

Expression génique de la métallothionéine (MT) chez les vers de terre (biomarqueur de contamination des sols par le Cadmium)

F. Vandenbulcke, F. Bernard et F. Brulle. LGCGE-Lille 1
Contact : franck.vandenbulcke@univ-lille1.fr



DESCRIPTION DE L'INDICATEUR

Nom de l'indicateur : Expression génique de la métallothionéine chez les vers de terre, un indicateur de contamination métallique, notamment par le cadmium.

Rôle écologique de l'indicateur testé : Les vers de terre constituent l'un des plus importants taxons du sol. Ils remplissent un rôle important dans la transformation des éléments nutritifs, la répartition des flux d'énergie dans les écosystèmes terrestres et l'augmentation de la fertilité des sols. Les nombreux effets, directs et indirects, des activités des vers de terre sur l'eau, les nutriments et le cycle du carbone expliquent que, depuis les premiers travaux de Darwin (1883), les vers de terre sont, sous les climats tempérés et tropicaux, considérés comme les ingénieurs de l'écosystème sol (Lavelle & Spain, 2001). De plus, en raison de leur biologie, les populations de vers de terre peuvent renseigner sur les conditions de structure du sol, les conditions microclimatiques, la situation nutritionnelle et les éléments toxiques présents dans les sols (Christensen, 1988; Edwards & Bohlen, 1996; Edwards, 1998 (Kautenburger *et al.*, 2006). Pour ces raisons, les lumbricidés ont ainsi été adoptés par la communauté internationale comme **bio-indicateurs** pour l'étude de l'impact écologique potentiel (Ecological Risk Assessment ou ERA) de contaminants, tels que les pesticides, les hydrocarbures et les Eléments Traces Métalliques (ETMs) provenant de sources anthropiques (voir Spurgeon *et al.*, 2003).



Figure 1 : *Lumbricus rubellus*

Type d'indicateur : L'émergence des techniques de biologie moléculaire appliquée à l'écotoxicologie, a permis une meilleure compréhension des mécanismes d'action des contaminants dans les organismes vivants et l'apport de connaissance, en particulier de « données de séquence » chez des espèces très utilisées en écotoxicologie. Dans ce contexte, les travaux portant notamment sur l'expression génique se sont développés. En effet, **les profils d'expression génique** représentent le premier niveau d'intégration entre les facteurs de stress environnementaux et le génome, qui, grâce à la synthèse des protéines, pilote la réponse des organismes aux changements externes. Ainsi, l'analyse des changements d'expression des gènes est un outil puissant, (1) pour diagnostiquer l'existence d'un stress dans une population et (2) analyser de façon mécanistique la réponse à un stress (Brulle *et al.*, 2008).

En écotoxicologie, des mesures de bioindicateurs et de biomarqueurs peuvent être réalisées chez des organismes collectés (espèces sentinelles) directement sur des sites pollués, cela à des fins de biosurveillance pour l'étude de « l'impact écologique potentiel » (Ecological risk assessment ou ERA) de contaminants, tels que les pesticides, les hydrocarbures et les ETMs provenant de sources anthropiques.

Le travail consiste en la mesure du niveau d'expression du gène codant la Métallothionéine (MT2), une protéine de détoxification de métaux, chez des lombriciens collectés sur des sites contaminés par des ETMs. Des travaux antérieurs montrent que la mesure de l'expression du gène *mt2* semble constituer un bioindicateur pertinent dans un contexte de pollution métallique (Brulle *et al.*, 2006 ; 2007b ; 2008).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Normes et/ou protocoles de référence

Publications de référence : Brulle *et al.*, 2006 ; 2007.

Collecte et tri, précisions importantes

- Le niveau d'expression de la MT2 est mesuré à partir d'un échantillon composite constitué d'animaux constitués d'un seule et même espèce) issus des prélèvements réalisés dans chaque zone d'échantillonnage.
- L'identification de l'espèce est indispensable.
- Nombre de vers d'une même espèce requis : 12 par zone de prélèvement (l'analyse du niveau d'expression de la MT2 peut être réalisée chez toutes les espèces chez lesquelles le gène a été cloné et séquencé)

Description des étapes en laboratoire

1. dès réception des animaux, les faire jeûner 2 à 3 jours dans de l'Agar de façon à vider l'intestin.
2. pour chaque lot de vers, broyer les animaux en milieu liquide dans du Tri-ReagentTM (Euromedex) à l'aide d'un broyeur (T8 ultraturax IKA)
3. congeler les échantillons à -80°C jusqu'à utilisation
4. lorsqu'il sera décidé de faire les mesures (nécessité technique de regrouper les échantillons), décongeler sur glace
5. extraction individuelle de l'ARN de chaque lot d'animaux
6. dosage très précis des quantités d'ARN extraits
7. aliquoter et recongeler les ARN ainsi extraits au fur et à mesure des extractions
8. lorsque toutes les extractions sont réalisées, décongeler les échantillons
9. refaire un dosage très précis
10. RT (reverse transcription = transformation des ARN en ADN complémentaires) de tous les lots d'ARN à doser.
11. mesure par PCR temps réel de l'expression génique de mt2 en duplicat ou en triplicat pour chaque échantillon. Pour certains sites, il peut y avoir plusieurs mesures correspondant à plusieurs lots d'animaux de la même espèce ou appartenant à plusieurs espèces.
12. mesures de l'expression génique d'un ou deux gènes de ménage dont l'expression servira de référence (gènes choisis : β -actine et protéine ribosomale S13). Mesures réalisées en duplicat ou triplicat également.
13. analyse statistique et exploitation des résultats. Nous réalisons une quantification de l'expression du gène MT par rapport au niveau d'expression d'un ou plusieurs gènes de ménage (gènes de référence).
14. Rendu des résultats sous forme d'histogrammes et interprétation en fonction des statistiques.

Estimation du temps : collecte : 1 journée ; Traitement des échantillons : 3 à 5 jours en fonction du nombre d'échantillons

Paramètre mesuré

- Niveau d'expression du gène codant la MT
- Le niveau d'expression peut varier jusqu'à 10 fois sur les sites fortement contaminés par des métaux

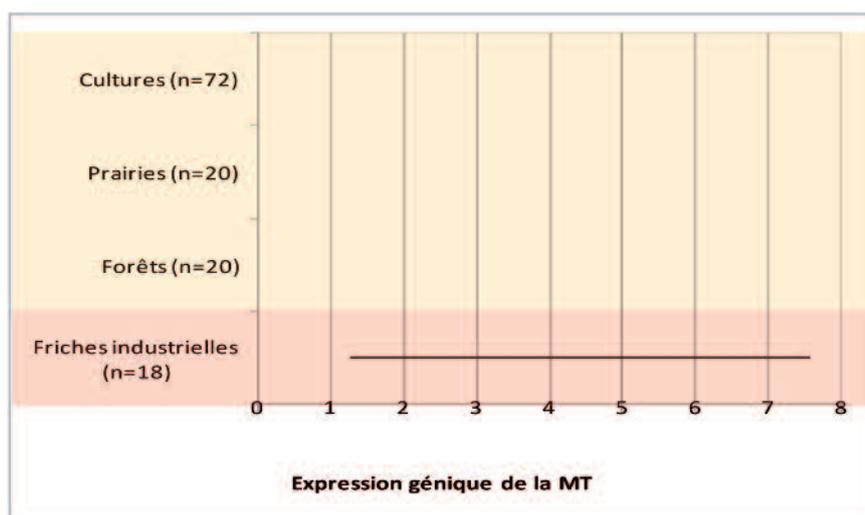


Figure 2 : Gamme de variation de l'expression de la MT mesurée uniquement sur les sites contaminés du programme Bioindicateur 2.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Quantification relative du niveau d'expression

Pour chaque échantillon, le niveau d'expression du gène cible a été comparé à l'expression du gène de la β -actine (β -act) qui est exprimé de manière constitutive (Ricketts *et al.* 2004). Le rapport d'expression (R) a été calculé selon la formule : $R = (EG_c)^{CP_{Gc}} / (Eact)^{CP_{act}}$. Un autre gène contrôle exprimé de manière constitutive et codant la protéine ribosomale S 13 (RiboS13) a été utilisé lors de nos expérimentations. Pour calculer l'efficacité d'amplification (E) de chaque effecteur, des courbes de calibration ont été générées en utilisant une série de dilution (1 :10, 1 :100, 1:1000, 1 :10000) d'un cocktail d'ADNc constitué par un mélange d'ADNc (un par condition) de notre expérimentation. Les courbes de calibration ont été réalisées par le logiciel LightCycler®480 Software release 1.2.0.0625. Elles sont basées sur les valeurs de points de croisement et la valeur en log de la dilution d'ADNc. L'efficacité de la PCR en temps réel a été calculée à partir de la pente de la courbe de calibration en suivant l'équation suivante : $E = 10^{(-1/pente)}$.

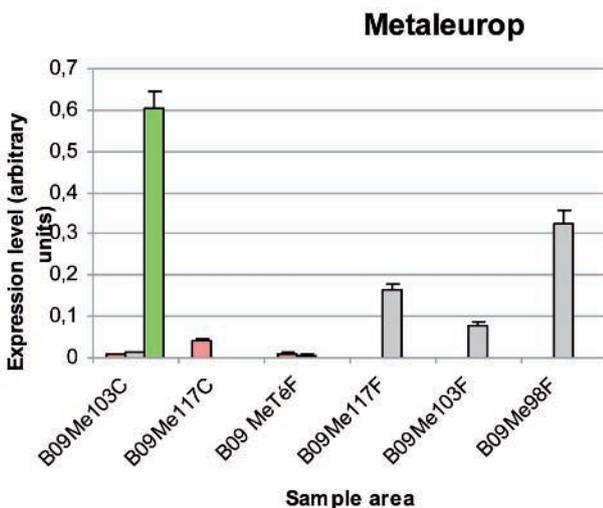
Un **référentiel global** semble pouvoir être déterminé. En effet, plus la contamination métallique est faible, plus le niveau d'expression du gène *mt2* semble faible, parfois non détectable. Attention cependant, pour certaines espèces, les données sont très peu nombreuses.

Des informations complémentaires tels que climat, usage du sol, type de sol ne semblent pas nécessaire. Cependant, certains paramètres tels que pH, texture, CEC, teneur en Matière Organique peuvent influencer la biodisponibilité des métaux et sont donc susceptibles d'affecter le niveau d'expression de la MT2, protéine de détoxication de métaux.

EXEMPLE D'APPLICATION

Il est possible de considérer les données par site ou par espèce sur l'ensemble des sites où l'espèce considérée est collectée

Données par site



Légende

F : forêt
 C : culture
 B09Me98F : fortement contaminé
 B09Me117C ; B09Me117F: moyennement contaminé
 B09Me103c ; ; B09Me103F : faiblement contaminé
 B09MeTéF : témoin

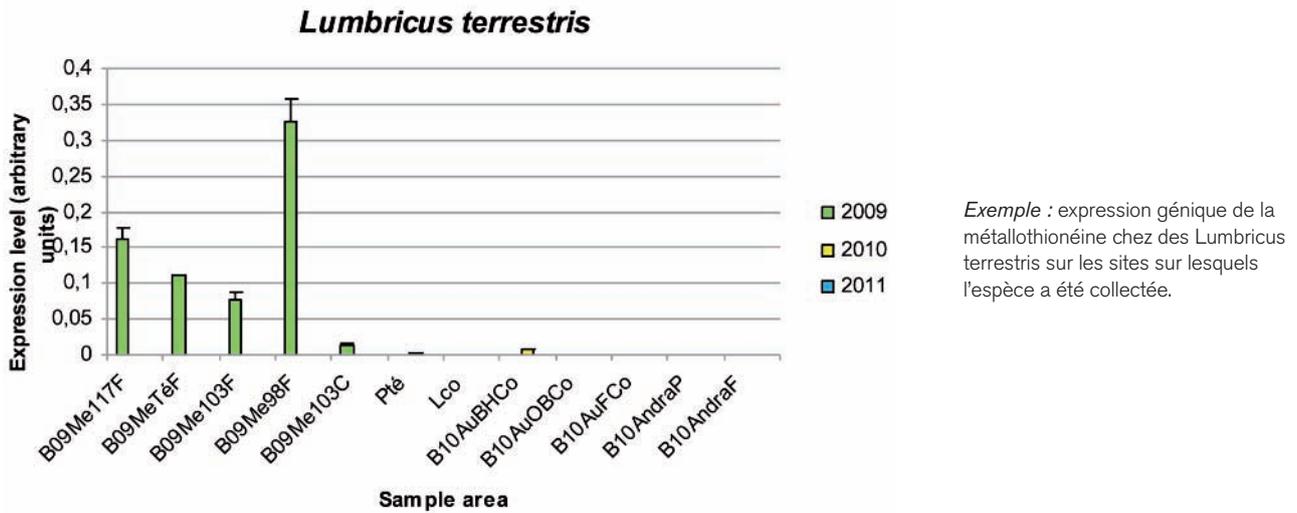
- Lumbricus rubellus
- Lumbricus terrestris
- Allobophora chlorotica

Exemple : expression génique de la métallothionéine chez des vers (appartenant à plusieurs espèces) collectés sur le site Metaleurop.

Les résultats obtenus montrent une expression de la métallothionéine (MT) plus ou moins forte selon les espèces (Figure 2). Chez Lumbricus terrestris, espèce trouvée sur la plupart des modalités du site, l'expression de la MT est très forte au regard des autres sites ateliers ayant fait l'objet de l'étude. Elle est maximale sur le Me98F, modalité la plus contaminée et répond de façon décroissante le long du gradient de contamination.



Données par espèce



Là encore, on observe un niveau d'expression plus élevé chez les animaux collectés sur les sites les plus contaminés par les métaux.

INTÉRÊTS ET LIMITES DE L'INDICATEUR

- + intègre tous les facteurs modulant ou susceptibles de moduler la biodisponibilité des contaminants métalliques du sol (pH, paramètres pédologiques, climat...).
- + la plupart des lombriciens semblent répondre de la même manière.
- + rapidité d'analyse.
- + simplicité d'interprétation.
- difficulté de choix d'un site de référence.
- spécificité de réponse (contamination métallique et sensibilité particulière au cadmium).
- la mesure n'est pas réalisable chez toutes les espèces de vers de terre puisqu'elle nécessite un clonage préalable du gène codant la MT2.
- difficulté de comparer des mesures obtenues chez des espèces différentes.



Laboratoire Génie Civil et géo-Environnement-Lille 1 (LGCgE). Equipe Ecotoxicologie. Université Lille Nord de France-Lille1, Cité Scientifique, Bâtiment SN3, 59655 Villeneuve d'Ascq

PUBLICATIONS : Brulle *et al.*, 2006. *Environmental Science and Technology*; Brulle *et al.*, 2007. *Comparative Biochemistry and Physiology C*; Brulle *et al.*, 2008. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; Brulle *et al.*, 2008. *Developmental and Comparative Immunology*; Bernard *et al.*, 2010. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; Brulle *et al.*, 2011. *Science of the Total Environment*.

Pérès, G., F. Vandebulcke, M. Guernion *et al.*, 2011. *The use of earthworms as tool for soil monitoring, characterization and risk assessment. Example of a Bioindicator Programme developed at National scale (France)*. *Pedobiologia* 54, 77–87.

CONTACT franck.vandebulcke@univ-lille1.fr