

Les gènes de défense utilisés comme indicateurs de pollution

De la recherche fondamentale à l'application pratique

Quand les cellules animales ou végétales sont exposées à certains polluants, divers composés oxygénés toxiques se forment en leur sein, notamment l'oxygène singulet. Les cellules disposent fort heureusement de mécanismes moléculaires de défense contre ces produits hautement réactifs. Une équipe de l'EAWAG étudie actuellement le comportement de l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* en présence d'oxygène singulet. Ces travaux doivent à long terme permettre de développer un biosenseur pour la détection de l'oxygène singulet qui servirait donc en même temps d'indicateur indirect de la présence de polluants.

La molécule d'oxygène est une base indispensable de la vie des organismes supérieurs puisque c'est la respiration qui permet aux plantes et aux animaux de développer l'énergie nécessaire à la croissance et au métabolisme cellulaire. Mais l'oxygène peut également constituer un danger de mort quand des espèces réactives de l'oxygène (voir encadré et Fig. 1) se forment au sein des cellules où leur action oxydatrice peut occasionner de sérieux dommages [1]. Si les cellules ne parviennent pas à neutraliser ce stress oxydatif, elles peuvent subir au niveau de certains de leurs composants intrinsèques comme les lipides, les protéines et l'ADN des dommages tels qu'ils peuvent même entraîner leur mort. La formation des espèces réactives de l'oxygène peut être accélérée sous l'effet de certains facteurs, notamment une exposition des organismes à des métaux lourds ou à certains polluants organiques comme les herbicides et les composés halogénés. Cet effet des

polluants peut de plus être accentué par un fort rayonnement solaire. Cependant, très souvent les cellules ont développé des mécanismes spécifiques de détoxification de ces espèces réactives de l'oxygène [2].

Différents scénarios de défense moléculaire

En simplifiant un peu, on peut décrire une réaction de défense au niveau moléculaire de la façon suivante [3]: la cellule dispose de détecteurs qui l'avertissent dès qu'une situation de stress apparaît, comme p. ex. la formation intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène. Dès que l'alarme est déclenchée, il se produit une activation des gènes de stress suivie de leur transcription, le nombre de copies des gènes de stress (ARN messagers) dépendant de l'intensité du signal d'alarme et de l'activation. Cette réaction conduit enfin à la synthèse des protéines de stress correspondantes. Leur fonction est soit d'éliminer directement la

cause du stress, p. ex. de transformer les espèces réactives de l'oxygène en formes inoffensives, soit de réparer les dommages occasionnés à la cellule. Celle-ci synthétise deux types de protéines de stress: des protéines de stress généralistes et des protéines de stress très spécialisées capables de contrer de manière ciblée, rapide et efficace des facteurs de stress bien particuliers [4]. Le mode d'activation génétique donne donc souvent une indication sur la nature et l'intensité d'un stress subi par la cellule. On se sert aujourd'hui de l'expression (l'intensité d'activation) de gènes spécifiques pour développer des biosenseurs biologiques

Espèces réactives de l'oxygène

L'oxygène moléculaire, tel qu'il est présent dans la nature, est de par sa configuration électronique un composé peu réactif et donc inoffensif pour les êtres vivants. Il peut cependant être activé de manière physique par transfert d'énergie ou de manière chimique par transfert d'électrons. On désigne par espèces réactives de l'oxygène ces molécules d'oxygène excitées, car elles sont particulièrement réactives. Dans les organismes aérobies, elles peuvent déjà se former dans des conditions physiologiques normales. L'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle se forment par transfert d'électrons provenant p. ex. de la chaîne respiratoire des mitochondries (Fig. 1) [1]. Si par contre de l'énergie provenant p. ex. du rayonnement solaire est transférée à la molécule d'oxygène c'est ce que l'on appelle de l'oxygène singulet qui se forme (Fig. 1). L'oxygène singulet ne se distingue pas de la molécule d'oxygène par sa composition chimique mais par sa configuration électronique; il réagit très rapidement avec les composants de la cellule et donne naissance à des hydroperoxydes organiques. Les acides gras insaturés dans les membranes réagissent particulièrement vite avec l'oxygène singulet, ce qui peut entraîner la formation de peroxydes lipidiques et donc une altération des membranes. Il est ainsi vital pour tous les organismes de disposer de mécanismes de défense efficaces contre l'oxygène singulet et les dommages qu'il peut occasionner.

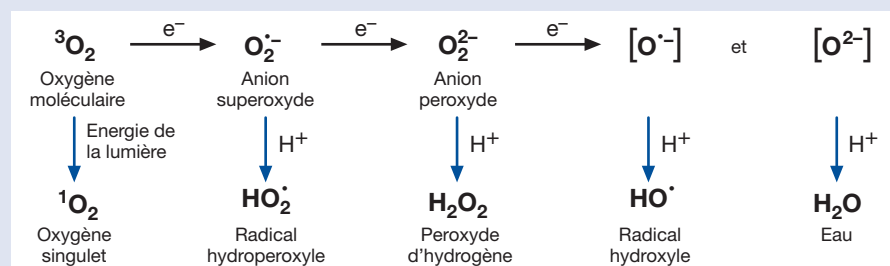


Fig. 1: Formation d'espèces réactives de l'oxygène à partir d'oxygène moléculaire par réduction incomplète ou par transfert d'énergie de la lumière. Les espèces de l'oxygène indiquées entre parenthèses sont instables et donnent immédiatement leur forme protonée.

Stress cellulaire	Polluant	Facteur d'induction
Peroxyde d'hydrogène	H ₂ O ₂ (2 mM)	2,8
Anion superoxyde	Ménadione (5 µM)	6,4
Hydroperoxydes organiques	Tert-butyl-hydroperoxyde (0,1 mM)	4,7
Oxygène singulet	Rose Bengal à la lumière (5 µM)	78,9
Rose Bengal (témoin)	Rose Bengal à l'obscurité (5 µM)	3,1
Inhibition de la photosynthèse	DBMIB (herbicide) (1 µM)	9,5
Choc thermique	Passage de 25 °C → 40 °C	1,3
Sel/stress osmotique	NaCl (200 mM)	1,5

Tab. 1: Activation du gène du *Gpxh* dans des cellules de *Chlamydomonas* soumises à différents types de stress. Des cultures de *Chlamydomonas* ont été exposées pendant 60 minutes aux différents facteurs de stress. Facteur d'induction = quotient de l'expression du gène du *Gpxh* dans la culture stressée sur l'expression du gène du *Gpxh* dans la culture témoin. L'expression du gène du *Gpxh* est représentée par la quantité d'ARN messenger synthétisée par l'appareil de transcription.

pour la détection et le dosage de polluants, comme p. ex. celui mis au point par l'EAWAG pour le dosage de l'arsenic (voir l'article de J.R. van der Meer, p. 12). Le projet présenté ici a pour but de développer un biosenseur pour la détection dans l'eau de polluants provoquant dans les cellules la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Etant donné que les connaissances sur les mécanismes de défense contre l'oxygène singulet (voir encadré et Fig. 1) sont encore assez minces, nous portons tous nos efforts sur ce réactif-là.

Des puces à ADN livrent les premiers éléments d'information

Les organismes capables de photosynthèse sont particulièrement sensibles au stress oxydatif [2] étant donné que l'appareil photosynthétique est une source importante de composés oxygénés réactifs. C'est pour cette raison que nous avons choisi comme modèle pour notre étude un organisme photosynthétique, la chlorophycée flagellée unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Cette chlorophycée présente la

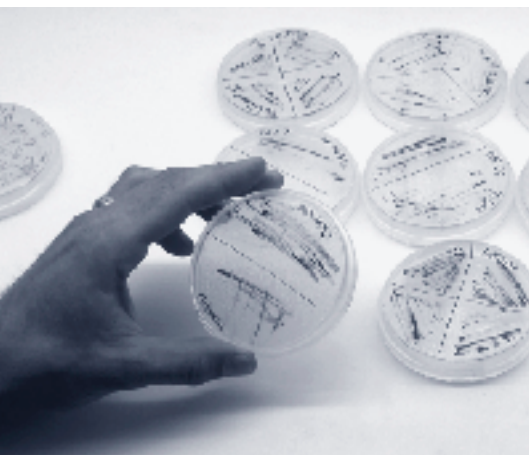
même structure cellulaire que les algues et les plantes supérieures, est facile à cultiver et se prête bien à l'emploi de techniques de biologie moléculaire [5]. Autre avantage décisif, on dispose depuis peu de puces à ADN renfermant l'information génétique de *C. reinhardtii*. Les puces à ADN permettent d'étudier l'expression de la majorité des gènes d'un organisme [3, 6] et donc, comme dans notre cas, de mettre en évidence des gènes de défense spécifiques encore inconnus.

Un total de 2792 gènes de *C. reinhardtii* se trouvent fixés sur les puces à ADN que nous avons utilisées. Pour faire la distinction entre les gènes de défense spécifiquement axés sur l'oxygène singulet et les gènes non spécifiques impliqués dans un stress oxydatif, nous avons réalisé les expériences avec des puces à ADN en utilisant soit l'oxygène singulet soit le H₂O₂, un réactif oxygéné fort répandu. Une étude comparative de l'expression des gènes dans les deux cas révèle de nettes différences: certains gènes sont activés par l'oxygène singulet mais pas par H₂O₂ (voir la photographie d'une puce à ADN en page de couverture: chaque point

correspond à un gène de *Chlamydomonas*; les gènes induits sont en rouge, ceux qui sont réprimés en vert et les gènes dont l'expression reste inchangée en jaune).

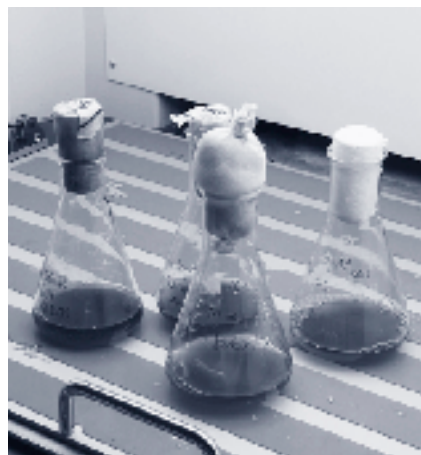
Une induction spécifique due à l'oxygène singulet

Les gènes dont l'induction par l'oxygène singulet était la plus forte et la plus spécifique ont été étudiés plus avant pour caractériser leur expression et leur fonction dans le cas d'autres types de stress. Dans le cadre de ces tests, un gène s'est avéré particulièrement intéressant. Il s'agit d'un gène homologue de la glutathion peroxydase (*Gpxh*) qui appartient à une famille de gènes impliqués dans d'autres organismes dans la dégradation des hydroperoxydes organiques [7]. Bien que le gène *Gpxh* soit également induit par d'autres espèces réactives de l'oxygène, son expression est maximale en présence de l'oxygène singulet (Tab. 1) [8]. Cette observation semble indiquer que dans *Chlamydomonas* un récepteur spécifique détecte la présence de l'oxygène singulet et que cette réaction est suivie d'une activation ciblée de gènes de

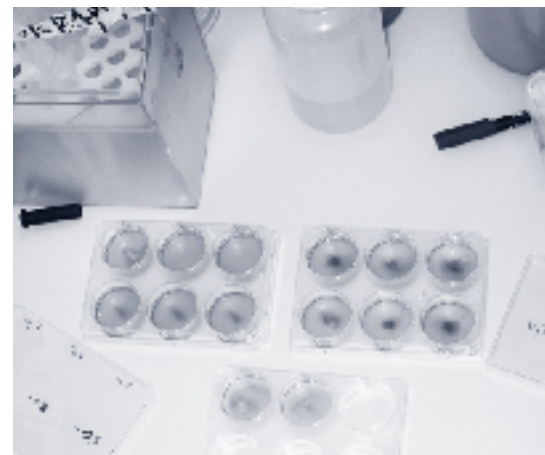


Photos: M. Bauchrowitz, EAWAG

Culture de *Chlamydomonas* sur milieu gélosé en boîte de Pétri ...



... ou en milieu liquide à température et éclairement constants.



Pour les essais d'induction, les cellules d'algues sont transférées sur des plaques de culture de cellules.

défense spécifiques de cette forme de l'oxygène.

Le promoteur du *Gpxh* examiné de plus près

Pour nous faire une idée plus exacte du mécanisme d'induction du gène *Gpxh*, nous nous consacrons en ce moment à une étude détaillée du promoteur de ce gène. Le promoteur est la région d'ADN située avant la séquence codante qui contrôle l'expression du gène. Il comprend des éléments régulateurs auxquels peuvent se fixer ce que l'on appelle des facteurs de transcription entraînant alors une activation du gène. Ces éléments régulateurs présentent une séquence de nucléotides bien précise qui ne peut être reconnue que par le facteur de transcription qui lui correspond (Fig. 2). Une comparaison avec la séquence d'autres gènes a permis de détecter un tel élément régulateur dans le promoteur du *Gpxh*. En réalisant une expérience dans laquelle l'élé-

ment régulateur était coupé du promoteur, nous avons pu montrer que cet élément jouait un rôle important pour l'induction du gène par l'oxygène singulet. Le gène de *Gpxh* ainsi modifié n'était en effet plus activable par l'oxygène singulet [8]. Dans une deuxième étape, nous avons cherché à savoir ce qui se passerait si cet élément régulateur du *Gpxh* était intégré dans la région du promoteur d'un autre gène qui n'est normalement pas activé par l'oxygène singulet. Pour cette expérience, nous avons choisi de travailler sur le gène de la β -tubuline de *Chlamydomonas*. Ce gène code pour la tubuline qui est une protéine structurale que l'on trouve dans le flagelle de nombreuses microalgues dont *Chlamydomonas*. Nous avons effectivement observé une légère activation du gène modifié de la β -tubuline par l'oxygène singulet. Ces deux expériences montrent que l'élément régulateur du *Gpxh* joue un rôle important dans le mécanisme d'activation du gène par l'oxygène singulet. Bien que l'élément présente une grande homologie avec deux éléments régulateurs de mammifères connus et bien caractérisés, il n'a pas été possible de l'identifier formellement comme l'un des deux. Il se peut que les éléments de la séquence n'aient pas été entièrement conservés entre algues et mammifères. Il est également concevable que l'élément régulateur du *Gpxh* soit un élément régulateur nouveau et jusqu'à présent inconnu. Nous ne pourrions répondre à ces questions que lorsque le facteur de transcription qui lui correspond sera isolé et caractérisé. Des efforts de recherche sont encore nécessaires pour déterminer plus précisée-

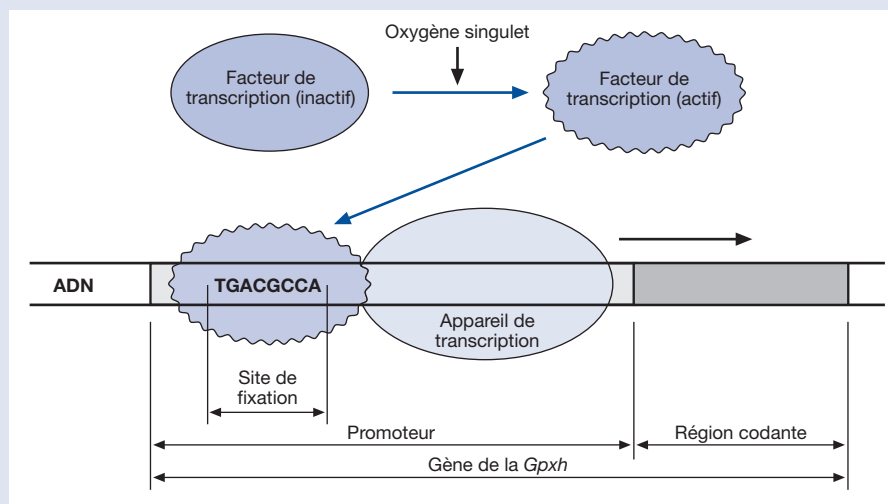
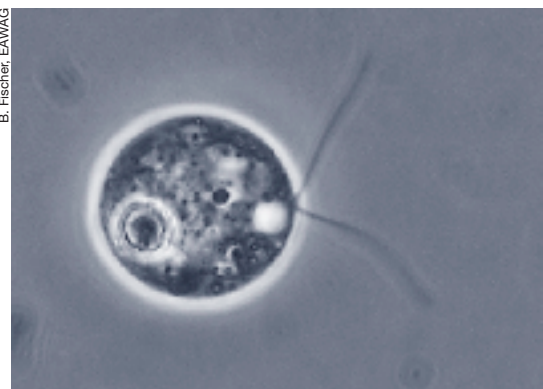


Fig. 2: Mécanisme possible d'activation du gène *Gpxh* par l'oxygène singulet. En présence d'oxygène singulet, le facteur de transcription du *Gpxh* passe de sa forme inactive à sa forme active et se fixe sur l'élément régulateur du *Gpxh*. C'est seulement à partir de ce moment-là que l'appareil de transcription peut venir se fixer sur le gène pour le lire.

B. Fischer, EAWAG



L'algue unicellulaire biflagellée *Chlamydomonas* vue au microscope (Grossissement: 100x).

ment s'il existe un mécanisme spécifique d'induction du *Gpxh* par l'oxygène singulet dans *Chlamydomonas*. Si c'était le cas, l'élément régulateur du *Gpxh* pourrait servir au développement d'un indicateur moléculaire de pollution. Un tel biosenseur permettrait de détecter et de doser les polluants à l'origine de la formation d'oxygène singulet dans les cellules.



Beat Fischer, biologiste moléculaire, effectue une thèse de doctorat à la division «Microbiologie de l'environnement et écotoxicologie moléculaire» de l'EAWAG.

Coauteur: Rik Eggen

- [1] Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1999): Free radicals in biology and medicine. Oxford science publications, 3rd edition. Clarendon Press, Oxford, New York, 968 p.
- [2] Mendez-Alvarez S., Leisinger U., Eggen R.I.L. (1999): Adaptive responses in *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Microbiology* 2, 15–22.
- [3] Eggen R.I.L. (2002): L'emploi de traceurs biologiques en écotoxicologie. *EAWG news* 52, 8–9.
- [3] Gille G., Sigler K. (1995): Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiologica* 40, 131–52.
- [5] Rochaix J.-D., Michel G.-C., Sabeeha M. (1998): The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in *Chlamydomonas*. *Advances in photosynthesis*, Vol. 7. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 760 p.
- [6] Rockett J.C., Dix D.J. (2000): DNA arrays: technology, options and toxicological applications. *Xenobiotica* 30, 155–177.
- [7] Leisinger U., Rüfenacht K., Zehnder A.J.B., Eggen R.I.L. (1999): Structure of a glutathione peroxidase homologous gene involved in the oxidative stress response in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Science* 149, 139–149.
- [8] Leisinger U., Rüfenacht K., Fischer B., Pesaro M., Spengler A., Zehnder A.J.B., Eggen R.I.L. (2001): The glutathione peroxidase homologous gene from *Chlamydomonas reinhardtii* is transcriptionally up-regulated by singlet oxygen. *Plant Molecular Biology* 46, 395–408.