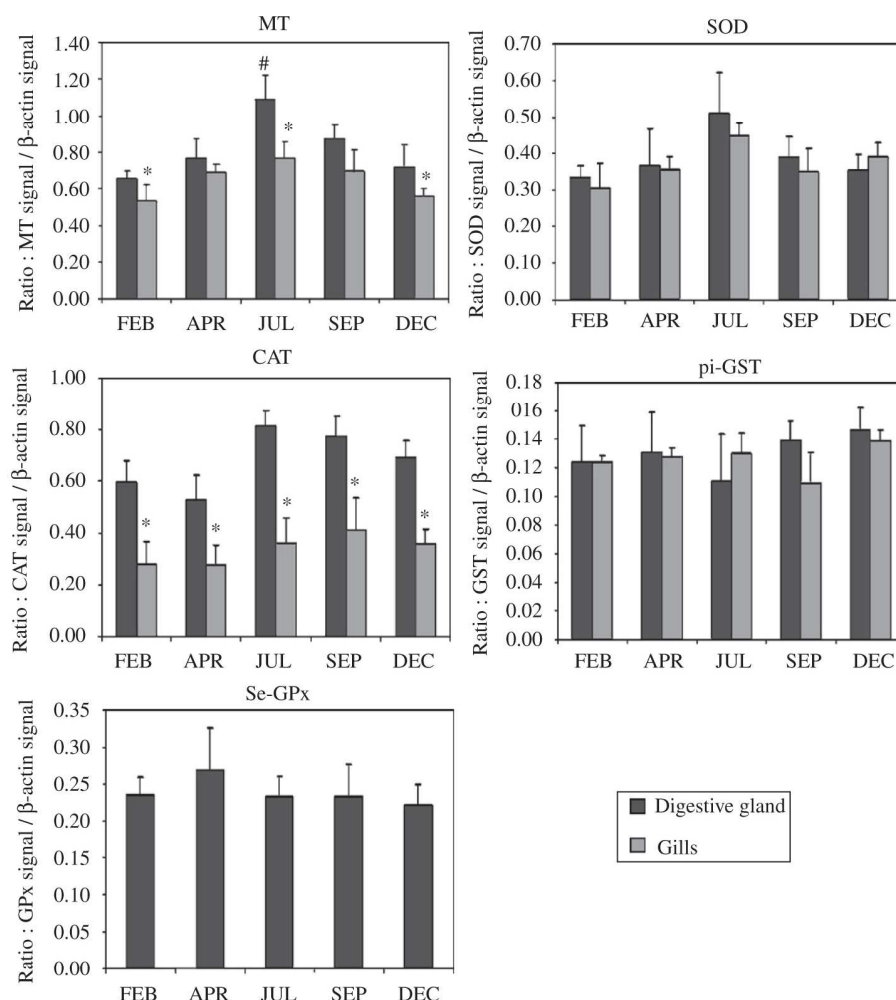


Fig. 4. Seasonal expression levels of MT, SOD, CAT, pi-GST and Se-GPx transcripts in the digestive gland and the gills of *Corbicula fluminea*. *indicates significant differences between digestive gland and gills ($P < 0.05$), # indicates significant increase on July ($P < 0.05$).

5. Conclusion

A low increase of MT in July and a tendency of SOD and CAT transcript levels to be higher in July were noted. We observed no significant seasonal variation of pi-GST and Se-GPx mRNA level. It is important to know the seasonality on the antioxidant status of the bivalve studied for the interpretation of biomonitoring data. According to our results, mRNA expression of these five genes could be used as biomarker throughout the year.

Funding sources

This work was supported by the CPER Lorraine. Aurélie Bigot was the recipient of a Ph.D. fellowship from the Region Lorraine.

Our study was conducted in accordance with national and institutional guidelines for the protection of human subjects and animal welfare.

Acknowledgments

The authors thank P. Wagner for the sampling of bivalves.

Appendix A. Supporting Information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.ecoenv.2008.04.014.

References

- Almar, M., Otero, L., Santos, C., Gallegho, J.G., 1998. Liver glutathione content and glutathione-dependent enzymes of two species of freshwater fishes as bioindicators of chemical pollution. *J. Environ. Sci. Health* 33, 769–783.
- Almeida, E.A., Bainy, A.C.D., Dafre, A.L., Gomes, O.F., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., 2005. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 318, 21–30.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76, 160–202.
- Baudrimont, M., Lemaire-Gony, S., Ribeyre, F., Metivaud, J., Boudou, A., 1997. Seasonal variations of metallothionein concentrations in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*). *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 118, 361–367.
- 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., Serafim, M.A., 2003. Variation of metal and metallothionein concentrations in a natural population of *Ruditapes decussatus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 44, 53–66.
- Bocchetti, R., Regoli, F., 2006. Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic sea. Chemosphere 65, 913–921.
- Bouskill, N.J., Handy, R.D., Ford, T.E., Galloway, T.S., 2006. Differentiating copper and arsenic toxicity using biochemical biomarkers in *Asellus aquaticus* and *Dreissena polymorpha*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 65, 342–349.
- Britton, J.C., Morton, B., 1979. *Corbicula* in North America: the evidence reviewed and evaluated. In: Britton, J.C., Mattice, J.S., Murphy, C.E., Newland, L.W. (Eds.), Proceedings of the First International *Corbicula* Symposium. Texas Christian University Research Foundation, Texas, pp. 249–287.
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. Sci. Total Environ. 247, 295–311.
- Cheung, C.C.C., Zheng, G.J., Li, A.M.Y., Richardson, B.J., Lam, P.K.S., 2001. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and anti-oxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. Aquat. Toxicol. 52, 189–203.
- Corpet, F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Res. 16, 10881–10890.
- Deisseroth, A., Dounce, A.L., 1970. Catalase: physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. Physiol. Rev. 50, 319–375.
- Dondero, F., Dagnino, A., Jonsson, H., Capri, F., Gastaldi, L., Viarengo, A., 2006. Assessing the occurrence of a stress syndrome in mussels (*Mytilus edulis*) using a combined biomarker/gene expression approach. Aquat. Toxicol. 78, S13–S24.
- Doyen, P., Bigot, A., Vasseur, P., Rodius, F., 2008. Molecular cloning and expression study of pi-class glutathione S-transferase (pi-GST) and selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) transcripts in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 147, 69–77.
- Engelken, J., Hilderbrandt, A., 1999. cDNA cloning and cadmium-induced expression of metallothionein mRNA in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. Biochem. Cell Biol. 77, 237–241.
- Epp, O., Ladenstein, R., Wendel, A., 1983. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. Eur. J. Biochem. 133, 51–69.
- Fridovich, I., 1989. Superoxide dismutases. An adaptation to aparamagnetic gas. J. Biol. Chem. 264, 7761–7764.
- Geffard, A., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., 2005. Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels, *Mytilus edulis*? Ecotoxicol. Environ. Saf. 61, 209–220.
- Geffard, A., Quéau, H., Dedourge, O., Biagianti-Risboug, S., Geffard, O., 2007. Influence of biotic and abiotic factors on metallothionein level in *Gammarus pulex*. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 145, 632–640.
- Ivankovic, D., Pavicic, J., Erk, M., Filipovic-Marijic, V., Raspor, B., 2005. Evaluation of the *Mytilus galloprovincialis* lam. Digestive gland metallothionein as a biomarker in a long-term field study: seasonal and spatial variability. Mar. Pollut. Bull. 50, 1303–1313.
- Kägi, J.H.R., 1991. Overview of metallothionein. Methods Enzymol. 205, 613–626.
- Kägi, J.H.R., Schäffer, A., 1988. Biochemistry of metallothionein. Biochemistry 27, 8509–8515.
- Ketterer, B., Coles, B., Meyer, D.J., 1983. The role of glutathione in detoxication. Environ. Health Perspect. 49, 59–69.
- 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.
- Leinio, S., Lehtonen, K.K., 2005. Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic sea. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 140, 408–421.
- Lionetto, M.G., Giordano, M.E., Caricato, R., Pascariello, M.F., Marinosci, L., Schettino, T., 2001. Biomonitoring of heavy contamination along the Salento coast (Italy) by metallothionein evaluation in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus*. Aquat. Conserv.: Mar. Freshwater Ecosyst. 11, 305–310.
- Livingstone, D., Lips, F., Garcia Martinez, P., Pipe, R., 1992. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. Mar. Biol. 122, 265–276.
- Marie, V., Baudrimont, M., Boudou, A., 2006. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. Chemosphere 65, 609–617.
- Martin-Diaz, M.L., Blasco, J., Sales, D., DelValls, T.A., 2007. Biomarkers study for sediment quality assessment in Spanish ports using the crab *Carcinus maenas* and the clam *Ruditapes philippinarum*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 53, 66–76.
- Orbea, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Sole, M., Porte, C., Cajaraville, M.P., 2002. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). Aquat. Toxicol. 58, 75–98.
- Petrovic, S., Ozretic, B., Krajnovic-Ozretic, M., Bobinac, D., 2001. Lysosomal membrane stability and metallothioneins in digestive gland of mussels (*Mytilus galloprovincialis* lam.) as biomarkers in a field study. Mar. Pollut. Bull. 42, 1373–1378.
- Power, A., Sheehan, D., 1996. Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel *Mytilus edulis*. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 114, 99–103.
- Rajagopal, S., van der Velde, G., Jansen, J., van der Gaag, M., Atsma, G., Janssen-Mommen, J.P.M., Polman, H., Jenner, H.A., 2005. Thermal tolerance of the invasive oyster *Crassostrea gigas*: feasibility of heat treatment as an antifouling option. Water Res. 39, 4335–4342.
- Raspor, B., Dragun, Z., Erk, M., Ivankovic, D., Pavicic, J., 2004. Is the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* a tissue of choice for estimating cadmium exposure by means of metallothioneins? Sci. Total Environ. 333, 99–108.
- Roesijadi, G., 1996. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 113, 117–123.
- Serafim, M.A., Company, R.M., Bebianno, M.J., Langston, W.J., 2002. Effect of temperature and size on metallothionein synthesis in the gill of *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. Mar. Environ. Res. 54, 361–365.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. Biochem. J. 360, 1–16.
- Statgraphics, 1995. Statgraphics Plus V2.0 User Manual. In: Manugistics (Ed.). Rockville.
- Thornalley, P.J., Vasák, 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.
- Vasak, M., 2005. Advances in metallothionein structure and functions. J. Trace Elem. Med. Biol. 19, 13–17.
- Verlecar, X.N., Jena, K.B., Chainy, G.B.N., 2007. Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature. Chem. Biol. Interact. 167, 219–226.
- Viarengo, A., Nott, J.A., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 104, 355–372.
- Wilhelm Filho, D., Tribess, T., Gaspari, C., Claudio, F.D., Torres, M.A., Magalhães, A.R.M., 2001. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). Aquaculture 203, 149–158.



Etude de l'expression saisonnière des ARNm des gènes de détoxification chez le bivalve d'eau douce *Unio tumidus*

1. Résultats

Les niveaux d'expression des ARNm de SOD, CAT, Se-GPx, GST-pi et MT dans les glandes digestives d'*Unio tumidus* prélevées en avril, juillet, septembre et décembre sont décrits dans la figure 36. Le pH et la température de l'eau ont été mesurés à chaque prélèvement (Tableau 11).

	Avril	Juillet	Septembre	Décembre
Taille des bivalves (cm)	[6,5-8]	[6-8]	[7-8,5]	[6-7,5]
pH	7,84	8,73	9,18	8,87
Température (°C)	13	28	23,5	5,2

Tableau 11 : Taille des *Unio tumidus*, pH et température de l'eau mesurés lors des prélèvements.

Les niveaux de transcription de CAT, Se-GPx et GST-pi présentent des profils similaires : le niveau d'expression le plus faible est observé en avril, puis une augmentation de l'expression est notée en juillet, septembre et décembre, avec une expression maximale en décembre. Les niveaux de transcrits de MT les plus faibles sont notés en avril et juillet, suivi d'une augmentation de l'expression à partir de septembre avec un niveau maximal en décembre. Le niveau d'expression le plus faible de la SOD est également observé en avril et les niveaux les plus élevés en juillet, septembre et décembre.

2. Discussion

Le métabolisme des bivalves est connu pour varier avec la saison en réponse à des facteurs abiotiques tels que la température ou la salinité, et à des facteurs biotiques tels que la disponibilité alimentaire ou le cycle de reproduction (Livingstone, 1981).

Dans notre étude, l'expression des ARNm de SOD, CAT, Se-GPx, GST-pi et MT est plus élevée en décembre. Une augmentation des activités de la SOD, de la CAT et de la GPx a été

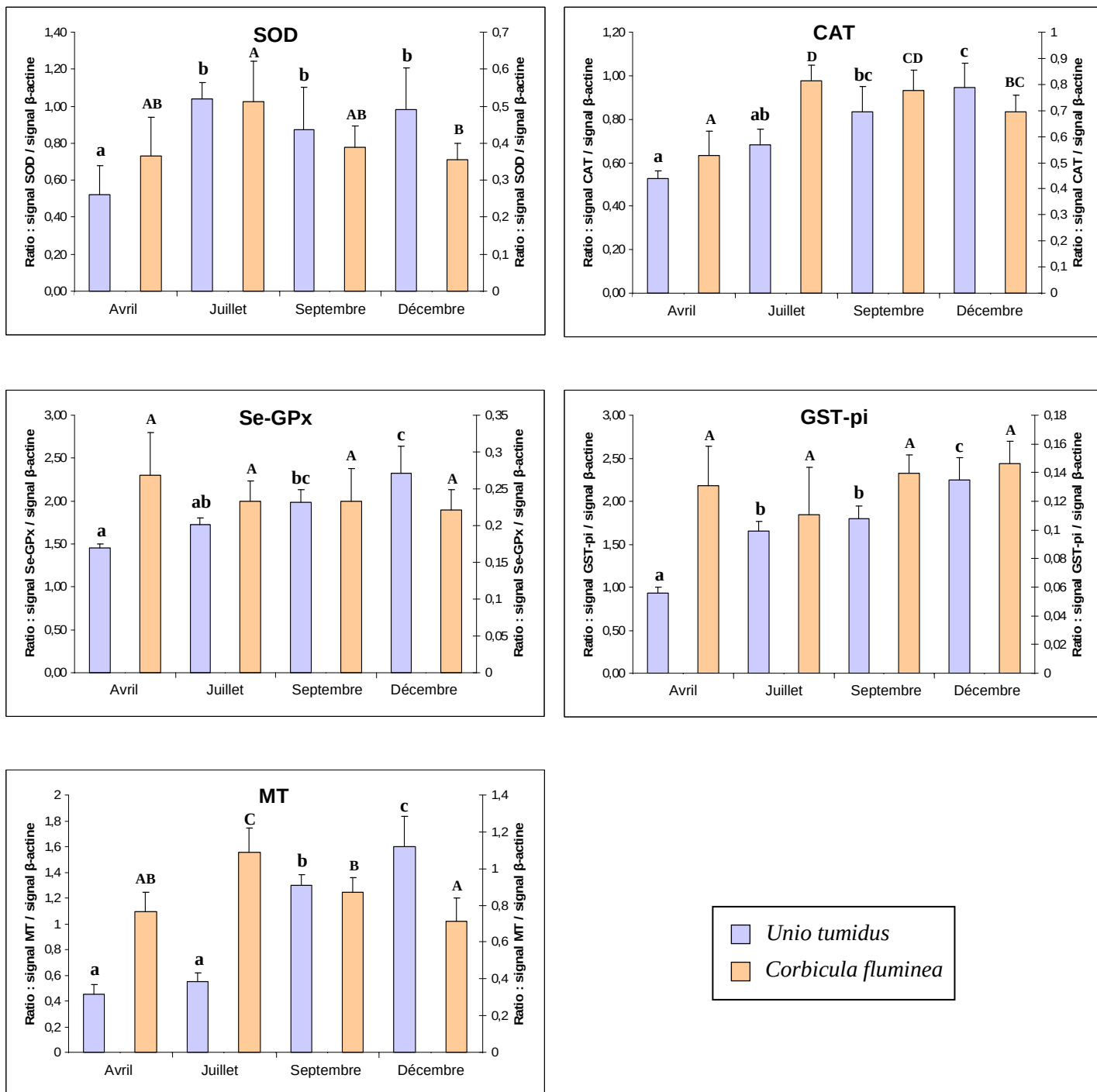


Figure 36 : Niveaux d'expression transcriptionnelle normalisée saisonniers des transcrits de SOD, CAT, Se-GPx, GST-pi et MT dans les glandes digestives d'*Unio tumidus* et de *Corbicula fluminea*. Les moyennes marquées d'une même lettre sont significativement identiques ($P > 0,05$).



reportée en novembre au niveau des glandes digestives de *Perna viridis* (Verlecar et al., 2008). Des études réalisées sur *Macoma balthica* et *Mytilus galloprovincialis* ont montré une augmentation du niveau de MT en hiver, alors que les niveaux les plus faibles sont notés en été (Bordin et al., 1997; Ivankovic et al., 2005). Une influence de la saison sur les activités de la SOD et des GST a également été démontrée chez *Mytilus galloprovincialis*. Les activités les plus fortes sont observées en hiver (février) et les plus faibles au printemps (mai) (Borkovic et al., 2005).

Le niveau d'expression des gènes antioxydants chez *Unio tumidus* paraît être corrélé avec la saison. La faible température mesurée en décembre (5,2°C) pourrait induire un stress chez les organismes, déclenchant ainsi les défenses antioxydantes. Il a ainsi été montré que la moule *Modiolus modiolus* compense la diminution de température par l'augmentation des concentrations seuil en enzymes métaboliques (Lesser et Kruse, 2004).

Le cycle de reproduction associé à la diminution de la biodisponibilité en phytoplancton qui constitue la source énergétique majeure pour les organismes filtreurs durant l'hiver, peuvent affecter le métabolisme des bivalves. Une étude portant sur les organismes macrobenthiques a montré que les variations de température avaient une influence sur le système digestif et le développement des gonades (Brey, 1995). Chez les *Unioidea*, la gamétogenèse commence en septembre jusqu'en novembre, puis débute l'étape de maturation qui s'achève en février-début mars (Şereflişan et al., 2009). L'augmentation de l'expression de la SOD, de la CAT, de la Se-GPx, de la GST-pi et de la MT en septembre et décembre chez *Unio tumidus* pourrait être corrélée à l'augmentation de l'activité métabolique liée à la diminution de la température qui est susceptible de provoquer des changements au niveau du statut nutritif et hormonal.

Le niveau d'expression des ARNm de SOD augmente dès le mois de juillet et se maintient en septembre et en décembre. La SOD est une enzyme antioxydante majeure qui convertit l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Nos résultats pourraient donc suggérer que l'anion superoxyde est produit durant les activités métaboliques dès le mois de juillet. L'élévation de la température permet la libération des larves chez *Unio tumidus* et pourrait provoquer l'augmentation de l'activité métabolique et la production de ROS.

Chez *Unio tumidus* les niveaux d'expression des gènes antioxydants sont plus faibles en avril. Au printemps, les bivalves ne sont pas soumis à un stress lié à la température ou à l'insuffisance de ressource alimentaire puisque la température et la production de



phytoplancton augmentent durant cette période. La plus faible expression des ARNm paraît donc corrélée à la diminution du stress oxydant d'origine biotique ou abiotique.

3. Comparaison des résultats obtenus dans les études d'expressions saisonnières menées chez *Unio tumidus* et *Corbicula fluminea*

Lors d'une étude précédente, nous avons mesuré l'expression saisonnière de la SOD, de la CAT, de la Se-GPx, de la GST-pi et de la MT chez *Corbicula fluminea* sur une période de 1 an. Cette étude nous a permis de noter une augmentation du niveau de transcrits de MT et une tendance du niveau de transcrits de SOD et de CAT à augmenter en juillet. L'expression des ARNm de Se-GPx et de GST-pi n'ont pas montré de variations.

Unio tumidus et *Corbicula fluminea* sont deux espèces différentes de par :

- leur mode de reproduction :
 - *U. tumidus* est unisexué à fécondation interne et ovipares,
 - *C. fluminea* est hermaphrodite.
- leur démographie :
 - *U. tumidus* est autochtone du nord est de la France et d'Europe centrale et septentrionale,
 - *C. fluminea* est invasive et sa répartition naturelle s'étend aux régions tropicales et sub-tropicales d'Asie, d'Afrique, d'Australie, et de la Nouvelle-Guinée.

Des analyses en composantes principales (ACP) des expressions d'ARNm de SOD, CAT, Se-GPx, GST-pi et MT au niveau de la glande digestive, des températures et du pH de l'eau pour *Unio tumidus* ainsi que de l'oxygène dissous et de la conductivité pour *Corbicula fluminea* ont été réalisées pour chaque campagne de prélèvement. Les deux premiers axes ont été sélectionnés en raison de la rupture de pente qui leur succède.

Les variables injectées dans les ACP réalisées sur les données de *Corbicula fluminea* et d'*Unio tumidus* apparaissent comme étant informatives dans les plans F1xF2 présentés. Ils expriment respectivement plus de 60 et 90 % de la variance totale (Figures 37a et 38a).

Chez *Corbicula fluminea*, l'axe F1 est principalement défini par le niveau d'expression de la MT ainsi que la température de l'eau. L'axe F2 est quant à lui essentiellement corrélé au niveau d'expression des ARNm de GST-pi.

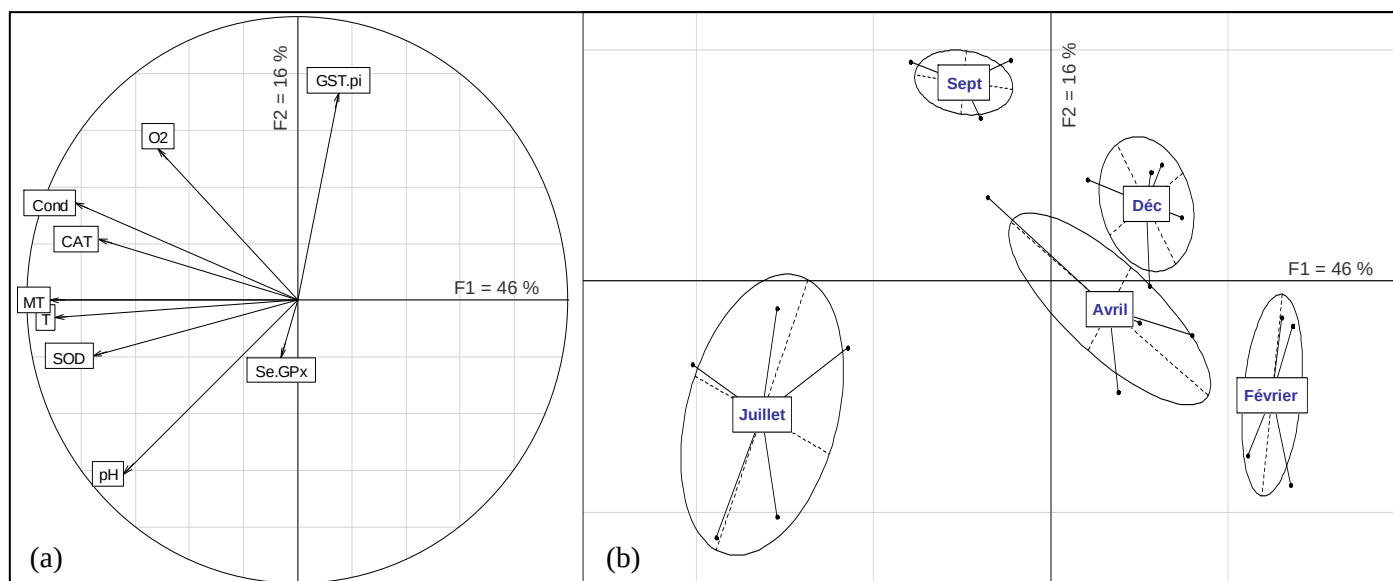


Figure 37 : Analyses en composantes principales des expressions d'ARNm de SOD, CAT, Se-GPx, GST-pi et MT, des températures (T), du pH, de l'oxygène dissous (O2) et de la conductivité (Cond) de l'eau chez *Corbicula fluminea*. (a) Le cercle des corrélations des variables analysées. (b) La carte factorielle présentant les variations saisonnières selon les axes sélectionnés.

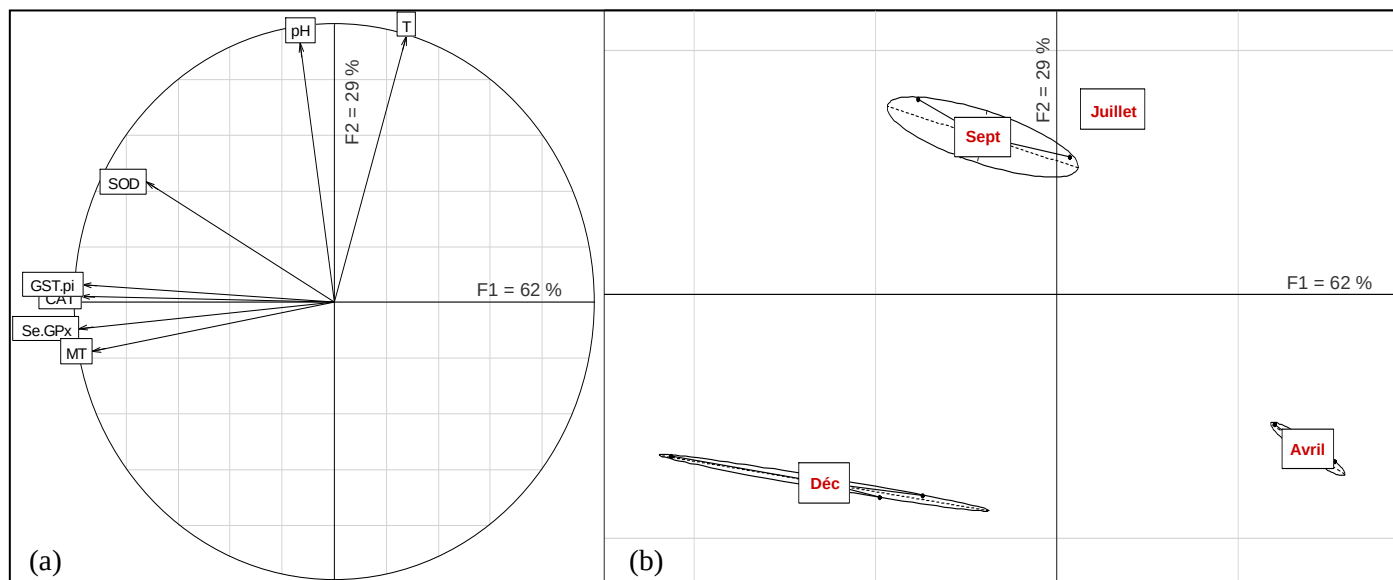


Figure 38 : Analyses en composantes principales des expressions d'ARNm de SOD, CAT, Se-GPx, GST-pi et MT, des températures (T) et du pH de l'eau chez *Unio tumidus*. (a) Le cercle des corrélations des variables analysées. (b) La carte factorielle présentant les variations saisonnières selon les axes sélectionnés.



L'analyse de la carte factorielle de la période d'étude, présentée Figure 37b, fait apparaître des différences marquées dans les variations saisonnières. L'axe factoriel F1 qui exprime 46 % de la variance totale sépare le mois de juillet des mois de décembre, février, avril et septembre qui représentent un gradient. Cette représentation reflète la différence d'expression de la MT, de la CAT et de la SOD qui sont plus fortement exprimés en juillet, mois où la température de l'eau est la plus élevée.

Chez *Unio tumidus*, l'axe F1 est défini par l'expression des ARNm des gènes de détoxification alors que l'axe F2 est corrélé à la température et au pH de l'eau.

L'analyse de la carte factorielle présentée Figure 38b montre que l'axe F1 qui exprime 62 % de la variance totale, sépare les mois étudiés en formant un gradient (décembre, septembre, juillet et avril), ce qui correspond aux différences de niveau d'expression des gènes de détoxification. En effet, les niveaux d'expression les plus élevés chez *Unio tumidus* sont notés en décembre, les niveaux intermédiaires sont observés en septembre et juillet, et les niveaux d'expression les plus faibles en avril. Les 29 % additionnels de la variance sont révélés par l'axe F2 qui délimite nettement l'ensemble formé par les mois de décembre et avril, situés dans la moitié inférieure du graphique, des mois de septembre et juillet, situés dans la moitié supérieure. Ces groupes se corréleront à la température et au pH de l'eau puisque avril et décembre correspondent aux mois où la température et le pH sont les plus faibles alors que septembre et juillet présentent les températures et les pH les plus élevés. Par ailleurs, le cercle des corrélations nous apprend que contrairement à *Corbicula fluminea*, les niveaux d'expression des ARNm chez *Unio tumidus* ne sont pas corrélés à la température, bien qu'une composante saisonnière existe : la figure 38b illustre bien la répartition sur l'axe F1 des différents mois en fonction de l'expression des ARNm. Il est donc probable que ces expressions soient corrélées à un paramètre variant de manière saisonnière mais non mesuré ici. De plus, septembre et décembre forment des nuages de points plus dispersés ce qui caractérise des différences inter-individus plus importantes. Or septembre correspond à la période gamétogénèse et décembre au début de la maturation : les variations inter-individuelles pourraient donc être corrélées au cycle de reproduction d'*Unio tumidus*.

Les positions des points de prélèvement mensuels sur les plans factoriels des deux bivalves s'organisent le long d'une ellipse qui caractérise les variations saisonnières. Les centres de gravité, correspondant à chacun des mois, se suivent dans l'ordre chronologique.

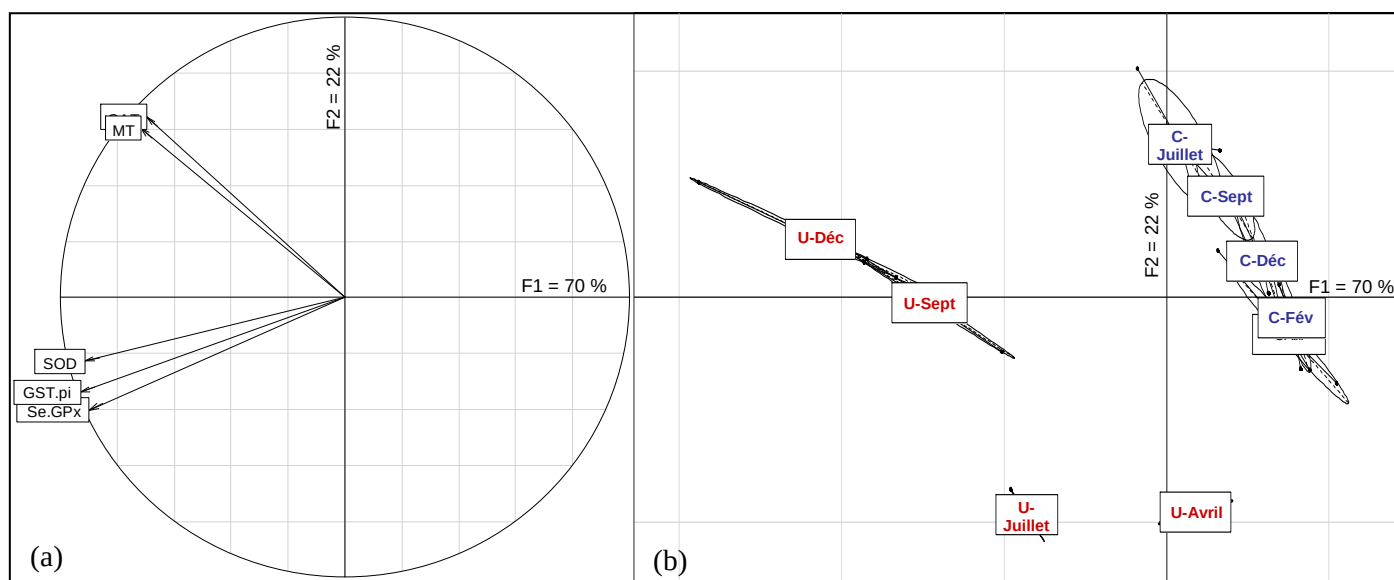


Figure 39 : Analyses en composantes principales des expressions d'ARNm de SOD, CAT, Se-GPx, GST-pi et MT des deux bivalves. (a) Le cercle des corrélations des variables analysées. (b) La carte factorielle présentant les niveaux d'expression des gènes de détoxification des deux études combinées : *Unio tumidus* en rouge et *Corbicula fluminea* en bleu, selon les axes sélectionnés.



Ces observations peuvent être confirmées et précisées par les résultats de l'analyse conjointe des niveaux d'expression des ARNm des gènes de détoxification chez les deux bivalves étudiés, dont l'ACP et la carte factorielle sont présentées Figure 39. Les deux bivalves sont clairement discriminés en fonction des axes F1 et F2 exprimant 70 % et 22 % de la variance totale.

Chez la corbicule, les centres de gravité des mois étudiés sont beaucoup plus rapprochés par rapport aux centres de gravité d'*Unio tumidus*. Cette observation pourrait témoigner d'une plus forte similarité des niveaux d'expression des gènes de détoxification tout au long de l'année chez la Corbicule.

La répartition des nuages de points par mois étudiés est globalement plus homogène chez *Corbicula fluminea* que chez *Unio tumidus* et pourrait être corrélée à des différences inter-individuelles moins importantes.

De plus, cette analyse conjointe nous apprend que les niveaux de SOD, GST-pi et Se-GPx varient peu chez *Corbicula fluminea* comparativement à *Unio tumidus*, alors que l'échelle de variation de MT et CAT sont similaires chez les deux espèces.

Cette étude démontre l'importance des facteurs biotiques et abiotiques autre que les polluants chimiques sur le niveau d'expression des gènes de détoxification chez le bivalve *Unio tumidus*. L'interprétation des réponses de ces gènes en tant que biomarqueurs sur une étude à long terme doit donc être réalisée avec précautions.



PARTIE 3

ÉTUDE DE L'EXPRESSION DES GÈNES DE DÉTOXICATION CHEZ DES BIVALVES SOUMIS À DIFFÉRENTES PERTURBATIONS

PUBLICATION 2

Early defence responses in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* exposed to copper and cadmium: transcriptional and histochemical studies

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence des réponses précoces d'exposition au cuivre et au cadmium chez le bivalve *Corbicula fluminea*. Des groupes de six individus ont été soumis aux conditions d'exposition suivantes pendant 12h :

- exposition au cuivre seul : 10 ou 50 µg Cu/L,
- exposition au cadmium seul : 2, 10 ou 50 µg Cd/L,
- exposition aux mélanges : 10 µg Cu/L + 10 µg Cd/L ou 50 µg Cu/L + 50 µg Cd/L.

Les niveaux d'expression des ARNm de la SOD, de la CAT, de la Se-GPx, de la pi-GST et de la MT ont été mesurés dans la glande digestive et les branchies grâce à la technique de RT-PCR en temps réel (Tableau 12). L'étude histologique du système lysosomal et des lipides neutres a été réalisée dans la glande digestive des bivalves. La Réponse Intégrée des Biomarqueurs (IBR) a ensuite été calculée dans le but de standardiser les valeurs des biomarqueurs seuls et ensembles, afin de faciliter l'interprétation des effets biologiques.

Au niveau de la glande digestive, nous avons observé une diminution de l'expression de la SOD après une exposition à 10 µg Cu/L, puis une augmentation après 50 µg Cu/L. Une augmentation de l'expression de la SOD après une exposition à 10 µg Cd/L a également été notée et pourrait suggérer son implication dans la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène.

L'expression de la Se-GPx augmente au niveau des branchies après une exposition à 10 µg Cu/L, ainsi qu'à 2, 10 et 50 µg Cd/L. Ce résultat peut être dû à la production de peroxyde d'hydrogène produit par la conversion de l'anion superoxyde résultant de la toxicité du cuivre et du cadmium.



Une augmentation significative de l'expression des ARNm de GST-pi a été observée dans les branchies après une exposition à 10 µg Cd/L, 10 et 50 µg Cu/L.

Le niveau d'expression des transcrits de MT augmente significativement en réponse à une intoxication à 50 µg Cu/L et 2, 10 et 50 µg Cd/L dans les branchies, et à 10 µg Cu/L dans la glande digestive.

Une inhibition de l'expression de la SOD, de la CAT, de la Se-GPx et de la GST-pi a été notée dans la glande digestive après une exposition à 10 µg Cu/L. Une diminution de l'expression de la SOD et de la CAT dans les branchies et de la MT dans la glande digestive a également été observée avec les plus fortes concentrations en Cu et en Cd. Ces observations suggèrent un effet toxique des métaux.

Les niveaux d'expression de la Se-GPx et de la GST-pi dans les branchies et de la MT dans les glandes digestives augmentent en réponse à une faible concentration en métaux, mais tendent à diminuer après une exposition à 50 µg/L de Cu ou Cd, ce qui suggère un possible effet hormétique. Les capacités des organismes à détoxifier les ROS peuvent être débordées.

	Cu		Cd			Cu + Cd	
	10	50	2	10	50	10+10	50+50
SOD-GD	–	+		+			–
SOD-BR		–	–		–		–
CAT-GD	–			–	–		++
CAT-BR	--	–	–	–	–	–	–
Se-GPx-GD	–		–				–
Se-GPx-BR	++		+	+	+	+	+
GST-pi-GD	–		–	–	–	–	–
GST-pi-BR	++	+		+		+	+
MT-GD	+	–			–	–	–
MT-BR	–	+	+	++	+	+	+

Tableau 12 : Récapitulatif des niveaux d'expression des ARNm de SOD, CAT, Se-GPx, GST-pi et MT dans la glande digestive (GD) et les branchies (BR) de *Corbicula fluminea*, après intoxication à 2, 10 ou 50 µg/L de cuivre et/ou cadmium pendant 12h.

(+) : augmentation significative du niveau d'expression par rapport au témoin.

(–) : diminution significative du niveau d'expression par rapport au témoin.

() : aucune différence significative par rapport au témoin.

Les bivalves exposés au cadmium montrent un développement plus faible du système lysosomal en raison d'une plus faible quantité de lysosomes et non d'une diminution du volume des lysosomes. Cette observation est encore plus marquée chez les individus exposés aux mélanges. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les lysosomes contenant des métaux



sont immédiatement expulsés des cellules.

Au contraire, le système lysosomal des organismes exposés au cuivre tendent à disposer d'une densité de surface plus importante, associée avec une quantité de lysosomes plus élevée. Ces observations pourraient être dues à la fission des plus grands lysosomes. Il a été établi que les métaux peuvent être neutralisés par la formation de complexes MT-métaux, qui sont transportés dans les lysosomes pour minimiser leurs possibles effets toxiques. Les lysosomes et les MT jouent ainsi un rôle important dans la détoxification des métaux chez les invertébrés.

Les résultats ont montré une diminution de la quantité de lipides neutres après une exposition au cuivre et au cadmium, ce qui pourrait être due à une augmentation de la consommation de cette ressource énergétique dans le but de maintenir les procédés de détoxification cellulaires.

L'analyse de l'IBR nous a permis de noter que les effets de la combinaison du cuivre et du cadmium sont additifs au niveau de la réponse des biomarqueurs.

Peu d'études sur la réponse précoce de l'expression des ARNm ont été réalisées chez les bivalves d'eau douce. Ces travaux mettent en évidence la réponse du système lysosomal, des lipides neutres et de tous les gènes testés dès 12h en réponse à un stress oxydant généré par le cuivre et le cadmium. Nos résultats suggèrent que l'expression des ARNm de SOD, CAT, Se-GPx, GST-pi et MT ainsi que le système lysosomal et les lipides neutres peuvent être utilisés comme biomarqueurs précoces d'exposition au cuivre et au cadmium chez *Corbicula fluminea*. L'utilisation d'une batterie de biomarqueurs paraît nécessaire pour l'évaluation des effets biologiques d'une pollution environnementale.



Early defence responses in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* exposed to copper and cadmium: transcriptional and histochemical studies¹

Aurélie Bigot*, Laëtizia Minguez*, Laure Giambérini* and François Rodius*

* Lab. L.I.E.B.E - Université de Metz, CNRS UMR 7146, Rue Delestraint, 57070 Metz, France

Abstract

The aim of the present study was to measure the early effects of copper (10 and 50 µg/L) and cadmium (2, 10 and 50 µg/L) in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* exposed for 12h in laboratory. Transcription levels of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx), pi-class glutathione S-transferase (pi-GST), metallothionein (MT) in digestive gland and gills, and response of lysosomal system and neutral lipids in digestive gland were determined after the exposure period. Results showed that lysosomal system, neutral lipids content and gene expression were modified, suggesting their early response against oxidative stress and their important role in cell integrity. The integrated biomarker response was calculated and showed that the effects of the combinations of Cu and Cd on the biomarker responses are additive. MT and pi-GST mRNA expressions correspond to the broadest ranges of response. As efficient biomarkers should have an early warning capacity, SOD, CAT, Se-GPx, pi-GST, MT expressions, lysosomal system and neutral lipids could be used as biomarkers of metal contamination in the aquatic environment.

Keywords: cellular and molecular biomarkers, *Corbicula fluminea*, copper, cadmium, antioxidant system, lysosomes.

¹ Article soumis à Environmental Toxicology



1. Introduction

Environmental pollution by metals had increased in the last decades due to their extensive use in agricultural, chemical and industrial processes. We selected two metals, copper (Cu) and cadmium (Cd), which are among the main toxic metals detected in the aquatic environment. Although Cu is a trace element essential to life, it is also one of the most toxic heavy metals catalysing the formation of ROS (reactive oxygen species) through the Haber-Weiss reaction (Kayali and Tarhan 2003). Cd can also generate oxidative stress, but the mechanisms are poorly understood.

Exposure of marine mollusks to metals had shown an oxidative stress induction due to the formation of ROS (Viarengo et al. 1990). To protect against oxidative stress, organisms possess defences such as superoxide dismutases (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidases (GPx), glutathione S-transferases (GST) and metallothioneins (MT).

SOD, CAT and GPx are major components of the antioxidant system. SOD catalyses the first step converting superoxide radicals to hydrogen peroxide and divalent oxygen (Fridovich 1989), then CAT and GPx catalyse the reduction of hydrogen peroxide (Deisseroth and Dounce 1970). Two GPx isoforms have been identified: selenium-dependent GPx (Se-GPx) and selenium-independent GPx. Se-GPx catalyses the reduction of organic and inorganic peroxides while selenium-independent GPx reduces only organic peroxide (Almar et al. 1998).

GST are a multifunctional family of cytosolic enzymes involved in phase II biotransformation. They catalyse the conjugation of electrophilic substrates with reduced glutathione (Ketterer et al. 1983). Eight classes of isoenzymes can be distinguished, alpha, beta, zeta, theta, kappa, mu, pi and sigma, based on their substrate specificity, immunological properties and protein sequence homology (Sheehan et al. 2001). Among GST isoforms, pi-class GST is the highest expressed (Salinas and Wong 1999).

MT are also involved in antioxidant defences via their capacity to scavenge hydroxyl radicals (Thornalley and Vasák 1985), but their predominant role is linked to cellular homeostasis and detoxification of essential and non-essential metals (Roesijadi 1996; Vasák 2005). MT binding to excess of metals protects the organism against cytotoxicity (Cajaraville et al. 2000).

Like MT, the digestive lysosomal system plays an important role in sequestration and detoxification of toxic metals, therefore inducing measurable changes in the volume, size and number of lysosomes (Moore 1988; Regoli 1992). Neutral lipids represent an important



energy source for bivalve molluscs, particularly during gametogenesis. The neutral lipid content can be influenced by several environmental factors, like the food quality/quantity or exposure to some pollutants. Several studies have shown an accumulation of neutral lipids in tissues associated with lysosomal system damages. Such increased levels are often attributed to a chemically induced lipidosis and regarded as specific biomarkers of organic pollution (Domouhtsidou and Dimitriadis 2001; Moore 1988). Other stressors such as metal contamination seem to deplete digestive neutral lipid amount (Regoli 1992). Lysosomes and neutral lipid levels give general information about the physiological state of organisms (Domouhtsidou and Dimitriadis 2001; Guerlet et al. 2006; Moore 1988).

The use of antioxidant enzymes, MT, lysosomal system and neutral lipids as biomarkers of metal contamination has been evaluated by several authors in *Dreissena polymorpha* (De Lafontaine et al. 2000; Gagné et al. 2002; Giambérini and Cajaraville 2005), *Mytilus edulis* (Lemoine et al., 2000), *Mytilus galloprovincialis* (Hoarau et al. 2006) and *Crassostrea gigas* (Geffard et al. 2002; Jo et al. 2008).

Bivalve molluscs are relevant species to study the quality of the aquatic environment. They are sedentary, filter water to cope with nutritional and respiratory needs and can accumulate pollutants. *Corbicula fluminea* is a freshwater bivalve originating from Asia, which has progressively colonised North America and Europe (Britton and Morton 1979).

The aim of this study was to measure a set of biomarkers (SOD, CAT, Se-GPx, pi-GST, MT, lysosomal system and neutral lipids) as early warning signals of chemical exposure in *Corbicula fluminea*. Clams were exposed to CuCl_2 and CdCl_2 for 12h. Fewer studies have been performed on short-time exposure in order to show possible early response. SOD, CAT, Se-GPx, pi-GST and MT mRNA levels were studied in the digestive gland and the gills, whereas lysosomal system and neutral lipids were analysed in the digestive gland. These tissues have been chosen as they are important target organs for metal accumulation (Tanhan et al. 2005). Integrated biomarker response (IBR) was calculated as defined by Beliaeff and Burgeot (2002). This method standardises the values of single biomarkers and puts them together, enhancing the interpretation of biological effects (Damiens et al. 2007).



2. Materials and methods

2.1. Exposure protocol

Corbicula fluminea adult specimens (27 to 37 mm in length) were collected at a reference location (Moselle River, France). They were acclimatized to the experimental conditions for 2 days in dechlorinated water under oxygenation. After this step, mussels were randomly divided into groups of six specimens. Each group was subjected to an exposure condition, six specimens were kept as controls (T-0h). The exposure was conducted at 18°C in 1 L tanks. Mussels were exposed to 10 and 50 µg Cu/L; 2, 10 and 50 µg Cd/L; and mixtures of 10 µg Cu/L + 10 µg Cd/L and 50 µg Cu/L + 50 µg Cd/L. Cu exposure levels were chosen according to a previous study performed in our laboratory which showed a significant increase of the volume of the digestive lysosomal and peroxisomal system in *Dreissena polymorpha* after 2 days of 10, 20 and 40 µg Cu/L exposure (unpublished results). Cd exposure levels were selected to surround the water quality limits for human consumption (10 µg/L) established by the World Health Organization.

After 12h, organisms were collected at each condition (control and exposure) to measure the SOD, CAT, Se-GPx, pi-GST and MT mRNA expressions and to analyse the lysosomal system response and the levels of neutral lipids. Digestive gland and gills from each *Corbicula* were immediately dissected. A piece of each digestive gland was cryoprotected during 10 minutes in phosphate buffer solution (0.05M, pH 7.4) containing 10% sucrose, embedded in Shandon Cryomatrix, frozen in nitrogen vapors and conserved at -80°C until sections (Giambérini and Cajaraville 2005). These samples were used for the histochemical study of lysosomes and neutral lipids. Gills and the remaining digestive glands were placed in 4 M guanidium isothiocyanate solution (Fermentas Life sciences, Vilnius, Lithuania) and also conserved at -80°C in liquid nitrogen to avoid RNA degradation.

2.2. Total RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNAs were extracted from 30 mg of tissue using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, USA). The RNA integrity was estimated by electrophoresis on a 1.5% agarose gel in TAE (Tris 40 mM, Acetic acid 1 mM, EDTA 40 mM) buffer and visualisation under UV light.



Reverse transcription was performed on 1 µg of total RNA using the Revert Aid MuLV RT Kit (Fermentas Life Sciences, Vilnius, Lithuania). Reaction was conducted at 42°C for 30 min in 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP mix, 2.5 µM of OligodT primer, 2.5 U/µL of Revert Aid MuLV RT and 1 U/µL of Ribolock RNase Inhibitor.

2.3. Quantitative real-time PCR

Evaluation of SOD, CAT, Se-GPx, pi-GST and MT gene expressions were carried out by real-time quantitative PCR using a SYBR Green dye (Applied Biosystems, Foster City, USA) in a MiniOpticon System according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad, Hercules, USA). Specific primers (SOD.CF400, SOD.CR400, CAT.CF300, CAT.CR300, GPx.CF100, GPx.CR100, GST.CF100, GST.CR200, MT.CF400 and MT.CR500) were used to amplify cDNA of SOD, CAT, Se-GPx, pi-GST and MT; β-actin cDNA was co-amplified as control using ACT.F100 and ACT.R200 primers. The primers were obtained from Invitrogen (Carlsbad, USA) and their sequences are given in Table 1.

Negative controls were carried out: no template control (NTC) and no reverse transcriptase control (No RT). NTC provides a control for external contamination or other factors that can result in a nonspecific increase in the fluorescence signal. No RT control should show no amplification in the subsequent PCR step since DNA polymerase cannot amplify RNA templates. Optimal primers quantity was evaluated across a range of concentrations between 150 and 600 nM. Dilutions of the cDNA mixture between 1:10 and 1:160 were tested to calculate the PCR efficiency (E), the results are indicated in legend of figure 1.

PCR were performed in triplicate in the following mixture: 4 µL of diluted cDNA, 10 µL of Power SYBR Green PCR Master Mix, and 300 nM of ACT or MT primers, or 600 nM of SOD, CAT, pi-GST or Se-GPx primers. The PCR steps consisted of 3 min-initial denaturation at 95 °C followed by 40 cycles of heat denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s, polymerisation at 72°C for 30 s, and a 10-min final extension at 72°C. A melting curve of PCR products (30-98°C) was also performed to ensure the absence of artifacts (data not shown).

Fluorescent signal from each PCR reaction was collected as peak-normalised values plotted versus the cycle number. The normalized fold SOD, CAT, Se-GPx, pi-GST or MT expression was calculated from the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen 2001) taking into account the PCR efficiency (E). The Ct corresponds to the number of PCR cycles at which a significant exponential increase in fluorescence is detected.



2.4. Histochemistry and Image analysis

Four to six sections (8µm) of digestive glands were cut in a CM3000 cryostat (Leica Instruments GmbH, Germany) and conserved at -80°C until required for staining.

2.4.1. Revelation of the lysosomal system and neutral lipids

The cytochemical reaction for lysosomal β -glucuronidase was carried out in unfixed cryostat sections using the substrate Naphthol AS-BI- β -D-glucuronide (Sigma N1875) as described by Cajaraville (Cajaraville et al. 1991), and adapted to freshwater organisms by Giambérini and Cajaraville (2005). An incubation in the substrate medium containing acetate buffer 0.05 M, NaHCO_3 50 mM, polyvinyl alcohol at a 20% (w/v) was carried out at pH 4.5 and 37°C for 30 min in moist atmosphere. After a rinsing step with NaCl, slides were stained with Fast Garnet GBC (Sigma F8761) (0.1% in phosphate buffer 0.05 M pH 7.4), and then fixed in Baker's formol before mounted in Kaiser's gelatine.

Unsaturated neutral lipids were demonstrated by oil red O staining (Moore 1988). Cryostat sections were fixed in Baker's formol for 15 min, followed by a rinsing step with triethylphosphate (60% in distilled water), stained in a 1% solution of Oil Red O in 60% triethylphosphate and washed in 60% triethylphosphate.

2.4.2. Image analysis

Biomarker responses were quantified by image analysis (Analysis pro 3.2, Olympus) using a Sony DP 50 colour video camera connected to an Olympus BX 41 microscope with a 100-x objective. For each individual, five fields of view were randomly analysed on one section. Areas not belonging to digestive tissues were discarded from the analysis. Four stereological parameters were calculated for lysosomes: volume density ($V_{V_L} = V_L/V_C$), surface density ($S_{V_L} = S_L/V_C$), surface to volume ratio (S_L/V_L), and numerical density ($N_{V_L} = N_L/V_C$) where C = digestive cell cytoplasm, L = lysosomes, N = number, S = surface, V = volume. For neutral lipids, only surface densities could be calculated ($S_{V_{NL}} = S_{NL}/V_C$, where C = digestive cell cytoplasm, NL = neutral lipids, S = surface and V = volume), indeed neutral lipid droplets often formed clusters in the digestive gland cells and their separation with image analysis was difficult.



2.5. Data analysis

For all statistical analysis, differences were considered as significant if $P < 0.05$. SOD, CAT, Se-GPx, pi-GST and MT expressions in the digestive gland and the gills were analysed with the parametric Student test using Statgraphics Plus software (Statgraphics, 1995).

Responses of lysosomal system and neutral lipids contents were studied with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's test after testing homoscedasticity of the data (assessed by Brown-Forsythe test), using Statistica software version 7.1, Statsoft, USA.

A method allowing the visualization of response patterns of a battery of biomarkers termed "Integrated Biomarker Response" (IBR) was applied for this experiment (Beliaeff and Burgeot 2002). In a first step, an IBR gathering SOD, CAT and Se-GPx expression in the digestive gland was calculated and named "OxStress". The final IBR consisted of "OxStress", pi-GST, MT, lysosomal system and neutral lipids. Only surface density (S_{VL}) among the four lysosomal parameters was used for star plots realization in order to avoid a lysosomal response over-represented in the final index value. Moreover, S_{VL} corresponds to general response of lysosomal system. The basis of the calculation for each biomarker is briefly described here (Beliaeff and Burgeot 2002). (1) Calculation of mean for each exposure condition. (2) Standardisation of data for each exposure condition: $Y = (X - m)/s$, where Y is the standardized value of the biomarker, X is the mean value of a biomarker from each exposure condition, m is the mean of the biomarker calculated for all the exposure condition, and s is the standard deviation calculated for the exposure condition-specific values of each biomarker. (3) Using standardized data, Z was computed as $+Y$ in the case of an activation and $-Y$ in the case of an inhibition, then the minimum value for all exposure condition for each biomarker was obtained and added to Z . Finally the score S was computed as $S = Z + |min|$ where $S \geq 0$ and $|min|$ is the absolute value. Star plot areas were calculated for all the biomarkers treated. Finally, the integrated biomarker response for each exposure condition and biomarker was calculated via the following formula:

$$IBR = \frac{1}{2} \sin(2\pi/n) \times S_1 \times S_2 + \dots + \frac{1}{2} \sin(2\pi/n) \times S_{n-1} \times S_n$$



3. Results

3.1. Biomarkers of defence responses in *Corbicula fluminea* digestive gland

The results of SOD, CAT, Se-GPx, pi-GST and MT gene expressions are reported in Fig. 1. In the digestive gland, a significant decrease of SOD, CAT, Se-GPx and pi-GST transcript levels and a significant increase of MT transcript level were observed after exposure to 10 µg Cu/L. Cd exposures and mixtures of Cu and Cd produced a decrease of pi-GST mRNA level. CAT transcript level increased significantly after exposure to mixture of 50 µg Cu/L + 50 µg Cd/L.

3.2. Biomarkers of defence responses in *Corbicula fluminea* gills

In the gills, exposure to 10 µg Cu/L produced a significant increase of Se-GPx and pi-GST mRNA expressions compared to control (Fig. 1). Cd exposure produced an increase of Se-GPx expression level at 2 and 10 µg Cd/L treatments whereas pi-GST expression showed only a significant increase at 10 µg Cd/L treatment. A significant increase of MT expression was observed at 2, 10 and 50 µg Cd/L exposure. Co-exposure to metal mixtures increased MT, Se-GPx and pi-GST mRNA expressions. A significant decrease of CAT expression was observed after metal mixtures exposures and no effect was observed for SOD expression.

3.3 Biomarkers of physiological integrity in *Corbicula fluminea* digestive gland

The quantitative measurement results of the lysosomal system structure and neutral lipids accumulation are reported in Fig. 2. Lysosomal system volume and surface, and numerical density showed a significant metal effect, whereas the surface to volume ratio, which is interpreted as the inverse of the lysosomal size, displayed no variation according to metals. Volume, surface and numerical density parameters tended to increase in clams exposed to Cu, whereas in organisms exposed to 50 µg Cd/L these parameters displayed a significant decrease compared to control. This reduction was much marked in clams exposed to the mixture, which presented about three-times less and two-times smaller lysosomes than non-exposed organisms. No significant difference between metal concentrations was observed. A decrease of the neutral lipid amounts was observed in clams for each exposure condition. This depletion was more pronounced in clams exposed to 10 µg Cu/L, 50 µg Cd/L and mixtures.



3.4. Integrated biomarker responses in *Corbicula fluminea* digestive gland

The integrated biomarker responses are shown in Fig. 3.

The final IBR (“OxStress”, pi-GST, MT, LS and NL) showed that in clams exposed to Cu and Cd, the higher responses were obtained with 50 µg Cu/L and 50 µg Cd/L. The highest response was obtained with the mixture of 50 µg Cu/L + 50 µg Cd/L showing that the effects of the mixtures of Cu and Cd on the final biomarker responses are additive.

Major biomarkers responses are pi-GST and OxStress for 2 and 10 µg Cd/L, pi-GST and MT for 50 µg Cd/L and for the mixture of 10 µg Cu/L + 10 µg Cd/L. For the mixture of 50 µg Cu/L + 50 µg Cd/L, lysosomal system and neutral lipids showed highest responses.

4. Discussion

Our results showed increase or decrease of biomarker responses in organisms exposed to metals.

Fifty µg Cu/L exposure had no significant effect on the CAT expression in digestive gland. In the freshwater planarian *Dugesia (Girardia) schubarti*, CAT activity was induced at concentration of 40, 80 and 160 µg Cu/L after 24h exposure (Guecheva et al. 2003). It could be interesting to test longer time exposures to show a possible CAT induction at the mRNA level.

In the digestive gland, SOD expression decreased after 10 µg Cu/L exposure, then increased after exposure to 50 µg Cu/L. Similar results have been observed in clam *Ruditapes decussates* exposed to 0.5, 2.5 and 25 µg Cu/L (Geret et al. 2002). Cd inhibits the electron transfer chain and causes superoxide radical formation (Wang et al. 2004). Therefore, the increase of SOD expression in *Corbicula fluminea* digestive gland exposed to 10 µg Cd/L could suggest its active involvement in dismutation of superoxide to hydrogen peroxide.

Se-GPx mRNA expression increased after exposure to 10 µg Cu/L, and after exposure to 2, 10 and 50 µg Cd/L in the gills. These increases may be due to the production of hydrogen peroxide resulting from the continue conversion of superoxide as a result of Cu and Cd toxicity. These results are consistent with other studies: GPx activity increased in the gills of the mussel *Pyganodon grandis* after exposure to 1.3 µg Cu/g dw (Giguère et al. 2003). In oyster *Crassostrea gigas* exposed to 100 µg Cd/L, the Se-GPx mRNA expression increased up to 3 days (Jo et al. 2008).



In *Corbicula fluminea* gills, pi-GST transcript level showed significant increase after exposure to 10 µg Cd/L, 10 and 50 µg Cu/L. These results are consistent with GST activity which was found to be induced by the presence of various metals in crab *Carcinus maenas* and in clam *Ruditapes philippinarum* (Martín-Díaz et al. 2008).

The level of MT mRNA transcript increased significantly in response to 50 µg Cu/L and Cd exposures in the gills, and to 10 µg Cu/L in the digestive gland. Our results are in accordance with other studies. An induction of MT expression was reported in the gills of the freshwater crab *Sinopotamon henanense* exposed to 5.8 mg Cd/L during 1 day (Ma et al. 2008) and in the aquatic worms *Tubifex tubifex* exposed to 50 µg Cu/L during 7 days (Mosleh et al. 2006).

An inhibition of SOD, CAT, Se-GPx and pi-GST expression was observed with 10 µg Cu/L exposure in the digestive gland. A decrease of SOD and CAT expressions in the gills and MT expression in the digestive gland were also observed with higher concentrations of Cu and Cd (50 µg/L). Similar results were obtained in other bivalves. A significant inhibition of SOD activity in the gills of mussel *Bathymodiolus azoricus* was pointed out after exposure of 25.4 µg Cu/L (Company et al. 2004). These observations may correspond to Cu and Cd toxic effects as previously observed in rat (Del Carmen et al. 2002), in oyster *Pinctada fucada* (Jing et al. 2006) and in crab *Charybdis japonica* (Pan and Zhang 2006). Our study showed that Se-GPx and pi-GST expressions in the gills and MT expression in the digestive gland increased in response to low concentrations of metal, but decreased after exposure to 50 µg/L of Cu or Cd, suggesting a possible hormesis effect. The organism ability to detoxify oxygen free radicals could be dropping. Our results are in correlation with those obtained with crab *Charybdis japonica* exposed to Cd (25 and 50 µg/L): SOD, CAT and GPx activities were reduced to the control level with 50 µg Cd/L dose exposure (Pan and Zhang 2006).

Clams exposed to Cd showed a less developed lysosomal system (lower V_{VL}) compared to control organisms, due to less numerous lysosomes. This result was much marked in organisms exposed to the mixture. In marine mollusc exposed to both organic and metallic pollutants, the decrease of lysosome number had often been reported as concomitant with lysosomal enlargement, indicating a fusion process of small lysosomes into larger ones (Maríngomez et al. 1989; Moore 1985; Regoli 1992). In our study, the organelle size did not change suggesting that lysosomes loaded with metals were immediately expelled of cells (e.g. increased exocytosis); this had been previously proposed as possible detoxification process (Guerlet et al. 2008; Viarengo and Nott 1993; Zorita et al. 2006). In contrast, the lysosomal system in copper-exposed organisms tended to display higher surface densities associated with more numerous lysosomes. Our results showed the same pattern than those obtained by



Alvarado et al. (2005) and Dondero et al. (2006) where *Scophthalmus maximus* or *Mytilus edulis* exposed to growing copper concentrations showed enlarged lysosomes. In our study, changes in lysosome structure in copper-exposed organisms could be due to a fission process of larger ones (Maríngomez and Baybay-Villacorta 2003), since no variation in the organelle size was observed compared to control. Variations of antioxidants and lysosomal stability were confirmed as sensitive early warning signals for biological disturbance.

Metal exposures caused a cascade of related cellular responses that involve the metallothionein pool and the lysosomal system of digestive cells. Metals are neutralized in form of MT-metal complexes that are transported into the lysosomes to minimize their possible toxic effects (Alvarado et al. 2005). MT levels and lysosomal responses are valuable biomarkers to assess metal exposure. Lysosomes and MT are very effective to sequester metals and they may represent the most important site of metal detoxification in invertebrates (Viarengo and Nott 1993).

Our results showed a reduction in the amount of neutral lipids, expressed as a decrease in their surface density after exposure to Cu and Cd. Others studies explained that metal contamination are likely to deplete digestive unsaturated neutral lipid contents in freshwater snail *Radix peregra* transplanted for 0, 3, 14 and 21 days at polluted sites and in mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to Cu and Cd for 15 days (Guerlet et al. 2006; Koukouzika and Dimitriadis 2008). The observed neutral lipid depletion may be due to an enhanced consumption of these energetic resources in order to sustain cellular detoxification processes (Regoli 1992).

The IBR allows to examine differences in responses between several doses of metal exposure by using variable biomarker combinations. The number of biomarkers included in the calculation of the IBR plays an important role affecting the relative weight of each biomarker in the final index value (Broeg and Lehtonen 2006).

The effects of the combinations of Cu and Cd on the final biomarker responses (“OxStress”, pi-GST, MT, LS and NL) are additive. However, conflicting results have been observed in mussel *Dreissena polymorpha*: mixtures consisting of 5 µg Cu/L + 2 µg Cd/L, 10 µg Cu/L + 2 µg Cd/L, 10 µg Cu/L + 20 µg Cd/L did not modify the MT response compared to single-metal exposure (Lecoeur et al. 2004).

Fewer studies on early defence responses had been performed in freshwater bivalves. Our study pointed out a response of lysosomal system, neutral lipids and all genes tested, as soon as 12h in response to the oxidative stress generated by Cu and Cd. The IBR showed that the effects of the combinations of Cu and Cd on the biomarker responses are additive. It appears



essential to include integrated multivariate analysis of biomarker responses to enhance information about global adverse environmental effects.

As efficient biomarkers should have an early warning capacity. Results suggest that SOD, CAT, Se-GPx, GST-pi, MT expressions, lysosomal system and neutral lipids could be used as biomarkers of Cu and Cd exposure in the aquatic environment in *Corbicula fluminea*. Nevertheless, field studies are necessary to use these findings in pollutant monitoring.

Acknowledgements

This work was supported by the CPER Lorraine. Aurélie Bigot and Laëtitia Minguez were respectively recipients of a Ph.D. fellowship from the Region Lorraine and from the French Ministry of Research.



References

- Almar M, Otero L, Santos C, Gallego JG. 1998. Liver glutathione content and glutathione-dependent enzymes of two species of freshwater fishes as bioindicators of chemical pollution. *J Environ Sci Health* 33:769-783.
- Alvarado NE, Buxens A, Mazón LI, Marigómez I, Soto M. 2005. Cellular biomarkers of exposure and biological effect in hepatocytes of turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to Cd, Cu and Zn and after depuration. *Aquat Toxicol* 74:110-125.
- Beliaeff B, Burgeot T. 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ Toxicol Chem* 21:1316-1322.
- Britton JC, Morton B. 1979. *Corbicula* in North America: the evidence reviewed and evaluated. In: Britton JC, Mattice JS, Murphy CE, Newland LW, editors. *Proceedings of the First International Corbicula Symposium*. Texas: Texas Christian University Research Foundation. p 249-287.
- Broeg K, Lehtonen KK. 2006. Indices for the assessment of environmental pollution of the Baltic Sea coasts: Integrated assessment of a multi-biomarker approach. *Mar Pollut Bull* 53:508-522.
- Cajaraville MP, Marigómez JA, Angulo E. 1991. Automated measurement of lysosomal structure alterations in oocytes of mussels exposed to petroleum hydrocarbons. *Arch Environ Contam Toxicol* 21:395-400.
- Cajaraville MP, Bebianno MJ, Blasco J, Porte C, Sarasquete C, Viarengo A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci Total Environ* 247:295-311.
- 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.
- Damiens G, Gnassia-Barelli M, Loquès F, Roméo M, Salbert V. 2007. Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. *Chemosphere* 66:574-583.
- Deisseroth A, Dounce AL. 1970. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev* 50:319-375.
- De Lafontaine Y, Gagne F, Blaise C, Costan G, Gagnon P, Chan HM. 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquat Toxicol* 50:51-71.
- Del Carmen EM, Souza V, Bucio L, Hernandez E, Damian-Matsumura P, Zaga V, Gutierrez-Ruiz MC. 2002. Cadmium induces α_1 collagen (I) and metallothionein II gene and alters the antioxidant system in rat hepatic stellate cells. *Toxicology* 170:63-73.
- Domouhtsidou GP, Dimitriadis VK. 2001. Lysosomal and lipid alterations in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.) as biomarkers of environmental stress. *Environ Pollut* 115:123-137.
- Fridovich I. 1989. Superoxide dismutases. An adaptation to aparamagnetic gas. *J Biol Chem* 264:7761-7764.
- Gagné F, Blaise C, Aoyama I, Luo R, Gagnon C, Couillard Y, Campbell P, Salazar M. 2002. Biomarker study of a municipal effluent dispersion plume in two species of freshwater mussels. *Environ Toxicol* 17:149-159.
- Geffard A, Amiard J-C, Amiard-Triquet C. 2002. Use of metallothionein in gills oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker : seasonal and intersite fluctuations. *Biomarkers* 2:123-137.
- Geret F, Serafim A, Barreira L, Joao Bebianno M. 2002. Response of antioxidant systems to copper in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. *Mar Environ Res* 54:413-417.



- Giambérini L, Cajaraville MP. 2005. Lysosomal responses in the digestive gland of the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*, experimentally exposed to cadmium. *Environ Res* 98:210-214.
- Giguère A, Couillard Y, Campbell PGC, Perceval O, Hare L, Pinel-Alloul B, Pellerin J. 2003. Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. *Aquat Toxicol* 64:185-200.
- Guecheva TN, Erdtmann B, Benfato MS, Henriques JAP. 2003. Stress protein response and catalase activity in freshwater planarian *Dugesia (Girardia) schubarti* exposed to copper. *Ecotoxicol Environ Saf* 56:351-357.
- Guerlet E, Ledy K, Giambérini L. 2006. Field application of a set of cellular biomarkers in the digestive gland of the freshwater snail *Radix peregra* (Gastropoda, Pulmonata). *Aquat Toxicol* 77:19-32.
- Guerlet E, Ledy K, Giambérini L. 2008. Is the freshwater gammarid, *Dikerogammarus villosus*, a suitable sentinel species for the implementation of histochemical biomarkers? *Chemosphere* 72:697-702.
- Hoarau P, Damiens G, Romeo M, Gnassia-Barelli M, Bebianno MJ. 2006. Cloning and expression of a GST-pi gene in *Mytilus galloprovincialis*. Attempt to use the GST-pi transcript as a biomarker of pollution. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 143:196-203.
- Jing G, Li Y, Xie L, Zhang R. 2006. Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 144:184-190.
- Jo PG, Choi YK, Choi CY. 2008. Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 147:460-469.
- Kayali HA, Tarhan L. 2003. Influence of zinc and copper ions on metals transport, antioxidant system responses and membrane LPO levels of *F. equiseti* and *F. acuminatum*. *Enzyme Microb Technol* 33:828-835.
- Ketterer B, Coles B, Meyer DJ. 1983. The role of glutathione in detoxication. *Environ Health Perspect* 49:59-69.
- Koukouzika N, Dimitriadis VK. 2008. Aspects of the usefulness of five marine pollution biomarkers, with emphasis on MN and lipid content. *Mar Pollut Bull* 56:941-949.
- 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.
- Lemoine S, Bigot Y, Sellos D, Cosson RP, Laulier M. 2000. Metallothionein isoforms in *Mytilus edulis* (Mollusca, Bivalvia): Complementary DNA characterization and quantification of expression in different organs after exposure to cadmium, zinc, and copper. *Mar Biotechnol* 2:195-203.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* 25:402-408.
- Ma W, Wang L, He Y, Yan Y. 2008. Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in freshwater crab *Sinopotamon henanense* during acute exposure to waterborne cadmium. *Environ Toxicol* 23:393 - 400.
- Marigómez JA, Vega MM, Cajaraville MP, Angulo E. 1989. Quantitative responses of the digestive-lysosomal system of winkles to sublethal concentrations of cadmium. *Cell Mol Biol* 35:555-562.
- Marigómez I, Baybay-Villacorta L. 2003. Pollutant-specific and general lysosomal responses in digestive cells of mussels exposed to model organic chemicals. *Aquat Toxicol* 64.
- Martín-Díaz ML, Blasco J, Sales D, DelValls TA. 2008. Field validation of a battery of biomarkers to assess sediment quality in Spanish ports. *Environ Pollut* 151:631-640.
- Moore MN. 1985. Cellular responses to pollutants. *Mar Pollut Bull* 16:134-139.



- Moore MN. 1988. Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Mar Ecol Prog Ser* 46:81-89.
- Mosleh YY, Paris-Palacios S, Biagianti-Risbourg S. 2006. Metallothioneins induction and antioxidative response in aquatic worms *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae) exposed to copper. *Chemosphere* 64:121-128.
- Pan L, Zhang H. 2006. Metallothionein, antioxidant enzymes and DNA strand breaks as biomarkers of Cd exposure in a marine crab, *Charybdis japonica*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 144:67-75.
- Regoli F. 1992. Lysosomal responses as a sensitive stress index in biomonitoring heavy metal pollution. *Mar Ecol Prog Ser* 84:63-69.
- Roesijadi G. 1996. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 113:117-123.
- Salinas AE, Wong MG. 1999. Glutathione S-Transferases. *Current Medicinal Chemistry* 6:279-309.
- Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd C. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 360:1-16.
- Tanhan P, Sretarugsa P, Pokethitiyook P, Kruatrachue M, Upatham ES. 2005. Histopathological alterations in the edible snail, *Babylonia areolata* (spotted babylon), in acute and subchronic cadmium poisoning. *Environ Toxicol* 20:142-149.
- Thornalley PJ, Vasák 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.
- Vasák M. 2005. Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace Elem Med Biol* 19:13-17.
- Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Poli G, Moore MN, Orunesu M. 1990. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 97:37-42.
- Viarengo A, Nott JA. 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 104:355-372.
- Wang Y, Fang J, Leonard SS, Krishna Rao KM. 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces Reactive Oxygen Species. *Free Radic Biol Med* 36:1434-1443.
- Zorita I, Ortiz-Zarragoitia M, Soto M, Cajaraville MP. 2006. Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): An integrated biochemical, histochemical and histological study. *Aquat Toxicol* 78:S109-S116.



Primers	Sequences (5' – 3')
ACT.CF100	TTGCCGGCAGAGATCTTACT
ACT.CR200	AACCACCGATCCAGACTGAG
MT.CF400	TGCGCTACAACCTGGTACGTG
MT.CR500	AGTCGCTCTCACATTTGCAC
SOD.CF400	TTTGACGAGATGAAGGCAGA
SOD.CR400	GTAAGCGTGCTCCCAAACAT
CAT.CF300	GAACCCCTGATGGGTACAGA
CAT.CR300	GTTGCCCTCAGCAATAGCAT
GST.CF100	TGTTTGACCTGTTGGACGAC
GST.CR200	TGTAGCAAGCTCGGAAACAA
GPx.CF100	GGAGGGTGTGGCACTATCAT
GPx.CR100	CTCGGTGAGAGGAAAGTTCTG

Table 1 Sequences of primers used for real-time PCR.

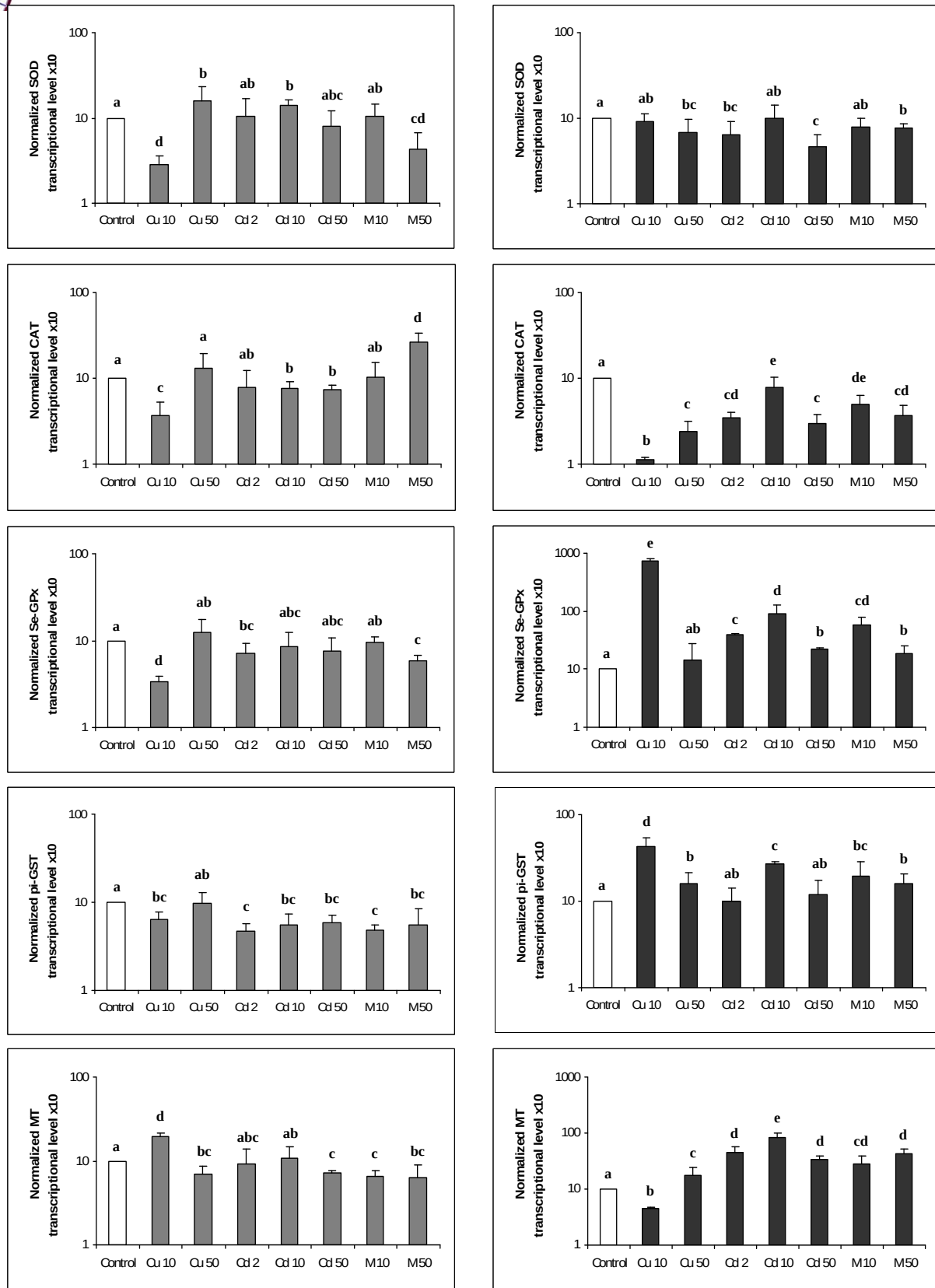
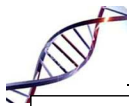


Figure 1 Normalized fold expression (x10) of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx), pi class glutathione S-transferase (pi-GST) and metallothionein (MT) in the digestive gland and the gills of *Corbicula fluminea* exposed to Cu (10 and 50 µg/L), Cd (2, 10 and 50 µg/L) and mixtures of 10 µgCu/L + 10 µg Cd/L (M10) and 50 µg Cu/L + 50 µg Cd/L (M50) during 12h. PCR efficiencies: $E_{SOD} = 1.16$, $E_{CAT} = 0.92$, $E_{Se-GPx} = 1.07$, $E_{pi-GST} = 1.05$, $E_{MT} = 0.97$ and $E_{Act} = 1.00$. Histogram bars represent means $\pm$ SD. Means with same letters are not significantly different ($P > 0.05$).

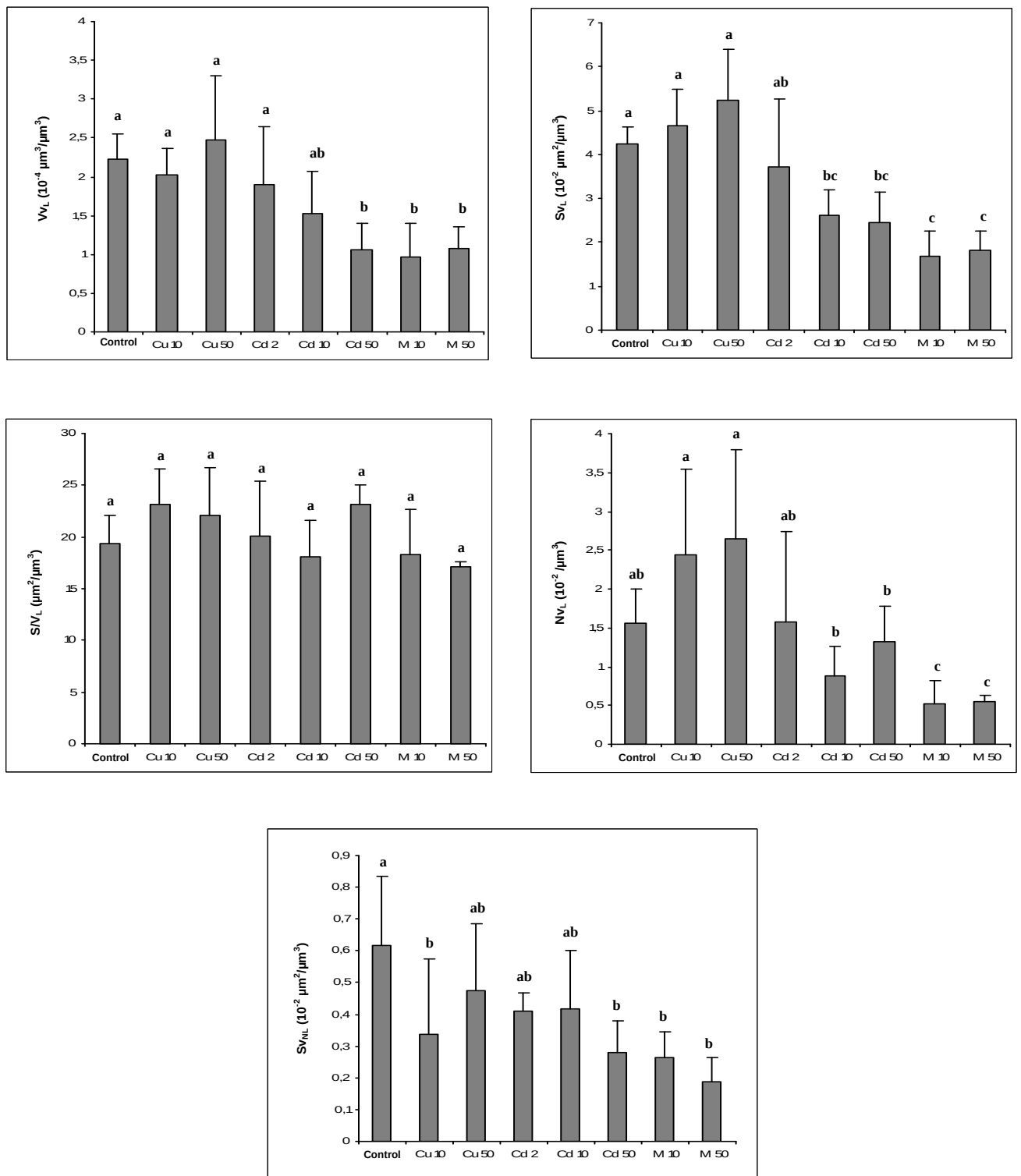
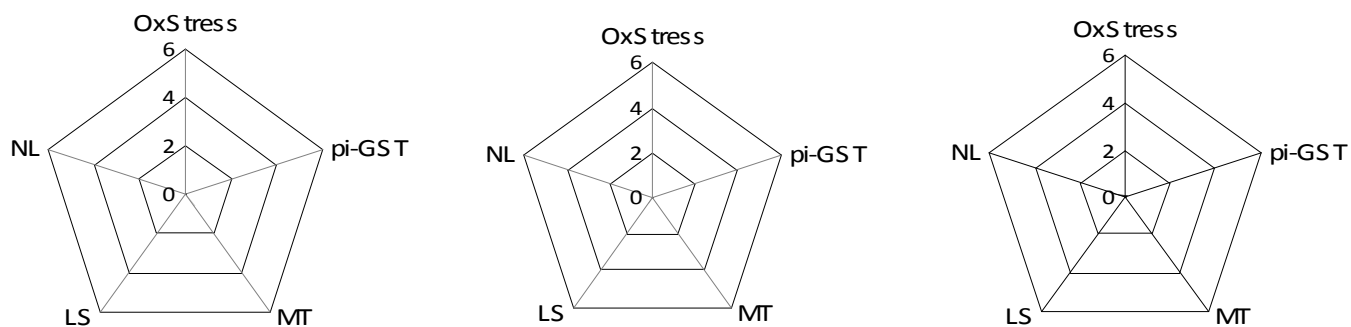


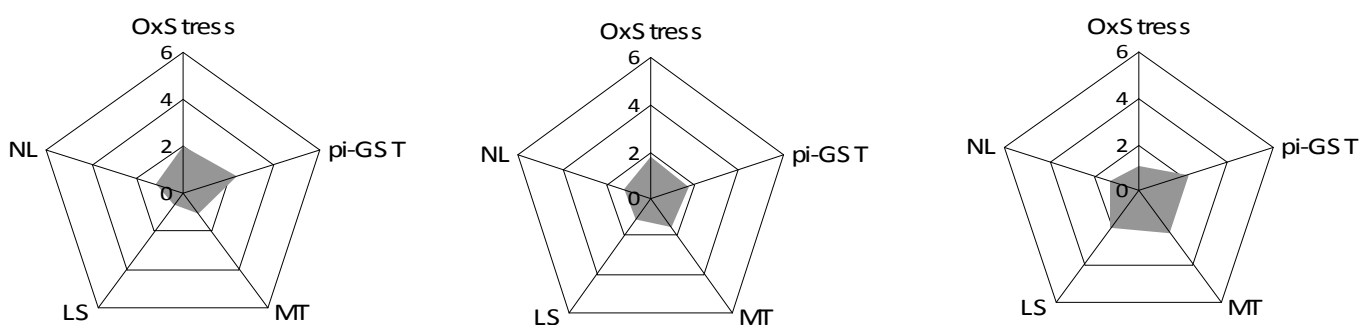
Figure 2 Stereological parameters of lysosomal system and neutral lipids in the digestive gland cells of *C. fluminea*. For lysosomal system: volume density Vv_L , surface density Sv_L , surface to volume ratio S/V_L , numerical density Nv_L . For neutral lipids: surface density Sv_{NL} . Histogram bars represent means $\pm$ SD. Means with same letters are not significantly different (P>0.05).



Control



Cd 2 µg/L



M 10 µg/L

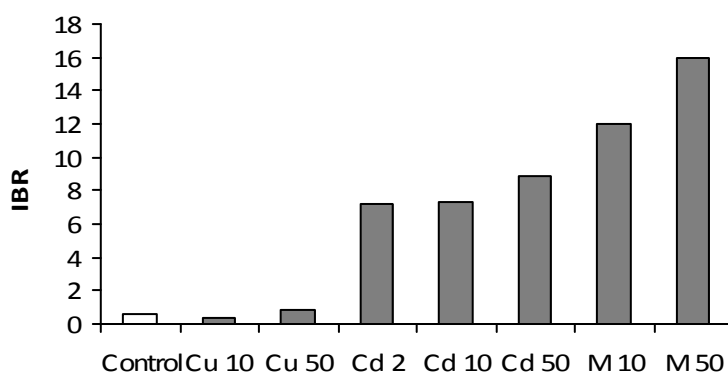
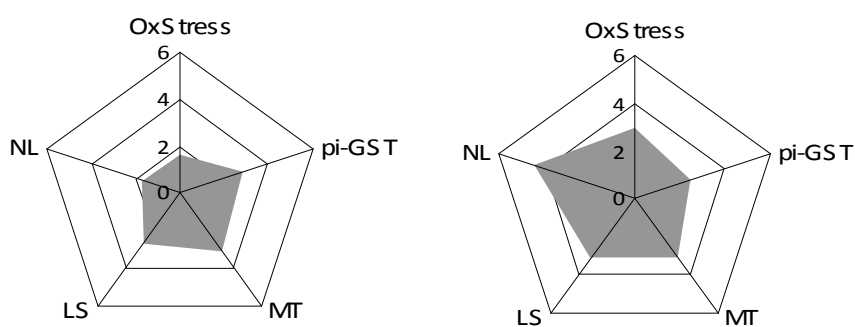


Figure 3 Biomarker star plots and integrated biomarker responses (IBR) measured in digestive gland of *Corbicula fluminea* exposed to Cu (10 and 50 µg/L), Cd (2, 10 and 50 µg/L) and mixtures of 10 µg Cu/L + 10 µg Cd/L (M10) and 50 µg Cu/L + 50 µg Cd/L (M50) during 12h. Final IBR consisted of “OxStress” (SOD, CAT and Se-GPx), pi-class glutathione S-transferase (pi-GST), metallothionein (MT), lysosomal system (LS) and neutral lipids (NL).



PUBLICATION 3

SOD and CAT cDNA cloning and expression pattern of detoxification genes in the freshwater bivalve *Unio tumidus* transplanted into the Moselle River

La première partie de cette étude porte sur l'identification des séquences codantes de SOD et CAT chez *Unio tumidus*. Ces résultats ont été présentés précédemment (partie 1) et nous ont permis de choisir des amorces spécifiques.

Les séquences de la MT, de la Se-GPx et de la GST-pi chez *Unio tumidus* avaient été identifiées lors d'études précédentes (numéros d'accès : EF185127, DQ830766, AY885666).

L'identification de ces séquences nous a permis de mesurer l'expression de ces gènes, dans les glandes digestives d'*Unio tumidus* transplantées au niveau de quatre sites de la Moselle (M1 à M4) pendant 8 et 21 jours. Ces stations, localisées en amont et en aval d'Epinal (88), couvrent une zone soumise à des perturbations d'origines agricole, domestique et industrielle. Le niveau d'expression des ARNm a été mesuré grâce à la technique de PCR en temps réel. Des différences de niveau d'expression des gènes de SOD, CAT, Se-GPx, GST-pi et MT ont été observées en fonction du site et du temps d'exposition (Tableau 13).

	8 jours				21 jours			
	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
SOD	+	+	+	++	+	+	-	++
CAT	+	+	+	+	+	+	-	++
Se-GPx			+	+	++	++	--	++
GST-pi	+	++	+	++	+	++	+	++
MT		+	+	++		++	-	++

Tableau 13 : Récapitulatif des niveaux d'expression des ARNm de SOD, CAT, Se-GPx, GST-pi et MT chez *Unio tumidus* transférés sur les sites M1, M2, M3 et M4 de la Moselle, pendant 8 et 21 jours.
 (+) : augmentation significative du niveau d'expression par rapport au site témoin.
 (-) : diminution significative du niveau d'expression par rapport au site témoin.
 () : aucune différence significative par rapport au site témoin.



Le site M3 se situe en aval d'Epinal, d'une papeterie et d'une gravière. Au bout de 21 jours d'exposition, une diminution de l'expression de la SOD, de la CAT, de la Se-GPx et de la MT par rapport au témoin a été notée et pourrait démontrer l'inefficacité des bivalves à neutraliser l'impact des peroxydes, des polluants organiques et des métaux lourds présents dans les effluents de la papeterie et de la gravière.

Une augmentation de l'expression de tous les gènes étudiés a été observée au niveau des sites M1, M2 et M4 avec une expression plus élevée au niveau du site M4 après 21 jours d'exposition. Ces résultats pourraient correspondre à une réponse antioxydante adaptative à un stress chez les organismes. La présence de HAP au niveau du site M2 pourrait expliquer l'augmentation du niveau transcriptionnel des gènes de détoxification. Nous pouvons également supposer que des composés générant des ROS et non mesurés lors des mesures chimiques pourraient être présents au niveau des sites. Par exemple, des pesticides provenant des terres agricoles situées près du site M4 pourraient être lessivés dans la rivière et provoquer un stress oxydant.

Des études précédentes avaient mis en évidence des variations de l'activité de la GPx et de la glutathion réductase ainsi qu'une augmentation de la cytotoxicité caractérisée par l'induction de la lipopéoxydation au niveau des sites M3 et M4. Une modification de l'expression d'un ARNm avait également été détectée chez les bivalves transférés au niveau du site M4 ; elle pourrait correspondre à l'induction d'un gène antioxydant associé à un stress. Des perturbations écologiques avaient été notées avec une diminution de l'abondance et de la diversité des invertébrés benthiques et une modification de l'espèce dominante. Cependant, des mesures chimiques réalisées sur ces sites n'avaient pas montré de pollutions importantes.

Nos résultats montrent que le site M4 est soumis à une perturbation importante due aux activités anthropiques, et sont en corrélation avec les dégradations écologiques identifiées précédemment.

Les approches biologiques apparaissent donc comme des outils indispensables à la détection de perturbations environnementales et à l'évaluation de l'impact des activités anthropiques sur le système aquatique.



SOD and CAT cDNA cloning and expression pattern of detoxification genes in the freshwater bivalve *Unio tumidus* transplanted into the Moselle River²

Aurélie Bigot*, Paule Vasseur*, François Rodius*

* Lab. L.I.E.B.E - Université de Metz, CNRS UMR 7146, Rue Delestraint, 57070 Metz, France

Abstract

The cDNA sequences encoding manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) and catalase (CAT) were isolated in the freshwater bivalve *Unio tumidus* by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using degenerate primers.

Quantitative real-time PCR approach was used to evaluate the mRNA expression patterns of SOD, CAT, selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx), pi class glutathione S-transferase (pi-GST) and metallothionein (MT), in the digestive gland of *Unio tumidus* transplanted from a control site to four stations in the Moselle River (M1 to M4), for a period of 8 and 21 days. These sites were chosen upstream and downstream of populated areas. Chemical analysis performed on sediments from the Moselle river sites did not show high levels of pollutants. Decrease of SOD, CAT, Se-GPx and MT mRNA levels were observed at M3 site after 21-day exposure compared to control site. These results suggest inefficiency of antioxidant systems affected by cytotoxic mechanisms and confirm an environmental perturbation. Organisms transplanted at M4 site showed a strong increase of biomarkers transcriptional levels after 21-day exposure. These inductions could correspond to an adaptive response to an altered environment. Our results showed that biological approaches using multibiomarkers appear as essential tools complementary to measurement of contaminants, to detect environmental degradations.

Keywords: cDNA cloning, biomarkers, oxidative stress, field studies, quantitative real-time PCR, *Unio tumidus*

² Article accepté dans Ecotoxicology



1. Introduction

The rapid elimination of excessive reactive oxygen species (ROS) is essential for organism survival. This is performed by antioxidant system including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx), pi class glutathione S-transferase (pi-GST) and metallothionein (MT). SOD catalyses the first step converting superoxide radicals to hydrogen peroxide and divalent oxygen (Fridovich 1989), then CAT and GPx catalyse the reduction of hydrogen peroxide. CAT is a tetrameric hemoprotein which eliminate excessive hydroperoxide and maintain cellular redox balance (Deisseroth and Dounce 1970). Se-GPx catalyses the reduction of organic and inorganic peroxides like hydrogen peroxide (Almar et al. 1998; Epp et al. 1983). pi-GST belongs to a multifunctional family of cytosolic enzymes involved in phase II biotransformation and catalyses the conjugation of electrophilic substrates with reduced glutathione (Ketterer et al. 1983; Sheehan et al. 2001). pi-GST catalyses the synthetic conjugaison reactions of many xenobiotic compounds including hydrocarbons, organochlorine insecticides and polychlorinated biphenyls (PCBs), in order to facilitate the excretion of chemical (George and Buchanan 1990; Van der Oost et al. 2003). MT are the most abundant intracellular metal binding proteins and play a predominant role in the metabolism and bioavailability of essential metals such as Cu and Zn (Richard and Cousins 1975; Viarengo et al. 1980). They are also involved in free radical scavenger (Sato and Bremner 1993) and in the detoxification of essential and toxic metals such as Cd, Hg and Ag (Suzuki and Yoshikawa 1974; Vasak 2005). The role of MT sequestering metals is well established, and their induction by exposure to a wide variety of metals is associated with an exposure protection function (Amiard and Cosson 1997; Kągi and Schäffer 1988; Martín-Díaz et al. 2007).

SOD and CAT have been proposed as biomarkers of exposure for environmental monitoring programs (Jena et al. 2009; Richardson et al. 2008). An induction of SOD activity has been observed in *Mytilus galloprovincialis* after urban pollution (Nasci et al. 2002). Increased activity of CAT had been demonstrated in response to exposure to organochlorines and PCBs in *Perna viridis* and *Ruditapes philippinarum* (De Luca-Abbott et al. 2005). Among different invertebrates exposed to PCBs and PAHs, induction of GST and GPx activities were observed (Förlin et al. 1996; Machala et al. 1998; Martín-Díaz et al. 2007, 2008). MT were used as biomarkers of heavy metals exposure on several organisms including vertebrates and invertebrates: mice *Mus spretus* (Marques et al. 2008), fish *Scatophagus argus* (Nikpour et al.



2008), crab *Carcinus maenas* (Pedersen et al. 1997), mussel *Mytilus edulis* (Geffard et al. 2005), and clam *Ruditapes decussates* (Hamza-Chaffai et al. 1999).

Bivalve molluscs are appropriate sentinel species to study the quality of the aquatic environment. They are sedentary, filter-feeding species, bioaccumulating high amounts of environmental micropollutants and can easily be transferred to contaminated areas.

The aim of this study was, in a first step, to identify the SOD and CAT mRNA of the freshwater bivalve *Unio tumidus* using RT-PCR (reverse-transcription polymerase chain reaction) performed with degenerate primers deduced from SOD and CAT conserved coding sequence. In a second step, we used quantitative real-time PCR to establish the mRNA expression of MT, SOD, CAT, Se-GPx and pi-GST in digestive gland of autochthonous freshwater bivalve *Unio tumidus* transplanted into several Moselle river stations in order to point out anthropic effects.

2. Materials and methods

2.1. Experimental animals

Five freshwater bivalves *Unio tumidus* were collected from a control pond located close to Manom (C) (Moselle) in order to identify SOD and CAT cDNA, and fifty were collected to study the expression pattern of detoxification genes.

For the expression pattern of detoxification genes, bivalves were transferred and encaged for 8 and 21 days at the water-sediment interface at four stations along the Moselle River, from upstream to downstream: Les Mitreuches (M1), Archettes (M2) located upstream from the town of Epinal, Igney (M3) which stands downstream from Epinal, a paper mill and a gravel pit, and Velle-sur-Moselle (M4) located downstream from the town of Charmes. M3 and M4 sites are affected by urban and agricultural activities (Fig. 1). After exposure, five mussels were collected per station and their digestive glands were immediately removed, immersed in a 4 M guanidium isothiocyanate solution (Fermentas Life sciences, Vilnius, Lithuania) and conserved in liquid nitrogen to avoid RNA degradation.



2.2. Total RNA extraction from *Unio tumidus*

Total RNAs were extracted from 30 mg of digestive gland using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, USA). RNA integrity was estimated by UV revelation after electrophoresis on 1.5% agarose gel in TAE (Tris 40 mM, Acetic acid 1 mM, EDTA 40 mM) buffer.

2.3. Primers design

The primers were obtained from Invitrogen (Carlsbad, USA) and their sequences are given in Table 1. Degenerate primers (SOD.F4d, SOD.F5d, SOD.R4d, SOD.R5d, CAT.F5d, CAT.F6d, CAT.R5d and CAT.R6d) were chosen in the SOD and CAT conserved coding regions from *Caenorhabditis elegans*, *Corbicula fluminea*, *Crassostrea gigas* and *Danio rerio* (GenBank accession no. D85499, EF446611, EU420128, AY195857) for SOD sequences; and from *Corbicula fluminea*, *Crassostrea gigas*, *Danio rerio*, *Dreissena polymorpha*, *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* (GenBank accession no. EF446609, EF687775, NM130912, EF681763, AY580271, AY743716) for CAT sequences.

SOD and CAT specific primers were chosen according to *Unio tumidus* SOD and CAT sequences identified in this study. Se-GPx, pi-GST and MT specific primers were chosen according to *Unio tumidus* Se-GPx, pi-GST and MT sequences identified in our laboratory (GenBank accession no. DQ830766, AY885667 and EF185127).

2.4. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Reverse transcription was performed on 1 µg of total RNA using the Revert Aid MuLV RT Kit (Fermentas Life Sciences). The reaction was conducted at 42°C for 30 min with 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP mix, 2.5 µM of OligodT primer, 2.5 U/µL of Revert Aid MuLV RT and 1U/µL of Ribolock RNase Inhibitor.

PCR amplifications were performed on 100 ng of cDNA and different reaction mixtures were tested: 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1, 1.5 or 2 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP, 1 or 2 µM of each degenerate primers and 0.025 U/µL of Taq DNA Polymerase (Fermentas Life Sciences). Several amplification conditions were tested: a 5-min initial denaturation at 94°C, 40 cycles of heat denaturation at 94 °C for 30 s or 1 min, annealing at 30, 35, 40, 45, 50, 55 or 60°C for 1 or 2 min, polymerisation at 72°C for 30 s or 1 min, and a 2-min final extension at 72°C.



2.5. Cloning and sequencing of *Unio tumidus* cDNA

PCR products were purified using the Wizard SV Gel and PCR Clean-up system according to the manufacturer's instructions (Promega, Madison, USA) and were cloned into pGEM-T Vector system (Promega). Following transformation into *Escherichia coli* cells (JM109), individual colonies were screened by PCR using the specific primers in order to confirm the presence of an insert corresponding to CAT or SOD cDNA. Plasmid DNA was extracted and purified from the positive clones with Wizard Plus SV Minipreps-DNA Purification System (Promega). Three clones were sequenced on both strands by MWG Sequencing Department (Martinsried, Germany).

2.6. Sequence analysis

Amplimer sequences were translated using the six open reading frames (ORF). Nucleotide and amino acid sequences obtained were identified by submission to databases available on the National Center for Biotechnology Information (NCBI) site (www.ncbi.nlm.nih.gov) using BLAST programs (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al. 1997).

2.7. Quantitative real-time PCR (QPCR)

Evaluation of MT, SOD, CAT, Se-GPx and pi-GST gene expressions were carried out in each bivalve by real-time quantitative PCR using a SYBR Green dye (Applied Biosystems, Foster City, USA) in a MiniOpticon System (Bio-Rad, Hercules, USA) according to the manufacturer's instructions. Specific primers SOD.UF200, SOD.UR200, CAT.UF100, CAT.UR100, GPx.UF100, GPx.UR100, GST.UF100, GST.UR100, MT.UF100 and MT.UR100 were used to amplify cDNA of SOD, CAT, Se-GPx, pi-GST and MT in *Unio tumidus*. β -actin cDNA was co-amplified as control using ACT.UF100 and ACT.UR200 primers. Primers sequences are given in Table 1.

Two negative controls comprising no template control (NTC) and no reverse transcriptase control (No RT) were carried out. NTC provides a control for external contamination or other factors that can result in a nonspecific increase of the fluorescence signal. The no RT control should show no amplification in the subsequent PCR step since Taq polymerase cannot amplify RNA templates. Optimal primers quantity was evaluated across a range of concentrations between 150 and 600 nM. Dilutions of the cDNA mixture between 1:10 and



1:80 were tested to calculate the PCR efficiency (E), the results are indicated in legend of figure 4.

PCR were performed in the following mixture: 4 μ L of diluted cDNA, 10 μ L of Power SYBR Green PCR Master Mix, 600 nM of ACT, MT, SOD, GPx or GST primers, or 300 nM of CAT primers. The PCR steps consisted of 3-min initial denaturation at 95 °C followed by 40 cycles of heat denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s, polymerisation at 72°C for 30 s, and a 10-min final extension at 72°C. A melting curve of PCR products (30-98°C) was also performed to ensure the absence of artifacts (data not shown).

Fluorescent signals from each PCR reaction were collected as peak-normalised values plotted versus the cycle number. The normalized folds of SOD, CAT, Se-GPx, pi-GST and MT expression were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen 2001) taking into account the PCR efficiency (E). The C_t (threshold cycle) corresponds to the number of PCR cycles at which a significant exponential increase in fluorescence is detected.

2.8. Statistical analysis

Parametric Student test using Statgraphics Plus software (Statgraphics 1995) was performed to identify differences between SOD, CAT, Se-GPx, pi-GST and MT expression levels. Differences were considered as significant if $P < 0.05$.

2.9. Sediment analysis

Sediments from control and Moselle River sites were collected at the end of the experiment and their contaminant levels were measured (Table 2). The chemical analysis were performed by the Centre d'Analyse et de Recherches-Hydrologie et Environnement, Illkirch, France. Sediments were sifted through a 1 mm mesh sieve. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were analyzed by HPLC and spectrofluorometric detection. Polychlorinated biphenyls (PCBs) were measured using gas chromatography with an electron capture detector. Metal concentrations were determined by atomic absorption spectrophotometry. Analyses were carried out with standard methods, as previously described (Cossu et al. 2000).



3. Results

3.1. Identification of *Unio tumidus* SOD and CAT coding sequences

A 251 bp product was obtained with the degenerate primers SOD.F4d, SOD.F5d, SOD.R4d and SOD.R5d (Fig. 2), using an annealing temperature of 50°C, 2 mM MgCl₂ and 2 µM of each degenerate primer (data not shown). A 216 bp product was obtained with the degenerate primers CAT.F5d, CAT.F6d, CAT.R5d and CAT.R6d (Fig. 2), using an annealing temperature of 50 and 55°C, 1.5 and 2 mM MgCl₂ and 2 µM of each degenerate primer (data not shown).

Unio tumidus SOD and CAT cDNA partial sequences have been deposited in GenBank database under accession no. FJ608580 and FJ608579.

3.2. Analysis of SOD and CAT sequences

The deduced amino acid sequences of *Unio tumidus* SOD and CAT were compared to several bivalves protein sequences (Fig. 3) using MULTALIN program (Corpet 1988). Multiple sequence alignment of *Unio tumidus* SOD and CAT identified with other known amino acid sequences of invertebrates revealed that they are highly conserved.

Sequences of *Unio tumidus* SOD and CAT displayed highest identity with sequence of *Hyriopsis schlegelii* Mn-SOD (95 %) and *Dreissena polymorpha* CAT (81 %) respectively.

3.3. Gene transcription levels in bivalves transplanted into Moselle sites

SOD, CAT, Se-GPx, pi-GST and MT mRNA levels in *Unio tumidus* digestive gland are shown in Fig. 4.

After 8-day exposure, SOD, CAT and pi-GST expression levels increase significantly in bivalves transferred at M1, M2, M3 and M4 sites, compared to mussels from control site. MT mRNA level was significantly increased at M2, M3 and M4 sites compared to control site, whereas GPx mRNA expression increased significantly only at M3 and M4 sites.

After 21-day exposure, significant variations in SOD, CAT, Se-GPx and MT mRNA levels were seen in mussels at the different locations: there was an increase at M1 and M2 sites (only at M2 site in the case of MT), followed by a decrease at M3 site and a strong increase at M4 site in comparison to control site. Strong increases of pi-GST mRNA levels were found in



mussels transferred at M1, M2 and M4 sites compared to individuals located in Manom, whereas a less pronounced increase was noted in organisms transferred at M3 site.

3.4. Physico-chemical parameters

Analysis showed that PAHs, PCBs and metals concentrations in sediments sampled in the Moselle River stations corresponded to threshold of quality 1, except for PAHs concentration at M2 site which corresponded to threshold of quality 2. According to the French water agency, thresholds of quality 1 and 2 correspond to a very good or good water quality respectively.

4. Discussion

In this study, SOD and CAT cDNA sequences were cloned from the freshwater bivalve *Unio tumidus*. Sequence alignment analysis demonstrated that these partial sequences shared high identity with Mn-SOD and CAT from other bivalves. Identification of these sequences allowed us to select specific primers in order to measure the mRNA expression level in mussels transferred into Moselle stations.

The biomarkers surveyed in the bivalves transferred into the Moselle River for 8 and 21 days were the mRNA expression of the antioxidant enzymes SOD, CAT and Se-GPx, the phase II detoxifying enzyme pi-GST and the protein MT which was measured as a biomarker of exposure to metals.

Differences in SOD, CAT, Se-GPx, pi-GST and MT mRNA expression were observed with respect to location and time of exposure.

The M3 site is located downstream from the town of Epinal, a paper mill and a gravel pit. Industrial waste from gravel pits is composed of mud originating from washing alluvium or crushed rock. Paper mill effluents are complex mixtures of heavy metals, chlorophenols, dioxins, furans, catechols, PAHs, fatty acids and resin acids ; and are reported to induce oxidative stress in aquatic organisms (Aaltonen et al. 1997; Jokinen et al. 1995). Decrease of SOD, CAT, Se-GPx and MT transcriptional levels was observed after 21-day exposure and could demonstrate inefficiency of organisms to neutralize the impact of peroxides, organic pollutants and heavy metals of paper mill and gravel pit effluents not measured in the chemical analysis performed. In fishes exposed to effluent collected from paper mill, it has



been observed an activation of the circulatory phagocytes, which further contribute to increase the burden of reactive oxygen species (Ahmad et al. 2000; Fatima et al. 2000). A paper mill effluent (1 %) induced consistent significant decreases in the activity of GPx, CAT and GST in the catfish *Channa punctatus* gill and kidney, after 15, 30, 60 and 90 day-exposures (Ahmad et al. 2000).

A significant increase of SOD, CAT, Se-GPx, pi-GST and MT mRNA expressions was observed at M1, M2 and M4 sites after 21-day exposure, with higher expression levels at M4 site. The increase of these mRNA expressions could correspond to an adaptative antioxidant stress response. Sediments of M2 station are the most contaminated by PAHs (928 µg/kg dw). An increase of CAT and GST activities was reported in the liver of fish *Sparus auratus* in response to 0.444 µM of PAHs mix (phenanthrene, pyrene and fluorene) (Kopecka-Pilarczyk and Correia 2009). Significant inductions of CAT and SOD were also observed in barnacle, *Balanus balanoides* collected from PAH polluted sites (Niyogi et al. 2001). PAH compounds are organic component that may generate free radicals by photo-reaction in the aquatic environment (Zafiriou et al. 1984), and/or metabolic activation (Cavalieri and Rogan 1985). In a study carried out in our laboratory, DNA oxidatively formed lesions were induced in digestive gland and gills of *Unio tumidus* after exposure to 100 µg/L of benzo[a]pyrene for 6 days (Lemiere et al. 2005). The presence of PAHs could explain the increase of biomarker transcriptional levels at M2 site, but it could be interesting to test markers of genotoxicity to show possible DNA damages.

Mussels seemed to be exposed to an oxidative stress and we could suppose that compounds generating ROS not measured in chemical analysis could be present at Moselle sites and could explain the increase of mRNA transcriptional levels. Oxidative stress could be resulted by the leaching of pesticides (organophosphates or carbamates) into the river from the agricultural lands located closed to M4 site. Elevated SOD, CAT, GPx and GST activities were reported in *Perna viridis* exposed to organochlorine pesticides (between 0.02 and 0.1 µg/L) for 4 weeks (Richardson et al. 2008). An increase of MT expression level was also shown in *Caenorhabditis elegans* exposed to 10 µg/L of chlorpyrifos (organophosphorus pesticide) for 24 hours (Roh and Choi 2008)

Previous studies, performed on *Unio tumidus* transplanted into the Moselle river, revealed a degradation of the bivalve conditions at M3 and M4 station (Thiébaud et al. 2006). Indeed, variations of GPx and glutathione reductase activities and reduced glutathione quantity were pointed out and an increase of the cytotoxicity was characterized by lipoperoxidation



induction. We also detected modification of mRNA expression in the bivalves transferred into M4 site which could correspond to the induction of an antioxidant stress-associated gene (Rodius et al. 2002). Moreover, the chemical analysis have not revealed major pollution in the sediments of the control and the Moselle sites. Ecological perturbations were noted at M3 and M4 sites: a decrease of abundance and diversity of benthic invertebrate populations, and a change of dominant species were observed (Thiébaud et al. 2006). As these sites are located downstream of populated and industrial areas, our studies showed they seem to be the most affected by human activities.

Our results pointed out that chemical analysis performed are not sufficient to predict biological effects. The biological approaches appear as essential tools to detect environmental disturbances and to evaluate anthropic impacts on ecosystem. MT is a scavenger of heavy metals and free radicals; SOD, CAT and Se-GPx are involved in the antioxidant system and pi-GST is an antioxidant enzyme involved in phase II biotransformation. As these biomarkers are involved in different detoxification process, their expression level could be used as early warning indicator of complex mixtures of contaminants.

Acknowledgements

This work was supported by the CPER of the Region Lorraine and by the National Program in Ecotoxicology (PNETOX) of the French Ministry of the Environment. Aurélie Bigot was the recipient of a Ph.D. fellowship from the Region Lorraine.



References

- Aaltonen TM, Valtonen ET, Jokinen EI (1997) Immunoreactivity of roach, *Rutilus rutilus*, following laboratory exposure to bleached pulp and paper mill effluents. *Ecotoxicol Environ Saf* 38:266-271. doi: 10.1006/eesa.1997.1588
- Ahmad I, Hamid T, Fatima M, Chand HS, Jain SK, Athar M, Raisuddin S (2000) Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochim Biophys Acta* 1523:37-48. doi: 10.1016/S0304-4165(00)00098-2
- Almar M, Otero L, Santos C, Gallego JG (1998) Liver glutathione content and glutathione-dependent enzymes of two species of freshwater fishes as bioindicators of chemical pollution. *J Environ Sci Health* 33:769-783. doi: 10.1080/03601239809373177
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402
- Amiard JC, Cosson RP (1997) Les métallothionéines. In: Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F (eds) *Biomarqueurs en écotoxicologie-Aspects fondamentaux*. Masson, Paris, pp 149-163
- Cavalieri E, Rogan E (1985) Role of radical cations in aromatic hydrocarbon carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 64:69-84
- Corpet F (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16:10881-10890
- Cossu C, Doyotte A, Babut M, Exinger A, Vasseur P (2000) Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicol Environ Saf* 45:106-121. doi: 10.1006/eesa.1999.1842
- Deisseroth A, Dounce AL (1970) Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev* 50:319-375
- De Luca-Abbott SB, Richardson BJ, McClellan KE, Zheng GJ, Martin M, Lam PKS (2005) Field validation of antioxidant enzyme biomarkers in mussels (*Perna viridis*) and clams (*Ruditapes philippinarum*) transplanted in Hong Kong coastal waters. *Mar Pollut Bull* 51:694-707. doi: 10.1016/j.marpolbul.2005.01.010
- Epp O, Ladenstein R, Wendel A (1983) The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. *Eur J Biochem* 133:51-69
- Fatima M, Ahmad I, Sayeed I, Athar M, Raisuddin S (2000) Pollutant-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissues. *Aquat Toxicol* 49:243-250. doi: 10.1016/S0166-445X(99)00086-7
- Förlin L, Blom S, Celander M, Sturve J (1996) Effects on UDP glucuronosyl transferase, glutathione transferase, DT-diaphorase and glutathione reductase activities in rainbow trout liver after long-term exposure to PCB. *Mar Environ Res* 42:213-216. doi: 10.1016/0141-1136(95)00061-5
- Fridovich I (1989) Superoxide dismutases. An adaptation to aparamagnetic gas. *J Biol Chem* 264:7761-7764
- Geffard A, Amiard-Triquet C, Amiard J-C (2005) Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels, *Mytilus edulis*? *Ecotoxicol Environ Saf* 61:209-220. doi: 10.1016/j.ecoenv.2005.01.004
- George SG, Buchanan G (1990) Isolation, properties and induction of plaice liver cytosolic glutathione-S-transferases *Fish Physiol Biochem* 8:437-449
- Hamza-Chaffai A, Amiard JC, Cosson RP (1999) Relationship between metallothioneins and metals in a natural population of the clam *Ruditapes decussatus* from Sfax coast: a non-linear model using Box-Cox transformation. *Comp Biochem Physiol C, Pharmacol Toxicol Endocrinol* 123:153-163. doi: 10.1016/S0742-8413(99)00023-7



- Jena KB, Verlecar XN, Chainy GBN (2009) Application of oxidative stress indices in natural populations of *Perna viridis* as biomarker of environmental pollution. *Mar Pollut Bull* 58:107-113. doi: 10.1016/j.marpolbul.2008.08.018
- Jokinen EI, Aaltonen TM, Valtonen ET (1995) Subchronic effects of pulp and paper mill effluents on the immunoglobulin synthesis of roach, *Rutilus rutilus*. *Ecotoxicol Environ Saf* 32:219-225. doi: 10.1006/eesa.1995.1107
- Kägi JHR, Schäffer A (1988) Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry* 27:8509-8515
- Ketterer B, Coles B, Meyer DJ (1983) The role of glutathione in detoxication. *Environ Health Perspect* 49:59-69
- Kopecka-Pilarczyk J, Correia AD (2009) Biochemical response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to in vivo exposure to a mix of selected PAHs. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:1296-1302. doi: 10.1016/j.ecoenv.2008.12.003
- Lemiere S, Cossu-Leguille C, Charissou AM, Vasseur P (2005) DNA damage (comet assay) and 8-oxodGuo (HPLC-EC) in relation to oxidative stress in the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Biomarkers* 10:41-57. doi: 10.1080/13547500500038783
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* 25:402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Machala M, Drábek P, Neca J, Kolářová J, Svobodová Z (1998) Biochemical markers for differentiation of exposures to nonplanar polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, or 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in trout liver. *Ecotoxicol Environ Saf* 41:107-111. doi: 10.1006/eesa.1998.1675
- Marques CC, Gabriel SI, Pinheiro T, Viegas-Crespo AM, da Luz Mathias M, Bebianno MJ (2008) Metallothionein levels in Algerian mice (*Mus spretus*) exposed to elemental pollution: an ecophysiological approach. *Chemosphere* 71:1340-1347. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.11.024
- Martín-Díaz ML, Blasco J, Sales D, DelValls TA (2007) Biomarkers study for sediment quality assessment in Spanish ports using the crab *Carcinus maenas* and the clam *Ruditapes philippinarum*. *Arch Environ Contam Toxicol* 53:66-76. doi: 10.1007/s00244-006-0121-4
- Martín-Díaz ML, Blasco J, Sales D, DelValls TA (2008) Field validation of a battery of biomarkers to assess sediment quality in Spanish ports. *Environ Pollut* 151:631-640. doi: 10.1016/j.envpol.2007.03.019
- Nasci C, Nesto N, Monteduro RA, Da Ros L (2002) Field application of biochemical markers and a physiological index in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*: transplantation and biomonitoring studies in the lagoon of Venice (NE Italy). *Mar Environ Res* 54:811-816. doi: 10.1016/S0141-1136(02)00122-8
- Nikpour Y, Zolgharnein H, Sinaei M, Najafzadeh H, Ghavasi M (2008) Evaluation of metallothionein expression as a biomarker of mercury exposure in *Scatophagus argus*. *Pak J Biol Sci* 11:2269-2273. doi: 10.3923/pjbs.2008.2269.2273
- Niyogi S, Biswas S, Sarker S, Datta AG (2001) Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides* and their relation with polyaromatic hydrocarbons. *Mar Environ Res* 52:13-26. doi: 10.1016/S0141-1136(00)00257-9
- Pedersen SN, Lundebye AK, Depledge MH (1997) Field application of metallothionein and stress protein biomarkers in the shore crab (*Carcinus maenas*) exposed to trace metals. *Aquat Toxicol* 37:183-200. doi: 10.1016/S0166-445X(96)00816-8
- Richard MP, Cousins RJ (1975) Mammalian zinc homeostasis: requirement for RNA and metallothionein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 64:1215-1223.
- Richardson BJ, Mak E, De Luca-Abbott SB, Martin M, McClellan K, Lam PKS (2008) Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels "integrate" biomarker responses? *Mar Pollut Bull* 57:503-514. doi: 10.1016/j.marpolbul.2008.02.032



Rodius F, Hammer C, Vasseur P (2002) Use of RNA arbitrarily primed PCR to identify genomic alterations in the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus* at a contaminated site. *Environ Toxicol* 17:538-546. doi: 10.1002/em.20021

Roh J-Y, Choi J (2008) Ecotoxicological evaluation of chlorpyrifos exposure on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicol Environ Saf* 71:483-489. doi: 10.1016/j.ecoenv.2007.11.007

Sato M, Bremner I (1993) Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic Biol Med* 14:325-337. doi: 10.1016/0891-5849(93)90029-T

Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd C (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 360:1-16.

Statgraphics (1995). Statgraphics Plus V2.0 User Manual. In: Manugistics (ed) Rockville

Suzuki Y, Yoshikawa H (1974) Role of metallothionein in the liver in protection against cadmium toxicity. *Ind Health* 12:141-151.

Thiébaud G, Tixier G, Guérold F, Muller S (2006) Comparison of different biological indices for the assessment of river quality: application to the upper river Moselle (France). *Hydrobiologia* 570:159-164. doi: 10.1007/s10750-006-0176-2

Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13:57-149. doi: 10.1016/S1382-6689(02)00126-6

Vasak M (2005) Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace Elem Med Biol* 19:13-17. doi: 10.1016/j.jtemb.2005.03.003

Viarengo A, Pertica M, Mancinelli G, Zanicchi G, Orunesu M (1980) Rapid induction of copper-binding proteins in the gills of metal exposed mussels. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 67:215-218.

Zafiriou OC, Jousset-Dubien J, Zepp RG, Zika RG (1984) Photochemistry of natural waters. *Environ Sci Technol* 18:358A-371A. doi: 10.1021/es00130a001



Primers	Sequences (5' – 3')
SOD-F4d	AATGGWGGDGGWCATWTBAAN
SOD-F5d	CARGMTCMGGMTGGRGMTGGN
SOD-R4d	TGYTCCCARACRTCWATHCCN
SOD-R5d	ARWGGRTCYTGRTTTRGCACAN
CAT-F5d	CACCAGGTSTCBTTCCTSTTCN
CAT-F6d	ATGAAYGGHTAYGGHWSBCAN
CAT-R5d	TCDGCYTSYTCVDRBGTCATN
CAT-R6d	CCABGADGGGWADTTBCCN
ACT.UF100	TGCTTCTGGTCGTACCACTG
ACT.UR200	GGTGCCTCCAGATAATACGG
MT.UF100	GCCTTGAGACCGGAGAATGT
MT.UR100	TTGCATGAACATCCAGAGTCA
SOD.UF200	GAAGTGCTTTGTCCGACAGG
SOD.UR200	GACCTGTTGTTGGTTCCAATG
CAT.UF100	GGCATAATCTGGGTCCTG
CAT.UR100	CACCCCAGATGGTTATCGTC
GPx.UF100	CCATCTTGTACGAGCCCATT
GPx.UR100	TCCCATGCCCATGTAAAGTT
GST.UF100	GGAAAGCAGGAGTTCATTGC
GST.UR100	GGTGCCAGCAAAAGATGAAT
OligodG-Anchor	GACCACGCGTATCGATGTCGAC(G) ₁₅ H
Anchor	GACCACGCGTATCGATGTCGAC

M: A/C ; R: A/G ; S: G/C ; W: A/T ; Y: C/T ; B: C/G/T ; D: A/G/T ; H: A/C/T ; V: A/C/G

Table 1 Sequences of primers used for PCR amplifications



	Threshold of quality $\mu\text{g/kg dw}$		Manom	Les	Archettes	Igney	Velle-sur-
	1	2	(Control)	(M1)	(M2)	(M3)	Moselle (M4)
Total PAHs *	360	4600	22	84	928	307	279
Total PCBs	2	22	< QL	< QL	< QL	< QL	< QL
Cadmium	700	4200	< QL	0.06	0.58	0.29	0.93
Mercury	130	700	< QL	< QL	0.17	0.20	0.06
Zinc	124000	271000	44,9	39.1	90.7	89.2	63.5
Arsenic	700	7000	9.6	14.6	10.9	7.6	4.6
Chromium	5200	52000	21.5	32.6	26.5	27.5	24.8
Copper	1900	19000	8.7	6.6	19.4	17.4	10.9
Nickel	1600	16000	16.4	8.6	12.2	10.5	11.4
Lead	4100	41000	10.3	7.1	49.7	35.1	23.5

Table 2 Organic and inorganic pollutant concentrations ($\mu\text{g/kg dw}$) in sediments (<1 mm fraction) sampled in the Moselle River stations

* Benzo(a)pyrene, Benzo(a)fluoranthene, Benzo(ghi)perylene, Benzo(k)fluoranthene

dw: dry weight

QL: quantification levels

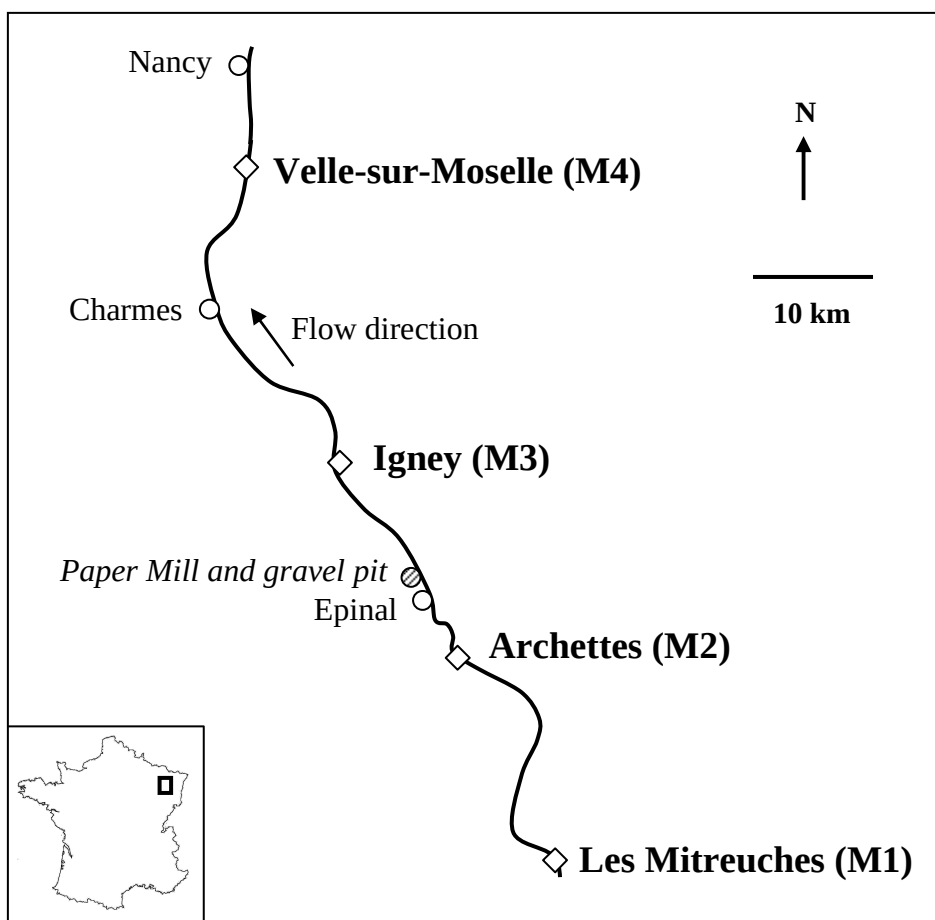


Fig. 1 Localisation of the sampling stations in the Moselle River



SOD

```
aatcactcgttatTTTTGGGAAGTGCTTTGTCCGACAGGAGGTGGGGAACCCAAGGGTGAC
N H S L F W E V L C P T G G G E P K G D
ctgatggacataataagaagagattttggattatttGAAACATGAAAAATGAATTGATC
L M D I I R R D F G L F E N M K N E L I
aacagatctgtggcaattcaagggttcaggctggggatggcttgggtacaaccagccaca
N R S V A I Q G S G W G W L G Y N P A T
ggcagactgcgaataaacactacagctaatcaggatccattggaaccaacaacagggtctg
G R L R I N T T A N Q D P L E P T T G L
atacctttgtt
I P L
```

CAT

```
tctgaccgtggcaccccagatggttatcgtcacatgaacggctatggcagtcacacattc
S D R G T P D G Y R H M N G Y G S H T F
aaaatggtgaacaaggacggcaagccagtctactgcaagttccactggaagactgaccag
K M V N K D G K P V Y C K F H W K T D Q
ggtatcaaaaacttgccagcaaacaagcagcagaaatggccggcagtgaccagattat
G I K N L P A N K A A E M A G S D P D Y
gccataagagacctgtacaatgccattgctgagggc
A I R D L Y N A I A E G
```

Fig. 2 cDNA and deduced amino acid sequences of *Unio tumidus* SOD and CAT

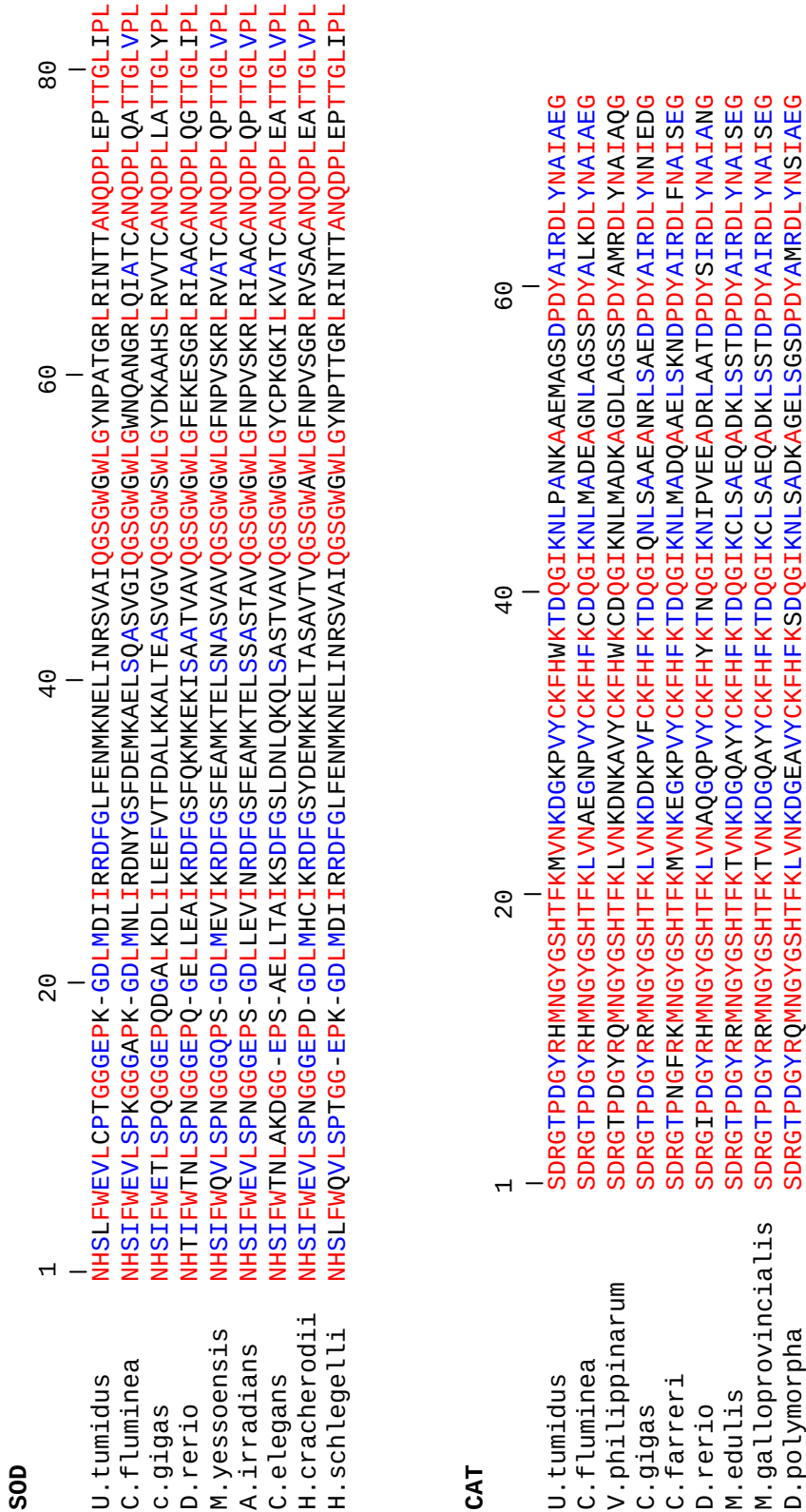


Fig. 3 Comparison of the deduced SOD and CAT amino acid sequences of *Unio tumidus* with several invertebrates SOD and CAT sequences available in GenBank. Amino acids in red are identical in all species, amino acids in blue are identical in at least five species

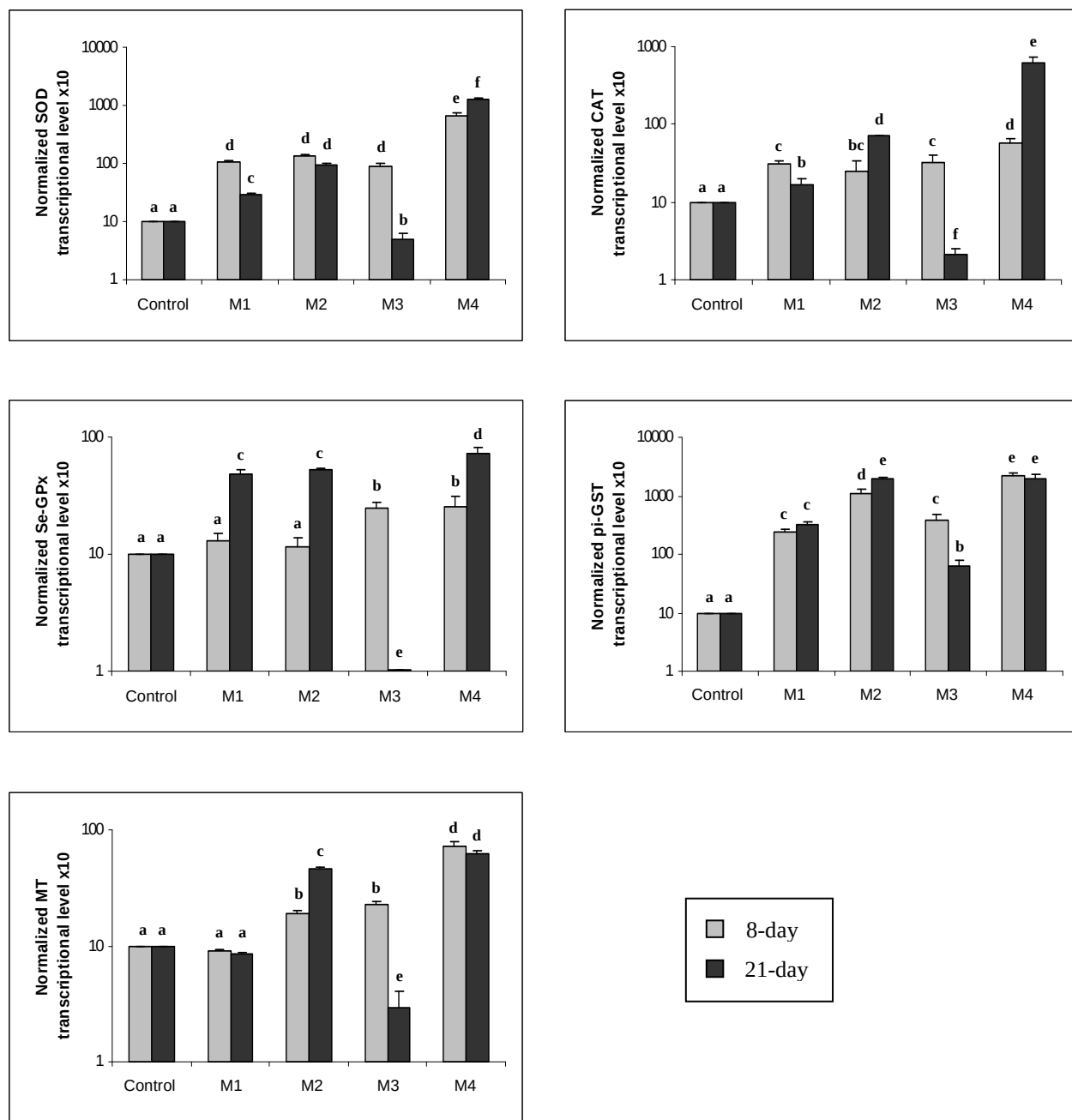


Fig. 4 Normalized fold expression of metallothionein (MT), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) and pi class glutathione S-transferase (pi-GST) in the digestive gland of transplanted *Unio tumidus* (n=5) in M1 (Les Mitreuches), M2 (Archettes), M3 (Igney) and M4 (Velle-sur-Moselle). PCR efficiencies: $E_{MT} = 0.91$, $E_{SOD} = 1.15$, $E_{CAT} = 1.06$, $E_{Se-GPx} = 0.97$, $E_{pi-GST} = 1.06$ and $E_{Act} = 1.05$. Histogram bars represent means $\pm$ SD. Means with same letters were not significantly different ($P > 0.05$)

CONCLUSION ET PERSPECTIVES



CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les objectifs de cette étude étaient de caractériser des marqueurs moléculaires d'exposition chez les bivalves *Corbicula fluminea* et *Unio tumidus*. Pour atteindre ces objectifs, les études ont été conduites en deux étapes. Dans un premier temps, les séquences codantes de MT chez *C. fluminea* et *U. tumidus* et de la SOD et de la CAT chez *U. tumidus* ont été identifiées. Ces travaux nous ont permis, dans un deuxième temps, d'étudier le niveau d'expression de ces gènes ainsi que ceux de la Se-GPx et de la GST-pi selon la saison et également chez des bivalves soumis à diverses perturbations (Figure 40).

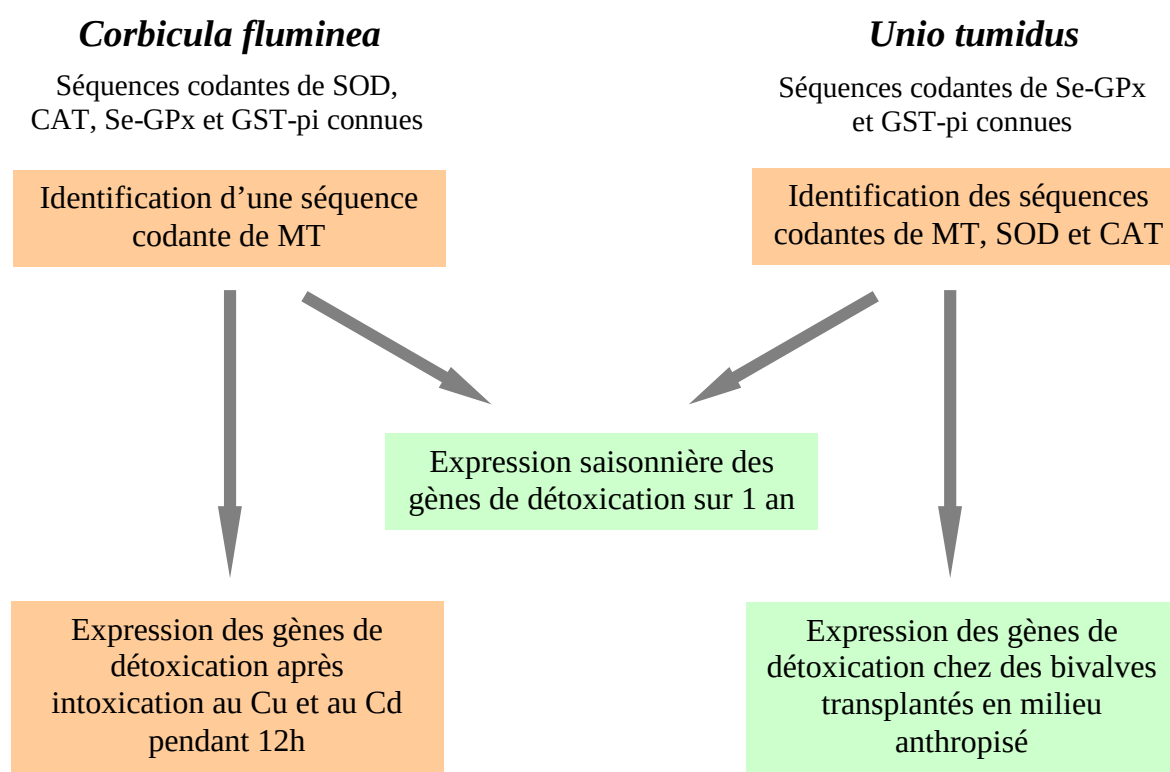


Figure 40 : Résumé des travaux réalisés chez les bivalves *C. fluminea* et *U. tumidus*.

■ Expérimentation en laboratoire et ■ Expérimentation terrain

Nous avons identifié les séquences codantes complètes de MT chez *Corbicula fluminea* et *Unio tumidus*, elles codent pour une protéine de 73 et 71 acides aminés respectivement et sont caractérisées par leur forte teneur en résidus cystéine qui représentent 30 % des acides aminés totaux de la protéine. La comparaison de ces séquences MT avec les séquences MT de



différents bivalves révèle de forts pourcentages d'identité et une forte conservation des positions des résidus cystéines. Les deux séquences MT identifiées possèdent 75 % d'identité entre elles et neuf motifs Cys-X-Cys qui sont impliqués dans la formation des groupements thiolates et permettent la fixation des ions métalliques. Les 21 résidus cystéine et l'absence de motif Cys-Cys suggèrent que les séquences MT de *Corbicula fluminea* et d'*Unio tumidus* correspondent à des isoformes MT-10.

Nous avons identifié des séquences codantes partielles de Mn-SOD et de CAT chez *Unio tumidus* en utilisant des amorces dégénérées choisies dans les régions conservées des séquences SOD et CAT de différents bivalves. Ses séquences codantes partielles comprennent 251 et 216 nt respectivement et sont fortement conservées chez les invertébrés, avec 95% d'identité avec la séquence Mn-SOD de *Hyriopsis schlegelii* et 81 % avec la séquence CAT de *Dreissena polymorpha*.

L'étude de l'expression saisonnière des protéines de stress oxydant a démontré l'importance des facteurs autres que les polluants chimiques dans la réponse des gènes de détoxification chez *Corbicula fluminea* et d'autant plus chez *Unio tumidus*. En effet, seule une augmentation significative de l'expression de la MT en juillet a été notée chez *C. fluminea*, alors que l'expression de tous les autres gènes est significativement plus élevée au mois de décembre chez *U. tumidus*. Les ACP ont révélé une plus forte similarité des niveaux d'expression des gènes de détoxification tout au long de l'année chez *Corbicula fluminea* par rapport à *Unio tumidus*.

Nos résultats ont montré que les variations du niveau d'ARNm observées pourraient correspondre à des paramètres saisonniers tels que la température ou le cycle de reproduction. D'autres facteurs tels que le sexe, l'âge et le poids des organismes étudiés ou encore la disponibilité alimentaire peuvent également influencer la réponse de l'expression des ARNm. Ces travaux soulignent la nécessité de prendre en compte les variabilités saisonnières du niveau d'expression des gènes de détoxification dans le cadre d'une étude de biomonitoring à long terme, et particulièrement chez *Unio tumidus*.

Dans de nombreuses études, l'exposition de mollusques à des métaux a montré une induction du stress oxydant par la formation de ROS. Une exposition à court terme (12h) au cuivre et au cadmium a été réalisée dans le cadre de notre étude chez le bivalve *Corbicula fluminea*. Le niveau d'expression des ARNm de MT, SOD, CAT, Se-GPx et GST-pi a été mesuré dans la



glande digestive et les branchies. L'étude histologique du système lysosomal et des lipides neutres a également été réalisée dans la glande digestive des bivalves.

Nos travaux mettent en évidence la réponse de tous les gènes testés, dès 12h en réponse à un stress oxydant généré par le cuivre seul à 10 et 50 µg/L et par le cadmium seul à 2, 10 et 50 µg/L, et également en mélange. Le mélange 10 µg Cu/L + 10 µg Cd/L a un effet additif alors que le mélange 50 µg Cu/L + 50 µg Cd/L tendrait à avoir un effet synergique puisque la réponse est 1,6 fois supérieur à la somme des réponses du cuivre et du cadmium seul à 50 µg/L. Il a été observé un plus fort niveau d'expression des gènes de détoxification au niveau de la glande digestive par rapport aux branchies.

Les bivalves exposés au cadmium montrent une plus faible quantité de lysosomes. Un procédé de détoxification suggérant que les lysosomes contenant des métaux soient immédiatement expulsés des cellules a déjà été proposé et pourrait expliquer cette observation (Guerlet et al., 2008; Viarengo et Nott, 1993; Zorita et al., 2006).

Par contre, les organismes exposés au cuivre tendent à disposer d'une densité de surface du système lysosomal plus importante, associée avec une quantité de lysosomes plus élevée. Cette observation pourrait être due à la fission des plus grands lysosomes.

Il a été décrit une augmentation de la consommation des lipides neutres comme ressource énergétique dans le but de maintenir les procédés de détoxification cellulaires.

L'analyse de l'IBR nous a permis de noter que l'utilisation d'une batterie de biomarqueurs paraît nécessaire pour l'évaluation des effets biologiques d'une pollution environnementale. Les MT sont connues pour fixer les métaux, la SOD, la CAT et la Se-GPx sont des enzymes intervenant dans le système antioxydant et la GST-pi est une enzyme antioxydante intervenant en phase II de biotransformation. Ces protéines sont donc impliquées dans différents processus de détoxification et leur étude permet de mettre en évidence un large spectre de contaminants.

A l'issue de cette étude, les niveaux d'expression des ARNm de MT, SOD, CAT, Se-GPx et GST-pi ainsi que la réponse lysosomale et les lipides neutres apparaissent comme des biomarqueurs précoces d'exposition au cuivre et au cadmium chez *Corbicula fluminea*.

Une étude de l'expression des ARNm de MT, SOD, CAT, Se-GPx et GST-pi a été réalisée chez le bivalve *Unio tumidus* transféré pendant 8 et 21 jours au niveau de quatre sites localisés sur la Moselle. Ces sites sont caractérisés par des perturbations d'origines agricole, domestique et industrielle. Des analyses physico-chimiques ont été réalisées au niveau des sédiments de chaque site et aucune pollution importante n'a été révélée. Le but de cette étude



était de déterminer si les gènes de détoxification pouvaient être utilisés en tant que biomarqueurs de perturbation environnementale chez *Unio tumidus*.

Cette étude nous a permis d'identifier des variations dans les profils d'expression au niveau des stations M3 et M4. Le site M3 se situe en aval d'Epinal, d'une papeterie et d'une gravière. Une diminution de l'expression de la SOD, de la CAT, de la Se-GPx et de la MT a été notée au niveau de ce site et pourrait démontrer l'inefficacité des bivalves à neutraliser les ROS générés lors d'un stress oxydant. Au niveau du site M4, le niveau d'expression de tous les gènes augmente et pourrait correspondre à une réponse antioxydante adaptative à un stress. M4 paraît donc soumis à une perturbation importante due aux activités anthropiques, ce qui se corrèle avec les dégradations écologiques identifiées dans une étude précédente.

Nos résultats confirment la nécessité de mettre en œuvre une approche biologique pour évaluer l'impact des activités anthropiques sur les écosystèmes. En effet, les analyses physico-chimiques, bien que nécessaires sur le plan réglementaire, ne suffisent pas à prévoir les effets biologiques sur les espèces vivantes. Ces analyses sont non exhaustives et ne donnent pas d'information sur la biodisponibilité des polluants. Les résultats obtenus valident l'utilisation des gènes de détoxification en tant que biomarqueurs et comme éléments prospectifs de la qualité des systèmes hydriques sur le long terme et en complément de l'approche écologique.

Ces résultats nous laissent entrevoir différentes perspectives de travail.

Il serait intéressant d'étudier l'expression saisonnière des gènes de détoxification chez des bivalves prélevés sur une période de 2 ans et avec des intervalles de prélèvement plus courts, dans le but de déterminer si les réponses de ces gènes sont reproductibles d'une année à l'autre.

L'étude du niveau d'expression des gènes de détoxification chez des corbicules intoxiquées au cuivre et au cadmium nous a permis d'observer des réponses dès 12h d'exposition. Il serait également intéressant de réaliser une intoxication à long terme pour déterminer si les effets observés sont ou non réversibles chez les organismes exposés. Une intoxication au cuivre et au cadmium devra également être réalisée chez *Unio tumidus*.

L'expression d'autres gènes tels que les cytochromes P450 qui est un système enzymatique de biotransformation de phase I, la GST-alpha qui pourrait présenter une activité enzymatique peroxydase sélénium indépendante (Zhao et al., 1999), les MXR (multi-xenobiotic resistance) intervenant en phase III de biotransformation ou encore les HSP (heat shock protein) pourraient être étudiés.



Des travaux pourraient être réalisés grâce aux puces à ADN dans le but d'identifier une batterie de gènes dont le profil d'expression varie selon l'échantillon (témoin et exposés à différents polluants).

Il serait intéressant de comparer le niveau d'expression des gènes impliqués dans les mécanismes de détoxification entre plusieurs populations de *Dreissena polymorpha* provenant de différents sites témoins et de sites plus ou moins pollués. La comparaison de l'expression génique nous permettrait de comprendre les mécanismes d'adaptation de ces bivalves.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. Meth. Enzymol. 105, 121-126.
- Akyilmaz, E., Dinçkaya, E., 2003. Development of a catalase based biosensor for alcohol determination in beer samples. Talanta 61, 113-118.
- Almeida, E.A., Bainy, A.C.D., Dafre, A.L., Gomes, O.F., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., 2005. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 318, 21-30.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Metayer, C., Marchand, J., Ferre, R., 1980. Etude du transfert de Cd, Pb, Cu et Zn dans les chaines trophiques neritiques et estuariennes--I. Etat dans l'estuaire interne de la Loire (France) au cours de l'été 1978. Water Res. 14, 665-673.
- Amiard, J.C., Cosson, R.P., 1997. Les métallothionéines. In: Biomarqueurs en écotoxicologie-Aspects fondamentaux, Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C. and Ramade, F. (Eds.), vol. 3. Masson, Paris, pp. 149-163.
- Andrews, G.K., 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. Biochem. Pharmacol. 59, 95-104.
- Araujo, R., Moreno, D., Ramos, M.A., 1993. The asiatic clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Bivalvia: Corbiculidae) in Europe. Am. Malacol. Bull. 10, 39-49.
- Armstrong, R.N., 1991. Glutathione S-transferases: reaction mechanism, structure, and function. Chem. Res. Toxicol. 4, 131-140.
- Armstrong, R.N., 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. Chem. Res. Toxicol. 10, 2-18.
- Arumugam, N., Thanislass, J., Ragunath, K., Niranjali Devaraj, S., Devaraj, H., 1999. Acrolein-induced toxicity—defective mitochondrial function as a possible mechanism Arch. Environ. Contam. Toxicol. 36, 373-376.
- Babior, B.M., 1978. Oxygen dependent microbial killing by phagocytes. N. Engl. J. Med. 298, 659-721.
- Bachmann, V., Cegiela, E., Wagner, P., Usseglio Polatera, P., Moreteau, J.-C., 1995. Establishment of the amphipod *Corophium curvispinum* and the asiatic clam *Corbicula sp.* in the French part of the Mosel river. Hydroecol. Appl. 1-2, 185-190.
- Banci, L., Carloni, P., Orioli, P.L., 1994. Molecular dynamics studies on mutants of Cu, Zn superoxide dismutase: The functional role of charged residues in the electrostatic loop VII. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 18, 216 - 230.
- Barata, C., Varo, I., Navarro, J.C., Arun, S., Porte, C., 2005. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 140, 175-186.
- Baudrimont, M., Lemaire-Gony, S., Ribeyre, F., Metivaud, J., Boudou, A., 1997. Seasonal variations of metallothionein concentrations in the Asiatic Clam (*Corbicula fluminea*). Comp. Biochem. Physiol. C, Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 118, 361-367.



- Beckett, G.J., Hayes, J.D., Herbert, E.S., 1993. Glutathione S-transferases: biomedical applications. In: *Advances in Clinical Chemistry*, vol. 30. Elsevier, pp. 281-380.
- Berthet, B., 2008. Les espèces sentinelles. In: *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques*, Amiard, Jean-Claude and Amiard-Triquet, Claude (Eds.), Lavoisier, Paris, pp. 121-125.
- Berthet, B., Mouneyrac, C., Perez, T., Amiard-Triquet, C., 2005. Metallothionein concentration in sponges (*Spongia officinalis*) as a biomarker of metal contamination. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 141, 306-313.
- Beyer, W., Imlay, J., Fridovich, I., Waldo, E.C.a.K.M., 1991. Superoxide Dismutases. In: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, vol. Volume 40. Academic Press, pp. 221-253.
- Biz de Vaate, A., 1991. Colonization of the german part of the river Rhine by the asiatic clam, *Corbicula fluminea* Müller, 1774 (Pelecypoda, Corbiculidae). *Bull. Zool. Mus. Amsterdam* 13, 13-16.
- Biz de Vaate, A., Greijdanus-Klaas, M., 1990. The asiatic clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Pelecypoda, Corbiculidae), a new immigrant in the Netherlands. *Bull. Zool. Mus. Amsterdam* 12, 173-177.
- Board, P.G., Baker, R.T., Chelvanayagam, G., Jermini, L.S., 1997. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochem. J.* 328, 929-935.
- Board, P.G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermini, L.S., Schulte, G.K., Danley, D.E., Hoth, L.R., Griffor, M.C., Kamath, A.V., Rosner, M.H., Chrnyk, B.A., Perregaux, D.E., Gabel, C.A., Geoghegan, K.F., Pandit, J., 2000. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* 275, 24798-24806.
- Board, P.G., Coggan, M., Wilce, M.C.J., Parker, M.W., 1995. Evidence for an essential serine residue in the active site of the Theta class glutathione transferases. *Biochem. J.* 311, 247-250.
- Bocchetti, R., Regoli, F., 2006. Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere* 65, 913-921.
- Bordin, G., McCourt, J., Cordeiro Raposo, F., Rodriguez, A.R., 1997. Metallothionein-like metalloproteins in the Baltic clam *Macoma balthica* : seasonal variations and induction upon metal exposure. *Mar. Biol.* 129, 453-463.
- Borgstahl, G.E.O., Parge, H.E., Hickey, M.J., Beyer, W.F., Hallewell, R.A., Tainer, J.A., 1992. The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. *Cell* 71, 107-118.
- Borkovic, S.S., Saponjic, J.S., Pavlovic, S.Z., Blagojevic, D.P., Milosevic, S.M., Kovacevic, T.B., Radojicic, R.M., Spasic, M.B., Zikic, R.V., Saicic, Z.S., 2005. The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 141, 366-374.



- Boveries, A., Oshino, N., Chance, B., 1972. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 128, 617-630.
- Bray, J.I., Webb, L.A., Reilly, J.F.J., 1983. Multielement analysis of metal-binding proteins in cytosol fractions. *Sci. Total Environ.* 28, 367-374.
- Brey, T., 1995. Temperature and reproductive metabolism in macrobenthic populations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 125, 87-93.
- Britton, J.C., Morton, B., 1986. Polymorphism in *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculoidea) from North America. *Malacological review* 19, 1-43.
- Bustin, S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169-193.
- Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M., Gallo, G., 1999. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquat. Toxicol.* 46, 67-76.
- Canli, M., Stagg, R.M., Rodger, G., 1997. The induction of metallothionein in tissues of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* following exposure to cadmium, copper and zinc: The relationships between metallothionein and the metals. *Environ. Pollut.* 96, 343-350.
- Chan, K.M., Ku, L.L., Chan, P.C.-Y., Cheuk, W.K., 2006. Metallothionein gene expression in zebrafish embryo-larvae and ZFL cell-line exposed to heavy metal ions. *Mar. Environ. Res.* 62, S83-S87.
- Chang, Y.T., Jong, K.J., Liao, B.K., Wu, S.M., 2007. Cloning and expression of metallothionein cDNA in the hard clam (*Meretrix lusoria*) upon cadmium exposure. *Aquaculture* 262, 504-513.
- Cheung, C.C.C., Siu, W.H.L., Richardson, B.J., De Luca-Abbott, S.B., Lam, P.K.S., 2004. Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Environ. Pollut.* 128, 393-403.
- Chu, F.-F., Doroshov, J.H., Esworthy, R.S., 1993. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J. Biol. Chem.* 268, 2571-2576.
- Cleland, R.E., Grace, S.C., 1999. Voltammetric detection of superoxide production by photosystem II. *FEBS Lett.* 457, 348-352.
- Company, R., Serafim, A., Bebianno, M.J., 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.
- Corpet, F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 16, 10881-10890.
- Culotta, V.C., Hamer, D.H., 1989. Fine mapping of a mouse metallothionein gene metal response element. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1376-1380.



- Cunha, I., Mangas-Ramirez, E., Guilhermino, L., 2007. Effects of copper and cadmium on cholinesterase and glutathione S-transferase activities of two marine gastropods (*Monodonta lineata* and *Nucella lapillus*). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 145, 648-657.
- Dallinger, R., Berger, B., 1993. Function of metallothioneins in terrestrial gastropods. *Sci. Total Environ.* 134, 607-615.
- De Freitas, D.M., Valentine, J.S., 1984. Phosphate is an inhibitor of copper-zinc superoxide dismutase. *Biochemistry* 23, 2079–2082.
- De Luca-Abbott, S.B., Richardson, B.J., McClellan, K.E., Zheng, G.J., Martin, M., Lam, P.K.S., 2005. Field validation of antioxidant enzyme biomarkers in mussels (*Perna viridis*) and clams (*Ruditapes philippinarum*) transplanted in Hong Kong coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 694-707.
- Del Carmen, E.M., Souza, V., Bucio, L., Hernandez, E., Damian-Matsumura, P., Zaga, V., Gutierrez-Ruiz, M.C., 2002. Cadmium induces α_1 collagen (I) and metallothionein II gene and alters the antioxidant system in rat hepatic stellate cells. *Toxicology* 170, 63-73.
- Del Ramo, J., Torreblanca, A., Martínez, M., Pastor, A., Díaz-Mayans, J., 1995. Quantification of cadmium-induced metallothionein in crustaceans by the silver-saturation method. *Mar. Environ. Res.* 39, 121-125.
- Denicola, A., Souza, J., Radi, R., 1993. Desferrioxamine inhibits hydroxyl radical like-reactivity from peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* 15, 497-497.
- Dhaunsi, G.S., Singh, I., Hanevold, C.D., 1993. Peroxisomal participation in the cellular response to the oxidative stress of endotoxin. *Mol. Cell. Biochem.* 126, 25-35.
- Dickhut, R.M., Gustafson, K.E., 1995. Atmospheric inputs of selected polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls to southern Chesapeake Bay. *Mar. Pollut. Bull.* 30, 385-396.
- Ding, Y., Ortell, F., Rossiter, L.C., Hemingway, J., Ranson, H., 2003. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC Genomics* 4, 35–45.
- Dixon, D.P., Cole, D.J., Edwards, R., 2000. Characterisation of a zeta class glutathione transferase from *Arabidopsis thaliana* with a putative role in tyrosine catabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 384, 407-412.
- Dixon, D.P., Laphom, A., Edwards, R., 2002. Plant glutathione transferases. *Genome Biol.* 3, 1-10.
- Djinovic, K., Gatti, G., Coda, A., Antolini, L., Pelosi, G., Desideri, A., Falconi, M., Marmocchi, F., Rotilio, G., Bolognesi, M., 1992. Crystal structure of yeast Cu,Zn superoxide dismutase : Crystallographic refinement at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 225, 791-809.
- Dondero, F., Piacentini, L., Banni, M., Rebelo, M., Burlando, B., Viarengo, A., 2005. Quantitative PCR analysis of two molluscan metallothionein genes unveils differential expression and regulation. *Gene* 345, 259-270.



- 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. Thèse de doctorat. Univ. Paul Sabatier, Toulouse, p. 169.
- Engelken, J., Hilderbrandt, A., 1999. cDNA cloning and cadmium-induced expression of metallothionein mRNA in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Biochem. Cell Biol.* 77, 237-241.
- Fita, I., Rossmann, M.G., 1985. The active center of catalase. *J. Mol. Biol.* 185, 21-37.
- Förlin, L., Blom, S., Celander, M., Sturve, J., 1996. Effects on UDP glucuronosyl transferase, glutathione transferase, DT-diaphorase and glutathione reductase activities in rainbow trout liver after long-term exposure to PCB. *Mar. Environ. Res.* 42, 213-216.
- Fowler, B.A., Hildebrand, C.E., Kojima, Y., Webb, M., 1987. Nomenclature of metallothionein. *Experientia Suppl.* 52, 19-22.
- Frayse, B., Geffard, O., Berthet, B., Quéau, H., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, A., 2006. Importance of metallothioneins in the cadmium detoxification process in *Daphnia magna*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 144, 286-293.
- Freedman, J.H., Ciriolo, M.R., Peisach, J., 1989. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol. Chem.* 264, 5598-5605.
- Fridovich, I., 1975. Superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 44, 147-159.
- Fridovich, I., 1989. Superoxide dismutases. An adaptation to aparamagnetic gas. *J. Biol. Chem.* 264, 7761-7764.
- Frohman, M.A., Dush, M.K., Martin, G.R., 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts : Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 8998-9002.
- Geffard, A., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., 2005. Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels, *Mytilus edulis*? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 209-220.
- Geffard, A., Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., 2002. Use of metallothionein in gills oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker : seasonal and intersite fluctuations. *Biomarkers* 2, 123-137.
- Geret, F., Serafim, A., Barreira, L., Bebianno, M.J., 2002a. 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., Barreira, L., Joao Bebianno, M., 2002b. Response of antioxidant systems to copper in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. *Mar. Environ. Res.* 54, 413-417.
- Ghyselinck, N.B., Dufaure, J.P., 1990. A mouse cDNA sequence for epididymal androgen-regulated proteins related to glutathione peroxidase. *Nucleic Acids Res.* 18, 7144.



- Gibson, U.E., Heid, C.A., Williams, P.M., 1992. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 6 995-1001.
- Goldstein, S., Czapski, G., 1991. Superoxide dismutase. In: *Free Radicals: A Practical Approach*, PUNCHARD, N.A. and KELLY, F.J. (Eds.), Oxford University Press, Oxford, pp. 241-246.
- Guerlet, E., Ledy, K., Giambérini, L., 2008. Is the freshwater gammarid, *Dikerogammarus villosus*, a suitable sentinel species for the implementation of histochemical biomarkers? *Chemosphere* 72, 697-702.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione s-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Halliwell, B., Clement, M.V., Long, L.H., 2000. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* 486, 10-13.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219, 1-14.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1999. *Free radicals in medicine and biology*. Oxford University press.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1985. *Free radicals in biology and medicine*. Press, Clarendon (Ed.) Oxford University Press, New York.
- Hamza-Chaffai, A., Amiard, J.C., Cosson, R.P., 1999. Relationship between metallothioneins and metals in a natural population of the clam *Ruditapes decussatus* from Sfax coast: a non-linear model using Box-Cox transformation. *Comp. Biochem. Physiol. C, Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 123, 153-163.
- Hamza-Chaffai, A., Amiard, J.C., Pellerin, J., Joux, L., Berthet, B., 2000. The potential use of metallothionein in the clam *Ruditapes decussatus* as a biomarker of in situ metal exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C, Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 127, 185-197.
- Haq, F., Mahoney, M., Koropatnick, J., 2003. Signaling events for metallothionein induction. *Mutat. Res.* 533, 211-226.
- Harris, E.D., 1992. Regulation of antioxidant enzyme. *FASEB J.* 6, 2675-2683.
- Harris, J.M., Meyer, D.J., Coles, B., Ketterer, B., 1991. A novel glutathione transferase (13-13) isolated from the matrix of rat liver mitochondria having structural similarity to class theta enzymes. *Biochem. J.* 278, 137-141.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51-88.
- Hayes, J.D., McLellan, L.I., 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.* 31, 273 – 300.



- Hayes, J.D., Pulford, D.J., 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 521-600.
- Hellou, J., Parsons, D., Mercer, G., 1997. Organochlorine contaminants in the Northern shrimp, *Pandalus borealis*, collected from the Northwest Atlantic. *Mar. Environ. Res.* 44, 99-113.
- Herwig, H.J., Brands, F., Kruitwagen, E., Zandee, D.I., 1989. Bioaccumulation and histochemical localization of cadmium in *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium chloride. *Aquat. Toxicol.* 15, 269-285.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R., 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10, 413-417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11, 1026-1030.
- Hoarau, P., Damiens, G., Romeo, M., Gnassia-Barelli, M., Bebianno, M.J., 2006. Cloning and expression of a GST-pi gene in *Mytilus galloprovincialis*. Attempt to use the GST-pi transcript as a biomarker of pollution. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 143, 196-203.
- Hoffman, D.J., Niyogi, S.K., 1977. Metal mutagens and carcinogens affect RNA synthesis rates in a distinct manner. *Science* 198, 513-514.
- Howard, A.G., Nickless, G., 1977. Heavy metal complexation in polluted molluscs I. Limpets (*Patella vulgata* and *Patella intermedia*). *Chem. Biol. Interact.* 16, 107-114.
- Hühnerfuss, H., Pfaffenberger, B., Gehrcke, B., Karbe, L., König, W.A., Landgraff, O., 1995. Stereochemical effects of PCBs in the marine environment: Seasonal variation of coplanar and atropisomeric PCBs in blue mussels (*Mytilus edulis* L.) of the german bight. *Mar. Pollut. Bull.* 30, 332-340.
- Ichikawa, I., Kiyama, S., Yoshioka, T., 1994. Renal antioxidant enzymes: Their regulation and function. *Kidney Int.* 45, 1-9.
- Ishiguro, T., Saitoh, J., Yawata, H., Yamagishi, H., Iwasaki, S., Mitoma, Y., 1995. Homogeneous Quantitative Assay of Hepatitis C Virus RNA by Polymerase Chain Reaction in the Presence of a Fluorescent Intercalater. *Anal. Biochem.* 229, 207-213.
- Ivankovic, D., Pavicic, J., Erk, M., Filipovic-Marijic, V., Raspor, B., 2005. Evaluation of the *Mytilus galloprovincialis* Lam. digestive gland metallothionein as a biomarker in a long-term field study: Seasonal and spatial variability. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 1303-1313.
- Jaiswal, A.K., 1994. Antioxidant response element. *Biochem. Pharmacol.* 48, 439-444.
- Jakobsson, P.J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., Persson, B., 1999. Common structural features of MAPEG -- a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci.* 8, 689-692.



Jena, K.B., Verlecar, X.N., Chainy, G.B.N., Application of oxidative stress indices in natural populations of *Perna viridis* as biomarker of environmental pollution. Mar. Pollut. Bull. In Press, Corrected Proof.

Jena, K.B., Verlecar, X.N., Chainy, G.B.N., 2009. Application of oxidative stress indices in natural populations of *Perna viridis* as biomarker of environmental pollution. Mar. Pollut. Bull. 58, 107-113.

Jing, G., Li, Y., Xie, L., Zhang, R., 2006. Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 144, 184-190.

Kägi, J.H.R., Vallee, B.L., 1961. Metallothionein: a cadmium and zinc-containing protein from equine renal cortex. J. Biol. Chem. 136, 2435-2442.

Kägi, J.H.R., Vasak, M., Lerch, K., Gilg, D.E., Hunziker, P., Bernhard, W.R., Good, M., 1984. Structure of mammalian metallothionein. Environ. Health Perspect. 54, 93-103.

Kang, J.J., Watson, R.M., Fisher, M.E., Higuchi, R., Gelfand, D.H., Holland, M.J., 2000. Transcript quantitation in total yeast cellular RNA using kinetic PCR. Nucleic Acids Res. 28, E2-e2.

Kayali, H.A., Tarhan, L., 2003. Influence of zinc and copper ions on metals transport, antioxidant system responses and membrane LPO levels of *F. equiseti* and *F. acuminatum*. Enzyme Microb. Technol. 33, 828-835.

Ketterer, B., Coles, B., Meyer, D.J., 1983. The role of glutathione in detoxication. Environ. Health Perspect. 49, 59-69.

Keyer, K., Imlay, J.A., 1996. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 13635-13640.

Khoo, H.W., Patel, K.H., 1999. Metallothionein cDNA, promoter and genomic sequences of the tropical green mussel *Perna viridis*. J. Exp. Zool. 284, 445-453.

Kim, Y.H., Yoo, H.Y., Jung, G., Kim, J.-Y., Rho, H.M., 1993. Isolation and analysis of the rat genomic sequence encoding Cu/Zn Superoxide dismutase. Gene 133, 267-271.

Konishi, T., Kato, K., Araki, T., Shiraki, K., Takagi, M., Tamaru, Y., 2005a. Molecular cloning and characterization of alpha-class glutathione S-transferase genes from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 140, 309-320.

Konishi, T., Kato, K., Araki, T., Shiraki, K., Takagi, M., Tamaru, Y., 2005b. A new class of glutathione S-transferase from the hepatopancreas of the red sea bream *Pagrus major*. Biochem. J. 388, 299-307.

Kryukov, G.V., Castellano, S., Novoselov, S.V., Lobanov, A.V., Zehtab, O., Guigó, R., Gladyshev, V.N., 2003. Characterization of mammalian selenoproteomes Science 300, 1439 - 1443.



- Ladhar-Chaabouni, R., Mokdad-Gargouri, R., Denis, F., Hamza-Chaffai, A., 2009. Cloning and characterization of cDNA probes for the analysis of metallothionein gene expression in the Mediterranean bivalves: *Ruditapes decussatus* and *Cerastoderma glaucum*. Mol. Biol. Rep. 36, 1007-1014.
- Lam, P.K.S., Gray, J.S., 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. Mar. Pollut. Bull. 46, 182-186.
- LaRochelle, O., Gagné, V., Charron, J., Soh, J., Séguin, C., 2001. Phosphorylation is involved in the activation of metal-regulatory transcription factor 1 in response to metal ions. J. Biol. Chem. 276, 41879-41888.
- Larzul, D., 1993. La PCR un procédé de répllication in vitro. In: Technique et Documentation Lavoisier, Editions médicales internationales, Paris, pp. 23-31.
- Lau, P.S., Wong, H.L., Garrigues, P., 2004. Seasonal variation in antioxidative responses and acetylcholinesterase activity in *Perna viridis* in eastern oceanic and western estuarine waters of Hong Kong. Continental Shelf Research 24, 1969-1987.
- 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.
- Leinio, S., Lehtonen, K.K., 2005. Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 140, 408-421.
- Lemoine, S., Bigot, Y., Sellos, D., Cosson, R.P., Laulier, M., 2000. Metallothionein isoforms in *Mytilus edulis* (Mollusca, Bivalvia): Complementary DNA characterization and quantification of expression in different organs after exposure to cadmium, zinc, and copper. Mar. Biotechnol. 2, 195-203.
- Lemoine, S., Laulier, M., 2003. Potential use of the levels of the mRNA of a specific metallothionein isoform (MT-20) in mussel (*Mytilus edulis*) as a biomarker of cadmium contamination. Mar. Pollut. Bull. 46, 1450-1455.
- Lerch, K., Johnson, G.F., Grushoff, P.S., Sternlieb, I., 1985. Canine hepatic lysosomal copper protein: Identification as metallothionein. Arch. Biochem. Biophys. 243, 108-114.
- Lesser, M.P., Kruse, V.A., 2004. Seasonal temperature compensation in the horse mussel, *Modiolus modiolus*: metabolic enzymes, oxidative stress and heat shock proteins. Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol. 137, 495-504.
- Lionetto, M.G., Giordano, M.E., Caricato, R., Pascariello, M.F., Marinosci, L., Schettino, T., 2001. Biomonitoring of heavy contamination along the Salento coast (Italy) by metallothionein evaluation in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus*. Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst. 11, 305-310.
- Liu, S., Zhang, P., Ji, X., Johnson, W.W., Gilliland, G.L., Armstrong, R.N., 1992. Contribution of tyrosine 6 to the catalytic mechanism of isoenzyme 3-3 of glutathione S-transferase. J. Biol. Chem. 267, 4296-4299.



- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* 25, 402-408.
- Livingstone, D., 1993. Biotechnology and pollution monitoring : use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J Chem Technol Biotechnol* 57, 195-211.
- Livingstone, D., Lips, F., Garcia Martinez, P., Pipe, R., 1992. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 122, 265-276.
- Livingstone, D.R., 1981. Induction of enzymes as a mechanism for the seasonal control of metabolism in marine invertebrates: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenases from the mantle and hepatopancreas of the common mussel *Mytilus edulis* L. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 69, 147-156.
- Livingstone, D.R., Martinez, P.G., Michel, X., Narbonne, J.F., O'Hara, S., Ribera, D., Winston, G.W., 1990. Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other molluscs. *Funct. Ecol.* 4, 415-424.
- Lopez-Barea, J., Barcena, J.A., Bocanegra, J.A., Florindo, J., Garcia-Alfonso, C., Lopez-Ruiz, A., Martinez-Galistero, E., Peinado, J., 1990. Structure, mechanism, functions, and regulatory properties of glutathione reductase. In: *Metabolism and Physiological Function*, J., Vina (Ed.) CRC Press, Floride, pp. 105-112.
- Luchette, P.A., Prosser, R.S., Sanders, C.R., 2002. Oxygen as a paramagnetic probe of membrane protein structure by cysteine mutagenesis and ^{19}F NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 124.
- Lynch, M., Kuramitsu, H., 2000. Expression and role of superoxide dismutases (SOD) in pathogenic bacteria. *Microbes Infect.* 2, 1245-1255.
- Machala, M., Drábek, P., Neca, J., Kolárová, J., Svobodová, Z., 1998. Biochemical markers for differentiation of exposures to nonplanar polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, or 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in trout liver. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 107-111.
- Mackay, E.A., Overnell, J., Dunbar, B., Davidson, I., Hunziker, P.E., Kägi, J.H.R., Fothergill, J.E., 1993. Complete amino acid sequences of five dimeric and four monomeric forms of metallothionein from the edible mussel *Mytilus edulis*. *Eur. J. Biochem.* 218, 183-194.
- Mackay, I.M., Arden, K.E., Nitsche, A., 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 30, 1292-1305.
- Malanga, G., Estevez, M.S., Calvo, J., Abele, D., Puntarulo, S., 2007. The effect of seasonality on oxidative metabolism in *Nacella (Patinigera) magellanica*. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 146, 551-558.
- Manduzio, H., Monsinjon, T., Galap, C., Leboulenger, F., Rocher, B., 2004. Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquat. Toxicol.* 70, 83-93.



- Manduzio, H., Monsinjon, T., Rocher, B., Leboulenger, F., Galap, C., 2003. Characterization of an inducible isoform of the Cu/Zn superoxide dismutase in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 64, 73-83.
- Margoshes, M., Vallee, B.L., 1957. A cadmium protein from equine kidney costex. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4813-4819.
- Marklund, S.L., Holme, E., Hellner, L., 1982. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clinal and Chimal Acta* 126, 41-51.
- Marques, C.C., Gabriel, S.I., Pinheiro, T., Viegas-Crespo, A.M., da Luz Mathias, M., Bebianno, M.J., 2008. Metallothionein levels in Algerian mice (*Mus spretus*) exposed to elemental pollution: an ecophysiological approach. *Chemosphere* 71, 1340-1347.
- Martín-Díaz, M.L., Blasco, J., Sales, D., DelValls, T.A., 2007. Biomarkers study for sediment quality assessment in Spanish ports using the crab *Carcinus maenas* and the clam *Ruditapes philippinarum*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 66-76.
- Martín-Díaz, M.L., Blasco, J., Sales, D., DelValls, T.A., 2008. Field validation of a battery of biomarkers to assess sediment quality in Spanish ports. *Environ. Pollut.* 151, 631-640.
- Martín-Díaz, M.L., Villena-Lincoln, A., Bamber, S., Blasco, J., DelValls, T.Á., 2005. An integrated approach using bioaccumulation and biomarker measurements in female shore crab, *Carcinus maenas*. *Chemosphere* 58, 615-626.
- Martínez-Lara, E., Toribio, F., López-Barea, J., Bárcena, J.A., 1996. Glutathione-S-transferase isoenzyme patterns in the gilthead seabream (*Sparus aurata*) exposed to environmental contaminants. *Comp. Biochem. Physiol. C, Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 113, 215-220.
- Martinez, M., Del Ramo, J., Torreblanca, A., Pastort, A., Diaz-Mayans, J., 1996. Cadmium toxicity, accumulation and metallothionein induction in *Echinogammarus echinosetosus* J. *Environ. Sci. Health A31*, 1605-1617.
- Martínez, M., Torreblanca, A., Del Ramo, J., Pastor, A., Díaz-Mayans, J., 1993. Cadmium induced metallothionein in hepatopancreas of *Procambarus clarkii*: Quantification by a silver-saturation method. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 105, 263-267.
- Matozzo, V., Ballarin, L., Pampanin, D.M., Marin, M.G., 2001. Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam, *Tapes philippinarum*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 163-170.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- McMahon, R.F., 1982. The occurrence and spread of the introduced Asiatic freshwater clam, *Corbicula fluminea* (Müller), in North America: 1924-1982. *Nautilus* 96, 134-141.
- Mehler, A.H., 1951. Studies on reactions of illuminated chloroplasts. II. Stimulation and inhibition of the reaction with molecular oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.* 34, 339-351.
- Meister, A., Anderson, R.S., 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 711-760.



- Mills, G.C., 1957. Hemoglobin catabolism. I - Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* 229, 189-197.
- Morrison, T.B., Weis, J.J., Wittwer, C.T., 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24, 952-962.
- Mosleh, Y.Y., Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S., 2006. Metallothioneins induction and antioxidative response in aquatic worms *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae) exposed to copper. *Chemosphere* 64, 121-128.
- Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Cottier, A., Rainbow, P.S., Smith, B.D., 2002. Partitioning of accumulated trace metals in the talitrid amphipod crustacean *Orchestia gammarellus*: a cautionary tale on the use of metallothionein-like proteins as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 57, 225-242.
- Mourgaud, Y., Martinez, E., Geffard, A., Andral, B., Stanisiere, J., Amiard, J., 2002. Metallothionein concentration in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of response to metal contamination : validation in the field. *Biomarkers* 7, 479-490.
- Mouthon, J., 1981. Sur la présence en France et au Portugal de *Corbicula* (Bivalvia, *Corbiculidae*) originaire d'Asie. *Basteria* 45, 109-116.
- Moyes, C., Schulte, P., 2007. Principles of Animal Physiology. Pearson-Education (Ed.) Benjamin Cummings, New York.
- Mugesh, G., Panda, A., Singh, H.B., Puneekar, N.S., Butcher, R.J., 2001. Glutathione peroxidase-like antioxidant activity of diaryl diselenides: a mechanistic study. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 839-850.
- Nasci, C., Nesto, N., Monteduro, R.A., Da Ros, L., 2002. Field application of biochemical markers and a physiological index in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*: transplantation and biomonitoring studies in the lagoon of Venice (NE Italy). *Mar. Environ. Res.* 54, 811-816.
- Nikpour, Y., Zolgharnein, H., Sinaei, M., Najafzadeh, H., Ghavasi, M., 2008. Evaluation of metallothionein expression as a biomarker of mercury exposure in *Scatophagus argus*. *Pak J Biol Sci.* 11, 2269-2273.
- Niyogi, S., Biswas, S., Sarker, S., Datta, A.G., 2001. Antioxidant enzymes in brackishwater oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary (India): seasonality and its consequences. *The Science of The Total Environment* 281, 237-246.
- Orbea, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M.P., 2002. Interactive effects of benzo(a)pyrene and cadmium and effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on antioxidant and peroxisomal enzymes and peroxisomal volume density in the digestive gland of mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Biomarkers* 7, 33-48.
- Overnell, J., Trehwella, E., 1979. Evidence for the natural occurrence of (cadmium, copper)-metallothionein in the crab *Cancer pagurus*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 64, 69-76.



- Page, D.S., 1995. A six-year monitoring study of tributyltin and dibutyltin in mussel tissues from the Lynher River, Tamar Estuary, UK. *Mar. Pollut. Bull.* 30, 746-749.
- Pahl, A., Enna, S.J., David, B.B., 2007. Prostaglandin-D Synthase. In: *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Elsevier, New York, pp. 1-5.
- Pan, L., Zhang, H., 2006. Metallothionein, antioxidant enzymes and DNA strand breaks as biomarkers of Cd exposure in a marine crab, *Charybdis japonica*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 144, 67-75.
- Pedersen, S.N., Lundebye, A.K., Depledge, M.H., 1997. Field application of metallothionein and stress protein biomarkers in the shore crab (*Carcinus maenas*) exposed to trace metals. *Aquat. Toxicol.* 37, 183-200.
- Pedersen, S.N., Pedersen, K.L., Hjrur, P., Knudsen, J., Depledge, M.H., 1998. Induction and identification of cadmium-, zinc- and copper-metallothioneins in the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Comp. Biochem. Physiol. C, Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 120, 251-259.
- Pemble, S.E., Taylor, J.B., 1992. An evolutionary perspective on glutathione transferases inferred from class-theta glutathione transferase cDNA sequences. *Biochem. J.* 287, 957-963.
- Pemble, S.E., Wardle, A.F., Taylor, J.B., 1996. Glutathione S-transferase class Kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. *Biochem. J.* 319, 749-754.
- Petrovic, S., Ozretic, B., Krajnovic-Ozretic, M., Bobinac, D., 2001. Lysosomal membrane stability and metallothioneins in digestive gland of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) as biomarkers in a field study. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 1373-1378.
- Pillai, V.K., Valsala, K.K., 1995. Seasonal variations of some metals in bivalve mollusc *Sunetta scripta* from the Cochin coastal waters. *Ind. J. Mar. Sci.* 24, 113-115.
- Piscator, M., 1964. On cadmium in normal human kidneys with a report on the isolation of metallothionein from cadmium exposed rabbit livers. *Nord. Hyg. Tidskr.* 45, 76-82.
- Power, A., Sheehan, D., 1996. Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 114, 99-103.
- Prakash, N.T., Rao, K.S.J., 1995. Modulations in antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalve *Perna viridis* during heavy metal exposure. *Mol. Cell. Biochem.* 146, 107-113.
- Putnam, C.D., Arvai, A.S., Bourne, Y., Tainer, J.A., 2000. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J. Mol. Biol.* 296, 295-309.
- Radtke, F., Heucher, R., Georgiev, O., Schaffner, W., Stark, G., Aguet, M., 1995. Gene disruption of the transcription factor MTF-1 leads to loss of metal regulation of mouse metallothionein genes. In: *Genetic Response to Metals*, Sarkar, Bibudhendra (Ed.) CRC Press, Toronto, pp. 411-421.



Richardson, B.J., Mak, E., De Luca-Abbott, S.B., Martin, M., McClellan, K., Lam, P.K.S., 2008. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels "integrate" biomarker responses? Mar. Pollut. Bull. 57, 503-514.

Ringwood, A.H., 1993. Age-specific differences in cadmium sensitivity and bioaccumulation in bivalve molluscs. Mar. Environ. Res. 35, 35-39.

Ringwood, A.H., Connors, D.E., DiNovo, A., 1998. The effects of copper exposures on cellular responses in oysters. Mar. Environ. Res. 46, 591-595.

Rocher, B., Le Goff, J., Peluhet, L., Briand, M., Manduzio, H., Gallois, J., Devier, M.H., Geffard, O., Gricourt, L., Augagneur, S., Budzinski, H., Pottier, D., André, V., Lebailly, P., Cachot, J., 2006. Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. Aquat. Toxicol. 79, 65-77.

Roesijadi, G., 1994. Metallothionein induction as a measure of response to metal exposure in aquatic animals. Environ. Health Perspect. 102, 91-96.

Roesijadi, G., 1996. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 113, 117-123.

Roesijadi, G., Drum, A.S., Thomas, J.M., Fellingham, G.W., 1982. Enhanced mercury tolerance in marine mussels and relationship to low molecular weight, mercury-binding proteins. Mar. Pollut. Bull. 13, 250-253.

Roesijadi, G., Kielland, S., Klerks, P., 1989. Purification and properties of novel molluscan metallothioneins. Arch. Biochem. Biophys. 273, 403-413.

Roesijadi, 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.

Roesijadi, G., Vestling, M.M., Murphy, C.M., Klerks, P.L., Fenselau, C.C., 1991. Structure and time-dependent behavior of acetylated and non-acetylated forms of a molluscan metallothionein. Biochim. Biophys. Acta 1074, 230-236.

Roméo, M., Gharbi-Bouraoui, S., Gnassia-Barelli, M., Dellali, M., Aïssa, P., 2006. Responses of *Hexaplex* (*Murex*) *trunculus* to selected pollutants. Sci. Total Environ. 359, 135-144.

Romero-Isart, N., Vasak, M., 2002. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. J. Inorg. Biochem. 88, 388-396.

Roveri, A., Maiorino, M., Nisii, C., Ursini, F., 1994. Purification and characterization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from rat testis mitochondrial membranes. Biochim. Biophys. Acta 1208, 211-221.

Rushmore, T.H., Morton, M.R., Pickett, C.B., 1991. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. J. Biol. Chem. 266, 11632-11639.



Rutledge, R.G., Côté, C., 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res.* 31, e93.

Sadhu, C., Gedamu, L., 1989. Metal-specific posttranscriptional control of human metallothionein genes. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5738-5741.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.

Santovito, G., Piccinni, E., Cassini, A., Irato, P., Albergoni, V., 2005. Antioxidant responses of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, to environmental variability of dissolved oxygen. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 140, 321-329.

Saydam, N., Georgiev, O., Nakano, M.Y., Greber, U., Schaffner, W., 2001. Nucleocytoplasmic trafficking of metal-regulatory transcription factor 1 is regulated by diverse stress signals. *J. Biol. Chem.* 276, 25487-25495.

Schlezing, J.J., White, R.D., Stegeman, J.J., 1999. Oxidative inactivation of cytochrome P-450 1A (CYP1A) stimulated by 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl: production of reactive oxygen by vertebrate CYP1As. *Mol. Pharmacol.* 56, 588-597.

Searle, M.S., Embrey, K.J., 1990. Sequence-specific interaction of Hoechst 33258 with the minor groove of an adenine-tract DNA duplex studied in solution by ¹H NMR spectroscopy. *Nucleic Acids Res.* 18, 3753-3762.

Şereflişan, H., Çek, Ş., Şereflişan, M., 2009. Histological studies on gametogenesis, hermaphroditism and the gametogenic cycle of *Anodonta gabillotia pseudodopsis* (Locard, 1883) in the lake Gölbaşı, Turkey (bivalvia: Unionidae). *Journal of Shellfish Research* 28, 337-344.

Sheehan, D., McIntosh, J., Power, A., Fitzpatrick, P.J., 1995. Environmental biochemistry. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 419-422.

Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360, 1-16.

Sheehan, D., Power, A., 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comp. Biochem. Physiol. C, Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 123, 193-199.

Sies, H., William, B.J., 1981. Measurement of hydrogen peroxide formation *in situ*. *Meth. Enzymol.* 77, 15-20.

Simes, D.C., Bebianno, M.J., Moura, J.J.G., 2003. Isolation and characterisation of metallothionein from the clam *Ruditapes decussatus*. *Aquat. Toxicol.* 63, 307-318.

Sinning, I., Kleywegt, G.J., Cowan, S.W., Reinemer, P., Dirr, H.W., Huber, R., Gilliland, G.L., Armstrong, R.N., Ji, X., Board, P.G., Olin, B., Mannervik, B., Jones, T.A., 1993. Structure determination and refinement of human alpha class glutathione transferase A1-1, and a comparison with the mu and pi class enzymes. *J. Mol. Biol.* 232, 192-212.



- Sluis-Cremer, N., Dirr, H., 1995. Conformational stability of Cys45-alkylated and hydrogen peroxide-oxidised glutathione S-transferase. *FEBS Lett.* 371, 94-98.
- Smaoui-Damak, W., Hamza-Chaffai, A., Bebianno, M.J., Amiard, J.C., 2004. Variation of metallothioneins in gills of the clam *Ruditapes decussatus* from the Gulf of Gabès (Tunisia). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 139, 181-188.
- Smirnova, I.V., Bittel, D.C., Ravindra, R., Jiang, H., Andrews, G.K., 2000. Zinc and cadmium can promote rapid nuclear translocation of metal response element-binding transcription factor-1. *J. Biol. Chem.* 275, 9377-9384.
- Stillman, M.J., 1995. Metallothioneins. *Coord. Chem. Rev.* 144, 461-511.
- Stillman, M.J., Law, A.Y., Cai, W.H., Zelazowski, A.J., 1987. Information on metal binding properties of metallothioneins from optical spectroscopy. *Experientia Suppl.* 52, 203-211.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 321-336.
- Strolin-Benedetti, M., Brogin, G., Bani, M., Oesch, F., Hengstler, J.G., 1999. Association of cytochrome P450 induction with oxidative stress in vivo as evidenced by 3-hydroxylation of salicylate. *Xenobiotica* 29, 1171-1180.
- Swaileh, K.M., 1996. Seasonal variations in the concentrations of Cu, Cd, Pb and Zn in *Arctica islandica* L. (Mollusca: Bivalvia) from Kiel Bay, Western Baltic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 631-635.
- Swinnen, F., Leynen, M., Sablon, R., Duvivier, L., Vanmaele, R., 1998. The asiatic clam *Corbicula* (Bivalvia: Corbiculidae). *Bull. Inst. Royal Sc. Nat. Belgique* 68, 47-53.
- Tachet, H., Richoux, P., Bournaud, M., Usseglio-Polatera, P., 2000. Les bivalves. In: *Invertébrés d'eau douce, systématique, biologie, écologie*, Editions, CNRS (Ed.) vol. 1. Paris, pp. 137-141.
- Takahashi, K., Avissar, N., Whitin, J., Cohen, H., 1987. Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: A selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 256, 677-686.
- Tappel, M.E., Chaudiere, J., Tappel, A.L., 1982. Glutathione peroxidase activities of animal tissues. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 73, 945-949.
- Tavares-Sánchez, O.L., Gómez-Anduro, G.A., Felipe-Ortega, X., Islas-Osuna, M.A., Sotelo-Mundo, R.R., Barillas-Mury, C., Yepiz-Plascencia, G., 2004. Catalase from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: molecular cloning and protein detection. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 138, 331-337.
- Tessier, C., Blais, J.-S., 1996. Determination of cadmium-metallothioneins in zebra mussels exposed to subchronic concentrations of Cd²⁺. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 33, 246-252.
- Thannickal, V.J., Fanburg, B.L., 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279, 1005-1028.



- Tong, Z., Board, P.G., Anders, M.W., 1998. Glutathione transferase Zeta catalyses the oxygenation of the carcinogen dichloroacetic acid to glyoxylic acid. *Biochem. J.* 331, 371-374.
- Tsuchida, S., Sato, K., 1992. Glutathione transferases and cancer. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 27, 337-384.
- Ursini, F., Maiorino, M., Valente, M., Ferri, L., Gregolin, C., 1982. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim. Biophys. Acta* 710, 197-211.
- Utomo, A., Jiang, X., Furuta, S., Yun, J., Levin, D.S., Wang, Y.-C.J., Desai, K.V., Green, J.E., Chen, P.-L., Lee, W.-H., 2004. Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 279, 43522–43529.
- Varshney, U., Jahroudi, N., Foster, R., Gedamu, L., 1986. Structure, organization, and regulation of human metallothionein IF gene: differential and cell-type-specific expression in response to heavy metals and glucocorticoids. *Mol. Cell. Biol.* 6, 26-37.
- Verboost, P.M., Flik, G., Lock, R.A., Wendelaar Bonga, S.E., 1988. Cadmium inhibits plasma membrane calcium transport. *J. Membr. Biol.* 102, 97-104.
- Verlecar, X.N., Jena, K.B., Chainy, G.B.N., 2007. Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature. *Chem. Biol. Interact.* 167, 219-226.
- Verlecar, X.N., Jena, K.B., Chainy, G.B.N., 2008. Seasonal variation of oxidative biomarkers in gills and digestive gland of green-lipped mussel *Perna viridis* from Arabian Sea. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* 76, 745-752.
- 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, 1612-1619.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D.R., 1991. Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 100, 187-190.
- Viarengo, A., Moore, M.N., Mancinelli, G., Mazzucotelli, A., Pipe, R.K., 1985. Significance of metallothioneins and lysosomes in cadmium toxicity and homeostasis in the digestive gland cells of mussels exposed to the metal in presence or absence of phenanthrene. *Mar. Environ. Res.* 17, 184-187.
- Viarengo, A., Moore, M.N., Mancinelli, G., Mazzucotelli, A., Pipe, R.K., Farrar, S.V., 1987. Metallothioneins and lysosomes in metal toxicity and accumulation in marine mussels: the effect of cadmium in the presence and absence of phenanthrene. *Mar. Biol.* 94, 251-257.
- Viarengo, A., Nott, J.A., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 104, 355-372.



- Viarengo, A., Pertica, M., Canesi, L., Mazzucotelli, A., Orunesu, M., Bouquegneau, J.M., 1989. Purification and biochemical characterization of a lysosomal copper-rich thionein-like protein involved in metal detoxification in the digestive gland of mussels. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 93, 389-395.
- Viarengo, A., Pertica, M., Mancinelli, G., Zanicchi, G., Orunesu, M., 1980. Rapid induction of copper-binding proteins in the gills of metal exposed mussels. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 67, 215-218.
- Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullos, M.J., Valavanidis, A., 2007. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 1361-1371.
- Wan, X.S., Devalaraja, M.N., Clair, D.K., 1994. Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol.* 13, 1127-1136.
- Wang, D., Couillard, Y., Campbell, G.C., Jolicoeur, P., 1999. Changes in subcellular metal partitioning in the gills of freshwater bivalves (*Pyganodon grandis*) living along an environmental cadmium gradient. *Can J. Fish Aquat. Sci.* 56, 774-784.
- Whittemore, E.R., Loo, D.T., Cotman, C.W., 1994. Exposure to hydrogen peroxide induces cell death via apoptosis in cultured rat cortical neurons. *Neuroreport* 5, 1485-1488.
- Wilce, M.C.J., Parker, M.W., 1994. Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochim. Biophys. Acta* 1205, 1-18.
- Wilhelm Filho, D., Tribess, T., Gaspari, C., Claudio, F.D., Torres, M.A., Magalhaes, A.R.M., 2001. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). *Aquaculture* 203, 149-158.
- Willson, R.L., 1978. Hydroxyl radicals and biological damage in vitro: what relevance in vivo? *Ciba Found. Symp.* 65, 19-42.
- Winge, D.R., Miklossy, K.-A., 1982. Differences in the polymorphic forms of metallothionein. *Arch. Biochem. Biophys.* 214, 80-88.
- Yang, M.S., Lai, K.P., Cheng, K.Y., Wong, C.K.C., 2000. Changes in endogenous Zn and Cu distribution in different cytosolic protein fractions in mouse liver after administration of a single sublethal dose of CdCl₂. *Toxicology* 154, 103-111.
- Yoneda, M., Katsumata, K., Hayakawa, M., Tanaka, M., Ozawa, T., 1995. Oxygen stress induces an apoptotic cell death associated with fragmentation of mitochondrial genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 723-729.
- Yoshioka, T., Homma, T., Meyrick, B., Takeda, M., Moore-Jarret, T., Kon, V., Ichikawa, I., 1994. Oxidants induce transcriptional activation of manganese superoxide dismutase in glomerular cells. *Kidney Int.* 46, 405-413.
- Yu, B.P., 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74, 139-163.



Zhao, T., Singhal, S.S., Piper, J.T., Cheng, J., Pandya, U., Clark-Wronski, J., Awasthi, S., Awasthi, Y.C., 1999. The role of human glutathione S-transferases hGSTA1-1 and hGSTA2-2 in protection against oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* 367, 216-224.

Zhou, J.L., Fileman, T.W., Evans, S., Donkin, P., Mantoura, R.F.C., Rowland, S.J., 1996. Seasonal distribution of dissolved pesticides and polynuclear aromatic hydrocarbons in the Humber Estuary and Humber coastal zone. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 599-608.

Zorita, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Soto, M., Cajaraville, M.P., 2006. Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): An integrated biochemical, histochemical and histological study. *Aquat. Toxicol.* 78, S109-S116.

RÉSUMÉ

Les perturbations environnementales peuvent induire des changements au niveau génétique, biochimique et physiologique chez les organismes exposés. Pour faire face à ces perturbations, les bivalves possèdent des défenses antioxydantes telles que la métallothionéine (MT), la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxidase sélénium dépendante (Se-GPx) et la glutathion S-transférase de classe pi (pi-GST). L'objectif de ce travail est de contribuer à la compréhension des mécanismes de détoxification chez les bivalves d'eau douce *Unio tumidus* et *Corbicula fluminea*. Les mollusques bivalves sont largement utilisés comme espèce sentinelle pour étudier la qualité de l'écosystème aquatique. Ce sont des organismes sédentaires, filtreurs, pouvant bioaccumuler une grande quantité de micropolluants environnementaux et qui peuvent être facilement transférés dans des milieux contaminés. La séquence codante de MT de *Corbicula fluminea*, ainsi que les séquences codantes de MT, SOD et CAT d'*Unio tumidus* ont été identifiées par RT-PCR en utilisant des amorces dégénérées. L'expression de ces gènes, ainsi que ceux de la Se-GPx et de la GST-pi, a ensuite été étudiée au niveau des ARNm dans différents cas d'études : (i) chez des bivalves prélevés sur une période d'un an dans le but d'identifier une éventuelle variation de l'expression en fonction de la saison, (ii) chez *Corbicula fluminea* exposée au cuivre et au cadmium, (iii) et chez *Unio tumidus* transférée au niveau de stations situées le long de la Moselle. Nous avons mis en évidence des variations du niveau d'expression des gènes dues à des paramètres saisonniers tels que la température de l'eau et le cycle de reproduction, principalement chez *Unio tumidus*. Nos résultats ont montré que les niveaux d'expression des ARNm de MT, SOD, CAT, Se-GPx et GST-pi peuvent être utilisés en tant que biomarqueurs précoces d'exposition au cuivre et au cadmium chez *Corbicula fluminea*. Des variations d'expression de tous les gènes étudiés ont également été observées chez *Unio tumidus*, mettant en évidence une anthropisation du milieu aquatique, non détectée par les analyses physico-chimiques. Les approches biologiques apparaissent donc comme des outils indispensables à la détection de perturbations environnementales.

Mots clés: ARNm, biomarqueurs, bivalves, PCR quantitative en temps réel, stress oxydant.

ABSTRACT

Environmental perturbations can induce genetic, biochemical and physiological changes in exposed organisms. To protect from oxidative stress, bivalves possess defences such as metallothionein (MT), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) and pi class glutathione S-transferase (pi-GST). The aim of this study is to contribute to the understanding of the detoxification mechanisms in the freshwater bivalves *Unio tumidus* and *Corbicula fluminea*. Bivalve molluscs are appropriate sentinel species to study the quality of the aquatic environment. They are sedentary, filter-feeding species, bioaccumulating high amounts of environmental micropollutants and can easily be transferred to contaminated areas. The MT coding sequence of *Corbicula fluminea* and the MT, SOD and CAT coding sequences of *Unio tumidus* were identified by RT-PCR using degenerated primers. Then, the mRNA expression level of MT, SOD, CAT, Se-GPx and pi-GST was measured in different studies: (i) in bivalves sampled during a 1-year period in order to identify possible seasonal variations of the expression pattern, (ii) in *Corbicula fluminea* exposed to copper and cadmium, (iii) and in *Unio tumidus* transplanted in stations located along the Moselle River. Fluctuations of the mRNA level, supposed to correspond to seasonal parameter such as water temperature and reproductive statute, were noted, principally in *Unio tumidus*. Our results pointed out that MT, SOD, CAT, Se-GPx and GST-pi mRNA expression level could be used as early exposure biomarkers of copper and cadmium exposure in *Corbicula fluminea*. Variations of gene expression were observed in *Unio tumidus*, highlighting anthropic impacts on aquatic ecosystem no detected by chemical analysis. Biological approaches appear as essential tools to detect environmental degradations.

Key words: mRNA, biomarkers, bivalves, Real-Time Quantitative PCR, oxidative stress.

