## **Université Lille I**

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

### <u>THÈSE</u>

Pour l'obtention du grade de

#### DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I

*Ecole Doctorale : Ecotoxicologie Ecole Doctorale : Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement* 

# Développement de biomarqueurs d'exposition des métaux sur les fonctions physiologiques de l'Annélide Oligochète *Eisenia fetida*

Présentée et soutenue publiquement par

#### **Franck Brulle**

Le 14 novembre 2008

Devant le jury composé de :

Pr. Alain Leprêtre, Université Sciences et Technologies de Lille	Président du jury
Pr. François Leboulenger, Université du Havre	Rapporteur
Dr. Andrew John Morgan, Cardiff University, Pays de Galles	Rapporteur
Dr. Cécile Grand, ingénieur ADEME	Examinatrice
Pr. Paule Vasseur, Université de Metz	Examinatrice
Pr. Franck Vandenbulcke, Université Sciences et Technologies de Lille	Directeur de thèse

## **AVANT PROPOS**

C'est avec un très grand enthousiasme que je tiens à remercier toutes les personnes qui ont pris part d'une manière ou d'une autre au bon déroulement de cette thèse.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux personnes qui m'ont permis de bénéficier d'un financement ADEME/Région Nord/Pas-de-Calais pour réaliser cette thèse et plus particulièrement Mme Cécile Grand, ingénieur ADEME.

Je tiens à remercier en tout premier lieu Mr le Pr Franck Vandenbulcke qui a dirigé cette thèse dans la continuité de mon stage de Master 2. Je le remercie pour ses conseils et pour sa grande disponibilité, mais aussi pour avoir cru en moi et pour m'avoir soutenu tout au long de ces trois années. Ce fut un très grand plaisir de partager ces trois années avec vous.

Je tiens à remercier Mr le Pr Alain Leprêtre, directeur du laboratoire Ecologie Numérique et Ecotoxicologie qui m'a accueilli dans son laboratoire dans un cadre propice pour mener à bien ce travail.

Mes remerciements vont également vers le Dr Claude Cocquerelle, grâce à qui j'ai beaucoup appris en biologie moléculaire, pour ses nombreux conseils, ses remarques toujours pertinentes et son soutien.

Mes remerciements s'adressent également à Mr le Pr François Leboulenger et Mme le Pr Paule Vasseur qui me font l'honneur de juger ce travail.

I would like to thank Dr Andrew John Morgan who accepted to review this work.

Je voudrais également remercier les membres du jury du comité de suivi de thèse : Mr le Dr Françis Douay, directeur du laboratoire Sols et environnement de l'Institut Supérieure Agronomique, et Mme le Pr Chantal Van Haluwyn du laboratoire de botanique et de mycologie de L'université de Lille 2, pour leurs discussions, leurs conseils et leur intérêt pour ce travail de thèse.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent également à l'équipe du Laboratoire de Parasitologie Fonctionnelle et Évolutive de Perpignan pour leur accueil durant mes différents séjours « qPCR » et pour leur aide dans le séquençage des séquences de la banque soustractive. Merci beaucoup à tous et plus particulièrement à Mr le Pr Guillaume Mitta pour sa disponibilité, ses nombreux conseils, son aide et sa patience.

Mes remerciements vont également vers le Dr Vincent Castric, le Dr Pierre Saumitou-Laprade et Mlle Adeline Courseaux du laboratoire de Génétique et Evolution des Populations Végétales de Lille1, pour leur aide et leur disponibilité lors de la réalisation de la banque soustractive et pour l'utilisation du Lightcycler 480.

Je tiens à remercier vivement Mlle Régine Leroux, adjointe technique au laboratoire d'Ecologie numérique et d'Ecotoxicologie, pour son aide, ses conseils, sa disponibilité et sa bonne humeur. Un grand merci à toi Régine.

Mes remerciements les plus sincères et chaleureux aux membres du laboratoire d'Ecologie Numérique et Ecotoxicologie pour leur soutien, le Dr Sylvain Demuynck, le Dr Fabien Grumiaux, le Dr Patrick Delplace, le Dr Sébastien Lemière et le Dr Claude Cocquerelle pour leur soutien. Je remercie plus particulièrement Sébastien et Claude pour leur travail de relecture et leurs conseils lors de la réalisation de ce manuscrit.

Je voudrais également remercier les étudiants qui ont pris part de près ou de loin aux différents travaux réalisés pendant cette thèse tout au long de ces trois années. Ainsi, je remercie plus particulièrement, les quatre stagiaires IUT, Anne-lise, Cindy, Vanessa et Mathieu mais également Fabien Bernard, stagiaire M1 puis M2, pour son aide.

Enfin, c'est pour moi un très grand plaisir de pouvoir dédier ce travail à mes proches, mes parents (Joëlle et Albert) et Valérie pour leur soutien tout au long de mes études dont ce mémoire est l'aboutissement. Merci.

## SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	6
INTRODUCTION	8
PREMIERE PARTIE	15
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	16
I. Contexte bibliographique élargi	17
I. 1. Identification et caractérisation de gènes induits ''spécifiquement'' par les	éléments
traces métalliques	
I. 1. 1. Cas des métallothionéines de type II	
I. 1. 2. Identification de gènes (autres que ceux codant les métallothionéines) inc	luits
spécifiquement par les éléments traces métalliques	
I. 1. 2. 1. Chez Caenorhabditis elegans	
I. 1. 2. 2. Chez Lumbricus rubellus	19
I. 1. 2. 3. Chez Eisenia fetida	
I. 1. 2. 4. Chez Enchytraeus buchholzi	
I. 2. Identification de gènes répondant à d'autres contaminants	
I. 2. 1. Chez Caenorhabditis elegans	
I. 2. 2. Chez Eisenia fetida	
I. 3. Analyse des profils d'expression chez des invertébrés terrestres	
I. 3. 1. Chez Caenorhabditis elegans	
I. 3. 2. Chez Lumbricus rubellus	
I. 3. 2. 1. Exposition au cadmium	
I. 3. 2. 2. Exposition au fluoranthène	
I. 3. 2. 3. Exposition à l'atrazine	
I. 3. 2. 4. Exposition au cuivre	
I. 3. 2. 5. Identification d'une réponse transcriptionnelle commune à 3 exposit	ions 26
I. 3. 3. Chez Eisenia fetida	
I. 4. Conclusion	
II. Présentation des effecteurs sélectionnés	
II. 1. Protéines de choc thermique	
II. 2. Protéines impliquées dans les systèmes antioxydants	
II. 3. Protéines de signalisation cellulaire	

II. 4. La Pyruvate Carboxylase
II. 5. La Translationally controlled tumour protein
II. 6. Effecteurs immunitaires
II. 6. 1. La Cyclophiline-A
II. 6. 2. La Lysénine
II. 6. 3. La Coactosin-Like protein
II. 7. Protéines impliquées dans la séquestration des métaux
II. 7. 1. La métallothionéine de type II 40
II. 7. 2. La phytochélatine synthase 40
III. Modèle d'étude : l'Annélide Oligochète Eisenia fetida (Savigny 1826) 42
SECONDE PARTIE : RESULTATS
CHAPITRE I : Clonage et analyse du niveau d'expression de 16 candidats
biomarqueurs chez Eisenia fetida lors d'expositions in vivo à des éléments traces
métalliques
Publication 1: Cloning and real-time PCR testing of 14 potential biomarkers in Eisenia
fetida following cadmium exposure
Publication 2: The strong induction of metallothionein gene following cadmium
exposure transiently affects the expression of many genes in Eisenia fetida: A trade off
mechanism?
Publication 3: cDNA cloning and expression analysis of Eisenia fetida (Annelida:
Oligochaeta) phytochelatin synthase under cadmium exposure
CHAPITRE II°: Identification et étude du profil d'expression de nouveaux gènes induits
par les éléments traces métalliques dans les cellules circulantes de l'Annélide Eisenia
<i>fetida</i>
Publication 4: Identification and expression profile of gene transcripts differentially
expressed during metallic exposure in <i>Eisenia fetida</i> cœlomocytes
CONCLUSIONS – PERSPECTIVES
LISTE DES PUBLICATIONS
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>
ANNEXES

LISTE DES ABREVIATIONS

AA	Acide Aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ATP	Adénosine Triphosphate
β-ark	β-adrénergique récepteur kinase
Cd	Cadmium
CDR	Cadmium-responsive gene
CLP	Coactosin-Like Protein
Cu	Cuivre
DDRT-PCR	Differential Display Reverse Transcription PCR
EST	Expressed Sequence Tag
ETM	Elément Trace Métallique
HAP	Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
GO	Gene Ontology
GST	Glutathion-S-Transférase
HSP	Heat Shock Protein (Protéine de choc thermique)
MP	Métalloprotéine
MT	Métallothionéine
PC	Phytochelatine
PCS	Phytochelatine synthase
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pb	Plomb
qPCR	PCR quantitative
RACE-PCR	Rapid Amplification of cDNA Ends-PCR
RDX	Cyclotrimethylenetrinitramine
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-PCR	Reverse Transcription-PCR
SCBP	Sarcoplasmic Calcium Binding Protein
SOD	Superoxyde Dismutase
SSH	Suppression Subtractive Hybridization
ТСТР	Translationally controlled tumour protein
TNT	Trinitrotoluène
Zn	Zinc

# **INTRODUCTION**

#### Introduction

Les éléments chimiques indispensables à la vie sont très peu nombreux comparés au nombre d'éléments stables que l'on trouve dans la classification de Mendeleev. En effet, un grand nombre d'éléments présents sur Terre n'ont pas ou peu d'intérêts dans la chimie du vivant. Certains éléments non biologiques constituent une menace pour les organismes vivants du fait de leurs interactions permanentes avec les fonctions cellulaires essentielles. Parmi tous ces éléments on trouve les éléments traces métalliques (ETMs). Ces ETMs et en particulier le cadmium (Cd) et le plomb (Pb) sont d'intérêt majeur puisque leurs propriétés leur confèrent une grande gamme d'usages technologiques qui favorisent ou augmentent l'exposition professionnelle et environnementale humaine. De plus, ces éléments ont un large éventail d'effets délétères avec par exemple des effets toxiques pour le système nerveux ou des effets génotoxiques (Palus *et al.*, 2003; Florea & Büsselberg, 2006).

Pendant plus d'un siècle, la région Nord/Pas-de-Calais a été le siège d'une activité métallurgique intense. La région de Noyelles-Godault en est le parfait exemple (Figure 1). En effet, la fonderie de zinc située à Auby (Zn), Umicore, est l'une des plus grande usine d'Europe. Créée en 1869, elle produit aujourd'hui encore environ 220 000 tonnes de Zn par an. Jusque 1975, cette fonderie utilisait un procédé de fabrication pyrométallurgique qui générait d'importantes quantités de poussières, contribuant à la contamination de l'environnement. Après 1975, ce procédé fut remplacé par un procédé électrolytique beaucoup moins polluant, qui a considérablement réduit les émissions atmosphériques. Localisée à moins de 4 km d'Umicore, la fonderie de Metaleurop Nord de Noyelles-Godault était la seule usine productrice de plomb primaire en France et l'une des plus grandes d'Europe. Cette usine a arrêté son activité en 2003 pour des raisons économiques, mais pendant plus d'un siècle, elle aura entraîné le rejet dans l'atmosphère de grandes quantités de poussières métalliques du fait de l'utilisation du procédé pyrométallurgique. Les activités métallurgiques de ces 2 usines ont entraîné l'émission de poussières métalliques qui ont affecté une aire d'environ 120 km<sup>2</sup> où plus de 55 000 personnes résident (Douay et al., 2008). Les sols de cette région ont accumulé de grandes quantités d'ETMs dans leurs couches supérieures. En effet, les concentrations relevées sont souvent nettement supérieures aux normes en vigueur (Annexe 1). Ainsi, Frangi et Richard (1997) ont révélé que les couches supérieures des sols agricoles situés à proximité d'Umicore et Metaleurop présentaient des niveaux de contamination pouvant atteindre 1132 mg/kg de Pb, 21 mg/kg de Cd et 2167 mg/kg de Zn. Une étude récente a montré que les concentrations en Cd et en Pb des sols agricoles sont respectivement 20 et 15 fois supérieures à celles des sols agricoles de référence.

#### Introduction

Il en est de même pour les sols urbains qui présentent des concentrations en Cd et en Pb respectivement 16 et 10 fois plus importantes que des sols provenant de jardins de référence (Pruvost *et al.*, 2006). Bien que la majeure partie de la contamination de ces sols soit située au niveau des couches superficielles, ces métaux ont été retrouvés en traces dans certains cas jusqu'à 2 mètres de profondeur (Sterckeman *et al.*, 2000). Cette pollution métallique peut induire une contamination des eaux souterraines et de la chaîne alimentaire et entraîner un transfert des métaux au travers des différents niveaux trophiques avec à terme des effets néfastes pour la santé humaine. Des cas de cancer en rapport avec les fortes concentrations de Cd ont été rapportés (Nawrot *et al.*, 2006) ainsi que des cas de saturnisme chez certains enfants en relation avec les fortes concentrations en Pb (Declercq & Beaubois, 2000).



Figure 1 : Localisation et situation des 2 usines métallurgiques : Metaleurop nord et Umicore

#### Introduction

Une étude épidémiologique a été menée en 2000 sur plus de 400 enfants de 8 à 11 ans. Parmi ces 400 enfants, 200 vivaient dans des villes situées à proximité des usines d'Umicore et Metaleurop Nord et 200 vivaient loin de toutes sources d'ETMs. Ce travail a révélé que les enfants vivant à moins de 4 km des usines présentaient une charge métallique dans le corps et une concentration en Cd dans le sang significativement supérieure aux enfants vivant à plus de 4 km de ces usines (Leroyer *et al.*, 2000). De plus, Leroyer *et al.* (2001) ont démontré que la plombémie des enfants vivant à moins de 3 km des usines était significativement supérieure à celle des autres enfants, montrant que la contamination industrielle était un facteur pouvant expliquer ce taux anormalement élevé.

La présence d'une quantité importante d'ETMs peut aussi générer un stress environnemental susceptible d'affecter les organismes exposés aux sols pollués. De fortes teneurs en métaux sont susceptibles d'affecter les communautés microbiennes du sol en provoquant une diminution de la taille des populations (Müller *et al.*, 2001) ou une réduction de la diversité bactérienne des sols (Moffett *et al.*, 2003). Ces effets ont pour conséquences visibles, une réduction de la minéralisation qui entraîne une accumulation de la litière et une forte teneur en matière organique observable sur certains sites très pollués (Cotrufo *et al.*, 1995). La santé du sol et le maintien de sa productivité dépendent des organismes vivants qui le peuplent et qui affectent le recyclage et la biodisponibilité des composés organiques et non organiques majeurs dans leur recherche constante de nourriture et de source d'énergie (Doran & Safley, 1997). De nombreuses études chez des plantes et des animaux vivant en contact étroit avec des sols contaminés ont permis de mieux comprendre les changements physiologiques, les mécanismes d'acclimatation (adaptation physiologique) et les mécanismes de détoxication des métaux (Stone *et al.*, 2001; Morgan *et al.*, 2007).

Chez les plantes, l'exposition métallique peut entraîner une diminution sensible du taux de croissance de certains arbres (Dickinson *et al.*, 1992), ou une augmentation de l'hydrolyse de la chlorophylle due aux effets toxiques de l'accumulation de métaux dans les tissus, ce qui affecte la photosynthèse (Manios *et al.*, 2003).

Les populations animales, et en particulier les populations de macroinvertébrés, sont elles aussi fortement affectées. Par exemple, chez les collemboles (Insecte ; Collembole), une exposition métallique peut conduire à une altération des communautés (Pawert *et al.*, 1996) ; chez les coléoptères appartenant à la famille des carabidae, on observe un développement larvaire ralenti, une surmortalité des larves (Mozdzer *et al.*, 2003), une fécondité moindre (Lagisz *et al.*, 2002) et une sensibilité aux stress additionnels (Stone *et al.*, 2001). Chez les vers de terre qui sont parmi les organismes dont la sensibilité aux métaux lourds est la plus

exacerbée, il a été observé, par exemple, une diminution de la densité de population (Pizl & Josen, 1995) et des changements dans la structure des communautés (Lukkari *et al.*, 2004a).

Selon Weeks (1995), un « biomarqueur » est une réponse biologique à un produit chimique (pesticides, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), ETMs,...) qui induit un stress et peut donner une estimation de l'exposition ou une mesure des effets toxiques potentiels. Le biomarqueur peut aussi être défini comme tout changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cytologique, physiologique, biologique ou comportemental qui révèle l'exposition présente ou passée d'un organisme à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic et al., 1997). Les biomarqueurs développés à ce jour sont pour l'essentiel des marqueurs précoces d'exposition ou d'effet des contaminants mais ne révèlent pas forcément les effets potentiels à long terme sur l'écosystème. Le développement de biomarqueurs permettant un diagnostic précoce des perturbations à long terme d'un écosystème représente un défi pour les écotoxicologues. Ces biomarqueurs doivent concerner des fonctions physiologiques dont les perturbations agissent sur les paramètres démoécologiques. L'émergence des techniques de biologie moléculaire appliquées à l'écotoxicologie a permis de mieux appréhender les mécanismes d'action des contaminants sur les organismes vivants. En effet, les profils d'expression génique représentent le premier niveau d'intégration entre les « stress » environnementaux et le génome qui, à travers la synthèse de protéines, conduit la réponse des organismes aux changements externes. L'analyse des changements dans l'expression génique est donc un outil puissant, 1- pour diagnostiquer l'existence d'un stress dans une population et 2- pour analyser les mécanismes de réponse à un stress.

Un des groupes faunistiques les plus étudiés est celui des Annélides Oligochètes. Depuis les premiers travaux de Darwin (1883), les vers de terre (Embranchement des Annélides, sousclasse des Oligochètes) sont considérés comme les ingénieurs des écosystèmes du fait de leurs effets directs et indirects sur l'eau, les nutriments et le cycle du carbone dans les sols sous les climats tempérés et tropicaux. Ces animaux, qui représentent une part importante de la macrofaune du sol, jouent un rôle clé dans la plupart des écosystèmes continentaux et sont impliqués dans l'entretien de la structure et de la fertilité des sols. Les vers ont ainsi été adoptés par la communauté internationale pour le diagnostic des écosystèmes et pour l'étude de l'impact potentiel de contaminants, tels que les pesticides, les hydrocarbures et les métaux provenant de sources anthropiques (Spurgeon *et al.*, 2003a). La quantification de la toxicité des éléments chimiques pour les Annélides est couramment réalisée *via* la mesure des principaux traits de vie (survie, croissance et reproduction) dans les conditions contrôlées au laboratoire avec des organismes tests (*Eisenia fetida*, *Eisenia andrei* et *Lumbricus rubellus*). Ces organismes considérés comme prioritaires en écotoxicologie (Spurgeon *et al.*, 2003a) sont souvent fortement affectés par la pollution métallique. Par conséquent, l'exposition métallique de certains Annélides Oligochètes pourrait engendrer des modifications exploitables permettant de dresser un état des lieux et de mesurer les risques provoqués par la présence de métaux polluants dans le sol.

Ces dix dernières années, l'analyse des profils d'expression génique a permis l'identification de biomarqueurs candidats chez les Annélides Oligochètes. Le candidat le plus connu est la Cadmium-métallothionéine (Cd-MT), une protéine de faible poids moléculaire (6000-8000 Da), riche en cystéines (environ 30%), impliquée dans l'homéostasie des éléments traces essentiels tels que le Zn mais aussi la détoxication de métaux tels que le Cd (Palmiter, 1998; Klaassen *et al.*, 1999). La Cd-MT est considérée comme un bon biomarqueur d'exposition car elle montre une réponse dose- et temps-dépendante à certains contaminants métalliques. Ainsi, la quantité de protéines et le nombre de transcrits codant la Cd-MT augmentent lorsque les vers sont exposés à une contamination métallique et en particulier à une contamination au Cd (Gruber *et al.*, 2000; Stürzenbaum *et al.*, 2004; Demuynck *et al.*, 2007).

La présence de métaux constitue un stress majeur susceptible de perturber les grandes fonctions physiologiques des animaux (Labrot et al., 1996). Une stratégie alternative à la recherche de protéines fixatrices des métaux (Métallothionéines (MTs) et Métalloprotéines (MPs)) consiste en l'identification de biomarqueurs moléculaires impliqués dans de grandes fonctions biologiques, communs à plusieurs macroinvertébrés et dont l'expression est affectée par un stress métallique. Ainsi, il apparaît intéressant d'identifier et de constituer une batterie de biomarqueurs impliqués dans les grandes fonctions biologiques, révélant la nature et l'amplitude des stress (biomarqueurs qui seraient idéalement communs à plusieurs groupes d'invertébrés terrestres ou d'eau douce). Parmi les grandes fonctions physiologiques, l'immunité apparaît comme un candidat favorable à une telle étude (Tasiemski et al., 1994; Munoz et al., 2002). En effet, le système immunitaire est une fonction complexe qui intègre de nombreuses informations environnementales et interagit avec la fonction de nombreux organes. Schématiquement, chez les invertébrés, la réponse immunitaire est de type innée et met en œuvre des réponses non spécifiques : phagocytose, cascade de coagulation, choc oxydatif, induction de protéines (Mitta et al., 2000). De plus, il est rapporté dans la littérature qu'une pollution métallique rend des invertébrés d'élevage (moule, huître, crevette) beaucoup plus sensibles aux infections microbiennes et que les métaux affectent les processus de défense immunitaire (Fisher et al., 2003; Sauvé et al., 2003). Cette recherche permettrait

13

également d'aller plus avant dans la connaissance des mécanismes de défense, de détoxication et d'adaptation des organismes aux pollutions.

L'objectif du présent travail était de développer sur les Oligochètes et plus particulièrement chez le modèle de laboratoire *Eisenia fetida*, un ensemble de biomarqueurs aspécifiques – biomarqueurs sensibles aux métaux mais aussi à d'autres contaminants – qui apporteraient une image multi-variable (correspondant à plusieurs grandes fonctions physiologiques) du stress existant chez les invertébrés.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une revue bibliographique des connaissances acquises sur les gènes répondant de manière spécifique à un contaminant donné (ETMs, hydrocarbures, pesticides,...) *via* l'utilisation de méthodes moléculaires permettant l'étude de ces gènes (1) individuellement ou (2) plus largement lors d'études transcriptomiques s'intéressant aux changements pouvant survenir au niveau des profils d'expression génique.

La seconde partie concerne la présentation de nos résultats (sous la forme de publications) et font l'objet de 2 chapitres :

- Une première approche qualifiée de ciblée, correspond à l'étude du niveau d'expression de nombreux gènes, identifiés dans la littérature, chez divers macroinvertébrés. Ces gènes ont été retenus en raison des variations d'expression observées lors d'expositions à un contaminant d'origine métallique.

- Une deuxième approche qualifiée de globale, correspond à la construction de banques soustractives afin d'identifier de nouveaux gènes différentiellement exprimés lors d'expositions à un mélange complexe d'ETMs, représentatif d'une contamination que l'on peut retrouver sur le terrain.

14

# **PREMIERE PARTIE**

# ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

#### I. Contexte bibliographique élargi

Jusqu'à présent la compréhension des relations entre les changements induits par un contaminant au niveau moléculaire (*i.e.* expression d'ARN messagers) et les conséquences biologiques des altérations dues à ces contaminants n'a été établie que de manière très partielle. En effet, seul un petit nombre de gènes répondant spécifiquement à un contaminant donné a été identifié chez diverses espèces d'invertébrés. La plupart de ces gènes ont été testés individuellement du fait de leur implication dans les mécanismes de résistance aux effets délétères induits par la présence de contaminants.

Toutes les réponses à un stress externe, incluant les composés chimiques, impliquent des changements dans les profils d'expression génique. Quelques réponses sont le résultat de l'exposition à un composé chimique, d'autres sont compensatoires, c'est à dire qu'elles reflètent la réponse d'un organisme aux dommages moléculaires ou aux dysfonctionnements cellulaires, provoqués par la présence du composé chimique (Ankley et al., 2006). Depuis quelques années, les outils permettant l'analyse du transcriptome ont connu un très grand essor. Ainsi, la mise en œuvre de techniques de biologie moléculaire permettant l'identification des changements globaux survenant au niveau des profils d'expression en ARNm en réponse à diverses conditions expérimentales (Puce à ADN, Banque soustractive via la PCR Temps-Réel) s'est généralisée. Le terme "toxicogénomique" fut inventé pour décrire l'application de la génomique à la toxicologie (Nuwaysir et al., 1999). Les informations obtenues grâce à la génomique peuvent être utilisées pour réaliser des puces à ADN avec tout ou partie des gènes d'un organisme. Ces puces peuvent être ensuite utilisées pour déterminer quels gènes sont sur- ou sous-exprimés dans une cellule, un organe et/ou le tissu d'un organisme dans des conditions physiologiques données ou en réponse à une perturbation environnementale, telle que l'exposition à un composé chimique toxique. Ces approches transcriptomiques ont permis d'étudier l'expression de nombreux gènes et de mettre en évidence des voies physiologiques impliquées dans la réponse à un composé chimique non essentiel (Métaux, Hydrocarbures, pesticides...). La mise en évidence de voies physiologiques mises en œuvre pour répondre à un stress chez un organisme test, ainsi que l'identification des gènes associés à ces voies constituent des outils de choix pour identifier un panel de marqueurs d'exposition. Ainsi, l'objectif de cette analyse bibliographique est de faire une synthèse, chez les invertébrés vivant en contact étroit avec le sol : (1) de l'ensemble des gènes ayant été caractérisés au niveau moléculaire pour leur réponse spécifique à un élément chimique donné, (2) des études transcriptomiques portant sur la réponse d'invertébrés à différentes classes de composés chimiques non essentiels. Cette étude porte plus particulièrement sur les effets engendrés par 3 classes de contaminants : inorganiques (les éléments traces métalliques), organiques (les hydrocarbures polycycliques aromatiques) et phytosanitaires (Herbicides et Pesticides).

I. 1. Identification et caractérisation de gènes induits ''spécifiquement'' par les éléments traces métalliques

Parmi les éléments chimiques les plus étudiés chez les invertébrés vivant en contact étroit avec le sol, on trouve les éléments traces métalliques (ETMs). L'estimation de l'impact des ETMs chez les invertébrés terrestres, *via* l'utilisation de techniques de biologie moléculaire est une stratégie développée par plusieurs laboratoires. En effet, les ETMs sont susceptibles de moduler l'activité transcriptionnelle de nombreux gènes. Cependant, peu de gènes ont été identifiés pour leurs réponses spécifiques aux ETMs. L'un de ces gènes est la *Cd-métallothionéine* ou métallothionéine de type II.

#### I. 1. 1. Cas de la métallothionéine de type II

Les gènes codant les métallothionéines ont été identifiés chez la plupart des espèces d'invertébrés terrestres chez qui ils ont été étudiés. L'analyse de leurs niveaux expression lors d'expositions à divers ETMs a également été réalisée. L'expression du gène codant la métallothionéine de type II (Cd-MT) a fait l'objet de nombreux travaux. En effet, ce gène est caractérisé par une réponse dose- et temps-dépendante de son niveau d'expression dans plusieurs phyla. Ainsi, chez les nématodes avec *Caenorhabditis elegans* (Liao & Freedman, 1998), les collemboles avec *Orchesella cincta* (Insecte ; Collembole) (Timmermans *et al.*, 2005), les escargots avec *Helix pomatia* (Mollusque ; Gastéropode) (Chabicovsky *et al.*, 2003), et les Annélides Oligochètes avec notamment *Lumbricus rubellus* (Stürzenbaum *et al.*, 1998a; Galay-Burgos *et al.*, 2003), *Lumbricus terrestris* (Asensio *et al.*, 2007) et *Eisenia fetida* (Gruber *et al.*, 2000; Demuynck *et al.*, 2006; Demuynck *et al.*, 2007), le gène de la Cd-MT est aujourd'hui considéré comme un bon biomarqueur d'exposition aux ETMs et en particulier au Cd.

I. 1. 2. Identification de gènes (autres que ceux codant les métallothionéines) induits spécifiquement par les éléments traces métalliques

#### I. 1. 2. 1. Chez Caenorhabditis elegans

D'autres gènes induits par les ETMs ont été identifiés chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. Cet organisme est très fréquemment utilisé en écotoxicologie du fait de sa très large répartition dans l'habitat terrestre, sa facilité d'utilisation au laboratoire, sa sensibilité envers différents types de stress et parce qu'il s'agit d'un organisme modèle dont le génome a été entièrement séquencé.

Le cadmium-responsive gene ou gène *cdr* fut identifié par Liao et Freedman en 1998 par Differential Display Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (DDRT-PCR). Ce gène a fait l'objet d'une étude particulière montrant qu'il code une protéine membranaire des lysosomes située dans les cellules intestinales de C. elegans (Liao et al., 2002). Lors de cette étude, ces auteurs ont démontré que le gène *cdr-1* présentait une forte activité de transcription uniquement lors d'exposition au Cd, avec une quantité d'ARNm codant le CDR-1 5 fois supérieure après 15h d'exposition à 100 µM de Cd. Puis, la technique des ARN interférents a permis de démontrer que les individus chez qui l'expression du cdr-1 était inhibée présentaient une croissance réduite, ne se reproduisaient pas et avaient une durée de vie plus courte. Ces résultats montraient que la transcription du gène cdr-1 est requise chez C. elegans, pour développer des mécanismes de résistance vis à vis du Cd. Par ailleurs, la technique des ARN interférents a également permis de préciser le rôle de ce gène. En effet, l'observation d'une accumulation de fluide dans la cavité du corps des nématodes n'exprimant pas (ou peu) le gène cdr-1, lors d'une exposition au Cd, semble indiquer que ce gène est impliqué dans l'osmorégulation, peut-être par pompage du Cd ou d'autres ions dans les lysosomes. Par ailleurs, en 2005 Dong et al. ont démontré que ce gène faisait partie d'une famille de 7 gènes, similaires aux niveaux nucléotidique et protéique.

#### I. 1. 2. 2. Chez Lumbricus rubellus

L'Annélide Oligochète *Lumbricus rubellus* a également fait l'objet de travaux visant à identifier des gènes, autres que la *Cd-mt*, répondant de manière spécifique aux métaux. Deux gènes différentiellement exprimés chez des populations naturelles de *Lumbricus rubellus* exposées à une contamination d'origine métallique ont été identifiés.

Stürzenbaum *et al.* (1998b), ont caractérisé un gène codant une protéine identifiée pour la première fois dans une tumeur humaine (Gross *et al.*, 1989), la Translationally Controlled Tumour Protein ou TCTP. Dans ce travail, ces auteurs ont clairement montré que le gène codant la TCTP était induit par les métaux (par le Cd et plus particulièrement par le Cu) chez des Annélides vivant sur différents sols fortement contaminés par les ETMs.

Puis, Stürzenbaum *et al.* (1999) ont mis en évidence qu'un gène utilisé jusqu'alors comme gène de référence en biologie moléculaire, présentait 2 isoformes, dont l'une est inductible par les métaux chez *Lumbricus rubellus*. Ce gène code une cyclophiline (ou

peptidyl-prolyl cis-trans isomérase), une enzyme appartenant à la superfamille des immunophilines et impliquée entre autres dans la catalyse des protéines. Les auteurs ont distingué la *cyclophiline-A* (inductible) de la *cyclophiline-B* (non inductible), montrant que le gène de la cyclophiline-A était induit plus de 38 fois chez des individus exposés pendant 6 semaines à un sol provenant d'un site métallifère très fortement contaminé par les ETMs (Cd = 279 mg/kg ; Pb = 7080 mg/kg ; Zn = 35265 mg/kg ; Cu = 36.3 mg/kg). Les auteurs donnent 2 hypothèses pour expliquer cette induction :

- (1) Cette induction serait due à un taux exceptionnellement fort de Zn auquel les vers sont exposés par contact ou par ingestion durant les 6 semaines d'exposition. Ce gène pouvant être induit pour cibler les protéines perturbées par l'excès de Zn.
- (2) Ces vers montrent également une induction de protéines de détoxication en réponse à la présence de métaux lourds, ceci est confirmé par la forte induction du gène codant la Cd-MT dans cette étude (+ de 1284 fois). Ainsi, si la cyclophiline-A est impliquée dans des mécanismes de régulation de la transcription comme le suggèrent Krummrei *et al.* (1995), il est alors possible d'établir un lien de cause à effet entre les expressions de la *Cd-mt* et de la *cyclophiline-A*.

#### I. 1. 2. 3. Chez Eisenia fetida

En 2004, l'Annélide Oligochète *Eisenia fetida* a fait l'objet d'une étude montrant l'existence d'un gène différentiellement exprimé lors d'exposition à un sol provenant d'un site métallifère (Pb > 600 mg/kg et Zn > 1800 mg/kg) (Ricketts *et al.*, 2004). Ce gène code l'annétocine, une hormone neuropeptidique membre de la famille vasopressine/ocytocine impliquée dans l'osmorégulation et certains traits reproductifs (ovulation, oviposition, etc...) (Acher, 1993; Oumi *et al.*, 1996). Lors de cette étude, les auteurs ont déterminé par PCR quantitative que l'expression du gène codant l'annétocine était réprimée de l'ordre de 20 fois suite à 20 jours d'exposition au sol métallifère. Ce résultat est mis en relation par les auteurs, avec la diminution de production de cocons observée dans les mêmes conditions, suggérant un lien mécanistique entre l'expression du gène de l'annétocine, la reproduction des vers et l'impact potentiel de la pollution sur la population d'*E. fetida*.

#### I. 1. 2. 4. Chez Enchytraeus buchholzi

Willuhn *et al.* (1994) ont caractérisé une protéine de 25 kDa, riche en cystéines et contenant de l'histidine chez l'Annélide Oligochète *Enchytraeus buchholzi*. Ces auteurs, qui ont nommés cette protéine « Cystein Rich Protein » (CRP) ont montré que les vers accumulent des concentrations de cadmium très importantes associées à l'induction du gène

codant cette protéine. Une étude complémentaire (Willuhn et al., 1996), a montré que le niveau de transcription du gène crp est directement lié à la concentration de Cd. En effet, une concentration de 100 µg/l de Cd est suffisante pour induire une expression massive de ce gène après 2 heures d'exposition pour atteindre son maximum d'expression après seulement 6 heures. Ces résultats suggèrent que la CRP possède un rôle central dans le processus de détoxication du Cd chez Enchytraeus buchholzi. De plus, ces auteurs ont démontré que le gène crp est induit uniquement par le Cd et dans une moindre mesure par le Zn. En 2004, Schmitt-Wrede et al. ont séquencé la portion d'ADN génomique correspondant à ce gène. Ils ont démontré que celui-ci était d'une longueur approximative de 12 kbp, et consistait en 10 exons dont les exons 2 à 9 codent des régions de 31 acides aminés presque identiques. Chacun de ces domaines répétés contient 9 cystéines dont six sont disposées en motifs Cys-X-Cys et Cys-Cys, ce qui est primordial pour la liaison du Cd, comme pour les MTs (Kägi & Schäffer, 1988). Une très grande conservation de ces motifs cystéines lors de comparaisons avec les séquences protéiques de MTs appartenant à des lombricidés, et plus particulièrement avec celles de Lumbricus rubellus, a été observée. Ainsi, ces études comparatives avec les MTs, suggèrent que le gène crp peut être considéré comme un membre de la très grande famille des MTs et qu'il dériverait d'une duplication d'un exon appartenant à un gène ancestral de MT.

#### I. 2. Identification de gènes répondant à d'autres contaminants

#### I. 2. 1. Chez Caenorhabditis elegans

Peu d'études ont porté sur l'analyse de l'expression de gènes lors d'expositions à des contaminants autres que les ETMs. En 2001, Menzel *et al.* ont montré que certaines isoformes de la famille des cytochromes P450, étaient induites après 72 heures d'exposition du nématode *C. elegans* à différents composés chimiques. Cette famille de gènes a pour but de catalyser le métabolisme oxydatif de nombreux composés exogènes et endogènes, avec entre autres, une implication dans la biotransformation des drogues et toxiques organiques. Parmi les 18 éléments testés, un hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP), le fluoranthène (2,47  $\mu$ M) et un herbicide, l'atrazine (115,9  $\mu$ M) induisaient l'expression de gènes appartenant à cette famille. Ces résultats furent confortés en 2005, par la mise en évidence de l'induction de certaines isoformes de la famille des cytochromes P450 après 48 heures d'exposition, pour des concentrations plus réalistes de fluoranthène et d'atrazine respectivement de 1,23 et 23,2  $\mu$ M (Menzel *et al.*, 2005).

#### I. 2. 2. Chez Eisenia fetida

Une étude très récente portant sur l'analyse du niveau l'expression de deux gènes chez *Eisenia fetida*, lors d'expositions à divers HAPs a été réalisée. Dans cette étude, Zheng *et al.* (2008) ont étudié le niveau d'expression du gène de la TCTP et de l'annétocine car il a été démontré que les HAPs peuvent engendrer des effets cancérigènes et une toxicité pour la reproduction (Santodonato, 1997). Ainsi, des vers ont été soumis pendant 4 semaines à des concentrations sub-létales de phénanthrène, pyrène, fluoranthène et benzo(a)pyrène (de 0,1 à 10 mg/kg). Les résultats ont montré que le benzo(a)pyrène avait potentiellement plus d'effets que les autres HAPs, avec la mise en évidence d'inductions comprises entre 58 et 83 fois pour le gène codant l'annétocine et d'inductions comprises entre 14 et 106 fois pour le gène codant la TCTP.

#### I. 3. Analyse des profils d'expression chez des invertébrés terrestres

#### I. 3. 1. Chez Caenorhabditis elegans

Plusieurs organismes ont fait l'objet d'études transcriptomiques en réponse à une exposition à des composés chimiques non-essentiels. C'est plus particulièrement le cas du nématode Caenorhabditis elegans. Depuis que son génome est connu, un grand nombre d'études portant sur les relations fonctionnelles entre expression génique et réponses phénotypiques ont été réalisées. Plusieurs approches transcriptomiques, via l'utilisation de puces génomiques, ont permis d'étudier l'expression des gènes et de mettre en évidence les voies physiologiques impliquées dans la réponse à divers composés chimiques (Tableau 1). En 2005, Reichert et Menzel, ont étudié les variations d'expression génique survenant chez C. elegans, via l'utilisation d'une puce génomique, lors d'expositions à 5 composés chimiques différents. Parmi ces 5 composés, on retrouve le fluoranthène et l'atrazine. Des expositions de  $48 \pm 5$  heures au fluoranthène (2,47  $\mu$ M) et à l'atrazine (115,9  $\mu$ M) ont été réalisées. Les résultats de ces expositions ont montré que le fluoranthène et l'atrazine engendraient respectivement l'induction de l'expression de groupes de 79 et 52 gènes. Parmi les gènes identifiés dans ces 2 groupes on retrouve des gènes plus particulièrement impliqués (1) dans les voies de biotransformation des éléments chimiques (voies de détoxication de phase I et II, *e.g.* la superfamille des cytochromes P450 et la famille des glutathion-S-transférases (GST)); (2) dans la formation de la cuticule, via l'induction de gènes appartenant à la superfamille des gènes codant le collagène ; (3) dans les mécanismes de défense immunitaire via l'induction de gènes codant les lectines de type C.

Un second travail réalisé en 2007 par Cui et al. avait pour but d'identifier les changements globaux survenant au niveau des profils de transcription lors d'expositions courtes (4 et 24 heures) au Cd. En effet, dans les études précédentes, seul un petit nombre de gènes répondant spécifiquement au Cd ont été testés individuellement du fait de leurs implications dans des mécanismes de résistance aux effets délétères du Cd (cf I. 1. 1. et I. 1. 2. 1.) . Les expérimentations menées par ces auteurs ont permis de mettre en évidence un groupe de 290 gènes différentiellement exprimés (237 sur-exprimés et 53 sous-exprimés) à la fois après 4 et 24 heures d'exposition à 100 µM de Cd. Une analyse bioinformatique utilisant Gene Ontology (GO) (Ashburner et al., 2000) a révélé que la plupart des gènes sur-exprimés après 4 heures d'exposition étaient impliqués dans des voies physiologiques régulant l'homéostasie (localisation et transport) des espèces chimiques et plus particulièrement des ions métalliques. Les gènes impliqués dans ces voies sont par exemple, la mtl-2 et le cdr-1, confirmant par ailleurs leurs inductions spécifiques dans le cadre d'une exposition au Cd. En 2005, Novillo et al. ont rapporté la sur-expression des gènes cdr-1, mtl-2 et du collagène après 7 jours d'exposition au Cd . Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Cui et al. (2007), à l'exception de la mise en évidence de la sur-expression de quelques gènes impliqués dans l'activité ATPase et de gènes possédant un domaine Ubiquitine Transferase. Les différences observées peuvent être attribuées aux concentrations de Cd utilisées (0,1; 1 et 10 µM), au temps d'exposition plus long (7 jours) et aux méthodes d'analyses (utilisation d'une banque de données autre que GO pour l'annotation). Dans l'étude de Cui et al. d'autres voies sont associées aux gènes sous-exprimés après 24 heures d'exposition. C'est le cas de la voie du métabolisme des acides gras et de la voie du métabolisme des lipides cellulaires. Les gènes sur-exprimés après 24 heures représentent majoritairement les voies de la protéolyse. Enfin, les gènes sur-exprimés à la fois après 4 et 24 heures d'exposition ont majoritairement une activité catalytique et des activités de liaison à diverses espèces ioniques. Ces résultats suggèrent que la première réponse à une exposition au Cd est un ajustement transcriptionnel pour maintenir l'homéostasie des ions et réajuster le métabolisme énergétique. Puis, pour une exposition plus longue (24 heures), les gènes impliqués dans la protéolyse sont induits, suggérant une accumulation de protéines endommagées du fait de leur exposition prolongée au Cd. Enfin, les gènes impliqués dans le trafic cellulaire et le métabolisme des acides gras sont sous-exprimés après 24 heures d'exposition, suggérant que plusieurs fonctions cellulaires sont perturbées par la toxicité du Cd. Il est à remarquer que lors de cette étude, les 49 ADNc identifiés en DDRT-PCR comme variant lors d'une exposition au Cd (Liao & Freedman, 1998), ont été de nouveau identifiés par ces auteurs. De plus, plusieurs familles de gènes n'ayant pas fait l'objet d'une bonne caractérisation dans le cadre d'une exposition au Cd l'ont été. Parmi ceux-ci on retrouve des gènes codant les protéines de détoxication de phase I et II (sur-expression de 14 gènes appartenant à la famille des cytochromes P450 et de 6 gènes appartenant à la famille des GSTs) et des protéines pouvant être impliquées dans l'immunité innée (répression de 4 gènes lysosomaux et induction de 8 gènes appartenant la famille des lectines de type C). Cependant, la base de données GO n'est pas assez vaste pour prédire la fonction de tous les gènes répondant au Cd mis en évidence dans cette étude. En effet, sur les 290 gènes montrant une variation significative de leur niveau d'expression, seul 83 gènes (29%) sont liés à un processus biologique dans GO et 109 (38%) sont liés à une fonction moléculaire. Ainsi, la fonction d'un grand nombre de gènes dont l'expression varie fortement en réponse à une exposition au Cd demeure inconnue. L'étude de ces gènes pourrait permettre de mieux comprendre la réponse physiologique des organismes lors d'une exposition au Cd et d'identifier de nouveaux candidats biomarqueurs.

#### I. 3. 2. Chez Lumbricus rubellus

Récemment, l'Annélide Oligochète Lumbricus rubellus a fait l'objet de plusieurs études transcriptomiques. Contrairement à C. elegans, le génome de L. rubellus n'est pas encore connu mais 17 225 séquences ont été obtenues pour cette espèce lors de travaux antérieurs (Stürzenbaum et al., 2003). En 2008, Owen et al. ont utilisé ces séquences pour les annoter et faire la première puce à ADN chez Lumbricus rubellus. Ainsi, une analyse bioinformatique a permis l'identification de 8129 séquences uniques, chacune correspondant à un gène. Concrètement, pour chaque produit chimique les vers ont été maintenus dans des sols naturels contaminés artificiellement pendant une période relativement longue (28 jours) en comparaison avec les périodes préconisées pour des tests de toxicité aigüe (48h sur papier filtre et 14 jours dans le sol). Les auteurs ont délibérément choisi une période d'exposition longue pour mesurer la réponse transcriptomique observée à un niveau correspondant au plateau d'acclimatation physiologique, plutôt que dans une phase dynamique associée au stress initial. Puis, une puce à ADN contenant plus de 8100 éléments a été fabriquée, avec pour but d'identifier les profils de transcription spécifiques à trois classes de contaminants : inorganiques (le Cd), organiques (le fluoranthène) et phytosanitaire (l'atrazine). Plusieurs doses ont été utilisées : pour le Cd : 0, 13, 43, 148, 500 mg/kg ; pour le fluoranthène : 0, 13.8, 46, 158, 533 mg/kg; et pour l'atrazine: 0, 9.4, 20.7, 35, 59 mg/kg. Chaque type de contamination entraine l'apparition d'un profil d'expression caractéristique (Tableau I).

#### I. 3. 2. 1. Exposition au cadmium

Outre l'activation de voies de protection et de détoxication (voie des métallothionéines), le Cd est connu pour ses effets cancérigènes pour l'homme (IARC, 1993). Il induit également des dommages oxydatifs, module la réparation de l'ADN et interfère avec le métabolisme des ions métalliques essentiels, incluant le fer, le calcium et le Zn. L'analyse des profils d'expression obtenus chez *L. rubellus*, a confirmé l'existence de profils dose dépendant en accord avec ces mécanismes.

#### I. 3. 2. 2. Exposition au fluoranthène

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont lipophiles et peuvent donc s'incorporer et perturber les fonctions des membranes biologiques (Walker, 2001). Chez les mammifères, ils sont également suspectés pour leurs effets cancérigènes et tératogènes à faible concentration (IARC, 2008). Chez L. rubellus, l'exposition au fluoranthène cause la modulation de voies associées aux Aryl hydrocarbon Receptor (AhR). De plus, la répression de l'expression de certains gènes impliqués dans la protéolyse et l'induction d'un gène impliqué dans la voie de détoxication de phase II (gst de classe pi) a été observée. D'autres voies indépendantes de l'AhR montrent des variations intéressantes. C'est le cas des voies associées à l'inflammation et l'hypoxie, via l'induction de cytokines cellulaires en réponse aux dommages cellulaires provoqués par les espèces réactives de l'oxygène générées par l'exposition aux hydrocarbures. Ainsi, les impacts cellulaires provoqués par les HAPs sont associés : (1) à un disfonctionnement mitochondrial menant à des perturbations de la respiration mitochondriale et une inhibition du transport des électrons (gènes : NADH déshydrogénase sous-unités 1, 2 & 4, cytochrome b et cytochrome c oxydase sous-unité II montrent une répression de leur expression) ; (2) aux dommages génotoxiques (gènes associés à la réparation des adduits de l'ADN) ; (3) à une hypoxie avec génération de d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

#### I. 3. 2. 3. Exposition à l'atrazine

En comparaison du nombre très important de recherches en relation avec la toxicité de l'atrazine (PAN-Pesticides-Database), peu de choses sont connues sur les voies moléculaires affectées par une exposition à cet herbicide. Owen *et al.* (2008) ont confirmé que l'exposition à l'atrazine était liée aux voies de détoxication métabolique de phase I et II par l'induction d'isoformes du cytochrome P450 et de GSTs. De plus, cette exposition montre une induction de gènes impliqués dans la réparation des dommages causés à l'ADN, en réponse aux effets

cancérigènes provoqués par l'atrazine (Morgan *et al.*, 1996). Une augmentation du nombre de transcrits impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire a été également observé.

Le mode d'action de l'atrazine consiste en une perturbation du transport d'électrons affectant le photosystème II des chloroplastes chez les plantes (Pfister *et al.*, 1981). La réponse observée chez *L. rubellus* indique une augmentation significative de plusieurs membres associés à la voie de phosporylation et du cycle des acides tricarboxyliques. Ces résultats indiquent que l'atrazine entraine la mise en place de voies alternatives à la génération d'ATP pour compenser les effets sur la voie de phosporylation. Au cours de cette étude, le groupe de gènes le plus représenté correspondait à un groupe impliqué dans la synthèse protéique et le catabolisme (induction de gènes codant des protéines ribosomales, des transporteurs d'acides aminés et des enzymes conjuguées à l'ubiquitine dont le rôle est de cibler les protéines pour leur dégradation). Une explication possible est que l'atrazine entraine la formation de protéines mal repliées. Ainsi, la dégradation de ces protéines nonfonctionnelles et la synthèse de protéines correctes peut expliquer l'observation d'un tel profil.

#### I. 3. 2. 4. Exposition au cuivre

Un second travail a porté sur la mise en évidence des profils de transcription observés chez *L. rubellus* lors d'une exposition longue (70 jours) en mésocosme à un sol naturel artificiellement contaminé par différentes concentrations de Cu (Bundy *et al.*, 2008). Outre la mise en évidence de gènes impliqués dans divers mécanismes de détoxication, *i.e. métallothionéines*, *hsp* 40 et 70, etc, les auteurs ont observé que des gènes impliqués dans 3 voies présentaient de forts changements de leurs niveaux de transcription : (1) la voie associée au transport des électrons ; (2) la voie impliquée dans la liaison des métaux essentiels tels que le calcium ou le fer ; (3) la voie du métabolisme lipidique. D'autre part, nous savons que le Cu entraine une génotoxicité du fait de la génération de ROS (Cervantes-Cervantes *et al.*, 2005), ainsi que des dommages menant à l'apoptose (Raes *et al.*, 2000). Il n'est pas surprenant dès lors d'observer l'induction de certains gènes codant des protéines impliquées dans la réparation des dommages causés à l'ADN et dans la régulation des mécanismes apoptotiques.

I. 3. 2. 5. Identification d'une réponse transcriptionnelle commune à 3 expositions

Très récemment, Svendsen *et al.* (2008) ont étudié la réponse transcriptomique de *Lumbricus rubellus* lors d'expositions séparées à 3 composés chimiques (Cd, fluoranthène, atrazine) en concentrations sub-létales (~10% EC50). En utilisant leur puce à ADN, ces auteurs voulaient identifier les gènes impliqués dans la « réponse environnementale commune » à ces 3 éléments. Seuls 11 gènes présentaient des variations similaires pour les 3 contaminants. Parmi ces 11 gènes, 7 ont montré une homologie significative avec des séquences présentes dans les banques de données génétiques, incluant des transcrits associés avec la fonction mitochondriale et le métabolisme énergétique (*e.g.* ATP synthase, protéine ribosomale S24 et l'acyl-coA monoacylglycerol acyltransferase 2), ainsi que la synthèse protéique et la réplication de l'ADN. Il est surprenant de ne pas observer la présence de gènes codant des protéines associées à des fonctions de protection telles que les protéines de choc thermique, les métallothionéines, les cytochromes P450, les glutathion-S-transférases et les protéines impliquées dans les systèmes antioxydants. En effet, la plupart de ces gènes ont été identifiés pour leurs réponses lors d'un stress environnemental (Klaassen *et al.*, 1999; Lewis *et al.*, 2001; Hanukoglu, 2006).

#### I. 3. 3. Chez Eisenia fetida

Très peu de données génétiques étaient disponibles dans les banques de données pour l'Annélide *Eisenia fetida* (< 200 dans GenBank<sup>TM</sup>). Pour combler ce manque, Pirooznia *et al.* (2007) ont mis en place une stratégie menant au clonage de 4032 ESTs (Expressed Sequence Tags) en utilisant une approche passant par la réalisation de banques soustractives. Ces auteurs ont construit 2 banques en utilisant 3 classes de produits chimiques : (1) un nitroaromatique (ex : Trinitrotoluène (TNT)); (2) les hétérocycles nitro-amines (ex : Cyclotrimethylenetrinitramine (RDX)); (3) les ETMs (Cd, Pb, Zn, et Cu). Concrètement, ils ont récupéré les ADNc obtenu pour chaque exposition à un contaminant donné après 3 périodes d'exposition (4, 14 et 28 jours). Puis, ils ont mélangé ces ADNc par groupe de 5 composés chimiques pour ensuite réaliser une banque soustractive. Ainsi, ces auteurs ont obtenu un mélange de séquences représentatif du profil d'expression correspondant à une exposition à 5 contaminants environnementaux (cf Figure 2). Cette approche a permis l'obtention de 4032 séquences correspondant à 2231 séquences uniques après soumission dans les banques de données génétique. Puis, une fonction a été assignée à chacune des 2231 séquences via l'utilisation de la banque de données Gene Ontology (Ashburner et al., 2000). Suite à l'annotation des séquences, les auteurs ont identifié plusieurs voies physiologiques atteintes chez les animaux exposés. Il s'agit des voies du métabolisme énergétique, du métabolisme des acides aminés, de gènes impliqués dans les processus cellulaires immunitaires, nerveux et sensoriels. Les voies de transduction, de transcription de l'ADN, de traduction de l'ARN sont également perturbées (Tableau 1).



Figure 2 : Dispositif expérimental mis en œuvre par Pirooznia *et al.* (2007) pour réaliser leurs banques soustractives

Puis, Gong et al. (2007), ont construit une puce à ADN reprenant les 4032 séquences issues des travaux de Pirooznia et al. (2007) pour étudier les profils d'expression d'E. fetida, lors d'expositions à un composé explosif, le TNT. Après une exposition de 28 jours les voies affectées par une exposition au TNT sont principalement liées à la contraction musculaire, la signalisation neuronale, la croissance, la fibrinolyse, la coagulation, l'homéostasie du fer et du calcium, le transport de l'oxygène et l'immunité. Une seconde exposition au TNT (concentration plus forte, 50 au lieu de 38,7 mg/kg) et au RDX en exposition unique ou en mélange a permis d'obtenir des résultats sensiblement identiques à ceux observés dans l'étude avec le TNT seul (Gong et al., 2008). Lors d'une exposition au TNT, les auteurs ont identifié des gènes impliqués dans le transport de l'oxygène et l'homéostasie du fer (e.g. la ferritine), la coagulation du sang et fibrinolyse (fibrinogène et fibronectine), la contraction musculaire et la mobilité cellulaire (actine, tropomyosine, et troponines), la réponse immunitaire (chitinase protéine de reconnaissance des peptidoglycanes), la réponse antioxydante et (métallothionéines), le transport d'électrons (cytochromes c oxydases), la voie de détoxication phase II (GSTs), l'homéostasie du calcium (centrines et autres protéines contenant des domaines de liaison au calcium EGF-like), protéines de dégradation (lysozyme destabilase). Les nouvelles voies mises en évidence lors de cette étude sont les voies associées à la structure des ribosomes, la traduction, le transport des protéines, la dégradation des protéines non-lysosomales, inhibiteurs de protéases, le métabolisme énergétique, la glycolyse et de multiples signaux de transduction (*e.g.* la phophorylation des protéines et ribosylation de l'ADP). L'exposition au RDX entrainait l'induction de gènes associés aux fonctions mitochondriales (ex : *nadh déshydrogénase 1*), au métabolisme énergétique (*atp synthase f0*), à la synthèse protéique (Ubiquitine ligase) et à la réplication de l'ADN. De plus, ces auteurs ont remarqué qu'une exposition au TNT engendrait des effets plus marqués sur l'expression des gènes qu'une exposition à un mélange contenant du TNT et du RDX. En effet, seul l'expression de 3 gènes était plus particulièrement perturbée par ce mélange. Ces gènes codent une ferritine, une chitinase et une dopamine beta mono-oxygénase.

#### I. 4. Conclusion

La toxicogénomique est une approche innovante pour l'étude des effets des produits chimiques sur un organisme, l'appréciation de leurs effets et contribuera peut-être à l'estimation des risques engendrés pour les écosystèmes. Appliqué à l'écotoxicologie, cet outil de génomique augmente notre capacité à comprendre le mode d'action des éléments chimiques chez des espèces modèles et des espèces considérées comme clés pour les écosystèmes. En effet, cette approche permet d'identifier la nature des changements transcriptomiques lors de l'exposition d'un organisme à un élément toxique. Depuis une dizaine d'années, l'emploi de ces techniques de biologie moléculaire s'est largement généralisé, pour aujourd'hui concerner la plupart des organismes vivants, qu'ils soient vertébrés ou invertébrés, continentaux ou marins. Le but principal étant d'obtenir de meilleures connaissances sur les modes d'action des produits chimiques pour réduire le doute dans l'estimation des risques encourus par un écosystème, un organisme, etc. Ainsi, des polluants majeurs présents dans l'environnement ont été testés. Trois classes de composés ont été plus particulièrement étudiés, les éléments : (i) inorganiques (les Eléments Traces Métalliques), (ii) organiques (Hydrocarbures Polycycliques Aromatiques) et (iii) phytosanitaires (Herbicides et Pesticides).

L'objectif de cette analyse bibliographique était de faire une synthèse de l'ensemble des études transcriptomiques portant sur les invertébrés vivant en contact étroit avec les sols. L'identification de gènes clés, associés à des voies spécifiques peut être fait chez des espèces

29

clés pour établir des connaissances sur les modes d'action des produits chimiques. En effet, selon Ankley et *al.* (2006), l'exploration des effets des produits chimiques au travers de l'étude de diverses espèces, est un domaine où une meilleure compréhension des modes d'action via la transcriptomique pourrait fournir de précieuses informations. Par exemple, quelques mécanismes de toxicité sont très bien conservés entre les espèces, tandis que d'autres ne le sont pas. Les techniques de toxicogénomique pourraient permettre de définir les similarités ou au contraire les différences entre espèces, afin d'estimer si l'extrapolation des risques des produits chimiques d'une espèce à l'autre est techniquement faisable et pertinent.

Parmi toutes les voies physiologiques identifiées, les composés chimiques ont plus particulièrement un impact sur les voies de détoxication de phase I (gènes des cytochromes P450) et II (gènes des GSTs), les voies de l'homéostasie du calcium et du fer (ex : gènes de la Sarcoplasmic Calcium Binding Protein (SCBP) et de la ferritine), les voies associées à la dégradation protéique (voie des ubiquitines) et les voies associées au transport des électrons (gènes des cytochromes c oxydases). L'identification de ces voies, ainsi que les gènes qui y sont associés pourrait permettre de constituer une nouvelle batterie de candidats biomarqueurs potentiels. En effet, combinés aux résultats obtenus lors de la réalisation d'une banque soustractive chez E. fetida, il apparaît possible d'étudier le niveau d'expression des gènes appartenant à ces voies physiologiques lors d'une exposition à un composé chimique, chez cette espèce. Un tel groupe de gènes pourrait constituer une signature de l'ensemble des changements survenant au niveau transcriptomique, chez un organisme test, par exemple lors d'une contamination d'origine métallique. L'étude de ces changements au niveau moléculaire, pourrait également permettre d'identifier une signature stress spécifique dans les profils d'expression génique, pour diagnostiquer l'impact d'un xénobiotique sur les populations (Snell et al., 2003; Lettieri, 2006).

Organismes	Substances testées	Substrat et concentrations testées	Durée d'exposition	Outil moléculaire utilisé	Observations : Voies physiologiques atteintes	Références
	Fluoranthène	Milieu de culture S ; 0- 2,47 $\mu M$	ulture S ; 0- $\mu M$ 48±5 heures alture S ; 0- $0 \mu M$	Puce génomique et/ou PCR semi- quantitative	Noies de détoxication de Phase I (x3,1) (cytochromes P450) et II (x2,6) (GST),  voie des lectines de type C ( x5,8 à 42,3) et  voie du collagène (x2,7)	Reichert & Menzel 2005
elegans	Atrazine	Milieu de culture S ; 0- 115,9 µM		Puce génomique et/ou PCR semi- quantitative	✓ Voies de détoxication de Phase I (x2,4 à 8,7) (cytochromes P450) et II (x2,6 à 6,3) (GST, UDP-glucoronosyltransférase (UDPGT)), ✓ voie des lectines de type C (x2,5 à 14,9) et ✓ voie du collagène (x2,4)	Reichert & Menzel 2005
Camorhabditis	Cadmium	Milieu de culture S ; 0- 100 μΜ	4 et 24 heures	Puce génomique et/ou qPCR	<u>Groupe de gènes à réponse précoce (4h) :</u> <b>7</b> Détoxication et homéostasie des ions métalliques (x28,7 pour la mtl-2, x73.4 pour le cdr-1), <b>7</b> voie de détoxication de Phase I (Cytochromes P450 (x6)) et II (GST (x3,8), UDPGT (x5))	Cui <i>et al.</i> , 2007
elegans					<u>Groupe de gènes à réponse tardive (24h) :</u> $\checkmark$ Métabolisme des acides gras, $\checkmark$ métabolisme des lipides cellulaires, $\checkmark$ voies de la protéolyse, $\checkmark$ voie des lectines de type C (x1,6 à 2)	
					<u>4 &amp; 24h :</u> , <b>7</b> Voies Catalytiques, voies associées à l'activité de liaison de divers ions métalliques (Ca, Fe,)	
Caenorhabditis elegans	Cadmium	Milieu de culture S ; 0- 0,1-1-10 μM	7 jours	Puce génomique	<ul> <li>Détoxication et homéostasie des ions métalliques (mtl-2 (x2,5), cdr-1 (x2)),</li> <li>voie du collagène (x2,5),</li> <li>voies de la protéolyse (ATPases),</li> <li>gènes possédant un domaine Ubiquitine transférase</li> </ul>	Novillo <i>et al.</i> , 2005
Ω Lumbricus rubellus	Cadmium	Sol test (cf Spurgeon <i>et al.</i> , 2003b) ; 0-13-43- 148-500 mg/kg	28 jours	Puce à ADN (~8100 gènes)	7 Détoxication des ions métalliques (mt (x11 à 37), ↘ métabolisme des ions métalliques (Ca, Fe, Zn) ( <i>ferritine</i> , <i>scbp2</i> , <i>calcineurine</i> ), 7 Voie de détoxication de Phase I et II (x1,5 à 3), ↘ réparation de l'ADN (équivalent du gène <i>rad51</i> (x3)), 7 gènes impliqués dans la formation du cytosquelette ( <i>tropomyosine 2</i> (x24)), ↘ voies associées au transport des électrons (Cytochromes c oxydases (x4), Cytochrome b), ↘ voie des protéases	Owen <i>et al.</i> , 2008
Lumbricus rubellus	Fluoranthène	Sol test (cf Spurgeon <i>et</i> <i>al.</i> , 2003b) ; 0-13,8-46- 158-533 mg/kg	28 jours	Puce à ADN (~8100 gènes)	▶ Voie de la protéolyse (ATP ases (x2)), 7 voie de détoxication de Phase II (x2), 7 voies impliquées dans la réponse immunitaire (inflammatoire, cytokines cellulaires), ▶ voies associées à la respiration cellulaire (NADH déshydrogénases (x2), <i>cytochrome c oxydase II</i> (x2), <i>cytochrome b</i> (x10)), 7 réparation de l'ADN (x2,8 à 7,1)	Owen <i>et al.</i> , 2008
Lumbricus rubellus	Atrazine	Sol test (cf Spurgeon <i>et al.</i> , 2003b) ; 0-9,4-20,7- 35-59 mg/kg	28 jours	Puce à ADN (~8100 gènes)	<ul> <li>Voie de détoxication de Phase I (x1,65) et II, voies de réparation de l'ADN (gène <i>rad23</i> (x1,7)), gènes associés au contrôle du cycle cellulaire, voie de phosphorylation, cycle des acides tricarboxyliques, voies de synthèse protéique (x1,7 à 3,3) et catabolisme (gènes d'enzymes conjuguant l'ubiquitine) (x1,5 à 2,2).</li> </ul>	Owen <i>et al.</i> , 2008

Tableau I : Travaux de recherche utilisant des outils de transcriptomique et de génomique pour identifier les gènes différentiellement exprimés lors d'une exposition à un contaminant et les voies physiologiques qui y sont associées **7** : induction des gènes ; **¥** : répression des gènes ; Les variations d'expression sont indiquées entre parenthèse quand elles sont disponibles.

	Organismes	Substances testées	Substrat et concentrations testées	Durée d'exposition	Outil moléculaire utilisé	Observations : Voies physiologiques atteintes	Références
	Lumbricus rubellus	Cuivre	Sol naturel ([Cu] initiale= 16,1 mg/kg) contaminé artificiellement ; 0-10- 40-160-480 mg/kg	70 jours	Puce à ADN (~8100 gènes)	Détoxication des ions métalliques (mt (x1,5 à 5,2)),      → voie des chaperonnes ( <i>hsp 40</i> (x1,7) et 70 (x1,5 à 3)),      → voie de détoxication de phase II (x1,7 à 2,9), voie du transport des électrons, métabolisme des ions métalliques (Ca, Fe, Zn), réparation de l'ADN,      → gènes de régulation de l'apoptose (x2)	Bundy <i>et al.</i> , 2008
	Lumbricus rubellus	Cadmium, Fluoranthène, Atrazine	Sol test (cf Spurgeon <i>et al.</i> , 2003b) ; Cd : 0-13- 43-148-500 mg/kg ; FLA :0-13,8-46-158-533 mg/kg ; ATZ : 0-9,4- 20,7-35-59 mg/kg	28 jours	Puce à ADN (~8100 gènes)	<ul> <li>Voies associées aux fonctions mitochondriales (<i>nadh déshydrogénase</i> 1),</li> <li>Voie associée au métabolisme énergétique (<i>atp synthase f0</i>),</li> <li>synthèse protéique (gène <i>ubiquitine ligase</i>) et</li> <li>réplication de l'ADN</li> </ul>	Svendsen <i>et al.</i> , 2008
	Eisenia fetida	Cd, TNT, 2,6-DNT, RDX, HMX	Sols artificiels ; respectivement : 292- 100-54-50-10 mg/kg	4, 14 et 28 jours	Banque soustractive	Identifications de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique (ATP synthase), le métabolisme des acides gras, dans les voies de détoxication ( <i>mt</i> ), dans le transport des électrons (cytochromes c	Pirooznia <i>et al.</i> , 2007
32	Eisenia fetida	Cu, Pb, Zn, 2,4-DNT, TNB	Sols artificiels ; respectivement : 293- 8778-357-100- 100 mg/kg	4, 14 et 28 jours	Puce à ADN (~8100 gènes)	dans l'immunité, dans les processus sensoriels et nerveux. Gènes associés aux signaux de transduction, à la transcription de l'ADN, la traduction de l'ARN.	Pirooznia <i>et al.</i> , 2007
	Eisenia fetida	TNT	Sol naturel contaminé artificiellement ; 0-2- 10,6-38,7mg/kg	28 jours	Puce à ADN (~4032 éléments)	✓ Voies associées à la contraction musculaire, voies associées à la liaison du calcium (SCBPs, Calmodulines, centrines) à la croissance, à la signalisation neuronale, la fibrinolyse (protéase fibrinolytique), la coagulation, 当 le métabolisme des ions métalliques (Ferritine), 矛 le transport de l'oxygène (Hémoglobine, myohemerythrine) et la réponse immunitaire (protéines de reconnaissance des peptidoglycanes), 当 gènes impliqués dans l'ubiquitinylation	Gong <i>et al.</i> , 2007

Tableau I (Suite1) : Travaux de recherche utilisant des outils de transcriptomique et de génomique pour identifier les gènes différentiellement

exprimés lors d'une exposition à un contaminant et les voies physiologiques qui y sont associées

**7** : induction des gènes ; **1** : répression des gènes ; Les variations d'expression sont indiquées entre parenthèse quand elles sont disponibles

	Organismes	Substances testées	Substrat et concentrations testées	Durée d'exposition	Outil moléculaire utilisé	Observations : Voies physiologiques atteintes	Références
	Eisenia fetida	TNT	Sol naturel contaminé artificiellement ; 50 mg/kg	28 jours	Puce à ADN (~4032 éléments)	7 Gènes impliqués dans le transport de l'oxygène et l'homéostasie du fer (e.g. la ferritine (x7)), № la coagulation du sang et fibrinolyse (fibrinogène (x11) et fibronectine), № la contraction musculaire et la mobilité cellulaire (tropomyosine (x9), et troponines (x9)), la réponse immunitaire (chitinase et protéines de reconnaissance des peptidoglycanes), la réponse antioxydante (métallothionéines, GST, cytochromes c oxydases et les NADH déshydrogénases), l'homéostasie du calcium (centrine et autres protéines de dégradation (lysozyme destabilase). Voies associées à la structure des ribosomes, la traduction, le transport des protéines, la dégradation des protéines non-lysosomales, inhibiteurs de protéases, le métabolisme énergétique, la glycolyse et de multiples signaux de transduction (e.g. la phophorylation des protéines et ribosylation de l'ADP)	Gong <i>et al.</i> , 2008
22	Eisenia fetida	RDX	Sol naturel contaminé artificiellement ; 30 mg/kg	28 jours	Puce à ADN (~4032 éléments)	<ul> <li>7 Voies associées aux fonctions mitochondriales (<i>nadh déshydrogénase</i> 1),</li> <li>7 au métabolisme énergétique (gène <i>ATP synthase F0</i>),</li> <li>7 synthèse protéique (gène ubiquitine ligase) et</li> <li>7 réplication de l'ADN</li> </ul>	Gong et al., 2008
	Eisenia fetida	TNT + RDX	Sol naturel contaminé artificiellement ; respectivement 50 et 30 mg/kg	28 jours	Puce à ADN (~4032 éléments)	L'expression de 3 gènes est plus particulièrement perturbée par le mélange : $\mathbf{\hat{y}}$ ferritine (x2), $\mathbf{\hat{y}}$ une chitinase (x2), et $\mathbf{\hat{y}}$ une dopamine beta mono-oxygenase (x2)	Gong <i>et al.</i> , 2008

Tableau I (Suite2) : Travaux de recherche utilisant des outils de transcriptomique et de génomique pour identifier les gènes différentiellement exprimés lors d'une exposition à un contaminant et les voies physiologiques qui y sont associées

🛪 : induction des gènes ; 🗳 : répression des gènes ; . Les variations d'expression sont indiquées entre parenthèse quand elles sont disponibles

#### II. Présentation des effecteurs sélectionnés

Il existe dans la littérature un grand nombre d'effecteurs testés à la fois aux niveaux protéique ou génique chez différents macroinvertébrés. Une étude bibliographique nous a permis d'en identifier un grand nombre dont le clonage et l'analyse du niveau d'expression a été entreprise chez notre modèle de laboratoire.

Les résultats obtenus par une approche par DDRT-PCR (Differential Display Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), réalisée par Liao et Freedman (1998) chez *C. elegans* (Nématode) suggèrent que le Cd fait varier l'expression d'un grand nombre de gènes. Parmi les 32 gènes cités par ces auteurs, une quinzaine codent des effecteurs protéiques potentiellement impliqués dans des mécanismes de défense tels que des protéines de choc thermique (HSP 60 & 70), la superoxide dismutase (SOD), la catalase (CAT), la métallothionéine (MT), etc. En complément, une analyse des séquences protéiques nous a permis de sélectionner une dizaine d'effecteurs montrant un fort degré de conservation chez les macroinvertébrés. Il s'agit de protéines impliquées dans des mécanismes physiologiques essentiels et donc très conservées d'une espèce à l'autre. Ces effecteurs peuvent être rangés dans plusieurs catégories en fonction de leurs rôles au niveau cellulaire. Ces catégories sont :

#### II. 1. Protéines de choc thermique

Ces protéines sont parmi les plus abondantes au niveau intracellulaire. Une accumulation est rapidement observée sous l'effet de stress variés incluant plus particulièrement la température, les infections et les contaminations métalliques. Ces effecteurs sont des molécules chaperonnes intracellulaires fortement conservées, évolutivement très anciennes et constituées par plusieurs super-familles multigéniques. Ces HSP sont présentes et exprimées de manière constitutive dans tous les compartiments subcellulaires (noyau, mitochondries, réticulum endoplasmique, etc) de tous les types cellulaires des procaryotes jusqu'aux organismes les plus complexes (Robert, 2003).

Les rôles majeurs de ces effecteurs sont :

- Prévenir l'agrégation des protéines lors d'un stress
- Servir de protéines chaperonnes lors de transports protéiques entre les différents organites cellulaires
- Contribuer à la récupération (après dénaturation) ou dans la mise en place initiale (après synthèse) de la conformation tridimensionnelle d'autres protéines.

Elles se répartissent en plusieurs familles selon leur masse moléculaire, les principales étant les HSP 60 et 70 auxquelles s'ajoute l'ubiquitine, protéine plus particulièrement impliquée dans la dégradation non lysosomale des protéines cellulaires (Dhainaut *et al.*, 1997). Chez *Lumbricus terrestris* suite à une contamination métallique (Cd, Cu, Pb ou Mercure (Hg)), après 3 jours d'exposition, on observe une quantité d'HSP 70 plus importante au niveau des tissus intestinaux (Nadeau *et al.*, 2001). De même, des travaux réalisés par Homa *et al.* (Homa *et al.*, 2005; Homa *et al.*, 2007) ont montré par immuno-cytochimie que la quantité de protéines HSP 70 augmentait significativement dans les cœlomocytes d'*Eisenia fetida* lors d'expositions sur des papiers filtres contaminés par un mélange complexe de métaux (Cd, Pb, Zn, Cu).

#### II. 2. Protéines impliquées dans les systèmes antioxydants

L'exposition des organismes à divers stress peut entraîner la production d'espèces réactives de l'oxygène (communément appelées ROS pour Reactive Oxygen Species). Ces ROS incluent les différentes formes actives de l'oxygène, les hydroperoxydes, et des espèces radicalaires. Dans les milieux biologiques, ces molécules réactives peuvent attaquer les constituants cellulaires (protéines, lipides, polysaccharides, acides nucléiques) et entraîner une destruction et/ou un dysfonctionnement des systèmes cellulaires (Cossu *et al.*, 1997). Afin de contrer l'action oxydante des espèces réactives de l'oxygène, les organismes possèdent de nombreuses enzymes antioxydantes, parmi lesquelles on peut citer la Superoxyde dismutase (SOD) et la Catalase.

La superoxide dismutase : on regroupe sous ce nom les métalloenzymes capables de dismuter l'anion superoxide  $(O_2^{-})$  en peroxyde d'hydrogène  $(H_2O_2)$  (Figure 3). L'action oxydante de l'anion superoxide est assez faible. Cependant, il peut générer des radicaux plus agressifs (Nakazawa *et al.*, 1996). La SOD s'attaque donc a ce produit et permet d'arrêter les réactions en chaîne au début. Trois SOD différentes ont été identifiées dans les cellules eucaryotes. Nous nous sommes intéressés à la SOD Cu/Zn, qui est exprimée de manière constitutive et retrouvée dans le cytosol.

La catalase est une peroxydase hémique, exprimée de manière constitutive, se retrouvant principalement dans les peroxysomes des cellules. Cette enzyme catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en eau et en oxygène moléculaire (Figure 3).

Quelques travaux portant sur l'activité de ces enzymes sous exposition métallique ont été réalisés chez des Annélides Oligochètes. Laszczyca *et al.* (2004) ont étudié les profils d'activité de ces enzymes chez les espèces *Aporrectodea caliginosa, Lumbricus terrestris* et

35

*Eisenia fetida* provenant de sols pollués par différents métaux dont le Cd. Ces travaux ont permis d'observer une diminution de l'activité de la CAT ainsi que de la glutathion peroxydase et de la glutathion-S-transférase, deux autres enzymes impliquées dans la défense antioxydante (Figure 3).



Figure 3 : Principales enzymes impliquées dans la réponse à un stress oxydatif Abréviations : **GSH** : Glutathion réduit ; **GSSG** : Glutathion oxydé

#### II. 3. Protéines de signalisation cellulaire

Chaque cellule d'un organisme multicellulaire est exposée à de nombreux signaux différents provenant de son environnement. La transduction de ces signaux se fait soit à la surface des cellules, soit dans leur cytoplasme par des protéines spécialisées qui forment un système de transmission du signal afin de générer la réponse cellulaire appropriée.

La cellule répond à ces différents signaux en accord avec ses propres caractères acquis au travers de la différenciation cellulaire pendant le développement. Une cellule peut répondre à un type de signal par une prolifération, à un autre par la mise en place d'une fonction ou par de la différenciation cellulaire. Parmi les protéines sélectionnées, nous trouvons un certain nombre de protéines impliquées dans les mécanismes de signalisation cellulaire : la protéine kinase C (PKC), la calmoduline (Calm) et la  $\beta$ -adrénergique récepteur kinase ( $\beta$ -ark).

La Protéine Kinase C (PKC) est une sérine/thréonine kinase membranaire ou cytosolique à la base de l'activation/inactivation de voies de signalisation. La PKC représente une famille d'enzymes dépendantes du calcium et des phopholipides, catalysant le transfert d'un phosphate d'une molécule d'ATP vers un résidu sérine ou thréonine d'une protéine
substrat. Cette enzyme entraîne donc une modification des propriétés structurales et fonctionnelles de protéines-cibles en les phosphorylant (Casabona, 1997).

La calmoduline est une protéine intracellulaire de liaison du calcium qui appartient à la famille des protéines à « mains EF », caractérisée par un motif hélice-boucle-hélice. Le site de liaison au calcium est un motif composé de 30 acides aminés et contenant 2 hélices  $\alpha$  (E et F) reliées par une boucle. Lors de la fixation du calcium, l'hélice F passe d'une conformation « fermée » à une conformation « ouverte ». Son action consiste en l'activation de trois sérine /thréonine protéines kinases parmi lesquelles on retrouve la PKC.

Enfin, la  $\beta$ -ark est une protéine dont la fonction est de phosphoryler le récepteur adrénergique  $\beta$  lorsque celui-ci est occupé par son agoniste. Sa localisation est essentiellement cytosolique (Benovic *et al.*, 1987).

II. 4. La Pyruvate Carboxylase

La pyruvate carboxylase (PyC) est une enzyme mitochondriale permettant d'augmenter le taux d'oxaloacétate dans la matrice mitochondriale, selon la réaction suivante :

$$Pyruvate + ATP + HCO_{3}^{-} \xrightarrow{Acetyl-CoA, Mg^{2+}} Oxaloacétate + ADP + Pi$$

La production d'oxaloacétate permet de conduire le pyruvate et les composés glucoformateurs qui le précèdent (lactate, alanine, sérine,...) vers la gluconéogenèse permettant ainsi, la formation de glucose et de lipides. Pour ces substrats, la Pyruvate Carboxylase est l'enzyme clé de la gluconéogenèse.

#### II. 5. La Translationally controlled tumour protein

La Translationally controlled tumour protein (TCTP) est une protéine fortement conservée, exprimée chez tous les eucaryotes dans plus de 500 tissus et types cellulaires étudiés. La TCTP tire son nom d'une étude ayant permis le clonage de son ADN complémentaire dans une tumeur humaine et l'observation de sa régulation au niveau de la traduction (Gross *et al.*, 1989). La TCTP aurait plusieurs fonctions, parmi lesquels on trouve une activité de liaison au calcium ou à la tubuline (Gachet *et al.*, 1999; Bommer & Thiele, 2004). De plus, cette protéine serait importante pour la croissance cellulaire et la division. Enfin, les observations conjointes de la mise en évidence d'une similarité avec des chaperonnes (Thaw *et al.*, 2001) et de sa caractérisation comme une protéine anti-apoptotique (Li *et al.*, 2001) suggèrent que la TCTP exerce plus généralement une fonction cytoprotectrice (Figure 4) (Bommer & Thiele, 2004).



**Figure 4 :** Régulation et importance fonctionnelle de la TCTP. Cette figure résume les signaux extracellulaires et les conditions permettant la régulation du niveau de la TCTP ainsi que son importance au niveau cellulaire et extracellulaire. D'après Bommer et Thiele, 2004

Une publication fait état d'une induction du gène codant la TCTP chez un Annélide Oligochète. Dans cette étude le niveau d'expression du gène codant la TCTP a été étudié chez l'Annélide Oligochète *Lumbricus rubellus* provenant d'un sol minier fortement contaminé par les ETMs (Pb/Zn/Cd). Stürzenbaum *et al.* (1998b), ont montré que le niveau d'expression du gène codant la TCTP était 4 fois plus important chez les animaux provenant d'un sol minier par rapport à des individus provenant de sites sains.

#### II. 6. Effecteurs immunitaires

II. 6. 1. La Cyclophiline-A

La cyclophiline-A est une enzyme cytosolique ayant une activité peptidyl-prolyl cis/trans isomérase et appartenant à la famille des immunophilines. Ces protéines sont responsables du « pliage » des protéines et des peptides, et ont un rôle dans la transmission d'information pour toutes les cellules eucaryotes et en particulier les lymphocytes (Fruman *et al.*, 1994). L'expression de cet effecteur très conservé peut-être affectée par une pollution métallique. En effet, Stürzenbaum *et al.* (1999) ont mis en évidence une très forte induction

(38 fois) de la cyclophiline-A chez l'Annélide Oligochète *Lumbricus rubellus* après 6 semaines d'exposition à un sol contaminé par un cocktail d'ETMs (Cd/Pb/Zn/Cu).

#### II. 6. 2. La Lysénine

La lysénine est une protéine de 297 acides aminés (33 kDa) isolée pour la première fois dans le liquide cœlomique de l'Annélide Oligochète *Eisenia fetida* (Sekiwaza *et al.*, 1996). Cette protéine appartient à une famille multi-génique, dans laquelle on retrouve la fétidine, donnant plusieurs isoformes ayant un rôle hémolytique et une activité antibactérienne (Bruhn *et al.*, 2006). La lysénine, produite dans les chloragocytes (Ohta *et al.*, 2000) est connue pour être strictement dépendante de la sphyngomyéline. Elle forme des oligomères menant à la formation de pores d'un diamètre de 3 nm dans les membranes cibles (Roch *et al.*, 1989; Yamaji *et al.*, 1998).

#### II. 6. 3. La Coactosin-Like protein

La Coactosin-like protein (CLP) fait partie du groupe des protéines ADF/Cofilin se liant à l'actine. La CLP se lie spécifiquement à la 5-lipoxygénase (5-LO) la première enzyme impliquée dans la biosynthèse des leucotriènes et joue un rôle de chaperonne. La 5-LO catalyse deux étapes dans la conversion de l'acide arachidonique (20:4) en leucotriènes qui sont les médiateurs lipidiques impliqués dans des réactions inflammatoires lors de désordres d'ordre allergique (Radmark *et al.*, 2007). La liaison de la CLP à la 5-LO a été observée pour la première fois chez la levure (Provost *et al.*, 1999). La CLP peut induire et réguler la voie de la 5-LO *in vitro* (Rakonjac *et al.*, 2006). Elle est le support de l'activité de la 5-LO induite par le calcium. Ainsi, il semble que la CLP joue le rôle de chaperonne pour la 5-LO. De plus, la CLP peut se lier à la 5-LO en absence de calcium. Cependant, le calcium est indispensable à l'activité de la 5-LO. Ainsi, le mode de liaison de la 5-LO à la CLP semble dépendre de la présence de calcium (Annexe 2).

#### II. 7. Protéines impliquées dans la séquestration des métaux

De nombreuses protéines possèdent des ions métalliques dans leur structure propre ou sont capables d'en fixer sur des sites actifs. Certaines protéines ne possédant pas d'activité enzymatique sont également capables de fixer des ions métalliques, ce sont les métallothionéines (MTs). Les métallothionéines appartiennent à une famille de protéines riches en cystéines de faible poids moléculaire caractérisées par une absence en acides aminés aromatiques, connues pour être impliquées dans les processus de détoxication des éléments traces métalliques tel que le Cd mais aussi dans l'homéostasie de certains métaux essentiels comme le Zn ou le Cu (Palmiter, 1998; Klaassen *et al.*, 1999; Vasak & Hasler, 2000). Le lien fonctionnel entre MTs et détoxication des ETMs a facilité leur exploitation comme marqueurs de stress lors de contaminations métalliques (Kennette *et al.*, 2002; Galay-Burgos *et al.*, 2003; Lemoine & Laulier, 2003; Stürzenbaum *et al.*, 2004; Timmermans *et al.*, 2005; Trinchella *et al.*, 2006; Swiergosz-Kowalewska *et al.*, 2007).

Classiquement, les métallothionéines sont subdivisées en trois classes, les métallothionéines codées par un gène qui montrent beaucoup ou aucune homologie avec la métallothionéine de cheval, respectivement les métallothionéines de classe I et II et celles synthétisées de manière post-transcriptionnelles que l'on nomme aussi phytochélatines (Fowler *et al.*, 1987). Récemment, ce système de classification a été affiné, séparant les phytochélatines de la très grande famille des gènes codant les métallothionéines (Cobbett & Goldsbrough, 2002).

#### II. 7. 1. La métallothionéine de type II

Chez la plupart des animaux, la tolérance aux éléments traces métalliques dépend de l'induction de métallothionéines codées par des gènes ayant une homologie limitée avec la métallothionéine de cheval. Ces métallothionéines dites de classe II sont des protéines cytosoliques de faible masse moléculaire (6 à 8 kDa), riches en cystéines et caractérisées par l'absence d'acides aminés aromatiques (Fowler *et al.*, 1987). L'estimation de l'impact des métallothionéine de classe II a été réalisé chez de nombreuses espèces terrestres, incluant les Annélides Oligochètes comme *Lumbricus rubellus* (Stürzenbaum *et al.*, 2004) ou *Eisenia fetida* (Demuynck *et al.*, 2006) le nématode *Caenorhabditis elegans* (Liao & Freedman, 1998) et le collembole *Orchesella cincta* (Insecte ; Collembole) (Timmermans *et al.*, 2005).

#### II. 7. 2. La phytochélatine synthase

Chez les plantes, la tolérance aux métaux a été associée à la synthèse posttranscriptionnelle des métallothionéines de classe III ou phytochélatines (PCs) (polymères poly-[ $\gamma$ -Glu-Cys]<sub>n</sub>-X) (Grill *et al.*, 1985; Cobbett & Goldsbrough, 2002) (Figure 5). En effet, depuis leur découverte chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* (Grill *et al.*, 1985), les phytochélatines ont été caractérisées chez la plupart des plantes chez qui elles ont été étudiées (Cobbett, 1999). Elles jouent un rôle majeur dans la détoxication des ETMs chez les plantes en tant que chélateurs de haute affinité de ces métaux, et plus particulièrement des ions Cd<sup>2+</sup>. Les PCs interviendraient également dans la régulation des concentrations intracellulaires de métaux essentiels, chez les plantes, les champignons et les microalgues (Clemens, 2006). Chez les plantes supérieures, ces PCs sont synthétisées de manière post-transcriptionelle par la phytochélatine synthase (PCS), ou  $\gamma$ -Glutamylcysteine dipeptidyl transférase, une enzyme dont les facteurs activateurs sont les éléments traces métalliques, catalysant le transfert net d'une unité  $\gamma$ -Glu-Cys d'une molécule de Glutathion à une autre [ $\gamma$ -Glu-Cys-Gly +  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly  $\rightarrow$  ( $\gamma$ -Glu-Cys)<sub>2</sub>-Gly + Gly], ou à une molécule de phytochélatine précédemment synthétisée pour générer un polymère contenant de 2 à 11  $\gamma$ -Glu-Cys répétés (Grill *et al.*, 1989).

En outre, une étude réalisée chez l'ail (*Allium sativum*) a montré par RT-PCR semiquantitative que la phytochélatine synthase était régulée au niveau transcriptionnel par les métaux lourds et plus particulièrement par le Cd (Zhang *et al.*, 2005). De plus, ces auteurs ont démontré que le niveau d'expression de cet effecteur était significativement induit par un stress au Cd, dans les racines d'*Allium sativum*.

Avant 2001, Il n'y avait aucune preuve de l'existence de PCs ou d'une PCS chez des animaux. Cependant, très peu de temps après la caractérisation du génome complet de *Caenorhabditis elegans* deux publications ont décrit indépendamment l'une de l'autre l'existence d'une PCS fonctionnelle chez ce modèle invertébré (Clemens *et al.*, 2001; Vatamaniuk *et al.*, 2001). De plus, Clemens et ses collaborateurs ont émis l'hypothèse que la PCS pourrait être impliquée dans la tolérance et l'homéostasie des métaux chez tous les eucaryotes.



**Figure 5 :** Structure des phytochélatines, peptides synthétisés à partir du glutathion. Dans la plupart des cas, des phytochélatines avec n > 4 ont été détectées.

## III. Modèle d'étude : l'Annélide Oligochète Eisenia fetida (Savigny 1826)

Le ver du fumier *Eisenia fetida* (Savigny 1826) appartient à l'embranchement des Annélides, sous-classe des Oligochètes, ordre des Haplotaxida, sous-ordre Lumbricina, famille des Lumbricidae, genre Eisenia et espèce fetida.

Ce ver présente un tégument avec un ensemble de bandes rouges foncées en alternance avec des aires intersegmentaires jaunes moins pigmentées (Figure 6). *E. fetida* mesure de 50 à 120 mm de long, 3 à 5 mm de large pour une masse comprise entre 200 et 500 mg à l'âge adulte. Cet animal possède un régime alimentaire de type détritivore, se nourrissant principalement de bouse de vache ou de crottin de cheval dans un habitat de type épigé, *i.e.* vivant à la surface du sol et en particulier dans la litière. La durée de vie de ce ver est de l'ordre de 1 à 2 ans. Au laboratoire, ces vers sont élevés dans de grands bacs contenant un milieu d'élevage composé de 50% de tourbe blonde et de 50% de bouse de vache. Le pH est ajusté à 6,5  $\pm$  0,5 à l'aide de carbonate de calcium. La température ambiante est maintenue à 20  $\pm$  2°C et le taux d'humidité à 60% par ajout régulier d'eau distillée.



Figure 6 : Photographie de l'Annélide Oligochète Eisenia fetida

*Eisenia fetida* est une espèce recommandée par l'OCDE en tant qu'organisme test depuis de nombreuses années (OCDE, 1984, 2004) et à fait l'objet de plus de 700 publications scientifiques depuis 1973. Il a été démontré que cette espèce pouvait bioaccumuler les ETMs (Grelle & Descamps, 1998; Conder & Lanno, 2000; Lock & Janssen, 2001; Conder *et al.*, 2002). Comparés à d'autres groupes taxonomiques, les lombriciens peuvent bioaccumuler de très fortes teneurs en métaux, supérieures à celles trouvées dans les sols contaminés ou non

contaminés, ceci a été vérifié pour le Cd (Neuhauser et al., 1995; Grelle & Descamps, 1998; Heikens et al., 2001). Il a également été démontré que la quantité de métaux présents dans le corps d'individus de l'espèce E. fetida augmentait parallèlement à l'augmentation de la concentration en métaux du substrat (Reinecke et al., 1999; Scaps et al., 2002). De plus, les effets des ETMs sur les principaux traits d'histoire de vie de cette espèce sont bien caractérisés. En effet, l'exposition à des concentrations sub-létales de métaux (représentatives des concentrations présentes dans un sol naturel fortement contaminé) engendre des effets sur les principaux traits d'histoire de vie tels que la survie, la reproduction et/ou la croissance. De très nombreuses études ont montré l'existence d'une plus forte mortalité, d'une maturité sexuelle retardée, d'une réduction de la production de cocons de pontes et d'une croissance ralentie (Spurgeon & Hopkin, 1996; Fischer & Molnar, 1997; Helling et al., 2000; Nahmani et al., 2007). Cependant, bien qu'étant considérée comme une espèce modèle en écotoxicologie, E. fetida a fait l'objet de très peu d'études au niveau moléculaire. En effet, jusqu'en septembre 2007, seulement 103 séquences nucléotidiques et 96 séquences protéiques étaient déclarées dans les banques de données (GenBank<sup>TM</sup>), ce qui est très peu compte tenu de son statut d'espèce recommandée par l'OCDE.

**SECONDE PARTIE : RÉSULTATS** 

## **CHAPITRE I**

Clonage et analyse du niveau d'expression de 16 candidats biomarqueurs chez *Eisenia fetida* lors d'expositions *in vivo* à des éléments traces métalliques

Chapitre I

## **Chapitre I**

Clonage et analyse du niveau d'expression de 16 candidats biomarqueurs chez *Eisenia fetida* lors d'expositions *in vivo* à des éléments traces métalliques

#### **Publication 1**

Cloning and real-time PCR testing of 14 potential biomarkers in *Eisenia fetida* following cadmium exposure. *Environmental Science and Technology*. 2006, Vol. 40, 2844-2850

Chez une majorité d'organismes, la tolérance aux métaux repose, au moins en partie, sur l'induction de gènes codant des molécules capables de fixer les métaux. Parmi ces molécules, les métallothionéines (MT), protéines de faible masse moléculaire (6000-8000 Da) riches en cystéines (environ 30%), et caractérisées par l'absence d'acides aminés aromatiques sont connus pour être impliquées dans la détoxication des métaux traces tels que le Cd et dans l'homéostasie des métaux essentiels tels que le Zn et le Cu (Palmiter, 1998; Klaassen et al., 1999; Vasak & Hasler, 2000). Une stratégie alternative à la recherche de protéines fixatrices des métaux (MTs et MPs) consiste en l'identification de biomarqueurs protéiques impliqués dans de grandes fonctions biologiques, communs à plusieurs macroinvertébrés et dont l'expression est affectée par un stress métallique. Outre leur capacité à accumuler de grandes quantités de métaux, et en particulier le Cd (Grelle & Descamps, 1998), les Annélides Oligochètes sont des modèles biologiques sur lesquels de nombreuses études ont permis de mettre en évidence un éventail d'effets néfastes des métaux. Concrètement, les effets sur certains traits de vie comme la survie peuvent se caractériser par l'éradication de certains genres d'Annélides (Abdul Rida & Bouché, 1995) ou par des effets létaux (Spurgeon et al., 2004). Un retard de maturité sexuelle peut survenir chez Eisenia fetida (Spurgeon & Hopkin, 1996) et la croissance des individus peut être diminuée (Abdul Rida & Bouché, 1995; Spurgeon & Hopkin, 1996; Lukkari et al., 2004a). L'activité de certaines enzymes peut également être modifiée (Laszczyca et al., 2004; Lukkari et al., 2004b).

Un important travail bibliographique nous a permis d'identifier plusieurs effecteurs présents chez la plupart des macroinvertébrés continentaux dont l'expression est affectée par une pollution métallique. Dans la première partie de ce chapitre, le choix de ces effecteurs a été guidé en partie par les travaux de Liao et Freedman (Liao & Freedman, 1998). En effet, ces auteurs ont démontré chez *Caenorhabditis elegans* (Nématode) l'existence d'un groupe de

32 gènes dont l'expression varie lors d'expositions au Cd. Nombre de ces effecteurs sont impliqués dans des mécanismes de défense des organismes et présentent un fort degré de conservation phylogénique. Ce haut degré de conservation est lié au rôle physiologique essentiel exercé par ces effecteurs. Ainsi, nous nous sommes focalisés sur le clonage de ces effecteurs par RT-PCR chez notre modèle *Eisenia fetida*. Puis, l'analyse du niveau d'expression de ces effecteurs lors d'une exposition à un contaminant métallique a été entreprise par PCR en temps réel.

Concrètement, les 14 effecteurs sélectionnés étaient : la calmoduline, les HSP 60 et 70, la superoxide dismutase Cu/Zn, la catalase, la Cd-métallothionéine, la  $\beta$ -adrenergic receptor kinase, la pyruvate carboxylase, la TCTP, la protéine kinase C, et l'ubiquitine. Du fait de leur implication dans des mécanismes de défense, leur clonage a été entrepris sur le tissu ayant un rôle immunitaire majeur chez notre modèle, les cellules circulantes de la cavité cœlomique : les cœlomocytes. Le clonage est une étape préliminaire indispensable, puisque pour analyser le niveau d'expression par PCR en temps réel, nous avons besoin de connaître, au moins partiellement, la séquence des gènes sélectionnés.

Puis, le niveau d'expression de ces candidats a été analysé lors d'expositions in vivo à des sols artificiels contaminés par différentes concentrations de Cd au moyen de la PCR en temps-réel. Lors de ces intoxications expérimentales la plupart des effecteurs n'ont pas montré de variations intéressantes de leur niveau d'expression. Seuls les gènes catalase et Cd-mt présentent des variations intéressantes. Le gène de la catalase se caractérisait par une diminution significative de son niveau d'expression après 14 heures et 1 jour d'exposition à 80 et 800 mg Cd/kg, alors que le gène de la Cd-MT était caractérisé par une augmentation dose et temps dépendante quelque soit le niveau de contamination étudié (induction après 1 jour et 14 heures pour des intoxications de 80 et 800 mg Cd/kg respectivement). À la vue de ces résultats, la catalase et la Cd-mt peuvent donc être considérées comme des biomarqueurs d'exposition précoces au Cd. De plus, il est intéressant de noter que lors de cette expérimentation a été observé une diminution du niveau d'expression d'un grand nombre d'effecteurs après 14 heures d'exposition quelque soit le niveau de contamination. Cette baisse observée est à mettre en relation avec l'augmentation significative du nombre de transcrits codant la Cd-MT, qui survient au même moment. Ceci suggère un coût métabolique pour la synthèse de Cd-MT et la séquestration des métaux au niveau subcellulaire ou dans d'autres types cellulaires. Ce mécanisme peut être aussi appelé Trade-off.

## Cloning and Real-Time PCR Testing of 14 Potential Biomarkers in *Eisenia fetida* Following Cadmium Exposure

F. BRULLE,<sup>†</sup> G. MITTA,<sup>‡</sup>

- C. COCQUERELLE, § D. VIEAU, "
- S. LEMIÈRE,<sup>†</sup> A. LEPRÊTRE,<sup>†</sup> AND
- F. VANDENBULCKE\*,†

Laboratoire d'Ecologie Numérique et d'Ecotoxicologie, EA 3570, Université de Lille 1, Cité scientifique, Batiment SN3, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France, Parasitologie Fonctionnelle et Evolutive, UMR 5555, CNRS Université de Perpignan, 52 avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France, Laboratoire de la régulation des signaux de division, Université de Lille 1, Cité Scientifique, Batiment SN3, IFR 118, Villeneuve d'Ascq Cedex, France, and Laboratoire de Neuroendocrinologie du Développement – UPRES-EA 2701 Université de Lille 1, Cité scientifique, Bâtiment SN4, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Important biological activities could be affected in metal exposed species, and among the main physiological functions, immunity may provide one (or more) effector(s) which expression can be directly affected by a metal exposure in various macroinvertebrates. As many proteinic effectors showed a high degree of homology between species, we have developed a PCR approach to characterize partial mRNA sequences of selected effectors in the laboratory model, Eisenia fetida. After cloning, levels of expression of each gene were analyzed following exposures (80 and 800 mg/kg) to cadmium spiked soils using real-time PCR. An implemented approach was allowed to test quickly potential biomarkers in Eisenia fetida. Selected effectors were calmodulin, heat shock proteins, superoxide dismutase, catalase, metallothionein,  $\beta$ -adrenergic receptor kinase, pyruvate carboxylase, trancriptionally controlled tumor protein, protein kinase C, and ubiquitin. Most of the selected effectors did not show variations of expression level after exposure. Others expressed weak changes of expression as heat shock proteins. At last for catalase and metallothionein, early suitable variations of expression were observed.

#### Introduction

According to Weeks (1) a "biomarker" is a biological response to a chemical (pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), metals, ...) which induces a stress and could assess exposure or point out toxic effects. Biomarkers have been also defined as any observable and/or measurable variation

 $^\dagger$  Laboratoire d'Ecologie Numérique et d'Ecotoxicologie, Université de Lille 1.

<sup>‡</sup> CNRS Université de Perpignan.

<sup>§</sup> Laboratoire de la régulation des signaux de division, Université de Lille 1.

 $^{\rm II}$ Laboratoire de Neuro<br/>endocrinologie du Développement – UPRES-EA 2701 Université de Lille 1.

at molecular, biochemical, cytological, physiological, biological, or behavioral levels revealing past or present exposure of an organism to one or several pollutants (2). The development of biomarkers allowing an early diagnosis of long-term ecosystem dysfunctions represents a challenge for ecotoxicologists. Biomarkers affiliated with physiological functions whose alterations disturbed life history traits seemed promising candidates. Our aim was the identification and the constitution of a battery of proteinic biomarkers implied in main biological functions. This study also contributed to enrich the knowledge of adaptation, detoxification, and defense mechanisms of invertebrates to pollutants.

Since the pioneer observations of Darwin (3), the key role of earthworms in soil ecosystems is well-known. These animals represent an important part of soil macrofauna biomass. The species *Eisenia fetida* is one of the most commonly used in ecotoxicology and was recommended by the OECD for the testing of chemicals since 1984 (4), mainly because earthworms are distributed worldwide, their life cycles are short, they have a wide temperature and moisture tolerance range, and they are resilient earthworms which can be readily handled (5).

The presence of metals constitutes a major stress likely to disturb the main physiological functions of animals (6). An alternative strategy to the research of metal-fixing proteins (metallothioneins (MTs) and metalloproteins (MPs)) would consist in the identification of proteinic markers implied in important biological functions, common to macroinvertebrates, and which expression was affected by metallic stress. In addition to their capacity to accumulate metals and especially cadmium (Cd) (7), oligochete annelids were biological models often used in toxicological studies with endpoints related to life history traits (survival can be characterized by the disparition of some species (8) or by lethal effects (9)). Delay of sexual maturity (10) and a decrease of growth have been observed in Eisenia fetida after metallic exposure (8, 11, 10). Accordingly, it has been demonstrated that the activity of several enzymes can also be modified after metal exposures (12, 13). Metallic pollutions sensitize invertebrates used in aquaculture (mussel, oyster, shrimp) to microbial infections by altering the defense processes (14, 15). Similar observations were also reported in Lumbricus terrestris (16) and Eisenia andrei (17). Examination of the literature has enabled the identification of effectors present in most continental macroinvertebrates which expression could be affected by metallic pollutions. Liao and Freedman (18) showed in Caenorhabditis elegans (Nematod) the existence of a group of 32 genes which expression varied following Cd exposures. Many effectors were implied in defense mechanisms of this organism and presented a high degree of phylogenic conservation that could be related to their essential physiological role. Among them, we selected 11 genes which cloning in the laboratory model Eisenia fetida was first conducted. Second, to identify suitable potential biomarkers, the expression of each gene was studied after in vivo Cd-spiked soil exposures using real-time PCR.

#### **Material and Methods**

Animals and Treatment. Adult earthworms came from controlled cultures of our laboratory. They were bred at an ambient temperature of  $22 \pm 2$  °C, in the dark, on vegetable mould with fresh cattle manure as food source. Moisture content was maintained around 60%.

Artificial substrates were prepared as described in the OECD guidelines (4) (1984). Briefly, the substrate was composed (percentages refer to dry weight) of 10% sphag-

2844 ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY / VOL. 40, NO. 8, 2006

10.1021/es052299x CCC: \$33.50 © 2006 American Chemical Society Published on Web 03/14/2006

<sup>\*</sup> Corresponding author e-mail: franck.vandenbulcke@ univ-lille1.fr.

num, 20% kaolinite clay, and 70% quartz sand. The pH was adjusted to 6  $\pm$  0.5 with CaCO<sub>3</sub>. The cadmium (CdCl<sub>2</sub>) was added to the soil within half an hour of introducing the worms.

Two concentrations (80 and 800 mg/kg) of cadmium (19) were tested, and 25 adult worms per condition were used. The latter concentration, although very high, is under the LC50 (1000 mg/kg) reported for *Eisenia fetida* in OECD artificial soil (20). Exposure periods were 2 h, 6 h, 14 h, 1 day, 2 days, and 6 days.

At the end of the exposure periods, the worms were rinsed in distilled water before coelomocyte extrusions and cellular RNA extractions were processed as described below.

**Ethanol and Electrical Extrusion.** Twenty-five worms were placed for 5 min in a 50-mL polypropylene tube containing 30 mL of cold extrusion medium (2.5 mg·mL<sup>-1</sup> EDTA, 8.5 mg·mL<sup>-1</sup> NaCl, pH 7.3, 5% ethanol). Then, the worms were stimulated 10 times using short (<5 s) exposure to 9 V alternate current (*21*). After removal of the worms, a centrifugation (1000g, 5 min) was performed. Cellular pellet weights were noted.

RNA Extraction and Reverse Transcription. All expression analyses were conducted on total RNA extracted from coelomocytes, using Tri-Reagent (Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, U.S.A.) according to manufacturer's instructions. RNA purity and integrity were checked by ensuring that absorbance ratios (A260/280) were between 1.8 and 2.0 and by agarose gel electrophoresis (2%). First strand cDNA synthesis was performed using 4 units of Omniscript (Qiagen, Paris, France), 200 ng of random primer, and  $1.5 \,\mu g$  of total RNA in order to allow the cloning using degenerate primers. For real-time PCR analysis, reverse transcription was conducted with 200 units of SuperScript II reverse transcriptase (GibcoBRL, Cergy-Pontoise, France), 500 ng of oligo (dT) primer (18-mer), and 1.5  $\mu$ g of total RNA. The use of oligo (dT) allowed to select mRNA and consequently the coding RNA.

**Reverse Transcription PCR Optimization.** Specific conditions of amplification (temperature and Mg<sup>2+</sup> concentration) were determined for each selected effector.

All the effectors were cloned from circulating cells of the coelomic cavity of *Eisenia fetida* by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) using degenerate sense and antisense primers (Table S1, Supporting Information).

**Sequencing.** To clone each gene, degenerate primers were used. To determine such primers, protein sequences of the selected effectors (already cloned in other invertebrates species) were obtained from NCBI. Alignments were done with the online/Web tools (MULTALIN; CLUSTALW) (22, 23). Primers were then determined using software available online (CODEHOP) (24). Forward and reverse primers were designed on their degenerescence level and the temperature for DNA hybridation during PCR reactions. *Eisenia fetida* cDNA was used as the matrix to amplify various fragments corresponding to the selected genes.

PCR reactions were done with HotstartTaq polymerase (Qiagen), and typical PCR cycling conditions were 1 min at 95 °C, 1 min at 55 °C, and 2 min at 72 °C for 30 cycles.

Expected size products were resolved on a 2% (w/v) agarose gel stained with ethidium bromide and subsequently cloned into the pGEM-T Vector (Promega, Charbonnières, France). The recombinant clones were purified using Wizard Plus SV Miniprep DNA Purified system kit (Promega). One or two clones were sequenced in both directions by Genoscreen (Lille, France). Sequence analysis was performed using Genbank (NCBI).

**Real-Time Quantitative PCR.** Partial characterization of several recombinant clones allowed us to design homologous primers, subsequently used in real-time quantitative PCR using the Light Cycler Probe Design Software version 1.0 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany).

PCR reactions were performed according to the Light-Cycler Manual (Roche Molecular Biochemicals). Mastermix contained (final concentrations) the following: 4.3 µL of water (DEPC), 1.2 µL of MgCl<sub>2</sub> (4 mM), 0.5 µL of forward primer (0.4  $\mu$ M), 0.5  $\mu$ L of reverse primer (0.4  $\mu$ M), and 1  $\mu$ L of LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics, Meylan, France). A 7.5  $\mu$ L LightCycler Mastermix was filled in the LightCycler glass capillaries, and 2.5  $\mu$ L of cDNA was added as PCR template. The following PCR conditions were used: denaturation step (95 °C, 10 min), amplification and quantification step repeated 40 times (95 °C for 15 s, annealing temperature for 6 s, 72 °C for 16 s), melting curve step (60-95 °C with a heating rate of 0.1 °C per s and continuous fluorescence measurement), and a cooling step at 40 °C. Analyses of melting curves allowed optimization of annealing temperatures for  $\beta$ -actin and other amplification products. Single highly specific amplifications were obtained using annealing temperature equal to 1 °C below the Tm of primer pairs. For each reaction, the crossing point (CP; defined as the cycles number at which the noise band intersects the fluorescent curve) was determined using the "Fit Point Method" of the LightCycler Software 3.3 (Roche Diagnostics).

For each mRNA, absence of contamination (genomic DNA) was checked using a no-RT control with  $\beta$ -actin primers.

**Relative Quantification of Expression Levels.** To calculate amplification efficiencies (*E*) of cDNAs, relative standard curves were generated using serial dilutions (1:10, 1:100, 1:1000, and 1:10 000) of a single cDNA sample (cal) constituted of a pool of the 14 analyzed cDNAs. Relative standard curves were based on CP values and the log value of standard cDNA dilution.

Real-time PCR efficiencies (*E*) were calculated from the given slope of the standard curve according to the equation  $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ . They ranged from 1.93 to 2 (Pearson correlation coefficient r > 0.99) (Table S2, Supporting Information), and a strong linearity was observed.

Levels of expression of the target gene (Tg) were compared to the expression of the constitutively expressed  $\beta$ -actin (act) gene (25). The expression ratio (*R*) was calculated according to the formula  $R = (E_{\text{Tg}})^{\text{CPTg}}/(E_{\text{act}})^{\text{CPact}}$ . Another constitutively expressed gene coding the ribosomal protein S13 was used as an additional control.

**Statistical Analysis.** Expression levels were compared by means of two-way analysis of variance followed by Student post-hoc *t*-tests. The normality of each distribution was verified by Kolmogorov-Smirnov's tests and variance heterogeneity by Hartley's tests. An  $\alpha$  level of 0.05 was used in all procedures. All results are represented as mean standard error.

#### **Results**

**RNA Extraction.** No significant difference was observed for RNA quantities obtained between control and exposed worms. A lower RNA quantity was obtained after 6 days of exposure to 80 or 800 mg/kg (p = 0.04) (Figure S3, Supporting Information).

**Cloning and Sequencing.** Our experimental approach allowed us to clone and to characterize partial fragments of the 11 selected genes. At this step, we noticed that two related but distinct sequences for three of them (protein kinase C (PKC), calmodulin (Calm), and  $\beta$ -adrenergic receptor kinase ( $\beta$ -ark)) were obtained. Fourteen genes of interest were thus partially cloned and sequenced. The  $\beta$ -actin and the S13 ribosomal protein were also cloned in order to be used as expression controls for real-time PCR. Each sequence was identified using the BlastX software. The sequence data were submitted to GenBank (accession number DQ286708 to DQ286722) (Table S1, Supporting Information).

VOL. 40, NO. 8, 2006 / ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY = 2845

TABLE 1. Induction Factors and $p$ Values for Animals Exposed to 80 mg/kg Cadmium <sup>a</sup>														
	SOD	PKC2	тстр	PKC1	PyC	Calm 16-1	Calm 16-2	Bark 1-4	Bark 2-3	Ubiq	HSP 70	HSP 60	CAT	MT
2 h	0.91	0.83	1.06	0.96	0.90	0.97	0.97	1.11	1.25	1.27	1.38	0.83	1.59	1.23
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.03	0.03	ns	0.02	ns	0.03	ns
6 h	1.63	0.77	0.96	1.27	0.69	1.02	1.61	1.50	1.59	2.01	0.71	1.95	1.05	1.98
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.004	0.002	0.002	$4  imes 10^{-4}$	0.044	0.01	ns	ns
14 h	0.62	0.36	0.99	0.73	0.52	1.06	1.04	0.91	0.84	1.19	0.99	0.67	0.45	1.23
	ns	ns	ns	ns	0.04	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.004	ns
1 day	0.85	0.68	1.041	1.33	0.78	1.21	1.21	0.97	1.09	1.43	0.83	1.89	0.66	3.45
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.03	ns	0.023	0.016	0.002
2 days	1.03	0.92	0.865	1.24	0.61	1.43	1.15	1.09	1.256	1.22	1.14	0.82	1.26	23.20
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.02	ns	ns	ns	ns	0.0016
6 days	1.07	0.88	0.855	1.29	1.06	1.37	1.29	0.76	1.16	1.07	1.42	1.30	1.32	33.33
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.045	0.045	ns	ns	ns	ns	0.007

<sup>a</sup> ns: nonsignificant.



FIGURE 1. Expression levels of metallothionein mRNA in control and Cd exposed (80 or 800 mg/kg) earthworms after 2 h, 6 h, 14 h, 1 day, 2 days, and 6 days of exposure. Legend: blue square: 0 mg/kg; red square: 80 mg/kg; yellow square: 800 mg/kg; \*: significant difference (p < 0.05).

**Real-Time PCR Analysis of Expression of Genes. Expression Analysis of the 14 Effectors.** Three effectors (superoxide dismutase (SOD), PKC2, and transcriptionally controlled tumor protein (TCTP)) did not show any difference in their level of expression following exposures to cadmium (Figures S4–S6, Supporting Information).

Significant differences in terms of gene expression were observed for all the other effectors, either with exposure periods and cadmium concentrations, but some changes of expression were not clear, either transient or not dose-related.

**Metallothionein.** In animals exposed to 80 mg/kg of Cd (Table 1), a significant increase in the quantity of mRNA expressed after 14 h was observed compared to the quantity observed in control animals (p = 0.018). After 1 day of exposure metallothionein (MT) was induced 3.5-fold more than in control worms. Then, mRNA levels were 23- and 33-fold higher after 2 days (p = 0.0016) and 6 days (p = 0.007) of exposure, respectively (Figure 1).

When animals were exposed to 800 mg/kg of Cd, the induction pattern was quite similar. Gene induction started earlier, and significant inductions (8-fold, 67-fold, 108-fold, and 205-fold) were observed after 14 h, 1 day, 2 days, and 6 days of exposure, respectively (Table 2, Figure 1).

**Catalase.** The catalase (CAT) showed a different pattern of induction (Figure 2). No dose effect relationship was observed for this effector.

In worms exposed to 80 mg/kg of Cd, an increase in the mRNA level was observed after 2 h (p = 0.033) compared to the controls. A significant decrease in the mRNA level after 14 h of exposure (p = 0.004) was also noticed. Thereafter, the level of expression returned toward values close to those observed for control animals.

A quite similar pattern was demonstrated when worms were exposed to 800 mg/kg excepted that the increase was observed after 6 h of exposure (p = 0.019) and the significant decrease in mRNA level after 14 h of exposure (p = 0.019).

**Protein Kinase C1 and Pyruvate Carboxylase.** No significant difference was observed between controls and worms exposed to 80 mg/kg except for a decrease after 14 h for pyruvate carboxylase (PyC) (Figure S8, Supporting Information) (p = 0.04 and p > 0.05 in all cases). For the exposure of 800 mg/kg, we observed increases in mRNA levels after 14 h (p = 0.03), 1 day (p = 0.046), and 6 days (p = 0.03) for PKC1 (Figure S7, Supporting Information) and after 1 (p = 0.015), 2 (p = 0.049), and 6 days (p = 0.012) of exposure for pyruvate carboxylase.

Calmodulin 16-1 and 16-2. Some differences were assessed between control and exposed *E. fetida*.

At 80 mg/kg, an increase in mRNA quantity after 6 h of exposure (p = 0.004) for the effector Calm 16-2 (Figure S10, Supporting Information) was reported.

In worms exposed to 800 mg/kg increases after 6 days (p = 0.04) of exposure for Calm 16-1 (Figure S9, Supporting Information) and after 6 h (0.002) and 1 day (p = 0.002) for Calm 16-2 (Figure S10, Supporting Information) were noted.

β-Adrenergic Receptor Kinase 1-4 and 2-3. For β-ark 1-4, significant increases in mRNA levels between control and worms exposed for 2 h (p = 0.03) and 6 h (p = 0.002) to 80 mg/kg Cd were observed (Figure S11, Supporting Information). Results for the other exposure periods were not significant.

At 800 mg/kg, no significant difference was observed ( p > 0.05) in all cases.

For  $\beta$ -ark 2-3 (Figure S12, Supporting Information), results are quite similar to those obtained with  $\beta$ -ark 1-4 in animals exposed to 80 mg/kg of Cd (Figure S11, Supporting Information). Observations were therefore comparable between the two concentrations of Cd in soil.

**Ubiquitin.** For exposure times of 6 h and 1 day, significant increases in the quantity of mRNAs both at 80 mg/kg (p = 0.0004 after 6 h and p = 0.027 after 1 day) and 800 mg/kg (p = 0.034 after 6 h and p = 0.00011 after 1 day) were reported (Figure S13, Supporting Information). For exposure times longer than 1 day, the mRNA quantity returned to the basal level.

A 3-fold increase was observed after 1 day of exposure to 800 mg/kg of cadmium in artificial substrate (p = 0.00011).

TABLE 2. Induction Factors and $p$ Values for Animals Exposed to 800 mg/kg Cadmium <sup>a</sup>														
	SOD	PKC2	тстр	PKC1	PyC	Calm 16-1	Calm 16-2	Bark 1-4	Bark 2-3	Ubiq	HSP 70	HSP 60	CAT	МТ
2 h	1.09	0.83	1.25	1.39	1.35	1.07	1.132	1.30	1.13	1.06	1.34	0.93	1.31	1.52
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.03	ns	ns	ns
6 h	1.17	0.70	0.98	1.27	1.06	1.42	1.48	1.39	1.51	1.34	1.06	1.42	1.72	1.62
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.002	ns	0.003	0.03	ns	ns	0.02	ns
14 h	0.73	0.65	1.28	1.79	1.16	0.791	0.95	0.93	1.05	1.12	1.80	1.32	0.72	7.98
	ns	ns	ns	0.03	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.045	ns	0.02	0.04
1 day	1.04	2.03	1.08	1.45	1.63	1.35	1.85	2.26	1.94	3.03	1.23	2.23	0.77	67.22
,	ns	ns	ns	0.046	0.015	ns	0.002	0.04	$4 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-4}$	ns	0.01	0.03	$3  imes 10^{-5}$
2 days	1.04	1.55	1.36	1.25	1.47	1.32	1.35	1.07	1.11	1.53	1.39	1.158	1.36	108.20
,	ns	ns	ns	ns	0.049	ns	ns	ns	0.02	ns	0.046	ns	ns	$4 \times 10^{-5}$
6 days	1.89	1.06	1.65	2.20	2.54	2.215	1.18	1.29	1.15	2.12	1.36	3.02	0.98	205.80
,	ns	ns	ns	0.03	0.012	0.04	ns	0.015	0.045	$1  imes 10^{-5}$	0.046	$6  imes 10^{-4}$	ns	$2  imes 10^{-5}$

<sup>a</sup> ns: nonsignificant.



FIGURE 2. Expression levels of catalase mRNA in control and Cd exposed (80 or 800 mg/kg) earthworms after 2 h, 6 h, 14 h, 1 day, 2 days, and 6 days of exposure. Legend: blue square: 0 mg/kg; red square: 80 mg/kg; yellow square: 800 mg/kg; \*: significant difference (p < 0.05).



FIGURE 3. Expression levels of heat shock protein 70 mRNA in control and Cd exposed (80 or 800 mg/kg) earthworms after 2 h, 6 h, 14 h, 1 day, 2 days, and 6 days of exposure. Legend: blue square: 0 mg/kg; red square: 80 mg/kg; yellow square: 800 mg/kg; \*: significant difference (p < 0.05).

Heat Shock Protein (HSP) 70. A significant increase in the quantity of mRNA was observed after 2 h of exposure to 80 mg/kg (p = 0.017) (Figure 3). After 6 h, a decrease in the quantity of mRNA was evidenced (p = 0.044). Thereafter, there was a return to a level comparable to those observed in control animals.

For 800 mg/kg no variation of expression was reported.

**HSP 60.** After a significant increase at 6 h (p = 0.011) then, a return to control levels, an induction of HSP 60 was observed after 1 day of exposure to 80 mg/kg (p = 0.023). Animals exposed longer than 1 day did not show significant variations compared to controls (Figure 4).

For 800 mg/kg exposure, the induction pattern was completely different. Indeed, the point corresponding to 6 days exposure showed a significant difference compared to controls (p = 0.0006). At this point, HSP 60 exhibited a significant increase in the number of messengers (3-fold higher) compared to controls.

All the results presented and summarized in Tables 1 and 2 are those corresponding to the expression of the cloned effectors compared to the housekeeping gene  $\beta$ -actin. A second constitutively expressed gene was cloned and used: the ribosomal protein S13. Results obtained with  $\beta$ -actin and the ribosomal protein S13 were comparable (data not shown).



FIGURE 4. Expression levels of heat shock protein 60 mRNA in control and Cd exposed (80 or 800 mg/kg) earthworms after 2 h, 6 h, 14 h, 1 day, 2 days, and 6 days of exposure. Legend: blue square: 0 mg/kg; red square: 80 mg/kg; yellow square: 800 mg/kg; \*: significant difference (p < 0.05).

#### Discussion

This work was based on the description of proteinic effectors in invertebrates. Effectors were selected among highly preserved proteins for which variations (in terms of protein quantity and/or expression) following a metal exposure were reported in the literature (18, 26). Although present in most macroinvertebrates, most of the proteins we selected had not yet been cloned in the invertebrate laboratory model *Eisenia fetida*. In this study, 14 potential biomarkers were partially cloned in our biological model, and an expression of each gene was then studied using real time PCR after in vivo exposure to Cd in artificial soil. Since the majority of the selected effectors are known to be implied in defense mechanisms, immune circulating cells of the coelomic cavities, i.e. the coelomocytes, were used.

After extraction of total RNA of coelomocytes, no difference between the quantities of extracted RNA for the two Cd concentrations was observed. However, a significant reduction of the quantity of RNA extracted from cells obtained at 6 days of exposure to 80 and 800 mg/kg of Cd was noticed. This decrease could be explained by a loss of viability of coelomocytes. Indeed, authors (27, 28) have shown that the activity and the viability of coelomocytes were affected in other oligochete annelids such as Allolobophora chlorotica and Lumbricus terrestris following metal contaminations (copper, zinc, cadmium, and lead). In E. fetida, one can observe three different types of coelomocytes according to the examination of coelomic cells obtained by extrusion (29): granulocytes, amoebocytes, and eleocytes. The significant reduction in the quantity of extracted RNA could correspond to a reduction in the viability of one or the other cell type. However, coelomocytes collected by extrusion seem completely viable since they allowed the collection of large quantities of RNA. Moreover the study of the expression carried out thereafter proves that the coelomocytes are perfectly viable. The heterogeneity of the cellular population of coelomocytes must be taken into account for the study of the messengers present following an exposure of the worms to cadmium. Induction of some effectors could be effective in one of the three cell types only.

During the analysis of sequences, two related but distinct sequences for three (PKC, Calm,  $\beta$ -ark) of the selected genes were obtained. It is not surprising since it has been demonstrated in other species that these genes were polygenic (*30*). Two related genes can exhibit specific responses toward the same stress or stimulus. For instance, it has been shown in mammals that three distinct genes coding a slightly different Calm protein were differentially regulated at the transcriptional level (*31*). For this reason, we choose to measure the expression of all cloned genes following Cd exposure.

The cloning by RT-PCR followed by real-time PCR allowed for identifying effectors which expression varies following soil exposure to cadmium. Real-time PCR was a method allowing a reliable and fast quantification of gene expression, compared to northern-blot and semiquantitative PCR methods. Other techniques, especially qualitative or semiquantitative methods based on the immunological detection of proteins, such as Dot Blot or Western Blot (*32*), allowed for determination if a protein was regulated at a post-transcriptional level.

Some of the analyzed effectors did not show significant variations of expression level in response to Cd exposures: pyruvate carboxylase, protein kinase C, calmodulin, ubiquitin (Ubiq),  $\beta$ -adrenergic receptor kinase superoxyde dismutase, and transcriptionally controlled tumor protein. However, variations of expression of these genes in other organs, especially those implied in detoxification processes such as the chloragogenous tissue (33) or intestinal tract (34), could not be excluded. Complementary studies are in progress in order to analyze gene expression in other tissues.

Stürzenbaum et al. (*26*) demonstrated that the expression of TCTP could be induced by a metal stress in *Lumbricus rubellus*. These authors demonstrated that TCTP was slightly up-regulated in a population originating from a Pb/Zn/Cd polluted mine and heavily up-regulated in a population native to a copper polluted mine. In the present study, *E. fetida* did not exhibit variation of the expression level of TCTP following Cd exposures. It must be noted that animals used were not originating from a polluted area and that TCTP seemed to be copper specific.

Other effectors presented weak variations as heat shock proteins (HSP 60 and HSP 70). Lewis et al. (32) and Nadeau et al. (35) demonstrated an increase in the quantity of these proteins after a metal exposure in L. terrestris and in E. fetida (36). They proposed HSP as suitable biomarkers of metal exposure despite the difficulty to quantify these proteins. In our study, the two effector expressions did not vary except for HSP 60 for which a significant increase in the level of messenger after 6 days of exposure to 800 mg/kg of Cd was reported. A later induction was not excluded, and studies will have to be carried out using longer exposure times (14 days). Our results seemed in contradiction with those of Nadeau et al. (2001). They showed by immunocytochemistry that the quantity of protein HSP 70 in coelomocytes increased after 3 days of exposure, whereas any variation of messenger RNA quantity at 6 days of exposure was observed here. The regulation might take place at a post-trancriptional level.

Metallothionein gene expression was characterized by a very strong induction (more than 200 times after a 6-day exposure to 800 mg/kg of Cd). Studies reported a proteinic synthesis of this effector after exposure to cadmium in annelids (*36*, *37*). Here, induction was described in a new organ having a major immune role (circulating cells of the coelomic cavity) and was quantified in a precise way. Real-time PCR quantification allowed for the establishment of an induction of the gene coding for metallothionein after 14 h (800 mg/kg) and 24 h (80 mg/kg) of exposure, whereas previous works described a proteinic synthesis only after 1 month (*38*) or more than 1 month of exposure (9).

Catalase, an enzyme implied in oxidative stress, showed a completely different induction pattern characterized by a significant decrease in the quantity of messengers after 14 h of exposure. Enzymatic activity of this effector has been studied (*6*, *12*), and contradictions appear since no or weak variations of activity were assessed. To our knowledge, results presented are the first at the transcriptional level.

Metals, especially cadmium, can have genotoxic effects (*39*) that could result in the appearance of DNA breaks. Authors suggest besides that such breaks measured by the comet assay could affect the expression of genes (*40*). Under our experimental conditions, it was excluded that DNA damage was responsible for changes in expression observed insofar as DNA breaks occurred randomly, and our measurements were carried out from a stock of RNA resulting from several millions of circulating cells themselves extracted from a group of 25 worms.

Real-time PCR quantification of gene expression distinguished metallothionein and catalase among the 14 effectors that we selected and cloned. For these two effectors, we demonstrated early variations of expression (14 or 24 h) whatever the level of Cd contamination in soil (80 or 800 mg/kg). Catalase and metallothionein could thus be considered as early biomarkers of exposure to cadmium. A decrease in the level of expression after 14 h of exposure for the majority of the effectors was also observed. This repression appears as a general tendency indicating an energetic costeffective response of individuals. Sokolova et al. (41) described a significant decrease (60-80%) of levels of intracellular ATP related to severe disturbances of cellular energetic status. Duquesne et al. (42) suggested that the fitness (or selective value) of the individuals was reached during a sublethal exposure to Cd. A significant reduction in the glycogen concentration in the exposed invertebrates was also observed. Existence of a metabolic cost of the synthesis of metallothionein and of the transport of metals toward subcellular sites of sequestration or in other cell types was also reported (43). In addition to its role in metal detoxification, metallothionein played a secondary antioxidant role with respect to the reactive species of oxygen formed following an exposure to cadmium (44). The assumption of consecutive cellular effects to the synthesis of metallothionein such as a tradeoff should have to be investigated in further studies.

#### Acknowledgments

The technical assistance of Régine Leroux is gratefully acknowledged. The present study was supported by a grant from the Région Nord-Pas-de-Calais, « Program de Recherches Concertées: Sites et sols pollués-Environnement et Activités Humaines ». F.B was supported by a doctoral fellowship from ADEME (Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie).

#### **Supporting Information Available**

Complementary data tables containing primer sequences, Genbank accession numbers, amplification efficiencies, and expression levels of genes following cadmium exposures. This material is available free of charge via the Internet at http:// pubs.acs.org.

#### **Literature Cited**

- Weeks, J. M. The value of biomarkers for ecological risk assessment: academic toys or legislative tools? *Appl. Soil Ecol.* 1995, 2, 215–216.
- (2) Lagadic, L.; Caquet, T.; Amiard, J. C.; Ramade, F. *Biomarqueurs* en écotoxicologie, aspects fondamentaux, Collection "Recherche en Biologie"; Masson, Ed.; Paris, 1997; 419p.
- (3) Darwin, C. R. *The formation of vegetable mould, through the action of worms*; Murray, J., Ed.; London, 1883.
- (4) OECD. OECD guideline for testing chemicals. Section 2: effects on biotic systems. Method, 207. Earthworm, acute toxicity tests. Paris, France; 1984.
- (5) Dominguez, J. In *Earthworm Ecology*; CRC Press: Boca Raton, FL, 2004; pp 401–424.
- (6) Labrot, F.; Ribera, D.; Saint-Denis, M.; Narbonne, J. F. In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxydation, acetylcholinesterase and glutathione peroxydase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers* 1996, 1, 21–28.
- (7) Grelle, C.; Descamps, M. Heavy metal accumulation by *Eisenia fetida* and its effects on Glutathione-S-Transferase activity. *Pedobiologia* 1998, 42, 289–297.
- (8) Abdul Rida, A. M. M.; Bouché, M. B. The eradication of earthworm genus by heavy metal in southern France. *Appl. Soil Ecol.* **1995**, *2*, 45–52.
- (9) Spurgeon, D. J.; Stürzenbaum, S. R.; Svendsen, C.; Hankard, P. K.; Morgan, A. J.; Weeks, J. M.; Kille, P. Toxicological, cellular and gene expression responses in earthworms exposed to copper and cadmium. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Pharmacol., Toxicol. Endocrinol.* 2004, 138, 11–21.
- (10) Spurgeon, D. J.; Hopkin, S. P. Effects of metal- contaminated soils on the growth, sexual development, and early cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*, with particular reference to zinc. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1996**, *35*, 86–95.
- (11) Lukkari, T.; Taavitsainen, M.; Väisänen, A.; Haimi, J. Effects of heavy metals on earthworms along contamination gradients in organic rich soils. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2004**, 59.
- (12) Laszczyca, P.; Augustyniak, M.; Babczynska, A.; Bednarska, K.; Kafel, A.; Migula, P.; Wilczek, G.; Witas, I. Profiles of enzymatic activity in earthworms from zinc, lead and cadmium polluted areas near Olkusz (Poland). *Environ. Int.* **2004**, *30*, 901–910.
- (13) Lukkari, T.; Taavitsainen, M.; Soimasuo, M.; Oikari, A.; Haimi, J. Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure: differences between populations with and without earlier exposure. *Environ. Pollut.* **2004**, *19*, 377–386.
- (14) Fisher, W. S.; Oliver, L. M.; Winstead, J. T.; Volety, A. K. Stimulation of defense factor for oysters deployed to contaminated sites in Pensacola Bay, Florida. *Aquat. Toxicol.* **2003**, *64*, 375–391.
- (15) Sauvé, S.; Hendawi, M.; Brousseau, P.; Fournier, M. Phagocytic response of terrestrial and aquatic invertebrates following in vitro exposure to trace elements. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2003, *52*, 21–29.
- (16) Fugère, N.; Brousseau, P.; Krzystyniak, K.; Coderre, D.; Fournier, M. Heavy metal-specific inhibition of phagocytosis and different *in vitro* sensitivity of heterogeneous coelomocytes from *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Toxicology* **1996**, *109*, 157–166.
- (17) Sauvé, S.; Fournier, M. Age-specific immunocompetence of the earthworm *Eisenia andrei*: exposure to methylmercury chloride. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2005**, *60*, 67–72.
- (18) Liao, V. L. C.; Freedman, J. H. Cadmium-regulated Genes from the Nematode *Caenorhabditis elegans*. Identification and cloning of new cadmium-responsive genes by differential display. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 31962–31970.
- (19) Demuynck, S.; Grumiaux, F.; Mottier, V.; Schikorski, D.; Descamps, M.; Leprêtre, A., Metallothionein response following cadmium and zinc exposures in *Eisenia fetida*. SETAC Europe, 15th annual meeting, 22–26 May 2005, Lille.
- (20) Honeycutt, M. E.; Roberts, B. L.; Roane, D. S. Cadmium disposition in the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicol*. *Environ*. *Saf.* **1995**, *30*, 143–150.
- (21) Hendawi, M.; Sauvé, S.; Ashour, M.; Brousseau, P.; Fournier, M. A new ultrasond protocol for extrusion of coelomocyte cells from the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicol*. *Environ*. *Saf*. **2004**, 59, 17–22.
- (22) Corpet, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 10881–10890.
- (23) Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence

alignment throught sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4673–4680.

- (24) Rose, T. M.; Schultz, E. R.; Henikoff, J. G.; Pietrokovski, S.; McCallum, C. M.; Henikov, S. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 1628–1635.
- (25) Ricketts, H. J.; Morgan, A. J.; Spurgeon, D. J.; Kille, P. Measurement of annetocin gene expression: a new reproductive biomarker in eartworm ecotoxicology. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2004, 57, 4–10.
- (26) Stürzenbaum, S. R.; Kille, P.; Morgan, A. J. Identification of heavy metal induced changes in the expression patterns of the translationally controlled tumour protein (TCTP) in the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1998, 1398, 294–304.
- (27) Bursh, S. W.; Fitzpatrick, A. J.; Goven, A. J.; Venables, B. J.; Giggleman, M. A. In vitro earthworm *Lumbricus terrestris* coelomocyte assay for use in terrestrial toxicity identification evaluation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1999**, *62*, 547–554.
- (28) Homa, J.; Niklinska, M.; Plytycz, B. Effect of heavy metals on coelomocytes of the earthworm *Allolobophora chlorotica*. *Pedobiologia* 2003, 47, 640–645.
- (29) Di Marzio, W. D.; Saenz, M. E.; Lemière, S.; Vasseur, P. Improved single cell gel electrophoresis assay for the earthworm *Eisenia foetida*. *Environ. Mol. Mutagen.* **2005**, *46*, in press.
- (30) Courjaret, R.; Grolleau, F.; Lapied, B. Two distinct calciumsensitive and -insensitive PKC up- and down-regule an alphabungarotoxin-resistant nAChR1 in insect neurosecretory cells (DUM neurons). *Eur. J. Neurosci.* 2003, *17*, 2023–2034.
- (31) Kortvely, E.; Gulya, K. Calmodulin, and various ways to regulate its activity. *Life Sci.* **2003**, *74*, 1065–1070.
- (32) Lewis, S.; Handy, R. D.; Cordi, B.; Billinghurst, Z.; Depledge, M. H. Stress proteins (HSP's): methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology* **1999**, *8*, 351– 368.
- (33) Morgan, A. J.; Stürzenbaum, S. R.; Winters, C.; Grime, G. W.; Nor Azwady Abd, A.; Kille, P. Differential metallothionein expression in earthworm (*Lumbricus rubellus*) tissues. *Ecotoxi*col. Environ. Saf. 2004, 57, 11–19.
- (34) Stürzenbaum, S. R.; Winters, C.; Galay, M.; Morgan, A. J.; Kille, P. Metal ion trafficking in earthworms. Identification of a cadmium-specific metallothionein. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 34013–34018.

- (35) Nadeau, D.; Corneau, S.; Plante, I.; Morrow, G.; Tanguay, R. M. Evaluation for Hsp70 as a biomarker of effect of pollutants on the earthworm *Lumbricus terrestris. Cell Stress Chaperones* 2001, *6*, 153–163.
- (36) Homa, J.; Olchawa, E.; Stürzenbaum, S. R.; Morgan, A. J.; Plytycz, B. Early-phase immunodetection of metallothionein and heat shock proteins in extruded earthworm coelomocytes after dermal exposure to metal ions. *Environ. Pollut.* 2005, 135, 275– 280.
- (37) Willuhn, J.; Otto, A.; Schmitt-Wrede, H.-P.; Wunderlich, F. Earthworm gene as indicator of bioefficacious cadmium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *220*, 581–585.
- (38) Stürzenbaum, S. R.; Kille, P.; Morgan, A. J. The identification, cloning and characterization of earthworm metallothionein. *FEBS Lett.* **1998**, 431, 437–442.
- (39) Dally, H.; Hartwig, A. Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis* **1997**, *18*, 1021–1026.
- (40) Lemière, S.; Cossu-Leguille, C.; Chaty, S.; Rodius, F.; Bispo, A.; Jourdain, M. J.; Lanhers, M. C.; Burnel, D.; Vasseur, P. Genotoxic and CYP1A enzyme effects consecutive to the food transfer of oil spill contaminants from mussels to mammals. *Aquat. Living Resour.* 2004, 17, 303–307.
- (41) Sokolova, I. M.; Evans, S.; Hughes, F. M. Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* **2004**, *207*, 3369–3380.
- (42) Duquesne, S.; Liess, M.; Bird, D. J. Sub-lethal effects of metal exposure: physiological and behavioural responses of the estuarine bivalve *Macoma balthica*. *Mar. Environ. Res.* **2004**, *58*, 245–250.
- (43) Marino, F.; Morgan, A. J. Equilibrated body metal concentrations in laboratory exposed earthworms: can they be used to screen candidate metal-adapted population? *Appl. Soil Ecol.* **1999**, *12*, 179–189.
- (44) Anderson, R. S.; Patel, K. M.; Roesijadi, G. Oyster metallothionein as an oxyradical scavenger: implications for hemocyte defense responses. *Dev. Comp. Immunol.* **1999**, *23*, 443–449.

Received for review November 15, 2005. Revised manuscript received February 14, 2006. Accepted February 17, 2006.

ES052299X

## **Supporting Information**

## Cloning and real-time PCR testing of 14 potential biomarkers in *Eisenia fetida* following cadmium exposure

F. Brulle, G. Mitta, C. Cocquerelle, D. Vieau, S. Lemière, A. Leprêtre, F. Vandenbulcke\*

Number of text pages: 0

Number of figures: 11

Number of tables: 2

Effectors	Primers	GenBank <sup>™</sup> accession no.
Calmodulin	calm-1_for 5'-CCGAGCTGCAGGACATGATHAAYGA-3' calm-2_rev 5'-CGGCCTCCCGGATCATYTCRTC-3'	DQ286708 DQ286709
Hsp60	hsp60-3_for 5'-GCCATCGAGCTGAAGGACAARTDBCARAA-3' hsp60-4_rev 5'-GCGGAGATGGTGGCCACYTGNGCDAT-3'	DQ286710
Hsp70	hsp70-5_for8 5'-TTTACCACCTACTCGGACAAC-3' hsp70-6_rev8 5'-TTGAGCTTCTCATCCTCGAC-3'	DQ286711
Superoxyde Dismutase	sod-3_for 5'-TGACCCCAGGCAAGCAYGGNTTYCA-3' sod-4_rev 5'-CCGGGCGCCGGYRTTNCCNGT-3'	DQ286712
Catalase	cata-1_for 5'-GCGGCCCGAGACCACNCAYCARGT-3' cata-2_rev 5'-GATCTGCTCCACCTCGGCRAARWARTT-3'	DQ286713
Metallothionein	MEF-1_for 5'-CGCAAGAGAGGGATCAACTT-3' MEF-2_rev 5'-CTATGCAAAGTCAAACTGTC-3'	DQ286714
Ubiquitin	ubiq-1_for 5'-TGAAGGCCAAGATCCAGGAYAARGARGG-3' ubiq-2_rev 5'-GCCGGTCAGGGTCTTCACRAADATYTGCA-3'	DQ286715
РКС	pkc-1_for 5'-ACGTGATCATCCAGGACGAYGAYGTNGA-3' pkc-2_rev 5'-GATGTAGTCGGGGGGGGCCRCARAANGT-3'	DQ286716 DQ286717
Pyruvate Carboxylase	pycarb-1_for 5'-CAAGGTGATGGTGGCCAACMGNGGNGARAT-3' pycarb-2_rev 5'-CGGGCGGCCACCTTRTCNCCCAT-3'	DQ286718
β-ark	$\beta$ -ark-1_for 5'-GACGTGTCCTACCTGATGGCNATGGARA-3' $\beta$ -ark-2_rev 5'-AGCTGCATGTTCAGCTCCARRTTYTTCCA-3'	DQ286719 DQ286720
ТСТР	TCTP-3_for 5'-TGACGGGCGTGGACATHGTNATGAA-3' TCTP-4_rev 5'-CCAGGCCGTGCTTGAARAADAWCAT-3'	DQ286721
β-actin	β-actin3_for 5'-TCTCCACCTTCCAGCAGATG-3' β-actin2_rev 5'-CGAAAAATGTCCTCCGCAAG-3'	DQ286722

Table S1 : Sequences of Primers used to partially cloned effectors in Eisenia fetida

IUB code for mixed base sites: N = A, C, G, T D = G, A, T H = A, T, C W = A, T M = A, C R = G, T Y = C, T

#### Selected gene Amplification efficiency PKC 2......2 β-ark 1-4.....2

Table S2 : Amplification efficiencies of selected genes for Real-Time PCR.



**Figure S3 :** Quantities of RNA extracted from exposed (80 or 800 mg/kg) earthworms after 2 hours, 6 hours, 14 hours, 1 day, 2 days and 6 days. **\*** : significant difference (p<0.05)



**Figure S4 :** Expression levels of Superoxide Dismutase mRNA in control and Cd exposed (80 or 800 mg/kg) earthworms after 2 hours, 6 hours, 14 hours, 1 day, 2 days, 6 days of exposure

Legend : : 0 mg/kg; : 80 mg/kg; : 800 mg/kg; : Significant difference (p<0.05)



**Figure S5 :** Expression levels of Protein Kinase C 2 mRNA in control and Cd exposed (80 or 800 mg/kg) earthworms after 2 hours, 6 hours, 14 hours, 1 day, 2 days, 6 days of exposure Legend : : 0 mg/kg; : 80 mg/kg; : 800 mg/kg; \* : Significant difference (p<0.05)



**Figure S6** : Expression levels of TCTP mRNA in control and Cd exposed (80 or 800 mg/kg) earthworms after 2 hours, 6 hours, 14 hours, 1 day, 2 days, 6 days of exposure

Legend : : 0 mg/kg; : 80 mg/kg; : 800 mg/kg; : Significant difference (p<0.05)



**Figure S7 :** Expression levels of Protein Kinase C 1 in control and Cd exposed (80 or 800 mg/kg) earthworms after 2 hours, 6 hours, 14 hours, 1 day, 2 days, 6 days of exposure Legend : : 0 mg/kg; : 80 mg/kg; : 800 mg/kg; : Significant difference (p<0.05)



**Figure S8 :** Expression levels of Pyruvate Carboxylase mRNA in control and Cd exposed (80 or 800 mg/kg) earthworms after 2 hours, 6 hours, 14 hours, 1 day, 2 days, 6 days of exposure Legend : : 0 mg/kg; : 80 mg/kg; : 800 mg/kg; \* : Significant difference (p<0.05)



**Figure S9 :** Expression levels of Calmoduline 16-1 mRNA in control and Cd exposed (80 or 800 mg/kg) earthworms after 2 hours, 6 hours, 14 hours, 1 day, 2 days, 6 days of exposure Legend : : 0 mg/kg; : 80 mg/kg; : 800 mg/kg; \* : Significant difference (p<0.05)



**Figure S10 :** Expression levels of Calmoduline 16-2 mRNA in control and Cd exposed (80 or 800 mg/kg) earthworms after 2 hours, 6 hours, 14 hours, 1 day, 2 days, 6 days of exposure Legend : : 0 mg/kg; : 80 mg/kg; : 800 mg/kg; \* : Significant difference (p<0.05)

65



**Figure S11 :** Expression levels of  $\beta$ -Adrenergic Receptor Kinase 1-4 mRNA in control and Cd exposed (80 or 800 mg/kg) earthworms after 2 hours, 6 hours, 14 hours, 1 day, 2 days, 6 days of exposure

Legend :  $\square$  : 0 mg/kg;  $\square$  : 80 mg/kg;  $\square$  : 800 mg/kg; \* : Significant difference (p<0.05)

**S11** 



**Figure S12 :** Expression levels of  $\beta$ -Adrenergic Receptor Kinase 2-3 mRNA in control and Cd exposed (80 or 800 mg/kg) earthworms after 2 hours, 6 hours, 14 hours, 1 day, 2 days, 6 days of exposure

Legend : : 0 mg/kg; : 80 mg/kg; : 800 mg/kg; : Significant difference (p<0.05)



**Figure S13 :** Expression levels of Ubiquitin mRNA in control and Cd exposed (80 or 800 mg/kg) earthworms after 2 hours, 6 hours, 14 hours, 1 day, 2 days, 6 days of exposure Legend : : 0 mg/kg; : 80 mg/kg; : 800 mg/kg; \* : Significant difference (p<0.05)

#### **Publication 2**

The strong induction of metallothionein gene following cadmium exposure transiently affects the expression of many genes in *Eisenia fetida*: A trade off mechanism?, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.* 2007, Vol. 144, 334–341

Une variation d'expression dans d'autres organes et plus particulièrement dans les épithélia de contact avec le sol contaminé, *i.e.* principalement l'épiderme, le tractus digestif ou le tissu chloragogène qui entoure le tractus digestif ne pouvant pas être négligé, dans la deuxième partie de ce chapitre nous présentons l'analyse du niveau d'expression des candidats sélectionnés sur individus entiers.

Ainsi, des groupes de 6 individus ont été exposés aux mêmes concentrations de Cd que celles utilisées lors de l'étude sur cœlomocytes. A cela s'ajoute le clonage et l'analyse du niveau d'expression d'un nouveau candidat biomarqueur. En effet, le gène codant la cyclophiline-A, une enzyme appartenant à la superfamille des immunophilines, a été identifié dans la littérature comme variant chez *Lumbricus rubellus*, une espèce proche d'*Eisenia fetida*, lors d'un stress métallique (Stürzenbaum *et al.*, 1999). De plus, des expositions à trois concentrations de Cu (40, 120 et 400 mg Cu/kg) ont été réalisées en parallèle. En effet, une analyse complémentaire de la littérature a permis de mettre en lumière que certains candidats étudiés lors d'intoxications au Cd pouvaient également être inductibles par le Cu. C'est le cas de la *Cd-mt*, du *tctp* et de la *cyclophiline-A* (Stürzenbaum *et al.*, 1998a, 1998b; Stürzenbaum *et al.*, 1999; Galay-Burgos *et al.*, 2003). Enfin, chacun des effecteurs a fait l'objet d'une exposition plus longue que celle réalisée lors de l'étude sur les cellules circulantes de la cavité cœlomique, jusque 14 jours au lieu de 6. Cet allongement de la période d'exposition avait pour but de ne pas négliger une induction plus tardive qui pourrait survenir pour l'un des candidats.

Les résultats de cette étude ont montré que parmi tous les effecteurs étudiés seul le gène *Cd-mt* était caractérisé par une induction précoce et massive de son niveau d'expression quelque soit le niveau de contamination considéré lors d'expositions aux sols contaminés par le Cd (plus de 5 fois après 14 heures d'exposition à 80 mg Cd/kg et plus de 3 fois après 6 heures d'exposition à 800 mg Cd/kg). Ces résultats sont similaires à ceux observés sur les cœlomocytes, cependant l'induction de *Cd-mt* observée au niveau de l'individu entier est plus précoce. De plus, un maximum d'induction était rapidement atteint après 2 jours d'exposition à 800 mg Cd/kg. Cette forte induction qui est maintenue tout au long de l'exposition (14 jours) peut être interprétée comme un phénomène d'acclimatation, c'est-à-dire un phénomène physiologique permettant à un organisme d'être plus tolérant lors d'une exposition à un

contaminant. Ici, la synthèse massive de protéines impliquées dans les mécanismes de détoxication telle que la Cd-MT permettrait de rendre les individus tolérants à une contamination métallique.

Lorsque les vers étaient exposés à des sols artificiellement contaminés par le Cu, la *Cd-mt* montrait une augmentation significative de son niveau d'expression pour les concentrations de 120 et 400 mg Cu/kg. En effet, la quantité d'ARNm codant la Cd-MT était jusqu'à 16 fois supérieure à celle observée chez les vers témoins. Ces résultats démontrent l'existence d'une réponse dose-dépendante du gène *Cd-mt* pour des concentrations sub-létales de Cu chez *Eisenia fetida*.

Enfin, au-delà des résultats non informatifs obtenus pour la plupart des effecteurs, il est intéressant de noter une diminution significative du niveau d'expression de 13 des 15 effecteurs étudiés après 14 heures d'exposition à 800 mg Cd/kg. Une telle répression a également été observée pour 9 effecteurs chez les individus exposés depuis 2 jours à 80 mg Cd/kg. Cette répression peut être mise en relation avec l'induction massive de *Cd-mt* se produisant aux mêmes moments. Lors d'un stress métallique intense, la synthèse de la Cd-MT pourrait se faire temporairement au détriment d'autres protéines non-essentielles. Ainsi, l'énergie détournée pour la synthèse accrue de Cd-MT protégerait les organismes des effets toxiques du Cd. Ce phénomène nommé Trade-off constituerait une réponse globale des organismes à une situation de stress intense.



Available online at www.sciencedirect.com





Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 144 (2007) 334-341

# The strong induction of metallothionein gene following cadmium exposure transiently affects the expression of many genes in *Eisenia fetida*: A trade-off mechanism?

F. Brulle<sup>a</sup>, G. Mitta<sup>b</sup>, R. Leroux<sup>a</sup>, S. Lemière<sup>a</sup>, A. Leprêtre<sup>a</sup>, F. Vandenbulcke<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire d'Ecologie Numérique et d'Ecotoxicologie, EA 3570, Université de Lille 1, Cité scientifique, Batiment SN3, 59655 Villeneuve d'Asca cedex, France

> <sup>b</sup> Parasitologie Fonctionnelle et Evolutive, UMR 5555, CNRS Université de Perpignan, 52 avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan cedex, France

Received 29 June 2006; received in revised form 13 October 2006; accepted 19 October 2006 Available online 27 October 2006

#### Abstract

Metal pollution causes disturbances at various levels of biological organization in most species. Important physiological functions could be affected in the exposed individuals and among the main physiological functions, immunity may provide one (or more) effector(s) whose expression can be directly affected by a metal exposure in various macroinvertebrates. Protein expressions were studied in order to test them as molecular biomarkers of metal exposure in *Eisenia fetida*. Selected effectors were calmodulin, heat shock proteins, superoxide dismutase, catalase, metallothionein,  $\beta$ -adrenergic receptor kinase, pyruvate carboxylase, transcriptionally controlled tumor protein, protein kinase C, ubiquitin and cyclophilin-A. The level of expression of each gene was analysed in whole organism following exposures to cadmium in soil using real-time PCR. Metallothionein, transcriptionally controlled tumor protein and cyclophilin-A expression were also measured following copper exposures in soil because these genes seemed to be sensitive to copper. This work enabled to distinguish metallothionein and cyclophilin-A among the 15 selected effectors. A strong decrease of the number of transcripts was also detected for most effectors soon after the exposure to cadmium suggesting that a trade-off mechanism occurs.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Metal exposure; Biomarker; Protein expression; Eisenia fetida; Trade-off

#### 1. Introduction

In most organisms, tolerance to metal trace elements depends, at least partly, on the induction of genes coding molecules that are able to fix metals. Among these molecules, metallothioneins (MT), cysteine-rich proteins of low molecular weight (6000–8000 Da), characterized by the absence of aromatic amino acids, are known to be implicated in the detoxification process of metal trace elements such as cadmium (Cd) and in the homeostasis of essential metals such as zinc (Klassen et al., 1999; Palmiter,

1998). Estimating the impact of metals on soil macroinvertebrates by methods using detection of MT or other proteins conferring a resistance to metals is a strategy developed by different laboratories. Indeed, MT-expression is induced by metals in many species such as *Lumbricus rubellus* (Stürzenbaum et al., 2004) and *Eisenia fetida* (Demuynck et al., 2005, 2006) both Annelida Oligocheta, in nematodes such as *Caenorhabditis elegans* (Liao and Freedman, 1998), or in springtails such as *Orchesella cincta* (Timmermans et al., 2005).

Recently, the high degree of conservation of defense protein actors allowed the cloning and study of the expression of 14 effectors in the laboratory model *E. fetida* using real-time PCR (Brulle et al., 2006). Moreover, implication of most selected effectors in defense mechanisms have lead to the choice of an immune tissue (cells of the coelomic cavities namely coelomocytes) to measure gene expressions. In this previous study, MT,

*Abbreviations:* Calm, Calmodulin; HSP, heat shock proteins; SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; MT, metallothionein; β-ark, β-adrenergic receptor kinase; PyC, pyruvate carboxylase; TCTP, transcriptionally controlled tumor protein; PKC, protein kinase C; Ubiq, ubiquitin; Cyclo A, cyclophilin-A. \* Corresponding author.

E-mail address: franck.vandenbulcke@univ-lille1.fr (F. Vandenbulcke).

catalase and HSP 60 showed significant variations of their levels of expression (Brulle et al., 2006). The other selected effectors did not show significant variations of expression in coelomocytes. A variation of expression in other organ and especially in epithelia of contact with contaminated soil *i.e.* mainly the epidermis, the digestive tract, or the chloragogenous tissue which surrounds the digestive tract cannot be excluded. For this reason, expressions of effectors were measured on the whole animal using real-time PCR. Moreover, other protein expressions were studied in order to test them as molecular biomarkers of metal exposure. Therefore, TCTP and cyclophilin-A whose expressions vary in L. rubellus exposed to metal pollution (Stürzenbaum et al., 1998, 1999) were chosen. Effectors were cloned and their expressions during experimental exposure were measured in E. fetida. MT, TCTP and cyclophilin-A were also checked on animals subjected to copper exposure, because these genes seemed to be sensitive to copper (Stürzenbaum et al., 1998, 1999; Galay-Burgos et al., 2003). All the experiments were carried on with E. fetida, an easy to breed and handle laboratory model, which is recommended by OECD as a test organism (1984).

#### 2. Materials and methods

#### 2.1. Animals and treatment

Adult earthworms came from the controlled cultures of our laboratory. Worms were bred at an ambient temperature of  $22\pm 2$  °C, in the dark, on vegetable mould with fresh cattle manure as food source. Moisture content was maintained around 60%.

For cadmium and copper exposures, artificial substrates were prepared as described in OECD guideline (1984). Briefly, substrate was composed (percentages refer to dry weight) of 10% sphagnum, 20% kaolinite clay and 70% quartz sand. The pH was adjusted to  $6\pm0.5$  with CaCO<sub>3</sub>. Food was first provided with 0.5% of air dried cow manure and provided every 14 days for longest exposure periods. Cadmium (CdCl<sub>2</sub>) and copper (CuCl<sub>2</sub>) were added to the soil within half an hour of introducing the worms.

Two concentrations (80 and 800 mg/kg) of cadmium and three concentrations (40, 120 and 400 mg/kg) of copper were

tested. The highest concentrations of cadmium and copper, although very high, are below the  $LC_{50}$  (1000 mg/kg for cadmium and 519 mg/kg for copper) reported for *E. fetida* in OECD artificial soil (Honeycutt et al., 1995; Spurgeon et al., 1994). Exposure times were 6 h, 14 h, 1 day, 2 days, 6 days and 14 days, both for cadmium and copper. A longer exposure period of 6 weeks was also conducted with 400 mg/kg of copper in soil.

#### 2.2. RNA extraction and reverse transcription

All expression analyses were conducted on total RNA extracted from 6 worms per condition, using Tri-Reagent (Molecular Research Center, Inc, Cincinnati, USA) according to manufacturer's instructions. RNA purity and integrity controls and reverse transcription were conducted as previously described (Brulle et al., 2006).

#### 2.3. Cloning and sequencing

Partial fragments of most selected effectors have been cloned and characterized in a previous study (Brulle et al., 2006). Sequence data were submitted to GenBank (accession numbers DQ286708-DQ286722). Using the same strategy, degenerate forward (5'-ggt gat ccc caa gtt cat gtg (ct)ca (ag)gg-3') and reverse (5'-cca cca ccc tgc cga a(agct)a c(agct)a c(ag)t-3') primers were designed in order to clone cyclophilin-A in *E. fetida*. A partial fragment sequence was submitted to GenBank (accession number DQ641249).

#### 2.4. Real-time quantitative PCR

Real-time PCR analysis of gene expression was performed on total RNAs extracted from *E. fetida* whole bodies. The expression of fifteen genes (superoxide dismutase, protein kinase C (2 different genes), transcriptionally controlled tumor protein, pyruvate carboxylase, calmodulin (2 different genes),  $\beta$ -adrenergic receptor kinase (2 different genes), ubiquitin, heat shock protein 70, heat shock protein 60, catalase, metallothionein and cyclophilin-A) was measured using real-time PCR. Real-time PCR (RT-PCR) reactions were performed with a

Fable 1	
induction factors and p values observed for the selected effectors in earthworms exposed to 80 mg/kg cadmium in artificial soil	

	SOD	PKC2	TCTP	PKC1	РуС	Calm 16-1	Calm 16-2	Bark 1-4	Bark 2-3	Ubiq	HSP 70	HSP 60	CAT	MT	Cyclo A
6 h	0.91	0.98	0.89	1.05	0.87	0.73	0.74	0.90	0.73	0.70	1.01	0.57	0.42	1.51	0.93
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
14 h	0.64	1.34	0.98	0.69	0.83	0.86	0.78	1.08	1.09	1.29	1.03	0.76	1.28	5.79	0.59
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.031	ns	ns	ns	0.012	0.0016
1 day	0.66	1.07	1.31	0.99	0.57	1.00	0.87	1.18	1.12	1.12	0.92	0.93	0.6	20.32	0.96
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	$3.10^{-4}$	ns
2 days	0.92	1.00	0.59	0.41	0.92	0.53	0.45	0.58	0.55	0.54	0.63	0.7	0.46	24.46	0.66
	ns	ns	0.039	0.026	ns	0.031	ns	0.0046	0.022	0.007	0.029	ns	ns	0.001	0.0056
6 days	0.71	1.15	0.72	0.85	0.70	0.61	0.41	0.70	1.07	0.61	0.75	0.55	0.55	28.61	1.01
2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.02	ns	0.011	ns	ns	ns	0.026	ns
14 days	0.70	0.99	1.06	0.88	0.46	0.71	0.66	0.74	0.62	0.99	1.02	0.75	0.65	63.52	1.81
	ns	ns	ns	ns	0.041	ns	ns	0.02	ns	ns	ns	ns	ns	0.035	$9 \times 10^{-5}$

ns: not significant. All the p values are italicized to enhance the difference with induction factors.
Table 2 Induction factors and p values observed for the selected effectors in earthworms exposed to 800 mg/kg cadmium in artificial soil

		-						-							
	SOD	PKC2	TCTP	PKC1	РуС	Calm 16-1	Calm 16-2	Bark 1-4	Bark 2-3	Ubiq	HSP 70	HSP 60	CAT	MT	Cyclo A
6 h	0.96	1.75	1.14	1.29	0.99	0.86	0.76	1.07	0.84	1.15	0.76	0.90	0.631	2.97	0.80
	ns	0.007	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.009	ns
14 h	0.49	0.073	0.87	0.079	0.096	0.228	0.058	0.04	0.03	0.183	1.03	0.089	0.052	28.19	0.22
	0.046	0.002	ns	0.0056	0.0065	0.0059	0.02	$1.10^{-4}$	0.001	$7.10^{-4}$	0.012	0.035	0.034	0.008	$1 \times 10^{-4}$
1 day	0.58	0.70	0.97	0.83	0.42	0.568	0.62	0.92	0.59	0.764	0.92	1.02	0.88	35	0.68
	ns	ns	ns	ns	0.028	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.013	0.004
2 days	0.97	1.54	1.42	0.99	1.29	0.95	1.00	1.46	1.51	1.15	0.63	2.50	0.94	85.03	0.51
	ns	0.025	ns	ns	ns	ns	ns	0.003	ns	ns	ns	ns	ns	0.013	$7 \times 10^{-4}$
6 days	0.59	0.66	1.27	0.64	0.56	0.74	0.69	0.99	0.86	1.09	0.75	1.54	0.61	76.13	0.66
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.002	0.003
14 days	0.56	1.06	1.90	0.89	0.72	0.66	0.74	0.97	0.91	1.42	1.03	2.12	0.39	80.19	0.47
	ns	ns	0.007	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.03	$5 \times 10^{-4}$

ns: not significant. All the p values are italicized to enhance the difference with induction factors.

LightCycler apparatus (Roche Molecular Biochemicals, Germany) according to previously described procedures (Brulle et al., 2006). For each reaction, the crossing point (CP) was determined using the "fit point method" of the LightCycler software 3.3 (Roche diagnostic). PCR reactions were set in duplicates and the mean value of the CPs were calculated. Level of expression of each target gene (Tg) was compared to the expression of the  $\beta$ -actin (act) gene (accession number DQ286722). The expression ratio (*R*) was calculated according to the formula:  $R = (E_{Tg})^{CPTg}/(E_{act})^{CPact}$ . Another constitutively expressed gene coding the ribosomal protein S13 was used as an additional control.

#### 2.5. Statistical analysis

Expression levels were compared by means of two-way analysis of variance followed by Student post-hoc *t*-tests. Normality of each distribution was verified by Kolmogorov–Smirnov's tests and variance homogeneity by Hartley's tests. An  $\alpha$  level of 0.05 was used in all procedures. All results are expressed as mean±standard error or by the induction factors (expression in exposed worms/expression in control worms).

#### 3. Results

All results presented and summarized in Tables 1, 2, and 3 correspond to the expression of the cloned effectors compared to the housekeeping gene  $\beta$ -actin. A second constitutively expressed gene was used: the ribosomal protein S13. Results obtained with  $\beta$ -actin and ribosomal protein S13 were comparable (data not shown).

3.1. Expression analysis of the effectors after cadmium exposure (Tables 1 and 2)

#### 3.1.1. Metallothionein

In earthworms exposed to 80 mg/kg of Cd in soil (Fig. 1) a significant increase of the quantity of mRNA expressed after 14 h (6 fold; p=0.012) was observed compared to the quantity obtained in control animals. mRNA levels were 20, 24, 28, 63 fold higher after 1 day (p=0.0003), 2 days (p=0.001), 6 days (p=0.026) and 14 days (p=0.035) of exposure respectively. The induction pattern was quite similar in earthworms exposed to 800 mg/kg of Cd in soil, but gene induction started earlier. Significant inductions (3 fold, 28 fold, 35 fold, 85 fold, 76 fold,

Table 3

Induction factors and p values observed for the selected effectors in earthwoms exposed to 40 mg/kg, 120 mg/kg and 400 mg/kg copper

	40 mg/	kg				120 mg	g/kg				400 mg	g/kg			
	TCTP	Bark 2-3	CAT	MT	Cyclo A	TCTP	Bark 2-3	CAT	MT	Cyclo A	ТСТР	Bark 2-3	CAT	MT	Cyclo A
6 h	0.80	0.53	0.71	0.74	0.62	0.70	0.97	0.55	0.61	0.46	0.90	0.38	0.62	0.32	1.07
	ns	0.044	ns	ns	0.031	0.045	ns	ns	ns	0.009	ns	0.043	ns	ns	ns
14 h	1.22	1.30	1.04	0.76	1.24	0.81	0.87	0.55	2.46	0.92	1.03	0.93	1.11	1.88	1.19
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.032	ns	ns	ns	ns	ns	ns
1 day	0.87	0.74	0.44	1.39	0.83	0.74	0.61	0.63	3.38	0.72	1.16	0.99	0.86	5.29	1.06
2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.007	ns	ns	ns	ns	$8 \times 10^{-4}$	ns
2 days	0.71	1.08	0.46	1.24	0.75	1.01	0.98	0.48	6.07	0.70	0.63	1.23	0.4	12.49	1.05
2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	$7 \times 10^{-4}$	ns	ns	ns	0.04	$2.6 \times 10^{-5}$	ns
6 days	1.36	0.84	0.28	1.74	0.60	0.86	0.73	0.71	3.51	0.67	0.76	0.98	0.36	4.82	0.61
2	0.029	ns	0.026	ns	0.023	ns	ns	ns	0.006	0.047	ns	ns	0.034	0.001	0.025
14 days	0.59	0.59	0.55	1.89	0.39	0.64	0.11	0.46	2.89	0.61	0.92	1.03	0.36	7.71	0.88
	0.037	0.032	ns	ns	0.007	0.029	0.013	ns	0.018	0.026	ns	ns	0.034	$2 \times 10^{-4}$	ns
6 weeks														16.75	0.96
														$3.7 \times 10^{-5}$	ns

ns: not significant. All the p values are italicized to enhance the difference with induction factors.



Fig. 1. Expression levels of metallothionein mRNA in control and Cd spiked soil exposed (80 or 800 mg/kg) earthworms after 6 h, 14 h, 1 day, 2 days, 6 days and 14 days of exposure. Legend:  $\blacksquare$ : Control;  $\blacksquare$ : 800 mg/kg; \*: Significant difference (p < 0.05).

80 fold) were registered after 6 h, 14 h, 1 day, 2 days, 6 days and 14 days of exposure respectively (Fig. 1).

#### 3.1.2. Cyclophilin-A

A significant decrease in the quantity of mRNA was observed after 14 h and 2 days of exposure to 80 mg/kg Cd in soil (p=0.0016 and p=0.0056). For exposure of 14 days a significant increase was showed ( $p=9 \times 10^{-5}$ ) (Fig. 2). In worms exposed to 800 mg/kg, a significant decrease of the mRNA quantity was observed after 14 h of exposure (5 fold and  $p=1 \times 10^{-4}$ ). Other significant decreases were also reported after 1, 2, 6 and 14 days (p=0.004;  $p=7 \times 10^{-4}$ ; p=0.003 and  $p=5 \times 10^{-4}$  respectively) (Fig. 2).

# 3.1.3. Protein kinase C 1, Calmodulin 16-1, $\beta$ -adrenergic receptor kinase 1-4, $\beta$ -adrenergic receptor kinase 2-3, ubiquitin, and HSP 70

These effectors showed the same pattern of expression as illustrated by expression pattern of PKC1 in Fig. 3. For earthworms exposed to 80 mg/kg Cd in soil, a decrease in mRNA quantity after 2 days of exposure was registered (p=0.026, p=0.031, p=0.0046, p=0.022, p=0.007 and

p=0.029 for PKC1, Calm 16-1, β-ark 1-4, β-ark 2-3, ubiq and HSP 70 respectively). We observed strong and significant decreases in mRNA levels after 14 h of exposure to 800 mg/kg Cd in soil (12 fold and p=0.0056, for PKC1 (Fig. 3); 4 fold and p=0.0059 for Calm 16-1; 26 fold and  $p=1 \times 10^{-4}$  for β-ark 1-4; 32 fold and p=0.001 for β-ark 2-3; 5 fold and  $p=7 \times 10^{-4}$  for ubiq; 3 fold and p=0.012 for HSP 70).

### 3.1.4. Superoxide dismutase, pyruvate carboxylase, calmodulin 16-2, HSP 60, and catalase

No informative difference was observed between controls and worms exposed to 80 mg/kg Cd in soil for these five effectors. However, for worms exposed to 800 mg/kg Cd in soil, a significant decrease was observed after 14 h of exposure (2 fold and p=0.046 for SOD; 10 fold and p=0.0065 for PyC; 17 fold and p=0.02 for Calm 16-2; 11 fold and p=0.035 for HSP 60; 19 fold and p=0.034 for CAT).

#### 3.1.5. Protein kinase C 2

No variation of expression was observed for 80 mg/kg, p > 0.05 in all cases. Significant variations in the quantity of mRNA obtained from worms exposed to 800 mg/kg in soil were



Fig. 2. Expression levels of cyclophilin-A mRNA in control and Cd spiked soil exposed (80 or 800 mg/kg) earthworms after 6 h, 14 h, 1 day, 2 days, 6 days and 14 days of exposure.



Fig. 3. Expression levels of protein kinase C 1 mRNA in control and Cd spiked soil exposed (80 or 800 mg/kg) earthworms after 6 h, 14 h, 1 day, 2 days, 6 days and 14 days of exposure. Legend:  $\blacksquare$ : Control;  $\blacksquare$ : 80 mg/kg;  $\ddagger$ : Significant difference (p < 0.05).

recorded. A strong decrease in mRNA quantity was observed after 14 h of exposure (14 fold, p=0.002). Others variations were also registered after 6 h (p=0.007) and 2 days (p=0.025).

#### 3.1.6. TCTP

A significant decrease in the quantity of mRNA was observed after 2 days of exposure of worms to 80 mg/kg Cd in soil (p=0.039). In case of 800 mg/kg exposed worms, a small increase after 14 days (p=0.007) of exposure was observed.

# 3.2. Expression analysis of the effectors after copper exposure (Table 3)

#### 3.2.1. TCTP, *β*-adrenergic receptor kinase 2-3 and catalase

These three effectors were characterized by several significant variations in their mRNA quantity after copper exposures. However, these variations seemed to be not very informative.

#### 3.2.2. Metallothionein

No significant difference was observed between controls and worms exposed to 40 mg/kg in soil (p > 0.05 in all cases) (Fig. 4). A significant increase in mRNA quantity was registered after 14 h of exposure to 120 mg/kg in soil (p=0.032). Then, levels of mRNA also increase after 1 day, 2 days, 6 days and 14 days (3.4 fold and p=0.007; 6 fold and  $p=7\times10^{-4}$ ; 3.5 fold and p=0.006; 2.9 fold and p=0.018 respectively) (Fig. 4). The induction pattern was quite similar in animals exposed to 400 mg/kg of copper in soil. A significant induction of this gene appeared after 1 day of exposure until the end of exposures (5.3 fold and  $p=8\times10^{-4}$ ; 12.5 fold and  $p=2.6\times10^{-5}$ ; 4.8 fold and p=0.001; 7.7 fold and  $p=2\times10^{-4}$ ; 16.7 fold and  $p=3.7\times10^{-5}$ for exposure times from 1 day to 6 weeks respectively) (Fig. 4).

#### 3.2.3. Cyclophilin-A

This effector was characterized by a significant decrease of the mRNA quantity after 6 days of exposure, whatever the level of contamination of soil by copper (0.6 fold and p=0.023 for 40 mg/kg; 0.67 fold and p=0.047 for 120 mg/kg; 0.61 fold and p=0.025 for 400 mg/kg) and by a decrease for two levels of contamination: 40 mg/kg and 120 mg/kg after 6 h (0.62 fold and p=0.031; 0.46 fold and p=0.009 respectively) and 14 days (0.39 fold and p=0.007; 0.61 fold and p=0.026 respectively)



Fig. 4. Expression levels of metallothionein mRNA in control and Cu spiked soil exposed (40, 120 and 400 mg/kg) earthworms after 6 h, 14 h, 1 day, 2 days, 6 days and 14 days of exposure. Legend: Control; 2 40 mg/kg; 1 20 mg/kg; 2 400 mg/kg \*: Significant difference (p < 0.05).



Fig. 5. Expression levels of cyclophilin-A mRNA in control and Cu spiked soil exposed (40, 120 and 400 mg/kg) earthworms after 6 h, 14 h, 1 day, 2 days, 6 days and 14 days of exposure. Legend:  $\Box$ : Control;  $\Box$ : 40 mg/kg;  $\Box$ : 120 mg/kg;  $\Box$ : 400 mg/kg \*: Significant difference (p < 0.05).

and the cyclophilin-A was also characterized by other noninformative decreases through the three contamination kinetics (Fig. 5).

#### 4. Discussion

In a previous study, we measured the expression of 14 potential biomarker candidates in the laboratory model E. fetida during an experimental exposure with cadmium spiked artificial soil (Brulle et al., 2006). This study of expression, carried out from the immune cells or coelomocytes, has highlighted variations of expression of genes coding effectors that are implied in defence or stress mechanisms such as catalase, HSP 60 or MT. The other effectors tested did not exhibit specific variations of expression following Cd spiked soil exposure. However, a variation of expression in another organ or another tissue could not be excluded, especially in epithelia in contact with soil such as epidermis and digestive tract. Implication of these tissues in immune responses was clearly demonstrated in several invertebrates (Mitta et al., 2000; Munoz et al., 2002). Moreover, a variation of expression in a detoxification specialized organ such as the chloragogenous tissue, located around the digestive tract, could also be considered. The originality of the present work lies in (1)-study on whole organism of the expression of the 14 effectors previously tested on coelomocytes; (2)-follow up the expressions in a longer kinetic (up to 14 days and 6 weeks when necessary); (3)-cloning and processing of experimental exposures with copper to follow the expression of cyclophilin-A, TCTP and MT, three effectors likely to respond to this metal.

The expression pattern of MT was characterized by an early and strong induction whatever the contamination level with Cd (5.8 times after 14 h of exposure to 80 mg/kg and 3 times after 6 h of exposure with 800 mg/kg). Results were similar to those obtained with coelomocytes, the induction observed in whole animals starting even earlier. Thus, a clear induction of the gene coding MT was observed as early as 14 h in animals exposed to 80 mg/kg of Cd in soil. Moreover, a maximum of induction was rapidly reached *i.e.*, approximately 85 times after 2 days of exposure to 800 mg/kg. This strong induction, which was detected throughout the exposure (14 days) and which was also observed by others in a longer exposure period (Demuynck et al., 2006), can be interpreted as the resultant of a phenomenon of acclimatization, *i.e.* a physiological phenomenon allowing organisms to be more tolerant to contaminants. In 2005, Timmermans and colleagues suggested that exposure to Cd would led to the development of detoxification mechanisms such as the production of MT in order to allow tolerance of individuals to metallic contaminants.

When earthworms were exposed to copper in soil, MT showed significant variations of its expression level. So, after 6 weeks of exposure to 400 mg/kg, mRNAs coding MT were 16.75 fold more abundant in comparison to levels observed in control animals. These results are similar to those obtained by Galay-Burgos et al. in 2003. These authors highlighted a 3 fold induction of MT in *L. rubellus* exposed to 160 mg/kg of copper for 42 days. Here, we demonstrated the existence of a dose-dependent induction of MT gene following exposure to sub-lethal copper concentrations in *E. fetida*.

TCTP, which expression strongly varies in *L. rubellus* (Stürzenbaum et al., 1998) sampled in or exposed to abandoned spoil heaps with contaminated soils, did not show variations of its expression in coelomocytes of *E. fetida* exposed to a strong amount of Cd (Brulle et al., 2006). In their work, Stürzenbaum et al. (1998) located the site of expression of TCTP in the posterior part of the animals and an induction by copper could not be excluded. In the present study, done on whole animals, expression of the gene coding TCTP was affected neither by Cd nor by Cu. Thus, as opposed to published results in *L. rubellus*, TCTP gene induction does not seem to be exploitable as a biomarker of exposure to Cd or Cu in *E. fetida*. Moreover, the variation of expression reported by Stürzenbaum et al. (1998) may be a result of a long term of adaptation rather than species differences.

The TCTP was first identified as a tumor-associated protein. It was demonstrated in vertebrates that TCTP is a housekeeping gene and that its deregulation may be involved in the tumor development of colon carcinoma (Chung et al., 2000). From our knowledge, the role of TCTP in invertebrates is unknown. Since lower animals develop neoplasia rarely or not at all, it is quite difficult to speculate concerning the role of TCTP in the formation of tumors or lack of tumors in earthworms (Kurelec, 1993).

Cyclophilin-A, an enzyme belonging to the immunophilin superfamily, is involved in lymphocyte signal transduction processes in vertebrates (Fruman et al., 1994). Expression of this highly conserved immune effector is affected by a metal pollution. Indeed, Stürzenbaum et al. (1999) highlighted a strong induction of cyclophilin-A in *L. rubellus* after 6 weeks of exposure to a soil contaminated by a cocktail of metals (Cd, Pb, Zn, Cu). In our study, cyclophilin-A showed an induction pattern to copper characterized by a significant decrease of the quantity of mRNA after 6 days of exposure whatever the level of contamination. Thus, cyclophilin-A couldn't constitute a suitable potential biomarker in *E. fetida*. The induction pattern observed after cadmium exposures was characterized by two drops observed after 2 days of exposure to 80 mg/kg and 14 h of exposure to 800 mg/kg cadmium in soil.

Most of the selected effectors showed minor variations of their level of expression whatever the metal (cadmium or copper), the metal concentration in soil and the period of exposure. Work on whole animals allowed to justify our previous choice of coelomocytes as a representative tissue to measure gene expression of effectors implied in defence mechanisms. Indeed, the most significant variations of expression were measurable both on whole animals and extruded coelomocytes. From a technical point of view, coelomocytes were easy to sample, RNA extracted from coelomocytes was of excellent quality and such protocol was non-invasive.

Beyond non-informative results, it is interesting to note significant decreases in the quantity of transcripts after 14 h of exposure to 800 mg/kg of Cd in soil for 13 among the 15 effectors tested. A decrease of the expression level was also observed for 9 among the 15 effectors after 2 days of exposure to 80 mg/kg of Cd. These repressions can be linked to the massive induction of the gene coding MT occurring at the same time. Two hypotheses could explain this phenomenon:

- 1. Cadmium would have an effect on expression of these effectors and the synthesis of a detoxification protein like MT, which chelates Cd, could allow a return to basal levels of expression.
- 2. There would be a preferential energy allowance for MT synthesis to allow a faster and more effective detoxification process, but also for exposed animals to rapidly acquire a metal resistance. Diverted energy would be redistributed to the cellular machinery responsible of the synthesis of MT in order to protect the organism from the toxic effects of cadmium. MT synthesis would be temporarily performed to the detriment of the synthesis of other proteins, not of major importance when exposure to metal trace elements occurs. Moreover, the number of transcripts coding antioxidant system proteins like catalase and superoxide dismutase strongly drops (respectively 2 and 19 times after 14 h of exposure to massive synthesis of MT with antioxidant properties against

the reactive oxygen species formed following an exposure to cadmium (Anderson et al., 1999). This phenomenon also named trade-off would constitute a global response to a highly stressful situation. The concept of trade-off is supported by other studies. Indeed, Stone et al. (2001) then Augustyniak et al., 2005 demonstrated that insects residing in a smelter area were more sensitive to additional stress. This suggests that insects residing in polluted areas have occurred physiological or genetic costs. Among possible physiological costs (compensatory efforts), these authors proposed the enhancement of the transcription of metalbinding proteins. Moreover, investigating the relationship between changes in physiological energetics of organisms and alterations of growth, development and reproduction of Daphnia magna under toxicant stress, Knops et al. (2001) illustrated the importance of trade-off processes in regulating the distribution of energy among growth and reproduction.

Recent work conducted with the freshwater mussel Dreissena polymorpha showed that a strong quantity of MT could allow this organism to strongly accumulate a high amount of Cd without suffering *i.e.*, without affecting growth rates (Lecoeur et al., 2004). Another study on the same model showed that exposure to a pollution gradient generated negative effects on cellular energy allocation (Smolders et al., 2004). This involved the damaging of reproduction and development processes. Thus, damaging reproduction and growth rates observed in E. fetida (Spurgeon and Hopkin, 1996) when animals were exposed to contaminated soils could be consecutive to a redistribution of metabolic energy in favour of synthesis of detoxification proteins. Moreover, it is well-known that synthesis of MT generated an important metabolic cost (Marino and Morgan, 1999). This cost could explain that less cellular energy was available for other physiological functions.

The quantification of gene expressions by real-time PCR enabled to distinguish MT and cyclophilin-A among the 15 selected effectors. The dose-dependant induction of MT coding gene was demonstrated. This expression started early, after only 6 or 14 h of exposure. Induction of the gene coding cyclophilin-A was also registered later, after 14 days of contamination to copper in soil. This work confirmed MT as a suitable biomarker of exposure to Cd and unvalidated cyclophilin-A as biomarker of exposure to copper in *E. fetida*. The gene coding TCTP, which expression seemed to be up-regulated by copper in *L. rubellus* (Stürzenbaum et al., 1998), did not show variation of its expression in *E. fetida* exposed to cadmium or copper. This effector could not thus be considered as a biomarker of exposure in this species.

A decrease of the quantity of transcripts was also highlighted for 9 effectors after 2 days of exposure to 80 mg/kg of Cd and for 13 effectors after 14 h of exposure to 800 mg/kg of Cd. Variations of expression would not be directly due to the environmental conditions, but due to the very strong gene induction of proteins implicated in detoxification or stress mechanisms like MT. This phenomenon named trade-off, depends on the faculty of the individuals to respond to a stress.

#### Acknowledgements

The present study was supported by a grant from the Région Nord-Pas de Calais (Programme de Recherches Concertées: Sites et sols pollués-Environnement et Activités Humaines). F.B was supported by a doctoral fellowship from ADEME (Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie).

#### References

- Anderson, R.S., Patel, K.M., Roesijadi, G., 1999. Oyster metallothionein as an oxyradical scavenger: implications for hemocyte defense responses. Dev. Comp. Immunol. 23, 443–449.
- Augustyniak, M., Babczynska, A., Migula, P., Wilczek, G., Laszczyca, P., Kafel, A., Augustyniak, M., 2005. Joint effects of dimethoate and heavy metals on metabolic responses in a grasshopper (*Chorthippus brunneus*) from a heavy metals pollution gradient. Comp. Biochem. Physiol. C 141, 412–419.
- Brulle, F., Mitta, G., Cocquerelle, C., Vieau, D., Lemiere, S., Leprêtre, A., Vandenbulcke, F., 2006. Cloning and real-time PCR testing of 14 potential biomarkers in *Eisenia fetida* following cadmium exposure. Environ. Sci. Technol. 40, 2844–2850.
- Chung, S., Kim, M., Choi, W.-J., Chung, J.-K., Lee, K., 2000. Expression of translationally controlled tumor protein mRNA in human colon cancer. Cancer Lett. 156, 185–190.
- Demuynck, S., Grumiaux, F., Descamps, M., Leprêtre, A., 2005. Differential expression of stress proteins in response to heat and cadmium in two oligochaete species *Eisenia fetida* and *E. andrei*. Trends Comp. Biochem. Physiol. 10, 105–110.
- Demuynck, S., Grumiaux, F., Mottier, V., Schikorski, D., Lemière, S., Leprêtre, A., 2006. Metallothionein response following cadmium exposure in the oligochaete *Eisenia fetida*. Comp. Biochem. Physiol. C 144, 34–46.
- Fruman, D.A., Burakoff, S.J., Bierer, B.E., 1994. Immunophilins in protein folding and immunosuppression. FASEB J. 8, 391–400.
- Galay-Burgos, M., Spurgeon, D.J., Weeks, J.M., Stürzenbaum, S.R., Morgan, A.J., Kille, P., 2003. Developing a new method for soil pollution monitoring using molecular genetic biomarkers. Biomarkers 8, 229–239.
- Honeycutt, M.E., Roberts, B.L., Roane, D.S., 1995. Cadmium disposition in the earthworm *Eisenia fetida*. Ecotoxicol. Eviron. Saf. 30, 143–150.
- Klassen, C.D., Liu, J., Choudhuri, S., 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 39, 267–294.
- Knops, M., Altenburger, R., Segner, H., 2001. Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress. Aquat. Toxicol. 53, 79–90.
- Kurelec, B., 1993. The genotoxic disease syndrome. Mar. Environ. Res. 35, 341–348.

- Lecoeur, B., Videmann, B., Berny, P., 2004. Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*. Environ. Res. 94, 184–191.
- Liao, V.L.C., Freedman, J.H., 1998. Cadmium-regulated Genes from the nematode *Caenorhabditis elegans*. identification and cloning of new cadmium-responsive genes by differential display. J. Biol. Chem. 273, 31962–31970.
- Marino, F., Morgan, A.J., 1999. Equilibrated body metal concentrations in laboratory exposed earthworms: can they be used to screen candidate metaladapted population? Appl. Soil Ecol. 12, 179–189.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Roch, P., 2000. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. FEBS Lett. 486, 185–190.
- Munoz, M., Vandenbulcke, F., Saulnier, D., Bachere, E., 2002. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. Eur. J. Biochem. 269, 2678–2689.
- OECD, 1984. OECD guideline for testing chemicals. Section 2: effects on biotic systems. Earthworm, Acute Toxicity Tests. Method, vol. 207. Paris, France. Paris.
- Palmiter, R.D., 1998. The elusive function of metallothioneins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 8428–8430.
- Smolders, R., Bervoets, L., De Coen, W., Blust, R., 2004. Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. Environ. Pollut. 129, 99–112.
- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., 1996. Effects of metal-contaminated soils on the growth, sexual development, and early cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*, with particular reference to zinc. Ecotoxicol. Eviron. Saf. 35, 86–95.
- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., Jones, D.T., 1994. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny). Environ. Pollut. 84, 123–130.
- Stone, D., Jepson, P., Kramarz, P., Laskowski, R., 2001. Time to death response in carabid beetles exposed to multiple stressors along a gradient of heavy metal pollution. Environ. Pollut. 113, 239–244.
- Stürzenbaum, S.R., Georgiev, O., Morgan, A.J., Kille, P., 2004. Cadmium detoxification in earthworms: from genes to cells. Environ. Sci. Technol. 38, 6283–6289.
- Stürzenbaum, S.R., Kille, P., Morgan, A.J., 1998. Identification of heavy metal induced changes in the expression patterns of the translationally controlled tumour protein (TCTP) in the earthworm *Lumbricus rubellus*. Biochim. Biophys. Acta 1398, 294–304.
- Stürzenbaum, S.R., Morgan, A.J., Kille, P., 1999. Characterisation and quantification of earthworm cyclophilins: identification of invariant and heavy metal responsive isoforms. Biochim. Biophys. Acta 1489, 467–473.
- Timmermans, M.J.T.N., Ellers, J., Roelofs, D., Van Straalen, N.M., 2005. Metallothionein mRNA expression and cadmium tolerance in metal-stressed and reference populations of the springtail *Orchesella cincta*. Ecotoxicology 14, 727–739.

#### **Publication 3**

<u>cDNA cloning and expression analysis of *Eisenia fetida* (Annelida: Oligochaeta) phytochelatin synthase under cadmium exposure, *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2008, Vol. 71, 47-55</u>

La troisième partie de ce chapitre décrit comment l'étude de la littérature associée à l'exploitation des données publiées dans les banques de séquences telles que GenBank<sup>TM</sup>, nous a permis d'identifier, de caractériser et d'analyser le niveau d'expression d'un dernier candidat biomarqueur, la phytochélatine synthase.

L'exploitation de la conservation protéique observée entre les espèces nous a permis de caractériser la *pcs* chez la première espèce appartenant aux lophotrochozoaires. Concrètement, nous avons cloné la séquence codante complète de l'ADNc codant la PCS à partir des cellules immunitaires d'*Eisenia fetida* puis nous avons étudié sa relation avec les séquences correspondantes obtenues chez les plantes, les levures et les nématodes. Ce clonage a été réalisé grâce à l'utilisation d'amorces dégénérées, déterminées préalablement par la réalisation d'alignements protéiques (Annexe 3) utilisant les séquences des espèces animales et végétales chez lesquelles la *pcs* avait été caractérisée à ce jour (Corpet, 1988; Rose *et al.*, 1998). De plus, l'analyse du niveau d'expression de cette enzyme par PCR en temps réel, lors d'expositions expérimentales *in vivo* à 3 doses de Cd, a été réalisée en complément de celle du gène *Cd-mt*, un gène répondant de manière dose- et temps-dépendante au Cd chez *Eisenia fetida* (Brulle *et al.*, 2006; Brulle *et al.*, 2007).

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

Ces résultats suggèrent que la PCS est impliquée dans la détoxication du Cd de manière dose-dépendante. De plus, les réponses comparées de la *pcs* et de la *Cd-mt* suggèrent que ces 2 gènes peuvent agir de conserve dans les processus de détoxication, avec une PCS qui aurait un rôle dans les réponses immédiates ou pour de faibles concentrations et la Cd-MT

qui participerait plus tardivement ou pour des concentrations plus importantes. Ainsi, le clonage de l'ADN complémentaire codant la PCS chez notre modèle et l'analyse de son niveau d'expression fait de la PCS un nouveau candidat biomarqueur pour des faibles contaminations par le Cd.



Available online at www.sciencedirect.com



Ecotoxicology and Environmental Safety

Ecotoxicology and Environmental Safety 71 (2008) 47-55

www.elsevier.com/locate/ecoenv

### cDNA cloning and expression analysis of *Eisenia fetida* (Annelida: Oligochaeta) phytochelatin synthase under cadmium exposure

Highlighted Article

Franck Brulle<sup>a</sup>, Claude Cocquerelle<sup>b</sup>, Atta Nda Wamalah<sup>a</sup>, Andrew John Morgan<sup>c</sup>, Peter Kille<sup>c</sup>, Alain Leprêtre<sup>a</sup>, Franck Vandenbulcke<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire d'Ecologie Numérique et d'Ecotoxicologie, EA 3570, Université de Lille 1, Cité Scientifique, Bâtiment SN3,

59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

<sup>b</sup>Laboratoire de la Régulation des Signaux de Division, EA 4020, Université de Lille 1, Cité Scientifique, Bâtiment SN3, Villeneuve d'Ascq Cedex, France <sup>c</sup>Cardiff School of Biosciences, Cardiff University, P.O. Box 915, Cardiff, CF10 3TL Wales, UK

> Received 6 June 2007; received in revised form 4 October 2007; accepted 20 October 2007 Available online 20 February 2008

#### Abstract

Metallothioneins (MTs) are central to trace metal homeostasis and detoxification throughout biological systems. Prokaryotes, plants, and fungi utilize both gene encoded cysteine-rich polypeptides (classically designated Class I and II MTs) and enzymatically synthesized cysteine-rich peptides (classically designated Class III MTs or phytochelatins). In contrast, although gene encoded MTs are ubiquitous in animal species the identification of a functional phytochelatin synthase in the nematode *Caenorhabditis elegans*, a representative member of the Ecdysozoa, provided the first evidence for these metal-binding peptides in animals. By exploiting the conservation observed between species we have been able to clone and transcriptionally characterize a phytochelatin synthase from the immune cells of the earthworm *Eisenia fetida*, the first evidence for its presence in a phylum belonging to the Lophototrochozoa. The complete coding sequence of this enzyme was determined and the phylogenetic relationship to plant, yeast and nematode enzymes elucidated. Temporal- and dose-profiling of the transcriptional regulation of phytochelatin synthase and MT in response to cadmium was performed by using real-time PCR. © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Eisenia fetida; Phytochelatin synthase; Cælomocytes; Cadmium exposure; Expression; Real-time PCR

#### 1. Introduction

It is essential for biological systems to acquire essential trace metals for growth, respiration, internal signalling, and a myriad of other indispensable activities. However, the consequence of this deep-rooted dependency is that they must avoid being damaged either by excessively high levels of reactive and potentially dangerous essential metals, like copper, as well as toxic non-essential metals that enter cells and tissues as analogues of essential elements. Metallothioneins (MTs) are a ubiquitous family of cysteine-rich proteins/peptides that chelate metal ions

\*Corresponding author.

providing protection against metal cytotoxicity whilst ensuring the trafficking of metals to their intended targets (Vasak and Hasler, 2000). The functional linkage between MTs and metal detoxification has facilitated their exploitation as diagnostic markers for metal contamination (Kim et al., 2006). Classically MTs were divided into three classes, the gene which exhibit high or no homology with horse MT, Class I and II MT, respectively, and those enzymically synthesized, Class III MTs or phytochelatins (Fowler et al., 1987). This classification system has been refined to uncouple the phytochelatins from the exponentially expanding phylogenetically diverse family of gene encoded MTs (Cobbett and Goldsbrough, 2002).

In plants, metal tolerance has classically been associated with the synthesis of the post-transcriptionally synthesized phytochelatins (poly- $[\gamma$ -Glu-Cys]<sub>n</sub>-X polymers) (PCs) (Grill

E-mail address: franck.vandenbulcke@univ-lille1.fr

<sup>(</sup>F. Vandenbulcke).

<sup>0147-6513/\$ -</sup> see front matter  $\textcircled{}{}$  2007 Elsevier Inc. All rights reserved. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.10.032

et al., 1985; Cobbett, 1999; Cobbett and Goldsbrough, 2002). Indeed, since their discovery in the yeast Schizosaccharomyces pombe in 1985, PCs have been characterized in a wide range of plant species (Grill et al., 1985) and play a major role in the detoxification of trace metals in plants by chelating metals, especially cadmium, with high affinity. PCs have also been implicated in the regulation of intracellular essential metal concentrations in plants, fungi, and microalgae (see Clemens, 2006). In higher plants, these peptides are synthesized after exposure to certain metal trace elements and form macro-molecular complexes facilitating metal detoxification (Hirata et al., 2005). PCs are synthesized by phytochelatin synthase (PCS), or  $\gamma$ -Glutamyl cysteine dipeptidyl transferase, an enzyme which catalyses the transfer of a  $\gamma$ -Glu-Cys unit of a glutathione molecule either to another  $[\gamma$ -Glu-Cys-Gly +  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly  $\rightarrow (\gamma$ -Glu-Cys)<sub>2</sub>-Gly+Gly] or to a molecule of phytochelatin previously synthesized to generate a polymer containing from 2 to 11 repeated  $\gamma$ -Glu-Cys units (Grill et al., 1989). A study performed on garlic (Allium sativum) in 2005 using semiquantitative RT-PCR showed that phytochelatin synthase was controlled at the transcriptional level following exposure to metals, especially cadmium (Zhang et al., 2005). Indeed, these authors showed that pcs-gene expression in the roots of Allium sativum was significantly induced by cadmiuminduced stress.

In most animals, tolerance to heavy metals depends on the induction of genomically encoded MTs, a family of cysteinerich proteins of low molecular weight (6000-8000 Da) characterized by the absence of aromatic amino acids and limited homology to horse MT (Fowler et al., 1987). These metallo-proteins are known to be implicated in the detoxification process of heavy metals such as cadmium (Cd) and in the homeostasis of essential metals such as zinc (Palmiter, 1998; Klaassen et al., 1999). Estimating the impact of metals on soil macroinvertebrates by quantifying transcript levels of genomically encoded Class II MTs has been performed in a number of terrestrial species, including the oligochaete worms Lumbricus rubellus (Stürzenbaum et al., 2004) and Eisenia fetida (Demuynck et al., 2005; Brulle et al., 2006; Demuynck et al., 2006), the nematode Caenorhabditis elegans (Liao and Freedman, 1998), and the springtail Orchesella cincta (Timmermans et al., 2005).

Prior to 2001 there had been no reports of the presence of PCs or phytochelatin synthase in any animal. However, soon after the completion of the full genome sequence for the nematode *C. elegans* two publications independently described a functional PCS in this model invertebrate (Clemens et al., 2001; Vatamaniuk et al., 2001). Moreover, Clemens et al. (2001) hypothesized that PCs may be ubiquitously involved in the tolerance and homeostasis of metals in all eukaryotic organisms, a hypothesis which is yet to be tested.

In this paper we describe the cloning and the cadmiumdependent transcriptional control of a phytochelatin synthase from the ecotoxicologically important earthworm species *E. fetida*. This is only the second animal in which *pcs* has been identified and induction by heavy metals characterized. This oligochaete has been exploited by the OECD since 1984 for the ecotoxicological assessment of chemicals (OECD, 1984; Dominguez, 2004), and it is known to express a metal-inducible Class II MT (Demuynck et al., 2005; Brulle et al., 2006; Demuynck et al., 2006). We have investigated the complementary transcriptional induction of *mt* and *pcs* genes in response to cadmium within *E. fetida* and discussed their possible interdependency and potential implications for metal detoxification.

#### 2. Material and methods

#### 2.1. Animals and treatment

Earthworms came from controlled cultures maintained in our laboratory. Worms were bred at an ambient temperature of  $22\pm2$  °C, in the dark, on vegetable mould with fresh cattle manure as food source. The moisture content was maintained around 60%.

Artificial substrates were prepared as described in OECD guideline (OECD, 1984). Briefly, substrate was composed (percentages refer to dry weight) of 10% sphagnum, 20% kaolinite clay, and 70% quartz sand. The pH was adjusted to  $6\pm0.5$  with CaCO<sub>3</sub>. The cadmium (CdCl<sub>2</sub>) was added to the soil. Then, half an hour later, worms were added.

Three concentrations (8, 80, and 800 mg/kg) of cadmium were tested and 25 adult worms per condition were used. The latter concentration, although very high is under the LC50 (1000 mg/kg) reported for *E. fetida* in OECD artificial soil (Honeycutt et al., 1995). Exposure periods were 2 and 14 days. At the end of exposure periods, worms were rinsed in distilled water before coelomocyte extrusion, with non-invasive method using cold extrusion medium ( $2.5 \text{ mg ml}^{-1}$  EDTA,  $8.5 \text{ mg ml}^{-1}$  NaCl, pH 7.3, 5% ethanol) and electrical stimuli as previously described (Brulle et al., 2006). Then cellular RNA extraction was processed as described below.

#### 2.2. RNA extraction and reverse transcription

All expression analyses were conducted on total RNA extracted from cœlomocytes, using Tri-Reagent<sup>®</sup> (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, USA) according to manufacturer's instructions. RNA purity and integrity were checked by ensuring that absorbance ratios (A260/280) were between 1.8 and 2.0 and by agarose gel electrophoresis (2%). First strand cDNA synthesis was performed using 200 units of RevertAid<sup>TM</sup> H Minus M-MuLV reverse transcriptase (Fermentas, Burlington, Canada), 200 ng of random primer, and 1.5 µg of total RNA in order to allow the cloning using degenerate primers. For real-time PCR analysis, reverse transcriptase<sup>TM</sup> (GibcoBRL, Cergy-Pontoise, France), 500 ng oligo (dT) primer (18-mer) and 1.5 µg total RNA. The use of oligo (dT) priming within the reverse transcription bias cDNA synthesis towards mRNA and consequently the protein encoding RNA population.

#### 2.3. Cloning and sequencing

Cloning of the *pcs* gene was achieved using degenerate primers designed against evolutionarily conserved motifs of the enzyme. To identify these conserved sequences, protein sequences of PCS (already cloned in other eukaryotic species, mainly plants and *C. elegans*) were obtained from GenBank (NCBI). Alignments were done with the online/Web tools (MULTALIN; CLUSTAL W) (Corpet, 1988; Thompson et al., 1994). Primers were then determined using software available online (CODE-HOP) (Rose et al., 1998). The forward (5'-CCAGAACGAGCCCG-C(AGCT)T(AT)(CT)TG(CT)GG-3') and reverse (5'-GTGGGGAGGG-TACTTGAACC(GT)(AGCT)GC(AGCT)AC(AG)TC-3') primers were designed to minimize their level of degeneracy and optimize their

temperature of DNA hybridation during PCR reactions. *E. fetida* cDNA was used as the template from which to amplify a fragment corresponding to the *pcs* gene.

PCR reactions were performed with GoTaq<sup>®</sup> polymerase (Promega, France, Charbonnières) and the typical PCR cycling conditions were 1 min at 95 °C, 1 min at 55 °C, and 2 min at 72 °C for 30 cycles. The expected size products were resolved on a 2% (w/v) agarose gel stained with ethidium bromide and subsequently cloned into the pGEM<sup>®</sup>-T Vector (Promega). The recombinant clones were purified using the Wizard<sup>®</sup> Plus SV Miniprep DNA Purified system kit (Promega). Several clones were sequenced in both directions by Genoscreen (Lille). Sequence analysis was performed using Blast algorithms hosted at NCBI.

#### 2.4. Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

In order to get the full length cDNA of *E. fetida* phytochelatin synthase, 5' and 3' RACE PCR were performed according to Frohman et al. (1988) with the following modifications.

*Tailing.* Excess 5' specific primer was removed from 5' RACE cDNA reaction with a NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II kit according to the manufacturer protocol (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Duren, Germany) and 50  $\mu$ l elution was collected. To 10  $\mu$ l elution, 2.5  $\mu$ l of 2 mM dGTP, 5  $\mu$ l of 5X tailing buffer (Promega) and 30 units of terminal deoxynucleotidyl-transferase (Promega) were added and the mixture was incubated for 10 min at 37 °C and heated for 10 min at 70 °C.

Amplification. For the 5' RACE PCR first round, 5µl of tailing reaction, 25 pmol of (dC)-adaptor primer (5'-GGAATTCGCGGCCGCC-CCCCCCCCCCCCC(AGT)-3') and 25 pmol of PCSRT primer were added to a final 50 µl PCR reaction mixture with 5X GoTaq<sup>®</sup> polymerase buffer (Promega), MgCl<sub>2</sub> (2 mM final), dNTP (each one 200 µM final) and 1.25 units of GoTaq<sup>®</sup> polymerase (Promega). After an initial step at 94 °C for 2 min, 35 cycles of amplification were carried out (94 °C, 30 s; 55 °C, 1 min; 72 °C, 2 min), followed by a 30 min final extension at 72 °C. PCR reaction was diluted to 500 µl in water, and a second round of PCR was done as described above with 5 µl of dilution, 25 pmol of (dC)-adaptor and 5'PCSP1 (5'-TTGATCGGAACGCAGCAGTC) primers. For the first round of the 3' RACE PCR procedure, 5 µl of diluted cDNA reaction with 25 pmol of adaptor (5'-TAGGAATTCTCGAGCGGCCGC-3') and 3'PCSP1 (5'-GATGCAAGCGCATCTGAGGA-3') primers were used for amplification as described for the 5'-end procedure. For the second round of PCR, 3'PCSP1 primer was substituted by 3'PCSP2 primer (5'-TGTCGAAGGGTTCGGAGGAG-3'). All PCR products were analysed and cloned as described in Section 2.3.

#### 2.5. Real-time quantitative PCR

Real-time PCR analysis of gene expression was performed on reverse transcripted total RNAs extracted from *E. fetida* cœlomocytes. Expression levels of *mt* and *pcs* were measured using real-time PCR. Real-time PCR (RT-PCR) reactions were performed with a LightCycler apparatus (Roche Molecular Biochemicals, Germany) according to previously described procedures (Brulle et al., 2006). For each reaction, the crossing point (CP) was determined using the "fit point method" of the LightCycler software 3.3 (Roche diagnostic). PCR reactions were set in duplicates and the mean value of the CPs were calculated.

#### 2.6. Relative quantification of expression levels

To calculate amplification efficiencies (*E*) of cDNAs, relative standard curves were generated using serial dilutions (1:10, 1:100, 1:1000, and 1:10 000) of a single cDNA sample (cal) constituted of a pool of the eight analysed cDNAs. Relative standard curves were based on CP values and the log value of standard cDNA dilution. Real-time PCR efficiencies (*E*) were calculated from the given slope of the standard curve according to the equation  $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ . They ranged from 1.91 to 1.99 (Pearson correlation coefficient r > 0.99), and a strong linearity was observed. Levels of expression of the target gene (Tg) were compared to the expression of the constitutively expressed  $\beta$ -actin (act) gene (accession number DQ286722). Moreover, level of expression of MT was studied as a positive control for Cd exposure. The expression ratio (*R*) was calculated according to the formula  $R = (E_{Tg})^{CPTg}/(E_{act})^{CPact}$ . Another constitutively expressed gene coding the ribosomal protein S13 was used as an additional control.

#### 2.7. Phylogenetic tree of phytochelatin synthase

A phylogenetic tree of phytochelatin synthases was constructed using the Phylip software program sourced from Protdist (Joseph Felsenstein, University of Washington, Seattle, USA) using the seven full-length PCS coding sequence used to design degenerated primers (one from yeast, four from plants, two from nematodes, plus the full-length PCS coding sequence of *E. fetida*) (Fig. 5). Distances were measured using the Jones–Taylor–Thornton model.

#### 2.8. Statistical analysis

Expression levels were compared by means of two-way analysis of variance followed by Student post hoc *t*-tests. The normality of each distribution was verified by Kolmogorov–Smirnov's tests and variance heterogeneity by Hartley's tests. An  $\alpha$  level of 0.05 was used in all procedures. All results are represented as mean±standard error.

#### 3. Results

#### 3.1. Cloning and sequencing

Initial amplification of an internal fragment of the pcs gene using primers designed towards to the conserved regions of the enzyme and a coelomocyte cDNA template yielded an amplicon of 426 bp. Subsequent to cloning the sequence analysis of this product, using the BlastX algorithm, allowed the putative identification as a fragment of pcs gene. Following 5' and 3' RACE treatments, a complete coding sequence corresponding to the pcs of E. fetida was obtained (accession number EF433776). The complete coding sequence of the PCS of E. fetida was elucidated with 440 amino acids (Fig. 1). This sequence was used to examine the database of all known amino acid and nucleotide sequences using BlastX and BlastN homology programmes. The deduced amino acid sequences of putative earthworm PCS showed considerable identity with PCSs from plants and other invertebrate species (Fig. 2).

The similarity observed is significant in the N-terminal half of the protein (50–60% identity). Five cysteine residues are absolutely conserved in the N-terminal half in all

tggaaatcataattttcattaaaatgtcgtccaacaactgaactttgtaaagtcagcagccg tgaatttatgtacgtgctacgttgagcctttgttgccactggcgtgtcgataatttaact tttgaacaatttacggccttttgccgtacaagtttgaacaatttgccgcccggtactgtt ctataaaaacacgaacacgagaacgatattagcaggcgtggtaagccatactataggtct ggcgatgaacctatccggcctgagtgaagctatctgtcagactcgagtttcagactgatg taattcatgatggcgcatgcctcgctcaaccctgatcctccgactgaccacttctaccgc M M A H A S L N P D P P т D. H F v R cqtcctctccccqcqqtqtqcaccqcqttctqttccccqqaaqqcaaqtccatattccqa R. P L P AVCT A F C s P E G K - 81 Т gaageeetgaatgaaggetacatggaaaaettetteeeattagegteacagtttegtacg A L N E G Y M E N F F P L S E A 0 F R caggaggaaccagcettetgeggaetetegaecetggteatggteetgaacaegetegag OEEP A FCGL S TLVM v  $-\mathbf{N}$ TL F L gtcgacccggggaaggtctggaagggaccgtggagatggtaccacgagaatatgctcgac v DPGK VWKGP WRWY н E N М. L D tgetgegtteegateaacgttategaaaaatetgggataacgtttgaceagttetegtgt VIE C C V P I N K s GI TF D 0 F С ctggcagtttgcaatacgttgaatgtgaggtcagttcgggctgatgcaagcgcatccgag A V C TLNVRS VRA L. N. D. - S E Α. А. - 81 gacgagtttcggcagcttgtgaaacgggtgtcgaagggttcggaggaggtgatcgtggcg D. E F 0 L v ĸ R v S K G S E E Mт 37 R А tcgtattcgaggaagggcctggatcagaccggagacggacatttctcgccgatcgccggt D s v  $\mathbf{S}$  $\mathbf{R}$ к G L D. 0 Т G G H F s P т G tatcatccgggtagggatttggtgttgataatggatgtggcccgattcaagtaccagccg v н G R D Τ. V T. Т M D V à. R F K 0 cactgggtgaaggttcattccttgttcaaggcgatgcatgacgttgataaggacacgggt н ы -M $\mathbf{K}$ MH S LF K A MHD MD. K -Dт ctgtcgcgtggctacttgctgttgtcgaagagccgatcacttccaacggtcttgttccga Y L L L S K S R S L P Т v L cttacctccaatctgtgcgtgaacggcgtacagtccacgaatgtcgtgcggttcataaca CVNG v S T N v L т S. N L 0 v R F Т т gactggaaggaatggttggtaacttccgccagttcgaccaattccaacaagattctcgac VTS S - S T N S N K D. ы KE ы L A TL D actgccgtaaaccaactggtgaagtttctcaacctgaaggaaagcaacctctcgatggct т V N Q .... L v KFLNL K E S N L s M A cttgtcgaggttgtcggcttcgagaacatctccatggagcacaagtacgccatcaagcag GFENIS L v E V v M E H K Y I attetegaggcactcaagaacttgcctgtctaccaggtggtacggagttgcattccaggc K N L P V Y Q V V I L EAL R S C TP G ggagacaagttggagtetgagacacaegtteeagtggaegatggaeegeateeggagaag GDKL Е SE THVPVDD G P H P E K tteteeatgaageegaagaeetggeaetatgtgaetatgettetgttgatgtggeeatat F S M K P КТ Ш Н Ү v т M L L L M W P Y agggatgacgaaggcagcttcggcaggtgtttggatcagctgatggcggaccagttaaag RCLDQL RDDE G SF G Κ MA - D O L gcaagcgccagcgagcttcttcagaacgaggtgaccattctgcggcagcaggtttcatct S  $\mathbf{V}$ Т S A à. S E LL O N E I L R 0 - 0 V S gtccttggatttgtggccgtttgtgatgcgtgtccctgtaaacaaaggctgctgaggca v L G F v A VCD A C P СК QK A A E A gcgaaataggttttgtcggttgaacggtttgcgatgctcactcctccgaacccttcgaca K A

Fig. 1. Complete coding sequence of *Eisenia fetida* phytochelatin synthase. Depicted is the base sequence with the amino acid translation of the predicted protein. The sequence was submitted to international genetic databases under accession no. EF433776.

studied species while the C-terminal domain containing also multiple cysteine residues is variable (20–30% identity) (Fig. 2). Partial fragments of the MT has been cloned and characterized in a previous study (Brulle et al., 2006). Sequence data were submitted to GenBank<sup>TM</sup> (accession number DQ286714).

# 3.2. Expression analysis of pcs and mt after cadmium exposure

#### 3.2.1. Phytochelatin synthase

The induction pattern of *pcs* was characterized and exhibited a significant increase of the number of transcripts

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

Caenorhabditis_briggsae	FYRRPLP-E	15
Caenorhabditis_elegans	FYRRPLP-E	15
Eisenia fetida	MAHASLNPDPPTDHFYRRPLP-A	23
Arabidonsis thaliana	I.YERSI.PSP	14
Arabidopsis_chailana		11
Arabidopsis_nalleri	LIKKSLPSP	14
Brassica_juncea	Lyrrslpsp	14
Nicotiana_tabacum	LYRRVLPSP	14
Schizosaccharomyces pombe	MNIVKRAVPELLRGMTNATPNIGLIKNKVVSFEAVGOLKKSFYKROLP-K	49
rr	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
		<b>C E</b>
Caenornabditis_briggsae	ICVEFSSELGKKLFIEALLQGSANIIFKLASQFKIQDEPAIGLSILVMV	60
Caenorhabditis_elegans	TCIEFSSELGKKLFTEALVRGSANIYFKLASQFRTQDEPAY	65
Eisenia_fetida	VCTAFCSPEGKSIF REALNEGYMENFFPLASQFRTQEEPAFCGLSTLVMV	73
Arabidopsis thaliana	PAIDFSSAEGKLIFNEALOKGTMEGFFRLISYFOTOSEPAY	64
Arabidonsis halleri	PAIDESSAEGKLIENEALOKGTMEGEERLISYEOTOSEPAY	64
Description durant		C 4
Brassica_juncea	EXIDE 222FOKKIENEMENDOKGIMEGEEKTI21EÖIÖSPEKIOOPASP2AAA	04
Nicotiana_tabacum	PAVDFASTEGKQLFLEAIQNGTMEGFFKLISYFQTQSEPAY	64
Schizosaccharomyces_pombe	QCLAFDSSLGKDVFLRALQEGRMENYFSLAQQMVTQNEPAF	99
	. * * ** :* .*: .* : :* * . : **.***:***	
Caenorhabditis_briggsae	LNALEVDPEKVWKAPWRFYHESMLD	115
Caenorhabditis elegans	LNALEVDPEKVWKAPWRFYHESMLD	115
Fisonia fotida		122
Eisenia_reciua	LNILEVDEGRVWRGEWRWIRENPILDCOVEINVIERSGITEDQESCLAVON	122
Arabidopsis_thaliana	LNALSIDPGRKWKGPWRWFDESMLD <mark>OO</mark> EPLEVVKEKGISFGKVV <mark>O</mark> LAH <mark>O</mark> S	114
Arabidopsis_halleri	LNALSIDPGRKWKGPWRWFDESMLDCCEPLEVVKEKGISFGKVVCLAHCS	114
Brassica_juncea	LNALSIDPGRKWKGPWRWFDESMLDCEPLEVVKEKGISFGKVVCLAHCS	114
Nicotiana tabacum		114
Rebierershewerers werke		140
Schizosaccharonyces_ponibe		149
Caenorhabditis_briggsae	RLRSSVSYGETTPEFLKKFRASLVNSVKSDDQVLVASYDRSVLGQTGTGH	165
Caenorhabditis elegans	RLKSTVSYGDNSPDFLKKFRTSLVNSVRSDDOVLVASYDRSVLGOTGSGH	165
Figonia fotida		172
Elsenia_lecida		172
Arabidopsis_thaliana	GAKVEAFRTSQSTIDDFRKFVVKCTSSENCHMISTYHRSVFKQTGNGH	162
Arabidopsis_halleri	GAKVEAFRTTQSTIEDFRKFVLKCTSSENCHMISSYHKGVFMQTGTGH	162
Brassica juncea	GAKVEAFRTNOTTIDDFRKLVMKCSTSENCHMISTYHRGVFKOTGSGH	162
Nicotiana tabacum	CAKVEAFE SNUSTIDDERKOVMACTTSDNCHLISSYHRCLEKOTOSCH	162
NICOCIANA_CADACAM	GARVEAR SHIDTIDDE RRQVEACTIDDRCHIDDDTINGER QTGDGH	102
<b>6</b> - <b>b</b> - <b>b</b> - <b>c</b> - <b>b</b> - <b>c</b> -		
Schizosaccharomyces_pombe	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH	197
Schizosaccharomyces_pombe	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH ** : .: : :: : *** **	197
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH ** : .: : : : : *** ** FSPLAAYHADSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDISTKKPRG	215
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis elegans	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH ** : : : : : : : *** ** FSPLAAYHADSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDISTKKPRG FSPLAAYHEDSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDVTTKLPRG	215 215
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Fisenia fetida	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH ** : : : : : : : *** ** FSPLAAYHADSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDISTKKPRG FSPLAAYHEDSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDVTTKLPRG FSPLACYHPCRDLVLIMDVARFKYPPHWVKLSLFKAMHDVDKDTGLSRG	215 215 215
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH ** : .: : : : : : *** ** FSPLAAYHADSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDISTKKPRG FSPLAAYHEDSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDVTTKLPRG FSPLAGYHPGRDLVLIMDVARFKYQPHWVKVHSLFKAMHDVDKDTGLSRG	215 215 222
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH 	215 215 222 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH ** : : : : : : : *** ** FSPLAAYHADSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDISTKKPRG FSPLAAYHEDSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDVTTKLPRG FSPIAGYHPGRDLVLIMDVARFKYPPHWVKHSLFKAMHDVDKDTGLSRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDESTGKRRG	215 215 222 212 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH ** : .: : : : : : : *** ** FSPLAAYHADSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDISTKKPRG FSPLAAYHEDSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDVTTKLPRG FSPIAGYHPGRDLVLIMDVARFKYPPHWVVLKLLWEAMDSIDQSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG	215 215 222 212 212 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana tabacum	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH ** : : : : : : : : *** ** FSPLAAYHADSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDISTKKPRG FSPLAAYHEDSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDVTTKLPRG FSPIAGYHPGRDLVLIMDVARFKYPPHWVVLKLLWEAMDSIDQSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG	215 215 222 212 212 212 212 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces pombe	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH ** : .: : : : : : *** ** FSPLAAYHADSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDISTKKPRG FSPLAAYHEDSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDVTTKLPRG FSPIAGYHPGRDLVLIMDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLPLUWEAMNTIDEATGLHRG	215 215 222 212 212 212 212 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH ** : .: : : : : : : *** ** FSPLAAYHADSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDISTKKPRG FSPLAAYHEDSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDISTKKPRG FSPIGGYHAERDMALILDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDVTTKLPRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYSSESDNKILLDVARFKYPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG ***:: : **:****** :** : :::: : * : **	215 215 222 212 212 212 212 212 212 247
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH ** : .: : : : : : *** ** FSPLAAYHADSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDISTKKPRG FSPLAAYHEDSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDVTTKLPRG FSPIAGYHPGRDLVLIMDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLFLWEAMNTIDEATGLHRG FSPVGGFSESDNKILILDVARFKYPCYWVDLKLMYESMFFIDKASQPRG ***:: : **:****** :** : :::: :* : **	197 215 215 222 212 212 212 212 212 247
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH 	215 215 222 212 212 212 212 212 247 239
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH ** : .: : : : : : : *** ** FSPLAAYHADSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDISTKKPRG FSPLAAYHEDSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDVTKLPRG FSPIAGYHAGRDLVLIMDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMNTIDEATGLHRG FSPVGGFSESDNKILILDVARFKYPCYWVDLKLMYESMFFIDKASGQPRG ***:: : **:****** :** : :::: :* : ** FVELELRKGTRPLIMYGLKAYVNV LVELELKKGTRPLIMYGLKAYVNI	215 215 222 212 212 212 212 212 212 247 239 239
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH 	215 215 222 212 212 212 212 212 247 239 239 245
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidonsis_thaliana	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH 	215 215 222 212 212 212 212 212 212 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH ** : : : : : : : : : *** ** FSPLAAYHADSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDISTKKPRG FSPLAAYHEDSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDVTKLPRG FSPIAGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMNTIDEATGLHRG FSPVGGFSESDNKILILDVARFKYPCYWVDLKLMYESMFFIDKASGQPRG ***:: : **:****** :** : :::: :* : ** FVELELRKGTRPLIMYGLKAYVNV LVELELKKGTRPLIMYGLKAYVNI YLLLSKSR-SLPTVLFRLISNLCV FMLISRPHREPGLYTLSCKDESWIEIAKYLKEDVPRLVSSQHVDSVEKI	215 215 222 212 212 212 212 212 212 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH 	215 215 222 212 212 212 212 212 212 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH 	215 215 222 212 212 212 212 212 212 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_hallana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_hallana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLQQTGDGH ** : : : : : : : : : *** ** FSPLAAYHADSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDISTKKPRG FSPLAAYHEDSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDVTKLPRG FSPIAGYHAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMNTIDEATGLHRG FSPVGGFSESDNKILILDVARFKYPCYWVDLKLMYESMFPIDKASGQPRG ***:: : **:****** :** : ::: :* : ** FVELELRKGTRPLIMYGLKAYVNV LVELELKKGTRPLIMYGLKAYVNV YLLLSKSR-SLPTVLFRLISNLCV FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWIDIAKYLKEDVPRLVSSQHVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWIDIAKYLKEDVPRLVSSQHVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQHVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQHVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQHVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQHVDSVEKI	215 215 222 212 212 212 212 212 212 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces pombe	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTBGH 	215 215 212 212 212 212 212 212 212 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH ** : .: : : : : : : : : *** ** FSPLAAYHADSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDISTKKPRG FSPLAAYHEDSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDVTTKLPRG FSPIAGYHPCRDLVLIMDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDSTGKRG ****:: : ****************************	215 215 222 212 212 212 212 212 212 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH ** : .: : : : : : : : : *** ** FSPLAAYHADSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDISTKKPRG FSPLAAYHEDSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDVTTKLPRG FSPLAGYHPCRDLVLIMDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDSTGKRRG ****:: : ***	215 215 222 212 212 212 212 212 212 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH ** : .: : : : : : : : *** ** FSPLAAYHADSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDISTKKPRG FSPLAAYHEDSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDVITKLPRG FSPIAGYHPGRDLVLIMDVARFKYPPHWVVLKLETLQKALCSVDVTTKLPRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDLYDAFFK 	215 215 222 212 212 212 212 212 212 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_hallari Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_hallari Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH ** : .: : : : : : : : : *** ** FSPLAAYHADSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDISTKKPRG FSPLAAYHADSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDISTKKPRG FSPIAGYHPGRDLVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDVTTKLPRG FSPIAGYHPGRDLVLIMDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPVGGFSESDNKILILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPVGGFSESDNKILILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPVGGFSESDNKILILDVARFKYPCYWDLKLMYESMFPIDKASGQPRG ***:: : **!****** :** : ::: :* : ** FVELELRKGTRPLIMYGLKAYVNV LVELELKKGTRPLIMYGLKAYVNY VLLESKSR-SLPTVLFRLTSNLCV FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWIEIAKYLKEDVPRLVSSQHVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQHVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQUVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQUVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQUVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQUVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQUVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQUVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQUVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQUVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQUVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQUVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQUVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQUVDSVEKI FMLISRPHNEPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQUVDSUKI SUVLLEPMHIPLGVLTVG	215 215 222 212 212 212 212 212 212 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thalleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH ** : .: : : : : : : : : : *** ** FSPLAAYHADSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDISTKKPRG FSPLAAYHEDSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDVTTKLPRG FSPIAGYHPGRDLVLIMDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNVCKGTUD FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWIEIAKYLKEDVPRLVSSQHVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWIEIAKYLKEDVPRLVSSQHVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWIEIAKYLKEDVPRLVSSQHVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQHVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQHVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQHVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQHVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQHVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQHVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQHVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQHVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVFRLVSSQHVGSQHVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVFRLVSSQHVGSQHVASUKI SUNJEPHNIPLGVLTVG	215 215 222 212 212 212 212 212 212 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_legans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana	<pre>GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH </pre>	215 215 215 222 212 212 212 212 212 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH 	215 215 222 212 212 212 212 212 212 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thalieri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Drassica_iumes	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH ** : .: : : : : : : : : *** ** FSPLAAYHADSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDISTKKPRG FSPLAAYHEDSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDVTTKLPRG FSPIAGYHPGRDLVLIMDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNVGFILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNVCKFILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNVCKGFRDLING FSPIGGYNVVRFITSKLMMDGPLCK FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWIEIAKYLKEDVPRLVSSQHVDSVCKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWIEIAKYLKEDVPRLVSSQHVDSVCKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQUVDSVCKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQUVDSVCKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQUVDSVCKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQUVDSVCKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQUVDSVCKI SULLEPMHIPLGVLTVG	215 215 212 212 212 212 212 212 212 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH 	215 215 222 212 212 212 212 212 212 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_lelegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTDGH 	215 215 212 212 212 212 212 212 212 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Atabidopsis_thalieri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thalieni Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH ** : : : : : : : : : : : : : : : : :	215 215 222 212 212 212 212 212 212 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH ** : : : : : : : : : : : : : : : : :	215 215 222 212 212 212 212 212 212 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thalleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH ** : ::::::::::::::::::::::::::::::	215 215 222 212 212 212 212 212 212 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTDGH ** : : : : : : : : : : : : *** ** FSPLAAYHADSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDVISTKKPRG FSPLAAYHADSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDVISTKKPRG FSPLAGYHAGDUVLIMDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMNTIDEATGLHRG FSPVGGFSESDNKILILDVARFKYPPHWVPLVLWYSMFPIDKASGQPRG ***:: : **:****** :** : ::: :* : ** FVELELRKGTRPLIMYG	215 215 225 212 212 212 212 212 212 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_hallari Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_hallari Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTDGH ** : :::::::::::::::::::::::::::::	215 215 222 212 212 212 212 212 212 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTGDGH ** : ::::::::::::::::::::::::::::::	215 215 212 212 212 212 212 212 212 212
Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_elegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_thaliana Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_briggsae Caenorhabditis_lelegans Eisenia_fetida Arabidopsis_thaliana	GLRTITKCVKDVSFDEFRKDVISCSTIENKIMAISFCRKVLGQTDGH ** : : : : : : : : : : : : *** ** FSPLAAYHADSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDVISTKKPRG FSPLAAYHADSDQVLIMDVARFKYPPHWVKLETLQKALCSVDVISTKKPRG FSPLAGYHAGDDVLIMDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNVGGFSEDSDNKILIDVARFKYPPHWVPLVLWEAMNTIDEATGLHRG FSPVGGFSEDNKILIDVARFKYPPHWVPLKLWEAMDSIDDSTGKRRG FSPIGGYNVGGFSUDJAKYPPHWVPLKVSSQVDVCK FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWIEIAKYLKEDVPRLVSSQVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWIEIAKYLKEDVPRLVSSQVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWIEIAKYLKEDVPRLVSSQVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVRLVSSQVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVPRLVSSQVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTLSCKDESWISIAKYLKEDVRLVSSQVDSVEKI FMLISRPHREPGLLYTSST SUVFKSLPSNFNQFIRWAER FST SUVFKSLPSNFNQFIRWAER FST SUVFKSLPSNFNQFIRWAER FST SUVFKSLPSNFNQFIRWAER FST SUVFKSLPSNFNQFIRWAER FST SUVFKSLPSNFNGFIRWAER FST SUVFKSLPSNFNGFIRWAER FST SUVFKSLPSNFNGFIRWAER FST SUSF SUSF SUSF SUSF SUSF SUSF SUSF	215 215 225 212 212 212 212 212 212 212

Fig. 2. Alignment of the *Eisenia fetida* phytochelatin synthase putative amino acid sequence and other selected amino acid sequences used to designed degenerates primers using Clustal W: *Caenorhabditis briggsae* (accession no. CAE59471), *Caenorhabditis elegans* (accession no. NP\_496475), *Eisenia fetida* (accession no. EF433776), *Arabidopsis thaliana* (accession no. AAD16046), *Arabidopsis halleri* (accession no. AAS45236), *Brassica juncea* (accession no. CAC37692), *Nicotiana tabacum* (accession no. AAO74500), *Schizosaccharomyces pombe* (accession no. NP\_593552). Amino-acids in bold indicate the five cysteine residues present through the sequences.

Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Schizosaccharomyces_pombe	HETELFKHISKFLSTVGYEDSLTYAAAKACCQGAEILSGC QDTPLYKHVTSILFSKNSICQSKAASDSSLANVAANICCQGAGLFAGRSG SKSGDFEHFKECIRST	352 362 327
Caenorhabditis_briggsae	NEHSDACKLICAEIRRTRFAEVF5555A	329
Caenorhabditis_elegans	TDQNEACKMICSEIRRTRFAEVFSSSA	329
Lisenia_retida	MEHKYAIKQILEALKNLPVYQVVRSCIPGDKLESETHVPVDDGPH	300
Arabidopsis_thaliana	PSKEFCCRETCVKCIKGPDDSEGTVVTGVVVRDGNEQKVDLLVPSTQTEC	402
Arabidopsis_halleri	PSKEFCCRETCVKCIKGPDDSEGTVVIGVVRDGSEQKIDLLVPSTQTEC	402
Brassica_juncea	SSREFCCRETCVTCVRGPGEAEGIVVIGVVRDGSEQNVDLLVPSIQINC	402
Rebisossabaremusos pembo	SSDRFCCLQICVRCIRAIGGNSAIVVSGIVVNGNGEQGVDVLVFISLARI	212
Schizosaccharomyces_pombe	KIINDEDKHININGI	242
Caenorhabditis_briggsae	TETINEMGE	355
Caenorhabditis_elegans	SDRIGNLAE	355
Eisenia_fetida	PEKFSMKPKTWHYVTMLLLMWPYRDDEGSFGRCLDQLMADQLK	398
Arabidopsis_thaliana	ECGPEATYPAGNDVFTALLLALPPQTWSGIKDQALMHEMKQLIS	446
Arabidopsis_halleri	VSGPEANYPAGNDVFTALLLALPPQTWSGIKDQALMHEMKQLIS	446
Brassica_juncea	ECGPEANFPAGNDVFTVLLLALPPQTWSGIKDQALMQEMKQLIS	446
Nicotiana_tabacum	SCCPSGQAGCSPMHPASNDVLTALLLALPPHTWSRIKDTKVLQEIENLVS	462
Schizosaccharomyces_pombe	ITMAFWAIFSLPMIQKALPKGVLEEIQSLLK	374
	:	
Caenorhabditis_briggsae	FCFVPSIKYCVILLQTN 372	
Caenorhabditis_elegans	KYKNEFSAETMNEMSE 371	
Eisenia_fetida	ASASELLQNEVTILRQQVSSVLGFVAVCDACPCKQKAAEAAK 440	
Arabidopsis_thaliana	MASLPTLLQEEVLHLRRQLQLLKRCQENKEEDDLAAPAY 485	
Arabidopsis_halleri	MASLPTLLQEEVLHLRRQLQLLKRCQENKEEEDLAAPAY 485	
Brassica_juncea	MASLPTMLQEEVLHLRRQLQLLKRCQENKEEEDFAAPAF 485	
Nicotiana_tabacum	AENLPPLLQEEILHLRGQFLLLKKCKDNKVEEDLAAPPF 501	
Schizosaccharomyces_pombe	EVEISEINTQLTALKKQLDSLTHCCKTDTGCCSSSCCKNT 414	

Fig. 2. (Continued)



Fig. 3. Expression levels of phytochelatin synthase mRNA in control and Cd exposed (8, 80, or 800 mg/kg) earthworms after 2 days (white bars) and 14 days (black bars) of exposure; \* significant difference (p < 0.05).

after 2 and 14 days of exposure to 8 mg/kg cadmium (5.8 fold;  $p = 2 \times 10^{-4}$  and 4.9 fold;  $p = 1 \times 10^{-4}$ , respectively) compared to the control animals (Fig. 3). For exposure to 80 and 800 mg/kg no significant differences were observed (Fig. 3) compared to the control animals (Table 1).

#### 3.2.2. Cd-metallothionein

In earthworms exposed to 8 mg/kg of Cd in soil a slight increase of the transcript levels encoding MT was observed independent of exposure period (1.45 fold; p = 0.014 and 2.48 fold;  $p = 2 \times 10^{-4}$  for 2 and 14 days of exposure, respectively) (Fig. 4).

For animals exposed to 80 and 800 mg/kg of Cd, a strong increase of the number of mRNA coding MT was observed

Table 1

Induction factors (compared with "zero Cd Control") and p values observed for PCS and MT in earthworms exposed to 8, 80, and 800 mg/kg cadmium

	8 mg/kg		80 mg/	/kg	800 mg	g/kg
	PCS	MT	PCS	MT	PCS	MT
2 days	5.78	1.45	0.77	54.04	0.57	93.56
	<i>p</i> <0.001	<i>p</i> < 0.05	n.s.	<i>p</i> < 0.05	n.s.	<i>p</i> < 0.05
14 days	4.94	2.48	1.36	65.93	0.74	87.28
	p<0.001	<i>p</i> < 0.001	n.s.	<i>p</i> < 0.01	n.s.	<i>p</i> < 0.05

n.s., non significant.



Fig. 4. Expression levels of Cd-metallothionein mRNA in control and Cd exposed (8, 80, or 800 mg/kg) earthworms after 2 days (white bars) and 14 days (black bars) of exposure; \* significant difference (p < 0.05).

again this was independent of the exposure period (54.04 and 65.93 fold after 2 and 14 days of exposure to 80 mg/kg, respectively; 93.56 and 87.28 fold after 2 and 14 days of exposure to 800 mg/kg, respectively) (Fig. 4; Table 1).

#### 4. Discussion

The dogmatic assumption that phytochelatins were not present in the animal kingdom was overturn with the characterization of phytochelatin synthase in the nematode C. elegans, a representative member of the Ecdysozoa. The isolation of the gene encoding PCS from E. fetida, provides the first functional evidence for its presence in a phylum belonging to the Lophototrochozoa, implying that pcs genes are far more widespread than previously anticipated (see Clemens, 2006). Under the recently proposed evolutionary relationships between animal phyla (Jones and Blaxter, 2005) this would leave only the superphyla Deuterostomia without a characterized PCS representative. However, mining cDNA and genome databases reveals putative pcs genes from Strongylocentrotus purpuratus (GenPept: XP\_790643.1, XP\_780594.1), together with Ciona intestinalis and Ciona savignyi (Ensembl: ENS-CING00000011973 and ENSCSAVG0000009417) representing, respectively, the Echinodermata and Urochordata phyla belonging to the Deuterostomia. Intriguingly, extensive analysis of various vertebrate genomes did not reveal any regions (with or without predicted cDNAs) with significant homology to PCS (Fig. 5).

The first proof of the existence of a functional PCS in an animal species other than Nematods made it possible to compare the deduced amino-acid sequence of the *E. fetida* PCS with the protein sequences of PCS of plants, a yeast and 2 Caenorhabditis species (Fig. 2). The C-terminal half of the protein, exhibits limited apparent conservation (20-30% identity) whilst, on the other hand, a significant homology can be detected in the N-terminal half of the protein (50-60% identity) a feature which is typical of the PCS family (Clemens et al., 2001). Moreover, five cysteine residues, among which two are adjacent (amino acids 99 and 100), are conserved in all species analysed within our alignments. The presence of these five cysteine residues is a key element since this highly conserved N-terminal part is involved with the catalytic activity of the enzyme. Maier et al. (2003) proposed that the Cd-binding activity of phytochelatin synthase in S. pombe is also linked to this region of amino-acid sequences and its associated cysteine motif. These authors also suggest that activation would putatively involve interaction of metal ions with essential metal-binding activations sites in the N-terminal segment of the protein incorporating the conserved cysteine residues. Additional binding sites were identified at the C-terminus of the protein which were not essential for activity but have been proposed to be involved in posttranslational control and protein stability (Ruotolo et al., 2004; Romanyuk et al., 2006).



Fig. 5. Phylogenetic tree of phytochelatin synthases carried out with the Phylip software program of Protdist (Joseph Felsenstein, University of Washington, Seattle, USA). Seven full-length PCS coding sequence used to design degenerated primers from yeast to plants and nematodes, plus the full-length PCS coding sequence of *Eisenia fetida*. Distances were measured using the Jones–Taylor–Thornton model. Following UPGMA clustering a consensus tree was constructed. Species abbreviations: Cb = Caenorhabditis briggsae, Ce = Caenorhabditis elegans, Ef = Eisenia fetida, Sp = Schizosaccharomyces pombe, At = Arabidopsis thaliana, Ah = Arabidopsis halleri, Bj = Brassica juncea, Nt = Nicotiana tabacum.

After cloning of the complete coding sequence of PCS in the oligochaete annelid worm E. fetida, and taking into account the role of this enzyme in the detoxification of metals in plants, we measured its expression in worms exposed in vivo to cadmium-spiked soils using real-time PCR. MTs are proteins that play an essential role in homeostasis and detoxification of metals in oligochaetes, and the expression of the gene coding this protein is well documented. Previous studies in E. fetida have shown a dose-dependant relationship between mt gene induction and cadmium exposure levels (Brulle et al., 2006, 2007). Parallel observations have been made in other earthworm species (Galay-Burgos et al., 2003; Stürzenbaum et al., 2004). Incidentally, the quantification of mt gene expression also provided an effective way of determining whether exposure to Cd was eliciting the established toxic responses and provides insight into the functional mechanisms of detoxification at a variety of Cd exposure levels.

In the present study we measured *pcs* and *mt* expressions specifically in the major immune tissue, the circulating fluid-suspended cœlomocytes. Cœlomocytes contain most immune effectors and proteins involved in detoxification

Cb PCS

(Homa et al., 2003; Brulle et al., 2006). Although, expression of the *pcs* gene in other organs or tissues cannot be excluded, the cells of the cœlomic cavity are integrally involved in detoxification of material absorbed via alimentary or dermal uptake routes and whose route of excretion may ultimately be the nephridia (earthworm kidney) (Stürzenbaum et al., 2004).

During experimental intoxications, *pcs* showed a significant increase in its level of expression at the lowest cadmium concentration of only 8 mg/kg. This increase was 5.8-fold after 2 days and 5-fold after 14 days of exposure, respectively. No variation of expression was observed at higher concentrations of Cd. These results suggest that regulation of the gene coding PCS occurs at the transcriptional level in *E. fetida.* In plants, there is limited data concerning the regulation of the expression of PCS in response to metal ions. Species specific hypotheses have been made suggesting that PCS is controlled at the transcriptional level (Clemens et al., 2001; Zhang et al., 2005) and/or at the post-transcriptional level (Ha et al., 1999; Vatamaniuk et al., 2000).

During intoxications with Cd, mt showed a low but significant induction in worms exposed to 8 mg/kg (1.5 fold after 2 days and 2.5 fold after 14 days). Higher doses elicited substantially greater inductions of 54 and 93-fold in response to exposure to concentrations of 80 and 800 mg/ kg cadmium, respectively. This classical observation, demonstrating dose-dependent and time-dependent regulation of *mt*, is of interest when compared to the regulation of pcs. Indeed, MT exhibited a weak but specific induction of its level of expression when exposed to 8 mg/kg of Cd whereas *pcs* only exhibited significant induction at this (low) exposure level. In contrast, at high Cd exposures (80) and 800 mg/kg), pcs did not show any increase of its level over control, whereas mt was substantially upregulated (from 54 to 93 fold). These results suggest that pcs is implicated in dose-dependent cadmium detoxification. Moreover, the timing of pcs and mt expression in E. fetida during Cd intoxication suggest that PCs and MT may act together in detoxification process, with PCs having an immediate and essential role at low concentration, and MT participating centrally later and at higher concentrations. A coordinated action of pcs and mt has been proposed by Zhang et al. (2005), in a study performed on garlic, A. sativum.

This later observation identifies a key question, what is the functional relationship between gene encoded MT and Phytochelatins? It has been suggested that in yeast species the two systems are ion specific with gene encoded *mts* providing resistance to Cu whilst Phytochelatins protect against Cd (Perego and Howell, 1997). In plants the metal specificity and function of the two systems is species and tissue specific (Rauser, 1999). Whilst it has been suggested that in *C. elegans* PCS may provide an alterative pathway for metal detoxification supplementing or compensating for Cd-MTs (Hughes and Stürzenbaum, 2007). It will therefore be important to further investigate both ion and tissue specificity in addition to the time and dose parameters explored in the current manuscript.

#### 5. Conclusions

The complete cloning of a cDNA coding phytochelatin synthase in *E. fetida* and its expression analysis under cadmium exposure allow us to consider the expression of PCS in *E. fetida* as a candidate potential biomarker for low level metal pollution. However, further studies will have to be performed to confirm or refine this proposal. *E. fetida* now provides an ideal model to better understand the complementary roles of PCS and gene encoded MTs in animals with developed immune and blood systems since, with the exception of *C. elegans*, this oligochaete worm is the only metazoan invertebrate in which both detoxification pathways have been identified (see Clemens, 2006).

#### Acknowledgments

The technical assistance of Régine Leroux is gratefully acknowledged. The present study was supported by a grant from the Région Nord-Pas-de-Calais, Program de Recherches Concertées: Sites et sols pollués-Environnement et Activités Humaines. F.B was supported by a doctoral fellowship from ADEME (Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie).

#### References

- Brulle, F., Mitta, G., Cocquerelle, C., Vieau, D., Lemière, S., Leprêtre, A., Vandenbulcke, F., 2006. Cloning and real-time PCR testing of 14 potential biomarkers in *Eisenia fetida* following cadmium exposure. Environ. Sci. Technol. 40, 2844–2850.
- Brulle, F., Mitta, G., Leroux, R., Lemière, S., Leprêtre, A., Vandenbulcke, F., 2007. The strong induction of metallothionein gene following cadmium exposure transiently affects the expression of many genes in *Eisenia fetida*: a trade-off mechanism? Comp. Biochem. Physiol. C 144, 334–341.
- Clemens, S., 2006. Evolution and function of phytochelatin synthases. J. Plant Physiol. 163, 319–332.
- Clemens, S., Schroeder, J.I., Degenkolb, T., 2001. *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. Eur. J. Biochem. 268, 3640–3643.
- Cobbett, C., 1999. A family of phytochelatin synthase genes from plant, fungal and animal species. Trends Plant Sci. 4, 335–337.
- Cobbett, C., Goldsbrough, P., 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Annu. Rev. Plant Biol. 53, 159–182.
- Corpet, F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucl. Acids Res. 16, 10881–10890.
- Demuynck, S., Grumiaux, F., Descamps, M., Leprêtre, A., 2005. Differential expression of stress proteins in response to heat and cadmium in two oligochaete species *Eisenia fetida* and *E. Andrei*. Trends Comp. Biochem. Physiol. 10, 105–110.
- Demuynck, S., Grumiaux, F., Mottier, V., Schikorski, D., Leprêtre, A., 2006. Metallothionein response following cadmium exposure in the oligochaete species *Eisenia fetida*. Comp. Biochem. Physiol. C 144, 34–46.
- Dominguez, J., 2004. State of the art and new perspectives on vermicomposting research. In: Earthworm Ecology. CRC Press, Boca Raton, pp. 401–424.

- Fowler, B.A., Hildebrand, C.E., Kojima, Y., Webb, M., 1987. Nomenclature of metallothionein. Experientia Suppl. 52, 19–22.
- Frohman, M.A., Dush, M.K., Martin, G.R., 1988. Rapid production of fulllength cDNAs from rare transcripts: amplification using a single genespecific oligonucleotide primer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998–9002.
- Galay-Burgos, M., Spurgeon, D.J., Weeks, J.M., Stürzenbaum, S.R., Morgan, A.J., Kille, P., 2003. Developing a new method for soil pollution monitoring using molecular genetic biomarkers. Biomarkers 8, 229–239.
- Grill, E., Winnacker, E.L., Zenk, M.H., 1985. Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. Science 230, 674–676.
- Grill, E., Loffler, S., Winnacker, E.L., Zenk, M.H., 1989. Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6838–6842.
- Ha, S.-B., Smith, A.P., Howden, R., Dietrich, W.M., Bugg, S., O'Connell, M.J., 1999. Phytochelatin synthase genes from arabidopsis and the yeast schizosaccharomyces pombe. Plant Cell 11, 1153–1163.
- Hirata, K., Tsuji, N., Miyamoto, K., 2005. Biosynthetic regulation of phytochelatins, heavy metal-binding peptides. J. Biosci. Bioeng. 100, 593–599.
- Homa, J., Niklinska, M., Plytycz, B., 2003. Effect of heavy metals on coelomocytes of the earthworm *Allolobophora chlorotica*. Pedobiologia 47, 640–645.
- Honeycutt, M.E., Roberts, B.L., Roane, D.S., 1995. Cadmium disposition in the earthworm *Eisenia fetida*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 30, 143–150.
- Hughes, S., Stürzenbaum, S.R., 2007. Single and double metallothionein knockout in the nematode *C. elegans* reveals cadmium dependent and independent toxic effects on life history traits. Environ. Pollut. 145, 395–400.
- Jones, M., Blaxter, M., 2005. Evolutionary biology—animal roots and shoots. Nature 434, 1076–1077.
- Kim, H.M., Kim, D.S., Chung, Y., 2006. Environmental genomics related to environmental health biomarker. Mol. Cell. Toxicol. 2, 75–80.
- Klaassen, C.D., Liu, J., Choudhuri, S., 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 39, 267–294.
- Liao, V.L.C., Freedman, J.H., 1998. Cadmium-regulated genes from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Identification and cloning of new cadmium-responsive genes by differential display. J. Biol. Chem. 273, 31962–31970.
- Maier, T., Yu, C., Küllertz, G., Clemens, S., 2003. Localization and functional characterization of metal-binding sites in phytochelatin synthases. Planta 218, 300–308.
- OECD, 1984. OECD guideline for testing chemicals. Section 2: effects on biotic systems. Method, 207. Earthworm, acute toxicity tests, Paris, France.

- Palmiter, R.D., 1998. The elusive function of metallothioneins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 8428–8430.
- Perego, P., Howell, S.B., 1997. Molecular mechanisms controlling sensitivity to toxic metal ions in yeast. Toxicol. Appl. Pharmacol. 147, 312–318.
- Rauser, W.E., 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants—the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. Cell Biochem. Biophys. 31, 19–48.
- Romanyuk, N.D., Rigden, D.J., Vatamaniuk, O.K., Lang, A., Cahoon, R.E., Jez, J.M., Rea, P.A., 2006. Mutagenic definition of a papain-like catalytic triad, sufficiency of the N-terminal domain for single-site core catalytic enzyme acylation, and C-terminal domain for augmentative metal activation of a eukaryotic phytochelatin synthase. Plant Physiol. 141, 858–869.
- Rose, T.M., Schultz, E.R., Henikoff, J.G., Pietrokovski, S., McCallum, C.M., Henikov, S., 1998. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. Nucl. Acids Res. 26, 1628–1635.
- Ruotolo, R., Peracchi, A., Bolchi, A., Infusini, G., Amoresano, A., Ottonello, S., 2004. Domain organization of phytochelatin synthase functional properties of truncated enzyme species identified by limited proteolysis. J. Biol. Chem. 279, 14686–14693.
- Stürzenbaum, S.R., Georgiev, O., Morgan, A.J., Kille, P., 2004. Cadmium detoxification in earthworms: from genes to cells. Environ. Sci. Technol. 38, 6283–6289.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment throught sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl. Acids Res. 22, 4673–4680.
- Timmermans, M.J.T.N., Ellers, J., Roelofs, D., Van Straalen, N.M., 2005. Metallothionein mRNA expression and cadmium tolerance in metalstressed and reference populations of the springtail *Orchesella cincta*. Ecotoxicology 14, 727–739.
- Vasak, M., Hasler, D.W., 2000. Metallothioneins: new functional and structural insights. Curr. Opin. Chem. Biol. 4, 177–183.
- Vatamaniuk, O.K., Mari, S., Lu, Y.-P., Rea, P.A., 2000. Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase. Blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. J. Biol. Chem. 275, 31451–31459.
- Vatamaniuk, O.K., Bucher, E.A., Ward, J.T., Rea, P.A., 2001. A new pathway for heavy metal detoxification in animals. phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. J. Biol. Chem. 276, 20817–20820.
- Zhang, H., Xu, W., Guo, J., He, Z., Ma, M., 2005. Coordinated responses of phytochelatins and metallothioneins to heavy metals in garlic seedlings. Plant Sci. 169, 1059–1065.

### **CHAPITRE II**

Identification et étude du profil d'expression de nouveaux gènes induits par les éléments traces métalliques dans les cellules circulantes de l'Annélide *Eisenia fetida* 

Chapitre II

### **Chapitre II**

Identification et étude du profil d'expression de nouveaux gènes induits par les éléments traces métalliques dans les cellules circulantes de l'Annélide *Eisenia fetida* 

#### **Publication 4**

Identification and expression profile of gene transcripts differentially expressed during metallic exposure in *Eisenia fetida* cœlomocytes, *Developmental and Comparative Immunology*. 2008, Vol. 32, 1441-1453

La faiblesse de l'approche « ciblée » décrite précédemment (étude de candidatsbiomarqueurs dont le rôle est documenté) réside dans le fait que nous dépendons de données publiées ou disponibles dans les banques de données. De plus, cette approche ciblée ne nous a pas permis d'identifier d'aussi bons candidats que la *Cd-mt*.

Parmi les techniques biologiques permettant l'analyse transcriptomique, la génération d'ESTs, de petites portions d'ADN (de 200 à 500 paires de bases habituellement) générées à partir du séquençage partielle d'une des extrémités de clones d'ADN complémentaires choisis au hasard, est l'une des techniques les plus simples pour caractériser le transcriptome. En l'absence du séquençage du génome complet des Lumbricidés, les ESTs permettent une identification rapide des gènes exprimés, grâce à l'analyse de séquences. De plus, ces séquences sont une ressource importante pour les études de génomique comparative et fonctionnelle. L'analyse transcriptomique utilisant des ESTs fourni un jeu de données fondamental et rapide pour l'identification de gènes exprimés dans certaines cellules, certains tissus ou dans un organe donné.

Depuis quelques années, certains projets ont permis de générer des ESTs chez des Annélides Oligochètes. Ainsi, Stürzenbaum *et al.* (2003) et Lee *et al.* (2005) ont produit respectivement plus de 17 000 ESTs chez *Lumbricus rubellus* et 1 106 ESTs chez *Eisenia andrei.* Cependant, il existe très peu de données disponibles dans les banques de données génétiques pour *Eisenia fetida*. En effet, jusqu'en septembre 2007, le nombre de données génétiques disponibles dans GenBank<sup>TM</sup> pour *Eisenia fetida* était de 103 séquences nucléotidiques et 96 séquences protéiques. Ainsi, en complément de l'approche ciblée, nous avons mis en œuvre une approche écotoxicogénomique en écotoxicologie des invertébrés. Cette approche dite « globale » repose sur la réalisation de banques soustractives d'ADNc (SSH : Suppressive Subtraction Hybridization) (Diatchenko *et al.*, 1996) qui devraient

permettre d'identifier de nouveaux gènes dont l'expression varie lors d'un épisode d'exposition métallique, donc candidats biomarqueurs.

Les banques soustractives ont été réalisées sur cœlomocytes car nous avons montré lors de l'approche ciblée que les résultats obtenus sur cellules circulantes et animaux entiers étaient similaires, justifiant notre choix initial de travailler sur les cœlomocytes du fait de l'implication de la plupart des effecteurs dans des mécanismes de défense immunitaire. En effet, les variations les plus importantes ont été mesurées à la fois sur cœlomocytes et animal entier et d'un point de vue technique, les cœlomocytes sont simples à échantillonner, les ARN extraits sont d'excellente qualité et le protocole utilisé est non invasif. Concrètement, un substrat artificiel contenant un mélange complexe comportant Cd, Pb et Zn à des concentrations réalistes (40 mg Cd/kg ; 500 mg Pb/kg ; 700 mg Zn/kg) (i.e. que l'on peut retrouver sur le terrain) a été réalisé. Des lots de 25 Eisenia fetida ont été exposés pendant 1 jour (exposition courte) ou 14 jours (exposition longue) à ce mélange. Les ARN ont ensuite été extraits des cœlomocytes et la banque soustractive mise en œuvre (Annexe 4 et 5). Un total de 1536 ESTs issus des trois conditions étudiées lors de notre banque soustractive a été obtenu. Ces séquences se répartissent de la manière suivante : 768 séquences correspondant à la condition sur exprimé 14 jours, 384 séquences correspondant à la condition sur exprimé 1 jour et 384 séquences correspondant à la condition sous-exprimé 14 jours. Nous avons volontairement négligé la condition Reverse 1 jour en raison du Trade-off mis en évidence dans l'approche ciblée lors de l'étude réalisée sur animal entier (Brulle et al., 2007). L'ensemble de ces séquences a ensuite fait l'objet d'une analyse bioinformatique à l'aide du logiciel Sequencher<sup>TM</sup> 4.2 (Genecode, Ann Arbor, Michigan). Cette analyse nous a permis d'extraire, vecteurs, adaptateurs et séquences de mauvaises qualités pour obtenir au final 764 séquences uniques de haute qualité. Ces 764 ESTs ont ensuite été répartis en 6 catégories fonctionnelles sur la base de données disponibles dans les banques de données et l'utilisation de «Gene Ontology» (Ashburner et al., 2000). Une fonction putative a été attribuée à 27,62% des ESTs analysés, 24,34% des ESTs présentent des homologies avec des protéines dont la fonction est inconnue, signifiant que 48,04% correspondent à des protéines nouvelles. L'analyse des séquences a montré que la catégorie regroupant des gènes impliqués dans le métabolisme était la catégorie fonctionnelle prédominante quelque soit la banque considérée. De plus, cette analyse bioinformatique nous a permis d'identifier 18 nouveaux candidats d'exposition aux ETMs, choisis sur la base de leur redondance i.e. les effecteurs les plus abondants ont été choisis.

Parmi les 18 candidats on retrouve, un gène impliqué dans la réponse immunitaire (lysénine), 5 gènes impliqués dans le métabolisme (Cd-mt, cytochrome c oxydase I, cytochrome b, tctp et granuline). On retrouve également 2 gènes codant des protéines du signal de transduction (sarcoplasmic calcium-binding protein (SCBP) et parvalbumine), puis on retrouve un gène codant une protéine ribosomale : la Ribosomal protein S16. Enfin, les 9 autres gènes sont soit similaires à des protéines dont on ignore la fonction (4 candidats) soit ne présentent aucune similarité avec des séquences déjà présentes dans les banques de données. Ces 18 nouveaux candidats ont fait l'objet de 2 étapes de validation successives. La première étape de validation a consisté en l'étude de leurs profils d'expression génique par PCR en temps réel, grâce à une banque d'ADN complémentaires provenant des conditions qui nous ont permis de réaliser la banque soustractive. Puis, les candidats validés lors de cette première étape ont fait l'objet d'une deuxième étape de validation passant par une étude en microcosme qui consiste en la réalisation d'expositions en microcosmes naturels en conditions contrôlées au laboratoire. Pour ces études en microcosme, nous avons utilisé un sol fortement pollué provenant d'un site localisé à proximité de l'emplacement de l'ancienne usine de Metaleurop à Evin-Malmaison, dont les concentrations en métaux sont comparables à celles utilisées pour la réalisation de la banque soustractive.

Suite à ces 2 étapes de validation successives, 3 candidats parmi les 18 initiaux ont montré des variations significatives de leur niveau d'expression. Ces 3 candidats sont : la Cd-MT (dont la présence démontre que l'étape de soustraction de la banque soustractive s'est bien déroulé et que les autres gènes validés sont bien différentiellement exprimés pour les conditions d'exposition utilisées), la Lysénine, une protéine hæmolytique, localisée dans les cœlomocytes et plus particulièrement dans un type cellulaire donné : les chloragocytes et un dernier candidat dont le clonage par RACE-PCR de la partie codante complète a identifié comme étant la Coactosin-Like Protein, une protéine impliquée dans des mécanismes de signalisation cellulaire et plus particulièrement dans la synthèse des leucotriènes chez les vertébrés, mais dont le rôle est encore inconnu chez les invertébrés.



# Identification and expression profile of gene transcripts differentially expressed during metallic exposure in *Eisenia fetida* coelomocytes

Franck Brulle<sup>a</sup>, Claude Cocquerelle<sup>b</sup>, Guillaume Mitta<sup>c</sup>, Vincent Castric<sup>d</sup>, Francis Douay<sup>e</sup>, Alain Leprêtre<sup>a</sup>, Franck Vandenbulcke<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire d'Ecologie Numérique et d'Ecotoxicologie, EA 3570, Université de Lille 1, Cité scientifique, Bâtiment SN3, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

<sup>b</sup>Laboratoire de la Régulation des Signaux de Division, EA 4020, Université de Lille 1, Cité Scientifique, Bâtiment SN3, IFR 118, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

<sup>c</sup>Biologie et Ecologie Tropicale et Méditerranéenne, UMR 5244, CNRS Université de Perpignan EPHE,

52 Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

<sup>d</sup>Génétique et Evolution des Populations Végétales, UMR CNRS 8016, Université de Lille 1,

59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

<sup>e</sup>Laboratoire Sols et Environnement, Institut Supérieur d'Agriculture, 48 Boulevard Vauban, 59046 Lille Cedex, France

Received 20 March 2008; received in revised form 4 June 2008; accepted 21 June 2008 Available online 15 July 2008

**KEYWORDS** Eisenia fetida;

Metallic pollution; Immune cells; SSH; Gene expression; Biomarker

#### Summary

The aim of this work was to identify in *Eisenia fetida* genes whose expression are regulated following exposure to a complex mixture of metallic trace elements (MTE) representative of a highly polluted smelter soil. Suppression subtractive hybridization (SSH) was used to construct cDNA libraries enriched in up- or down-regulated transcripts in the immunecirculating cells of the coelomic cavities, namely coelomocytes, from worms exposed to metallic pollution. Among 1536 SSH-derived cDNA clones sequenced, we identified 764 unique ESTs of which we selected 18 candidates on the basis of their redundancy. These selected candidates were subjected to a two-step validation procedure based on the study of their expression level by real-time PCR. The first step consisted in measuring the expression of the 18 candidates in worms exposed to artificial contaminated soil. The second step consisted in measuring the expression in animals exposed to a "naturally" contaminated soil sampled close to a smelter. Both steps allowed us to highlight 3 candidates that are strongly induced in worms exposed to a smelter polluted soil. These candidates are: the well-known MTE-induced Cd–metallothionein and 2 original

\*Corresponding author. Tel.: +33 3 20 33 59 99.

E-mail address: franck.vandenbulcke@univ-lille1.fr (F. Vandenbulcke).

<sup>0145-305</sup>X/ $\$  - see front matter @ 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.dci.2008.06.009

biomarkers, lysenin, and a transcript, which cloning of the complete coding sequence identified as the coactosin-like protein.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

#### Introduction

Human activities, especially metallurgical ones, lead to accumulation of metal trace elements (MTE) in the topsoils, where one typically observes concentrations largely exceeding the natural background. Heavy contaminations of soils are a threat to public health. Cases of cancer related to high cadmium concentrations have been described [1].

Moreover, the presence of high amounts of these MTE constitutes a major stress likely to disturb the reproduction and immunity functions of animals [2]. It has been also demonstrated that metallic pollution sensitizes invertebrates used in aquaculture (mussel, ovster, shrimp) to microbial infections by altering the defence processes [3,4]. MTE can generate an environmental stress likely to affect the organisms exposed to polluted soils. Plants and animals living in close contact with polluted soils were studied in order to better understand the physiological changes, the mechanisms of acclimation and the mechanisms of detoxification caused by metals [5,6]. According to Weeks [7], a "biomarker" is a biological response to a chemical (pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons, MTE,...), which induces a stress and could assess exposure or point out toxic effects. Biomarkers have been also defined as any observable and/or measurable variation at the molecular, biochemical, cytological, physiological, biological or behavioural level revealing past or present exposure of an organism to one or several pollutants [8]. Most are early markers of exposure that do not reveal longterm effects on the ecosystem. The development of biomarkers allowing an early diagnosis of long-term ecosystem dysfunctions represents a challenge for ecotoxicologists. The emergence of molecular biology techniques applied to ecotoxicology, allowed a better understanding of the mechanisms of action of contaminants in living organisms. Indeed, gene expression profiles represent the first level of integration between environmental stressors and the genome, which, through the synthesis of proteins, pilots the response of the organisms to external changes. Thus, analysis of the changes of gene expression is a powerful tool, (1) to diagnose the existence of a stress in a population and (2) to analyse mechanistically the response to a stress.

Soil health and sustainable productivity depends on living organisms, which affect the cycling rate and availability of the major organic and non-organic compounds in their constant search for food and energy sources [9]. One of the most studied faunistic groups is the Annelida Oligochaeta group. These animals play a key role in most continental ecosystems, represent an important part of soil macrofauna and are implied in the maintenance of the structure and the fertility of soils. Immunotoxicological studies demonstrated that MTE can affect phagocytic activity in *Lumbricus terrestris* [10] and in *Eisenia andrei* [11]. Annelids are usually strongly affected by a metal pollution. For example, metallic pollution of the soil can delay sexual maturation [12], slow down growth [13], modify enzymatic activities [14], and modify gene expression [15–17]. For 10 years, analysis of gene expression profiles has made it possible to identify biomarker candidates in Oligochaeta Annelida. The best known candidate is the metallothionein (MT), a protein of low molecular weight (6000–8000 Da), rich in cysteines (approximately 30%), involved in detoxification of metals such as cadmium and in the homeostasis of essential trace elements such as zinc [18,19]. MT is regarded as a good biomarker of exposure because it shows a dose and time-dependent increase of the protein and of the number of transcripts coding MT when worms are exposed to a metal contamination and especially cadmium [15,20].

In a recent study, we partially cloned and measured the gene expression of 14 potential biomarkers in the laboratory model Eisenia fetida after in vivo exposure to Cd in artificial soil. Effectors were chosen among highly preserved proteins for which variations (in terms of protein guantity and/or expression) following metal exposure were reported in the literature. Expression was measured in coelomocytes since the majority of the selected effectors were known to be involved in defence mechanisms [15]. However, this "targeted" approach provided no better candidate than MT. Thus, we undertook an un-selective strategy by producing SSH libraries on the same model. In the present study, this molecular biology technique was used to identify transcripts exhibiting variations of their amount following metal exposure. Worms were exposed to artificial soil contaminated by a realistic mixture of MTE i.e. metal concentrations, which can be found in a strongly polluted smelter soil. The aim of the study being the identification of genes, which response early and consistently across timepoints, kinetics of intoxication of 1 and 14 days were performed. Biomarker candidates selected after SSH, were submitted to two validation steps. The first step consisted in the analysis of the expression level of these candidates using real-time PCR in animals exposed to contaminated artificial soil. The second step of validation was an analysis of the expression level of the candidates validated in step 1 in animals exposed to a "naturally" polluted soil originating from Metaleurop, the main European lead smelter located in the north of France that generated significant atmospheric emissions (in 2001, Pb: 18.4 tons, Zn: 26.2 tons, Cd: 823 kg, [21]) until 2003, the closing date of its activities.

#### Material and methods

#### Animals and treatment

Adult earthworms came from controlled cultures in laboratory. They were bred at an ambient temperature of  $22\pm2$  °C, in the dark, on vegetable mould with fresh cattle manure as food source. Moisture content was maintained

around 60%. Artificial substrates were prepared as described in the OECD guidelines [22]. Briefly, the substrate was composed (percentages refer to dry weight) of 10% sphagnum, 20% kaolinite clay, and 70% quartz sand. The pH was adjusted to  $6\pm0.5$  with CaCO<sub>3</sub>. Metals (CdCl<sub>2</sub>, PbCl<sub>2</sub> and ZnCl<sub>2</sub>) were added to the soil within half an hour of introducing the worms. The concentrations used were  $40 \text{ mg kg}^{-1}$  of Cd, 500 mg kg<sup>-1</sup> of Pb and 700 mg kg<sup>-1</sup> of Zn. For the SSH, three groups of 25 adult worms were used per condition (75 worms per condition) and exposure lasted either 1 or 14 days. At the end of the exposure periods, worms were rinsed in distilled water, coelomocytes were extruded and cellular RNA was extracted as described below.

At the same time, the field soil was collected from a site located near the former smelter. Soil was collected from the top 20 cm layer after removal of vegetation, transferred to the laboratory and fresh soil aggregates were broken up then air-dried and sieved through a 4mm mesh. Physical-chemical parameters of soil are presented in Supplementary Table 1. Total Cd, Pb and Zn and CaCl<sub>2</sub> extractible concentrations were measured in artificial and in Metaleurop soils according to previously described procedures [23,24].

Real-time PCR analysis was done using worms (pools of 25 animals) exposed 1 or 14 days to metal-spiked artificial soil (like the worms used for the SSH) or exposed to a naturally contaminated soil from Metaleurop.

#### Ethanol and electrical extrusion

Groups of 25 worms were placed for 5 min in a 50-mL polypropylene tube containing 30 mL of cold extrusion medium (2.5 mg mL<sup>-1</sup> EDTA, 8.5 mg mL<sup>-1</sup> NaCl, pH 7.3, 5% ethanol). Then, worms were stimulated 10 times using short (<5s) exposure to 9 V alternate current [25]. After removal of the worms, a centrifugation (2000g, 6 min) was performed to collect pellets.

#### Suppression subtractive hybridization

In order to optimize detection of transcripts regulated after contamination, the subtractive libraries were made using four pooled samples: 3 groups of 25 uncontaminated adult worms at 1 day, 3 groups of 25 uncontaminated adult worms at 14 days, 3 groups of 25 contaminated adult worms at 1 day and 3 groups of 25 contaminated adult worms at 14 days. Coelomocytes total RNA was extracted from each group using Tri-Reagent (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, USA) according to manufacturer's instructions. One hundred micrograms of total RNA from each group were used to prepare 2 µg of mRNA (contaminated and control). mRNA were isolated using polyA Spin mRNA Isolation Kit (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA). The products of first and second strand cDNA synthesis were Rsal endonuclease digested. After ligation and hybridization, PCR amplifications were performed as described in the PCRselect cDNA subtraction manual (Clontech, Palo Alto, CA, USA). PCR products were cloned using TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen Life Technologies, France) with the pCR4-TOPO vector and chemically competent TOP10F' One Shot Escherichia coli.

Insert amplification was performed by picking randomly individual colonies and putting them directly in PCR mix. PCR reactions were done with GoTag polymerase (Promega) in 96-wells plates using M13 primers and typical PCR cycling conditions: 10 min at 94 °C then 1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C, and 1 min at 72 °C for 25 cycles. PCR products were purified in 96-wells plates using UltraClean-htp<sup>™</sup> 96 Well PCR Clean-Up Kit (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, USA) according to manufacturer's instructions. cDNA fragments isolated from the individual clones were sequenced using a dideoxydye-terminator method (CEQTM DTCS-Quick Start kit, Beckman coulter) and a CEQTM 8000 apparatus (Beckman Coulter). Sequencing was performed using the forward primer T7 (TAATACGACTCACTATAGGG). Sequences were analysed using the Sequencher<sup>™</sup> software (Gene Codes Corporation). Unique sequences (from contigs or singletons) were submitted to database searches using BLASTX and BLASTN softwares (http://blast.genome.jp/ or http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Specific domain searches were performed using RPS-BLAST (http://www.ncbi.nlm. nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi). Gene function was inferred from sequence identity with Genbank database and the "Gene Ontology" classification (http://www. geneontology.org/).

#### Quantitative RT-PCR

Total RNA from pools of 25 individuals from each treatment (control or contaminated after 1 or 14 days of exposure) were used. Specific primers for real-time quantitative PCR (Supplementary Table 2) were edited using the LightCycler Probe Design software version 1.0 (Roche Diagnostics). Levels of expression and amplification efficiencies (E) of each target gene (Tg) were determined according to previously described procedures [15]. For each sample, the levels of expression of the target gene (Tg) were compared with the expression of the constitutively expressed  $\beta$ -actin (act) gene and MT gene expression was used as a positive control for metallic exposure [15,16]. The expression ratio (R) was calculated according to the formula  $R = (E_{Tg})^{CPTg} / (E_{act})^{CPact}$ . Another constitutively expressed gene coding the ribosomal protein S13 was used as an additional control. In order to simplify data presentation, relative expression ratios of Tg's are presented (expression ratios in exposed earthworms relative to expression ratios in control unexposed earthworms).

#### Rapid amplification of cDNA ends (RACE)

In order to get the full-length cDNA of genes with unknown function but exhibiting high variations of their transcript levels, 5'RACE was performed according to a previously described procedure [26].

#### Metal analysis

Cd, lead (Pb) and zinc (Zn) contents were determined by inductively coupled plasma optical atomic emission spectroscopy (ICP-AES) (Varian Liberty Serie II axial view, Varian S.A., Les Ulis, France) (adapted from [27]). Calibration was done with standards for each metal (0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5,

 $1 \text{ mg Cd L}^{-1}$  or 0; 0.05; 0.1; 0.2; 0.4; 0.6 mg Pb L<sup>-1</sup> or 0; 0.1; 0.25; 0.5; 1; 2 mg Zn  $L^{-1}$ ) prepared in 500 mmol  $L^{-1}$  nitric acid (65% Suprapur, VWR, Fontenay-sous-Bois, France.) with a commercial standard stock solution of 1gL<sup>-1</sup> of Cd, Pb and Zn Titrisol (VWR). Cd, Pb and Zn contents in whole worms (3 groups of 5 animals per condition) were determined after acid digestion. Briefly, worms were lyophilised for 3 days then digested for 12 h at room temperature with 1 mL of 65% nitric acid per 100 mg (dry mass). Digestion was performed by progressive heating at 120 °C until half reduction of the volume and nitrous vapour removal. After cooling, 1 mL of a solution of analytical grade nitric, sulphuric and perchloric acids (10, 2, 3V, respectively) was added to samples and heating was followed at 180 °C for reducing the volume. Samples were then filtered and volume was adjusted to 20 mL with ultrapure water (Milli-Q water, Millipore, Molsheim, France).

#### Statistical analysis

Expression levels were compared by means of two-way analysis of variance followed by Student post-hoc *t*-tests. The normality of each distribution was verified by Kolmo-gorov–Smirnov's tests and variance heterogeneity by Hartley's tests.

Metal contents were analysed using Kruskal–Wallis non parametric test followed by Mann–Whitney test. An  $\alpha$ -level of 0.05 was used in all procedures.

#### Results

### EST sequencing and general characteristics of SSH library

A total of 1536 clones from exposed SSH libraries ("forward" libraries, i.e., subtracted with control) and from control

("reverse" library, i.e., substracted with exposed) were sequenced. Contaminant sequences corresponding to vector and adaptator were removed and redundant ESTs were organized into overlapping contigs using the Sequencher<sup>TM</sup> 4.2 software (Gene Codes Corporation). A total of 764 unique sequences from forward (1 and 14 days grouped) and reverse libraries (Genbank accession numbers EY892395–EY893158) were tested to detect potential alignment of ESTs sequenced and discard false positive SSH–ESTs (for details see Table 1).

#### Identification of candidate ESTs

ESTs were confronted to databases using BLASTN, BLASTX and RPS-BLAST programs [28]. Sequences similarities were considered to be significant when the expected values were less than  $10^{-3}$ . Comparisons of ESTs against non-redondant nucleic and protein databases revealed that 48.04% of the ESTs did not align significantly with known genes, and 24.34% align with genes of unknown function. Among the remaining 27.62%, ESTs presented significant similarities with genes of known function. These 211 ESTs were assigned to function based on their sequences identity with Genbank<sup>TM</sup> database. RPS-BLAST and according to "Gene Ontology" classification. Thus, 211 ESTs were associated to six major cellular physiological functions, (i) immunity; (ii) metabolism; (iii) signal transduction; (iv) replication, repair, transcription and translation; (v) cytoskeleton production and maintenance; and finally (vi) transport (see Figure 1 and Table 1 for library by library details).

In order to identify cDNAs corresponding to *E. fetida* genes regulated by metals, we chose 18 candidates, which showed the highest abundance (redundant clones) (Table 2). Candidate 1 showed similarity with lysenin (Lys), a protein involved in immunity. This protein is produced in large coelomocytes and free large chloragocytes [29]. Identified

<b>Table I</b> deficial characteristics of 5 3311 (ibraries from Lisenia Jethua exposed to metal-spiked so	Table 1	General characteristics	of 3 SSH libraries from Eisenia	fetida exposed to metal-spiked soi
--	---------	-------------------------	---------------------------------	------------------------------------

	Forward 1 day	Forward 14 days	Reverse 14 days
Total numbers of cDNAs sequenced	384	768	384
Total numbers of cDNAs analysed <sup>a</sup>	262	558	265
Singletons	198	273	142
EST contig	35	258	94
Redundancy <sup>b</sup> (%)	13.36	46.24	35.47
Average EST length (for three SSH libraries)	305 bp		
Functional categories			
No hits (%)	53.27	45.31	47.46
Unknown (%)	16.36	28.42	25.42
Immunity (%)	0.93	3.75	3.39
Metabolism (%)	18.22	12.33	10.17
Signal transduction (%)	3.74	2.14	2.82
Replication, repair, transcription, translation (%)	4.67	5.36	5.08
Cytoskeleton production and maintenance (%)	1.40	2.14	4.52
Transport (%)	1.40	0.54	1.13

EST, expressed sequenced tags.

<sup>a</sup>Sequences used to interrogate databases using Blast software after analysis using Sequencher<sup>TM</sup> 4.2 software.

<sup>b</sup>Redundancy = number of ESTs assembled in contig/total ETSs.

in *E. fetida*, the lysenin is a haemolytic protein, which binds specifically to sphingomyelin and forms oligomers, leading to the formation of pores with a diameter of  $\sim$ 3 nm in target membranes [30–32]. Lysenin is closely related to fetidin. The name lysenin was chosen because of the *E*-value given by the Blast analysis (*E*-value of 0 and of 5e–141, respectively with Blast N and Blast X).

Candidates 2-6 were similar to proteins involved in metabolism. As expected, the Cd-metallothionein (Cd-MT, candidate 2) was among these 5 candidates as one of the most abundant transcripts (n = 10) sequenced in both forward SSH libraries (1 and 14 days of exposure). Candidate 3 was similar to the Cytochrome c oxidase subunit 1 (CytOx c). This gene provides a critical function during respiration by transferring electrons from Cytochrome c to oxygen and contributing to ATP generation [33]. Candidate 4 was similar to cytochrome b (Cyto b) from various species, a component of the ubiquinol-cytochrome c reductase complex (complex III or cvtochrome b-c1 complex), which is a respiratory chain that generates an electrochemical potential coupled to ATP synthesis. Candidate 5 was similar to the translationally controlled tumor protein (TCTP). TCTP is induced in Lumbricus rubellus by metallic exposure [34]. Candidate 6 was the last putative metabolism protein and exhibited similarity to granulin (Granu). Granulin belongs to a family of cysteine-rich peptides of about 6 kDa derived from a larger precursor. Both have been found to modulate cell growth [35].

Two candidates were similar to proteins involved in signal transduction. Candidate 7 was similar to a sarcoplasmic calcium-binding protein (SCBPs). SCPs are an important  $Ca^{2+}$ -binding system in muscles of both vertebrate and invertebrate species. The SCP from the sandworm *Nereis diversicolor* is a single polypeptide chain of 174 amino acids

and a molecular weight of 19,485 Da. There are three calcium-binding sites, which may be occupied by magnesium ions under physiological conditions [36]. Candidate 8 was similar to parvalbumin (Parvalb). The protein encoded by this gene is a high-affinity calcium ion-binding protein believed to act as cytosolic  $Ca^{2+}$  buffers [37] that is structurally and functionally similar to calmodulin and troponin C. The unique sequence 9 was similar to ribosomal protein S16 (Ribo S16), which is involved in translation.

Four candidates were similar to proteins with unknown functions. Candidate 10, 11 and 12 aligned with ESTs from different *L. rubellus* ESTs libraries, whereas candidate 13 was similar to a predicted protein of *Nematostella vectensis*.

Finally, candidates 14–18 were unknown proteins with unknown functions (No Blast Hit).

#### Expression profiles in artificial soils

Expression levels of the 18 selected EST candidates were measured using real-time PCR in worms exposed to either uncontaminated (control) or metal-polluted (exposed) artificial soil.

This first step of validation was done with RNA samples from a second exposure experiment in order to eliminate candidates potentially regulated differentially between experiments.

The vast majority of the chosen candidates (14 out of the 18 analysed) showed moderate to strong variations in transcript levels associated with exposure to metals (Figure 2 and Table 3). As expected, transcript levels of the Cd–MT were strongly increased although this increase was only detectable after 14 days of exposure to the metallic



**Figure 1** Number of differentially expressed genes (%) in each gene category after submission to Blast databases and according to "Gene Ontology" classification (http://www.geneontology.org/).

	Accession	Length of	Blast similarity/sps/	Best blast	RDS-Blast	Domain function
sequen- ces	number (name)	Length of longest or consensus fragment- bp-(number of clones)	accession on no	E-value	(E-value)	Domain function
1 ( <i>E</i> )	EY892971 (Lys)	828 (n = 6)	Lysenin/ <i>Eisenia</i> fetida/BAA21518 ª	5e-141	None	
2 ( <i>E</i> )	EY892898 (Cd-MT)	502 ( <i>n</i> = 10)	Cd-metallothionein/ Eisenia fetida/ P81695 ª	4e-21	None	
3 (E)	EY892966 (CytOx c)	559 ( <i>n</i> = 4)	Cytochrome c oxidase subunit I/ <i>Eisenia fetida/</i> ABM66354 <sup>a</sup>	5e–69	cd01663/ Cyt_c_Oxida- se_I/ (2e-86)	Terminal oxidase in the respiratory chains of eukaryotes. Catalyze the reduction of O <sub>2</sub> and simultaneously pumps protons across the membrane of mitochondria
4 (E)	EY892965 (Cyto b)	332 ( <i>n</i> = 2)	Cytochrome b/ Lumbricus terrestris/ NP_008243 <sup>a</sup>	8e-50	cd00284/ Cytochro- me_b_N/(3e-21)	Cytochrome b is a subunit of cytochrome bc1, an 11-subunit mitochondrial respiratory enzyme. Contains two bound hemes and two ubiquinol/ubiquinone binding sites
5 (E)	EY892907 (TCTP)	493 (n = 2)	TCTP/Lumbricus rubellus/018477 <sup>a</sup>	3e-65	pfam00838/ Translationally controlled tumour protein/ (4e-22)	J
6 ( <i>E</i> )	EY892886 (Granu)	552 ( <i>n</i> = 3)	Granulin/ <i>Mus</i> <i>musculus/</i> EDL34132 ª	1e-20	smart00277/ Granulin/ (6e-04)	
7 (E)	EY892976 (SCBP)	415 (n = 3)	SCBP2 protein/ Lumbricus terrestris/ CAE18114 <sup>a</sup>	1e—08	cd00051/EF- hand, calcium binding motif/ (2e-04)	A diverse superfamily of calcium sensors and calcium signal modulators; Ca <sup>2+</sup> binding induces a conformational change in the EF-hand motif, leading to the activation or inactivation of target proteins
8 (E)	EY892890 (Parvalb)	434 ( <i>n</i> = 3)	MGC107867 protein (similar to parvalbumin)/ <i>Xenopus tropicalis/</i> NP 001015721 <sup>a</sup>	2e-04	cd00051/EF- hand, calcium binding motif/ (2e–04)	Same as above
9 (E)	EY892967 (RiboS16)	462 ( <i>n</i> = 4)	16S ribosomal RNA gene <i>/Eisenia fetida/</i> EF126208 <sup>b</sup>	9e-169	None	
10 (E)	EY892879 (Cand10)	402 ( <i>n</i> = 5)	Earthworm Copper Exposure Library/ Lumbricus rubellus/ DR009691 <sup>b</sup>	2e-16	None	

Unique sequen- ces	Accession number (name)	Length of longest or consensus fragment- bp-(number of clones)	Blast similarity/sps/ accession on no	Best blast <i>E</i> -value	RPS-Blast (E-value)	Domain function
11 (E)	EY892881 (Cand11)	472 ( <i>n</i> = 5)	Juvenile Earthworm Library/ <i>Lumbricus</i> rubellus/C0869889 <sup>b</sup>	5e-38	None	
12 (E)	EY892889 (Cand12)	415 ( <i>n</i> = 3)	Earthworm Head Enriched library/ <i>lumbricus rubellus/</i> CO378146 <sup>b</sup>	5e-05	None	
13 (Ctl)	EY893141 (Cand13)	284 (n = 4)	Predicted protein/ Nematostella vectensis/ XP_001638172 <sup>b</sup>	5e-31	None	
14 (E)	EY892888 (Cand14)	396 (n = 3)	No Blast Hit		None	
15 ( <i>E</i> )	EY892892 (Cand15)	318 (n = 3)	No Blast Hit		None	
16 ( <i>E</i> )	EY892903 (Cand16)	555 (n = 4)	No Blast Hit		None	
17 (E)	EY892882 (Cand17)	399 ( <i>n</i> = 5)	No Blast Hit		None	
18 (E)	EY892908 (Cand18)	739 (n = 6)	No Blast Hit		None	

<sup>b</sup>BlastN results.

mixture (5.75 fold induction and p = 0.001). According to the SSH results, both TCTP and candidate 10 were expected to be up-regulated by metallic exposure. Accordingly, they were characterized by a moderate but significant induction of their expression, after 1 and 14 days of exposure for TCTP (1.81, p = 0.031 and 2.11 fold,  $p = 6.10^{-4}$ , respectively) and after 14 days of exposure for the candidate 10 (2.34 fold and p = 0.005). Thus, the real-time PCR analysis confirmed this up-regulation.

A group of 3 candidates showed a 3 fold induction of their transcript levels. These were the Cyto b, the Ribo S16 and the candidate 12. Candidates from these groups were expected to be up-regulated, which is consistent with the observed expression profiles.

Three other candidates, namely Lys, candidates 15 and 17, displayed the highest variations of their expression ratios. This group is characterized by a strong and significant induction (5.89–21.84 fold) of each gene.

Finally, a last group contains 5 candidates exhibiting variation of expression they were not expected to. Indeed, CytOx c, SCBP, Parvalb and candidate 18 showed a substantial decrease of their levels of expression whereas they were expected to be up-regulated. Similarly, candidate 13 showed a significant increase of its transcript levels whereas it was expected to be down-regulated. Expression levels of these genes were not measured in animals exposed in "naturally" polluted soils.

Transcript levels of only 4 candidates (Granu, candidates 11, 14 and 16) did not vary substantially.

Overall, of the 14 candidates showing variations of transcript levels, we confirmed 9 of them had the expected increase in transcript abundance.

#### Expression profiles in a field soil

In a second step of validation, expression levels of the 9 remaining candidates (validated in step 1) were measured in animals exposed to a contaminated soil originating from Metaleurop for either 1 or 14 days. Expression levels of 6 candidates (Cyto b, TCTP, Ribo S16, candidates 10, 12 and 15) did not show significant variation in response to the metallic stress. Three candidates exhibited significant increase of their level of expression (Figure 3 and Table 4).

Cd-MT showed a significant increase of its transcript levels after 14 days of exposure to the field soil (10.4 fold and p = 0.041).

Lys was characterized by an induction of its expression for all exposure durations (1.42 fold and p = 0.031 after 1 day of exposure and 2.76 fold and p = 0.012 after 14 days of exposure).

Candidate 17 showed a significant increase of the quantity of mRNA expressed after 1 and 14 days of exposure



**Figure 2** Relative expression ratios of the 18 selected candidates during the metallic exposure. (For each transcript, expression levels (relative to  $\beta$ -actin) were measured on *E. fetida* exposed 1 and 14 days to the metallic mixture (*E*) and on *E. fetida* exposed 1 and 14 days to a control soil (*C*). For better clarity, relative expression is presented as a ratio of expression levels of exposed *E. fetida* relative to unexposed *E. fetida*.  $\Box$ : Control 1 day;  $\Box$ : Control 14 days;  $\Box$ : Exposed 1 day;  $\Box$ : Exposed 14 days.

(1.52 fold; p = 0.020 and 3.93; p = 0.006, respectively) compared with the quantity obtained in control animals.

#### Metal analysis

Cd and Pb burdens of *E. fetida*, which were metal-exposed for 1 or 14 days, indicated clearly that these metals were accumulated in worms exposed either to artificial metalspiked soil or to polluted field soil. On the other hand, accumulation of Zn in worms was not observed. Indeed, concentrations of Zn kept unchanged in worms exposed to 740 mg kg<sup>-1</sup> of Zn in metal-spiked soil or 1191 mg kg<sup>-1</sup> of Zn in polluted field soil (Tables 5 and 6).

#### Rapid amplification of cDNA ends (RACE)

A 5'RACE was performed on transcripts corresponding to candidate 17 to obtain the full-length sequence. This 5'RACE treatment allowed the obtention of a 1473 bp sequence (initially only 399 bp) containing the complete coding sequence (Genbank accession number EU296921) with strong similarity to the coactosin-like protein (CLP) of *Danio* rerio (*E*-value = 6e-32) (Supplementary Figure 1) (Fig. 4).

#### Discussion

The Annelida Oligochaeta *E. fetida* was chosen to perform this work because this model is recommended in ecotoxicology by OECD [38] and has been the subject of many physiological studies [17,25,31]. Although studied a lot, the number of nucleotidic sequences available in genomic libraries was relatively low until recently. A total of 3292 sequences are currently available in Genbank, and most of them are due to a single study by Pirooznia et al. [39]. The 764 sequences we obtained add to this initial database and are particularly interesting since they have been specifically chosen so as to be differentially expressed following metallic stress in coelomocytes.

In this work, we focused on the identification of genes whose expression was up-regulated after 1 day as well as after 14 days of exposure and on genes, which were downregulated after 14 days of exposure. The approach of identifying genes potentially under-expressed after 1 day of exposure was not exploited because a previous study showed that for many genes the decrease of level of expression following metal exposure was only transient. Thus, the level of expression of many genes coding effectors such as catalase, superoxide dismutase, heat shock proteins decreases after 48 h intoxication. This drop of expression was attributed to the massive induction of the gene coding MT [16].

The first validation step consisted of the analysis of the expression level of each candidate using real-time PCR in worms exposed to contaminated artificial soil. This step demonstrated that 9 candidates among the 18 selected were really induced by the contamination. Among the sequences exhibiting a strong redundancy and validated by this first step, it is not surprising to find the Cd–MT. Indeed, this gene, which is well documented in lumbricids, is involved in homeostasis of essential MTE (Cu and Zn) and in detoxification mechanisms of non-essential metals (Cd). MT is regarded as a good biomarker of exposure because it shows a dose and time-dependent increase of the protein and of the number of transcripts coding MT when worms are exposed to a metallic contamination and especially to a

Table 3	Induct	ion factc	nrs (compa	ired with	control	soils) and	d p valu	es observ	ed for the	18 select	ed candid	dates duri	ng the me	tallic exp	osure.			
	Lys	Cd-MT	CytOx c	Cyto b	тстр	Granu	SCBP	Parvalb	RiboS16	Cand10	Cand11	Cand12	Cand13	Cand14	Cand15	Cand16	Cand17	Cand18
1 day	7.67 3.10 <sup>-4</sup>	0.68 n.s.	0.38 0.005	3.63 0.006	1.81 0.031	0.55 0.008	0.39 0.010	0.51 0.002	3.46 0.005	1.50 n.s.	0.59 0.021	3.30 0.007	3.59 0.007	1.05 n.s.	7.67 3.10 <sup>-4</sup>	0.93 n.s.	12.38 0.003	0.08 0.036
14 days	5.89 9.10 <sup>-4</sup>	5.75 0.001	0.60 0.007	3.45 6.10 <sup>-4</sup>	2.11 6.10 <sup>-4</sup>	1.11 n.s.	0.50 0.002	0.51 0.001	3.44 0.033	2.34 0.005	0.97 n.s.	3.12 0.003	9.32 0.029	1.07 n.s.	5.89 9.10 <sup>-4</sup>	1.18 n.s.	8.51 0.003	0.04 0.023
n.s: non-	ignifican	t.																

contamination containing Cd [15,16,20,40]. In our study, this transcript is used as a positive control and its presence among the potentially induced sequences was expected and is indeed reassuring. The presence of many copies of this transcript also shows that the subtractive step of the SSH was successful, which is necessary to obtain satisfactory results, was correctly carried out and that the 764 single sequences have a good chance to be differentially expressed under the conditions of realization of the subtractive library.

The translationally controlled tumor protein (TCTP) was identified in another Annelida Oligochaeta species (L. rubellus) and its expression is induced by a multimetallic contamination [34]. Expression of TCTP in E. fetida is not affected by a monometallic exposure to Cd or Cu [16]. Therefore, the present work shows that the expression of TCTP is slightly induced in E. fetida exposed to artificial soil containing  $40 \text{ mg kg}^{-1}$  of Cd,  $500 \text{ mg kg}^{-1}$  of Pb and  $700 \text{ mg kg}^{-1}$  of Zn. TCTP was first identified as a tumorassociated protein. It was demonstrated in vertebrates that TCTP is a housekeeping gene and that gene expression deregulation may be involved in tumor development of colon carcinoma [41]. Moreover, it was shown that TCTP displays more general "cytokine-like activities", as it also induces the production of interleukins from basophils and eosinophils [42].

The three other candidates presenting homologies with known proteins and showing an increase of their expression level following a metallic stress on artificial soil are lysenin, cytochrome b and ribosomal protein S16. From our knowledge, these effectors have not been involved in a context of regulation of metals or metal pollution. Lastly, among the 9 candidates validated by this first step, candidates 10, 12, 15 and 17 correspond to non-identified genes.

One of the tested candidates, which did not show variation of expression in exposed worms is documented in other species. Indeed, the cytochrome C oxidase subunit I was studied in aquatic organisms. It was demonstrated that cytochrome C oxidase subunit I gene expression was up-regulated after mercury exposure in zebrafish *Danio rerio* [43] and Cd exposure in zebra mussel *Dreissena polymorpha* [44]. Over-expression of cytochrome C oxidase subunit I has also been evidenced in a pyrethroid insecticide-resistant strain of German cockroach *Blatella germanica* [45].

The aim of our study being to consider environmental conditions, a second step of validation of the 9 candidates induced on polluted artificial soil was undertaken. To do this, worms were exposed to a "naturally" contaminated soil originating from the site of Metaleurop, north of France.

Some genes that were induced in worms exposed to contaminated artificial soil were not induced in the tested Metaleurop soil. Such differences may be due to the fact that the structure and the texture of artificial soil are completely different compare to field soil (Table 5). For instance, it was shown that the bioavailability of MTE for living organisms and especially worms, depends of soil properties like the content of organic matter, the pH, the cation exchange capacity and the quantity of clay [46,47]. Moreover, the mode of administration of MTE in artificial soil, via the use of metallic solutions, makes these metals much bioavailable. As a consequence, toxicity and a greater bioaccumulation of metals are usually observed for weaker concentrations in artificial soil [48,49].



**Figure 3** Relative expression ratios of transcripts of 9 remaining candidates during the smelter soil exposure. (For each transcript, expression levels (relative to  $\beta$ -actin) were measured on *E. fetida* exposed 1 and 14 days to the smelter soil (*E*) and on *E. fetida* from controlled cultures of our laboratory (*C*). For better clarity, relative expression is presented as a ratio of expression levels of exposed *E. fetida*.  $\Box$ : Control;  $\Box$ : Exposed 1 day;  $\Xi$ : Exposed 14 days.

**Table 4** Induction factors (compared with control soils) and *p* values observed for the 18 selected candidates during the smelter soil exposure.

	Lys	Cd-MT	Cyto b	ТСТР	RiboS16	Cand10	Cand12	Cand15	Cand17
1 day	1.42	0.93	0.86	0.76	0.73	0.81	0.66	0.18	1.52
p	0.030	n.s.	0.039	n.s.	n.s	0.014	0.013	0.002	0.020
14 days	2.76	10.36	1.29	1.38	1.07	0.96	1.66	0.49	3.93
p	0.012	0.041	0.002	n.s.	n.s	n.s.	0.010	0.006	0.006

n.s: non-significant.

**Table 5** 0.01 M CaCl<sub>2</sub> extractable (n = 3) and total (n = 3) metal concentrations of soils used in this study.

Soil	0.01 M CaCl <sub>2</sub> e	xtraction		Total metal co	ncentrations	
	Cd (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Cd (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Zn (mg/kg)
Metal-spiked soil Field soil	9.62 1.7	1.24 1.3	172.73 143.8	41.18 15.1	614.7 946	740.4 1191

Cd and Pb burdens of *E. fetida*, which were metalexposed for 1 or 14 days indicated clearly that these metals were accumulated in worms exposed either to artificial metal-spiked soil or to polluted field soil. These data showed that gene expressions are induced in animals that accumulate metals (cadmium and lead). Zn remains unchanged in worms exposed to metal-spiked soil or in polluted field soil. These results are in accordance with those of Demuynck et al. [27] suggesting that Zn is regulated. Overall, only 3 candidates were induced in worms exposed to the Metaleurop polluted soil. These candidates are, Cd-MT, lysenin and a transcript corresponding to a gene, which function was unknown (candidate 17).

Cloning of the complete coding sequence of candidate 17 allowed the identification of the CLP. CLP is a member of the ADF/Cofilin group of actin-binding proteins, which support the activity of the 5-Lipoxygenase (5-LO), an enzyme of central importance in cellular leukotriene (LT) synthesis. 5-LO and LT are two key components involved in

	Cd (mg/kg of dry worm)	Pb (mg/kg of dry worm)	Zn (mg/kg of dry worm)
Control animals	$0.63 \pm 0.50$	< 0.01	91.04±3.79
Metal-spiked soil 1 day	$6.82 \pm 1.38$	$6.75\pm2.77$	1/5.52 <u>+</u> 9.01
Metal-spiked soil 14 days	33.12±2.36	47.83±4.27	184.66±16.61
p	<0.05	<0.05	n.s.
Field soil 1day	4.86±0.50	9.05±2.84	156.11±7.18
p	<0.05	<0.05	< 0.05
Field soil 14 days	23.22±4.67	32.26±4.50	95.26±12.35
<i>p</i>	< 0.05	< 0.05	n.s.

**Table 6** Metal contents (Cd, Pb and Zn) in non-exposed *Eisenia fetida* and in *Eisenia fetida* exposed either to artificial metalspiked soil or to polluted field soil.

Results are expressed as mean values  $\pm$  standard errors (n = 3 groups of 5 animals per treatment). n.s.: non-significant.

Multiple sequence alignment

H_sapiens	MATKIDKEACRAAYNLVRDDGSAVIWVTFKYDGS-TIVPGEQGAEYQHFIQQCTDDVRLF	59
M musculus	MATKIDKEACRAAYNLVRDDGSAVIWVTFRYDGA-TIVPGDQGADYQHFIQQCTDDVRLF	59
D rerio	MATRIDKEACREAYNLVRDDSSGICWACFKYDGS-TIVPGGHGSDYEEFKSQCTVDSRVF	59
E fetida	MAD-IQKESIAEAYDDVRNDQTPTTWALLGYDDSNTIVLLGTGSEYEEFRSKFSDDDRLF	59
_	** *:**: **: **:* : *. : **.: *** *::*:* .: : * *:*	
H sapiens	AFVRFTTGDAMSKRS <mark>K</mark> FALITWIGENVSGLQRAKTGTDKTLVKEVVQNFAKEFVISDRKE	119
M musculus	AFVRFTTGDAMSKRS <mark>K</mark> FALITWIGEDVSGLQRAKTGTDKTLVKEVVQNFAKEFVISDRKE	119
D rerio	GFVRIMTGDAMSKRS <mark>K</mark> FTFITWIGENITGLQRAKISTDKALVKDAVPTFAKEFMISDPKE	119
E fetida	GFVRLTAGDELSKRA <mark>K</mark> FVLITWIGSNISALKRAKVSTDKSTVKSILQNFALEIQISDLAE	119
_	.***: :** :***: <sup>*</sup> *.:****.:::.*:*** .***: **. : .** *: *** *	
H sapiens	LEEDFIKSELK <mark>K</mark> AGGANYDAQTE- 142	
M musculus	LEEDFIRSELK <mark>K</mark> AGGANYDAQSE- 142	
D rerio	LEEEYLRTELK <mark>K</mark> AGGANYDAQAE- 142	
E fetida	LEEPNIREALK <mark>K</mark> AGGAQYGTGVRD 143	
—	*** :: *****:*.: .	

**Figure 4** Alignment of the *Eisenia fetida* coactosin-like protein putative amino acid sequence and other selected amino acid sequences using ClustalW: *Homo sapiens* (Accession no. Q14019), *Mus Musculus* (Accession no. NP\_082347), *Danio rerio* (Accession no. NP\_956306) and *Eisenia fetida* (Accession no. EU296921). Amino acids in bold indicate the two binding sites of coactosin-like protein. *Symbols*: \* identity, : conserved substitutions have been observed, . semi-conserved substitutions are observed.

inflammatory disorders in vertebrates [50,51]. Studies on immune cells in human and vertebrate models have shown that CLP can up-regulate and modulate the 5-LO pathway *in vitro* [51].

Thus, CLP support  $Ca^{2+}$ -induced 5-LO activity and can function as a chaperone and/or scaffold for 5-LO. Moreover, CLP up-regulate the LT production, a very important agent in inflammatory response [51, see 52 for details].

It has been shown in rabbit macrophages, that  $Cd^{2+}$  disrupts the 5-LO pathway by enhancing release of LTB<sub>4</sub>, responsible for the extension of the inflammatory reaction after cadmium exposure [53]. In the latter study, authors suggest that  $Cd^{2+}$  partially mimics the effect of  $Ca^{2+}$ , which is an activator of the 5-LO activity and consequently required for the synthesis of LTB<sub>4</sub>. An indirect action of cadmium is supported by the lack of metal response elements observed in upstream part of mouse CLP gene [54]. Little is known about CLP in invertebrates. Therefore, the presence of CLP in *E. fetida* immune cells also supports its implication in stress and/or inflammatory mechanisms.

Moreover, the conservation of the two residues of key importance for interaction with 5-LO (Lys-131) and F-actin (Lys-75) is in favour of a similar role for CLP in our invertebrate model (Figure 4) [55].

Qualitative and quantitative gene expression analysis may be used to study the immune part of the response to a metallic stress. Moreover, expression profiles of numerous selected genes, as MT and both new ones described in this work, may constitute a "signature" of changes due to MTE.

#### Acknowledgements

The technical assistance of Régine Leroux is gratefully acknowledged. The present study was supported by a grant from the Région Nord-Pas de Calais, Programme de Recherches Concertées: Sites et sols pollués-Environnement et Activités Humaines. F.B. was supported by a doctoral fellowship from Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME).

#### Appendix A. Supporting Information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.dci.2008. 06.009.

#### References

- Nawrot T, Plusquin M, Hogervorst J, Roels HA, Celis H, Thijs L, et al. Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: a prospective population-based study. Lancet Oncol 2006;7: 119–26.
- [2] Labrot F, Ribera D, Saint-Denis M, Narbonne JF. In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxydation, acetylcholinesterase and glutathione peroxydase activities in three non-mammalian species. Biomarkers 1996;1:21–8.
- [3] Fisher WS, Oliver LM, Winstead JT, Volety AK. Stimulation of defense factor for oysters deployed to contaminated sites in Pensacola Bay, Florida. Aquat Toxicol 2003;64(4): 375–91.
- [4] Sauvé S, Brousseau P, Pellerin J, Morin Y, Senécal L, Goudreau P, et al. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg, and Zn). Aquat Toxicol 2002;58:189–200.
- [5] Stone D, Jepson P, Kramarz P, Laskowski R. Time to death response in carabid beetles exposed to multiple stressors along a gradient of heavy metal pollution. Environ Pollut 2001;113: 239–44.
- [6] Morgan AJ, Kille P, Stürzenbaum SR. Microevolution and ecotoxicology of metals in invertebrates. Environ Sci Technol 2007;41:1085–96.
- [7] Weeks JM. The value of biomarkers for ecological risk assessment: academic toys or legislative tools? Appl Soil Ecol 1995;2:215–6.
- [8]. Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F. Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux, Collection "Recherche en Biologie". Paris: Masson edn; 1997. 419pp.
- [9] Doran JW, Safley M. Defining and assessing soil health and sustainable productivity. In: Pankhurst CE, Doube BM, Gupta VVSR, editors. Biological indicators of soil health. CAB International; 1997. p. 1–28.
- [10] Brousseau P, Fugère N, Bernier J, Coderre D, Nadeau D, Poirier G, et al. Evaluation of earthworm exposure to contaminated soil by cytometric assay of coelomocytes phagocytosis in *Lumbricus trerrestris* (Oligochaeta). Soil Biol Biochem 1997;29: 681–4.
- [11] Sauvé S, Fournier M. Age-specific immunocompetence of the earthworm *Eisenia andrei*: exposure to methylmercury chloride. Ecotoxicol Environ Safe 2005;60:67–72.
- [12] Spurgeon DJ, Hopkin SP. Effects of metal-contaminated soils on the growth, sexual development, and early cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*, with particular reference to zinc. Ecotoxicol Environ Safe 1996;35:86–95.
- [13] Spurgeon DJ, Hopkin SP. Tolerance to zinc in populations of the earthworms *Lumbricus rubellus* from uncontaminated and metal-contaminated ecosystems. Environ Contam Toxicol 1999;37:332–7.
- [14] Laszczyca P, Augustyniak M, Babczynska A, Bednarska K, Kafel A, Migula P, et al. Profiles of enzymatic activity in earthworms from zinc, lead and cadmium polluted areas near Olkusz (Poland). Environ Int 2004;30:901–10.
- [15] Brulle F, Mitta G, Cocquerelle C, Vieau D, Lemière S, Leprêtre A, et al. Cloning and real-time PCR testing of 14 potential biomarkers in *Eisenia fetida* following cadmium exposure. Environ Sci Technol 2006;40:2844–50.

- [16] Brulle F, Mitta G, Leroux R, Lemière S, Leprêtre A, Vandenbulcke F. The strong induction of metallothionein gene following cadmium exposure transiently affects the expression of many genes in *Eisenia fetida*: a trade-off mechanism? Comp Biochem Phys C 2007;144(4):334–41.
- [17] Ricketts HJ, Morgan AJ, Spurgeon DJ, Kille P. Measurement of annetocin gene expression: a new reproductive biomarker in earthworm ecotoxicology. Ecotoxicol Environ Safe 2004;57: 4–10.
- [18] Palmiter RD. The elusive function of metallothioneins. P Natl Acad Sci USA 1998;95:8428–30.
- [19] Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. Annu Rev Pharmacol 1999;39:267–94.
- [20] Gruber C, Stürzenbaum SR, Gehrig P, Sack R, Hunziker P, Berger B, et al. Isolation and characterization of a self-sufficient onedomain protein (Cd)-metallothionein from *Eisenia foetida*. Eur J Biochem 2000;267:573–82.
- [21] Pruvost C, Douay F, Hervé F, Waterlot C. Heavy metals in soil, crops and grass as a source of human exposure in the former mining areas. J Soil Sediment 2006;6(4):215–20.
- [22]. OECD. OECD guideline for testing chemicals. Section 2: Effects on biotic systems. In: Method, 207. Earthworm, acute toxicity tests. Paris, France; 1984.
- [23] Sterckeman T, Douay F, Proix F, Fourrier H, Perdrix E. Assessment of the contamination of cultivated soils by eighteen trace elements around smelters in the North of France. Water Air Soil Pollut 2002;135:173–94.
- [24] Houba VJG, Lexmond TM, Novozamsky I, Van Der Lee JJ. State of art and future developments in soil analysis for the bioavailability assessment. Sci Total Environ 1996;178:21–8.
- [25] Hendawi M, Sauvé S, Ashour M, Brousseau P, Fournier M. A new ultrasound protocol for extrusion of coelomocyte cells from the earthworm *Eisenia fetida*. Ecotoxicol Environ Safe 2004; 59:17–22.
- [26]. Brulle F, Cocquerelle C, Wamalah AN, Morgan AJ, Kille P, Leprêtre A, et al. cDNA cloning and expression analysis of *Eisenia fetida* (Annelida; Oligochaeta) phytochelatin synthase under cadmium exposure. Ecotoxicol Environ Safe 2008, in press, doi:10.1016/j.ecoenv.2007.10.032.
- [27] Demuynck S, Grumiaux F, Mottier V, Schikorski D, Lemière S, Leprêtre A. Cd/Zn exposure interactions on metallothionein response in *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). Comp Biochem Phys C 2007;145:658–68.
- [28] Henikoff S, Henikoff JG. Performance evaluation of amino acid substitution matrices. Proteins 1993;17(1):49–61.
- [29] Ohta N, Shioda S, Sekizawa Y, Nakai Y, Kobayashi H. Sites of expression of mRNA for lysenin, a protein isolated from the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia fetida*. Cell Tissue Res 2000;302:263–70.
- [30] Roch P, Canicatti C, Valembois P. Interactions between earthworm hemolysins and sheep red blood cell membranes. Biochim Biophys Acta Biomembr 1989;983:193–8.
- [31] Yamaji A, Sekizawa Y, Emoto K, Sakuraba H, Inoue K, Kobayashi H, et al. Lysenin, a novel sphingomyelin-specific binding protein. J Biol Chem 1998;273(9):5300–6.
- [32] Yamaji-Hasegawa A, Makino A, Baba T, Senoh Y, Kimura-Suda H, Sato SB, et al. Oligomerization and pore formation of a sphingomyelin-specific toxin, lysenin. J Biol Chem 2003; 278(25):22762–70.
- [33] Malatesta F, Antonini G, Sarti P, Brunori M. Structure and function of a molecular machine: cytochrome c oxidase. Biophys Chem 1995;54(1):1–33.
- [34] Stürzenbaum SR, Kille P, Morgan AJ. Identification of heavy metal induced changes in the expression patterns of the translationally controlled tumour protein (TCTP) in the earthworm *Lumbricus rubellus*. Biochim Biophys Acta 1998;1398: 294–304.

- [35] Bateman A, Bennett HPJ. Granulins: the structure and function of an emerging family of growth factors. J Endocrinol 1998;158(2):145–51.
- [36] Cook WJ, Ealick SE, Vijay-Kumar S, Babu YS, Cox JA. Threedimensional structure of sarcoplasmic calcium-binding protein from *Nereis diversicolor*. J Biol Chem 1991;266(1):652–6.
- [37] Heizmann CW, Kagi U. Structure and function of parvalbumin. Adv Exp Med Biol 1989;255:215–22.
- [38]. OECD. Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*). Guidelines for the testing of chemicals, no. 222, Paris, France; 2004.
- [39] Pirooznia M, Gong P, Guan X, Inouye LS, Yang K, Perkins EJ, et al. Cloning, analysis and functional annotation of expressed sequence tags from the earthworm *Eisenia fetida*. BMC Bioinform 2007;8(Suppl. 7):S7.
- [40] Galay-Burgos M, Spurgeon DJ, Weeks JM, Stürzenbaum SR, Morgan AJ, Kille P. Developing a new method for soil pollution monitoring using molecular genetic biomarkers. Biomarkers 2003;8(4/3):229–39.
- [41] Chung S, Kim M, Choi W-J, Chung J-K, Lee K. Expression of translationally controlled tumor protein mRNA in human colon cancer. Cancer Lett 2000;156:185–90.
- [42] MacDonald SM, Bhisutthibhan J, Shapiro TA, Rogerson SJ, Taylor TE, Tembo M, et al. Immune mimicry in malaria: *Plamodium falciparum* secretes a functionnal histamine-releasing factor homologue in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:10829–32.
- [43] Gonzalez P, Dominique Y, Massabuau J-C, Boudou A, Bourdineaud J-P. Comparative effects of dietary methyl mercury on gene expression in liver, skeletal muscle, and brain of the zebra fish (*Danio rerio*). Environ Sci Technol 2005;39:3972–80.
- [44] Achard-Joris M, Gonzalez P, Marie V. Cytochrome c oxidase subunit I gene is up regulated by cadmium in freshwater and marine bivalves. Biometals 2006;19:237–44.
- [45] Pridgeon JW, Liu N. Overexpression of the cytochrome c oxidase subunit I gene associated with a pyrethroid resistant strain of German cockroaches, *Blattella germanica* (L.). Insect Biochem Mol 2003;33:1043–8.

- [46] Morgan JE, Morgan AJ. The distribution and intracellular compartimentation of metals in the endogeic earthworm *Aporrectodea caliginosa* sampled from an unpolluted an a metal-contaminated site. Environ Pollut 1998;99(2): 167–75.
- [47] Spurgeon DJ, Weeks JM. Evaluation of factors influencing results from laboratory toxicity tests with earthworms. In: Sheppard SC, Bembridge JD, Holmstrup M, Posthuma L, editors. Proceeding from the second international workshop on earthworm ecotoxicology. Amsterdam: Advances in Earthworm Ecotoxicology SETAC; 1998. p. 15–25.
- [48] Spurgeon DJ, Hopkin SP. Extrapolation of the laboratory-based OECD earthworm toxicity test to metal-contaminated field soil. Ecotoxicology 1995;4(3):190–205.
- [49] Davies NA, Hodson ME, Black S. Is the OECD acute worm toxicity test environmentally relevant? The effect of mineral form on calculated lead toxicity. Environ Pollut 2003;121: 49–54.
- [50] Provost P, Doucet J, Hammarberg T, Gerisch G, Samuelsson B, Radmark O. 5-Lipoxygenase interacts with coactosin-like protein. J Biol Chem 2001;276(19):16520–7.
- [51] Rakonjac M, Fischer L, Provost P, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B, et al. Coactosin-like protein supports 5-lipoxygenase enzyme activity and up-regulates leukotriene  $A_4$  production. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103(35):13150–5.
- [52] Radmark O, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B. 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. Trends Biochem Sci 2007;32(7):332–41.
- [53] Kudo N, Nakagawa Y, Waku K. Biphasic effect of cadmium ions on the secretion of leukotriene B<sub>4</sub> in rabbit alveolar macrophages. Arch Toxicol 1996;70:801–8.
- [54] Wimmer U, Wang Y, Georgiev O, Schaffner W. Two major branches of anti-cadmium defense in the mouse: MTF-1/ metallothioneins and glutathione. Nucleic Acids Res 2005; 33(18):5715–27.
- [55] Doucet J, Provost P, Samuelsson B, Radmark O. Molecular cloning and functional characterization of mouse coactosinlike protein. Biochem Biophys Res C 2002;290:783–9.

### Table 1 SM:

Physical-chemical parameters		
pH		7,7
Clay		180
Silt		692
Sand	g kg <sup>-1</sup>	128
Organic matter		32,2
CaCO <sub>3</sub> total		2,00

Physical-chemical parameters of the soil sampled near the smelter

Table 2 SM

Sea	mences	of the	forward	and	reverse	primers	used	for r	eal-	time	quantitativ	e PCR
buy	uchecs	or the	ionwaru	anu	10,0130	primers	uscu	101 1	Cui	unic	quantitativ	UTUR

<b>^</b>	Names	Sequences
1	Ef-SSH-Lys	Forward 5'-CGGCAACAAACGTCTAC-3' Reverse 5'-GTGAAATACAGGCAGAAGC-3'
2	Ef-SSH-MT	Forward 5'-CGCAAGAGAGGGATCAACTT-3' Reverse 5'-CTATGCAAAGTCAAACTGTC-3'
3	Ef-SSH-CytoC	Forward 5'-TTCTTGGGGGTTTGGGC-3' Reverse 5'-GTTCATCCTGTCCCAGC-3'
4	Ef-SSH-CytoB	Forward 5'-AATAAGGGTGAAACGGGA-3' Reverse 5'-CTAACCTGTTCTCAGCG-3'
5	Ef-SSH-TCTP	Forward 5'-TCGAATATGCCCTCAGC-3' Reverse 5'-GTATGGCGTTTCTCCATC-3'
6	Ef-SSH-Granu	Forward 5'-CTACCCGAACGATGTCT-3' Reverse 5'-ACCTACGACAATGGCT-3'
7	Ef-SSH-SCBP	Forward 5'-GGTTATCTGGATGAGGACG-3' Reverse 5'-CGTAGCACCCATCAACA-3'
8	Ef-SSH-Parvalb	Forward 5'-GGCCATTCACCAATCC-3' Reverse 5'-CCCATCCATTCTCTCTCAA-3'
9	Ef-SSH-RiboS16	Forward 5'-TTACGCCGGTCTGAAC-3' Reverse 5'-TCACACACTTGACCCT-3'
10	Ef-SSH-Cand10	Forward 5'-TTCTGCCTCTCCGACT-3' Reverse 5'-AGACTGCATTCGTAGGG-3'
11	Ef-SSH-Cand11	Forward 5'-CTACTCCTGCGAGACA-3' Reverse 5'-CCCGAGTCTTAACAGTCC-3'
12	Ef-SSH-Cand12	Forward 5'-GAATGTCTGTCATCCGC-3' Reverse 5'-GCGGAGATATAGCATCG-3'
13	Ef-SSH-Cand13	Forward 5'-CTACACTTCGCCAGGG-3' Reverse 5'-CGCTAGTAGGTAAAGGCT-3'
14	Ef-SSH-Cand14	Forward 5'-CGAGTTGACCAGAGGG-3' Reverse 5'-TGTGACACGAGACCTTC-3'
15	Ef-SSH-Cand15	Forward 5'-TGGACTCACAACTTGTCT-3' Reverse 5'-ATAGGCACACGACTGTTA-3'
16	Ef-SSH-Cand16	Forward 5'-CGATGTTACGCAGTTTCT-3' Reverse 5'-GGAGTGTCTCGCTCAG-3'
17	Ef-SSH-Cand17	Forward 5'-TGCTCGTTAAGGTGGTC-3' Reverse 5'-AACGCAAACATGGAGT-3'
18	Ef-SSH-Cand18	Forward 5'-TGTCTGGATACAGATAGGTG-3' Reverse 5'-AGGTATTCCTTTCCTCGG-3'
# Figure 1 SM:

```
cgacccggacctcgtcgtcgtcgtcgtcggggtccacccgttgcccgtcgtctggcctcgt
 cgtctcacagtcgcactcaccggttcgcctcgtctacggttagaagatcgtccgttccac
M A D I Q K E S I A E A
{\tt tacgacgatgtcaggaacgaccaaacgccaaccacctgggctctcttgggttatgatgac}
 Y D D V R N D Q T P T T W A L L G Y D D
agcaacacgattgttctcttggggacgggatcagaatatgaagaattcagatcaaagttt
 S N T I V L L G T G S E Y E E F R S K F
tctgatgacgacaggctctttggattcgttcgtctaactgctggagatgaattgagcaag
 S D D D R L F G F V R L T A G D E L S K
agagcaaagttcgtgctcatcacgtggatcggaagcaacatcagcgcactgaagagagct
 R A K F V L I T W I G S N I S A L K R A
aaagtcagcaccgacaagtccaccgtcaaatccatcctccagaattttgccttggagatt
 K V S T D K S T V K S I L Q N F A L E
                                                    Т
Q I S D L A E L E E P N I R E A L K K A
ggaggcgcccagtatggaaccggggtccgcgactgacgatgccttcaacggatcacgcga
 G G A Q Y G T G V R D -
aagcaggaaattcactgttgtctacgtcaatattctgaccctgaagtcctacggaaatgt
gggtgccgatggaggagccaaatccgatgacattgcaaaagaattagaccaaagacaaga
acgctttttaaattcgttgaaatttcagattattttctattcgtcagtgtagcggttaac
tggttaaagcggaaaacgtggtaaatttagacgcttctctggaagtccttacaagtgcta
gataattcaactgaqgcacatgcattcatgaacaatttacagtaatcgagcgacaagtag
\verb|ccctattaacctctatacctctgttggtgcatattcgccgacgtttaaaaggatggaagg||
{\tt tttaaatgggtcagacattccgggaaacatgtgggcctatgctcgtatgcctatgcccaa}
\verb|cccccaagattgacgcctataatggtgtgtggatatacggaggcctatgtaatttcacaa||
{\tt ttcgtaacgttgccagggattagttgggccacatgttccggtgtgaacgttgctcgttaa}
ggcggtcttccaatccagagaaattttgctcaaattcgctgatcctgtataatgtatctt
{\tt cttcttttgtctatctttcgatcagtagttgctccgtgaattagttgcaacagcagctga}
tgagtaaatagtgcgcattgaatatcgccataattataggaacatttgtagattcacgtt
{\tt tttagaaaatccagaaatttaactccatgtttgcgtttctagtgttgatcttctgctgaa}
gaactgacgcgagtcttctgatgcgatcactataggtctatatagttatacgagaaag
ctttttgtttagacgtttaggcagtctatgt
```

<u>Fig. 1 SM:</u> Complete coding sequence of *Eisenia fetida* Coactosin-Like Protein. Depicted is the base sequence with the amino acid translation of the encoded protein. The sequence was submitted to international genetic databases under accession No. EU296921

**CONCLUSIONS – PERSPECTIVES** 

#### Conclusions

Le constat de fonctionnement/dysfonctionnement au niveau des écosystèmes et des communautés (animales/végétales) doit s'accompagner d'une compréhension des relations entre organismes et de la biologie (y compris la toxicologie) d'espèces clés. Le but principal est d'identifier les causes de perturbation in situ (exposition) et éventuellement de dégager des moyens de remédiation efficaces compatibles avec le vivant. Une véritable approche écotoxicologique doit se fonder sur une approche intégrant les différents niveaux d'organisation (du moléculaire à l'écosystème) à plusieurs échelles spatiales et temporelles. Les indicateurs écologiques globaux (e.g. indices de diversité, indices biotiques, indices biologiques diatomiques, etc.) présentent l'avantage de donner une vision intégrée de l'état de santé de l'écosystème. Ils sont réalistes dans la mesure où ils sont établis in situ, intégrant une dimension temporelle, mais sont difficiles à mettre en œuvre avec une bonne «reproductibilité» et ne permettent souvent qu'un constat tardif des atteintes subies par les milieux. En effet, l'étude des réponses biologiques des individus vis-à-vis d'un contaminant est très importante pour évaluer les risques d'effets délétères sur les organismes qui peuplent un écosystème. Ainsi, de nombreuses recherches en écotoxicologie se focalisent sur la mesure des traits d'histoire de vie, typiquement la mortalité, ainsi que sur les effets des contaminants sur la reproduction et la croissance. Depuis quelques années, les recherches réalisées à l'échelle infra-individuelle, et plus particulièrement au niveau moléculaire, se multiplient. Ces travaux permettent de mieux comprendre les mécanismes de toxicité et mettent en rapport les changements moléculaires avec les changements observés au niveau des individus et des populations.

Les travaux menés au cours de cette thèse constituent une contribution, 1- à l'identification de gènes différentiellement exprimés chez l'Annélide Oligochète *Eisenia fetida*, en réponse à une contamination d'origine métallique ; 2- à l'identification de gènes dont les variations d'expression pourraient être indicatrices d'exposition métallique, donc biomarqueurs potentiels. Ces travaux ont été initiés sur la base de plusieurs constats, 1- la nécessité de rassembler l'ensemble des candidats potentiels identifiés chez divers macroinvertébrés, chez une seule et même espèce, 2- la nécessité d'identifier de nouveaux candidats biomarqueurs d'exposition et d'effet métallique, 3- le manque de données génétiques disponibles pour une espèce pourtant recommandée comme modèle en écotoxicologie (OCDE, 1984 et 2004). De nombreuses d'études ont été menées pour identifier les gènes répondant spécifiquement à une contamination métallique chez diverses espèces d'invertébrés. Parmi les grandes fonctions physiologiques perturbées, on trouve la fonction

immunitaire qui semble favorable à l'identification de nouveaux gènes différentiellement exprimés lors d'une exposition à une contamination d'origine métallique. Les cœlomocytes étant les cellules immunocompétentes chez *Eisenia fetida*, nous nous sommes principalement intéressés au niveau d'expression des candidats sélectionnés dans ce tissu. Pour cela, une recherche bibliographique nous a permis d'identifier, de cloner et d'analyser le niveau d'expression de plusieurs candidats biomarqueurs impliqués dans l'immunité et documentés dans la littérature pour leurs variations observées chez divers macroinvertébrés lors d'expositions à des contaminants d'origine métallique. Puis, chacun des effecteurs sélectionnés a fait l'objet d'une analyse de son niveau d'expression lors d'une exposition à un contaminant métallique. Par ailleurs, de nouveaux gènes différentiellement exprimés lors d'expositions métalliques ont été recherchés par la construction de banques soustractives d'ADNc.

# Clonage et analyse du niveau d'expression de 16 candidats biomarqueurs chez *Eisenia fetida* lors d'expositions *in vivo* à des éléments traces métalliques

Cette approche qualifiée de ciblée, basée sur l'observation d'une forte conservation phylogénique entre espèces, nous a permis d'identifier et de tester 16 candidats biomarqueurs chez notre modèle de laboratoire, l'Annélide Oligochète Eisenia fetida. Dans un premier temps cette approche s'est révélée quelque peu décevante. En effet, malgré le grand nombre de gènes identifiés comme variant potentiellement lors d'une contamination d'origine métallique, seule l'étude de l'expression du gène Cd-mt a apporté de nouvelles informations concernant sa cinétique d'induction. En effet, ce gène se caractérise par sa précocité d'induction et une réponse de type dose- et temps-dépendante. Il apparaît que l'analyse de l'expression de ce gène est utilisable comme biomarqueur d'exposition métallique. Les autres candidats testés même s'ils apportent de l'information sur leurs variations d'expression lors d'une exposition métallique, notamment avec la mise en évidence d'un phénomène de Tradeoff, ne semblent pas utilisables en tant que biomarqueurs. Ce travail nous a également permis de comparer les résultats obtenus sur cœlomocytes et animaux entiers. Bien que les variations les plus importantes aient été mesurées à la fois sur cœlomocytes et animal entier, d'un point de vue technique les cellules circulantes de la cavité cœlomique sont faciles à échantillonner. Une méthode non-invasive permet de les obtenir et les ARN extraits sont de meilleure qualité. Ces cellules sont impliquées dans la détoxication des éléments absorbés par voie alimentaire, par absorption dermique et dans toutes les voies d'excrétion menant aux néphridies. Ainsi, ce tissu contient la grande majorité des effecteurs immunitaires et les protéines impliquées dans la détoxication.

Cette approche nous a également permis de mettre en évidence l'existence d'une nouvelle voie de détoxication des ETMs chez *Eisenia fetida*. En effet, en exploitant la conservation observée entre les espèces, nous avons été capables de cloner le gène *pcs* à partir des cœlomocytes d'*E. fetida*. Ce travail est la première preuve de son existence dans un phylum appartenant aux Lophotrochozoaires. Les résultats obtenus suggèrent l'existence d'une action coordonnée des gènes *pcs* et *Cd-mt*. Le gène *pcs* semble être un gène à réponse immédiate pour des contaminations en Cd de faible amplitude tandis que le gène *Cd-mt* prendrait le relais lors d'exposition à de plus fortes concentrations en Cd. Des études complémentaires sont nécessaires afin de déterminer si ce gène est bien fonctionnel chez *E. fetida* (*i.e.* permet de catalyser la synthèse de phytochélatines à partir de glutathion). Ce travail, faisant appel à des outils de protéomiques (HPLC, spectrométrie de masse) est en cours de réalisation. Des expérimentations sont également actuellement en cours pour mieux appréhender le mode d'action de la phytochelatine synthase, mais aussi pour évaluer son intérêt en tant que biomarqueur de contamination métallique.

# Identification et étude du profil d'expression de nouveaux gènes induits par les éléments traces métalliques dans les cellules circulantes de l'Annélide *Eisenia fetida*

Afin d'identifier de nouveaux gènes plus spécifiquement exprimés au cours d'un épisode de contamination métallique, nous avons entrepris la construction de banques soustractives. La technique d'hybridation soustractive (SSH) (Diatchenko *et al.*, 1996) est une technique de choix de part sa capacité à discriminer les gènes différentiellement exprimés entre 2 conditions expérimentales données. Cette approche qualifiée de globale, nous a permis d'identifier les gènes différentiellement exprimés et donc biomarqueurs potentiels avec des conditions d'exposition métallique proches de celles que l'on peut retrouver sur des sites naturels pollués. Cette étude nous a permis de générer un grand nombre de séquences uniques (764 au total) d'assez grande taille (longueur moyenne de 300 nucléotides) avec pour particularité d'être toutes issues des cellules immunitaires, les cœlomocytes. Jusqu'alors la plupart des séquences disponibles dans les banques de données étaient issues de l'animal entier. Une analyse du niveau d'expression de 18 candidats sur sol artificiel et sur sol naturel contaminé a permis de mettre en lumière deux nouveaux candidats impliqués dans l'immunité

et particulièrement intéressants du fait de leurs variations lors d'épisodes de contamination métallique : la *lysénine* et la *coactosin-like protein*.

#### Perspectives

Suite aux résultats obtenus lors de cette thèse, plusieurs pistes sont envisageables.

Tout d'abord, l'analyse du niveau d'expression des 4 candidats biomarqueurs identifiés (*Cd-mt, pcs, lysénine, clp*) dans des conditions proches du terrain. Tout d'abord lors d'études en microcosmes, *i.e.* en utilisant des sols prélevés sur des sites contaminés par les ETMs afin d'y exposer notre modèle de laboratoire. Un travail est en cours de réalisation au laboratoire (Collaboration avec le Dr Francis Douay, <u>Institut Supérieur d'Agriculture de Lille</u>).

De plus, l'exploitation de nos banques soustractives doit se poursuivre car seules 18 séquences ont fait l'objet d'une analyse fine de leur niveau d'expression alors que 764 séquences uniques (correspondant chacune à un gène) ont été identifiées. Toutes les séquences sont potentiellement différentiellement exprimées lors d'expositions à des contaminants métalliques. L'analyse de l'ensemble de ces séquences pourrait être envisagée au moyen de la réalisation d'une puce à ADN, suivie d'une confirmation passant par l'analyse du niveau d'expression des nouveaux candidats ainsi identifiés par PCR en temps réel. Certains auteurs pensent que l'utilisation d'outils moléculaires permettant l'étude des profils d'expression du plus grand nombre possible de gènes (puces à ADN) peut constituer une « signature » de perturbation des changements induits par un composé chimique (Lettieri, 2006). On entend par « signature » de perturbation, l'identification des gènes ou d'un groupe de gènes représentatif d'une voie physiologique dont l'expression est perturbée par un polluant donné. Selon nous, il est difficile de faire reposer un diagnostic uniquement sur la variation d'expression d'un ou plusieurs gènes considérés comme biomarqueurs d'exposition, même s'il s'agit de gènes majeurs (ex : la Cd-mt). A l'heure actuelle, dans les études de génomique disponibles, les puces à ADN n'établissent pas une signature pour un polluant donné. En revanche, elles permettent d'identifier des gènes ou un groupe de gènes représentatif d'une voie physiologique dont l'expression est perturbée par un polluant donné. Nous pensons que l'élaboration puis l'utilisation de puces à ADN composées d'une batterie de gènes sélectionnés (impliqués dans certaines voies métaboliques ou fonctions physiologiques idéalement communes à plusieurs espèces sentinelles) seraient plus à même de fournir une « signature » de perturbation.

La plupart des effecteurs étudiés lors de ce travail de thèse sont conservés et présents chez des espèces d'Annélides Oligochètes proches que l'on peut retrouver sur des terrains pollués par les ETMs (*Lumbricus rubellus*, *Lumbricus castaneus*, *Lumbricus terrestris* et *Lumbricus friendi*). L'analyse du niveau d'expression des gènes candidats biomarqueurs identifiés lors de ce travail de recherche est donc un outil transposable chez ces espèces. Les premiers résultats d'études menées récemment suggèrent que certains gènes varient de manière semblable chez des espèces collectées sur des terrains fortement contaminés.

Les différentes études de terrain menées sur des animaux prélevés en milieu naturel devront tenir compte des phénomènes d'acclimatation et d'adaptation. Les individus appartenant à ces populations "naturelles" d'Annélides ayant subi les effets d'une contamination des sols sur une très longue période ont une histoire d'exposition s'étalant sur plusieurs dizaines de générations. En effet, qu'elle soit naturelle ou d'origine anthropique, la contamination des sols est un déterminant majeur du fonctionnement des écosystèmes et de la survie des espèces animales d'invertébrés terrestres qui peuplent ces écosystèmes. Ces animaux ont deux types de réponses possibles : (1) des réponses adaptatives, (*i.e.* la fonction des gènes est d'assurer qu'un trait favorisé par la sélection naturelle soit hérité par la descendance). Dans ce cas une population peut évoluer par la combinaison d'éliminations individuelles et la survie différentielle d'une population adaptée ayant la capacité de tolérer, par exemple, une forte concentration d'un contaminant dans un sol ; (2) des réponses génétiquement programmées pour ces contaminants (*i.e.* qu'il est possible, qu'une population exposée à un contaminant de manière chronique ne montre pas d'adaptation du fait que les individus qui la composent possèdent une plasticité phénotypique suffisante pour leur permettre de faire les réajustements physiologiques et biochimiques nécessaires durant leur vie afin d'atteindre au moins la fin d'un cycle de reproduction (Morgan et al., 2007)). Cette plasticité peut se caractériser par l'induction de gènes nécessaires pour limiter les effets délétères induits par la présence à haute dose de certains polluants (comme l'induction de Cd-mt lors d'expositions au Cd). Cependant, il est difficile de faire la distinction entre acclimatation et adaptation. En effet, lors d'exposition à très long terme, que l'on retrouve classiquement sur le terrain, ce type de réponse dit "d'acclimatation" peut se transformer en réponse adaptative par la sélection naturelle, si le trait incriminé est héritable. A titre d'exemple, des recherches sur le collembole Orchesella cincta (Insecte; Collembole) ont montré qu'il existait une sélection pour les phénotypes caractérisés par une très forte induction de l'expression du gène Cd-mt. Ces auteurs ont montré que parmi les 8 allèles possibles codant la Cd-MT, 3 allèles présentant une plus forte induction en présence de Cd sont plus fréquents dans des populations issues de sites pollués. Ce caractère, reposant sur des différences de séquences régulatrices de gène, est héritable puisque transmis à la descendance chez les populations de collemboles vivant sur des sols fortement contaminés par les ETMs. Il donne un avantage sélectif à la descendance en lui permettant de mieux tolérer la présence d'ETMs (Roelofs *et al.*, 2006). Dans ce cas, il y a eu sélection de formes alléliques d'un gène impliqué dans l'acclimatation. La compréhension des mécanismes qui régissent ces réponses est très faible chez les Annélides Oligochètes. Des études en microcosmes à l'aide de notre modèle ont été entreprises pour appréhender ces phénomènes d'acclimatation et d'adaptation (Bernard *et al.*, en préparation). LISTE DES PUBLICATIONS

# Articles publiés :

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

**Brulle F.**, Mitta G., Leroux R., Lemière S., Leprêtre A. & Vandenbulcke F. The strong induction of metallothionein gene following cadmium exposure transiently affects the expression of many genes in *Eisenia fetida*: A trade-off mechanism? *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.* 2007, Vol. 144, No. 4, 334-341.

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

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

# Participations à des conférences:

Demuynck S., Grumiaux F., **Brulle F.**, Mottier V., Schikorski D., Descamps M., Leprêtre A. Metallothionein response towards metals in *Eisenia fetida*: A study at the gene and protein levels. ECOTOX 2005 - Advances and Trends in Ecotoxicology. Brno, République Tchèque, 5-7 Septembre 2005. (Communication affichée).

**Brulle F.** et Vandenbulcke F. Développement de biomarqueurs d'effets néfastes durables des métaux sur les fonctions physiologiques d'invertébrés du sol. 1<sup>ère</sup> Réunion d'Avancement PROGRAMME NATIONAL ADEME « Bioindicateurs de qualité des sols » Angers, France, 14 et 15 mars 2006. (Communication orale).

**Brulle F.**, Mitta G., Cocquerelle C., Vieau D., Lemière S., Leprêtre A., Vandenbulcke F. Real-time PCR testing of potential biomarkers in soil invertebrates, SETAC Europe 16th Annual Meeting, « Controversies and Solutions in Environmental Sciences » La Haye, Pays-Bas, 7-11 Mai 2006. (Poster Corner – Communication affichée).

**Brulle F.** et Vandenbulcke F. Développement de biomarqueurs d'effets néfastes durables des métaux sur les fonctions physiologiques d'invertébrés du sol. 2<sup>ème</sup> Réunion d'Avancement PROGRAMME NATIONAL ADEME « Bioindicateurs de qualité des sols » Angers, France, 3 et 4 Juillet 2007. (Communication orale).

**Brulle F.** et Vandenbulcke F. Développement de biomarqueurs d'effets néfastes durables des métaux sur les fonctions physiologiques d'invertébrés du sol. 3<sup>ème</sup> Réunion d'Avancement PROGRAMME NATIONAL ADEME « Bioindicateurs de qualité des sols » Angers, France, 1 au 3 Avril 2008. (Communication orale).

**Brulle F.**, Cocquerelle C., Mitta G., Lemière S., Leprêtre A., Vandenbulcke F., 2008. Identification and analysis of the expression profiles of biomarker candidates to gain insight the immune response to a metallic stress; SETAC Europe 18th Annual Meeting, « World under stress: scientific and applied issues in environmental toxicology and chemistry », Varsovie, Pologne, 25-29 Mai 2008, (Communication orale).

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES** 

Abdul Rida A. M. M. & Bouché M. B. The eradication of earthworm genus by heavy metal in southern France. *Applied Soil Ecology*. 1995, Vol. 2, 45-52.

Acher R. Neurohypophysial peptide systems: Processing machinery, hydro-osmotic regulation, adaptation and evolution. *Regulatory Peptides*. 1993, Vol. 45, No. 1-2, 1-13.

Ankley G. T., Daston G. P., Degitz S. J., Denslow N. D., Hoke R. A., Kennedy S. W., Miracle A. L., Perkins E. J., Snape J., Tillitt D. E., Tyler C. R. & Versteeg D. Toxicogenomics in regulatory ecotoxicology. *Environmental Science & Technology*. 2006, Vol. 40, 4055-4065.

Asensio V., Kille P., Morgan A. J., Soto M. & Marigomez I. Metallothionein expression and Neutral Red uptake as biomarkers of metal exposure and effect in *Eisenia fetida* and *Lumbricus rubellus* exposed to Cd. *European Journal of Soil Biology*. 2007, Vol. 43, S233-S238.

Ashburner M., Ball C. A., Blake J. A., Botstein D., Butler H., Cherry H., Davis A. P., Dolinski K., Dwight S. S., Eppig J. T., Harris M. A., Hill D. P., Issel-Tarver L., Kasarskis A., Lewis S., Matese J. C., Richardson J. E., Ringwald M., Rubin G. M. & Sherlock G. Gene Ontologgy: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*. 2000, Vol. 25, No. 1, 25-29.

#### -B-

Benovic J. L., Mayor Jr F., Staniszewski C., Lefkowski R. J. & Caron M. G. Purification and characterisation of the Beta-Adrenergic receptor kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1987, Vol. 262, 9026-9032.

Bernard F., Brulle F., Demuynck S., Lemiere S., Leprêtre A. & Vandenbulcke, F. Gene expression analysis in two annelids species under metallic stress: a microcosm study. En préparation.

Bommer U.-A. & Thiele B.-J. The translationally controlled tumour protein (TCTP). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004, Vol. 36, 379-385.

Bruhn H., Winkelmann J., Andersen C., Andrä J. & Leippe M. Dissection of the mechanism of cytolytic and antibacterial activity of lysenin, a defence protein of the annelid *Eisenia fetida*. *Developmental and Comparative Immunology*. 2006, Vol. 30, 597-606.

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

Brulle F., Mitta G., Leroux R., Lemière S., Leprêtre A. & Vandenbulcke F. The strong induction of metallothionein gene following cadmium exposure transiently affects the expression of many genes in *Eisenia fetida*: A trade-off mechanism? *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.* 2007, Vol. 144, No. 4, 334-341.

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

Bundy J. G., Sidhu J. K., Rana F., Spurgeon D. J., Svendsen C., Wren J., Stürzenbaum S. R., Morgan A. J. & Kille P. 'Systems toxicology' approach identifies coordinated metabolic responses to copper in a terrestrial non-model invertebrate, the earthworm *Lumbricus rubellus*. *BMC Biology*. 2008, Vol. 6, art. no. 25.

# -C-

Casabona G. Intracellular signal modulation: a pivotal role for protein kinase C. *Progress in Neuro-psychopharmacology and biological psychiatry*. 1997, Vol. 21, No. 3, 407-425.

Cervantes-Cervantes M. P., Calderon-Salinas J. V., Albores A. & Munoz-Sanchez J. L. Copper increases the damage to DNA and proteinscaused by reactive oxygen species. *Biol Trace Elem Res.* 2005, Vol. 103, 229-248.

Chabicovsky M., Niederstätter H., Thaler R., Hödl E., Parson W., Rossmanith W. & Dallinger R. Localization and quantification of Cd- and Cu-specific metallothionein isoform mRNA in cells and organs of the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2003, Vol. 190, 25-36.

Clemens S., Schroeder J. I. & Degenkolb T. *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. *European Journal of Biochemistry*. 2001, Vol. 268, 3640-3643.

Clemens S. Evolution and function of phytochelatin synthases. *Journal of Plant Physiology*. 2006, Vol. 163, No. 3, 319-332.

Cobbett C. A family of phytochelatin synthase genes from plant, fungal and animal species. *Trends in Plant Science*. 1999, Vol. 4, No. 9, 335-337.

Cobbett C. & Goldsbrough P. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*. 2002, Vol. 53, 159-182.

Conder J. M. & Lanno R. P. Evaluation of surrogate measures of cadmium, lead, and zinc bioavailability to *Eisenia fetida*. *Chemosphere*. 2000, Vol. 41, 1659-1668.

Conder J. M., Seals L. D. & Lanno R. P. Method for determining toxicologically relevant cadmium residues in the earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere*. 2002, Vol. 49, 1-7.

Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*. 1988, Vol. 16, 10881-10890.

Cossu C., Doyotte A., Jacquin M. C. & Vasseur P. Mécanismes de formation et effets des espèces réactives de l'oxygène. In: *Biomarqueurs en ecotoxicologie, aspects fondamentaux* (ed. Masson) 1997, Paris.

Cotrufo M. F., De Santos A. V., Alfani A., Bartoli G. & De Cristofaro A. Effects of urban heavy metal pollution on organic matter decomposition in Quercus ilex L. woods. *Environmental Pollution*. 1995, Vol. 89, 81-87.

Cui Y., McBride S. J., Boyd W. A., Alper S. & Freedman J. H. Toxicogenomic analysis of *Caenorhabditis elegans* reveals novel genes and pathways involved in the resistance to cadmium toxicity. *Genome Biology*. 2007, Vol. 8, No. 6, art. no. R122.

#### -D-

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

Declercq C. & Beaubois M. *Programme de dépistage du saturnisme infantile autour du site Metaleurop de Noyelles-Godault. Bilan de la campagne 1999-2000*, Lille, Observatoire Régional de la santé, Nord-Pas-de-Calais. 2000.

Demuynck S., Grumiaux F., Mottier V., Schikorski D. & Leprêtre A. Metallothionein response following cadmium exposure in the oligochaete species *Eisenia fetida*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.* 2006, Vol. 144, No. 1, 34-46.

Demuynck S., Grumiaux F., Mottier V., Schikorski D., Lemiere S. & Leprêtre A. Cd/Zn exposure interactions on metallothionein response in Eisenia fetida (Annelida, Oligochaeta). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.* 2007, Vol. 145, No. 4, 658-668.

Dhainaut A., Bonaly J., Barque J. P., Minier C. & Caquet T. Protéines de choc thermique et résistance multixénobiotique. In: *Biomarqueurs en ecotoxicologie, aspects fondamentaux* (ed. Masson) 1997, Paris.

Diatchenko L., lau Y. F., Campbell A. P., Chenchik A., Mogadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E. D. & Siebert P. D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996, Vol. 93, No. 12, 6025-6030.

Dickinson N. M., Turner A. P., Watmough S. A. & Lepp N. W. Acclimation of trees to pollution stress: cellular metal tolerance traits. *Annals of Botany*. 1992, Vol. 70, No. 6, 569-572.

Dong J., Song M. O. & Freedman J. H. Identification and characterization of a family of *Caenorhabditis elegans* genes that is homologous to the cadmium-responsive gene *cdr-1*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005, Vol. 1727, 16-26.

Doran J. W. & Safley M. Defining and assessing soil health and sustainable productivity. In: *Biological indicators of soil health* (eds. C. E. Pankhurst, B. M. Doube & V. V. S. R. Gupta) 1997 pp. 1-28. CAB International.

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

#### -F-

Fischer E. & Molnar L. Growth and reproduction of *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae) in semi-natural soil containing various metal chlorides. *Soil Biology & Biochemistry*. 1997, Vol. 29, 667-670.

Fisher W. S., Oliver L. M., Winstead J. T. & Volety A. K. Stimulation of defense factor for oysters deployed to contaminated sites in Pensacola Bay, Florida. *Aquatic Toxicology*. 2003, Vol. 64, No. 4, 375-391.

Florea A.-M. & Büsselberg D. Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds. *Biometals*. 2006, Vol. 19, No. 4, 419-427.

Fowler B. A., Hildebrand C. E., Kojima Y. & Webb M. Nomenclature of metallothionein. *Experientia. Supplementum.* 1987, Vol. 52, 19-22.

Frangi J.-P. & Richard D. Heavy metal pollution cartography in northern France. *The Science of the Total Environment*. 1997, Vol. 205, 71-79.

Fruman D. A., Burakoff S. J. & Bierer B. E. Immunophilins in protein folding and immunosuppression. *FASEB Journal*. 1994, Vol. 8, 391-400.

# -G-

Gachet Y., Tournier S., Lee M., Lazaris-Karatzas A., Poulton T. & Bommer U.-A. The growth related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associated transiently with microtubules during the celle cycle. *Journal of Cell Science*. 1999, Vol. 112, 1257-1271.

Galay-Burgos M., Spurgeon D. J., Weeks J. M., Stürzenbaum S. R., Morgan A. J. & Kille P. Developing a new method for soil pollution monitoring using molecular genetic biomarkers. *Biomarkers.* 2003, Vol. 8, No. 4/3, 229-239.

Gong P., Guan X., Inouye L. S., Pirooznia M., Indest K. J., Athow R. S., Deng Y. & Perkins E. J. Toxicogenomics analysis provides new insights into molecular mechanisms of the sublethal toxicity of 2,4,6-Trinitrotoluene in *Eisenia fetida*. *Environmental Science* & *Technology*. 2007, Vol. 41, No. 23, 8195-8202.

Gong P., Guan X., Inouye L. S., Deng Y., Pirooznia M. & Perkins E. J. Transcriptomic analysis of RDX and TNT interactive sublethal effects in the earthworm *Eisenia fetida*. *BMC Genomics*. 2008, Vol. 9, No. (SUPPL. 1), art. no. S15.

Grelle C. & Descamps M. Heavy metal accumulation by *Eisenia fetida* and its effects on Glutathione-S-Transferase activity. *Pedobiologia*. 1998, Vol. 42, 289-297.

Grill E., Loffler S., Winnacker E. L. & Zenk M. H. Phytochelatins, the Heavy-Metal-Binding Peptides of Plants, are Synthesized from Glutathione by a Specific  $\gamma$ -glutamylcysteine Dipeptidyl Transpeptidase (Phytochelatin Synthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1989, Vol. 86, 6838-6842.

Grill E., Winnacker E. L. & Zenk M. H. Phytochelatins: The principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*. 1985, Vol. 230, No. 4726, 674-676.

Gross B., Gaestel M., Bohm H. & Bielka H. cDNA sequence coding for a translationally controlled tumour protein. *Nucleic Acids Research*. 1989, Vol. 17, No. 20, 8367.

Gruber C., Stürzenbaum S. R., Gehrig P., Sack R., Hunziker P., Berger B. & Dallinger R. Isolation and characterization of a self-sufficient one-domain protein (Cd)-metallothionein from *Eisenia foetida*. *European Journal of Biochemistry*. 2000, Vol. 267, 573-582.

#### -H-

Hanukoglu I. Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells. *Drug Metabolism Reviews*. 2006, Vol. 5, No. 1-2, 171-196.

Heikens A., Peijnenburg W. J. G. M. & Hendriks A. J. Bioaccumulation of heavy metal in terrestrial invertebrates. *Environmental Pollution*. 2001, Vol. 113, 385-393.

Helling B., Reinecke S. A. & Reinecke A. J. Effetcs of fungicide copper oxychloride on the growth and reproduction of *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2000, Vol. 46, No. (1), 108-116.

Homa J., Olchawa E., Stürzenbaum S. R., Morgan A. J. & Plytycz B. Early-phase immunodetection of metallothionein and heat shock proteins in extruded earthworm coelomocytes after dermal exposure to metal ions. *Environmental Pollution*. 2005, Vol. 135, 275-280.

Homa J., Stürzenbaum S. R., Morgan A. J. & Plytycz B. Disrupted homeostasis in coelomocytes of *Eisenia fetida* and *Allolobophora chlorotica* exposed dermally to heavy metals. *European Journal of Soil Biology*. 2007, Vol. 43, No. SUPPL. 1, S273-S280.

IARC. (International Agency for Research on Cancer). Cadmium and cadmium compounds. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization*. 1993, Vol. 58, 119-237.

IARC. (International Agency for Research on Cancer). Air Pollution, Part 1, Some Nonheterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Industrial Exposures. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization*. 2008, Vol. 92, in preparation.

#### -K-

Kägi J. H. & Schäffer A. Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry*. 1988, Vol. 27, No. 23, 8509-8515.

Kennette D., Hendershot W., Tomlin A. & Sauvé S. Uptake of trace metals by the earthworm *Lumbricus terrestris* L. in urban contaminated soils. *Applied Soil Ecology*. 2002, Vol. 19, 191-198.

Klaassen C. D., Liu J. & Choudhuri S. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1999, Vol. 39, 267-294.

Krummrei U., Bang R., Schmidtchen R., Brune K. & Bang H. Cyclophilin-A is a zincdependant DNA binding protein in macrophages. *FEBS letters*. 1995, Vol. 371, No. 1, 47-51.

# -L-

Labrot F., Ribera D., Saint-Denis M. & Narbonne J. F. *In vitro* and *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination : lipid peroxydation, acetylcholinesterase and glutathione peroxydase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers*. 1996, Vol. 1, 21-28.

Lagadic L., Caquet T., Amiard J. C. & Ramade F. *Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux.* Collection "Recherche en Biologie". Masson, 1997, Paris, 419p.

Lagisz M., Kramarz P., Laskowski R. & Tobor M. Population parameters of the beetle *Pterostichus oblongopunctatus* F. from metal contamineted and reference areas. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2002, Vol. 69, 243-249.

Laszczyca P., Augustyniak M., Babczynska A., Bednarska K., Kafel A., Migula P., Wilczek G. & Witas I. Profiles of enzymatic activity in earthworms from zinc, lead and cadmium polluted areas near Olkusz (Poland). *Environment International*. 2004, Vol. 30, 901-910.

Lee M. S., Cho S. J., Tak E. S., Lee J. A., Cho H. J., Park B. J., Shin C., Kim D. K. & Park S. C. Transcriptome analysis in the midgut of the earthworm (*Eisenia andrei*) using expressed sequence tags. *Biochemical And Biophysical Research Communications*. 2005, Vol. 328, No. 4, 1196-1204.

Lemoine S. & Laulier M. Potential use of the levels of the mRNA of a specific metallothionein isoform (MT-20) in mussel (Mytilus edulis) as a biomarker of cadmium contamination. *Marine Pollution Bulletin*. 2003, Vol. 46, No. 11, 1450-1455.

Leroyer A., Nisse C., Hemon D., Gruchociak A., Salomez J.-L. & Haguenoer J.-M. Environmental lead exposure in a population of children in northern France: factors affecting lead burden. *American journal of Industrial Medicine*. 2000, Vol. 38, 281-289.

Leroyer A., Hemon D., Nisse C., Auque G., Mazzuca M. & Haguenoer J.-M. Determinants of cadmium burden levels in population of children living in the vicinity of nonferrous smelters. *Environmental Research Section A.* 2001, Vol. 87, 147-159.

Lettieri T. Recent applications of DNA microarray technology to toxicology and ecotoxicology. *Environmental health perspectives*. 2006, Vol. 114, No. 1, 4-9.

Lewis S., Handy R. D., Cordi B., Billinghurst Z. & Depledge M. H. Stress proteins (HSP's) : methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology*. 1999, Vol. 8, 351-368.

Li F., Zhang D. & Fujise K. Charactrization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001, Vol. 276, 47542-47549.

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

Liao V. L. C., Dong J. & Freedman J. H. Molecular characterisation of a novel, cadmiuminductible gene from the nematode *Caenorhabditis elegans*. A new gene that contributes to the resistance to cadmium toxicity. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002, Vol. 277, 42049-42059.

Lock K. & Janssen C. R. Zinc and cadmium bidy burden in terrestrial oilogochaetes: use and significance in environmental risk assessment. *Environmental Toxicologic Chemistry*. 2001, Vol. 20, 2067-2072.

Lukkari T., Taavitsainen M., Väisänen A. & Haimi J. Effects of heavy metals on earthworms along contamination gradients in organic rich soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2004a, Vol. 59, No. 3, 340-348.

Lukkari T., Taavitsainen M., Soimasuo M., Oikari A. & Haimi J. Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure: differences between

populations with and without earlier exposure. *Environmental Pollution*. 2004b, Vol. 19, 377-386.

#### -M-

Manios T., Stentiford E. I. & Millner P. A. The effect of heavy metals accumulation on the chlorophyll concentration of *Typha latifolia* plants, growing in a substrate containing sewage sludge compost and watered with metaliferus water. *Ecological Engineering*. 2003, Vol. 20, 65-74.

Menzel R., Bogaert T. & Achazi R. A systematic gene expression screen of *Caenorhabditis elegans* Cytochrome P450 genes reveals CYP35 as strongly xenobiotic inducible. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2001, Vol. 395, No. 2, 158-168.

Menzel R., Rödel M., Kulas J. & Steinberg C. E. W. CYP35: Xenobiotically induced gene expression in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2005, Vol. 438, 93-102.

Mitta G., Vandenbulcke F. & Roch P. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS letters*. 2000, Vol. 486, No. 3, 185-190.

Moffett B. F., Nicholson F. A., Uwakwe N. C., Chambers B. J., Harris J. A. & Hill T. C. J. Zinc contamination decreases the bacterial diversity of agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology*. 2003, Vol. 43, 13-19.

Morgan A. J., Kille P. & Stürzenbaum S. R. Microevolution and ecotoxicology of metals in invertebrates. *Environmental Science & Technology*. 2007, Vol. 41, 1085-1096.

Morgan M. K., Scheuerman P. R., Bishop C. S. & Pyles R. A. Teratogenic potential of atrazine and 2,4-D using FETAX. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1996, Vol. 48, No. 2, 151-168.

Mozdzer T. J., Kramarz P., Piskiewicz A. & Niklinska M. Effects of cadmium and zinc on larval growth and survival in the ground beetle *Pterostichus oblongopunctatus*. *Environment International*. 2003, Vol. 28, 737-742.

Müller A. K., Westergaard K., Christensen S. & Sorensen S. J. The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. *FEMS Microbiology Ecology*. 2001, Vol. 36, 11-19.

Munoz M., Vandenbulcke F., Saulnier D. & Bachere E. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. *European Journal of Biochemistry*. 2002, Vol. 269, 2678-2689.

Nadeau D., Corneau S., Plante I., Morrow G. & Tanguay R. M. Evaluation for Hsp70 as a biomarker of effect of pollutants on the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Cell Stress & Chaperones*. 2001, Vol. 6, No. 2, 153-163.

Nahmani J., Hodson M. E. & Black S. Effects of metals on life cycle parameters of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to field-contaminated, metal-polluted soils. *Environmental Pollution*. 2007, Vol. 149, 44-58.

Nakazawa H., Genka C. & Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Japanese Journal of Physiology*. 1996, Vol. 46, 15-32.

Nawrot T., Plusquin M., Hogervorst J., Roels H. A., Celis H., Thijs L., Vangronsveld J., Van Hecke E. & Staessen J. A. Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: A prospective population-based study. *Lancet Oncology*. 2006, Vol. 7, 119-126.

Neuhauser E. F., Cukic Z. V., Malecki M. R., Loehr R. C. & Durkin P. R. Bioconcentration and biokinetics of the heavy metals in the earthworm. *Environmental Pollution*. 1995, Vol. 89, 293-301.

Novillo A., Won S.-J., Li C. & Callard I. P. Changes in nuclear receptor and vitellogenin gene expression in response to steroids and heavy metal in *Caenorhabditis elegans*. *Integrative and Comparative Biology*. 2005, Vol. 45, 61-71.

Nuwaysir E. F., Bittner M., Trent J., Barrett J. C. & Afshari C. A. Microarrays and toxicology: The advent of toxicogenomics. *Molecular carcinogenesis*. 1999, Vol. 24, No. 3, 153-159.

#### -0-

OCDE. *Guideline for testing chemicals*. Section 2 : effects on biotic systems. Method, 207. Earthworm, acute toxicity tests. 1984, Paris, France.

OCDE. *Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia andrei)*. Guidelines for the testing of chemicals. No. 222. 2004, Paris, France.

Ohta N., Shioda S., Sekizawa Y., Nakai Y. & Kobayashi H. Sites of expression of mRNA for lysenin, a protein isolated from the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia fetida*. *Cell and Tissue Research*. 2000, Vol. 302, 263-270.

Oumi T., Ukena K., Matsushima O., Ikeda T., Fujita T., Minakata H. & Nomoto K. Annetocin, an annelid oxytocin-related peptide, induces egg-laying behaviour in the earthworm, *Eisenia fetida*. *Journal of Experimental Zoology*. 1996, Vol. 276, No. 2, 151-156.

Owen J., Hedley B. A., Svendsen C., Wren J., Jonker M. J., Hankard P., Lister J. L., Stürzenbaum S. R., Morgan A. J., Spurgeon D. J., Blaxter M. L. & Kille P. Transcriptome profiling of developmental and xenobiotic responses in a keystone soil animal, the oligochaete annelid *Lumbricus rubellus*. *BMC Genomics*. 2008, Vol. 9, art. no. 266.

#### -P-

Palmiter R. D. The elusive function of metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998, Vol. 95, 8428-8430.

Palus J., Rydzynski K., Dziubaltowska E., Wyszynska K., Natarajan A. T. & Nilsson R. Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2003, Vol. 540, No. 1, 19-28.

PAN Pesticides Database. http://pesticideinfo.org

Pawert M., Triebskorn R., Gräff S., Berkus M., Schulz J. & Kölher H.-R. Cellular alterations in midgut cells as a marker of heavy metal exposure: ultrastructure and intracellular metal distribution. *The Science of the Total Environment*. 1996, Vol. 181, 187-200.

Pfister K., Steinback K. E., Gardner G. & Arntzen C. J. Photoaffinity-labeling of an herbicide receptor protein in chloroplast membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*. 1981, Vol. 78, No. 2, 981-985.

Pirooznia M., Gong P., Guan X., Inouye L. S., Yang K., Perkins E. J. & Deng Y. Cloning, analysis and functional annotation of expressed sequence tags from the earthworm *Eisenia fetida*. *BMC Bioinformatics*. 2007, Vol. 8 Suppl 7, art. no. S7.

Pizl V. & Josen G. Earthworm communities along a gradient of urbanisation. *Environmental Pollution*. 1995, Vol. 90, 7-14.

Provost P., Samuelsson B. & Radmark O. Interaction of 5-lipoxygenase with cellular proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999, Vol. 96, 1881-1885.

Pruvost C., Douay F., Hervé F. & Waterlot C. Heavy metals in soil, crops and grass as a source of human exposure in the former mining areas. *Journal of Soils and Sediments*. 2006, Vol. 6, No. 4, 215-220.

# -R-

Radmark O., Werz O., Steinhilber D. & Samuelsson B. 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *Trends in Biochemical Sciences*. 2007, Vol. 32, No. 7, 332-341.

Raes H., Braekman B. P., Criel G. R. J., Rzeznik U. & Vanfleteren J. R. Copper induces apoptosis in Aedes C6/36 cells. *Journal of Experimental Zoology*. 2000, Vol. 286, 1-12.

Rakonjac M., Fischer L., Provost P., Werz O., Steinhilber D., Samuelsson B. & Radmark O. Coactosin-like protein supports 5-lipoxygenase enzyme activity and up-regulates leukotriene A<sub>4</sub> production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006, Vol. 103, No. 35, 13150-13155.

Reichert K. & Menzel R. Expression profiling of five different xenobiotics using a *Caenorhabditis elegans* whole genome microarray. *Chemosphere*. 2005, Vol. 61, 229-237.

Reinecke S. A., Prinsloo M. W. & Reinecke A. J. Resistance of *Eisenia fetida* (Oligochaeta) to cadmium after long-term exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1999, Vol. 42, 75-80.

Ricketts H. J., Morgan A. J., Spurgeon D. J. & Kille P. Measurement of annetocin gene expression: a new reproductive biomarker in eartworm ecotoxicology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2004, Vol. 57, 4-10.

Robert J. Evolution of heat shock protein and immunity. *Developmental and Comparative Immunology*. 2003, Vol. 27, 449-464.

Roch P., Canicatti C. & Valembois P. Interactions between earthworm hemolysis and sheep red blood cell membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 1989, Vol. 983, No. 2, 193-198.

Roelofs D., Overhein L., de Boer M. E., Janssens T. K. S. & Van Straalen N. M. Additive genetic variation of transcriptional regulation: metallothionein expression in the soil insect *Orchesella cincta. Heredity.* 2006, Vol. 96, 85-92.

Rose T. M., Schultz E. R., Henikoff J. G., Pietrokovski S., McCallum C. M. & Henikov S. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Research*. 1998, Vol. 26, 1628-1635.

# -S-

Santodonato J. Review of the estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons: relationship to carcinogenicity. *Chemosphere*. 1997, Vol. 34, No. 4, 835–848.

Sauvé S., Hendawi M., Brousseau P. & Fournier M. Phagocytic response of terrestrial and aquatic invertebrates following *in vitro* exposure to trace elements. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2003, Vol. 52, No. 1, 21-29.

Scaps P., Descamps M. & Demuynck S. Biochemical and physiologycal response induced by toxics in Annelida: utilization as biomarkers. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology*. 2002, Vol. 9, 165-173.

Schmitt-Wrede H. P., Koevius H., Tschuschke S., Greven H. & Wunderlich F. Genomic organization of the cadmium-inducible tandem repeat 25-kDa metallothionein of the oligochaete worm *Enchytraeus buchholzi*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004, Vol. 1680, 24-33.

Sekiwaza Y., Hagiwara K., Nakajima T. & Kobayashi H. A novel protein, lysenin, that causes contraction of the isolated rat aorta: Its purification from the coelomic fluid of the earthworm, *Eisenia foetida*. *Biomedical Research*. 1996, Vol. 17, No. 3, 197-203.

Snell T. W., Brognon S. E. & Morgan M. B. Gene expression profiling in ecotoxicology. *Ecotoxicology*. 2003, Vol. 12, 475-483.

Spurgeon D. J. & Hopkin S. P. Effects of metal- contaminated soils on the growth, sexual development, and early cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*, with particular reference to zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1996, Vol. 35, 86-95.

Spurgeon D. J., Weeks J. M. & van Gestel C. A. M. A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology. *Pedobiologia*. 2003a, Vol. 47, No. 5-6, 588-606.

Spurgeon D. J., Svendsen C., Weeks J. M., Hankard P. K., Stubberud H. E. & Kammenga J. E. Quantifying copper and cadmium impacts on intrinsic rate of population increase in the terrestrial oligochaete *Lumbricus rubellus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2003b, Vol. 22, No. 7, 1465-1472.

Spurgeon D. J., Stürzenbaum S. R., Svendsen C., Hankard P. K., Morgan A. J., Weeks J. M. & Kille P. Toxicological, cellular and gene expression responses in earthworms exposed to copper and cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.* 2004, Vol. 138, 11-21.

Sterckeman T., Douay F., Proix N. & Fourrier H. Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the north of France. *Environmental Pollution*. 2000, Vol. 107, 377-389.

Stone D., Jepson P., Kramarz P. & Laskowski R. Time to death response in carabid beetles exposed to multiple stressors along a gradient of heavy metal pollution. *Environmental Pollution*. 2001, Vol. 113, 239-244.

Strange R. C., Spiteri M. A., Ramachandran S. & Fryer A. A. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2001, Vol. 482, No. 1-2, 21-26.

Stürzenbaum S. R., Kille P. & Morgan A. J. The identification, cloning and characterization of earthworm metallothionein. *FEBS letters*. 1998a, Vol. 431, 437-442.

Stürzenbaum S. R., Kille P. & Morgan A. J. Identification of heavy metal induced changes in the expression patterns of the translationally controlled tumour protein (TCTP) in the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998b, Vol. 1398, 294-304.

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

Stürzenbaum S. R., Parkinson J., Blaxter M., Morgan A. J. & Kille P. The earthworm expressed sequence tag project. *Pedobiologia*. 2003, Vol. 47, 447-451.

Stürzenbaum S. R., Georgiev O., Morgan A. J. & Kille P. Cadmium detoxification in earthworms: From genes to cells. *Environmental Science & Technology*. 2004, Vol. 38, 6283-6289.

Svendsen C., Owen J., Kille P., Wren J., Jonker M. J., Headley B. A., Morgan A. J., Blaxter M. L., Stürzenbaum S. R., Hankard P. K., Lister J. L. & Spurgeon D. J. Comparative transcriptomic responses to chronic cadmium, fluoranthene and atrazine exposure in *Lumbricus rubellus*. *Environmental Science & Technology*. 2008, Vol. 42, 4208-4214.

Swiergosz-Kowalewska R., Bednarska A. & Callaghan A. Expression of metallothionein genes I and II in bank vole *Clethrionomys glareolus* populations chronically exposed *in situ* to heavy metals. *Environmental Science & Technology*. 2007, Vol. 31, 1032-1037.

# -T-

Tasiemski A., Vandenbulcke F., Mitta G., Lemoine J., Lefebvre C., Sautiere P. E. & Salzet M. Molecular characterization of two novel antibacterial peptides inducible upon bacterial challenge in an annelid, the leech *Theromyzon tessulatum*. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994, Vol. 23, 30973-30982.

Thaw P., Baxter N. J., Hounslow A. M., Price C., Waltho J. P. & Craven C. J. Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones. *Nature Structural Biology*. 2001, Vol. 8, 701-704.

Timmermans M. J. T. N., Ellers J., Roelofs D. & Van Straalen N. M. Metallothionein mRNA expression and cadmium tolerance in metal-stressed and reference populations of the springtail *Orchesella cincta*. *Ecotoxicology*. 2005, Vol. 14, 727-739.

Trinchella F., Riggio M., Filosa S., Volpe M. G., Parisi E. & Scudiero R. Cadmium distribution and metallothionein expression in lizard tissues following acute and chronic cadmium exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.* 2006, Vol. 144, No. 3, 272-278.

# -V-

Vasak M. & Hasler D. W. Metallothioneins: New functional and structural insights. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2000, Vol. 4, No. 2, 177-183.

Vatamaniuk O. K., Bucher E. A., Ward J. T. & Rea P. A. A new pathway for heavy metal detoxification in animals. phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in

*Caenorhabditis elegans. The Journal of Biological Chemistry.* 2001, Vol. 276, No. 24, 20817-20820.

#### -W-

Walker C. H. Organic polluants: An ecotoxicological perspective. Taylor and Francis, 2001, London.

Weeks J. M. The value of biomarkers for ecological risk assessment: academic toys or legislative tools? *Applied Soil Ecology*. 1995, Vol. 2, 215-216.

Willuhn J., Schmitt-Wrede H.-P., Greven H. & Wunderlich F. cDNA cloning of a cadmiuminductible mRNA encoding a novel cysteine-rich, non-metallothionein 25-kDa protein in an enchytraeid earthworm. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994, Vol. 269, 24688-24691.

Willuhn J., Otto A., Schmitt-Wrede H.-P. & Wunderlich F. Earthworm gene as indicator of bioefficacious cadmium. *Biochemical And Biophysical Research Communications*. 1996, Vol. 220, 581-585.

# -Y-

Yamaji A., Sekizawa Y., Emoto K., Sakuraba H., Inoue K., Kobayashi H. & Umeda M. Lysenin, a novel sphingomyelin-specific binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998, Vol. 273, No. 9, 5300-5306.

# -Z-

Zhang H., Xu W., Guo J., He Z. & Ma M. Coordinated responses of phytochelatins and metallothioneins to heavy metals in garlic seedlings. *Plant Science*. 2005, Vol. 169, No. 6, 1059-1065.

Zheng S., Song Y., Qiu X., Sun T., Ackland M. L. & Zhang W. Annetocin and TCTP expressions in the earthworm *Eisenia fetida* exposed to PAHs in artificial soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2008, Vol. 71, No. 2, 566-573.

ANNEXES

# ANNEXE 1 : Valeurs limites de concentration en éléments-traces dans les sols

Éléments-traces dans les sols	Valeur limite en mg/kg MS
Cadmium	2
Chrome	150
Cuivre	100
Mercure	1
Nickel	50
Plomb	100
Zinc	300

Arrêté du 8 janvier 1998 modifié fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles pris en application du décret n°97-1133 du 8 décembre 1997 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées, JO du 31 janvier 1998.



<u>ANNEXE 2</u>: Conversion de l'acide arachidonique en leucotriènes (LTs). La 5-LO catalyse la conversion de l'acide arachidonique (AA), en acide 5(S)-hydroperoxy-6-trans-8,11,14-ciseicosatetraenoïque (5-HPETE), ou en LTA<sub>4</sub>. L'hydrolyse enzymatique du LTA<sub>4</sub> (catalysée par la LTA<sub>4</sub> hydrolase) mène au LTB<sub>4</sub>, et la conjugaison avec le glutathion mène au LTC<sub>4</sub>. D'après Radmark *et al.* 2007

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
Caenorhabditis_brigg Caenorhabditis_elega Schizosaccharonyces_ Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Consensus	1	RAYPELLI	RGMTNATPNIGL	IKNKVVSFI	MSVTAKNFY MSVTAKNFY ERVGQLKKSFY MAMASLY MAMASLY MAMASLY MAMAGLY k.fY	RRPLPET-CVE RRPLPET-CIE KRQLPKQ-CLF RRSLPSPPAII RRSLPSPPAII RRSLPSPPAII RRVLPSPPAVI rR.LPc.	FSSELGKKLF FSSELGKKLF FDSSLGKDVF FSSREGKLTF FSSREGKLTF FSSSEGKKTF FRSTEGKQLF FSSLGKLF	TEALLQGSAN TEALVRGSAN LRALQEGRHE NEALQKGTHE NEALQKGTHE NEALQKGTHE LEALQKGTHE LEALQNGTHE .eAlq.G.w	IYFKLASQFR IYFKLASQFR NYFSLAQQHV GFFRLISYFQ GFFRLISYFQ GFFRLISYFQ GFFKLISYFQ \$.%FKLAS9f.	TQDEPAYCGL TQDEPAYCGL TQNEPAFCGL TQSEPAYCGL TQSEPAYCGL TQSEPAYCGL TQSEPAYCGL TQ.EPA%CGL	STLYMYLNA STLYMYLNA GTLCHILNS ASLSYYLNA ASLSYYLNA ASLSYYLNA ASLSYYLNA ASLSMYLNA	ILEVDPEKVHKF ILEVDPEKVHKF ILSIDPGRLHK( ILSIDPGRKHK( ILSIDPGRKHK( ILSIDPGRKHK( ILSIDPGRKHK( ILSIDPGRKHK( ILSIDPGRKHK( ILSIDPGRKHK(	IPHRFYHESM IPHRFYHESM ISHRHYDQYM IPHRHFDESM IPHRHFDESM IPHRHFDESM IPHRHFDESM IPHRHFDESM IPHRH%d#st	LDCCVPL LDCCVPL LDCCRSL LDCCEPL LDCCEPL LDCCEPL LDCCEPL LDCC_PL
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
Caenorhabditis_brigg Caenorhabditis_elega Schizosaccharonyces_ Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Consensus	ENIKKS ENIRKS SDIEKE EVVKEK EVVKEK EVVKEK EKVKAK e.!kk.	GINLQQ GINLQQ GVTLEE GISFGK GISFGK GISFGK GISFGK GISFGK	FSCLATCNRLRS FSCLAKCNRLKS FSCLANCNGLRI VYCLAHCSGAKY VYCLAHCSGAKY VYCLAHCSGAKY VYCLAHCAGAKY FsCLA.Cnglk	SVSYGETTH TVSYGDNSH TKCYKDY 'EAFRTSQST 'EAFRTTQST 'EAFRTNQTT 'EAFRSNHST	PEFLKKFRASL POFLKKFRASL SFDEFRKDY IIDDFRKFY IIEDFRKFY IIDDFRKLY IIDDFRKQY d.FRk.v	VNSVKSDDQVL VNSVRSDDQVL ISCSTIENKI VKCTSSENCH VKCTSSENCH MKCSTSENCH MACTTSONCHL c.ts##4	VASYDRSVL( VASYDRSVL( IAISFCRKVL( IISTYHRSVFH (ISSYHKGVFH IISSYHRGVFH ISSYHRGLFH \$s%.R.vl{	QTGTGHFSPL QTGSGHFSPL QTGDGHFSP QTGNGHFSP QTGTGHFSPJ QTGSGHFSPJ QTGSGHFSPJ QTG_GHFSP	LARYHADSDQY ARYHEDSDQY /GGFSESDNKI (GGYNAERDMA (GGYNAERDMA (GGYNAERDMA (GGYNAERDMA (GGYHYGKDMA ,gg%h#	LIMDVARFKY LIHDVARFKY LILDVARFKY LILDVARFKY LILDVARFKY LILDVARFKY LILDVARFKY LILDVARFKY	(PPHWYKLET (PPHWYKLET (PCYWYDLKL (PPHWYPLKL (PPHWYPLKL (PPHWYPLKL (PPHWYPLPL (PPHWYLL1)	LQKALCSVDI LQKALCSVDVI MYESHFPIDKK LHEAMDSIDQ LHEAMDSIDD LHEAMDSIDD LHEAMDSIDD LAEAMNTIDE \$.ea\$.s!D.	STKKPRGFYE STKKPRGFYE ISGOPRGYVL STGKRRGFHL STGKRRGFHL STGKRRGFHL ATGLHRGFHL .tg.pRGfvJ	LE-LRKG LE-LKKG LE-LKKG ISRPHRE ISRPHRE ISRPHRE ITKLHRA le.lh
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
Caenorhabditis_brigg Caenorhabditis_elega Schizosaccharonyces_ Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacun Consensus	TRPLIN TRPLIN LGVL-1 PGLLY1 PGLLY1 PGLLY1 PALLY1	IYGLKAYY IYGLKAYY IYGLNKYS ILSCKDES ILSCKDES ILSCKDES ILSCKHES ILSCKHES ILSCKHES	VNVNDSDFATSV VNINDSDFATSV SHRNYSKHILQO SHIEIAKYLKEI SHIDIAKYLKEI SHISIAKYLKEI SHVTISKHLMDI SW.n.sk	TSHNEFLL( TSHNQFLL( AATYKN( WPRLYS) WPRLYS WPRLYS IPYLLS	CDPLENEEEEF CDPLEDDEEEF ADNLAEILL SQHYDSYEKII SQHYDSYDKII SQQYDSYEKIL SENVKGIKDYL .*.11	QLCCRKFGQCF QLCCRKFGQCF SINQSSIPL Syvfkslpsnf Syvfkslpsnf Syvfkslpsnf Syvfkslpsnf Stylsnlpsnf Stylsnlpsnf Stylsnlpsnf	APHALCCTQI APHANCCTQI IQERSNSSKS NQFIRHYAEJ NQFIRHYAEJ NTFIRHYAEJ VEFIKHIAEN	KTFDADQKNSC KTFDADQKNSC SGDFEHFKECJ (RITEDSNQNL (RITEDSNQIL (RITEDSNQIL (RITEDSNQIL (RITEDSNQIL (RRQEENGQNL (RRQEENGQNL) ed.k#	CVECSNEHSDA TECSTDQNEA CRSTKTYHLFL SAEEKSRLKL SAEEKSRLKL SAEEKSRLNL SDEEKGRLAI	CKLICAEIRR CKHICSEIRR KHTNTNVEYI KQLYLKEVHE KQLYLKEVHE KQVYLKEVHE KEEYLKQVQD ke	TRFAEYFSS TRFAEYFSS THAFWAIFS TELFKHINK TELFKHINK TELFKHISK DTPLYKHYTS Ts	SAYAALLYAH SAYAALLIAH LPHIQKALPK( (FL (FL	<sup>7</sup> FKHGYSERT <sup>3</sup> FEKGYSERS <sup>3</sup> VLEEIQSLL <sup>3</sup> TVGYEDSLT <sup>3</sup> SVGYEDSLT <sup>3</sup> SVGYEDSLT <sup>3</sup> SVGYEDSLT <sup>3</sup> SKAASDSSLF ss1,	ETINEMG DRIGNLA KEVEISE YAAAKAC YAAAKAC YAAAKAC NYAANIC
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
Caenorhabditis_brigg Caenorhabditis_elega Schizosaccharonyces_ Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacun Consensus	EFCFYF EKYKNE INTQLT CQGAEJ CEGAEJ CQGAEJ CQGAGL	PSIKYCVJ FSAETM TALKKQLI LSGSI LSGSI LSGC FAGRSG	LLQTN NEMSE DSLTHCCKTDT( PSKEFCCRETC) PSKEFCCRETC) SSKEFCCRETC) SSDRFCCLQTC) .scc	CCSSSCCKI KCIKGPDDS KCIKGPDDS TCYKGPGEF RCYRATGGI	NT Gegtvytgvyv Gegtvytgvyv Hegtvytgvyv Negtvytgvyv Nsatvysgtvy	RDGNEQKYDLL RDGSEQKIDLL RDGSEQNYDLL NgNgeqgydyl	LVPSTQTECE( LVPSTQTECVS LVPSTQTNCE( LVPTSLAKTS(	CGPEAT CGPEAN CGPEAN CCPSGQAGCSF	YPAGNDVFT YPAGNDVFT FPAGNDVFT YHPASNDVLT	ALLLALPPQT ALLLALPPQT YLLLALPPQT ALLLALPPHT	THSGIKDQAL THSGIKDQAL THSGIKDQAL THSGIKDQAL THSRIKDTKY	.MHEMKQLISHI .MHEMKQLISHI .MQEMKQLISHI /LQEIENLYSAI	ASLPTLLQEE ASLPTLLQEE ASLPTHLQEE ENLPPLLQEE	YLHLRRQ YLHLRRQ YLHLRRQ ILHLRGQ
	521	530	541 +											
Caenorhabditis_brigg Caenorhabditis_elega Schizosaccharonyces_ Arabidopsis_thaliana Arabidopsis_halleri Brassica_juncea Nicotiana_tabacum Consensus	LQLLKF LQLLKF LQLLKF FLLLKF	RCQENKEI RCQENKEI RCQENKEI RCQENKEI	eddlaapay Eedlaapay Eedfaapaf Eedlaappf											

<u>ANNEXE 3 :</u> Alignement des séquences protéiques correspondant à la phytochelatine synthase ayant permis d'obtenir les amorces oligonucléotidiques dégénérées pour le clonage de la phytochelatine synthase d'*Eisenia fetida* au moyen du logiciel Multalin : *Caenorhabditis briggsae* (no. accession CAE59471), *Caenorhabditis elegans* (no. accession NP\_496475), *Arabidopsis thaliana* (accession no. AAD16046), *Arabidopsis halleri* (no. accession AAS45236), *Brassica juncea* (no. accession CAC37692), *Nicotiana tabacum* (no. accession AAO74500), *Schizosaccharomyces pombe* (no. accession NP\_593552). En rouge les acides aminés conservés d'une espèce à l'autre, en bleu les acides aminés présentant une identité d'une espèce à l'autre, en noir les acides aminés non conservés ou sans identité.



<u>ANNEXE 4 :</u> Principe de réalisation d'une banque soustractive Tester = ADNc à tester Driver = ADNc témoin



Cd: 40 mg.kg<sup>-1</sup>; Pb: 500 mg.kg<sup>-1</sup>; Zn: 700 mg.kg<sup>-1</sup>

targeted approach

<u>ANNEXE 5 :</u> Protocole expérimental mis en place pour la réalisation de la banque soustractive sur *Eisenia fetida* (Brulle *et al.*, 2008)

#### Résumé

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

Mots-clés : *Eisenia fetida*, cœlomocytes, Eléments Traces Métalliques, Expression génique, Banque soustractive, biomarqueurs.

#### Abstract

Metallurgical activities lead to accumulation of metal trace elements in the topsoils, where one typically observes concentrations largely exceeding the natural background. Contaminations of soils are a threat for public health and the presence of high amount of metals can generate an environmental stress likely to affect the organisms exposed to polluted soils. Earthworms living in close contact with polluted soils were studied in order to better understand the physiological changes, the mechanisms of acclimation and of detoxification caused by metals. By exploiting the conservation observed between species and using molecular biology techniques, we have been able to clone and transcriptionally characterise potential biomarkers form the immune cells of the ecotoxicologically important earthworm species Eisenia fetida. During this Ph. D. we developed two approaches. First, a targeted approach based on bibliographic work, enabled us to identify and select effectors among highly preserved proteins for which variations following metal exposure were reported in invertebrates. Second, an open strategy was undertaken by performing a Suppression Subtractive Hybridization in order to identify genes which are differentially expressed following exposure to a complex mixture of metals representative of a strongly polluted soil. These approaches allowed the description of a group of genes which expression varies following metallic exposure as well as the analysis of their expression profiles may be used to analyse mechanistically the immune response to a metallic stress. Moreover, expression profiles of selected genes may constitute a signature of changes due to MTE.

Keywords: *Eisenia fetida*, cœlomocytes, metallic exposure, gene expression, Suppression Subtractive hybridization, biomarkers.

Laboratoire "Ecologie Numérique et Ecotoxicologie", Université des Sciences et Technologies de Lille (Lille1), Bâtiment SN3, Biologie Animale, 59 655 Villeneuve d'Ascq. FRANCE.