
Voies de signalisation des MAP kinases et apoptose : biomarqueurs de pollution ?

Amélie Châtel^{1,2}, Hélène Talarmin¹, Bojan Hamer³, Heinz-Christoph Schröder², Werner E. G. Müller², Germaine Dorange¹

¹EA 4326 « Facteurs nerveux et structuration tissulaire » UBO - Brest

²Institut Für Physiologische Chemie Johannes Gutenberg Universität - Mainz – Allemagne

³Ruder Bošković Institute, Center for Marine Research, Laboratory for Marine Molecular Biology, Giordano Paliaga 5, HR-52210 Rovinj, Croatie

amelie.chatel@univ-brest.fr; helene.talarmin@univ-brest.fr; hamer@cim.irb.hr; hschroed@uni-mainz.de; wmueller@uni-mainz.de; germaine.dorange@univ-brest.fr

Sections de rattachement : 65/68

Secteur : secondaire

*RÉSUMÉ. Les voies de signalisation des MAP kinases sont d'importants médiateurs activés en réponse à une grande variété de signaux extracellulaires (xénobiotiques, facteurs de croissance, stress osmotique, choc thermique, UV...). Elles représentent ainsi des cibles intéressantes pour les programmes de biosurveillance de la qualité de l'environnement marin. En particulier, l'étude des MAP kinases p38, JNK (c-Jun amino-terminal kinase) et ERK (extracellular signal-regulated protein kinase), hautement conservées au cours de l'évolution, renseigne sur des perturbations de l'organisme à un stade précoce, d'où leur intérêt en toxicologie. Des expositions de moules *Mytilus galloprovincialis* et d'éponges *Suberites domuncula* au tributylétain (TBT) et aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) entraînent une activation systématique de p38 pour toutes les conditions expérimentales testées, ce qui démontre son rôle central dans la transmission des signaux extracellulaires chez ces deux invertébrés, alors que JNK et ERK ne sont activées que pour certaines concentrations de polluants. En outre, une fragmentation de l'ADN a été observée en réponse aux xénobiotiques, signe d'apoptose. Ce travail permet de noter l'intérêt de la p38 comme biomarqueur d'exposition et celui de l'apoptose comme marqueur d'effet.*

*MOTS-CLÉS. TBT, HAPs, MAP kinases, apoptose, moule, *Mytilus galloprovincialis*, éponge, *Suberites domuncula**

1. Introduction

La signalisation intracellulaire est étudiée depuis quelques années chez les Invertébrés dans le but de développer des bioessais pour la surveillance de la qualité du milieu marin (Burlando et al., 2006). Parmi les protéines cibles, les MAP (Mitogen-activated protein) kinases sont d'importants médiateurs impliqués dans la transduction des signaux de stress (Kultz et Avila, 2001). Trois MAPKs ont été bien caractérisées chez les Mammifères : p38, JNK (c-Jun amino-terminal kinase) et ERK (extracellular signal-regulated protein kinase). Ces enzymes, hautement conservées au cours de l'évolution (Böhm et al., 2002 ; Müller et al., 2002), régulent de façon coordonnée diverses activités cellulaires telles que la prolifération, la différenciation, la survie et l'apoptose. Les études réalisées jusqu'alors concernent principalement l'activation des MAP kinases en réponse aux métaux lourds (Kefaloyianni et al., 2005 ; Burlando et al., 2006 ; Canesi et al., 2001), à une contamination bactérienne (Canesi et al., 2002 ; Böhm et al., 2001), à des hormones (Canesi et al., 2004 ; 2006), à des paramètres physico-chimiques tels que la salinité, la température (Gaitanaki et al., 2004 ; Anestis et al., 2007 ; Hamer et al., 2008).

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'activation de ces MAP kinases ainsi qu'à l'induction de l'apoptose chez 2 espèces marines, l'éponge *Suberites domuncula* et la moule *Mytilus galloprovincialis*, exposées à deux types de polluants de l'environnement marin, le tributylétain et les hydrocarbures.

2. Matériel et méthodes

Les éponges *S. domuncula* sont collectées à Rovinj (Mer Adriatique, Croatie) dans des sites non pollués à des profondeurs allant de 15 à 35 m. Quant aux moules *Mytilus galloprovincialis*, elles proviennent d'un site conchylicole de Riviera (Croatie).

Exposition aux xénobiotiques - Les animaux sont exposés au tributylétain (11 µg/L – 300 µ/L) (T50202, Sigma Aldrich) et à la fraction hydrosoluble d'hydrocarbures (3,25% - 30%). L'exposition dure 1h, sous oxygénation, puis les animaux sont remis dans de l'eau de mer pour une période de récupération de 6h et 24h.

Technique ELISA - Après broyage des fragments d'éponge et des branchies de moule dans un tampon de lyse (TBS [tampon Tris], pH 7.5, 1 mM EDTA [acide tétra-acétique éthylène diamine], 1% Nonidet-P40, 10 mM NaF [fluorure de sodium], mélange d'inhibiteurs de protéases [Complete Mini, Roche], 1 mM d'orthovanadate de sodium) et centrifugation (13,000 x g ; 10min ; 4°C), le surnageant est prélevé et le dosage protéique est réalisé selon la méthode de Bradford.

L'extrait protéique, à une concentration de 400 µg/mL, est mis à incuber pendant 3h à température ambiante dans les puits d'une plaque ELISA 96 puits. Après lavage au PBS/Tween 20 0,05%, et saturation par une solution de BSA à 3% en PBS pendant 12h, à 4°C, le taux des formes phosphorylées et totales de p38, JNK et ERK est déterminé après addition des anticorps spécifiques anti-p38 (sc-7149, sc-17852, Santa Cruz

Biotechnology), anti-ERK (sc-154, sc-7383, Santa Cruz Biotechnology) et anti-JNK (9251S, 9252, Cell signaling Technology) dilués à 0,3% dans du PBS/BSA. Un anticorps secondaire de chèvre couplé à la peroxydase est ajouté. Après addition de 3,5,5-Tetraméthylbenzidine (TMB), la densité optique est mesurée à 450nm.

Immunohistochimie TUNEL – Les coupes d'éponge et de branchies de moule sont fixés au paraformaldéhyde à 4 % en tampon PBS. L'apoptose est déterminée selon le protocole du kit « In situ cell death detection kit, Fluorescein » (ROCHE) et étudiée en microscopie à fluorescence.

Analyses statistiques - Les résultats sont présentés sous forme de moyenne de 3 expériences au minimum. Une analyse de variance (ANOVA) est effectuée pour analyser les résultats obtenus, suivie d'un test post-hoc de Tukey. La significativité est acceptée à $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) et $P < 0,001$ (***) .

3. Résultats

3.1 Effet du TBT sur l'activation des MAP kinases

L'exposition des moules et des éponges à des concentrations de TBT de 11 et 33 $\mu\text{g/mL}$, respectivement, provoque l'activation/ phosphorylation des MAP kinases p38 et JNK mais n'induit pas celle de ERK (Fig. 1A et B).

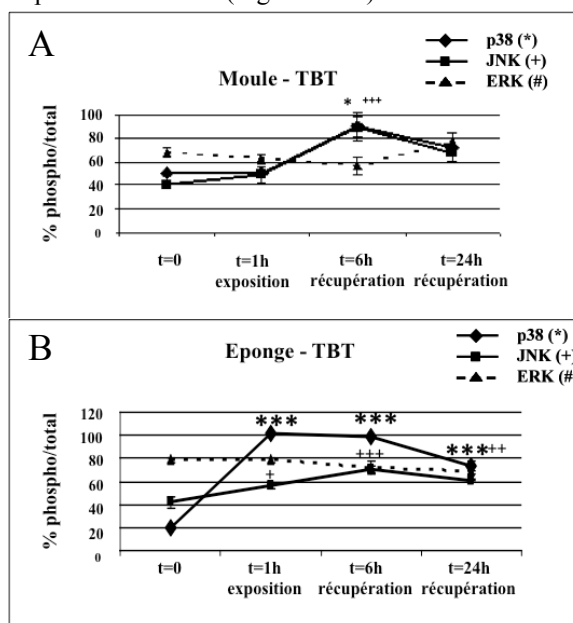


Figure 1. Effet du TBT sur l'activation des MAP kinases chez les moules (A) et les éponges (B). (*) et (+), données significativement différentes du contrôle.

Par ailleurs, l'activation des 2 MAPKs est observée dès 1h d'incubation dans du TBT

pour l'éponge mais pas pour la moule, où un tel effet n'est observé qu'après 6h de « récupération » dans de l'eau de mer.

3.2 Effet des HAPs sur l'activation des MAP kinases

Le traitement par les hydrocarbures entraîne chez la moule une activation de p38 et de JNK mais pas celle de ERK, alors que chez l'éponge, ce sont les taux phosphorylés de p38 et ERK qui sont augmentés et non ceux de JNK, dès 1h d'exposition (Fig. 2A et B).

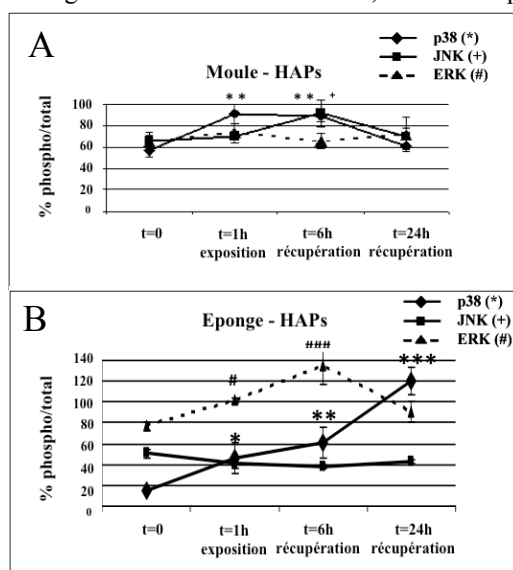
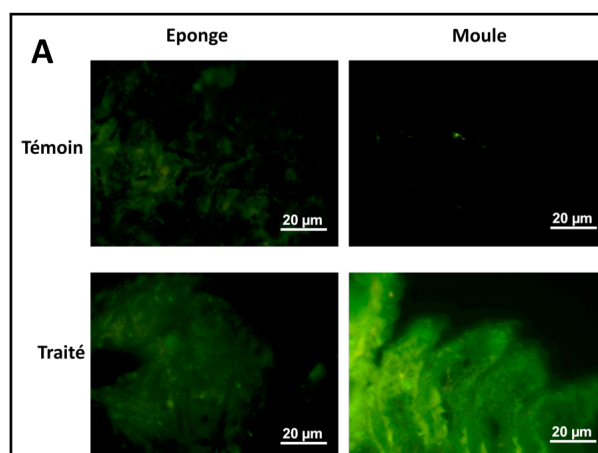


Figure 2. Effet des HAPs sur l'activation des 3 MAP kinases chez la moule (15%) (A) et l'éponge (3,25%) (B). (*), (+) et (#), données significativement différentes du contrôle

3.3 Effet des xénobiotiques sur la fragmentation de l'ADN (TUNEL)

Sur les coupes de tissus de 2 espèces exposées aux mêmes concentrations de TBT (Fig. 3A) et de HAPs que précédemment (Fig. 3B), des spots fluorescents, non visibles sur les coupes témoins, sont visibles, caractéristiques des phénomènes de fragmentation de l'ADN. De plus, chez les moules traitées par des HAPs, des corps apoptotiques sont observés au niveau de l'épithélium branchial.



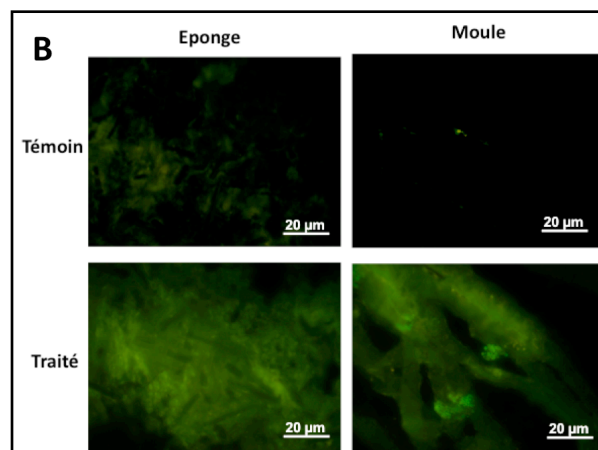


Figure 3. Coupes d'éponge et de moule exposées ou non au TBT 33µg/L (A) et aux HAPs 7,5% (B) - Méthode TUNEL

3. Discussion

L'objectif de notre étude était d'évaluer l'intérêt d'étudier, chez deux Invertébrés marins, la moule et l'éponge, la voie de signalisation intracellulaire des MAP kinases suite à une exposition à des polluants.

L'exposition au TBT entraîne chez la moule comme chez l'éponge, une activation de p38 et de JNK, en accord avec les données de Aluoch et al. (2006), pour des cellules NK humaines. L'activation de ces 2 MAP kinases est encore observée après 6h et 24h hors présence du polluant. Conformément aux hypothèses de Gaitanaki et al. (2004), après des travaux sur le manteau de *M. galloprovincialis*, il se peut que les substrats de p38 soient localisés dans le cytoplasme plutôt qu'au niveau du noyau. Les MAP kinases pourraient ainsi être réactivées par leur substrat (Kyriakis et Avruch, 1996), expliquant une persistance d'activité lorsque les animaux sont remis en eau sans polluant chimique.

En revanche, le TBT n'a aucun effet sur ERK. C'est aussi le constat de Damiani et al. (2009) chez des ascidies pour des concentrations proches de celles utilisées dans cette étude alors que ces auteurs ont montré que de fortes concentrations (jusqu'à 10 µM) de TBT provoquent une diminution importante de la phosphorylation de ERK.

Le TBT est un agent génotoxique puisqu'il induit la formation de radicaux libres, qui modifient les bases de l'ADN (Von Sonntag, 1987). Nos résultats montrent une positivité des coupes d'éponge et de moule par la méthode « TUNEL », ce qui suggère une induction de l'apoptose. Fafandel et al. (2003) ont montré pour des éponges exposées au TBT, une modification de l'expression et de la phosphorylation de la KRS kinase (serine/thréonine kinase répondant au stress), protéine impliquée dans l'induction de l'apoptose. Nos données sont également en adéquation avec celles de Micic et al. (2001) qui ont montré une induction de l'apoptose chez la moule *M. edulis* exposée au TBT. Owuor et Kong (2002) constatent une corrélation entre l'activation de JNK et celle de la caspase 3, protéine effectrice de l'apoptose dans des cellules de truite exposées à ce polluant, ce qui suggère que l'induction de l'apoptose pourrait être dépendante de JNK chez l'éponge et la moule.

En ce qui concerne les HAPs, nous notons une activation de p38 et de ERK chez l'éponge et une activation de p38 et JNK chez la moule. La toxicité des HAPs varie en fonction de leur structure. Dans les cellules de foie humain, le benzo(a)pyrène induit la phosphorylation de p38 et de ERK1/2 (Chen et al., 2003) et chez la souris, celle de JNK (Lei et al., 1998). De plus, il a été montré que les isomères de l'anthracène ont des effets opposés sur l'activation de ERK1/2 en relation avec leur structure (Rummel et al., 1999), pouvant ainsi expliquer les différences d'activation des MAP kinases entre la moule et l'éponge.

Le traitement des animaux par ces composés, à l'origine d'adduits de l'ADN (Pelkonen et Nebert, 1982) et de radicaux libres, provoque des lésions de l'ADN, comme l'attestent les résultats obtenus par la méthode « TUNEL ». Cependant pour les HAPs, il semble que ce soit p38 qui soit impliquée dans la médiation de l'apoptose, comme démontré par Chen et al. (2003) pour le benzo(a)pyrène, car un inhibiteur de p38 empêche l'activation des caspases. Rummel et al. (1999) suggèrent que le benzo(a)pyrène induit l'apoptose indépendamment de l'activation de JNK, ce qui pourrait être le cas chez la moule.

Notre étude montre donc une activation différentielle des MAP kinases selon le composé testé et/ou selon l'espèce cible, à l'exception de p38, activée dans toutes les conditions expérimentales, ce qui montre son rôle central dans la transmission des signaux extracellulaires chez les Invertébrés étudiés et par voie de conséquence son intérêt comme marqueur d'exposition à un polluant. Un autre constat est l'intérêt de l'apoptose comme biomarqueur d'effet.

5. Références

Aluoch, A.O., Odman-Ghazi, S.O., Whalen, M.M., Alteration of an essential NK cell signaling pathway by low doses of tributyltin in human natural killer cells. *Toxicol* 2006, 224(3): 229-37.

Anestis, A., Lazou, A., Portner, H.O. and Michaelidis, B., Behavioral, metabolic, and molecular stress responses of marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* during long-term acclimation at increasing ambient temperature. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* Italiques comme plus haut ou non??, 2007, 293, 911-921.

Böhm, M., Gamulin, V., Schröder, H.C. and Müller, W.E., Evolution of osmosensing signal transduction in Metazoa: stress-activated protein kinases p38 and JNK. *Cell Tissue Res.*, 2002, 308, 431-438.

Burlando, B., Berti, E., Viarengo, A., Effects of seawater pollutants on protein tyrosine phosphorylation in mussel tissues. *Aquat. Toxicol.*, 2006, 78 Suppl 1: S79-85.

Canesi, L., Betti, M., Ciacci, C., Scarpato, A., Citterio, B., Pruzzo, C., Gallo, G., Signaling pathways involved in the physiological response of mussel hemocytes to bacterial challenge: the role of stress-activated p38 MAP kinases. *Dev. Comp. Immunol.*, 2002, 26(4): 325-34.

Canesi, L., Lorusso, L.C., Ciacci, C., Betti, M., Zampini, M., Gallo, G., Environmental estrogens can affect the function of mussel hemocytes through rapid modulation of kinase pathways. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 2004, 138(1): 58-69.

Canesi, L., Pruzzo, C., Tarsi, R., Gallo, G., Surface interactions between *Escherichia coli* and hemocytes of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* lam. leading to efficient bacterial clearance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67(1): 464-8.

Chen, S., Nguyen, N., Tamura, K., Karin, M., Tukey, R.H., The role of the Ah receptor and p38 in benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278(21): 19526-33.

Damiani, F., Gianguzza, M., Dolcemascolo, G., Effects of tributyltin chloride in ascidian embryos: modulation of kinase-mediated signalling pathways. *I. S. J???*, 2009, 6, 87-94.

Fafandel, M., Müller, W.E.G., Batel, R., Molecular response to TBT stress in marine sponge *Suberites domuncula*: proteolytical cleavage and phosphorylation of KRS_SD protein kinase. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 2003, 297: 239-252.

Gaitanaki, C., Kefaloyianni, E., Marmari, A., Beis, I., Various stressors rapidly activate the p38-MAPK signaling pathway in *Mytilus galloprovincialis* (Lam.). *Mol. Cell. Biochem.*, 2004, 260(1-2): 119-27.

Hamer, B., Jaksic, Z., Pavicic-Hamer, D., Peric, L., Medakovic, D., Ivankovic, D., Pavicic, J., Zilberberg, C., Schröder, H.C., Müller, W.E., Smodlaka, N. and Batel, R., Effect of hypoosmotic stress by low salinity acclimation of Mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis* on biological parameters used for pollution assessment. *Aquat. Toxicol.*, 2008, 89, 137-151.

Kultz, D., Avila, K., Mitogen-activated protein kinases are *in vivo* transducers of osmosensory signals in fish gill cells. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 2001, 129(4): 821-9.

Kyriakis, J.M., Avruch, J. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays*. 1996, 18(7): 567-77.

Lei, W., Yu, R., Mandlekar, S., Kong, A.N., Induction of apoptosis and activation of interleukin 1beta-converting enzyme/Ced-3 protease (caspase-3) and c-Jun NH2-terminal kinase 1 by benzo(a)pyrene. *Cancer. Res.*, 1998, 58(10): 2102-6.

Micic, M., Bihari, N., Labura, Z., Muller, W.E., Batel, R., Induction of apoptosis in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis* by tri-n-butyltin chloride. *Aquat. Toxicol.*, 2001, 55(1-2): 61-73.

Müller, W.E., Böhm, M., Grebenjuk, V.A., Skorokhod, A., Müller, I.M. and Gamulin, V., Conservation of the positions of metazoan introns from sponges to humans. *Gene*, 2002, 295, 299-309.

Owuor, E.D., Kong, A.N., Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem. Pharmacol.*, 2002, 64(5-6): 765-70.

Pelkonen, O., Nebert, D.W., Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: etiologic role in carcinogenesis. *Pharmacol. Rev.*, 1982, 34(2): 189-222.

Rummel, A.M., Trosko, J.E., Wilson, M.R., Upham, B.L., Polycyclic aromatic hydrocarbons with bay-like regions inhibited gap junctional intercellular communication and stimulated MAPK activity. *Toxicol. Sci.*, 1999, 49(2): 232-40.

Von Sonntag C., New aspects in the free-radical chemistry of pyrimidine nucleobase. *Free Radic. Res. Commun.*, 1987, 2: 217-24.