

49725

NO50-REP-R

PROGRAMME NATIONAL D'ECOTOXICOLOGIE MARINE

REPONSE DES ORGANISMES MARINS AUX POLLUANTS BASES BIOLOGIQUES ET MOLECULAIRES

CONTRAT N° 93 - 306

MINISTERE DE L'ENVIRONNEMENT



IFREMER Bibliotheque de BREST



0EL06654

PROGRAMME NATIONAL D'ECOTOXICOLOGIE MARINE

MINISTERE DE L'ENVIRONNEMENT

Contrat N ° 93 306

*** ANALYSE MOLECULAIRE DE LA MUTAGENESE**

*** INHIBITION DE L'ACETYLCHOLINESTERASE OUTIL DE
DIAGNOSTIC DES CONTAMINATIONS PAR LES INSECTICIDES**

*** LA RESISTANCE MULTIDROGUE MEMBRANAIRE**

Laboratoire Ecotoxicologie. IFREMER-NANTES

Françoise VINCENT – Jérôme CACHOT – François GALGANI – Gilles BOCQUENE

Rue de l'île d'Yeu – BP 1049 – 44037 Nantes Cedex 01

Tél: 40 37 4193 Fax: 40 37 40 75

RESUME DES TRAVAUX

Analyse moléculaire de la mutagénèse

Pour prédire les effets à long terme de l'exposition aux polluants, la recherche s'oriente sur le développement, la validation et l'application de biomarqueurs de mutagénèse. Les mutations sur les gènes associés au développement tumoral peuvent être détectés dans des stades précoces du cancer, c'est le cas des gènes de la famille Ras et du gène suppresseur de tumeur P53. Les travaux ont porté sur l'étude de l'activation du protooncogène Ras chez les poissons, pour savoir si elle pouvait être corrélée avec l'apparition de tumeurs et à la présence de contaminants cancérigènes. Les exons 1 et 2 du gène Ras de *Callionymus lira* et de *Mullus barbatus* ont été amplifiés, clonés et séquencés pour détecter des mutations liées à la présence de micropolluants. La séquence obtenue présente de fortes homologues avec les mêmes gènes de la truite, du goldfish et plus surprenant de l'homme. Une mutation au niveau du codon 1.1 a été observé pour deux poissons présentant des foyers d'hyperplasie. Ce résultat devra être confirmé sur un plus grand nombre de poissons présentant des hyperplasies, des stades plus avancés du développement tumoral et des carcinomes.

L'acétylcholinestérase et son inhibition par les organophosphorés et les carbamates:

L'acétylcholinestérase est la cible directe des organophosphorés et des carbamates et l'inhibition enzymatique provoquée par ces composés est utilisée en monitoring principalement sur les poissons. Parmi les mollusques, l'huître est un bioindicateur très intéressant qui présente malheureusement une faible sensibilité. Le polymorphisme de l'acétylcholinestérase a été étudié chez ce mollusque et deux formes qui diffèrent par leur structure moléculaire et leur comportement cinétique vis à vis de différents inhibiteurs ont été identifiées dans le muscle adducteur. Ces deux isoformes ont été purifiées puis séparées en présence de tensio-actifs et leur caractérisation moléculaire a été entreprise. La forme majoritaire représente 70 à 80 % de l'ensemble de l'activité cholinestérasique. C'est un dimère amphiphile membranaire par opposition aux 20 à 30 % restant constitués par un tétramère soluble. La fraction amphiphile présente une sensibilité supérieure à celle de la fraction soluble, de l'ordre de 40000 fois et 15000 fois respectivement pour le Paraoxon et le Carbofuran. Elle se situe en matière de sensibilité au niveau des cholinestérases d'insectes. Le deuxième objectif de cette étude était d'obtenir une enzyme hypersensible utilisable dans des biocapteurs. Les travaux ont permis de fabriquer par mutagénèse dirigée des cholinestérases de drosophile hypersensibles, en se basant sur les modifications observées entre des populations résistantes et sensibles aux carbamates et aux organophosphorés. Ainsi une acétylcholinestérase mutée en position 199, où l'isoleucine est remplacée par un tryptophane présente une sensibilité 10 fois supérieure vis à vis du Malaoxon.

Résistance multidrogue membranaire

Certaines cellules de mammifères expriment une glycoprotéine membranaire expulsant activement hors des cellules un large spectre de composés cytotoxiques. Ce système de résistance, appelé pompe MXR, a été étudié chez des organismes marins dans l'objectif de développer un bioindicateur utilisable pour l'évaluation de la qualité du milieu littoral. Les cellules résistantes qui expriment la protéine membranaire peuvent transporter des substrats fluorescents dont la rhodamine. L'activité de transport de cellules de branchies de moules et d'algues unicellulaires (*Prorocentrum micans*) a été étudiée en se basant sur les modulations des cinétiques de pénétration et d'efflux de la rhodamine B engendrées par différents composés chimiques (vérapamil, quinidine, doxorubine, tamoxofen....), en utilisant la technique des microplaques. Ces travaux ont permis de mettre en évidence et de caractériser ce type de protéine de résistance. *Prorocentrum micans* constitue le modèle le plus sensible et pourrait devenir un modèle de référence permettant d'obtenir des populations cellulaires résistantes. L'utilisation du test d'efflux de la rhodamine B a également permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur de l'Atrazine et de la Simazine à des concentrations de 10 ng/l vis à vis du transport membranaire.

ANALYSE MOLECULAIRE DE LA MUTAGENÈSE

I INTRODUCTION

Les organismes marins vivant en milieu estuarien et côtier sont exposés à des concentrations importantes de contaminants organiques et non-organiques (Möller, 1985; McCain et al., 1988). Sur les côtes française, des contaminations par les polychlorobiphényles (PCBs), les hydrocarbures polycycliques aromatiques (PAHs), les pesticides et les métaux lourds sont observées en milieu estuarien (Claisse, 1989; Tronckzynski, 1993) et des études ont décrits une contamination des produits de la pêche (Cossa *et al.* 1990). L'absorption de ces contaminants peut se faire à partir de l'eau, des sédiments et de la nourriture. L'exposition des organismes marins aux contaminants est décrite (Galgani *et al.*, 1992; Burgot *et al.*, 1993), elle peut être caractérisée par la dose interne ou par le taux de métabolisation de ces contaminants.

La plupart de ces polluants sont de potentiels mutagènes et cancérigènes. Un ensemble d'évènements biologiques peuvent survenir suite à l'exposition des organismes marins aux contaminants : après absorption, distribution et métabolisation, des altérations biologiques peuvent intervenir si leur élimination est incomplète. Parmi ces altérations, ou effets biologiques précoces, certaines peuvent être des mutations au niveau de l'ADN. Certaines de ces mutations jouent un rôle important dans l'initiation du cancer.

L'évaluation de la dose interne et de la métabolisation des contaminants est insuffisante pour prédire des effets à long terme de l'exposition aux polluants, tel que le cancer. Depuis plusieurs années, la recherche s'oriente vers le développement, la validation et l'application de biomarqueurs de mutagenèse, ou effets biologiques précoces. Dans l'environnement marin cette approche est nouvelle.

Les mutations peuvent être détectées en utilisant des marqueurs classiques de cytogénotoxicité tel que les échanges de chromatides soeurs ou encore en étudiant ces mutations à un locus particulier tel que le gène hypophosphorybosyl transferase ou le gène thymidine kinase. Les mutations sur les gènes associés au développement tumoral peuvent être détectées dans les stades précoces du cancer. C'est le cas des gènes de la famille *ras* dans de nombreuses tumeurs (Balmain *et al.*, 1984; Nelson *et al.*, 1994) et c'est aussi celui du gène suppresseur de tumeur p53 dans la plupart des types de tumeurs (Harris & Holstein, 1993).

L'activation des gènes de la famille *ras*, *Ha-ras*, *Ki-ras* et *N-ras*, par mutation ponctuelle au niveau des codons 12, 13, 59, 61 et 63 a été étudiée en détail au cours du processus de cancérogénèse multiétape chez les rongeurs et plus récemment chez la truite (Chang *et al.*, 1991; Fong *et al.*, 1993; Hendricks *et al.*, 1994). En épidémiologie, il apparaît que ce gène est muté dans 30% des cancers chez l'homme et pour le cancer du pancréas, le gène *Ki-ras* est muté dans 75 à 100% des cas.

Dans l'environnement, des études ont été entreprises pour rechercher l'activation d'un gène de type *ras* chez des poissons présentant des tumeurs hépatiques et vivant sur des sites contaminés par des PCBs et des PAHs. L'activation par mutation ponctuelle du gène *Ki-ras* a été observée dans des tumeurs hépatiques chez le Flet (McMahon *et al.*, 1988; 1990) et la morue (Wirgin *et al.*, 1989). L'accumulation de la protéine p21*ras* a été observée dans des tumeurs hépatiques chez la Limande (*Limanda limanda*) (Moore & Evans, 1992).

D'après ces différentes données, nous avons choisi d'étudier l'activation du protooncogène *ras* chez des poissons vivant dans des zones particulièrement exposées aux contaminants tel que l'estuaire de la Seine.

L'objectif de cette étude est tout d'abord de savoir si l'activation du protooncogène *ras* peut être observée dans des tumeurs chez le poisson marin et si ce phénomène peut être corrélé à la présence de contaminants cancérigènes dans l'environnement marin.

Dans ce rapport est présenté la recherche de la séquence d'un gène de type *ras* chez deux poissons marins, *Callionymus lyra* et *Mullus barbatus*, utilisés jusqu'à présent dans le cadre du Réseau National d'Observation pour les études de l'induction de l'EROD. La recherche de mutations sur ce gène chez le Callionyme présentant quelques foyers d'hyperplasie au niveau du foie est également présentée.

II MATERIEL ET METHODE

Choix des espèces

Les espèces retenues dans cette étude sont celles utilisées dans le cadre des études de l'induction de l'EROD dans le cadre du réseau National d'Observation.

Le callionyme (*Callionymus lyra*) vivant en Manche et Atlantique et le Rouget barbet (*Mullus barbatus*) vivant en Méditerranée ont été retenus. Ces espèces, caractérisées par une distribution large dans ces zones, un mode de vie au contact du sédiment et une faible migration, sont particulièrement utiles dans des études de l'environnement.

Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits à partir du foie de *Callionymus lyra* et *Mullus barbatus* selon le protocole décrit par Chomczynski *et al.*, (1987). La synthèse d'ADNc a été effectuée à partir de 1 µg d'ARN totaux en utilisant 100 pmole d'amorce antisens. La réaction est effectuée dans un volume final de 20 µl dans le tampon de l'enzyme après addition de 0.5 mM dNTP et 200 unités de transcriptase inverse (superScript™ II, Gibco BRL).

Amplification et clonage

10 ul d'ADNc sont incubés dans un volume final de 50 ul dans le tampon de la Vent polymerase en présence de 50 picomole de chaque amorce, 250 uM de dNTP et 1 unité de Vent polymerase (NEN Biolabs). L'ADN est dénaturé à 94°C pendant 3 mn avant d'être amplifié pendant 30 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à 55°C et 20 s à 72°C dans un thermocycleur (Biometra, Kontron Instruments). 0.8 ul d'ADN issu de la première PCR sont utilisés comme matrice dans les mêmes conditions que précédemment à l'exception de l'amorce antisens remplacée par une amorce interne. Des produits PCR de 240 pb ont été soumis à une électrophorèse en gel d'agarose, transférés sur membrane de nitrocellulose et hybridés par une sonde v-Ha-ras marquée à la digoxygénine (fragment Eco RI-Bam HI extrait à partir du clone BRI). Les fragments de 240 pb PCRs ont été ensuite clonés au site Sfr I du plasmide pCR-Sript™ (SK+) (Stratagene). Différents clones ont été sélectionnés et séquencés sur un séquenceur 373 A DNA (Applied Biosystem) selon le protocole du dye terminator.

II RESULTATS ET DISCUSSION

Analyse de la séquence

Pour chaque espèce la séquence obtenue a été alignée en totalité avec différentes séquences de types *ras* correspondant à la séquence de l'exon 1 et à la séquence partielle de l'exon 2 (Fig. 1). La séquence du Callionyme présente une plus faible homologie avec le gène *ras* de la truite que *Mullus barbatus* (Tableau 1). Les pourcentages d'homologie entre ces poissons marins et l'homme restent malgré tout très élevés compte tenu de l'éloignement de ces espèces au cours de l'évolution. Ils confirment la conservation importante de la région 5' des gènes *ras* au cours de l'évolution, région correspondant aux premiers 90 acides aminés et codant pour la partie NH₂ terminale. Cette région est impliquée dans le site de fixation du GTP et du GDP (Leberman & Egner; 1984; Jurnak, 1985) et une partie de cette région est décrite comme correspondant au domaine effecteur de la protéine (revue dans Barbacid, 1987).

Pour l'instant il n'a pas été possible d'obtenir la séquence de la partie 3' du gène. La séquence nucléotidique dans cette région étant extrêmement variable au cours de l'évolution et pour les trois gènes *ras* chez l'homme. Cette région C-terminale est impliquée dans l'attachement de la protéine à la membrane plasmique.

Les changements de bases observés correspondent à des variations silencieuses puisque l'on observe 100% d'homologie entre les différentes séquences en acides aminés (séquence prédictive) (Fig. 2).

Recherche de mutations dans le foie hyperplasique

La recherche de mutations a été entreprise chez *Callionymus lyra* sur des foies présentant des foyers d'hyperplasie. Les produits obtenus après RT-PCR ont été directement séquenés. La séquence présente une mutation au niveau du codon 11 (Ala substituée à Thr). Cette mutation est rarement décrite dans les tumeurs (Bar-Eli *et al.*, 1989). D'autre part, elle a été identifiée après RT-PCR. Il serait donc souhaitable de confirmer ce résultat préliminaire par une technique de détection des mutations ponctuelles qui soit plus sensible et utilise l'ADN directement plutôt que l'ARN. Jusqu'à présent, l'amplification d'ADN correspondant aux exons 1 et 2 (partiel) du gène *ras* de *Callionyme* n'a pas été possible.

III CONCLUSION

L'étude de l'activation du gène *ras* chez le poisson doit être effectuée en priorité sur un modèle expérimental avant d'entreprendre des études chez les poissons vivant dans leur environnement naturel. Les observations obtenues dans cette étude expérimentale pourront nous aider à interpréter des observations effectuées sur des poissons où des tumeurs spontanées sont observées.

Enfin il est bien sûr évident que l'analyse moléculaire de la mutagenèse, des gènes *ras* ou *p53*, doit être intégrée dans une étude pluridisciplinaire si on souhaite donner une valeur à ces résultats en terme de mutagenicité de l'environnement. En aucun cas ces mutations ne pourront être directement considérées comme la conséquence de l'exposition aux polluants. La recherche de contaminants mutagènes dans les tissus et la caractérisation chimique de l'environnement marin dans lequel vivent les espèces étudiées permettront uniquement d'établir une corrélation entre la présence de ces contaminants et une mutation. Cependant, les situations sont en réalité plus complexes puisqu'une corrélation entre deux événements ne démontre pas que l'un est exclusivement la conséquence de l'autre.

IV PERSPECTIVE

Développement d'un modèle expérimental

De nombreuses études ont été effectuées chez les rongeurs utilisant ces animaux comme modèles d'études de la cancérogénèse. Ces recherches ont permis de montrer le rôle des agents chimiques dans le cancer, de mettre en évidence différentes étapes dans le développement tumoral et de préciser l'implication des gènes de la famille *ras* dans les stades précoces du développement tumoral. Ces études ont également montré que certains mutagènes induisent des mutations sur les gènes de la famille *ras*.

L'utilisation d'un modèle d'étude de la cancérogénèse s'impose dans le cadre de cette étude. L'objectif de ce travail est de préciser le rôle de certains contaminants cancérogènes dans la cancérogénèse chez le poisson et de montrer une éventuelle implication de l'oncogènes *ras*.

Nous proposons d'étudier l'apparition des tumeurs au cours du temps et de regarder si l'activation du protooncogène *ras* peut être observée dans ces tumeurs chimiquement induites soit par le TCDD, soit des PCBs.

Développement d'une technique d'étude des mutations ponctuelles

Différents protocoles seront testés pour suivre l'apparition de mutations dans les premiers stades du développement tumoral. Ces protocoles sont actuellement maîtrisés dans les tumeurs humaines, ils seront transférés au poisson. Des techniques très sensibles telles que la RFLP/PCR permettent de détecter une à cinq mutation parmi 10 millions de copies sauvages (Pourzand & Cerruti, 1993).

Détermination de la séquence du gène p53

Parmi la centaine de gènes impliqués dans le cancer, le gène p53 est muté dans environ la moitié des cancers. Ce gène se distingue par le fait qu'il peut être muté sur 300 sites, ou codons, différents. C'est le seul gène qui présente un spectre de mutations aussi élevé. Pour certains cancers, on sait que le gène p53 est muté avant même que la tumeur soit diagnostiquée. Les mutations sur p53 permettent un diagnostic précoce du cancer et constituent un formidable marqueur de cancérogenèse et de mutagenèse.

Enfin, dans de nombreux cancers le spectre de mutations est corrélé avec l'exposition à un facteur de risque de l'environnement.

L'intérêt de travailler sur le gène p53 dans des études de génotoxicité est donc évident. D'après les premiers résultats obtenus il serait souhaitable de bénéficier d'un tel marqueur de mutagenèse dans notre programme de recherches.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BALMAIN, A., RAMSDEN, BOWDEN, G.T., SMITH, J. (1984) Activation of the mouse cellular harvey-ras gene in chemically induced benign skin papillomas. *Nature* 307, 658-660.

BAR-ELI, M., AHUJA, H., FOTI, A., CLINE, M.J. (1989) N-ras mutations in T-cell acute lymphocytic leukaemia : analysis by direct sequencing detects a novel mutation. *Br. J. Haematol.*, 72, 36-39.

BARBACID, M; (1987) ras genes *Ann. Rev. Biochem.*, 56, 779-827.

BURGEOT, T., BOCQUENE, G., TRUQUET, P., LE DEAN, L., POULARD, J.C., DOREL, D., SOUPLLET, A., GALGANI, F. (1992) The dragonet (*Callionymus lyra*), a target species used for evaluation of the biological effects of chemical contaminants on French coasts (1993) *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 97, 309-316.

CHANG, Y.J., MATHEWS, C., MANGOLD, K., MARIEN, K., HENDRICKS, J., BAILEY, G. (1991) Analysis of ras gene mutations in Rainbow trout liver tumors initiated by Aflatoxin B1. *Mol. Carcinog.*, 4, 112-119.

CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. (1987) *Anal. Biochem.*, 162, 156-159

CLAISSE, D. (1989) Chemical contamination of French coasts. The results of ten years of mussel watch. *Mar. Pollut. Bull.*, 20, 523-528.

COSSA, D., AUGER, D., AVERTY, B., LUÇON, M., MASSELIN, P., NOEL, J., SANJUAN, J. (1990) Niveaux de concentration en métaux, métalloïdes et composés organochlorés dans les produits de la pêche cotière française. Rapport interne IFREMER.

FONG, A.T., DASHWOOD, R.H., CHENG, R., MATHEWS, C., FORD, B., HENDRICKS, J.D., BAILEY, G.S. (1993) Carcinogenicity, metabolism and Ki-ras proto-oncogene activation by 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene in rainbow trout embryos. *Carcinogenesis*, 14, 629-35.

GALGANI, F., BOCQUENE, G., TRUQUET, P., BURGEOT, T., CHIFFOLEAU, J.F., CLAISSE, D. (1992) Monitoring of pollutant biochemical effects in marine organisms of the French coasts. *Oceanologica Acta*, 15, 355-364.

HARRIS, C.C., & HOLLSTEIN, M. (1993) Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N. Engl. J. Med.*, 329, 1318-1327.

HENDRICKS, J.D., CHENG, R., SHELTON, D.W., PEREIRA, C.B., BAILEY, G.S. (1994) Dose-dependent carcinogenicity and frequent Ki-ras prot-oncogene activation by dietary N-nitrosoethylamine in rainbow trout. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 23, 53-62.

JURNAK, F., (1985) *Sciences*, 230, 32-36.

LEBERMAN, R., EGNER, U. (1984) *EMBO J.*, 3, 339-41.

MCCAIN, B.B., BROWN, B.B., KRAHN, M.K., MYERS, M.S., CLARK, JR. R.C., CHAN, S.L., MALINS, D.C. (1988) Marine pollution problems North America West Coast. *Aquat. Toxicol.*, 11, 143-162.

MÖLLER, H. (1985) A critical review on the role of pollution as a cause of fish disease. *Fish and Shellfish pathology*. ed. A.E. Ellis, pp 169-182. New York Academic Press.

NELSON, M.A., FUTSCHER, B.W., KINSELLA, T., WYMER, J., BOWDEN, G.T. (1992) Detection of mutant Ha-ras genes in chemically initiated mouse skin epidermis before the development of benign tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89, 6398-2.

POURZAND, C. & CERUTTI, P. (1993) Mutagenesis of H-ras codons 11 and 12 in human fibroblasts by N-ethyl-N-nitrosourea. *Carcinogenesis*, 14, 2193-2196.

TRONCZYNSKI, J. (1993) An overview of Atrazine in the estuarine environment. ICES/MCWG.

FIGURE N°1

Exon 1

	10	20	30	40	50	60
Mullus barbatus	ATGACGGAATATAAGCTGGTGGTGGTGGGAGCTGGTGGCGTTGGCAAGAGTGC	CACTCACC				
Callionymus lyraT.....T.A.....C.....G...					
Human H-rasC.C.C.T.G.....G.G...					
Human N-rasT.G.C.A.....T.....A.....T.....G.A.C.....G.A					
Human K-rasT.....A.T.....A.T.....A.....CT.G.G					
TroutG.A.A.T.G.....C.G.....					
GoldfishA.....T.....C.A.G.....A.....G.....T.....					

	70	80	90	100	110
1	ATCCAGCTCATCCAGAATCACTTTGTGGATGAATATGACCCCACCATCGAG				
2C.....C.....T...				
3G.....C.T.....C.....C.....T.A...				
4A.....C.....A.....T.....A...				
5	..A...A.T.....T.....C.....T.A.A.A...				
6				
7A.....C.....C.....C.....A.....A...				

Exon 2

	10	20	30	40	50	60
1	GACTCGTACAGGAAGCAGGTGGTGGTATTGACGGGGAGACCTGTCTGCTGGACATCCTGGAC					
2	..T..T.....C..T.....G..C..A.....T...					
3	..T..C...C.....C.....T.....G..C..T.....T					
4	..T..T....A.A.A....T.A.T.T.A....T.T.....A...T					
5	..T..C.....A.A.A....T.A.A....CT...T..T..C...					
6A.....G.....					
7C.....T.....G.....T.....T.....					

	70	80	90	100	110	120
1	ACTGCAGGTCAGGAGGAGTACAGCGCCATGAGGGATCAGTACATGAGGACAGGTGAGGGT					
2T..T.....G..A.....C					
3	..C..C..C.....C.....C.....C.C..C..G.....C					
4	..A..T..A..A..A....T.....A..C..A.....C..A..C					
5	..A.....A.....T.A.....C.....T.G.....C					
6C.....G.....C					
7A.....C					

	130	140	150
1	TTCTTCT-----		
2	...C...GTGT-----		
3	...C.G.GTGTGTTTGCCATCAACAACACCAAGTCT		
4	...C...GTGTATTTGCCATCAATAATAGCAAGTCA		
5	..TC.T.GTGTATTTGCCATAAATAATACTAAATC-		
6	...C...GTGT-----		
7	...C...GTGTCTTCGCCATCAATAACACCAAGTC-		

Comparison of DNA sequences of *Mullus barbatus* and *Callionymus lyra*

ras PCR products with the known trout, goldfish and human ras gene sequences

Tableau 1: Homologie entre *Mullus barbatus* et *Callionymus lra* et différentes séquences du gène ras

	Mullus barbatus	Callionymus lya
Ha-ras	83	84
N-ras	81	82
K-ras	77	78
Truite	96	91
Goldfish	91	89

% d'homologie entre les différentes séquences. Calculs basés sur 240 pb.

FIGURE N°2

10 20 30 40 50 60
Mullus barbatus MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDITAG
Callionymus lyra
Human H-ras
Human N-ras
Human K-ras
Trout
Goldfish

70 80
1 QEEYSAMRDQYMR-----
2TGEGLFC
3TGEGLFC
4TGEGLFC
5TGEGLFC
6TGEGLFC
7TGEGLFC

Comparison of the predicted amino acid sequence of Mullus barbatus and Callionymus lyra with the goldfish, trout and human ras sequences

INHIBITION DE L'ACÉTYLCHOLINESTERASE OUTIL DE DIAGNOSTIC DES CONTAMINATIONS PAR LES INSECTICIDES

I-SITUATION DU SUJET ET RESUME DE LA PROPOSITION ORIGINALE

Les cholinestérases et plus particulièrement l'acétylcholinestérase (AChE) sont les cibles directes des organophosphorés (OP) et des carbamates (C) qui représentent 70% des insecticides utilisés actuellement. L'inhibition enzymatique provoquée par ces produits est aisément mesurable et permet à la fois de localiser des zones où les effets de ces contaminants sur les organismes marins sont sensibles et d'appréhender les mécanismes biologiques perturbés à un niveau subléthal.

L'expérience acquise par le laboratoire Ecotoxicologie de l'IFREMER dans l'utilisation de ce biomarqueur a permis sa validation sur le terrain en tant qu'indice global de la contamination mais, malgré la puissante affinité qui relie l'inhibiteur à l'enzyme, l'absence de données sur les niveaux de présence de ces insecticides dans les différents compartiments marins interdit, par défaut, l'attribution des effets aux seuls organophosphorés et carbamates.

De nombreuses campagnes de prélèvement ont permis à IFREMER de mettre en évidence des différences significatives dans les niveaux d'activité de cholinestérases d'organismes (poissons, crustacés, mollusques) provenant de zones géographiques distinctes en montrant que les niveaux les plus faibles sont mesurés dans des organismes prélevés sur des zones notoirement contaminés telles que les estuaires.

Parmi les mollusques, l'huître est un bioindicateur intéressant en tant qu'organisme filtreur disposant de vastes aires de répartition et dont la récolte, comparée à celle de poissons, est extrêmement plus simple et plus économique. Mais les mollusques présentent de manière générale une sensibilité faible aux contaminants.

L'utilisation des cholinestérases en monitoring a été aussi développée sous forme de biocapteurs où l'enzyme est immobilisée sur une membrane ou bien en détection d'effets inhibiteurs in vitro (l'AChE en solution est incubée avec d'éventuels inhibiteurs recherchés). Ces cholinestérases ainsi fixées sont généralement des enzymes de vertébrés (torpille, anguille électrique, cheval) dont la sensibilité vis à vis des insecticides est plus faible que celles issues d'insectes (tableau 2).

On réalise que le problème se pose de la même manière que pour les cholinestérases d'huître et qu'il s'agit dans les deux cas d'améliorer sensiblement la réponse de l'acétylcholinestérase aux inhibiteurs.

L'une des idées maitresses de ce programme est à la fois d'augmenter la sensibilité de l'acétylcholinestérase d'huître, en développant une connaissance plus fondamentale du polymorphisme de cette enzyme en sélectionnant l'isoforme sensible, et de produire, à partir de l'expérience acquise sur les cholinestérases d'insectes, une acétylcholinestérase de drosophile hypersensible.

Trois axes de recherche sont essentiels au développement de l'acétylcholinestérase en tant que bioindicateur des effets des insecticides organophosphorés et des carbamates.

Axe 1: La connaissance approfondie du polymorphisme important de cette enzyme chez l'huître (certaines isoformes de l'AChE montrent une plus forte sensibilité que d'autres) est nécessaire. Cette connaissance des isoformes naturelles sensibles est une étape capitale dans le développement du monitoring des effets des polluants dans le milieu marin.

Axe 2: L'expérience de plusieurs équipes travaillant sur les cholinestérases d'insectes et le développement des outils de la biologie moléculaire (l'AChE et le gène qui la code sont connus chez la Drosophile) doivent conduire à une amplification de la réponse en terme de sensibilité et de spécificité des effets par la sélection et/ou la fabrication d'AChE hypersensibles. Ce projet s'inscrit dans les travaux en cours (programmes CNRS/DRET/IFREMER) d'une équipe pluridisciplinaire (D.FOURNIER, A.KLAEBE, Université P.SABATIER Toulouse/ P.MASSON, Santé Armées, Grenoble/G.BOCQUENÉ, IFREMER Nantes) qui essaie d'obtenir, par mutagenèse dirigée, une AChE hypersensible.

Axe 3: La corrélation entre les effets observés sur les organismes et des concentrations en OP et C mesurées dans leur biotope ne peut être vérifiée que par le développement de l'analyse chimique de ces composés. Le laboratoire Municipal de Brest (G.DURAND) possède la maîtrise de ces analyses.

Les travaux engagés en 1994 ont essentiellement porté sur les axes 1 et 2.

III SELECTION D'ISOFORMES SENSIBLES DE CHOLINESTERASES

Chez l'huître comme chez de nombreux autres organismes, l'acétylcholinestérase montre un important polymorphisme sur le plan moléculaire avec d'importantes répercussions sur le plan cinétique.

Des résultats préliminaires d'études réalisées en collaboration INRA/IFREMER (D.FOURNIER/G.BOCQUENÉ) ont montré la présence dans le muscle adducteur d'huître de deux formes d'acétylcholinestérase qui diffèrent par leur structure moléculaire et leur comportement cinétique vis à vis notamment des inhibiteurs.

La forme majoritaire qui représente 70 à 80 % de l'ensemble de l'activité cholinestérasique est un dimère amphiphile membranaire. Les 20 à 30 % restant sont constitués d'un tétramère soluble. Les étapes de purification sont communes aux deux formes et axées sur la chromatographie d'affinité entre l'enzyme et la procaïnamide. La séparation des deux formes est fondée sur leur comportement différent en présence de composés tensio-actifs.

Purification des deux isoformes

Différents types d'extractions ont été testés qui montrent qu'il est préférable d'extraire les deux formes en une seule étape par un broyage (1/2 poids/vol.) dans un tampon 0.02 M TrisHCl pH 7 0.1 % Triton X100. Le surnageant obtenu après centrifugation pendant 30 mn à 10 000 g contient les deux formes moléculaires. La précipitation au sulfate d'ammonium (0.4 g/ml) suivie d'une dialyse du précipité resuspendu permet le passage sur colonne de chromatographie d'affinité sur sépharose/procaïnamide. La procaïnamide est un triméthylammonium qui se fixe spécifiquement sur les sites anioniques de l'enzyme (site de fixation de l'AChE). L'élution est réalisée par passage de 1 M NaCl associé à 1 mM de procaïnamide dans un tampon 0.02 M Tris HCl pH 9.5. Les fractions montrant une activité AChE en sortie de colonne sont poolées et dialysées contre 0.02 M TrisHCl pH 7.

Séparation des deux isoformes

Après dialyse en sortie de colonne procaïnamide la séparation des deux formes est pratiquée selon les techniques d'extraction différentielle en présence de Triton X 114. Cette technique est basée sur la capacité du TX 114 à former une solution homogène avec un tampon aqueux à 4° C et à se recondenser de manière réversible à 20° C. (Bordier, 1981). Les cholinestérases membranaires de nature amphiphile (l'encrage est hydrophobe) sont récupérées dans la phase détergente tandis que les formes solubles sont retrouvées dans la phase aqueuse.

Cette technique a permis une très bonne séparation des deux formes confirmée par les contrôles d'activité en présence de paraoxon 10^{-3} M (94 % d'inhibition de l'acétylcholinestérase passée en phase TX 114 et 5 % de celle passée en phase aqueuse en présence de 10^{-3} M paraoxon).

L'étape définitive de purification est un second passage de chacune des formes sur colonne procaïnamide

Caractéristiques moléculaires et cinétiques des isoformes

Le bilan global des études sur les deux isoformes est donné dans le tableau 1.

L'électrophorèse native en gel gradient 2/23% en présence de déoxycholate (0.25%) montre, après révélation spécifique des cholinestérases par la coloration de Karnowski et Roots (1964) que la fraction hydrophile est constituée d'un tétramère de 300 KD et que la forme majoritaire est amphiphile (ou hydrophobe) sous la forme d'un dimère de 150 KD.

La digestion de chaque fraction par la PI-PLC (phosphatidylinositol-phospholipase C) permet la détermination de la nature de l'ancrage (la grande majorité des AChEs est membranaire)

La migration en milieu détergent non-ionique (Triton X 100) montre que la forme amphiphile possède l'ancrage glycophospholipidique qui confère à la molécule son caractère hydrophobe.

La chromatographie sur colonne d'affinité de ConA Sépharose des deux formes poolées en sortie de procaïnamide permet de préciser la nature glycosilée du tétramère soluble, la concanavoline A (lectine) fixée sur un gel de sépharose se combinant de manière spécifique aux glycoprotéines. Le dimère hydrophobe, non fixé sur ConA Sépharose, n'est pas glycosilé.

Les deux formes présentent un comportement cinétique similaire vis à vis de l'acétylthiocholine notamment avec des constantes d'affinité (K_M) peu différentes pour ce substrat. La K_M apparente vis à vis de l'acétylthiocholine est sensiblement la même pour les deux molécules: $6.7 \cdot 10^{-5}$ M pour le dimère amphiphile (TX 114 sensible) et $1.2 \cdot 10^{-5}$ M pour le tétramère hydrophile. Les calculs de constantes d'inhibition par les organophosphorés et les carbamates mettent en évidence des sensibilités opposées. La fraction amphiphile montre une très forte sensibilité au carbofuran (C) et au paraoxon (OP) tandis que la forme soluble est relativement insensible à ces inhibiteurs. L'isoforme amphiphile est 40 000 fois plus sensible au paraoxon que la fraction soluble et 15 000 fois plus sensible au carbofuran.

AChE en phase TX 114	AChE en phase aqueuse
Dimère (150 KDa)	Tétramère (300 KDa)
Protéine non glycosilée	Protéine glycosilée
Ancrage glycophospholipidique	PI-PLC insensible
K_M (ACTC) = $6.75 \cdot 10^{-5}$ M	K_M (ACTC) = $1.2 \cdot 10^{-5}$ M
Paraoxon sensible ($k_i = 3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ mn}^{-1}$)	Paraoxon insensible ($k_i = 7.6 \text{ M}^{-1} \text{ mn}^{-1}$)
Carbof. sensible ($k_i = 2.2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ mn}^{-1}$)	Carbofuran insensibl ($k_i = 135 \text{ M}^{-1} \text{ mn}^{-1}$)
70-80 % activité AChE totale	20-30% activité AChE totale

Tableau 1: Principales caractéristiques moléculaires et cinétiques des isoformes AChE de muscle adducteur de l'huître (*Crassostrea gigas*)

Les déterminations de constantes d'inhibition calculées sur des acétylcholinestérases types de vertébrés (AChE bovine) et d'insectes (AChE de drosophile) (tableau 2) montrent que la fraction amphiphile se situe, en terme de sensibilité, entre les cholinestérases de vertébrés et d'insectes, atteignant la sensibilité de ces derniers dans les cas du paraoxon et du carbofuran.

Rappelons que les AChEs d'insectes sont les cholinestérases les plus sensibles aux insecticides.

Sur le plan cinétique la résistance aux inhibiteurs de la forme tétramérique soluble est confirmée et exceptionnelle puisqu'elle est insensible à 10^{-3} M paraoxon. Cette propriété particulière de la fraction soluble est un outil exceptionnel qui va nous permettre à la fois de mieux suivre les étapes de purification et d'augmenter de manière importante la sensibilité du bioindicateur acétylcholinestérase chez les mollusques puisque jusqu'à maintenant la mesure de l'activité AChE était obtenue à partir des deux formes confondues.

L'utilisation du paraoxon 10^{-3} M permet dans un premier temps de calculer la répartition respective de chacune des formes dans un extrait brut du muscle adducteur. La mesure de l'activité AChE en présence de paraoxon 10^{-3} M montre que la forme majoritaire est la fraction membranaire amphiphile et qu'elle représente 80% de l'activité AChE totale .

Bien que la fraction soluble soit minoritaire (20%) les activités mesurées prenaient en compte l'insensibilité de cette forme. La mesure de l'activité AChE en présence de paraoxon 10^{-3} M, nous permet par différence de calculer l'activité de la fraction TX seule et d'accroître la sensibilité du test.

Organisme d'origine	Inhibiteur	k_i en $M^{-1} mn^{-1}$
AChE Serum bovin	Carbaryl	$3.8 \cdot 10^3$
AChE drosophile		$2.3 \cdot 10^5$
Fraction LS huitre		62.5
Fraction TX huitre		$6.7 \cdot 10^4$
AChE Serum bovin	Carbofuran	$3.3 \cdot 10^5$
AChE drosophile		$1.6 \cdot 10^6$
Fraction LS huitre		135
Fraction TX huitre		$2.2 \cdot 10^6$
AChE Serum bovin	Eserine	$2.8 \cdot 10^5$
AChE drosophile		$5.4 \cdot 10^7$
Fraction LS huitre		$2.75 \cdot 10^4$
Fraction TX huitre		$4.7 \cdot 10^5$
AChE Serum bovin	Paraoxon	$7.5 \cdot 10^4$
AChE drosophile		$8.6 \cdot 10^5$
Fraction LS huitre		7.6
Fraction TX huitre		$3 \cdot 10^5$

Tableau 2: Comparaison entre constantes d'inhibition d'acétylcholinestérase de diverses origines vis à vis de quatre inhibiteurs.

De nombreuses études cinétiques concernant notamment les effets d'inhibiteurs spécifiques du site anionique, du site périphérique et de la gorge catalytique de l'enzyme devraient nous apporter les informations permettant de mieux connaître les deux formes sur le plan moléculaire.

III-SYNTHESE D'ACETYLCHOLINESTERASE HYPERSENSIBLE

Existe-t-il dans certains compartiments marins des concentrations en inhibiteurs suffisantes pour induire des effets inhibiteurs mesurables ? La réponse à cette question est directement liée à la sensibilité de l'outil d'analyse, c'est-à-dire à la sensibilité de la cholinestérase mesurée.

La mise au point d'un tel outil passe nécessairement par l'obtention d'une enzyme hypersensible utilisable dans les biocapteurs et les incubations *in vitro*. Les cholinestérases utilisées dans ce type de mesure sont essentiellement des cholinestérases de vertébrés moins sensibles que les cholinestérases d'insectes.

Les insecticides étant dirigés contre les insectes le choix de la cholinestérase s'est porté sur l'acétylcholinestérase de drosophile (*Drosophila melanogaster*). C'est un modèle génétique connu qui permet d'avoir accès au gène, à son expression *in vitro* et à plusieurs mutants présentant une altération de l'inhibition par les insecticides. Toutefois au cours de ces travaux, les cinétiques d'inhibition et de métabolisation se sont avérées mal connues.

Cette méconnaissance étant un frein à la compréhension des mécanismes induisant la sensibilité (ou la résistance) de l'enzyme en limitant la précision du calcul des constantes de vitesse d'inhibition il était indispensable de démêler les composantes cinétiques de l'enzyme vis à vis du substrat.

Pour fabriquer une cholinestérase hypersensible aux OPs et Cs, nous nous sommes basés sur la connaissance actuelle du site actif de la cholinestérase et sur les mutations responsables de la résistance aux insecticides. Certaines populations d'insectes traités en agriculture depuis 20-30 ans ont développé des mécanismes de résistance dont l'un des plus efficaces est la modification du site actif de l'enzyme par mutation ponctuelle. L'hypothèse de départ pour cette étude de mutagénèse est qu'une mutation ayant l'effet inverse, sur le plan structural, de celle trouvée chez les populations résistantes induirait la sensibilité et produirait donc une cholinestérase hypersensible. Récemment, il a été démontré (Mutéro et al., 1994) que si une mutation procure un certain degré de résistance, la présence simultanée de plusieurs mutations sur le site actif augmente considérablement cette résistance. De la même manière il est logique de penser que la combinaison de plusieurs mutations entraînant la sensibilité aboutisse à l'obtention de molécules hypersensibles.

Les résultats obtenus dans ces deux approches, étude du comportement cinétique de l'enzyme et mutations ayant l'effet inverse de celui trouvé dans les souches résistantes, sont développés dans ce rapport.

Comportement cinétique de l'AChE de drosophile vis à vis du substrat

Une bonne compréhension du mécanisme d'inhibition des AChEs d'insectes nécessite une étude préalable du mécanisme d'hydrolyse de l'acétylcholine par l'enzyme. Cette étude montre que l'acétylcholinestérase de drosophile présente un comportement de cinétique non Michaelienne présentant une activation par le substrat aux alentours de 100 μM et une inhibition par excès de substrat aux alentours de 10 mM. Ce comportement est inconnu et inattendu. En effet on ne connaît jusqu'à présent que deux sortes de cholinestérases, l'acétylcholinestérase de vertébré caractérisée entre autres par une inhibition à fortes concentrations de substrat et la butyrylcholinestérase de vertébré activée par de grandes concentrations de substrat. Un modèle récent a été proposé pour unifier ces deux mécanismes en assignant un site secondaire de l'enzyme qui affecte la métabolisation du substrat soit en l'inhibant (AChE) soit en l'activant (BuChE) (Radic et al., 1993)

Le cas des insectes rejette ce modèle de fonctionnement et semble indiquer qu'il existe au moins deux autres sites de liaison du substrat autre que le site de métabolisation.

Une expérience de compétition nucléophile a permis de mettre en évidence qu'à faibles concentrations de substrat, l'étape limitante est la déacylation de l'enzyme alors qu'à de fortes concentrations en substrat les deux paramètres, acylation et déacylation sont limitants.

L'activation résulterait donc de la fixation d'une seconde molécule de substrat sur le site de fixation de la choline quand l'enzyme est acétylée tandis que l'inhibition serait due à la fixation d'une autre molécule de substrat sur le site périphérique.

Ces différents résultats nous permettent d'ors et déjà d'élaborer de nouveaux modèles de fonctionnement de l'enzyme. Ces modèles sont valables pour les cholinestérases d'insectes mais aussi pour ceux d'autres invertébrés. En effet des expériences préliminaires ont été effectuées sur une cholinestérase de nématode et nous retrouvons un comportement triphasique suggérant la présence de trois sites de liaison. Il est par ailleurs probable que ce modèle soit aussi valable pour les vertébrés. Certaines mutations effectuées sur l'acétylcholinestérase de torpille (*Torpedo californica*) ont provoqué ce comportement triphasique. Cette connaissance fondamentale du fonctionnement de l'AChE vis à vis de son substrat est un prérequis pour étudier l'influence des composés organophosphorés et carbamates sur les organismes marins pouvant servir de biomarqueurs. De plus la fabrication de cholinestérases hypersensibles aux insecticides nécessite une meilleure connaissance de l'inhibition de la cholinestérase sauvage.

Modifications du site actif et sensibilité de l'AChE de drosophile aux OPs et C

Dans le but de rechercher une mutation conférant une plus grande sensibilité aux organophosphorés et carbamates, nous avons étudié un site de résistance pour le transformer en site de sensibilité.

Les régions codantes de gènes AChE de quatre souches de drosophiles résistantes aux insecticides ont été séquencées et plusieurs mutations constantes ont été identifiées (Mutero et al., 1994) Dans un premier temps l'effort s'est porté sur la mutation qui remplace l'isoleucine 199 par la valine ou la thréonine selon les souches. Ces deux mutations sont connues pour entraîner une moindre sensibilité de l'AChE aux inhibiteurs en modifiant les caractéristiques de l'enzyme vis à vis de l'inhibiteur sans trop affecter les paramètres cinétiques de l'enzyme vis à vis du substrat naturel. Ces mutations sont situées dans la gorge du site actif, derrière le tryptophane 121 qui est une composante essentielle du site de liaison de la choline (ce qu'on appelait le site anionique). Après examen de l'influence de cette mutation sur la structure tridimensionnelle de la protéine, nous avons émis l'hypothèse que l'encombrement stérique de la chaîne latérale de l'acide aminé pouvait influencer l'orientation du site responsable de la reconnaissance du groupe partant de la plupart des composés organophosphorés.

Pour tester cette hypothèse, l'isoleucine 199 a été mutagénisée en plusieurs acides aminés avec des chaînes latérales plus ou moins encombrantes. Les gènes ainsi mutés ont été transférés dans un système baculovirus, les protéines correspondantes ont été produites puis purifiées par chromatographie d'affinité. Les caractéristiques cinétiques de ces enzymes mutées ont été mesurées.

Parallèlement, nous avons synthétisé de nouveaux composés organophosphorés présentant des groupes partant plus ou moins grands pour vérifier l'hypothèse de l'encombrement stérique.

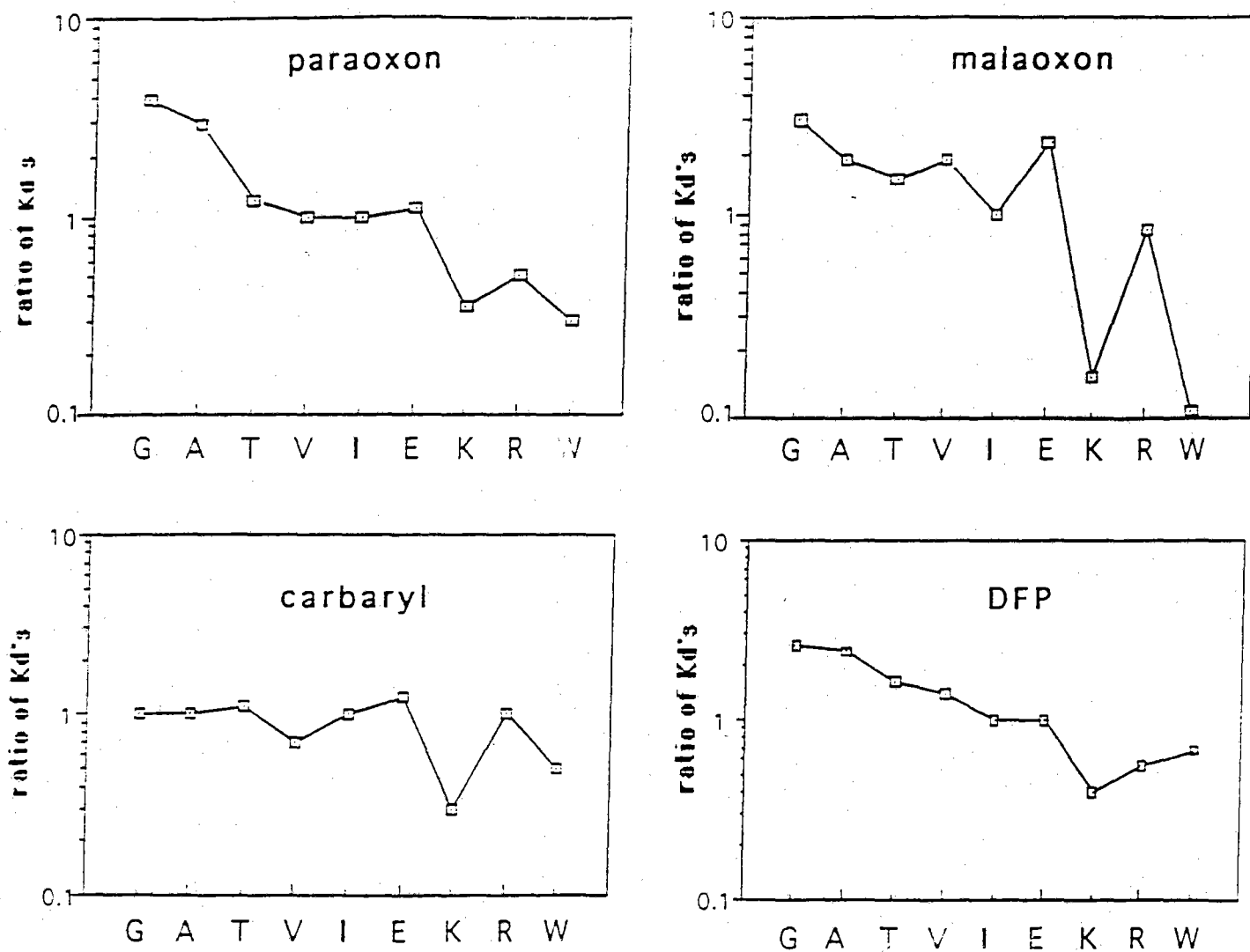


Figure 1: Variations des constantes d'affinité pour quelques inhibiteurs en fonction de différentes mutations en position 199. Les acides aminés sont classés par ordre de taille de la chaîne latérale. (glycocolle < tryptophane)

Ces deux approches ont permis de confirmer l'hypothèse de départ: plus la chaîne latérale en position 199 est courte plus l'acétylcholinestérase est résistante. A l'inverse, plus la chaîne latérale est encombrante plus l'enzyme est sensible.

Ainsi, une acétylcholinestérase présentant un tryptophane en position 199 est plus sensible à l'inhibition par les composés organophosphorés que l'acétylcholinestérase sauvage d'insecte qui possède une isoleucine à cette position, cette dernière étant elle-même plus sensible qu'une acétylcholinestérase de vertébré qui a une valine en position 199. Les résultats présentés sur la figure 1 mettent en évidence la corrélation entre la sensibilité (ou la résistance) de l'enzyme mutée et l'encombrement de l'acide aminé en position 199 pour différents inhibiteurs. Ainsi la sensibilité de la cholinestérase mutée au tryptophane remplace l'isoleucine a été amplifiée 10 fois vis à vis du malaoxon.

IV CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nous avons démontré:

- qu'il est possible, dans un mélange d'isoformes d'acétylcholinestérases présentant des caractéristiques moléculaires et cinétiques distinctes d'isoler l'activité de la forme sensible et de gagner en sensibilité dans la recherche d'effets inhibiteurs. L'utilisation d'inhibiteurs tels le paraoxon à 10^{-3} M permet aujourd'hui la mesure de la forme membranaire d'acétylcholinestérase de muscle adducteur d'huitre, cette isoforme se révélant la plus sensible aux insecticides. Cet effort de purification et séparation dans le polymorphisme de l'AChE pourrait être appliqué à d'autres espèces notamment aux crustacés dont les cholinestérases sont mal connues mais qui présentent une forte sensibilité aux insecticides et particulièrement aux carbamates.

- qu'il est possible de fabriquer par mutagenèse dirigée des cholinestérases plus sensibles en modifiant certains éléments du site actif en se basant sur les modifications observées entre populations résistantes et sensibles. Cette technique a déjà permis d'obtenir une AChE présentant vis à vis du malaoxon une sensibilité plus forte d'un facteur 10. Il est envisagé d'étudier les effets sur la sensibilité de mutations multiples dans le site actif. L'hypothèse étant que la présence simultanée de plusieurs mutations augmenterait considérablement la sensibilité.

Toutefois de nombreux points restent à éclaircir, plus particulièrement le comportement de l'enzyme vis à vis de ses substrats n'est pas encore totalement élucidé ni la production massive de la protéine à partir du gène muté.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BOCQUENE, G., GALGANI, F. and TRUQUET, P. (1990). Characterisation and assay conditions for the use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring *Mar. Environ. Res.* 30:75-89.

BON, S., TOUTANT, J.P., KAHLED, M. and MASSOULIE, J. (1988). Amphiphilic and nonamphiphilic forms of *Torpedo*: II. Electrophoretic variants and phosphatidylinositol phospholipase C-sensitive and insensitive forms. *J. Neurochem.*, Vol. 51, N° 3.

BORDIER, C. (1981). Phase separation of integral membrane proteins in Triton X114 solution. *J. Biol. Chem.*, Vol. 256, N° 4, pp. 1604-1607.

COPPAGE, D. L. and BRAIDECH, T. E. (1976). River pollution by anticholinesterase agents. *Water Res.*, 10:19-24.

DAY, K. E. and SCOTT, I. M. (1990). Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. *Aquatic Toxicol.* 18:101-114.

ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. O., ANDRRES, V. and FEATHERSTONE, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7:88-95.

FOURNIER, D., CUANY, A., BRIDE, J. M. and BERGE, J. B. (1987). Molecular polymorphism of head acetylcholinesterase from adult houseflies (*Musca domestica* L.). *J. Neurochem.*, Vol. 49, N° 5, 1455-1461.

GALGANI, F. and BOCQUENE, G. (1988). A method for routine detection of organophosphorous and carbamates in sea water. *Environ. Technology Letters*. Vol. 10:311-322.

LENOIR-ROUSSEAU, J. J., ARPAGAU, M., and TOUTANT, J. P. (1988). Separation and characterization of hydrophilic and detergent-interacting components of brain acetylcholinesterase from *Tenebrio molitor* L. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 90B, N° 1, 29-35.

MULDER, J. G. and BAKKER, J. (1992). Kinetics of inhibition of two forms of acetylcholinesterase from *Panagrellus redivivus* by organophosphorous and carbamate compounds. *Fundam. Appl. Nematol.* 15 (1), 19-23.

MUTERO, A., PRALAVORIO, M., BRIDE, J. M. and FOURNIER, D. (1994). Resistance-associated point mutations in insecticide insensitive acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 91, pp. 5922-5926.

WEISS C. M., 1965. Use of fish to detect organic insecticides in water. *Journal. WPCF*. Vol 37, N° 5, 647-658.

WEISS C. M. and GAKSTATTER J. H., 1964. Detection of pesticides in water by biochemical assay. *Journal WPCF* Vol. 36. N° 2 : 240-252.

WILLIAMS A. K. and SOVA R. C., 1966. Acetylcholinesterase levels in brains of fish from polluted waters. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1 : 198-204.

LA RESISTANCE MULTIDROGUE MEMBRANAIRE

I - INTRODUCTION

L'évaluation de la qualité du milieu utilise certaines espèces marines pour doser chimiquement les xénobiotiques accumulés dans leurs tissus et pour appréhender les effets biologiques de ces contaminations. Une importante somme de données concernant de nombreux sites ont ainsi été obtenues depuis quelques décennies. En marge des résultats proprement dits, l'accumulation de ces données indique que ces organismes peuvent se développer et se reproduire en milieu contaminé. Ils sont donc résistants à un ensemble complexe de composés chimiques.

La résistance multidrogue

Cette capacité de résister simultanément à plusieurs composés cytotoxiques semble s'apparenter à un phénomène qui préoccupe les cancérologues depuis plus de 40 ans : la résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie. Ce phénomène se caractérise par l'absence de réponse de certains cancers à l'administration d'une ou de combinaisons de différentes drogues cytotoxiques. Cette résistance apparaît dès les premiers traitements ou de façon différée après une réduction de la tumeur consécutive à l'administration de toxiques (Biedler et Riehm, 1970 ; Akiyama *et al.*, 1985). Ce phénomène qui invalide l'utilisation de plusieurs drogues est appelé résistance multidrogue (MDR) (Endicott et Ling, 1989). Il est considéré comme la cause majeure des échecs de la chimiothérapie qui constitue pourtant, avec l'immunothérapie, un des seuls espoirs actuels de traitement pour de très nombreux cancers.

L'élucidation du mécanisme mis en oeuvre par les cellules résistantes est malaisée car ces cellules MDR présentent la capacité de résister à un large spectre de composés cytotoxiques différant tant au niveau de leur structure que de leur mode d'action au niveau de la cellule (tableau 1). Quelques caractéristiques ont cependant pu être dégagées. Tout d'abord les cellules résistantes montrent la capacité de réduire l'accumulation de drogues dans leur cytoplasme, maintenant la concentration en dessous du niveau toxique pour la cellule (Kessel *et al.*, 1968). Deuxièmement, ces cellules hyperexpriment une glycoprotéine membranaire d'environ 170 kDa non présente chez les cellules parentales non résistantes (Juliano et Ling, 1976 ; Beck *et al.*, 1979) et dont le degré d'expression est relié au degré de résistance (Kartner *et al.*, 1983). L'implication de cette P-glycoprotéine ou Pgp dans la modification de la perméabilité membranaire est l'hypothèse la plus généralement admise aujourd'hui et aussi la plus étudiée (bien que le mécanisme de transport de plusieurs composés de structure différente par une seule protéine ne soit pas élucidé). Enfin la résistance mdr est un phénomène requérant de l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP (Horio *et al.*, 1988 ; Hamada et Tsuruo, 1988 ; Azzaria *et al.*, 1989). Ainsi l'abaissement de la concentration intracellulaire en drogues est dû principalement à un efflux actif des composés hors de la cellule ainsi qu'à une baisse de leur influx dans la cellule (Fojo *et al.*, 1985).

Drogues anticancéreuses

alcaloïdes de la *Vinca*, e.g. vinblastine
Anthracyclines, e.g. doxorubicine
Epipodophyllotoxines, e.g. etoposide
Antibiotiques, e.g. actinomycine D
Autres, e.g. mitomycine C, taxol, topotecan,
 mithramycine

Autres agents cytotoxiques

Drogues antimicrotubules, e.g. colchicine,
 podophyllotoxine
Inhibiteurs de la synthèse protéique, e.g.
 puromycine, émetine
Intercalants (ADN), e.g. éthidium bromide
Peptidestoxiques, valinomycine, gramicidine,
 N-acetyl-leucyl-leucylnorleucinal(ALLN)

Agents qui réversent la résistance multidrogue

Inhibiteur canaux calciques, e.g. vérapamil, nifédipine,
 dihydropéridines, azidopine
Anti-arrhythmiques, e.g. quinidine, amiodarone
Vasodilatateurs, e.g. réserpine
Antibiotiques, e.g. céphalosporines hydrophobes
Antihistaminiques, e.g. terféndine
Immunosuppresseurs, e.g. cyclosporine, FK50
 rapamycine

Hormones Stéroïdes, e.g. progestérone
Stéroïdes modifiés, e.g. tirilazad, tamoxifen
Cations lipophiles, e.g. tétraphénylphosphonium
Diterpènes, e.g. forskolin
Détergents, e.g. Tween-80
Antidépresseurs, e.g. tiopéridone
Antipsychotiques, e.g. phénothiazines
Autres drogues amphiphiles et leurs analogues

Tableau 1 : Différentes catégories d'agents qui réagissent avec la P-glycoprotéine (d'après Gottesman et Pastan, 1993).

La découverte des gènes codant pour la Pgp, de 1280 acides aminés, a fait apparaître qu'elle comporte 12 portions traversant la membrane cellulaire (formant 6 domaines transmembranaires) ainsi que 2 sites cytoplasmiques lui permettant de lier l'ATP. Les expériences de transfection du gène MDR ont finalement établi que l'expression de cette Pgp est une condition nécessaire et suffisante à l'acquisition du phénotype MDR (Gros *et al.*, 1986 ; Ueda *et al.*, 1987 ; Guild *et al.*, 1988).

Une dernière caractéristique importante de ce système est sa sensibilité à des composés non cytotoxiques tels que le vérapamil, la quinidine et la réserpine (Tsuruo *et al.*, 1982 ; Gottesman et Pastan, 1988). Ces produits peuvent entrer en compétition pour le transporteur protéique avec les drogues administrées et ainsi contribuer à en accroître la concentration intracellulaire (Rogan *et al.*, 1984 ; Cano-Gauci et Riordan, 1987). On parle alors de réversion de la résistance. Ce phénomène constitue un des espoirs de lutte contre la résistance multidrogue des cellules cancéreuses.

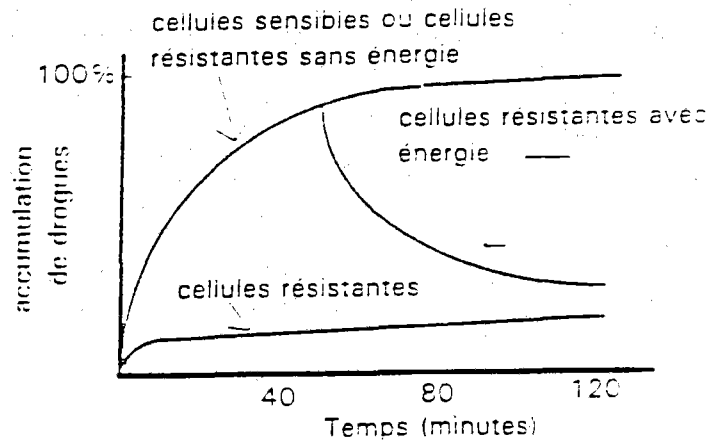


Figure 1 : Effet de l'activité de la Pgp sur l'accumulation énergie-dépendante de composés toxiques (d'après Gottesman et Pastan, 1993).

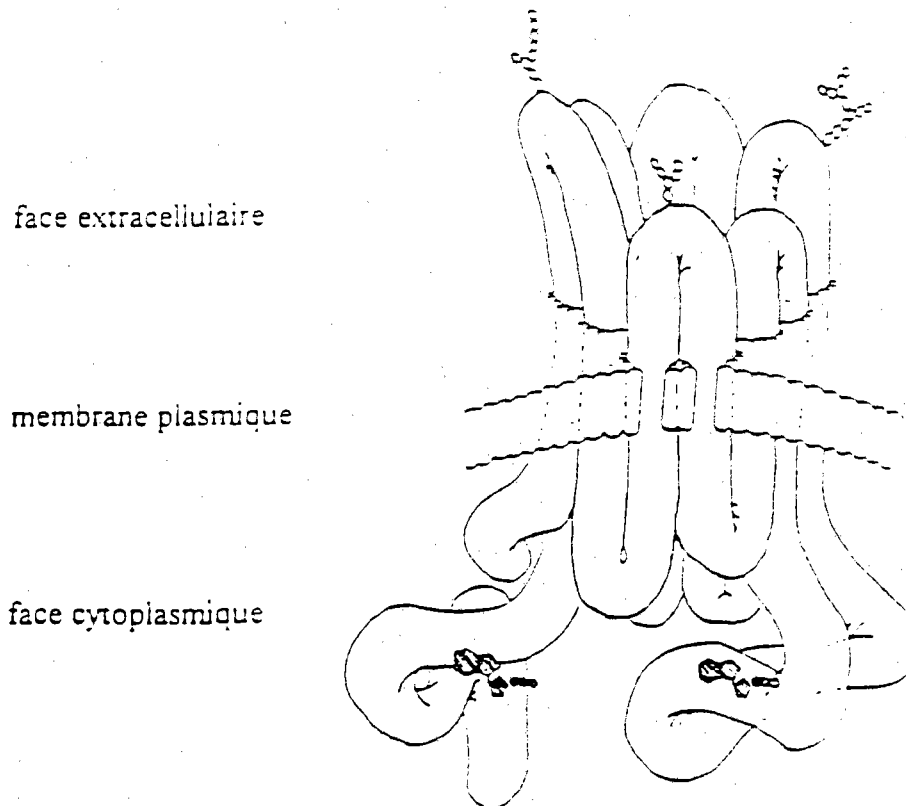


Figure 2 : Représentation schématique de la P-glycoprotéine. La molécule comporte 12 domaines transmembranaires, des résidus oligosaccharidiques sur la face externe (chaînettes ramifiées) et deux sites cytoplasmiques permettant de lier l'adénosine triphosphate (cycles ombrés) (d'après Ferguson et Baguley, 1993).

Une famille multigénique

Il existe 2 gènes MDR chez l'homme (Roninson *et al.*, 1986), 3 gènes chez la souris et le hamster (Ng *et al.*, 1989). Les gènes MDR de rongeurs et humains possèdent de grandes homologies de séquences indiquant, d'une part l'existence d'une famille multigénique MDR, et d'autre part une importante conservation du gène au cours de l'évolution. Par exemple, les parties codantes des gènes correspondant à la Pgp active de souris et humaine partagent 88 % d'homologie malgré 50 millions d'années d'évolution.

La famille ne s'arrête pas aux mammifères. Des homologies importantes sont retrouvées avec beaucoup d'autres protéines. Notamment, les 2 régions correspondant aux sites liant l'ATP sont présentes chez d'autres protéines de transport énergie-dépendante (Chen *et al.*, 1986 ; Gros *et al.*, 1986). Ainsi a-t-on défini la famille ABC (pour ATP-Binding-Cassette) ou "Traffic ATPases" (Higgins *et al.*, 1990 ; Ames, 1986). Une quarantaine de protéines de cette famille existe chez les bactéries (Higgins *et al.*, 1990). Chez les eucaryotes, des membres de cette famille ont été trouvés chez les protozoaires *Plasmodium falciparum* (Wilson *et al.*, 1989 ; Foote *et al.*, 1989), *Leishmania tarentolae* (Ouellette *et al.*, 1990) et *Entamoeba histolytica* (Descoteaux *et al.*, 1992), le nématode *Caenorhabditis elegans* (Lincke *et al.*, 1992), l'insecte *Drosophila melanogaster* (Wu *et al.*, 1991), mais aussi dans le monde végétal chez les levures *Saccharomyces cerevisiae* (Mc Grath et Varshavsky, 1989) et *Schizosaccharomyces pombe* (Nishi *et al.*, 1992) et la plante *Arabidopsis thaliana* (Dudler et Hertig, 1992).

Il semble désormais permis d'envisager la présence de gènes apparentés dans un nombre très important d'organismes.

La résistance mutixenobiotique

L'élucidation du rôle de transport joué par les protéines ABC chez divers organismes permet d'allonger la liste des substances que de telles protéines peuvent être amenées à transporter. Certaines protéines bactériennes permettent l'expulsion hors de la cellule de différentes toxines ou le transport de composés variés (Felmlee *et al.*, 1985 ; Glaser *et al.*, 1988 ; Higgins *et al.*, 1986). La Pgp de *S. cerevisiae* intervient dans l'excrétion d'un facteur sexuel (Wilson et Herskowitz, 1984). Celle de *D. melanogaster* serait impliquée dans le transport de pigments et la résistance à des composés toxiques (Wu *et al.*, 1991). Enfin les gènes "mdr-like" de *Leishmania* sont amplifiés avec d'autres gènes de résistance (Ouellette et Borst, 1991). De plus, la détection de protéines MDR dans des cellules de tissus humains non exposés à une chimiothérapie désigne ces protéines comme partie d'un système naturel de défense contre des toxiques d'origine alimentaire ou endogène. Ainsi des Pgp ont été trouvées au niveau du foie, du rein, de la surrénale, du pancréas, du rein, de l'intestin, du placenta et des capillaires cérébraux et des testicules (Sugawara *et al.*, 1988). La localisation au sein de ces tissus apparaît très spécifique. Il s'agit de la surface apicale des cellules épithéliales du foie, rein, colon et jéjunum ; des cellules du canal biliaire ; des cellules endocrines du pancréas et des cellules endothéliales des capillaires cérébraux et testiculaires (Thiebaut *et al.*, 1987 ; Cordon-Cardo, 1990).

L'existence d'un système de défense dont le terme s'étend aux multiples xénobiotiques pouvant être présents dans l'environnement des organismes a ainsi été envisagée (la résistance multixénobiotique ; MXR).

MXR et organismes aquatiques

A ce jour uniquement deux portions de séquences géniques apparentées à la famille MDR ont été découvertes dans des organismes aquatiques. Il s'agit de deux parties exoniques 3' terminales du flet, *Pleuronectes americanus* (Chan *et al.*, 1992).

Un ARN messager de 4,2 kb a aussi été identifié chez les éponges, *Geodia cydonium* et *Verongia aerophoba* (Kurelec *et al.*, 1992) avec une sonde spécifique de gène MDR humain.

Les études immuno-chimiques utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre la P-glycoprotéine ont montré l'existence d'une protéine apparentée de 125 kDa chez *G. cydonium* et *V. aerophoba* (Kurelec *et al.*, 1992). Tandis que l'anticorps monoclonal C219, spécifique des Pgp, a identifié une protéine de 140 kDa chez *Urechis caupo* (Toomey et Epel., 1993), deux protéines de 170 et 220 kDa chez *Mytilus galloprovincialis* et une de 170 kDa chez *Mytilus carlifornianus*.

La fonction des protéines identifiées a été étudiée. Les membranes cellulaires de *G. cydonium*, *V. aerophoba*, *Tethya aurantium*, *Anodonta cygnea* et *M. galloprovincialis* partagent avec les cellules cancéreuses la capacité de lier certains toxiques, le 2-acétylamino fluorène et la vincristine de façon compétitive avec le vérapamil (Kurelec et Pivcevic, 1989 et 1991 ; Kurelec *et al.*, 1992), ce qui constitue une bonne indication d'une fonction de type MDR. Les cellules branchiales de *M. galloprovincialis* et de *M. carlifornianus* (Galgani *et al.*, 1994a ; Cornwall *et al.*, 1994 ; Kurelec, 1994b), les cellules de l'escargot *Monodonta turbinata* (Kurelec *et al.*, 1994a) ainsi que les oeufs de *U. caupo* (Toomey et Epel., 1993) sont capables de réduire l'entrée et d'activer la sortie de substrat fluorescent (rhodamine B) couramment utilisé pour l'étude des cellules MDR. Ces cinétiques sont affectées par la présence de vérapamil et d'autres substrats connus des protéines mdr.

Resistance multixénobiotique et environnement

Différentes techniques ont été utilisées pour valider les caractéristiques du système de résistance multixénobiotique comme marqueur d'exposition à différents composés présents dans l'environnement.

Kurelec et collaborateurs ont utilisé les capacités des vésicules membranaires d'éponges ou de cellules rénales de bovin à lier le 2-acétylamino fluorène et la vincristine. Ils ont ainsi montré que les eaux des rivières Sava et Korona sont capables, de façon similaire au vérapamil, d'inhiber cette liaison (Kurelec and Pivcevic, 1989 ; Kurelec, 1994).

La possibilité de suivre le transport cellulaire de rhodamine B a aussi été utilisée. Certains polluants présents dans l'environnement, tels que PCB, PAH et DDT montrent une capacité à entrer en compétition avec la rhodamine et donc à en limiter le transport chez *M. galloprovincialis* (Galgani *et al.*, 1994a).

Le système MXR de ces moules semble donc apte à les défendre contre ces composés. De façon intéressante, ces mêmes composés ne semblent pas transportés par le système présent chez *M. californianus* (Cornwall *et al.*, 1994).

Enfin des techniques immunocytochimiques ont permis de dresser une carte des niveaux d'expression de la Pgp de moules sur les côtes anglaises. Cette étude montre des différences de niveau d'expression d'un facteur 9 entre les différents sites (Moore, communication personnelle).

Objectif du travail

Ces travaux indiquant que le système de résistance multixénobiotique est présent chez certains organismes marins et que ce système peut constituer un indicateur d'exposition à plusieurs composés toxiques présents dans le milieu marin ont encouragé le présent travail. Celui-ci a suivi une ligne directrice visant à développer un biomarqueur utilisable pour l'évaluation de la qualité du milieu côtier.

La première partie a consisté à mettre à profit l'existence d'un substrat fluorescent de la pompe mxr, la rhodamine. En effet, l'étude du transport de ce composé adapté à la technique utilisant les mesures en microplaques avec des cellules algales de *Prorocentrum micans* permettait *a priori* de répondre aux exigences visant à obtenir une mesure rapide de nombreux échantillons.

II - MATERIELS ET METHODES

Materiel biologique

Essentiellement deux types d'organismes ont fait l'objet d'essais visant à les utiliser comme support de tests écotoxicologiques : le dinoflagellé *Prorocentrum micans* et les mollusques *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* et *Crassostrea gigas*. L'algue rouge, *Porphyridium cruentum*, a été utilisée lors de mise au point technique d'amplification génique. Les cellules de mammifères, humaines ou de rat, ont servi de témoins pour les études immunologiques.

Les algues unicellulaires

Les algues unicellulaires, *Prorocentrum micans* Ehrenberg et *Porphyridium cruentum* proviennent de cultures effectuées respectivement sur milieu ESP (Provasoli *et al.*, 1957) et milieu de Conway (Walne, 1966) au laboratoire Phycotoxines et Nuisances (IFREMER, Nantes).

Les mollusques

Concernant les marquages cellulaires à la rhodamine B, les branchies de moules et d'huîtres ayant servi à la préparation de cellules dissociées proviennent de mollusques prélevés en rade de Brest et délivrées par le Dr. Orange.

Les cellules de mammifères

Une lignée cellulaire humaine (Adr^R MCF7) sélectionnée pour sa résistance à l'adriamycine (doxorubicine) (Cowan *et al.*, 1986) a été aimablement fournie par le Dr. Bénard (Institut Gustave Roussy, Villejuif, France).

Des hépatocytes de rats exprimant une Pgp (Fardel *et al.*, 1992) isolés après perfusion (Guguen *et al.*, 1975) ont été soit congelés immédiatement, soit cultivés pendant 2 jours au laboratoire d'Hématologie-Immunologie du Centre Hospitalier Régional de Rennes puis délivrés congelés par le Dr. Fardel.

Etude du transport de la rhodamine B

Les cellules résistantes exprimant la Pgp peuvent transporter certains substrats fluorescents, dont la rhodamine (Neyfakh, 1988). Cette capacité a pu être mise à profit pour étudier les caractéristiques des cellules de moules et de dinoflagellés vis-à-vis de composés interagissant avec les Pgp selon un protocole utilisant la lecture en microplaque adapté de celui décrit par Yoshimura *et al.* (1990).

Dissociation de cellules branchiales de moules

Les cellules de moules provenant de la rade de Brest ont été préparées selon le protocole de Dorange et collaborateurs (Dorange *et al.*, 1994). Les branchies ont été prélevées sur des organismes vivants et incubées dans 25 ml de milieu de Hanks (NaCl 8 g.l⁻¹, KCl 0,4 g.l⁻¹, glucose 1 g.l⁻¹, KH₂PO₄ 0,06 g.l⁻¹, Na₂HPO₄ 0,0475 g.l⁻¹, NaHCO₃ 0,35 g.l⁻¹) contenant 150 mg/l de Pénicilline G, 75 mg/l de streptomycine, 10 mg/l de kanamycine, 20 mg/l de gentamycine et 0,2 % (p/v) de pronase, puis découpés stérilement en fines portions, agités à température ambiante pendant 15 min. et filtrés sur toile à bluter. Le milieu de dissociation est éliminé par deux centrifugations douces (700 g, 3 min.) suivies de la reprise des cellules dans 20 ml d'eau de mer. Après une dernière centrifugation, le culot est homogénéisé dans 2 ml de milieu de Hanks et la viabilité des cellules estimée par comptage après coloration au bleu trypan.

Etude de l'activité de transport multixénobiotique

L'activité de transport de type mdr des cellules de moules et de *P. micans* a été étudiée via les modulations des cinétiques de pénétration et de sortie de la rhodamine B engendrées par différents composés.

Les marquages cellulaires ont d'abord été expérimentés pour différentes concentrations cellulaires et différentes concentrations en rhodamine B. Les concentrations cellulaires ont été ajustées aux différentes concentrations testées par centrifugation douce à 500 g pendant 2 min (Rotanta/R, Hettich) puis élimination d'une partie du surnageant ou par dilution. Les cellules ont ensuite été incubées en présence de rhodamine B (0,1 ; 0,5 ; 1 ; 5 et 10 μM) pendant une heure. Trois lavages successifs du milieu d'incubation ont alors été réalisés et la fluorescence des cellules a enfin été quantifiée spectrophotométriquement à l'aide d'un lecteur de microplaque (Fluoroskan II, Labsystems) équipé de filtres de 554 nm pour l'excitation et de 590 nm pour l'émission.

La cinétique de pénétration de la rhodamine B dans les cellules de *P. micans* a été étudiée par incubation d'une suspension cellulaire à 20000 cellules/ml en présence de 4 μM de rhodamine. 1,6 ml de cette suspension a été périodiquement prélevée. Puis après un lavage à l'eau de mer du milieu d'incubation, 200 μl (environ 4000 cellules) ont été répartis dans les puits d'une plaque de microtitration afin de réaliser la lecture de la fluorescence.

La cinétique d'efflux de la rhodamine B hors des cellules de *P. micans* et de *M. edulis* a été étudiée après saturation des cellules par incubation d'une suspension cellulaire à 20 000 cellules/ml en présence de 4 μM de rhodamine pendant une heure. Après lavage du milieu d'incubation, la fluorescence a été mesurée pour différents temps d'incubation dans l'eau de mer.

Ces deux types d'expérimentation, influx et efflux de rhodamine, ont été réalisés en présence de substrats et d'inhibiteurs connus de Pgp : vérapamil, quinidine, tamoxifen, vanadate, 2, 4- dinitrophénol, doxorubicine et vincristine.

Induction de l'expression d'un phénotype mxr

Afin d'amplifier l'activité de transport de type mxr, un essai de sélection de cellules particulièrement résistantes à un composé cytotoxique a été mené. Une culture de *P. micans* a ainsi été menée en présence de vincristine, composé induisant le phénomène de résistance multixénobiotique sur des cellules de mammifères (Raymond *et al.*, 1989). Cent microlitres à 2 mg/ml de vincristine ont été ajoutés, tous les trois ou quatre jours et pendant 45 jours, à trois cultures successives de 250 ml de dinoflagellés. Un contrôle a été effectué par culture parallèle où 100 μl d'eau étaient périodiquement ajouté.

III - RESULTATS

Certains marqueurs fluorescents constituent des outils fiables et d'utilisation facile pour étudier le phénomène de résistance multixénobiotique (Neyfakh, 1988). En effet ils peuvent être transportés activement hors des cellules résistantes par la Pgp. La daunorubicine (Slapak *et al.*, 1992 ; Gheuens *et al.*, 1991), le hoechst (Morgan *et al.*, 1989 ; Lautier *et al.*, 1993), et la doxorubicine (Schuurhuis *et al.*, 1991 ; Weaver *et al.*, 1991) ont, par exemple, été utilisés. Cependant ce sont les différentes rhodamines qui ont fait l'objet des plus nombreuses applications en cytométrie de flux (Kessel, 1989 ; Buccana *et al.*, 1990 ; Drenou *et al.*, 1993) ou avec des tests effectués en microplaques (Efferth et Wolm, 1988 ; Yoshimura *et al.*, 1990). Cette dernière technique présente des avantages de rapidité, de sensibilité et de coût compatible avec des études océanographiques. Elle a ainsi fait l'objet d'essais visant à l'utiliser avec des cellules de *P. micans* puis de *M. edulis*.

La démarche suivie correspond à, tout d'abord, étudier les possibilités de marquages des cellules avec la rhodamine B ; puis à étudier l'activité de transport de ce composé par les cellules (correspondant au phénotype mxr) ; enfin à étudier les implications de ce système vis-à-vis des principaux polluants du milieu marin.

Marquage des cellules de *P. Micans* à la rhodamine B

La rhodamine B est un composé fluorescent capable de pénétrer très rapidement les cellules de *P. micans* (figure 5). La fluorescence maximale est ainsi obtenue après 10 minutes d'incubation de cellules avec 4 μM de rhodamine. Ce marquage n'est linéaire, pour une concentration en rhodamine de 4 μM dans la solution d'incubation, que pour l'intervalle 0 – 25000 cellules par ml (figure 3). Les lavages successifs du milieu d'incubation ne modifient pas l'allure générale de la courbe obtenue. La décroissance de la fluorescence mesurée entre chaque lavage est due, d'une part à l'élimination de rhodamine B adsorbée sur les parois des tubes et visible au niveau du témoin sans cellules, d'autre part à l'activité d'expulsion de rhodamine hors des cellules, très importante entre les deux premiers lavages et qui devient plus faible entre le deuxième et le troisième lavage. Ces données montrent l'importance d'effectuer très rapidement les mesures d'efflux. Un seul lavage a ainsi été réalisé pour les expériences ultérieures avec *P. micans*.

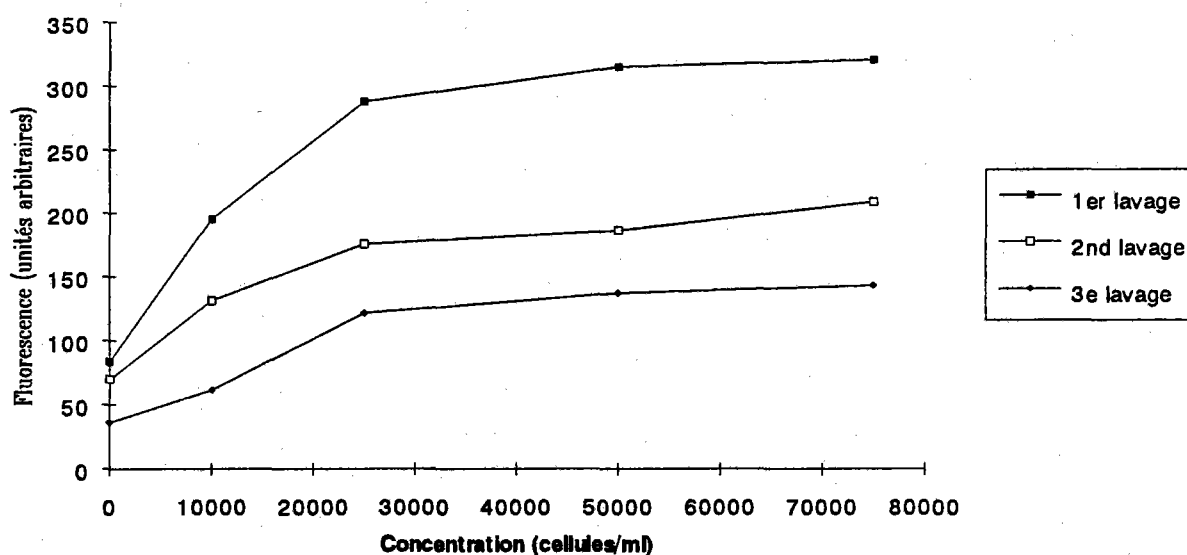


Figure 3 : Marquage cellulaire par incubation de cellules de *P. micans* en présence de 4 μM de rhodamine B pendant 1 heure. La lecture de la fluorescence cellulaire a été effectuée après 1, 2 et 3 lavages successifs du milieu d'incubation.

Après marquage cellulaire, la cinétique de sortie de rhodamine B hors des cellules a été étudiée (figure 4). Cette sortie est très importante dès le changement du milieu d'incubation, puis diminue graduellement. La rapidité d'exécution des expériences influe ainsi de façon importante sur les mesures de la diminution de fluorescence. Il semble que l'état physiologique des cellules puisse aussi avoir une incidence sur la qualité des mesures. Ainsi les pourcentages de composés fluorescents encore présents dans les cellules après 30 minutes d'efflux sont proches de 80 % pour des cellules prélevées en phase de croissance alors qu'ils s'abaissent à 40 % en fin de culture.

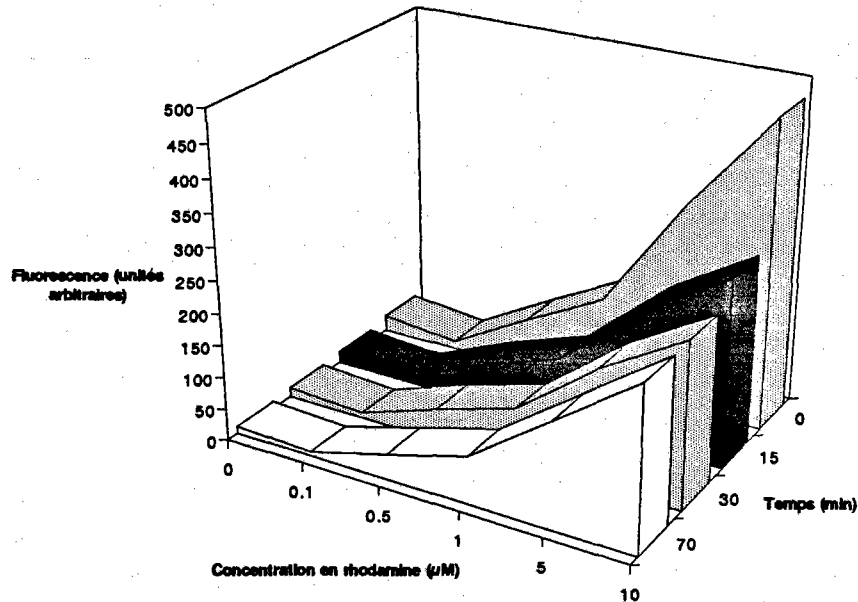


Figure 4 : Cinétiques d'efflux de rhodamine B hors des cellules de *P. micans* (20000 cellules/ml) en fonction de la concentration en composé fluorescent utilisée pour saturer les cellules par incubation préalable pendant une heure.

Etude du phénotype MXR

La rhodamine B est un substrat fluorescent pouvant faire l'objet d'un efflux actif hors de cellules de mammifères via le transporteur du phénomène de résistance multidrogue (Pgp) (Neyfakh, 1988). Sa concentration intracellulaire peut ainsi être influencée par la présence de composés connus pour modifier les activités de transport intervenant via la Pgp tels que le vérapamil, la quinidine, la vincristine, la doxorubicine, le tamoxifen, la réserpine, le vanadate, le dinitrophénol. L'étude de la modulation de transport par de tel composés est ainsi considérée comme la première étape pour explorer le phénotype mxr (Endicot et Ling, 1989).

Les cinétiques de pénétration de la rhodamine en présence ou absence de vérapamil ainsi que l'efflux du composé fluorescent après saturation des cellules sont représentées dans les figures 21 et 22. Elles montrent que le vérapamil influence ces cinétiques. L'inhibition de l'expulsion de rhodamine hors des cellules de *P. micans* correspond au phénotype observé pour des cellules exprimant un transporteur de type Pgp de cellules résistantes. Inversement le vérapamil limite aussi très nettement l'entrée de rhodamine B dans les cellules algales.

L'étude d'autres composés connus pour entrer en compétition avec les Pgp a conduit à tester différents types d'agents (figures 7 et 8). Les antagonistes de canaux calciques, le vérapamil et la quinidine réduisent le transport de rhodamine à travers la paroi et / ou la membrane des cellules de *P. micans*. Cependant l'action due à l'inhibiteur de perméases, le vanadate, est (légèrement) inverse. L'antagoniste d'oestrogène, le tamoxifen, et dans une moindre mesure la réserpine montrent une capacité similaire aux inhibiteurs de canaux calciques à limiter tout transport de rhodamine. Les drogues cytotoxiques, vincristine (inhibiteur du fuseau mitotique) et doxorubicine (inhibiteur d'ARN polymérase) inhibent significativement l'efflux de rhodamine hors des cellules. Par contre le dinitrophénol, agent découplant des ATPases mitochondriales ne modifie pas le transport du composé fluorescent.

Afin de s'assurer que la présence de ces différentes drogues ne réduit pas de façon trop importante l'activité métabolique des cellules algales, l'activité estérasique non spécifique des dinoflagellés en présence de vérapamil, doxorubicine et vincristine a été testée (figure 9). Cette activité est stable en présence de vérapamil dans la gamme testée de 0,1 à 100 μM et accrue de 21,5 ; 33,5 et 51 % respectivement par 10, 50 et 100 $\mu\text{g/ml}$ de vincristine. Inversement la doxorubicine entraîne une diminution de l'activité estérasique de 34 et 54 % pour des concentrations égales à 50 et 100 $\mu\text{g/ml}$. La concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ de doxorubicine, suffisante pour inhiber l'efflux de rhodamine B hors des cellules de *P. micans*, ne modifie pas cette activité enzymatique.

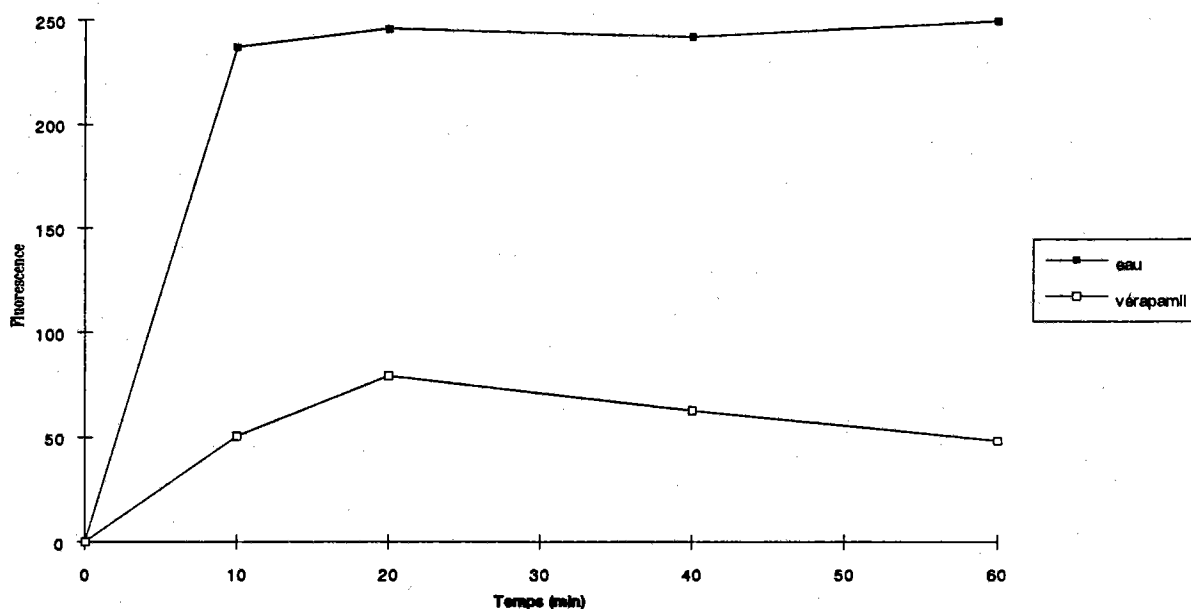


Figure 5 : Cinétiques de pénétration de rhodamine B dans les cellules de *P. micans* (20000 cellules/ml). Les cellules algales ont été incubées dans un milieu contenant 4 μM de composé fluorescent avec ou sans 40 μM de vérapamil.

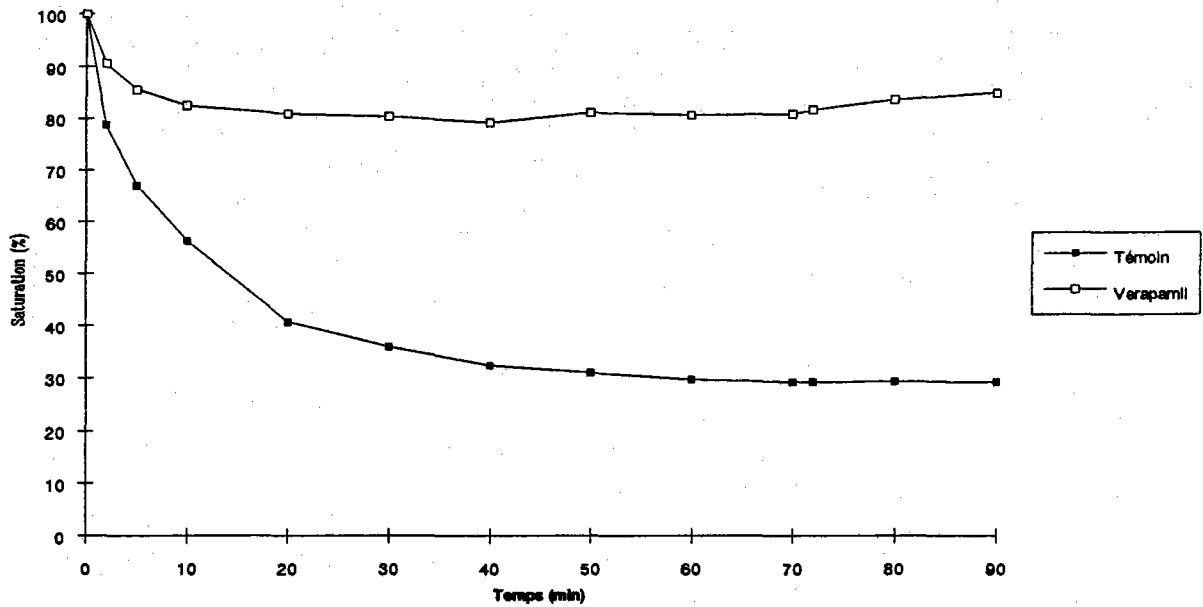


Figure 6 : Cinétiques d'efflux de rhodamine B hors des cellules de *P. micans* (20000 cellules/ml) en absence et en présence de $10 \mu\text{M}$ de vérapamil après saturation des cellules par incubation une heure en milieu contenant $4 \mu\text{M}$ de composé fluorescent.

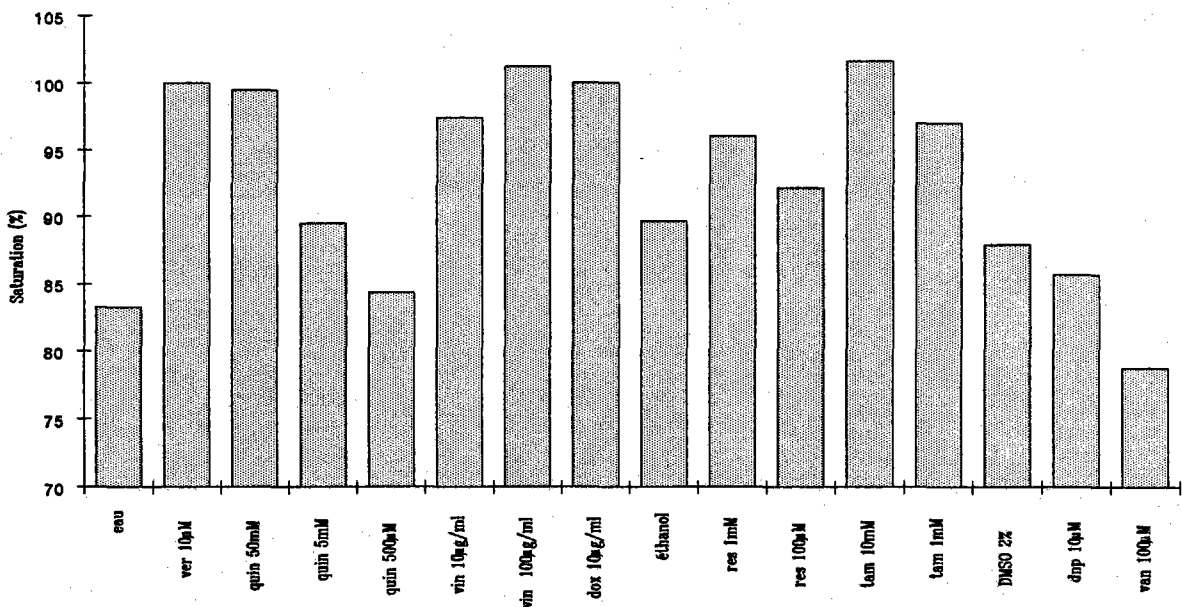


Figure 7 : Fluorescence cellulaire résultante après 20 minutes d'incubation dans l'eau de mer, et en présence de différents composés chimiques, des cellules de *P. micans* (20000 cellules/ml) préalablement saturées en rhodamine B. Les solvants utilisés ont été 1°- l'eau pour le vérapamil (ver), la quinidine (quin) et la vincristine (vin) ; 2°- l'éthanol pour la réserpine (res) et le tamoxifen (tam) ; 3°- le DMSO pour le dinitrophénol (dnp) et le vanadate (van).

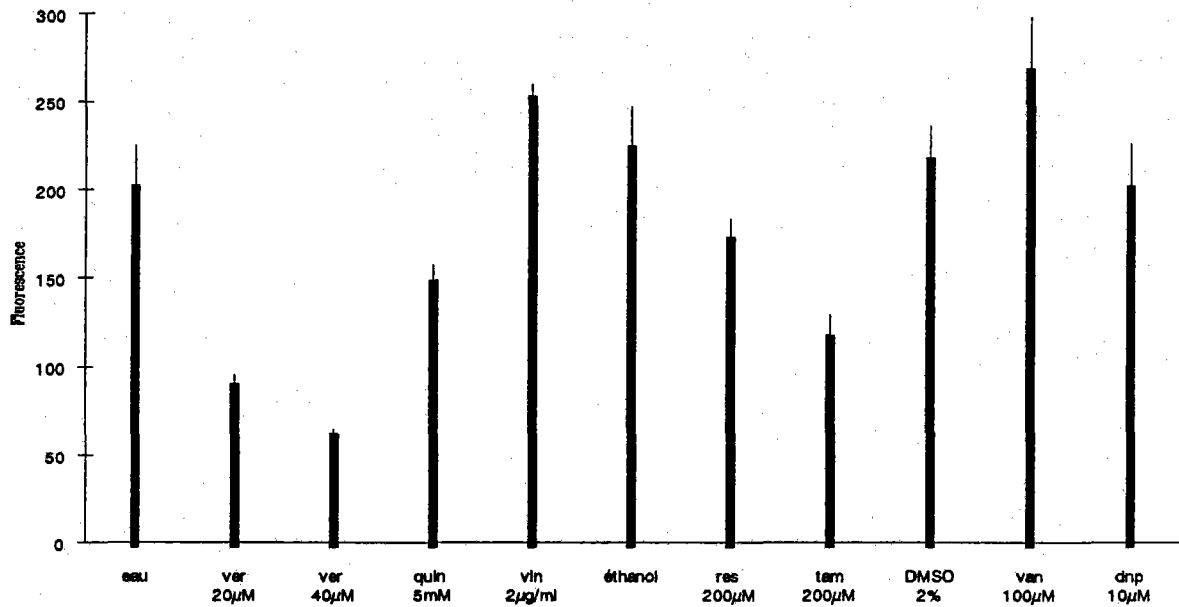


Figure 8 : Fluorescence cellulaire induite par incubation de 20000 cellules de *P. micans* par ml dans le milieu de culture contenant 4 μ M de rhodamine B et différents composés chimiques. Les solvants utilisés ont été 1°- l'eau pour le vérapamil (ver), la quinidine (quin) et la vincristine (vin) ; 2°- l'éthanol pour la réserpine (res) et le tamoxifen (tam) ; 3°- le DMSO pour le dinitrophénol (dnp) et le vanadate (van). Les barres représentent l'intervalle de confiance calculé pour 7 valeurs.

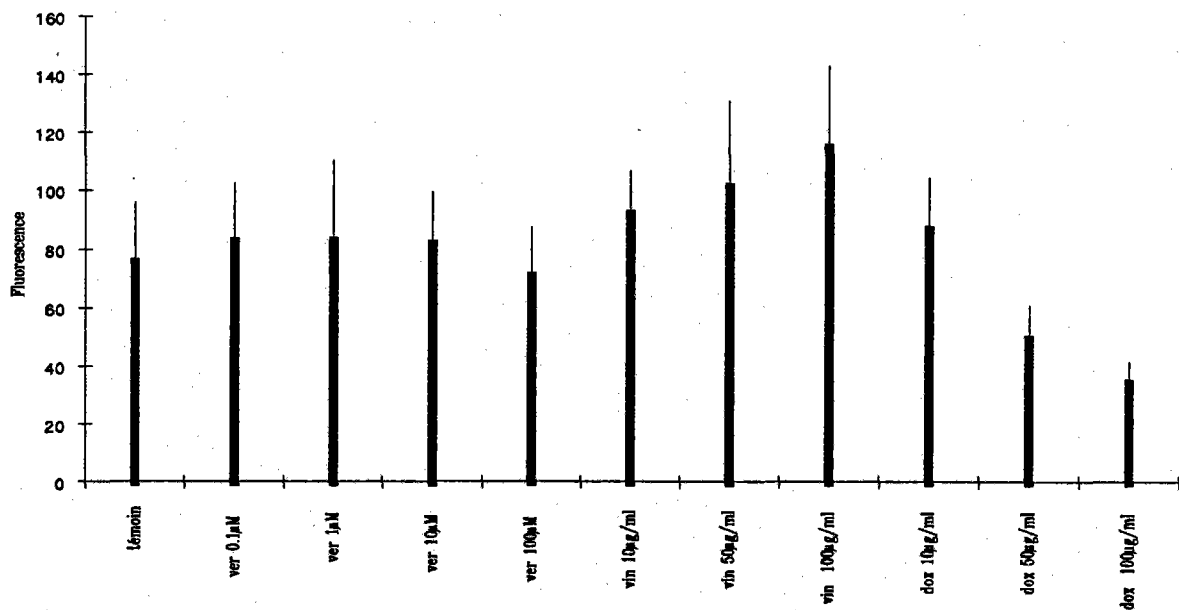


Figure 9 : Activité estérasique de cellules de *P. micans* en présence de vérapamil (ver), vincristine (vin) et doxorubicine (dox). Les barres représentent l'intervalle de confiance calculé pour 8 valeurs.

Dans l'optique d'obtenir une réponse plus proche du phénotype mxr tel qu'il est observé chez les cellules de mammifères, un essai préliminaire d'amplification de l'expression du phénomène a été réalisé. Une culture de *P. micans* a ainsi été menée en présence de vincristine, composé induisant le phénomène de résistance multixénobiotique sur des cellules de mammifères (Raymond *et al.*, 1989). Cent microlitres à 2 mg/ml de vincristine ont été ajoutés, tous les trois ou quatre jours et pendant 45 jours, à trois cultures successives de 250 ml de dinoflagellés.

Cependant les cellules de *P. micans* ainsi cultivées, périodiquement prélevées et testées n'ont pas permis d'observer une quelconque différence avec la culture témoin.

Etude de quelques polluants

Parallèlement à l'étude toxicologique, et en tenant compte des excellents résultats obtenus avec les tests d'efflux de rhodamine en présence et en absence de vérapamil, une étude écotoxicologique préliminaire, impliquant les polluants les plus présents dans l'environnement marin a été menée.

Après saturation des cellules de *P. micans* pendant une heure avec de la rhodamine B, puis transfert des cellules dans de l'eau de mer dénuée de composé fluorescent, la diminution de la fluorescence cellulaire a été mesurée. Les figures 10 et 11 montrent que cette fluorescence est de plus en plus importante lorsque l'eau de mer contient des concentrations croissantes en atrazine et simazine.

Ces composés inhibent donc de façon sensible la sortie de rhodamine des cellules des dinoflagellés. Après 30 minutes d'efflux de rhodamine, la fluorescence cellulaire reste supérieure de 30% et 40 % pour des concentrations de 10 ng.l^{-1} en atrazine et simazine respectivement.

L'incubation des cellules chargées en rhodamine en présence des mélanges de PAH ou de PCB n'a permis d'observer de modulations significatives de l'efflux du composé fluorescent (figure 12).

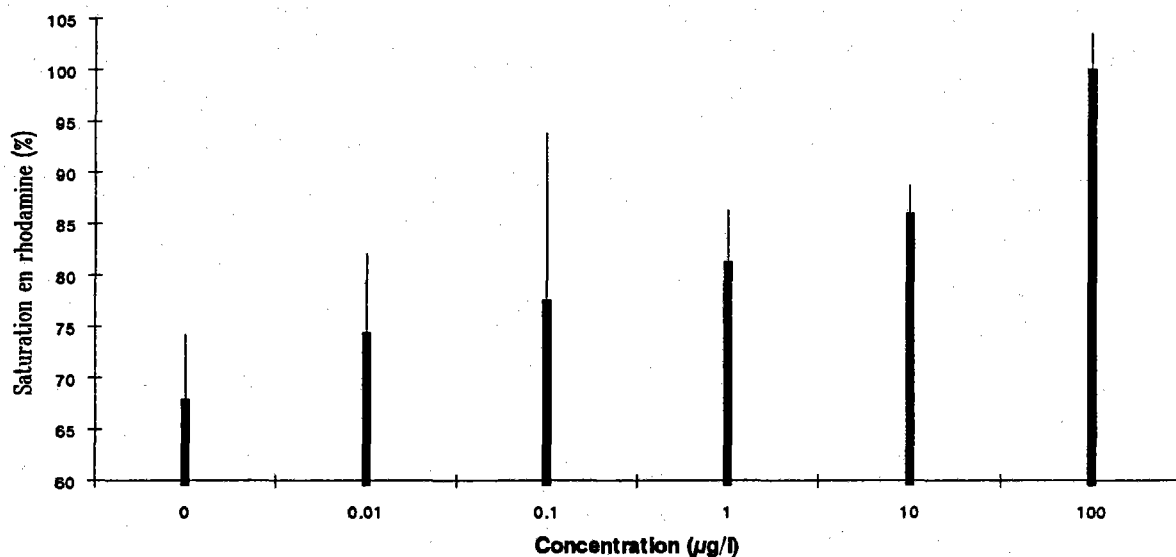


Figure 10 : Fluorescence des cellules de *P. micans* (20000 cellules/ml), préalablement saturées en rhodamine B, après 30 minutes d'efflux dans le milieu contenant de l'atrazine. Les barres représentent l'intervalle de confiance calculé pour 8 valeurs.

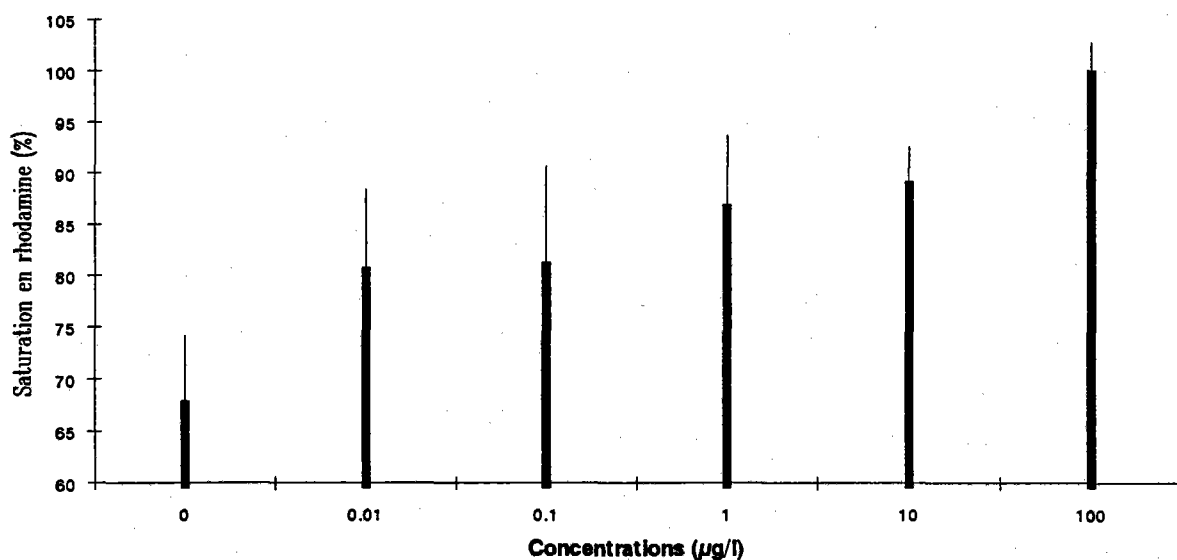


Figure 11 : Fluorescence des cellules de *P. micans* (20000 cellules/ml), préalablement saturées en rhodamine B, après 30 minutes d'efflux dans le milieu contenant de la simazine. Les barres représentent l'intervalle de confiance calculé pour 8 valeurs.

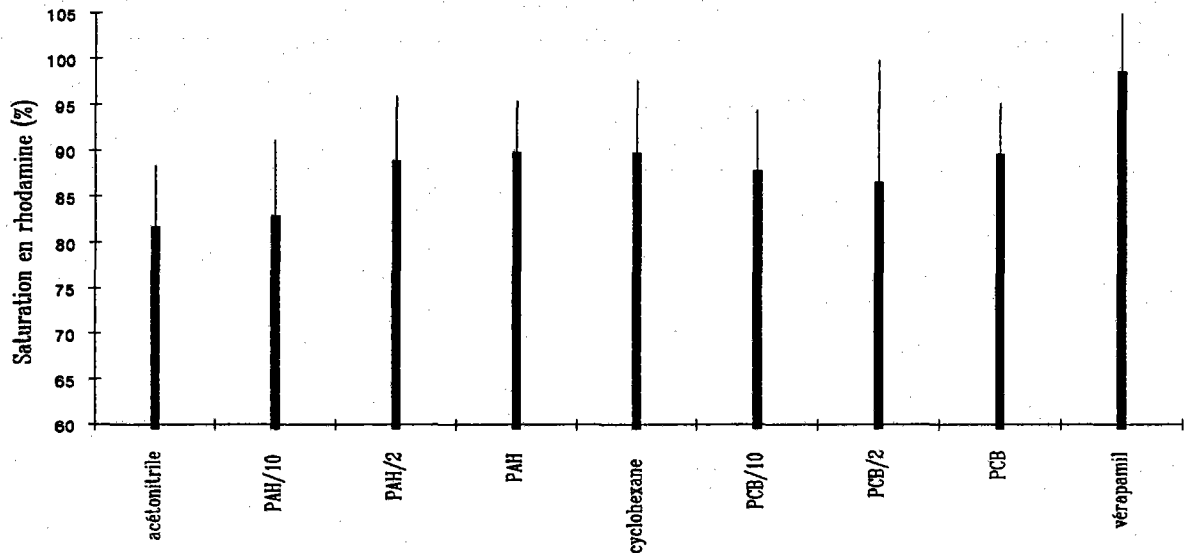


Figure 12 : Fluorescence des cellules de *P. micans* (20000 cellules/ml), préalablement saturées en rhodamine B, après 30 minutes d'efflux dans le milieu contenant un mélange de PAH ou de PCB et de leur dilutions 2 et 10 fois. Les PAH ont été dissous dans l'acétonitrile et les PCB dans le cyclohexane. Les barres représentent l'intervalle de confiance calculé pour 8 valeurs.

Marquage des cellules de *M. Edulis* à la Rhodamine B

La difficulté d'interpréter les caractéristiques du transport de rhodamine de *P. micans* en terme d'activité de type mxr a conduit à essayer d'adapter le protocole utilisé aux cellules dissociées de moules. En effet des études de transport de rhodamine B ont été réalisées avec succès avec des tissus branchiaux de *M. galloprovincialis* provenant des côtes californiennes (Galgani *et al.*, 1994b).

L'utilisation de la technique de mesure en microplaque imposait l'obtention de cellules isolées de moules. Des telles cellules, issues de la dissociation de tissus branchiaux à la pronase, ont testées. Elles ont permis de montrer que la rhodamine peut les pénétrer (figure 13). Le coefficient de corrélation du marquage obtenu en fonction de la concentration cellulaire, après 2 lavages du milieu d'incubation par de l'eau de mer, est de 0,87.

Cependant, après étude de la cinétique de sortie de rhodamine B hors des cellules, aucune diminution significative de la fluorescence n'a pu être mesurée, même après 40 minutes d'incubation dans l'eau de mer en présence ou non de vérapamil.

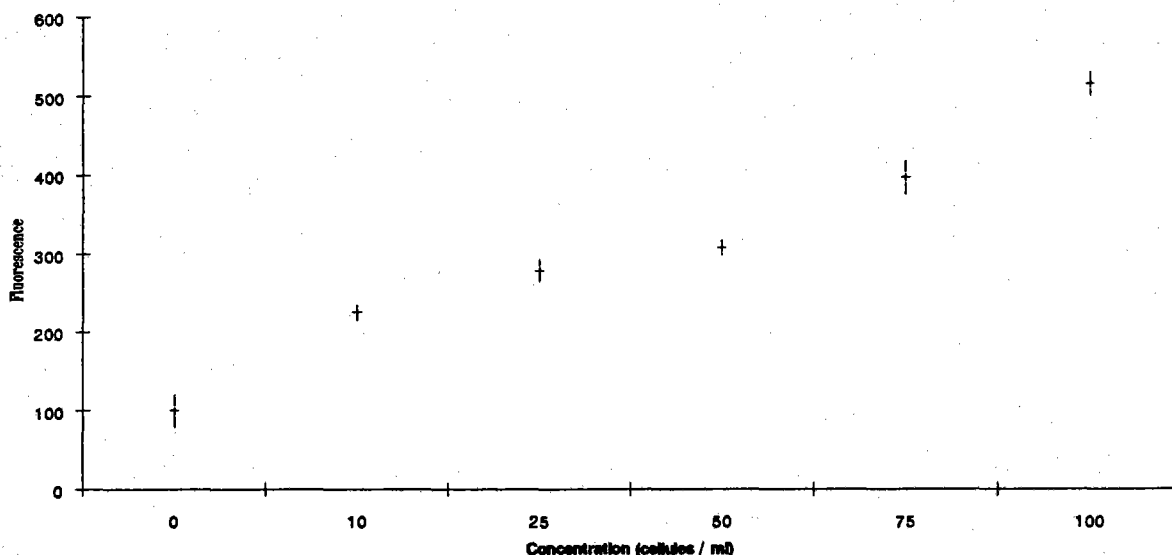


Figure 13 : Marquage cellulaire par incubation de cellules de *M. edulis* en présence de $4 \mu\text{M}$ de rhodamine B pendant 1 heure. La lecture de la fluorescence cellulaire a été effectuée après 2 lavages successifs du milieu d'incubation. Les barres représentent l'intervalle de confiance calculé pour 16 valeurs.

IV - DISCUSSION ET CONCLUSION

Certaines cellules de mammifère expriment une glycoprotéine membranaire expulsant activement hors des cellules un large spectre de composés cytotoxiques concourant au phénomène de résistance multidrogue (MDR) (Juliano et Ling, 1989). Ce phénomène, posant d'importants problèmes pour la chimiothérapie des cancers, a fait l'objet de nombreuses études permettant notamment le dosage des produits d'expression du gène impliqué et l'étude de la spécificité du transporteur. De façon similaire certains organismes marins semblent posséder un mécanisme de défense leur permettant de résister à de nombreux xénobiotiques d'origine anthropique ou non (Kurelec, 1992). Ainsi les méthodes d'étude du phénomène MDR adaptées aux organismes marins sont susceptibles d'apporter d'importantes informations du point de vue écotoxicologique.

Le Dinoflagellé *Prorocentrum micans*

Prorocentrum micans est une algue unicellulaire dont la culture en laboratoire est assez aisée. Ces cellules ont été utilisées pour adapter la technique de mesure en microplaque des propriétés de transport d'un substrat fluorescent connu pour interagir avec le transporteur responsable du phénotype MDR (la glycoprotéine appelée Pgp) (Efferth et Wolm, 1988 ; Yoshimura *et al.*, 1990).

L'incubation des cellules de *P. micans* en présence de rhodamine B a permis de montrer que ce composé peut pénétrer et donc permettre le marquage cellulaire de ces cellules. De façon inverse, l'incubation des cellules chargées en rhodamine dans un milieu dénué de ce composé a montré qu'il était libéré dans le milieu. Ce transport de la rhodamine peut être perturbé par la présence d'autres substrats connus de la Pgp dans le milieu d'incubation. Ainsi l'efflux du composé fluorescent est inhibé par le vérapamil, la quinidine, la doxorubicine, le tamoxifen et la vincristine. Ceci correspond aux effets décrits sur le transport de rhodamine hors de cellules résistantes de mammifères et interprété comme un phénomène de compétition de différents substrats pour un même transporteur. Ces inhibitions constituent de bonnes indications d'un phénotype mdr (Gottesman et Pastan, 1993).

Le transport impliquant la Pgp des mammifères est dépendant de l'apport énergétique fourni par l'hydrolyse de l'ATP (Horio *et al.*, 1988). De façon différente l'efflux de rhodamine B hors des cellules algales n'est pas sensible au dinitrophénol ni au vanadate. Ces résultats sont par contre similaires à l'absence d'effet observé sur les cellules branchiales de la moule *Mytilus californianus* de l'azide de sodium, un autre inhibiteur de la respiration mitochondriale (Cornwall *et al.*, 1994).

L'étude de l'influx s'est révélée plus complexe. Le dinitrophénol et la réserpine n'ont pas eu d'effet sur l'entrée de rhodamine B dans les cellules. Le vanadate et la vincristine ont montré de faibles capacités à entrer en compétition avec le marqueur fluorescent et donc à accroître la fluorescence cellulaire. A l'inverse la quinidine, le tamoxifen et surtout le vérapamil ont limité l'influx de la rhodamine B. Ces derniers résultats correspondent au phénomène inverse de celui observé avec des cellules mdr de mammifères. Le phénomène observé est donc différent du phénotype mdr tel qu'il est connu.

Tout ce passe, ici, comme si la présence de quinidine, tamoxifen et vérapamil dans le milieu d'incubation entraînait la mise en place d'une barrière limitant tout transport de la rhodamine. Le phénomène n'implique vraisemblablement pas une protéine de transport mais plutôt une modification de la fluidité de la membrane, du pH ou de l'équilibre ionique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule.

Les cellules de *P. micans* sont vraisemblablement des cellules "sensibles" du point de vue du phénomène de résistance multixénobiotique. Elles pourraient constituer un modèle de référence dans le cas d'obtention de cellules résistantes. Cependant le traitement périodique des cellules avec de la vincristine n'a pas permis l'expression du phénotype MXR.

De façon intéressante, l'utilisation du test d'efflux de rhodamine a permis de montrer que des concentrations de 10 ng.l^{-1} de simazine et d'atrazine permettent d'enregistrer une réponse significative. Ces concentrations sont habituellement trouvées dans le milieu estuarien et côtier et correspondent aux limites de sensibilité de dosages de ces herbicides par des méthodes chimiques (Tronczynski, 1994).

Celle-ci est altérée, puisqu'une observation au microscope photonique indique que le contenu cellulaire est très souvent absent, mais la membrane cellulaire ou de grosses protéines pourraient rester piégées dans ce compartiment encore délimité par la paroi cellulaire. Des dosages immunologiques effectués après digestion de la paroi algale devraient permettre de dissiper cette incertitude.

Les moules et les huîtres

Les moules et les huîtres ont été utilisées pour des essais préliminaires d'efflux de la rhodamine B, car cette technique permet l'étude *in vitro* de la spécificité du transporteur (Cornwall *et al.*, 1994), mais surtout dans une optique d'évaluation *in situ* des produits d'expression du (ou des) gène (s) dont la présence est suspectée chez ces organismes. Concernant l'étude du transport cellulaire de rhodamine B, la disposition de cellules en culture serait un atout très important. Cependant la culture cellulaire d'invertébrés marins est un travail qui pose de nombreux problèmes dont le laboratoire n'est pas spécialiste. De façon préliminaire des essais de mesures d'efflux de rhodamine B et d'inhibition par le vérapamil ont été réalisés sur des cellules branchiales de moules après dissociation des tissus à la pronase. Bien que la rhodamine B ait permis de réaliser un marquage fluorescent des cellules de mollusques, aucun efflux significatif n'a pu être visualisé. Ceci ne correspond pas aux données de la littérature qui indiquent que les cellules de moules expriment une activité de transport de type MDR. En effet les cellules de *M. galloprovincialis* partagent avec les cellules cancéreuses la capacité de lier le 2-acétylamino fluorène et la vincristine de façon compétitive avec le vérapamil (Kurelec et Pivcevic, 1991 ; Kurelec, 1992). Les branchies de *M. galloprovincialis* et *carlifornianus* montrent les mêmes caractéristiques de transport de rhodamine que les cellules résistantes de mammifères (Cornwall *et al.*, 1994 ; Galgani *et al.*, 1994a). Ce transport est altéré en présence de vérapamil, quinidine, émétine, vinblastine, trifluoropérazine et forskoline. Une hypothèse pouvant expliquer les résultats présents consiste à postuler que les antibiotiques utilisés lors de la préparation des cellules agissent comme des inhibiteurs de la Pgp de mollusques. En effet, certains antibiotiques ont été décrits comme des modulateurs de l'activité des Pgp des mammifères (Gottesman et Pastan, 1993). Une autre hypothèse possible est que ces cellules peuvent exprimer trop faiblement les Pgp. Le contrôle immunochimique visant à montrer la présence de Pgp au niveau de ces cellules n'a donné qu'une réponse faible. Le traitement à la pronase peut aussi avoir hydrolysé la partie extracellulaire du transporteur.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AKIYAMA S.I., FOJO A., HANOVER J.A., PASTAN I. & GOTTESMAN M.M. (1985). Isolation and genetic characterization of human KB cell lines resistant to multiple drugs. *Somatic Cell Mol. Genet.* 11 : 117-126.
- AMES G.F.L. (1986). Bacterial periplasmic transport systems : structure, mechanism and evolution. *Annu. Rev. Bioch.* 55:397-425.
- AZZARIA M., SCHURR E. & GROS P. (1989). Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance. *Mol. Cell Biol.* 9 : 5289-5297.
- BECK W.T., MUELLER T.J. & TANZER L.R. (1979). Altered surface membrane glycoproteins in *Vinca* alkaloid-resistant human leukemic lymphoblasts. *Cancer Res.* 39 : 2070-2076.
- BIEDLER J.M. & RIEHM H. (1970). Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells *in vitro* : cross-resistance, radioautographic and cytogenetic studies. *Cancer Res.* 30 : 1174-1184.

BUCANA C.D., GIAVAZZI R., NAYAR R., O'BRIAN C., SEID C., EARNEST L.E. & FAN D. (1990). Retention of vital dyes correlates inversely with the multidrug-resistant phenotype of adriamycin-selected murine fibrosarcoma variants. *Exp. Cell Res.* 190 : 69-75.

CANO-GAUCI D.F. & RIORDAN J.R. (1987). Action of calcium antagonists on multidrug resistant cells : Specific cytotoxicity independent of increased cancer drug accumulation. *Biochem. Pharmacol.* 36 : 2115-2123.

CHAN K.M., DAVIES P.L., CHILDS S., VEINOT L. & LING V. (1990). P-glycoprotein genes in the winter flounder, *Pleuronectes americanus* : isolation of two types of genomic clones carrying 3' terminal exons. *Biochim. Biophys. Acta.* 1171 : 65-72.

CHEN C.J., CHIN J.E., UEDA K., CLARK D.P., PASTAN I., GOTTESMAN M.M. & RONINSON I.B. (1986). Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr 1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell.* 47 : 381-389.

CORDON-CARDO C., O'BRIEN J.P., BOCCIA J., CASALS D., BERTINO J.R. & MELAMED M.R. (1990). Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 38 : 1277-1287.

CORNWALL R., TOOMEY B.H., BARD S., BACON C., JARMAN W.M. & EPEL D. (1994). Characterization of multixenobiotic/multidrug transport in the gills of the mussel *Mytilus californianus* and identification of environmental substrates. *Aquatic Tox.* Sous presse.

COWAN K.H., BATIST G., TULPUL A., SINHA B.K. & MEYERS C.E. (1986). Similar biochemical changes associated with multidrug resistance in human breast cancer cells and carcinogen-induced resistance to xenobiotics in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83 : 9328-9332.

DESCOTEAUX S., AYALA P., OROZCO E. & SAMUELSON J. (1992). Primary sequences of two P-glycoprotein genes of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54 : 201-211.

DORANGE G; LE MAREC F., DUBOR F., CHESNE C., SINQUIN G., MERHIC A. & GUILLOUZO A. (1994). Résumé n°144. 40th meeting of the european tissus culture society. Rennes.

DRENOU B., FARDEL O., AMIOT L. & FAUCHET R. (1993). Detection of P-glycoprotein activity on normal and leukemic CD34+ cells. *Leuk. Res.* 17 : 622-628.

DUDLER R. & HERTIG C. (1992). Structure of an *mdr*-like gene from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 267 : 5882-5888.

EFFERTH T. & VOLM M. (1988). Rapid detection assays for multidrug resistance. *Drug. Res.* 38 : 1771-1774.

ENDICOTT J.A. & LING V. (1989). The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *A. Rev. Biochem.* 58 : 137-171.

FARDEL O., LOYER P., MOREL F., RATANASAVANH D. & GUILLOUZO A. (1992) Modulation of multidrug resistance gene expression in rat hepatocytes maintained under various culture conditions. *Biochem. Pharmacol.* 44 : 2259-2262.

FELMLEE T., PELLETT S. & WELCH R.A. (1985). Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin. *J. Bacteriol.* 163 : 94-105.

FERGUSON L.R. & BAGULEY B. (1993). Multidrug resistance and mutagenesis. *Mutation Res.* 285 : 79-90.

FOJO A., AKIYAMA S.I., GOTTESMAN M.M. & PASTAN I. (1985). Reduced drug accumulation in multiple drug-resistant human kB carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 45 : 3002-3007.

FOOTE S.J., THOMPSON J.K., COWMAN A.F. & KEMP D.J. (1989) Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P. falciparum*. *Cell.* 57 : 921-930.

GALGANI F., CORNWALL R., TOOMEY B.H. & EPEL D. (1994b). Interaction of environmental xenobiotics with a multixenobiotic defense mechanism in the bay mussel *M. galloprovincialis* from the coast of California. *Soumis.*

GALGANI F., VINCENT F. & MINIER C. (1994a). Direct PCR from live algae. *J Mar. Biotech.* Sous presse.

GEUENS E.E., VAN BOCKSTAELE D.R., VAN DER KEUR M., TANKE H.J., VAN OOSTEROM A.T. & DE BRUIJN E.A. (1991). Flow cytometric double labeling technique for screening of multidrug resistance. *Cytometry.* 12 : 636-644.

GLASER P., SAKAMOTO H., BELLALOU J., ULLMANN A. & DANCHIN A. (1988). Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 7 : 3997-4004.

GOTTESMAN M.M. & PASTAN I. (1988). Resistance to multiple chemotherapeutic agents in human cancer cells. *Trends Pharmacol. Sci.* 9 : 54-58.

GOTTESMAN M.M. & PASTAN I. (1993). Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 62 : 385-427.

GROS P., BEN NERIAH Y., CROOP J.M. & HOUSMAN D.E. (1986). Isolation and expression of a cDNA (*mdr*) that confers multidrug resistance. *Nature (London).* 323 : 728-731.

GROS P., CROOP J. & HOUSMAN D. (1986). Mammalian multidrug resistance gene : complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell.* 47 : 371-380.

GUGUEN C., GUILLOUZO A., BOISNARD M., LE CAM A. & BOUREL M. (1975). Etude ultrastructurale de monocouches d'épithocytes de rat adulte cultivés en présence d'hémisuccinate d'hydrocortisone. *Biol. Gastroenterol.* 8 : 223-231.

GUILD B.C., MULLIGAN R.C., GROS P. & HOUSMAN D.E. (1988). Retroviral transfer of a murine cDNA for multidrug resistance confers pleiotropic drug resistance to cells without prior drug selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85 : 1595-1599.

HAMADA H. & TSURUO T. (1988). Purification of the P-glycoprotein associated with multidrug resistance : P-glycoprotein is an ATPase. *J. Biol. Chem.* 263 : 1454-1458.

HIGGINS C.F., HILES I.D., SALMOND G.P.C., GILL D.R., DOWNIE J.A., EVANS I.J., HOLLAND I.B., GRAY L., BUCKELS.D., BELL A.W. & HERMODSON M.A. (1986). A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature (London)* 323 : 448-450.

HIGGINS C.F., HYDE S.C., MIMMACK M.M., GILEADI U., GILL D.R. & GALLAGHER M.P. (1990). Binding protein-dependant transport systems. *J. Bioenerg. Biomembr.* 22 : 571-592.

HORIO M., GOTTESMAN M.M. & PASTAN I. (1988). ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88 : 3580-3584.

JULIANO R.L. & LING V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochem. Biophys. Acta,* 455 : 152-162.

KARTNER N., RIORDAN J.R. & LING V. (1983). Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug-resistance in mammalian cell lines. *Sciences.* 221 : 1285-1288.

KESSEL D. (1989). Exploring multidrug resistance using rhodamine 123. *Cancer Com.* 1 : 145-149.

KESSEL D., BOTTERILL V. & WODINSKY I. (1968). Uptake and retention of daunomycin by mouse leukemic cells as factors in drug response. *Cancer Res.* 28 : 938-941.

KURELEC B. & PIVCEVIC B. (1989). Distinct glutathione-dependent enzyme activities and a verapamil-sensitive binding of xenobiotics in a fresh-water mussel. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 164 : 934-940.

KURELEC B. & PIVCEVIC B. (1991). Evidence for a multixenobiotic resistance mechanism in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Tox.* 19 : 291-302.

KURELEC B. (1992). The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Crit. Rev. Toxicol.* 19 : 291-302.

KURELEC B. (1994a). Determination of pollutants with multixenobiotic resistance inhibiting properties. *Mar. Env. Res.* Sous presse.

KURELEC B., KRCA S., PIVCEVIC B., UGARKOVIC D., BACHMANN M., IMSIECKE G. & MÜLLER W. E. G. (1992). Expression of P-glycoprotein gene in marine sponges. Identification and characterization of the 125 KDa drug-binding glycoprotein. *Carcinogenesis* 13 : 69-76.

- KURELEC B. (1994b). Reversion of multixenobiotic resistance mechanism in gills of a marine mussel *Mytilus galloprovincialis* by bodel- and environmental-inhibitors of P170-glycoprotein. *Environ. Res.* Sous presse.
- KURELEC B., LUCIC D., PIVCEVIC B. & KRCA S. (1994a). Induction and reversion of multixenobiotic resistance in a marine snail *Monodonta turbinata*. *Mar. Biol.* Sous presse.
- LAUTIER D., LAHMY S., CANITROT Y., VIGO J., VIALLET P. & SALMON J.M. (1993). Detection of human leukemia cells with multidrug-resistance phenotype using multilabeling with fluorescent dyes. *Anticancer Res.* 13 : 1557-1563.
- LINCKE C.R., THE I., VAN GROENINGEN M. & BORST P. (1992). The P-glycoprotein gene family of *Caenorhabditis elegans*. Cloning and characterization of genomic and complementary DNA sequences. *J. Mol. Biol.* 228 : 701-711.
- MC GRATH J.P. & VARSHAVSKY A. (1989). The yeast STE6 gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. *Nature* (London) 340 : 400-404.
- MORGAN S.A., WATSON J.V., TWENTYMAN P.R. & SMITH P.J. (1989). Flow cytometry analysis of hoechst 33342 uptake as an indicator multi-drug resistance in human lung cancer. *Br. J. Cancer.* 60 : 282-287.
- NEYFAKH A.A. (1988). Use of fluorescent dyes as molecular probes for the study of multidrug resistance. *Exp. Cell Res.* 174 : 168-176.
- NG W.F., SARANGI F., ZASTAWNY R.L., VEINOT-DREBOT L. & LING V. (1989). Identification of members of the P-glycoprotein multigene family. *Mol. Cell. Biol.* 9 : 1224-1232.
- NISHI K., YOSHIDA M., NISHIKAWA M., NISHIYAMA M., HORINOUSHI S. & BEPPU T. (1992). A leptomycin B resistance gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a protein similar to the mammalian P-glycoproteins. *Mol. Microbiol.* 6 : 761-769.
- OUELLETTE M. & BORST P. (1991). Drug resistance and P-glycoprotein gene amplification in the protozoan parasite *Leishmania*. *Res. Microbiol.* 142 : 737-746.
- OUELLETTE M., FASE-FOWLER F. & BORST P. (1990). The amplified H circle of methotrexate-resistant *Leishmania tarentolae* contains a novel P-glycoprotein gene. *EMBO J.* 9 : 1027-1033.
- PROVASOLI L., Mc LAUGHLIN J.J.A. & DROOP M.R. (1957). The development of artificial media for marine algae. *Arch. Microbiol.* 25 : 392-428.
- RAYMOND M. ROSE E., HOUSMAN D.E. & GROS P. (1989). Physical mapping, amplification, and overexpression of the mouse *mdr* gene family in multidrug-resistant cells. *Mol. Cell. Biol.* 10 : 1642-1651.
- ROGAN A.M., HAMILTON T.C., YOUNG R.C., KLECKER R.W. & OZOLS R.F. (1984). Reversal of adriamycin resistance by verapamil in human ovarian cancer. *Sciences.* 224 : 994-996.

RONINSON I.B., CHIN J.E., CHOI K., GROS P., HOUSMAN D.E., FOJO A., SHEN D., GOTTESMAN M.M. & PASTAN I. (1986). Isolation of human *mdr* DNA sequences amplified in multi-drug resistant KB carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83 : 4538-4542.

SCHUURHUIS G.J., BROXTERMAN H.J., DE LANGE J.H., PINEDO H.M. & BAAK J.P. (1991). Early multidrug resistance, defined by changes in intracellular doxorubicin distribution, independent of P-glycoprotein. *Br. J. Cancer.* 64 : 857-861.

SLAPAK C.A., LECERF J.M., DANIEL J.C. & LEVY S.B. (1992). Energy-dependant accumulation of daunorubicin into subcellular compartments of human leukemia cells and cytoplasts. *J. Biol. Chem.* 267 : 10638-10644.

SUGAWARA I., KATAOKA I., MORISHITA Y., HAMADA H., TSURUO T., ITOYAMA S. & MORI S. (1988). Tissue distribution of P-glycoprotein encoded by a multidrug-resistant gene as revealed by a monoclonal antibody, MRK 16. *Cancer Res.* 48 : 1926-1929.

THIEBAUT F., TSURUO T., HAMADA H., GOTTESMAN M.M., PASTAN I. & WILLINGHAM M.C. (1987). Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84 : 7735-7738.

TOOMEY B.H. & EPEL D. (1993). Multidrug resistance in *Urechis caupo* embryos: Protection from environmental toxins. *Biological Bull.* 185 : 355-364.

TRONCZYNSKI J. (1994). Contamination des zones estuariennes et côtières en France par les herbicides. Dans Environnement littoral. *Equinoxe.* 47/48 : 30-33.

TSURUO T., IIDA H., TSUKAGOSHI S. & SAKURAI Y. (1982). Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res.* 42 : 4730-4733.

UEDA K., CARDARELLI C., GOTTESMAN M.M. & PASTAN I. (1987). Expression of a full-length cDNA for the human *mdr1* gene confers resistance to colchicine, doxorubicin and vinblastine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84 : 3004-3008.

WALNE P.R. (1966). Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis* L. *Fishery Invest.* 25 : 1-53.

WEAVER J.L., PINE P.S., ASZALOS A., SCHOENLEIN P.V., CURRIER S.V., PADMANABHAN R. & GOTTESMAN I B. (1991). Laser scanning and confocal microscopy of daunorubicin, doxorubicin and rhodamine 123 in multidrug-resistant cells. *Exp. Cell Res.* 196 : 323-329.

WILSON G.M., SERRANO A.E., WASLEY A., BOGENSCHUTZ M.P., SHANKAR A.H. & WIRTH D.F. (1989). Amplification of a gene related to mammalian *mdr* genes in drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Science.* 244 : 1184-1186.

WILSON K.L. & HERSKOWITZ I. (1984). Negative regulation of STE6 gene expression by the alpha 2 product of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molec. Cell Biol.* 4 : 2420-2427.

WU C.T., BUDDING M., GRIFFIN M.S. & CROOP J.M. (1991). Isolation and characterisation of *Drosophila* multidrug resistance gene homologs. *Molec. Cell Biol.* 11 : 3940-3948.

YOSHIMURA A., SHUDO N., IKEDA S.I., ICHIKAWA M., SUMISAWA T. & AKIYAMA S.I. (1990). Novel screening method for agents that overcome classical multidrug resistance in a human cell line. *Cancer. Letters.* 50 : 45-51.