

Table des matières

Remerciements	ii
Résumé	iii
Table des matières	v
Liste des figures	vi
Liste des abbréviations	vii
1 Introduction	1
1.1 La résistance aux xénobiotiques	2
1.1.1 Détoxification des xénobiotiques	2
1.1.2 Historique	5
1.1.3 MXR en écotoxicologie	6
1.2 Les protéines de MXR	9
1.2.1 La glycoprotéine P	13
1.2.2 Les protéines de résistance aux médicaments	15
1.2.3 Mesure de l'activité MXR	17
1.2.4 Répartition des protéines de MXR	19
1.3 Les microalgues en écotoxicologie	20
1.3.1 Présence de la MXR chez les microalgues marines	21
1.4 Objectifs	23

2	Evidence of a multixenobiotic resistance mechanism in marine microalgae	24
2.1	Introduction	24
2.2	Materials and methods	27
2.2.1	Reagents	27
2.2.2	Algal cultures	28
2.2.3	MXR assay	28
2.2.4	Flow cytometry	29
2.2.5	Toxicity of compounds used	30
2.2.6	Statistical analysis	30
2.3	Results	31
2.3.1	<i>Prorocentrum cf micans</i>	31
2.3.2	<i>Isochrysis galbana</i>	31
2.3.3	<i>Tetraselmis suecica</i>	33
2.4	Discussion	36
2.4.1	<i>Prorocentrum cf micans</i>	37
2.4.2	<i>Isochrysis galbana</i>	38
2.4.3	<i>Tetraselmis suecica</i>	39
2.5	Conclusion	40
3	Discussion	42
3.1	<i>Prorocentrum cf micans</i>	43
3.2	<i>Isochrysis galbana</i>	45
3.3	<i>Tetraselmis suecica</i>	46
3.4	Conclusion	48
	Références	50

Liste des figures

1.1	Domaines des transporteurs ABC.	12
1.2	Mécanisme d'action d'un exportateur ABC.	14
1.3	Topologie de la Pgp humaine.	16
1.4	Topologie des protéines de la famille ABCC.	16
2.1	Accumulation of fluorescent multixenobiotic resistance substrates in <i>Pro- rocentrum cf micans</i> cells.	32
2.2	Relative Rhodamine B accumulation in <i>Isochrysis galbana</i> cells.	34
2.3	Accumulation of fluorescent multixenobiotic resistance substrates in <i>Tetraselmis suecica</i> cells.	35

Liste des abbréviations

ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>
BCRP	protéine de résistance du cancer du sein ; <i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
CAM	ester d'acétométhyle de calcéine ; <i>Calcein AcetoMethyl ester</i>
chl	chlorophylle
CycA	Cyclosporine A
CYP	CYtochrome P450
DOM	Matière Organique Dissoute
FCM	cytométrie en flux ; <i>Flow CytoMetry</i>
FS	Diffusion vers l'avant ; <i>Forward Scatter</i>
GST	Glutathion (S)-Transférase
HAP	Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
MDR	résistance aux médicaments ; <i>MultiDrug Resistance</i>
MRP	protéine de résistance aux médicaments ; <i>Multidrug Resistance Protein</i>
MXR	résistance aux xénobiotiques ; <i>MultiXenobiotic Resistance</i>
NBD	domaine de liaison des nucléotiques ; <i>Nucleotide-Binding Domain</i>
PCR	réaction de polymérisation en chaîne ; <i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pgp	GlycoProtéine-P
RhoB	Rhodamine B
RT-PCR	PCR avec transcription inverse ; <i>Reverse Transcription PCR</i>
SS	diffusion latérale ; <i>Side Scatter</i>
TMD	domaine transmembranaire ; <i>TransMembrane Domain</i>
Ver	Vérapamil

Chapitre 1

Introduction

Au cours du dernier siècle, le développement de l'industrie chimique a mené à une forte augmentation de la concentration de nombreux composés toxiques dans l'environnement, allant des métaux aux molécules synthétiques créées par l'homme. Une grande proportion de ces composés aboutissent en milieu marin, soit parce qu'ils y sont directement relâchés ou par l'entremise du lessivage et du ruissellement. Ultiment, tous les composés stables se retrouvent en milieu côtier ou estuarien avant d'atteindre l'océan. L'impact des contaminants sur ces milieux peut être important et le domaine de l'écotoxicologie s'est développé pour comprendre et prédire la façon dont les polluants interagissent avec les organismes vivants et les écosystèmes. Pour ce faire, il est essentiel de comprendre comment les contaminants affectent les organismes vivants et comment ceux-ci réagissent, tant au niveau comportemental que moléculaire. Dans le cas des organismes planctoniques, seules

les défenses biochimiques permettent la survie des organismes en milieu pollué, ces organismes étant incapables de fuir activement les stress chimiques.

1.1 La résistance aux xénobiotiques

1.1.1 Détoxification des xénobiotiques

Certains organismes peuvent vivre dans des environnements fortement pollués où se retrouve une grande variété de contaminants. Pour conserver leur homéostasie, ils doivent détoxifier et éliminer des toxiques ayant des cibles cellulaires et des propriétés physicochimiques diverses. Bien que certains organismes soient beaucoup plus résistants aux stress toxiques que d'autres, ils expriment tous des protéines pouvant métaboliser les toxiques (Nebert et Dieter, 2000). Cette omniprésence des mécanismes de détoxification chez les procaryotes et les eucaryotes s'explique tant par le rôle essentiel de certaines des protéines de détoxification dans les processus vitaux que par le besoin de protection contre les toxiques présents depuis les origines de la vie (Nebert et Dieter, 2000). En effet, les organismes vivants ont toujours été exposés à des composés toxiques, que ce soit dû à leur présence naturelle dans de nombreux environnements ou à la production de métabolites toxiques par les cellules (Sheehan *et al.*, 2001). La guerre chimique que livrent les plantes contre les herbivores et les parasites n'a fait qu'augmenter la diversité des xénobiotiques présents dans l'environnement et la diversité des protéines de détoxification (Ames *et al.*, 1990). Dans le milieu marin, cela se traduit par la présence de nombreux composés sécrétés

par les algues et bactéries auxquels les organismes marins doivent pouvoir résister afin de maintenir leur homéostasie. Dans les milieux côtiers et estuariens, les composés générés par les activités humaines s'ajoutent aux xénobiotiques naturels. Afin de prédire l'effet potentiel de nouveaux composés introduits dans un milieu, il est primordial de comprendre comment les toxiques peuvent interagir entre eux. Une bonne portion des interactions ayant lieu au niveau du métabolisme des xénobiotiques (Padrós *et al.*, 2004), une bonne compréhension de celui-ci est des plus importantes.

Dans le cas des xénobiotiques hydrophobes, la capacité d'un organisme à éliminer le composé dépend de sa capacité à rendre celui-ci plus hydrosoluble, permettant ainsi son excrétion. Pour ce faire, les composés sont métabolisés par une voie générale de détoxification qui est séparée en trois ou quatre phases (Luedeking et Koehler, 2004). La première consiste en la fonctionnalisation du composé par les enzymes de phase I. La fonctionnalisation, souvent une oxydation, va rendre plus réactif le xénobiotique facilitant ainsi sa conjugaison à des molécules hydrosolubles endogènes. Cette conjugaison d'un composé (intact ou fonctionnalisé) à des molécules endogènes comme le glutathion, le glucuronate, le sulfate ou la glycine est la phase II du métabolisme des xénobiotiques. Elle rend le composé plus soluble, permettant son export final hors de la cellule ou de l'organisme par les protéines de phase III. Celles-ci sont des transporteurs membranaires qui, en plus des composés transformés, peuvent transporter certains xénobiotiques non métabolisés. Elles agissent alors comme première ligne de défense contre les contaminants et forment la phase 0 de détoxification (Luedeking et Koehler, 2004).

L'origine évolutive ancienne des protéines de détoxification et la grande diversité des xénobiotiques et toxiques endogènes expliquent la grande diversité des protéines de détoxification. En effet, chacune des phases du métabolisme des xénobiotiques est effectuée par une ou plusieurs superfamilles de protéines. Ainsi, l'origine des principales protéines de phase I, les membres de la superfamille des cytochromes P450 (CYP), précède la séparation des eucaryotes et procaryotes (Omura, 1999). De même, la superfamille des glutathion transférases (GST) trouverait son origine chez les procaryotes (Vuilleumier, 1997). Les GST catalysent la conjugaison du glutathion à divers xénobiotiques. Dans de nombreuses espèces, ce sont les principales enzymes de phase II (Sheehan *et al.*, 2001). Bien que la découverte initiale de membres de ces deux superfamilles remonte à plus de 40 ans (1961 pour les GST (Vuilleumier, 1997) et 1958 pour les CYP (Omura, 1999)), la première découverte d'une protéine de la superfamille des transporteurs *ATP-binding cassette* (ABC), principales protéines de phase III, remonte à 1976 (Bard, 2000). De façon analogue, les protéines de phases I et II ont été beaucoup plus étudiées que celles de phase III. Par contre, l'importance des protéines de phase III est maintenant reconnue et un nombre croissant d'études en toxicologie et écotoxicologie s'intéresse à ces protéines. Comme de nombreux domaines de l'écotoxicologie, l'étude des protéines de phase III a trouvé son origine dans le domaine biomédical.

1.1.2 Historique

L'histoire des protéines de phase III remonte au développement en laboratoire d'une résistance pléiotropique, de source unique mais affectant plusieurs phénotypes, chez des souches de cellules tumorales sélectionnées pour la résistance à l'actinomycine D ou à la colchicine (Biedler et Riehm, 1970 ; Kurelec, 1992). Ces cellules étaient résistantes à une vaste gamme de composés cytotoxiques utilisés en chimiothérapie, bien qu'elles n'aient été sélectionnées que pour la résistance à un seul composé. Cette résistance est associée à une diminution de l'accumulation intracellulaire des composés auxquels la cellule est résistante. Ce phénomène, nommé résistance aux médicaments (MultiDrug Resistance, MDR) a ensuite été associé à la surexpression d'une glycoprotéine de 170 kDa impliquée dans la perméabilité cellulaire, la glycoprotéine P (Pgp) (Juliano et Ling, 1976). Le niveau d'expression de cette protéine est corrélé au niveau de résistance des cellules tumorales et la transfection du gène de la protéine (*mdr1* chez l'homme) dans des cellules sensibles est suffisante pour les rendre résistantes (Kurelec, 1992).

D'importance primordiale dans le milieu médical, la MDR, acquise ou innée, est responsable de la majorité des échecs des traitements chimiothérapeutiques, l'expression de la Pgp par les cellules tumorales compliquant grandement le traitement (Haimeur *et al.*, 2004). La MDR est aussi importante dans le traitement de conditions médicales non liées au cancer, les protéines de MDR se retrouvant chez de nombreux parasites et bactéries (Annilo *et al.*, 2006). Les études sur la MDR ont mené à la découverte d'autres protéines responsables d'un phénotype semblable à celui associé à la Pgp. Les MRPs (Multidrug

Resistance Proteins) représentent la principale classe de protéines responsables de la MDR après la Pgp (Haimeur *et al.*, 2004). À l'image de la Pgp, elles confèrent une résistance pléiotropique à de nombreux composés cytotoxiques en diminuant leur accumulation intracellulaire.

Bien que la majorité des recherches concernant le phénomène de MDR provienne du milieu médical, il y a maintenant un nombre grandissant de travaux s'intéressant à l'impact que peuvent avoir les protéines responsables de la MDR sur la toxicité et les interactions entre contaminants dans l'environnement. Les premières études visant à démontrer la présence de la MDR chez des organismes aquatiques furent effectuées par l'équipe de Branko Kurelec. Il proposa, dans sa première revue du sujet, le terme de *multixenobiotic resistance* (MXR) pour référer au mécanisme de MDR dans un contexte environnemental (Kurelec, 1992). Depuis ces premiers travaux sur le sujet, de nombreuses autres études ont été effectuées et l'importance de la MXR en tant que mécanisme de résistance aux contaminants est acceptée. Les protéines de MXR servent maintenant de biomarqueur (ex.: Downs et Downs, 2007) et l'existence de polluants agissant comme inhibiteurs de la MXR est démontrée (ex.: Luckenbach *et al.*, 2004).

1.1.3 MXR en écotoxicologie

Depuis la première utilisation du terme, la résistance aux xénobiotiques est présentée comme un site d'interaction entre contaminants pouvant avoir une grande importance en écotoxicologie (Kurelec, 1992). Ce mécanisme de défense est généré par l'activité de

protéines utilisant l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour extraire une vaste gamme de composés hors des cellules ou organismes (Bard, 2000 ; Zaja *et al.*, 2007). Ces protéines fournissent une résistance pléiotropique à des toxines de structures variées, pouvant aller de molécules organiques modérément hydrophobes à des ions métalliques (Haimeur *et al.*, 2004). Ce large spectre de spécificité les rend par contre sensibles à une inhibition, compétitive ou non, par des composés de structures toutes aussi variées. L'existence de composés pouvant inhiber la MXR est préoccupante pour l'environnement, leur action menant à une sensibilisation des organismes vis-à-vis d'une panoplie de composés (Kurelec, 1997 ; Smital *et al.*, 2004). L'existence de composés peu ou pas toxiques mais pouvant inhiber la MXR, nommées chimiosensibilisateurs, est particulièrement inquiétante. Ces composés paraissant inoffensifs au regard des tests toxicologiques actuels pourraient ne pas être régulés (Smital *et al.*, 2004). Pourtant, leur présence dans l'environnement mènerait à la sensibilisation de nombreux organismes, potentialisant la toxicité des autres composés toxiques (anthropiques ou naturels) présents dans le milieu (Kurelec, 1997 ; Smital *et al.*, 2004). La présence de tels inhibiteurs dans le milieu naturel a déjà été documentée. Des extraits d'eau de rivière peuvent inhiber la MXR (Kurelec *et al.*, 1995), de même que des extraits de différentes algues et espèces phytoplanctoniques (Schröder *et al.*, 1998 ; Eufemia *et al.*, 2002). En plus de ces études qui ne traitent que d'extraits dont la composition n'est pas connue, certaines études ont directement déterminé le potentiel de contaminants en tant que chimiosensibilisateurs. Ainsi, des muscs, des pesticides (ex. : dachtal, chlorbenside, pentachlorophénol et sulfallate) et des toxines d'algues présentent un potentiel comme inhibiteur de MXR chez des organismes bioindicateurs (Cornwall

et al., 1995 ; Schröder *et al.*, 1998 ; Luckenbach *et al.*, 2004). Des études sur des cellules en culture ont aussi démontré le potentiel de certaines toxines comme inhibiteurs de la MXR. En plus d'une panoplie de composés pharmaceutiques (Holló *et al.*, 1996 ; Kurelec, 1997), des toxiques classiques comme certains hydrocarbures aromatiques polycycliques sont des substrats ou inhibiteurs de la MXR (Bamdad *et al.*, 1997).

De façon plus générale, la MXR a aussi une grande importance au niveau des approches classiques de la toxicologie. En effet, elle influe sur de nombreux phénomènes importants pour la détermination de l'impact de la pollution et dans les bases utilisées pour la réglementation des contaminants, soit l'absorption, la biodisponibilité, la toxicité, la bioaccumulation et l'exposition aux contaminants (Kurelec, 1992). Il va de soi qu'une inhibition ou saturation de la MXR entraînerait des conséquences au niveau de tous ces paramètres et donc de l'impact des contaminants pris en charge par la MXR sur les organismes exposés. En plus de sa potentielle inhibition par des polluants, la MXR commence à être utilisée comme biomarqueur. De nombreuses études visent à comprendre les facteurs environnementaux physiques et chimiques affectant le niveau d'expression des protéines de MXR ou leur activité (Luedeking et Koehler, 2004 ; Pain *et al.*, 2007 ; Tutundjian et Minier, 2007 ; Ivanina et Sokolova, 2008) et il y a maintenant des exemples d'utilisation de ces protéines comme biomarqueurs chez différents organismes (ní Shuílleabháin *et al.*, 2005 ; Minier *et al.*, 2006 ; Downs et Downs, 2007). Par contre, les études tendent à démontrer que le niveau d'expression des protéines de MXR est dépendant des conditions environnementales et qu'une hausse de leur expression serait plus un indicateur général de stress qu'un indicateur spécifique à un stress induit par la pollution, bien que lorsque

la variabilité saisonnière est bien connue, il est possible de détecter des stress toxiques soudains (Minier *et al.*, 2006 ; Tutundjian et Minier, 2007).

1.2 Les protéines de MXR

Le phénomène de MDR est principalement attribué à la surexpression de transporteurs de la superfamille des protéines *ATP-binding cassette* (ABC). Pour sa part, la MXR est le phénotype généré par ces mêmes transporteurs ABC. Cette superfamille ancienne, comportant 48 gènes chez l'homme, regroupe de nombreuses protéines membranaires impliquées dans différentes fonctions cellulaires, la grande majorité agissant au niveau de la perméabilité membranaire (Annilo *et al.*, 2006). Les protéines ABC participent à l'absorption des nutriments, au transport des lipides, à l'excrétion de xénobiotiques, à la sécrétion de macromolécules, à la présentation d'antigènes et au contrôle du volume cellulaire (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006). Leur origine précède la séparation entre les procaryotes et les eucaryotes, des membres de la superfamille étant retrouvés chez les organismes allant des bactéries à l'homme (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006). Malgré la grande distance évolutive entre les protéines se retrouvant chez des organismes aussi éloignés, les transporteurs ABC partagent une structure commune et certains des domaines présentent des séquences fortement conservées.

Toutes les protéines ABC présentent trois éléments de séquence conservés au niveau de leur domaine cytoplasmique liant l'ATP. Les motifs Walker A (boucle P) et Walker B (Walker *et al.*, 1982 ; Hollenstein *et al.*, 2007), communs à toutes les protéines liant l'ATP,

sont séparés par 100 à 200 acides aminés et sont impliqués dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP (Pérez-Tomás, 2006). Le motif C, de séquence ALSGGQ, est le motif signature des protéines ABC, il est retrouvé en N-terminal du motif Walker B et est aussi impliqué dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP (Haimeur *et al.*, 2004). Ces trois éléments de séquence sont fortement conservés chez toutes les protéines ABC et sont les principaux constituants des *ATP-binding cassettes* qui donnent leur nom à la superfamille. En plus de ces séquences conservées, les protéines ABC présentent aussi une structure générale commune.

Tous les transporteurs ABC fonctionnels comportent au moins quatre domaines qui sont essentiels au transport du substrat. Ceux-ci sont les deux domaines de liaison des nucléotides (*nucleotide binding domains*, NBD) et les deux domaines transmembranaires (*transmembrane domains*, TMD). Les NBDs sont situés dans la portion cytoplasmique de la protéine. Ils contiennent les séquences signatures des protéines ABC (motifs Walker A et B et motif C) et sont impliqués dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. Les NBDs sont fortement conservés chez tous les organismes, indiquant un mécanisme commun de transduction de l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006). Pour leur part, les TMDs ont une séquence plus variable. Par contre, ils présentent une structure générale comportant 6 hélices transmembranaires par TMD, donnant un transporteur fonctionnel comportant 12 hélices transmembranaires (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006). La plus grande variabilité de la séquence des TMDs permet la grande variabilité des substrats transportés par les protéines ABC. En plus de ces quatre domaines essentiels au fonctionnement des transporteurs, certaines protéines ABC présentent d'autres domaines

accessoires (Fig. 1.1). Il est intéressant de noter que les différents domaines peuvent être regroupés en une seule chaîne peptidique ou être codés par des gènes différents et ne former un transporteur fonctionnel que suite à l'association des différentes sous-unités de la protéine.

La conservation de la structure générale des protéines ABC appuie l'idée selon laquelle elles présentent un mécanisme de transport commun. L'obtention récente de la structure tridimensionnelle complète de quatre transporteurs ABC vient renforcer cette idée (Hollenstein *et al.*, 2007). Bien que ces transporteurs proviennent d'organismes différents et aient des rôles différents, trois sont des importateurs et un est un exportateur, la similarité des NBDs et de leur interface avec les TMDs indique que le « moteur » et la « transmission » des transporteurs ABC sont structurellement conservés (Hollenstein *et al.*, 2007). Ces données structurales viennent s'ajouter aux données biochimiques et permettent de proposer un mécanisme de transduction pour les transporteurs ABC (Fig. 1.2). Dans la conformation de base de la protéine, le pore de transduction serait ouvert du côté cytoplasmique de la protéine et fermé du côté extracellulaire. La liaison de l'ATP permettrait le changement de conformation ouvrant le pore à la portion extracellulaire et le fermant du côté cytosolique. L'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP et la relâche de l'ADP + Pi permet le retour à la conformation ouverte vers le cytoplasme. Ainsi, lorsque le transporteur est un importateur, la liaison de l'ATP permet l'ouverture du pore aux substrats et l'hydrolyse permet l'entrée du substrat dans la cellule. Dans le cas des exportateurs, le substrat se lie au transporteur dans le cytoplasme et la liaison de l'ATP permet la trans-

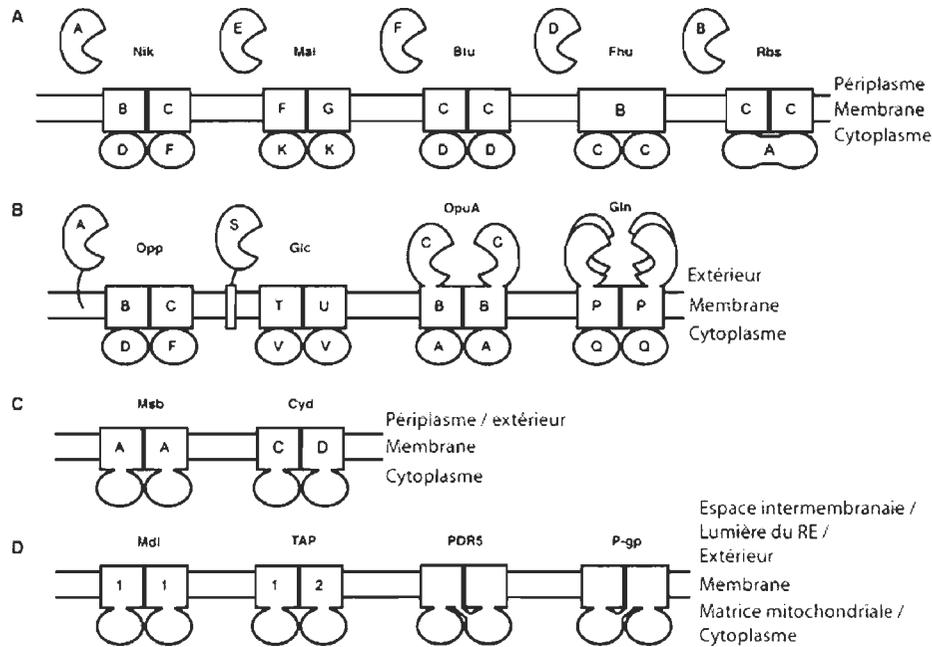


Figure 1.1 – Domaines des transporteurs ABC : Les domaines sont représentés schématiquement : protéines de liaison des substrats (forme de « pac-man »), domaines transmembranaires (rectangles), domaines de liaison des nucléotides (ovales). (A) Bactérie Gram- : Nik : transporteur de nickel ; Mal, transporteur de maltose/maltodextrine ; Btu, transporteur de la B12 ; Fhu, transporteur de sidérophore/hème/vitamine B12 ; Rbs, transporteur du ribose. (B) Bactéries Gram+ et Archaea : Opp, transporteur d’oligopeptides ; Glc, transporteur de glucose ; OpuA, transporteur de glycine bétaïne ; Gln, transporteur de glutamine/acide glutamique. (C,D) des homologues fonctionnels et structurels se retrouvent dans les trois royaumes de la vie. (C) Msb, lipide flippase ; Cyd, exportateur de cystéine. (D) Mdl, transporteur de peptides mitochondriaux ; TAP1/2 (ABCB2/3), transporteur de peptides ; PDR5, transporteur de la résistance pléiotropique de la levure ; P-gp (MDR1/ABC11), transporteur de médicaments (modifié de Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006).

duction du substrat hors de la cellule. L'hydrolyse de l'ATP retourne alors le transporteur à sa conformation initiale, permettant la liaison d'une nouvelle molécule de substrat.

Les caractéristiques et le mécanisme décrits ci-dessus seraient communs à tous les transporteurs ABC, mais il existe tout de même des différences entre les différentes protéines ABC. Ainsi, il est possible de séparer la superfamille en de nombreuses familles en fonction de l'homologie entre les protéines et de la présence de certains domaines particuliers. On retrouve 7 familles de protéines ABC chez l'homme. Parmi ces familles seulement trois comportent des membres dont l'expression est associée au phénomène de MDR (Haimeur *et al.*, 2004). Ceux-ci sont la Pgp (famille ABCB), le transporteur ABC le plus étudié, les MRPs (famille ABCC) et la protéine de résistance du cancer du sein (*Breast Cancer Resistance Protein*, BCRP, famille ABCG). Dans les études concernant la MXR, des orthologues de Pgp et de MRPs ont été trouvés chez de nombreux organismes (voir ci-dessous), leurs caractéristiques biochimiques sont donc présentées ci-dessous.

1.2.1 La glycoprotéine P

Transporteur ABC le plus étudié, la Pgp est la première protéine à avoir été reliée à la MDR (Bard, 2000). Cette protéine de masse apparente de 170 kDa chez l'homme est codée par le gène *mdr1* (aussi nommé ABCB1). Sa structure est caractéristique des transporteurs ABC, les quatre domaines se retrouvant sur une même chaîne peptidique (Fig. 1.3). Chacun des TMDs de la Pgp comporte six hélices transmembranaires où se retrouvent les résidus déterminant la spécificité de la protéine (Pérez-Tomás, 2006).

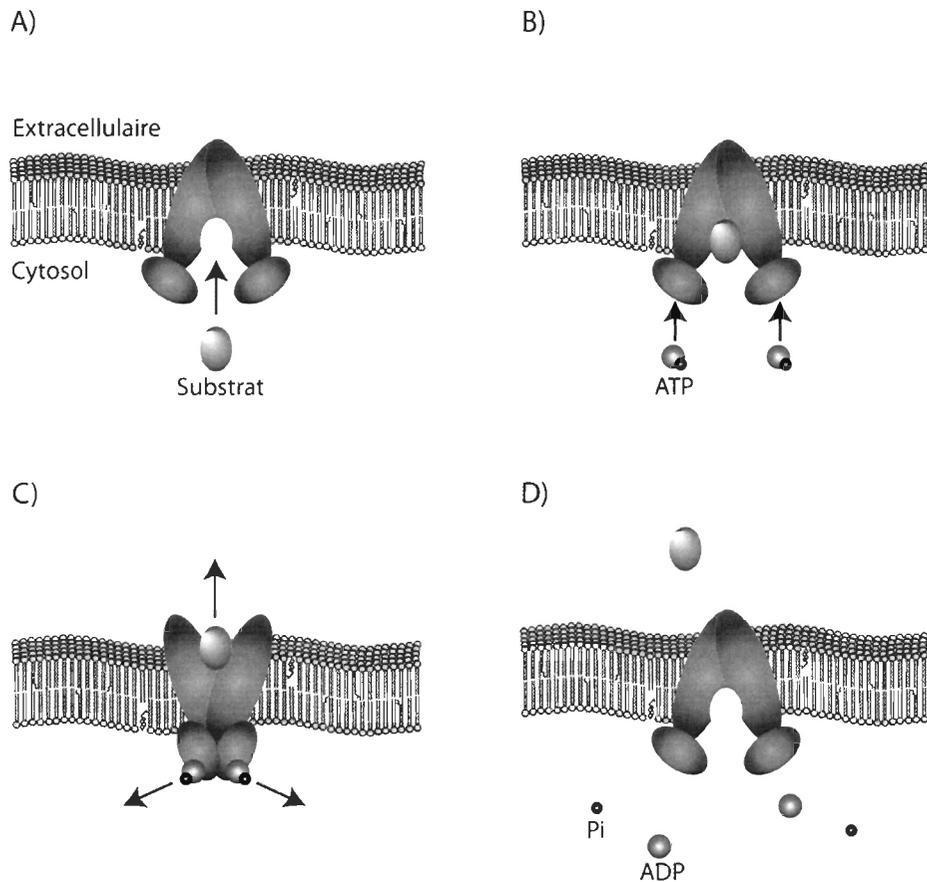


Figure 1.2 – Mécanisme d'action d'un exportateur ABC : (A) Dans sa conformation initiale, le pore est ouvert du côté cytoplasmique et le substrat peut s'y lier (B) Suite à la liaison du substrat, deux molécules d'ATP se lient aux domaines de liaison des nucléotides (C) La liaison de l'ATP entraîne un changement de conformation du transporteur, ouvrant le pore au milieu extracellulaire (D) Le substrat est relâché. L'hydrolyse de l'ATP et la relâche de l'ADP et du phosphate permettent le retour à la conformation initiale du récepteur.

Les caractéristiques qui font qu'un composé est transporté par la Pgp ne sont pas encore connues avec certitude (Pérez-Tomás, 2006). Le spectre de spécificité de la Pgp est large, ses substrats étant généralement des molécules modérément hydrophobes, cationiques ou neutres, présentant une structure planaire et contenant un atome d'azote basique (Zaja *et al.*, 2007). La Pgp est le principal transporteur responsable de l'export des composés n'ayant pas été modifiés par le métabolisme cellulaire.

1.2.2 Les protéines de résistance aux médicaments

Le deuxième transporteur ABC associé au phénomène de MDR a été nommé *Multidrug Resistance Protein* (Haimeur *et al.*, 2004). À cette première protéine MRP (ABCC1) identifiée se sont ajoutés d'autres peptides homologues qui forment la famille des protéines ABCC. Neuf des protéines de cette famille peuvent transporter des médicaments, bien qu'elles n'aient pas toutes été reliées à un phénotype MDR. Les protéines ABCC peuvent être séparées en deux groupes en fonction de leur structure. MRP1-3, MRP6 et MRP7 sont particulières pour des transporteurs ABC en ceci qu'elles ont un troisième TMD et peuvent contenir jusqu'à 17 hélices transmembranaires (Fig. 1.4). Pour leur part, MRP4, MRP5 ABCC11 et ABCC12 sont des transporteurs ABC de structure typique, ils contiennent 2 TMDs et un total de 12 hélices transmembranaires (Fig. 1.4). Tous ces peptides sont des transporteurs complets, leurs différents domaines étant codés par une même chaîne peptidique.

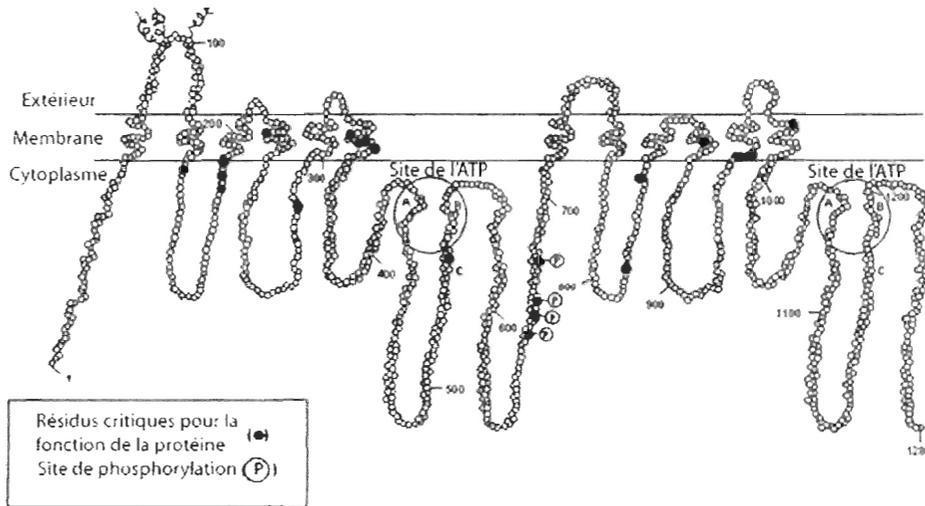


Figure 1.3 – Topologie de la Pgp humaine : Diagramme schématique de la Pgp humaine, incluant la localisation des résidus critiques à la fonction de la protéine et les sites de phosphorylation. Les sites de liaison de l'ATP sont encerclés (modifié de Pérez-Tomás, 2006).

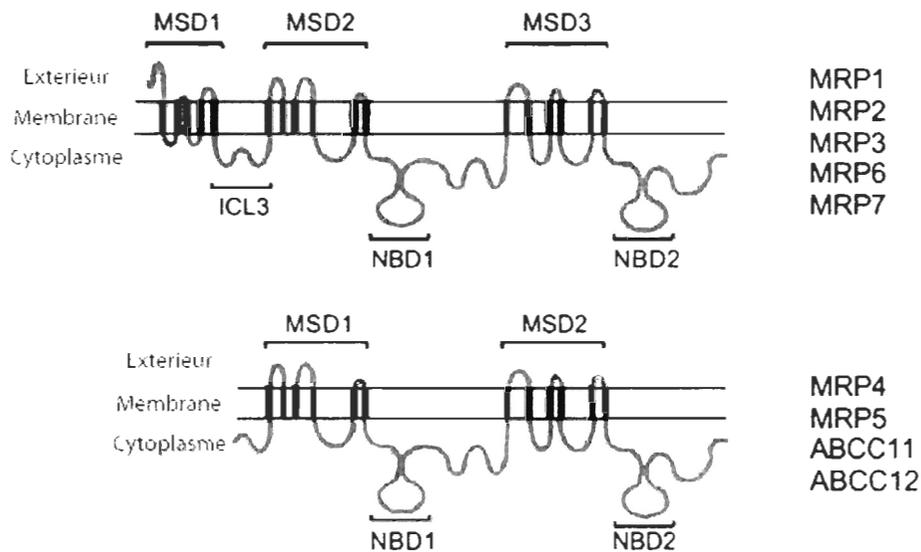


Figure 1.4 – Topologie des protéines de la famille ABCG : (modifié de Haimour *et al.*, 2004)

Au niveau de leur spécificité, les MRPs sont semblables à la Pgp en ceci qu'elles transportent une vaste gamme de composés, dont certains sont aussi des substrats de la Pgp. En général, les MRPs transportent des substrats plus hydrosolubles que la Pgp. Ceux-ci incluent les conjugués du glutathion, du glucuronate ou du sulfate (Haimeur *et al.*, 2004). Contrairement à la Pgp qui peut transporter des cations, les MRPs transportent des anions ou des molécules neutres (Zaja *et al.*, 2007).

1.2.3 Mesure de l'activité MXR

De façon à comprendre et démontrer l'importance de la MXR en écotoxicologie, il faut avoir accès à des techniques permettant de mesurer l'expression et l'activité des protéines responsables de ce phénomène. Le problème s'étant posé initialement pour le cas de la MDR, il existe de nombreuses techniques de mesure d'activité des transporteurs ABC.

Comme pour toute protéine, il est possible de détecter la présence des gènes de MXR par PCR ou RT-PCR en utilisant les séquences conservées comme amorce. Une autre technique grandement utilisée pour détecter ces protéines et suivre leur niveau d'expression est l'immunobuvardage de type Western. Des anticorps contre les régions conservées de la Pgp et des MRPs ont été développés pour les mammifères. La structure de ces protéines est suffisamment conservée pour que ces mêmes anticorps détectent les protéines de MXR chez des organismes évolutivement distants de l'homme comme des poissons et des mollusques (Bard, 2000).

Bien qu'il soit possible de suivre les changements du niveau de transcription ou de traduction des gènes de MXR par les techniques énumérées précédemment, ces changements peuvent ne pas être indicatifs de l'activité de la protéine, celle-ci étant soumise à des contrôles post-traductionnels (Ivanina et Sokolova, 2008). De plus, il est généralement plus utile d'étudier l'activité MXR que les protéines elles-mêmes, car c'est à ce niveau que les chimiosensibilisateurs agissent. En fait, les techniques de mesure de l'activité MXR sont basées sur l'utilisation de chimiosensibilisateurs. Le test le plus couramment utilisé est basé sur l'inhibition de la Pgp et des MRPs par le vérapamil (Ver), un inhibiteur compétitif (Smital *et al.*, 2004). Des cellules, tissus ou organismes sont incubés en présence d'un substrat connu de la MXR et en absence ou présence de Ver. Les substrats utilisés pour de tels tests sont fluorescents ou radiomarqués, permettant ainsi leur détection. Un effet du Ver sur l'accumulation ou la relâche du substrat est considéré comme indice de la présence d'un mécanisme de type MXR.

Au cours des dernières années, de nombreuses études visant à démontrer la présence de la MXR ou des changements de son activité ont utilisé le Ver et différentes rhodamines, une famille de substrats fluorescents de la MXR (ex.: McFadzen *et al.*, 2000 ; Minier *et al.*, 2002 ; Luckenbach *et al.*, 2004). Bien que le Ver et les rhodamines soient les composés les plus utilisés pour étudier l'activité MXR, de nombreux autres substrats et inhibiteurs existent, chacun étant plus ou moins spécifique à un transporteur ABC (Haimeur *et al.*, 2004 ; Pérez-Tomás, 2006 ; Zaja *et al.*, 2007). Une des faiblesses de l'utilisation d'un seul substrat et d'un seul inhibiteur est la possibilité de faux négatifs. La spécificité des protéines de MXR pouvant varier d'une espèce à l'autre (Zaja *et al.*, 2007) et même à

l'intérieur d'une même espèce (Haimeur *et al.*, 2004), l'inhibiteur ou le substrat utilisé peut ne pas être transporté par les protéines de MXR, donnant ainsi un faux négatif, l'inhibiteur n'affectant pas l'accumulation du substrat. De plus l'utilisation de seulement deux composés ne permet pas de caractériser, ne serait-ce que partiellement, les protéines présentes. L'utilisation de plusieurs paires d'inhibiteurs et de substrats permet par contre d'obtenir des informations sur les protéines présentes (ex.: Miller *et al.*, 1998).

La recherche d'inhibiteurs spécifiques aux protéines de MDR étant toujours très active, il n'est pas possible de faire ici une liste des composés interagissant avec celles-ci. Leur large spectre de spécificité les rend sensible à de très nombreux composés et leur permet de transporter une grande gamme de substrats. Les composés utilisés pour cette étude et leur spécificité sont présentés au Chapitre 2 (sous section Materials and Methods - MXR assay) de ce mémoire.

1.2.4 Répartition des protéines de MXR

L'origine de la superfamille des transporteurs ABC datant d'avant la séparation entre les eucaryotes et les procaryotes, les membres de cette superfamille se retrouvent chez tous les eucaryotes et la majorité des procaryotes (Annilo *et al.*, 2006). De plus, l'importance potentielle des protéines de MXR pour les fonctions physiologiques de base rend probable leur présence chez tous les organismes vivants. Par contre, les types de protéines présentes, leur distribution cellulaire et leur spécificité peuvent varier d'une espèce à l'autre. L'importance environnementale des chimiosensibilisateurs étant dépendante de ces facteurs,

la compréhension et la prédiction de leurs impacts dépendent d'une connaissance de la répartition des protéines de MXR chez les organismes marins.

Depuis le début des années 1990, bon nombre d'études ont démontré la présence de gènes ou d'ARNm codant des protéines de MXR et/ou d'une activité de type MXR chez différents organismes marins. Des organismes aussi variés que des éponges, des mollusques et des poissons présentent une activité MXR ou des protéines de MXR semblables à ce qui se retrouve chez l'homme (Bard, 2000). Par contre, très peu d'études ont porté sur la présence de la MXR chez les microalgues, malgré la grande importance de celles-ci pour le milieu marin.

1.3 Les microalgues en écotoxicologie

En tant que principal producteur primaire en milieu marin, le phytoplancton est à la base du réseau trophique marin. La production primaire et la structure de la communauté de microalgues sont donc des déterminants importants du fonctionnement de ces écosystèmes. De plus, les microalgues jouent un rôle primordial dans les grands cycles biogéochimiques, dont celui du carbone (Arrigo, 2005). Les stress affectant ces organismes peuvent donc se répercuter jusqu'aux niveaux trophiques supérieurs et avoir des impacts à l'échelle du globe. Cela est vrai même dans les cas où la production primaire totale n'est pas affectée, le changement de la structure de la communauté étant un meilleur indicateur de l'export de carbone et de la structure des niveaux trophiques supérieurs que la production primaire (Boyd et Newton, 1999).

De nombreux facteurs physiques influencent la structure de la communauté phytoplanctonique. Parmi ceux-ci, la température joue un rôle particulièrement important vu son influence sur le couvert de glace et la profondeur de la zone de mélange (Doney, 2006) de même que les inquiétudes grandissantes vis-à-vis des changements climatiques. En plus des stress physiques auxquels il est exposé, le phytoplancton, comme tous les organismes marins, peut être affecté par différents produits chimiques. Cela est particulièrement préoccupant en milieux côtier et estuarien où sont rejetés de nombreux polluants anthropiques. La résistance aux contaminants variant d'une espèce à l'autre, la présence de toxiques dans le milieu modifiera la composition de la communauté, favorisant la présence d'espèces résistantes (Petersen et Gustavson, 1998). La présence de contaminants affectera donc différemment les sous-portions de la communauté, entraînant possiblement la transition d'un réseau herbivore vers un réseau microbien (Pelletier *et al.*, 2006).

1.3.1 Présence de la MXR chez les microalgues marines

Bien que l'effet de différents contaminants sur la croissance de monocultures d'algues ou sur des communautés aient été étudiés, il n'y a encore que très peu d'études concernant le phénomène de MXR chez les microalgues. Downs et Downs (2007) ont démontré la présence d'une protéine d'environ 200 kDa qui est immunologiquement similaire aux Pgp de mammifère et de plante chez la zooxanthelle du corail *Madracis mirabilis*. Ils ont utilisé l'expression de cette protéine comme biomarqueur de réponse aux xénobiotiques suite à l'exposition du corail à l'Irgarol 1051, un agent anti-salissure. La seule étude

démontrant directement la présence d'une activité de type MXR chez des microalgues a été effectuée chez la diatomée *Thalassiosira rotula* par Scherer *et al.* (2008). Ils ont utilisé des inhibiteurs de MXR pour favoriser l'entrée d'une sonde fluorescente sensible au calcium, l'esther d'acétométhyle de Fura 2. Des trois inhibiteurs qu'ils ont testés, seul le Mk571 a permis d'augmenter l'entrée de la sonde. Le Mk571 étant un inhibiteur spécifique des MRPs, cela indique la présence d'une activité MRP chez cette diatomée (Haimeur *et al.*, 2004 ; Scherer *et al.*, 2008). En plus de ces études démontrant la présence de protéines ou d'activité MXR, il existe des études démontrant la présence de gènes ou d'ARNm présentant des homologies avec différentes protéines associées à la MXR (Okamoto et Hastings, 2003 ; Mock *et al.*, 2005). Par contre, celles-ci ne s'intéressaient pas au phénomène directement et n'ont pas recherché la présence des protéines ou de leur activité.

Malgré le fait que les études actuelles ne permettent pas de le démontrer, il est tout à fait possible que les protéines de MXR jouent un rôle primordial chez les microalgues, leur permettant de résister à des xénobiotiques d'origine anthropique ou naturelle. L'activité de ces protéines étant variable au sein d'une même espèce (Haimeur *et al.*, 2004), leur activité, et donc leur spécificité, sont probablement variables entre les différentes espèces d'algues. Ces différences au niveau des protéines peuvent mener à des variations interspécifiques de la résistance vis-à-vis des xénobiotiques. L'impact final de telles différences serait un changement de la biodiversité des microalgues des suites d'un stress toxique, les espèces ayant une activité MXR suffisante pour expulser le toxique étant favorisées au détriment de celles subissant pleinement l'effet du toxique. En plus de ces facteurs propres aux

organismes, les caractéristiques du milieu pourraient affecter le mécanisme de MXR des microalgues. Il a été démontré que l'activité MXR de gammaridés d'eau douce peut être modulée par la matière organique dissoute (MOD) d'origine naturelle (Timofeyev *et al.*, 2007). Ainsi, l'origine et la concentration de la MOD pourraient affecter la toxicité de composés organiques. L'importance de la MOD pour la toxicité des métaux est déjà bien connue, la MOD pouvant chélater les métaux et ainsi diminuer leur accessibilité. Par contre, les résultats de Timofeyev *et al.* (2007) montrent qu'il est possible que la matière organique augmente la toxicité de différents composés en inhibant la première ligne de défense contre les toxiques qu'est la MXR.

1.4 Objectifs

Bien qu'il soit indéniable à la lumière des études citées ci-haut que les protéines de MXR sont présentes chez certaines microalgues marines, la spécificité de ces protéines n'a été caractérisée en détail dans aucune des études et une seule d'entre elles a démontré la présence d'une activité MXR. La présente étude vise donc à ajouter aux connaissances actuelles en démontrant la présence d'une activité de type MXR chez trois espèces de microalgues marines. Ces trois espèces sont *Tetraselmis suecica*, un haptophyte, *Isochrysis galbana*, un chlorophyte, et *Prorocentrum cf micans*, un dinoflagellé présent dans l'estuaire du Saint-Laurent. Ces espèces sont distantes évolutivement, elles permettent donc de déterminer si l'activité MXR est répandue et à quel point sa spécificité peut varier d'une espèce à l'autre.

Chapitre 2

Evidence of a multixenobiotic resistance mechanism in marine microalgae

2.1 Introduction

Detoxification mechanisms in aquatic organisms are of primary importance in ecotoxicology as they influence the bioaccumulation, toxicity and fate of toxicants. Moreover, proteins associated to detoxification pathways are often used as biomarkers and they represent potential sites for interaction between toxicants. Among these, the proteins responsible for the MultiXenobiotic Resistance (MXR) phenomenon are of particular interest as they extrude a wide spectrum of modified and unmodified toxicants out of cells

(Bard, 2000 ; Smital *et al.*, 2004). Furthermore, their influence on the accumulation of compounds within cells and organisms is sensitive to the presence of various pollutants that can inhibit or saturate their activity, making them a crucial site for interactions (Kurelec, 1992 ; Luckenbach *et al.*, 2004 ; Smital *et al.*, 2004).

MXR proteins were initially discovered in tumor cells that developed resistance to a wide range of cytotoxic, structurally unrelated, drugs after selection for resistance to a single compound (Pérez-Tomás, 2006). This cellular mechanism, known as MultiDrug Resistance (MDR) in the biomedical field, was initially associated with the expression of the P-glycoprotein (Pgp, ABCB1) (Zaja *et al.*, 2007). Eight different proteins linked to MDR in humans are part of the ATP-binding cassette (ABC) superfamily, Pgp and the various Multidrug Resistance Proteins (MRPs, members of the ABCC family) being the most important in drug resistance and the most studied (Pérez-Tomás, 2006). All these membrane spanning-proteins are active molecular transporters that, using the energy from ATP hydrolysis, extrude compounds from the cytosol. They contain two nucleotide-binding domains and two or three membrane-spanning domains whose inner leaflet moiety is primordial for substrate recognition (Haimeur *et al.*, 2004 ; Pérez-Tomás, 2006). Although there is important overlap between the specificity spectrum of Pgp and MRPs, Pgp is usually considered as the main transporter for unmodified compounds, transporting moderately hydrophobic, cationic or neutral planar molecules (Zaja *et al.*, 2007). Conjugates of glutathione, glucuronate or sulfate are mostly transported by MRPs, which are more specific to neutral or anionic compounds (Haimeur *et al.*, 2004).

Even though most studies of ABC transporters are currently conducted on humans and model mammals, the presence of MXR activity (proteins or genes) has been extensively studied in fish, bivalves, worms and sponges since early studies on MDR in aquatic organisms and the introduction of MXR to ecotoxicology in the early 1990s (Kurelec, 1992 ; Bard, 2000). Surprisingly, there are only few studies on the presence and characteristics of the MXR mechanism in microalgae, despite their major role in the marine food web and direct exposition to waterborne pollutants. It has been recently shown that the endosymbiotic dinoflagellate (zooxanthella) from the coral *Madracis mirabilis* presented a ca. 200 kDa protein reacting to polyclonal antibodies generated against a conserved domain of mammalian and plant Pgp and to a conserved domain found only in plant Pgp (Downs et Downs, 2007). Authors used this protein as a biomarker and showed an increase of its expression by exposition of the coral to the antifouling agent Irgarol 1051 (Downs et Downs, 2007). In an attempt to increase the permeability of diatom *Thalassiosira rotula* cells to the fluorescent dye Fura 2 acetomethylester (Fura 2 AM), Scherer *et al.* (2008) studied the effect of MXR inhibitors Mk571, verapamil and probenecid P36400 on the intracellular accumulation of Fura 2 AM. At concentrations higher than 50 μ M, Mk571 enabled staining of cells with Fura 2 AM while staining with Fura 2 AM alone or in presence of the other inhibitors tested could not be achieved. These results indicate the presence of a MRP-like activity in *T. rotula* as Mk571 is a specific MRP inhibitor (Haimeur *et al.*, 2004 ; Scherer *et al.*, 2008). Finally, genes or mRNA of ABC transporters and MXR proteins were identified in some marine microalgae, although the presence of MXR proteins or activity in these organisms has not been investigated (Okamoto et Hastings, 2003 ;

Mock *et al.*, 2005). Little is yet known about the capacity of marine phytoplankton cells to excrete (or block the entrance) of dissolved xenobiotics. There is a need to develop a better understanding of detoxification mechanisms in these unicellular organisms, and especially exploring their first line of defence represented by the MXR phenomenon. This study investigates the presence of a MXR-like mechanism in three marine microalgae and characterizes this activity using model fluorescent substrates and inhibitors.

2.2 Materials and methods

2.2.1 Reagents

Cyclosporine A (CycA), rhodamine B (RhoB), verapamil (Ver) and Guillard's f/2-Si culture medium were obtained from Sigma-Aldrich Canada (Ontario, Canada). Calcein-AM (CAM) was obtained from VWR Canlab (Quebec, Canada). Mk571 was obtained from Cayman Chemicals (Michigan, USA). CAM and Mk571 stock solutions were prepared in DMSO, all other stock solutions were prepared in distilled water. Final DMSO concentrations never exceeded 0.3 %. Sea water was obtained at the ISMER's aquaculture laboratory on the South shore of the St-Lawrence Estuary, near Rimouski, Quebec, Canada. Water was pumped 400 m away from the shore at a depth of ca. 7 m.

2.2.2 Algal cultures

Unialgal cultures of the haptophyte *Isochrysis galbana* (CCMP), the chlorophyte *Tetraselmis suecica* (UTEX), and the dinoflagellate *Prorocentrum cf micans* (isolated from the St. Lawrence Estuary by O. Casas-Monroy, Institut des Sciences de la Mer, Université du Québec à Rimouski, Canada) were grown in sterile Guillard's f/2-Si medium prepared from 0.2 µm filtered sea water (Andersen, 2005). Cultures were maintained in 25 mL screw cap glass culture tubes at 18 °C under 4000 lux illumination supplied by white fluorescent lamps with a 14h light : 10 h dark photoperiod. Cells in exponential growth phase were used for all assays.

2.2.3 MXR assay

Determination of MXR activity is based on the use of model MXR inhibitors and substrates. As the activity of MXR/MDR proteins is well conserved throughout evolution, the model compounds enable detection and a partial characterisation of MXR activity. It is possible to identify the transporters present in a given organism or cell type by using substrates and inhibitors that are specific to different MXR proteins (Bard, 2000). In this study, we used three inhibitors : Ver, Mk571 and CycA; and two substrates : RhoB and CAM. Ver is known to inhibit both Pgp and MRPs (Zaja *et al.*, 2007), while Mk571 is considered to be specific to the MRP family of transporters (Haimeur *et al.*, 2004). CycA is often considered specific to Pgp, but is also known to inhibit MRPs, though with a lower affinity (Zaja *et al.*, 2007). RhoB is considered to be transported by Pgp only

(Roepke *et al.*, 2006), while CAM is transported both by Pgp and MRPs although its hydrolysis product, the fluorescent calcein, is transported out of the cytoplasm by MRPs only (Essodaïgui *et al.*, 1998).

In the present study, all aliquots for a given assay were taken from a single culture tube in exponential growth. Aliquots were kept in polypropylene disposable culture tubes at temperature and light conditions similar to growth conditions. A MXR substrate, either RhoB or CAM, was immediately added to a concentration of 1 μM . Cells were either exposed to substrates alone or in addition to a MXR inhibitor. Inhibitor concentrations were Ver (10 μM), Mk571 (10 μM) and CycA (2.5 μM) for *I. galbana* and *T. suecica* and Ver (5 μM), Mk571 (10 μM) and CycA (2.5 μM) for *P. micans*. DMSO concentration was adjusted to 0.3 % v/v in each tube. Cells were incubated for one hour before measurement of single cell fluorescence by flow cytometry (FCM). Each treatment (substrate \pm inhibitor) was repeated twice or thrice per assay. Two (*I. galbana*) or three (*P. micans* and *T. suecica*) independent assays were made using different culture tubes in order to control for variability between cultures.

2.2.4 Flow cytometry

After the one-hour incubation with MXR substrates \pm inhibitors, intracellular fluorescence was measured by FCM. Two (2) μL of a solution of 1.9 μm Fluoresbrite beads (Polysciences, Pennsylvania, USA) were added to each tube as an internal standard. Cells were analyzed with an Epics Altra® flow cytometer (Beckman Coulter) fitted with a

488 nm laser operated at 15 mW. The fluorescence of MXR substrates was measured at 525 ± 20 nm for CAM and 575 ± 20 nm for RhoB. Chlorophyll (chl) fluorescence was measured at 675 ± 5 nm. The cytograms obtained were analyzed using Expo32 v1.2b software (Beckman Coulter). Forward scatter (FS) vs. chl fluorescence plots were used to identify microalgal cells. The average fluorescence of the cells was only measured for cells whose FS and chl fluorescence were typical of healthy cells in exponential growth phase. Because the microalgae showed background level of autofluorescence at 525 and 575 nm, the CAM and RhoB fluorescence were corrected by subtracting this natural fluorescence. Fluorescence intensities are expressed relative to that of the Fluoresbrite beads.

2.2.5 Toxicity of compounds used

Changes in cellular characteristics detected by FCM were used as proxies of toxicity. In preliminary tests, Ver induced a reduction of side scatter (SS) in *I. galbana* at concentrations higher than 20 μ M and a modification of the chl fluorescence and FS in *P. micans* at concentrations higher than 10 μ M. CycA also showed signs of toxicity at concentrations higher than 5 μ M in *P. micans*. The inhibitor and substrate concentrations used for the essays presented thereafter had no effect on FS, SS or chl fluorescence.

2.2.6 Statistical analysis

All data were analyzed by two-way ANOVA using the SYSTAT 12 software (Systat Software Inc, California, USA). Homogeneity of variances was tested using one-way

ANOVA on the absolute value of residuals. Normality of residuals was tested using the Lilliefors test. If required, data were transformed to natural logarithm in order to meet the assumptions for the test. All data are presented as mean \pm SD of fluorescence relative to control conditions (substrate alone).

2.3 Results

2.3.1 *Prorocentrum cf micans*

In the marine dinoflagellate *P. micans*, Ver induced a significant decrease of nearly 30 % (71 ± 16 % of control, $p < 0.001$) in the accumulation of RhoB but more than quadrupled CAM accumulation (480 ± 167 %, $p < 0.001$) (Fig. 1). The accumulation of both RhoB and CAM was significantly increased by Mk571, the fluorescence reaching 136 ± 30 % ($p < 0.001$) and 313 ± 167 % ($p < 0.001$) of controls, respectively (Fig. 1). CycA did not induce a significant increase in RhoB accumulation (109 ± 21 %, $p > 0.05$) and only a relatively small increase in CAM accumulation (159 ± 49 %, $p < 0.01$)

2.3.2 *Isochrysis galbana*

CAM fluorescence could not be detected in *I. galbana* cells, either with CAM alone or when using inhibitors. RhoB accumulation was increased by two of the inhibitors tested (Fig. 2). The largest increase in fluorescence was induced by CycA (200 ± 21 %, $p < 0.001$),

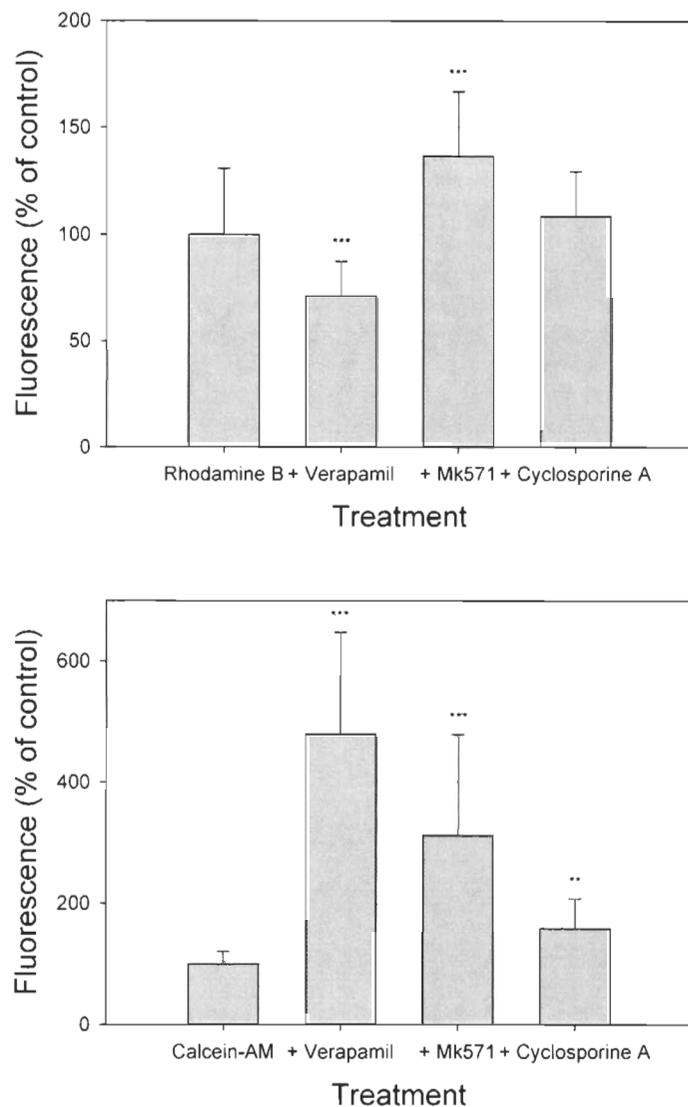


Figure 2.1 – Cells were incubated in 1 μ M substrate alone or in combination with Verapamil (5 μ M), Mk571 (10 μ M) or Cyclosporin A (1 μ M). Controls are treatments without inhibitors. All values are mean \pm SD of three separate assays ($n = 3$) where each treatment was done in duplicate or triplicate. (A) Relative Rhodamine B accumulation. (B) Relative Calcein-AM accumulation. (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ when compared to control; two-way ANOVA, Tukey post-hoc on treatments).

followed by Mk571 ($132 \pm 6 \%$, $p < 0.01$). Ver did not induce a significant increase in RhoB accumulation ($111 \pm 7 \%$, $p > 0.05$).

2.3.3 *Tetraselmis suecica*

Figure 3 presents the results of the MXR assay using the marine chlorophyte *T. suecica*. In contrast to what was observed for *P. micans* and *I. galbana*, there was a significant interaction between assays and treatments when using RhoB as a substrate for *T. suecica* (assay x treatment interaction, $p < 0.05$). In all assays, the three inhibitors increased RhoB accumulation although not always in a statistically significant way. The variation in the effect was due to the variability in the relative fluorescence intensity and not variations in the general direction (increase or decrease) of the effect.

When pooling results of the three assays together, RhoB accumulation reached $112 \pm 8 \%$, $108 \pm 4 \%$ and $118 \pm 8 \%$ of control when cells were exposed to Ver, Mk571 or CycA, respectively. The effect of CycA was the most important and was significant in 2 assays (both with $p < 0.01$) while Ver significantly increased fluorescence in one assay and no statistically significant effect of Mk571 was observed. The effects of inhibitors on CAM accumulation were of a greater magnitude, although statistical significance was reached only with Mk571. CAM accumulation was increased by all inhibitors to $223 \pm 132 \%$ ($p > 0.05$), 282 ± 83 ($p < 0.01$) and $177 \pm 90 \%$ ($p > 0.05$) of control values for Ver, Mk571 and CycA, respectively.

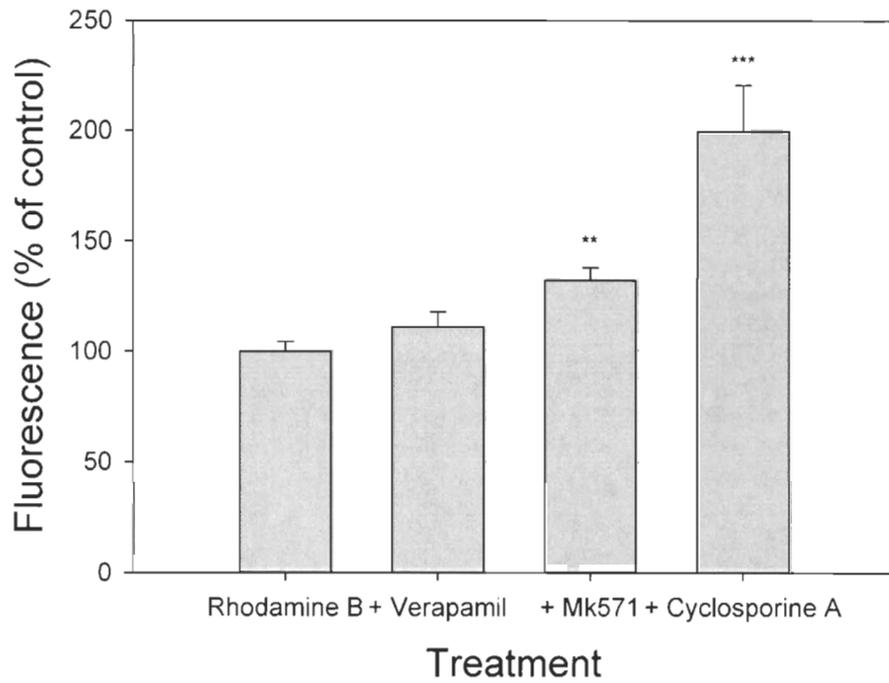


Figure 2.2 – Cells were incubated in 1 μ M Rhodamine B alone or in combination with Verapamil (10 μ M), Mk571 (10 μ M) or Cyclosporin A (2.5 μ M). Controls are treatments without inhibitors. Values are mean \pm SD of two separate assays (n = 2) where each treatment was made in triplicate (Two-way ANOVA, Tukey post-hoc on tubes x treatments). (** p < 0.01; *** p < 0.001 when compared to control; two-way ANOVA, Tukey post-hoc on treatments).

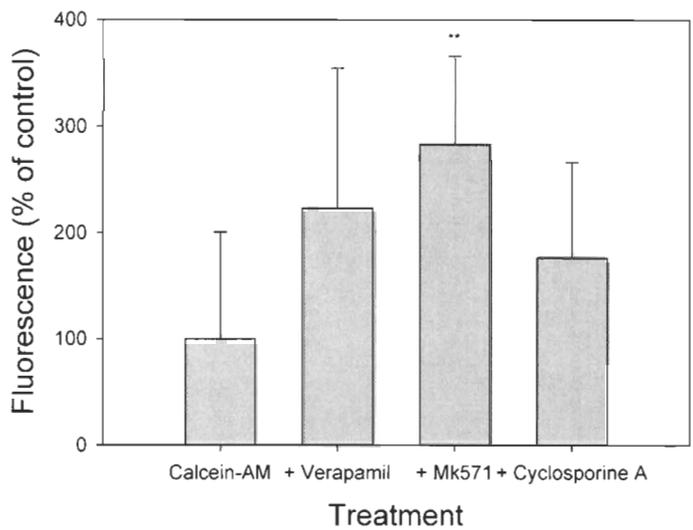
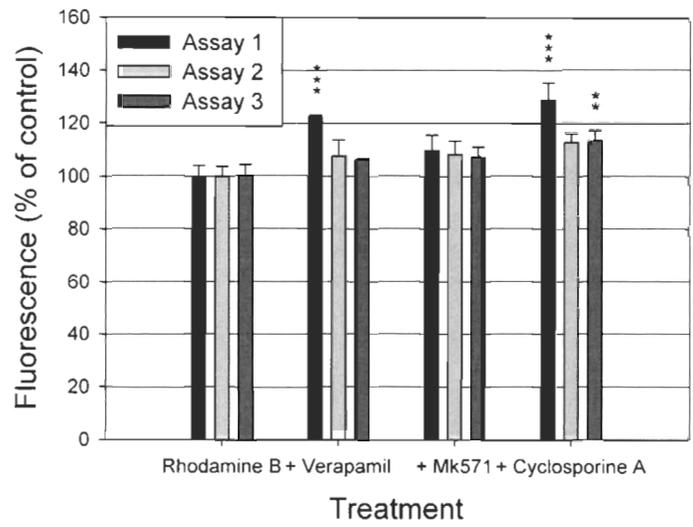


Figure 2.3 – Cells were incubated in 1 μ M substrate alone or in combination with Verapamil (10 μ M), Mk571 (10 μ M) or Cyclosporin A (2.5 μ M). Controls are treatments without inhibitors. (A) Relative Rhodamine B accumulation. Three separate assays were done ($n = 3$), values are mean \pm SD of triplicates of each treatment (two-way ANOVA, Tukey post-hoc on assay x treatments) (B) Relative Calcein-AM accumulation. Values are mean \pm SD of three separate assays ($n = 3$) where each treatment was made in triplicate (two-way ANOVA, Tukey post-hoc on treatments) (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ when compared to control).

2.4 Discussion

Microalgae being unicellular organisms, they are directly exposed to contaminants in the aquatic environment and are unable to flee contamination. Their detoxification mechanisms are thus of great importance for their survival in polluted areas. Since MXR proteins represent a first line of defence against toxicants (Kurelec, 1992), they possibly play a major role in protecting microalgae from natural and anthropogenic organic compounds. Using model MXR substrates and inhibitors to detect and characterize MXR activity, this study shows that a MXR-like mechanism is present in all three newly studied microalgae species, but also indicates that the effect of the inhibitors varies between species, suggesting specific differences in the expressed MXR proteins or in their specificity.

In addition to the general demonstration that a MXR-like mechanism is present in *T. suecica*, *I. galbana* and *P. micans* cells, the present results also give insight about the type of transporters expressed in *T. suecica* and *P. micans* cells. In both species, Pgp- and MRP-like activities were detected. Moreover, Pgp in *P. micans* seems to be expressed in an intracellular compartment, as inhibition of its activity by Ver leads to a decrease in RhoB accumulation. Such information was not available from previous studies, as only one substrate was used or MXR activity was not assessed (Downs et Downs, 2007 ; Scherer *et al.*, 2008). Results for each species are detailed below.

2.4.1 *Prorocentrum cf micans*

The accumulation of both RhoB and CAM in the dinoflagellate *P. micans* was significantly affected by Ver and Mk571 while CycA increased the accumulation of CAM only. These results demonstrate the presence of a MXR-like export mechanism that is sensitive to the model substrates and inhibitors of ABC transporters. Furthermore, the increase in CAM accumulation induced by Mk571 is also indicative of MRP-like activity as Mk571 is known to specifically inhibit transporters of the MRP (ABCC) family (Haimeur *et al.*, 2004). The fact that Mk571 also increased the intracellular accumulation of RhoB, which is usually considered as a specific Pgp substrate, could indicate that Mk571 is not specific of MRPs in this species or that RhoB is also a substrate of MRPs. This second option seems more likely as there is evidence that many rhodamine dyes are substrates of both MRP1 and Pgp (Saengkae *et al.*, 2003). Considering the structural similarity of RhoB with other rhodamine dyes and the wide specificity spectrum of ABC transporters it seems likely that RhoB is a MRP substrate. In addition to the presence of a MRP-like activity in *P. micans*, the presence of another transporter is shown by the influence of Ver on substrate accumulation. Ver decreased RhoB accumulation and strongly increased CAM accumulation. This behaviour seems an indication of the presence of different transporters located in different cellular compartments. It is known in animal cells that ABC transporters can be located on intracellular compartments and that their activity can lead to the accumulation of substrates inside these compartments (Svensson *et al.*, 2003). Inhibition of a transporter located on intracellular compartments by Ver could lead to the

observed decrease in RhoB accumulation. Because Ver and RhoB generally have higher affinities for Pgp than for other transporters, these results suggest the presence of Pgp-like transporters in this microalga. Further assays are required to confirm the presence of Pgp-like transporter in *P. micans* but the effects observed for Ver make it likely that a number of transporters are present in this species.

The lack of a strong effect induced by CycA is surprising, as in many organisms and in the other species used in this study, CycA is generally a strong inhibitor of Pgp activity and even of MRP (Zaja *et al.*, 2007). This lack of CycA inhibition may be due to the fact that relatively low concentration (2.5 μM) was used because CycA caused modifications of cell size at higher concentrations as measured by FCM, suggesting some cellular toxicity (data not shown).

2.4.2 *Isochrysis galbana*

In *I. galbana* cells, the presence of a MXR-like mechanism is suggested by the significant increase in RhoB accumulation induced by both Mk571 and CycA. However the characterization of the transporters was not possible since CAM was not used with this species as its fluorescence could not be detected. The small size of *I. galbana* cells (length ca. 4-6 μm) was probably responsible for this lack of signal since the fluorescence intensity is related to the quantity of dye in the cytosol, a function of cell size. This relationship with cell size was observed for *P. micans* cells (length 30-50 μm) where fluorescence intensity was stronger than in *T. suecica* cells (length ca. 12-15 μm) for both substrates.

2.4.3 *Tetraselmis suecica*

A statistically significant effect of the assay was observed for *T. suecica* when RhoB was used as a substrate in contrast to what was observed for the two other species. As the variability is related to fluorescence intensity and not the direction of the inhibitors effect, it is likely a result of variability of MXR activity between culture tubes. This variability may stem from differences in the age of the cultures used (even though all were in exponential growth phase) or in the time of the day (and thus photoperiod) the assay were made, as assay 1 was conducted during the morning and assays 2 and 3 were conducted in the afternoon. High variability in RhoB was also observed in the other species used in this study, although no statistically significant interaction was observed.

When results of the three assays using RhoB as a substrate are pooled and when considering CAM accumulation, the present results give indications of the presence of a MXR-like mechanism in *T. suecica*. Similarly to *P. micans*, this species seems to express two different transporters. In this study, CycA was a more potent inhibitor of RhoB export than of CAM export. Both CycA and RhoB being more specific to Pgp (Zaja *et al.*, 2007), this is indicative of a Pgp-like activity in *T. suecica*. On the other hand, the strong inhibition of CAM export by Mk571 compared to its weak, non significant, effect on RhoB accumulation indicates the presence of a transporter sensitive to Mk571 that does not transport RhoB efficiently. As Mk571 specifically inhibits transporters of the MRP family, this result strongly suggests the presence of a MRP-like activity in *T. suecica*. Even though CAM is a known substrate of Pgp and MRPs, its hydrolysis

product, calcein, is only transported by MRPs (Essodaigui *et al.*, 1998). The absence of a significant effect of CycA on CAM accumulation could thus be explained by the presence of a CycA-insensitive transporter that efficiently transports CAM and calcein even when the CycA-sensitive transporter is inhibited. Finally, the effects of Ver seem to confirm the presence of a MXR-like activity, as this inhibitor increased RhoB accumulation in all assays (significant effect in one assay) and tended to increase CAM accumulation (doubling, the effect was not statistically significant).

2.5 Conclusion

This study demonstrates the presence of a MXR-like export mechanism in three evolutionarily distant marine microalgae, *Prorocentrum cf micans*, *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis suecica*. This finding adds to the few studies of MXR in marine microalgae and reinforces the idea that MDR- or MXR-like mechanisms are present in all living organisms. As unicellular organisms evolving in coastal waters, microalgae are highly dependent on detoxification mechanisms such as MXR and are thus potentially sensitive to MXR inhibitors. As a consequence, it is of great interest to study the impact of known MXR inhibitors, such as the widespread musk compounds (Luckenbach *et al.*, 2004 ; Smital *et al.*, 2004), on natural algae populations exposed to pollutants. This would be an important step in the demonstration of the environmental importance of MXR inhibitors in these organisms at the base of the food web. Even though this study does not give direct information about the molecular identity of the expressed transporters, it clearly

shows that MXR is present in algae and that differences in sensibility to inhibitors exist between species.

Chapitre 3

Discussion

Les mécanismes biochimiques de résistance aux toxiques sont essentiels pour assurer l'homéostasie des organismes vivants, et ceci est particulièrement vrai depuis l'avènement de l'industrie chimique. Pour les organismes unicellulaires comme les microalgues qui sont directement exposés à leur milieu, ils représentent leur seul mécanisme de défense, les réactions comportementales ne pouvant pas leur permettre d'échapper aux stress toxiques. Chez de tels organismes, la MXR est particulièrement importante étant donné son rôle de première ligne de défense contre les contaminants. Notre étude démontre la présence d'un mécanisme semblable à la MXR chez trois espèces de microalgues marines (*P. micans*, *I. galbana* et *T. suecica*) en utilisant des substrats et inhibiteurs de MXR modèles. Le haut niveau de conservation des protéines de MXR permet d'utiliser les mêmes composés pour détecter leur activité chez tous les organismes vivants, des bactéries aux mammifères (Bard, 2000). Ainsi, la présente étude permet même de déceler la présence de deux activités

de transport chez *P. micans* et *T. suecica*, chacune des espèces présentant une activité semblable à celle de la Pgp et une semblable à celle des MRPs.

Les résultats obtenus montrent que l'activité MXR est variable d'un organisme à l'autre, les concentrations optimales d'inhibiteurs n'étant pas les mêmes selon les espèces. Le Ver diminue même l'accumulation de RhoB chez *P. micans* alors qu'il augmente (significativement ou non) l'accumulation de CAM chez la même espèce et celle des deux substrats chez les deux autres espèces étudiées. La présence d'une telle variabilité n'est pas surprenante, car bien que l'activité des protéines de MXR soit étonnamment conservée, elle peut être modifiée par des substitutions d'un seul acide aminé et la présence de différents allèles pour les protéines de MXR au sein d'une même espèce est connue (Haimeur *et al.*, 2004). C'est la présence de cette variabilité qui est à la base des différences de résistance aux contaminants chez les organismes et qui va être l'une des causes des changements dans les communautés phytoplanctoniques discutées précédemment (voir Chapitre 1).

3.1 *Prorocentrum cf micans*

La présence d'un mécanisme de type MXR chez le dinoflagellé *P. micans* est démontrée par l'impact qu'ont les trois inhibiteurs utilisés sur l'accumulation des substrats. En effet, le Ver et le Mk571 augmentent significativement l'accumulation des deux substrats alors que la CycA augmente significativement l'accumulation de CAM. De plus, l'augmentation de l'accumulation de CAM induite par le Mk571 indique la présence d'un transporteur

de type MRP, le Mk571 inhibant spécifiquement les transporteurs MRP (famille ABCC) (Haimeur *et al.*, 2004). L'augmentation de l'accumulation de RhoB par le Mk571 peut sembler contradictoire, la RhoB étant considérée comme un substrat spécifique des Pgp (Roepke *et al.*, 2006). Cela pourrait indiquer que le Mk571 n'est pas spécifique des MRP chez cette espèce ou que la RhoB n'est pas transporté exclusivement par la Pgp, le Mk571 agissant sur le transport de la RhoB par une protéine de type MRP. Cette option semble plus probable car la RhoB est structurellement similaire aux autres rhodamines (rhodamine 123 et 6G par exemple) qui sont reconnues pour être transportées tant par la Pgp que par la MRP1 (Saengkae *et al.*, 2003). Bien qu'il n'y ait pas d'étude sur le transport de la RhoB par les MRP, sa similarité avec les autres rhodamines en fait un substrat potentiel, tout particulièrement lorsque le large spectre de spécificité des protéines de MXR est considéré. En plus de la présence d'un transporteur MRP, l'action du Ver laisse présager la présence d'un deuxième transporteur, semblable à la Pgp, qui serait localisé dans la membrane d'une organelle. En effet, la diminution de l'accumulation de RhoB par le Ver peut être expliquée par la présence d'un transporteur situé au niveau d'un compartiment intracellulaire. L'activité de ce transporteur menant à la séquestration des substrats dans une organelle, son inhibition va diminuer l'accumulation intracellulaire des composés qu'il transporte. La localisation intracellulaire de protéines de MXR ayant déjà été répertoriée (Svensson *et al.*, 2003), les résultats obtenus avec le Ver indiquent que cela pourrait être le cas chez *P. micans*. La diminution étant observée avec l'utilisation de RhoB et de Ver, il s'agit possiblement d'une protéine semblable à la Pgp, ces deux composés ayant généralement une plus grande affinité pour cette protéine. Par contre, notre étude ne permet pas

de conclure avec certitude de la présence d'une Pgp chez *P. micans*, le Ver étant reconnu pour inhiber d'autres transporteurs et la spécificité de la RhoB comme substrat de la Pgp pouvant être mise en doute comme cela a été fait ci-haut.

Le faible effet de la CycA sur l'accumulation des substrats qui est observé chez cette espèce est surprenant, ce composé étant un inhibiteur très efficace de la Pgp, ayant même une affinité pour les MRPs, chez de nombreuses espèces dont les deux autres utilisés dans cette étude (Zaja *et al.*, 2007). Cela peut être expliqué par la faible concentration utilisée (2.5 μM) qui n'est probablement pas optimale pour étudier l'activité MXR chez cet organisme. Une concentration plus élevée n'a pu être utilisée, car l'utilisation de concentrations supérieures à 5 μM entraîne des modifications de la taille des cellules tel qu'observé en FCM, ce qui suggère que la CycA est toxique pour ces cellules à ces concentrations (données non présentées).

3.2 *Isochrysis galbana*

Chez *I. galbana*, l'augmentation de l'accumulation de RhoB en présence de CycA et de Mk571 démontre la présence d'une activité MXR. Par contre, ces résultats ne permettent pas de déterminer le type de protéine présente, cette détermination requérant l'utilisation de plus d'un substrat. Cela n'a pu être fait avec *I. galbana* car la fluorescence de la CAM n'a pas été détectée dans les expériences utilisant cette espèce. L'intensité de fluorescence étant dépendante de la quantité de fluorophore présente dans le cytoplasme des cellules, et donc de la taille des cellules, il est probable que cette absence de signal soit due à la faible

taille des cellules de *I. galbana* (4-6 μm). Cet impact de la taille cellulaire est corroboré par le fait que l'intensité de fluorescence était plus grande pour *P. micans* que pour *T. suecica* (données non présentées), les cellules de *P. micans* étant plus grosses (longueur de 30-50 μm) que celles de *T. suecica* (longueur de 12-15 μm) et beaucoup plus grosses que celles de *I. galbana*.

3.3 *Tetraselmis suecica*

Chez le chlorophyte *T. suecica*, l'effet des inhibiteurs sur l'accumulation de RhoB est plus variable que ce qui a été obtenu pour les autres espèces et même pour la CAM avec la même espèce. Cela se reflète par la présence d'une interaction statistiquement significative entre l'expérience et l'effet de l'inhibiteur (interaction expérience x inhibiteur, $p < 0.05$). Cette variabilité concerne seulement l'intensité de l'effet des inhibiteurs, car la direction de l'effet ou de la tendance (augmentation dans tous les cas) est inchangée d'une expérience à l'autre. La présente étude ne permet pas de discerner les causes de cette variabilité, mais il est probable qu'elle soit reliée à des stades différents des cultures, chaque essai étant fait avec un tube de culture différent et parfois à des temps différents dans la journée.

Malgré tout, les résultats obtenus pour *T. suecica* démontrent l'existence d'une activité de type MXR chez cet organisme. De plus, il est possible de déceler la présence de deux protéines différentes, comme pour *P. micans*. Lorsque l'on regroupe les trois essais faits avec la RhoB et qu'on compare les effets des inhibiteurs sur l'accumulation de chacun des substrats, on remarque que la CycA inhibe plus efficacement l'export de la

RhoB que celui de la CAM, l'effet sur l'accumulation de RhoB étant significatif pour deux expériences, alors qu'il ne l'est pas pour les expériences utilisant la CAM. Cela est indicatif de la présence d'une activité Pgp, la CycA et la RhoB étant plus spécifiques à cette protéine (Roepke *et al.*, 2006 ; Zaja *et al.*, 2007). Qui plus est, la forte inhibition de l'export de la CAM par le Mk571, cumulé à son absence d'effet sur l'accumulation de RhoB, indique la présence d'un transporteur sensible au Mk571, mais qui n'exporte pas efficacement la RhoB. Ce type de spécificité est caractéristique des MRPs, le Mk571 étant spécifique à cette famille de protéines (Haimeur *et al.*, 2004). Ces résultats supportent donc l'idée qu'un transporteur de type MRP est présent chez *T. suecica*. Cela est vrai même lorsque l'on considère que la CAM est reconnue pour être un substrat tant de la Pgp que des MRPs, car son produit d'hydrolyse, la calcéine, est uniquement transporté par les MRPs (Essodaïgui *et al.*, 1998), rendant donc l'accumulation de la CAM particulièrement sensible à l'inhibition des MRPs. L'absence d'un effet significatif de la CycA sur l'accumulation de la CAM peut donc être expliquée par la présence d'un transporteur insensible à la CycA qui transporte efficacement la CAM et la calcéine même lorsque l'activité de transporteurs sensibles à la CycA est inhibée. Finalement, l'effet du Ver semble confirmer la présence d'une activité MXR chez *T. suecica*. Il a augmenté l'accumulation de RhoB dans toutes les expériences effectuées (effet significatif pour une expérience) et doublé l'accumulation de la CAM, bien que la forte variabilité fait que cette augmentation n'est pas significative.

3.4 Conclusion

Cette étude démontre clairement qu'un mécanisme cellulaire d'export semblable à la MXR est présent chez trois espèces de microalgues évolutivement distantes, *Prorocentrum cf micans* (isolée dans l'estuaire du St-Laurent), *Isochrysis galbana* et *Tetraselmis suecica*. Ces résultats s'ajoutent aux rares études de la MXR chez les microalgues, renforçant l'idée que des mécanismes d'exports semblables à la MXR/MDR se retrouvent chez tous les organismes vivants. Les microalgues étant des organismes unicellulaires pouvant évoluer dans des eaux côtières polluées, elles sont dépendantes de tels mécanismes de détoxification pour leur survie et sont potentiellement sensibles à des composés pouvant compromettre ces mécanismes de résistance. Il s'agit là d'un sujet des plus actuels, les démonstrations de l'existence de chimiosensibilisateurs naturels et anthropogènes étant de plus en plus nombreuses (ex.: Eufemia *et al.*, 2002 ; Luckenbach *et al.*, 2004 ; Smital *et al.*, 2004). La démonstration d'une certaine variabilité dans le mécanisme de MXR que fait notre étude ouvre en fait la porte à la mise sur pied de travaux visant l'étude de l'effet de chimiosensibilisateurs sur des communautés microbiennes naturelles. Les différences observées peuvent permettre d'expliquer, théoriquement du moins, des changements de communauté que pourraient induire les chimiosensibilisateurs, utilisés seuls ou conjointement à d'autres toxiques. Bien que la caractérisation de la MXR chez les espèces étudiées ne soit pas complète, des études biomoléculaires étant nécessaires à une meilleure connaissance de la MXR elle-même, il apparaît maintenant important de commencer à démontrer

l'impact environnemental que peuvent avoir les inhibiteurs de la MXR et de la façon dont ils interagissent avec les composés toxiques.

Références

- Ames, B. N., Profet, M. et Gold, L. S., 1990. Nature's chemicals and synthetic chemicals : comparative toxicology, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87:7782–7786.
- Andersen, R. A., éditeur, 2005. *Algal culturing techniques*. Elsevier/Academic Press, Boston, Mass. (USA).
- Annilo, T., Chen, Z.-Q., Shulenin, S., Constantino, J., Thomas, L., Lou, H., Stefanov, S. et Dean, M., 2006. Evolution of the vertebrate ABC gene family : analysis of gene birth and death, *Genomics*, 88:1–11.
- Arrigo, K. R., 2005. Marine microorganisms and global nutrient cycles, *Nature*, 437:349–355.
- Bamdad, M., Reader, S., Grolière, C. A., Bohatier, J. et Denizeau, F., 1997. Uptake and efflux of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Tetrahymena pyriformis* : evidence for a resistance mechanism, *Cytometry*, 28:170–175.

- Bard, S. M., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms, *Aquatic Toxicology*, 48:357–389.
- Biedler, J. L. et Riehm, H., 1970. Cellular resistance to Actinomycin D in chinese hamster cells *in vitro* : Cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies, *Cancer Research*, 30:1174–1184.
- Biemans-Oldehinkel, E., Doeven, M. K. et Poolman, B., 2006. ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains, *FEBS Letters*, 580:1023–1035.
- Boyd, P. W. et Newton, P. P., 1999. Does planktonic community structure determine downward particulate organic carbon flux in different oceanic provinces?, *Deep Sea Research Part I*, 46:63–91.
- Cornwall, R., Holland Toomey, B., Bard, S., Bacon, C., Jarman, W. M. et Epel, D., 1995. Characterization of multixenobiotic/multidrug transport in the gills of the mussel *Mytilus californianus* and identification of environmental substrates, *Aquatic Toxicology*, 31:277–296.
- Doney, S. C., 2006. Plankton in a warmer world, *Nature*, 444:695–696.
- Downs, C. et Downs, A., 2007. Preliminary examination of short-term cellular toxicological responses of the coral *Madracis mirabilis* to acute Irgarol 1051 exposure, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52:47–57.

- Essodaïgui, M., Broxterman, H. et Garnier-Suillerot, A., 1998. Kinetic analysis of Calcein and Calcein-acetoxymethylester efflux mediated by the multidrug resistance protein and P-glycoprotein, *Biochemistry*, pages 2243–2250.
- Eufemia, N., Clerte, S., Girshick, S. et Epel, D., 2002. Algal products as naturally occurring substrates for p-glycoprotein in *Mytilus californianus*, *Marine Biology*, 140:343–353.
- Haimeur, A., Conseil, G., Deeley, R. G. et Cole, S. P. C., 2004. The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins : Biology, substrate specificity and regulation, *Current Drug Metabolism*, 5:21–53.
- Hollenstein, K., Dawson, R. J. et Locher, K. P., 2007. Structure and mechanism of ABC transporter proteins, *Current opinion in Structural Biology*, 17:412–418.
- Holló, Z., Homolya, L., Hegedüs, T. et Sarkadi, B., 1996. Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells, *FEBS Letters*, 383:99–104.
- Ivanina, A. V. et Sokolova, I. M., 2008. Effects of cadmium exposure on expression and activity of P-glycoprotein in eastern oysters, *Crassostrea virginica* Gmelin, *Aquatic Toxicology*, 88:19–28.
- Juliano, R. L. et Ling, V., 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants, *Biochimica Biophysica Acta*, 455:152–162.
- Kurelec, B., 1992. The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms, *Critical Reviews in Toxicology*, 22:23–43.

- Kurelec, B., 1997. A new type of hazardous chemical : the chemosensitizers of multixenobiotic resistance, *Environmental Health Perspectives*, 105:855–860.
- Kurelec, B., Pivčević, B. et Müller, W., 1995. Determination of pollutants with multixenobiotic-resistance inhibiting properties, *Marine Environmental Research*, 39: 261–265.
- Luckenbach, T., Corsi, I. et Epel, D., 2004. Fatal attraction : Synthetic musk fragrances compromise multixenobiotic defense systems in mussels, *Marine Environmental Research*, 58:215–219.
- Luedeking, A. et Koehler, A., 2004. Regulation of expression of multixenobiotic resistance (MXR) genes by environmental factors in the blue mussel *Mytilus edulis*, *Aquatic Toxicology*, 69:1–10.
- McFadzen, I., Eufemia, N., Health, C., Epel, D., Moore, M. et Lowe, D., 2000. Multidrug resistance in the embryos and larvae of the mussel *Mytilus edulis*, *Marine Environmental Research*, 50:319–323.
- Miller, D. S., Masereeuw, R., Henson, J. et Karnaky, Jr, K. J., 1998. Excretory transport of xenobiotics by dogfish shark rectal gland tubules, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 275:697–705.
- Minier, C., Abarnou, A., Jaouen-Madoulet, A., Le Guellec, A.-M., Tutundjian, R., Bocuquéné, G. et Leboulenger, F., 2006. A pollution-monitoring pilot study involving con-

- taminant and biomarker measurements in the Seine Estuary, France, using zebra mussels (*Dreissena polymorpha*), *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25:112–119.
- Minier, C., Lelong, C., Djemel, N., Rodet, F., Tutundjian, R., Favrel, P., Mathieu, M. et Leboulenger, F., 2002. Expression and activity of a multixenobiotic resistance system in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, *Marine Environmental Research*, 54:455–459.
- Mock, T., Krell, A., Glöckner, G., Kolukisaoglu, Ü. et Valentin, K., 2005. Analysis of expressed sequence tags (ESTS) from the polar diatom *Fragilariopsis cylindrus*, *Journal of Phycology*, 42:78–85.
- Nebert, D. W. et Dieter, M. Z., 2000. The evolution of drug metabolism, *Pharmacology*, 61:124–135.
- ní Shuilleabháin, S., Davoren, M., Mothersill, C., Sheehan, D., Hartl, M. G. J., Kilemade, M., O'Brien, N. M., O'Halloran, J., van Pelt, F. N. A. M. et Lyng, F. M., 2005. Identification of a multixenobiotic resistance mechanism in primary cultured epidermal cells from *Oncorhynchus mykiss* and the effects of environmental complex mixtures on its activity, *Aquatic Toxicology*, 73:115–127.
- Okamoto, O. K. et Hastings, J. W., 2003. Genome-wide analysis of redox-regulated genes in a dinoflagellate, *Gene*, 321:73–81.
- Omura, T., 1999. Forty years of cytochrome P450, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 266:690–698.

- Padrós, J., Pelletier, É. et Oliveira Ribeiro, C. A., 2004. Les interactions multiples en écotoxicologie - le cas du benzo(a)pyrène et du tributylétain chez l'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*). Dans Pelletier, É., Campbell, P. G. C. et Denizeau, F., éditeurs, *Écotoxicologie moléculaire - Principes fondamentaux et perspectives de développement*, chapitre 6, pages 257–299. Presses de l'Université du Québec.
- Pain, S., Devin, S. et Parant, M., 2007. Biomarker *versus* environmental factors : Seasonal variations and modelling multixenobiotic defence (MXD) transport activity in transplanted zebra mussels, *Science of the Total Environment*, 373:103–112.
- Pelletier, É., Sargian, P., Payet, J. et Demers, S., 2006. Ecotoxicological effects of combined UVB and organic contaminants in coastal waters : A review, *Photochemistry and Photobiology*, 82:981–993.
- Pérez-Tomás, R., 2006. Multidrug resistance : Retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment, *Current Medicinal Chemistry*, 13:1859–1876.
- Petersen, S. et Gustavson, K., 1998. Toxic effects of tri-butyltin (TBT) on autotrophic pico-, nano-, and microplankton assessed by a size fractionated pollution-induced community tolerance (SF-PICT) concept, *Aquatic Toxicology*, 40:253–264.
- Roepke, T. A., Hamdoun, A. M. et Cherr, G. N., 2006. Increase in multidrug transport activity is associated with oocyte maturation in sea stars, *Development, Growth & Differentiation*, 48:559–573.

- Saengkae, C., Loetchutinat, C. et Garnier-Suillerot, A., 2003. Kinetic analysis of rhodamine efflux mediated by the multidrug resistance protein (MRP1), *Biophysical Journal*, 85:2006–2014.
- Scherer, C., Wiltshire, K. et Bickmeyer, U., 2008. Inhibition of multidrug resistance transporters in the diatom *Thalassiosira rotula* facilitates dye staining, *Plant Physiology and Biochemistry*, 46:100–103.
- Schröder, H. C., Badria, F. A., Ayyad, S. N., Batel, R., Wiens, M., Hassanein, H. M. A., Kurelec, B. et Müller, W. E. G., 1998. Inhibitory effects of extracts from the marine alga *Caulerpa taxifolia* and of toxin from *Caulerpa racemosa* on multixenobiotic resistance in the marine sponge *Geodia cydonium*, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 5:119–126.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M. et Dowd, C. A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases : implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily, *The Biochemistry journal*, 360:1–16.
- Smital, T., Luckenbach, T., Sauerborn, R., Hamdoun, A. M., Vega, R. L. et Epel, D., 2004. Emerging contaminants–pesticides, PPCPs, microbial degradation products and natural substances as inhibitors of multixenobiotic defense in aquatic organisms, *Mutation Research*, 552:101–117.
- Svensson, S., Särngran, A. et Förlin, L., 2003. Mussel blood cells, resistant to the cytotoxic effects of okadaic acid, do not express cell membrane p-glycoprotein activity

(multixenobiotic resistance), *Aquatic Toxicology*, 65:27–37.

Timofeyev, M. A., Shatilina, Z. M., Bedulina, D. S., Menzel, R. et Steinberg, C. E. W., 2007. Natural organic matter (NOM) has the potential to modify the multixenobiotic resistance (MXR) activity in freshwater amphipods *Eulimnogammarus cyaneus* and *E. verrucosus*, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 146:496–503.

Tutundjian, R. et Minier, C., 2007. Effect of temperature on the expression of P-glycoprotein in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, *Journal of Thermal Biology*, 32:171–177.

Vuilleumier, S., 1997. Bacterial Glutathione S-Transferases : What are they good for?, *Journal of Bacteriology*, 179:1431–1441.

Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. et Gay, N. J., 1982. Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold, *The EMBO Journal*, 1:945–951.

Zaja, R., Klobučar, R. S. et Smital, T., 2007. Detection and functional characterization of Pgp1 (ABCB1) and MRP3 (ABCC3) efflux transporters in the PLHC-1 fish hepatoma cell line, *Aquatic Toxicology*, 81:365–376.