



HAL
open science

Étude développementale et fonctionnelle des métallothionéines chez la drosophile

François Bonneton

► **To cite this version:**

François Bonneton. Étude développementale et fonctionnelle des métallothionéines chez la drosophile. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris 11, 1994. Français. NNT: . tel-04227587

HAL Id: tel-04227587

<https://hal.science/tel-04227587>

Submitted on 3 Oct 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Étude développementale et fonctionnelle des métallothionéines chez la drosophile

Thèse présentée pour obtenir le titre de Docteur en Sciences de l'Université Paris XI par

François Bonneton

Soutenue le **16 décembre 1994** devant la Commission d'Examen:

Claudie Isnard	Rapporteur	Professeur à l'Université Paris 7
Jean-Antoine Lepasant	Rapporteur	Directeur de Recherches au CNRS
Hervé Leguyader	Président	Professeur à l'Université Paris 11
Maurice Wegnez	Directeur de thèse	Professeur à l'Université Paris 11

Mention très honorable, avec les félicitations du jury

RESUME

Les métallothionéines sont de petites protéines riches en cystéine et en métaux présentes chez les procaryotes et les eucaryotes. La fonction de ces protéines dans la détoxification métallique est clairement établie, mais leur implication dans le métabolisme normal du zinc, du cuivre et des radicaux libres est peu documenté. In vitro, les métallothionéines peuvent réguler des métalloprotéines telles que les facteurs de transcription à doigts de zinc par un échange réversible des ions métalliques. Elles sont aussi capables de se substituer fonctionnellement à la superoxyde dismutase dans la levure pour la protection contre les radicaux libres.

Le système métallothionéine de la drosophile constitue un bon modèle pour l'étude des métallothionéines d'un métazoaire car il est à la fois simple et différencié. En effet, contrairement à ce qu'on observe chez les vertébrés et les échinodermes, le génome de cette espèce ne contient que deux gènes métallothionéine, *Mtn* et *Mto*, qui codent pour des protéines très différentes (26% d'identité).

Une analyse de l'expression des deux gènes métallothionéine a été réalisée par hybridation in situ à tous les stades du développement de la drosophile. Les transcrits de *Mto* ne sont pas détectables avant les stades post-embryonnaires (larves, pupes, adultes) où ils sont localisés dans le mésentéron et inductibles par les métaux. Pendant tout le développement, les transcrits de *Mtn* sont présents dans le mésentéron et les tubes de Malpighi et inductibles par les métaux. *Mtn* est aussi exprimé dans certains hémocytes de l'embryon et dans les cellules folliculaires de l'ovaire. Nous avons démontré que l'expression de l'allèle *Mtn*³ est plus faible que celle de l'allèle *Mtn*¹ dans le mésentéron des embryons. Une surprenante variabilité inter-spécifique a été observée dans le sous-groupe *melanogaster* où des espèces très proches présentent différents profils d'expression de *Mtn*.

Nous avons transformé *Drosophila melanogaster* avec des éléments P contenant des gènes rapporteurs (*lacZ* ou *Adh*) sous contrôle de différentes portions des promoteurs de *Mtn* ou de *Mto*. Dans des conditions normales, ces transgènes s'expriment dans deux régions bien définies du mésentéron et, pour *Mtn* seulement, dans les tubes de Malpighi des larves. La spécificité tissulaire de l'induction métallique dépend du métal utilisé. L'induction des transgènes par un choc thermique dans le tube digestif indique que la localisation des métallothionéines n'est pas seulement due à l'absorption intestinale des ions métalliques. La possibilité d'induire les transgènes par un stress oxydatif suggère aussi que les métallothionéines pourraient jouer un rôle dans la protection contre les radicaux libres chez la drosophile. Dans des conditions naturelles, le gène *Mto* n'est jamais dupliqué. Au contraire, les duplications de l'allèle *Mtn*¹ sont fréquentes et toujours associées à une meilleure résistance à l'intoxication métallique. Des lignées transgéniques contenant le gène *Mto* entier montrent une meilleure résistance à l'intoxication par le cadmium. Ainsi *Mto*, comme *Mtn*, peut agir en tant que gène de détoxification.

Nos résultats suggèrent fortement que les gènes *Mtn* et *Mto* sont impliqués dans l'absorption et l'excrétion des métaux à tous les stades du développement de *D. melanogaster*. Ce travail montre aussi que l'étude des variations du système de régulation de *Mtn* dans le sous-groupe *melanogaster* est susceptible d'apporter des informations sur la façon dont de nouveaux profils d'expression, et peut-être de nouvelles fonctions, apparaissent au cours de l'évolution.

PLAN DE LA THÈSE

AVANT-PROPOS

INTRODUCTION

I- PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES MÉTALLOTHIONÉINES

1. Historique

2. Définition et classification

Définition

Classification

3. Structure et propriétés biochimiques

Structure

Propriétés biochimiques

4. Organisation génétique et évolution

Organisation génétique

Évolution

II- RÉGULATION ET FONCTION DES MÉTALLOTHIONÉINES

1. Métallothionéines et métaux

Induction métallique

Régulation métallique

Détoxication métallique

Métabolisme des métaux

2. Métallothionéines et radicaux libres

Induction par les radicaux libres

Protection contre les radicaux libres

Réponse immunitaire

3. Métallothionéine et croissance neuronale: cas de GIF/MT3

4. Conclusion

III- MÉTALLOTHIONÉINES ET DÉVELOPPEMENT

1. Métaux et développement

Des éléments essentiels

Des éléments toxiques

Des éléments tératogènes

2. Expression embryonnaire des métallothionéines

Expression précoce et différentielle

Expression embryonnaire des métallothionéines chez les oursins

Expression embryonnaire des métallothionéines chez les rongeurs

3. Conclusion

IV- LE SYSTÈME MÉTALLOTHIONÉINE DE LA DROSOPHILE

1. Deux gènes métallothionéines chez la drosophile: *Mtn* et *Mto*

Identification du gène *Mtn*

Identification du gène *Mto*

Existe-t-il d'autres gènes métallothionéine chez la drosophile?

2. Comparaison structurale de *Mtn* et *Mto*

3. Comparaison fonctionnelle de *Mtn* et *Mto*

Détoxication métallique

Expression développementale

4. Conclusion

RÉSULTATS

I- EXPRESSION EMBRYONNAIRE DU GÈNE *MTN*

1. Résumé de l'article 1

2. Article 1

II- EXPRESSION POST-EMBRYONNAIRE DES GÈNES

MTN* ET *MTO

1. Résumé de l'article 2

2. Article 2

III- ÉTUDE DE LA RÉGULATION DES GÈNES *MTN* ET *MTO* PAR TRANSGENÈSE

IV- TENTATIVE D' OBTENTION D'UN MUTANT DU GÈNE *MTN*

DISCUSSION GÉNÉRALE

BIBLIOGRAPHIE

AVANT-PROPOS

Les métaux jouent un rôle fondamental dans la vie. Le fait que 17 des 30 éléments chimiques essentiels à la vie soient des métaux illustre bien cette importance (Cotton and Wilkinson, 1980). La définition physico-chimique d'un métal est assez empirique et inclut un grand nombre d'éléments. Signalons simplement quelques unes de leurs propriétés: ils sont bons conducteurs de chaleur et d'électricité, ductiles et malléables, présentent un aspect brillant, ils sont réducteurs, forment des molécules pluriatomiques et des liaisons ioniques (Bernard, 1990). Les métaux constituent une importante composante nutritive de notre environnement. Ils sont aussi potentiellement toxiques à l'état libre ou en concentrations anormales. D'un point de vue biologique, on peut répartir les métaux en trois catégories (Thiele, 1992). Un premier groupe est constitué par des métaux, tels le zinc et le calcium, qui sont des co-facteurs essentiels à de nombreuses métalloprotéines et ne sont toxiques qu'à très forte concentration. Un second groupe contient des métaux également co-facteurs de nombreuses métalloprotéines mais qui sont potentiellement très toxiques, même à faible concentration, comme le cuivre et le fer. Enfin, une troisième catégorie comprend des métaux n'ayant aucun rôle biologique et étant hautement toxiques. Le cadmium et le mercure en sont de bons exemples.

Les coordinances métalliques peuvent consolider la structure d'une protéine autour d'un ion métallique. Ces protéines sont dites métalloprotéines et il en existe un très grand nombre. On connaît par exemple environ 300 enzymes et 200 protéines se liant à l'ADN qui ont besoin du zinc pour fonctionner (Vallee, 1991). Néanmoins, notre connaissance du métabolisme des métaux "lourds" (expression traditionnelle désignant les métaux dont la densité est supérieure à 5 g/cm^3) essentiels est assez incomplète. Quelques protéines de transport ou de stockage ont été identifiées pour le fer (ferritine, transferrine) ou le cuivre (céroploasmine, albumine). En ce qui concerne le zinc, la seule protéine connue susceptible de jouer un rôle dans l'homéostasie de cet ion métallique est la métallothionéine.

C'est l'importance du zinc pour la vie qui donne aux métallothionéines tout leur intérêt. Cependant, ces protéines ont été découvertes parcequ'elles fixaient le cadmium, un métal non essentiel et très toxique (Margoshes et Vallee, 1957). Ainsi, une grande partie des recherches ultérieures s'intéressèrent essentiellement à leur rôle dans la détoxification métallique. En même temps, les biochimistes comprenaient leur structure tridimensionnelle et les biologistes moléculaires disséquaient leur régulation transcriptionnelle. Mais la fonction des métallothionéines dans des conditions physiologiques normales constitue encore aujourd'hui un problème largement irrésolu. La découverte de nombreux inducteurs non métalliques tels que les radicaux libres, des hormones ou différentes situations de stress, permet de penser que les métallothionéines interviendraient dans de nombreux processus développementaux et pathologiques (Hamer, 1986).

L'étude de l'expression et de la régulation d'un gène au cours du développement permet de faire des suggestions intéressantes sur sa fonction. Si cette approche embryologique s'accompagne d'une analyse génétique, alors on peut espérer pouvoir définir assez précisément la fonction de la protéine en question. La drosophile étant le métazoaire dont les études d'embryologie et de génétique classique et moléculaire sont

les plus avancées, elle constitue un modèle de choix pour élucider la fonction des métallothionéines.

Cette thèse est une contribution à la compréhension de la fonction du système métallothionéine de *Drosophila melanogaster*. Dans l'introduction j'exposerai les caractéristiques générales de la structure, de la régulation et des fonctions possibles des métallothionéines. Puis je détaillerai les connaissances actuelles sur leur rôle dans le développement et sur le système métallothionéine de la drosophile. Pour déterminer le rôle de ces protéines il faut au préalable connaître leur profil d'expression. J'ai donc étudié, dans les deux premiers articles de cette thèse, le profil d'expression spatiale des métallothionéines à tous les stades du développement de la drosophile. Ensuite, l'étude de la régulation des métallothionéines m'a permis de caractériser différentes voies métaboliques dans lesquelles ces protéines sont impliquées. L'obtention d'un mutant de métallothionéine constituait le dernier objectif de ma thèse. Les résultats obtenus ainsi que les nouvelles perspectives de recherche initiées par ce travail seront discutés dans la dernière partie: Discussion générale.

INTRODUCTION

I- PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES MÉTALLOTHIONÉINES

1. Historique

La découverte des métallothionéines est la conséquence directe de la recherche d'un rôle biologique pour le cadmium.

Au milieu des années cinquante on savait déjà, grâce à des travaux soviétiques (Maliuga, 1941; Voinar, 1950), que le cadmium était présent dans de nombreux tissus vivants. Cette présence pouvait suggérer que le cadmium était un constituant essentiel de la matière vivante aussi bien qu'un contaminant. Par ailleurs, la grande ressemblance physico-chimique du cadmium avec le zinc, métal au rôle biologique déjà bien connu à l'époque, intriguait beaucoup certains chercheurs. C'est afin de découvrir si le cadmium avait un rôle biologique ou non que Bert Vallee décida de rechercher des protéines capables de fixer cet oligo-élément.

En 1957, Margoshes et Vallee isolèrent ainsi une petite protéine à forte teneur en cadmium (et en zinc) à partir du rein de cheval, un organe connu pour accumuler ce métal (Figure 1). Kägi et Vallee (1960, 1961) caractérisèrent davantage cette protéine qu'ils nommèrent "métallothionéine" car elle est riche en métaux et en cystéine (contenant des groupements thiol -SH).

De 1957 à 1966 ne furent publiés que neuf articles concernant les métallothionéines, étudiées essentiellement dans les laboratoires de Bert Vallee à Boston et de Jeremias Kägi à Zürich. Depuis, un nombre croissant de chercheurs se sont intéressés à ces protéines, utilisant des approches très variées. En 1993, par exemple, 300 articles concernant les métallothionéines parurent dans 150 revues couvrant les domaines suivants: biochimie (35%), physiologie et toxicologie (26%), médecine (30%) et biologie moléculaire (9%). Ainsi, à côté d'études biochimiques et toxicophysiologiques qui prolongent les expériences pionnières, se sont développées à partir des années 80 de nombreuses études de biologie moléculaire. L'inductibilité métallique des gènes métallothionéine a notamment contribué à faire de leurs promoteurs des systèmes modèles pour l'étude de la régulation de la transcription. Pour l'anecdote, signalons qu'un des premiers mammifères transgéniques fut une souris porteuse du gène de l'hormone de croissance de rat placé sous le contrôle du promoteur du gène métallothionéine *MTI* de souris (Palmiter et al., 1982).

Après quatre décennies d'investigation, la question initiale sur le rôle biologique du cadmium s'est déplacée et, aujourd'hui, c'est la fonction des métallothionéines qui reste à préciser.

**A CADMIUM PROTEIN FROM
EQUINE KIDNEY CORTEX**

Sir:

Cadmium never has been demonstrated to be an integral part of a natural product although present in various species.^{1,2,3} Physiological function has not been shown.

Colorimetric analyses⁴ of human, horse, cow, hog, and sheep kidney for cadmium led to the choice of horse kidney cortex for fractionation.

Fractionation of horse kidney cortex with ethanol and ammonium sulfate gave a product containing 20 to 25 milligrams of cadmium per gram dry weight of trichloroacetic acid precipitable material in successive fractionations. Ultracentrifugation⁵ in a synthetic boundary cell showed the final products of four successive fractionations to be monodisperse with a sedimentation constant (uncorrected for viscosity and diffusion) varying from 0.94 to 1.22×10^{-12} . Paper electrophoresis at pH 8.5 of the product of one fractionation showed three components moving toward the cathode, the slowest comprising about 70% of the total material.

The fractions were analyzed colorimetrically⁴ and by emission spectrography⁶ (Table I). The

though lesser, increase of zinc content as fractionation proceeds, nor can it be ruled out that cadmium is associated with one and zinc with another of the three electrophoretic fractions.

The product contains 14% nitrogen, measured on the material precipitated by trichloroacetic acid. It reacts positively to the biuret and ninhydrin tests. Hydrolysis and paper chromatography showed serine, glycine, aspartic, and glutamic acids, among other amino acids not identified. The last fraction (Table I, Fraction VII) contains about 1% of hexoseamine.⁷ A carbazole test for uronides⁸ was negative.

There is no ultraviolet absorption maximum near 280 m μ at pH 7 or pH 12, indicating a low content of aromatic groups. Absorption bands have not been found in the visible region. The infrared spectrum of a potassium bromide pellet of the lyophilized product closely resembles those obtained for several proteins.⁹

The low sedimentation constant and high metal content of this material are indicative of a low molecular weight protein, probably containing a small number of cadmium atoms per molecule.

TABLE I
EMISSION SPECTROGRAPHIC AND COLORIMETRIC ANALYSES OF HORSE KIDNEY CORTEX FRACTIONS

Cadmium determined by spectrography⁶ and by colorimetry⁴; all other metals determined spectrographically. Protein measured by dry weight of material precipitated by trichloroacetic acid. Data expressed as $\mu\text{g./g.}$ wet weight of cortex, and as $\mu\text{g./g.}$ protein for the fractions.

	Cortex	Fraction I	Fraction II	Fraction III	Fraction IV	Fraction V	Fraction VI	Fraction VII
Preparation E: colorimetric cadmium	82.7	1130	3050	17,100	14,300	a	b	24,500
Preparation C: colorimetric cadmium	83.7	754	3440	8,900	9,990	17,100	21,600	22,400
Spectrographic cadmium	137	687	2630	9,730	c	c	20,700	24,200
Spectrographic zinc	91	340	1440	3,600	3,330	c	4,910	5,880
Other metals (spectrographic) ⁶	829	2410	2200	4,910	3,190	45,200 ^d	15,400 ^d	2,470

^a Protein concentration too small to measure by trichloroacetic acid precipitation. ^b Sample lost. ^c Sample size inadequate. ^d Contamination with Mg and Ca introduced with ammonium sulfate. * Mg, Ca, Ba, Sr, Al, Fe, Mn, Cr, Pb; Na, K, Cu not determined.

cadmium content rises throughout the fractionation, a 30-fold increase from the first extract to the product. Cadmium is not removed by dialysis at pH 7, but is by treatment with hot trichloroacetic acid. With the exception of zinc, the other metals present initially and introduced during fractionation are removed and are low in concentration in the final material. Isomorphism cannot be excluded as an explanation of the substantial, al-

Characterization of this unusual natural product is in progress.

This work was supported by the National Institutes of Health and the Howard Hughes Medical Institute.

(6) B. L. Vallee, in "Advances in Protein Chemistry," **10**, 317 (1955).

(7) R. J. Wenzler, in "Methods of Biochemical Analysis," D. Gilck, ed., Vol. 2, Interscience Publishers, New York, N. Y., 1954, pp. 292-293.

(8) Z. Dische, *ibid.*, p. 343.

(9) L. J. Bellamy, "The Infrared Spectra of Complex Molecules," John Wiley and Sons, Inc., New York, N. Y., 1954, pp. 192-198.

(10) Fellow of the Kettering Foundation, Dayton, Ohio.

(1) D. P. Maliuga, *Compt. rend. Acad. Sci. U.S.S.R.*, **31**, 145 (1941).

(2) A. K. Klein and H. J. Wichmann, *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, **28** 257 (1945).

(3) A. O. Voinar, *Trudy Kark. Mikroelement* 1950, 580 (1952); *Abad. Nash U.S.S.R.*, Translation R-J-206, of Associated Technical Services, East Orange, New Jersey.

(4) B. E. Saltzman, *Anal. Chem.*, **28**, 493 (1953).

(5) The ultracentrifugations were done by Mr. Paul M. Reilly of the Biophysics Research Laboratory.

BIOPHYSICS RESEARCH LABORATORY OF
THE DEPARTMENT OF MEDICINE
HARVARD MEDICAL SCHOOL AND MARVIN MARGOSHES¹⁰
PETER BENT BRIGHAM HOSPITAL BERT L. VALLEE
BOSTON 15, MASSACHUSETTS

RECEIVED AUGUST 1, 1957

Figure 1: Historique

Premier article consacré à une métallothionéine publié par Margoshes et Vallee en 1957 dans "The Journal of the American Society" (79: 4813). Ce travail relate la purification d'une protéine fixant le cadmium à partir de reins de cheval. Le terme "métallothionéine" n'apparaîtra qu'après la caractérisation complète de cette protéine (Kägi et Vallee, 1960).

2. Définition et classification

Définition

Historiquement, le terme "métallothionéine" fut donc introduit pour désigner une protéine riche en soufre et en métaux isolée à partir du rein de cheval (Kägi et Vallee 1960, 1961). Aujourd'hui, toute protéine ressemblant dans plusieurs de ses caractéristiques à cette métallothionéine rénale de cheval peut être appelée "métallothionéine" (Kojima, 1991). Ces caractéristiques sont les suivantes:

- petit poids moléculaire (10 kDa)
- forte teneur en métal (5,9% Cd, 2,2% Zn)
- forte teneur en cystéine (30%)
- absence d'acides aminés aromatiques et d'histidine
- présence de motifs Cys-X-Cys dans la séquence
- présence de complexes tétrahédriques métal-thiolate

Se trouvent ainsi réunies sous le même terme des protéines parfois très différentes et dont la parenté évolutive est peu évidente. La forme dénuée de métal est l'apométallothionéine ou thionéine.

Classification

Traditionnellement, les métallothionéines sont réparties en trois classes (Kojima, 1991) (Figure 2A). Le critère utilisé est de comparer la répartition des cystéines dans la structure primaire à celles des métallothionéines de vertébrés:

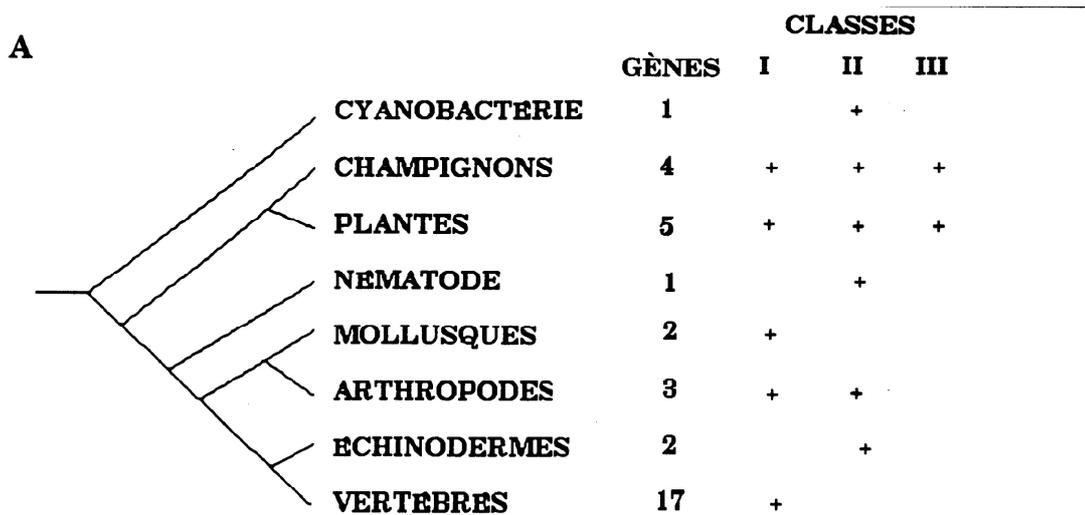
- Classe I: répartition très comparable
- Classe II: répartition assez éloignée
- Classe III: structure complètement différente

La classe I comprend les métallothionéines de vertébré, de mollusque et de crabe.

La classe II comprend les métallothionéines d'oursin, de nématode, de drosophile, de levure, de plante et de cyanobactérie.

La classe III comprend des polypeptides non codés génétiquement ayant la structure (Glu-Cys)_n-X où n=2-8 et où X peut être la glycine ou l'alanine. Elles ressemblent au glutathion des animaux (Glu-Cys-Gly) et sont présentes chez des plantes (où elles sont appelées phytochélatines) et chez des champignons (les cadystines).

Remarquons que si les métallothionéines de classe I se ressemblent entre elles, il n'en va pas du tout de même pour celles de la classe II. Cette dernière classe n'existe en effet que pour "ranger" les métallothionéines "exotiques". Les problèmes posés par cette classification sont abordés au paragraphe I-4.



B

Classe I

Mouse	MT-1	MDP.NCSCST.GGSCTCTSSCACKNCKCT.SCK.K.S.C.CSCCPVGCCKA..QGCVCCKG.....AADKC.T.C.CA.
	MT-2	MDP.NCSCAS.DGSCSCAGACKCKQCKCT.SCK.K.S.C.CSCCPVGCCKA..QGCVCCKG.....ASDKC.S.C.CA.
	MT-3	MDPETCPCT.GGSCTCSDKCKCKGCKCT.NCK.K.S.C.CSCCPAGCEKCA..KDCVCKGEEGAKAEAKC.S.C.CQ.
	MT-4	MDPGECTCMS.GGICICGDNCKCTTCKT.TCR.K.S.C.CPCCPPGCAKCA..RGCICKG.....GSDKC.S.C.CP.
Pigeon	MT-1	MDSQDCPCAA.GGTCTCGDNCKCKNCKCT.SCK.K.G.C.CSCCPAGCAKCA..QGCVCCKG.....PSSAKC.S.C.CH.
	MT-2	MDPQDCTCAA.GDSCSCAGSCKCKNCRQ.SCR.K.S.C.CSCCPASCNSCA..KGCVCCKE.....PSSSKC.S.C.CH.
Trout	MT-A	MDP..CECSK.TGSCNCGSCKCSNCACT.SCK.KAS.C.CDCCPSGCSKCA..SGCVCKG.....KTCDT.S.C.CQ.
	MT-B	MDP..CECSK.TGSCNCGSCKCSNCACT.SCK.K.S.C.CPCCPSDCSKCA..SGCVCKG.....KTCDT.S.C.CQ.
Crab	MT-1	.PG.PC.CND.K..CVCKEGGCKEGCQCT.SCRCP...CEKSSGC.KCA..NKECSKT.CSKA....C.S.C.CPT
	MT-2	.PD.PC.CND.K..CDCKEGECKTGCKCT.SCRCP...CEQSSGC.KCA..NKEDCRKT.CSKP....C.S.C.CP.
Oyster	MT	MSD.PCNIE.TGTCACSDSCPATGCKCGPGCKCGD.DCKAGCKVKC.SCTSEGGCKGCKE.CTGPATCKCGSGCSCKK

Classe II

Sea urchin	MTa	MPDVKCVCCTEGKECACFGQDCCVTGECCKDGTCCGICTNAAACKCANGCKCGSGCSCTEGNCAC
	MTb	MPDVKCVCCKEGNECACTGQDCCITIGKCKDGTCCGKCSNAACTCADGCTCGGCSCTEGNCPC
C. elegans	CeMT-I	ACKCDCKNKQCKGDRCECSGDCKCEKEYCEEASEKCCPAGCKGDCKCANCHCAEQKCGDKTHQHGQTAHAH
	CeMT-II	MVCKDCRNQNCsCNTGTRKDCSDAKCEEYCCPTASEKCKCKSGCAGGCKCACeCAQAAH
S. cerevisiae		MFSELINFQNEGHECQCQCGSCKNNEQCQKSCSPTGNSDDKCPCKGNKSEETKKSCCSGK
D.melanogaster	Ntn	MPcPCGSGCKCAsQATKGSnCgSDCKCGGDKKSAcGcSE
	Mto	MVCKGCGTNCQCSAQRcGDNCaCnKDCQcVcKNGPKD
N.crassa	Mt	MGDCGCSGASSCNCGSGCSsNCgSK
Mimulus guttatus	MT	MSSGCSGSGCKCGDNCsCSMYPMETNTTVMIEGVAPLKMYSEGSEKSFGBEGNGCKGNSCKCDPCNC
Wheat germ	Ecprot.	GCNDKCGCAVPCPGGTGCRCTsARSGAAAGEHTTCGGEHCgGNPCACGGESTPSGCAN...
Cynobacteria	MT	TSSTLVKCAcEPCLcIVDPSKAIDRNLGYCEACAHGHTGSGKCGHTGCNC

Figure 2: Classification et évolution des métallothionéines

A- Schéma des relations phylogénie/classification des métallothionéines. A gauche est représenté un arbre phylogénétique des différents phylas où ont été identifié des gènes métallothionéine. Le nombre de gènes connus est également noté. A droite, les croix indiquent l'appartenance des métallothionéines à l'une ou l'autre des trois classes.

B- Séquences primaires de quelques métallothionéines représentatives des différents phylas. Les métallothionéines de classe I sont alignées, pas celles de classe II (d'après Kägi, 1993).

7

3. Structure et propriétés biochimiques

Structure

Nous disposons aujourd'hui de plus de 80 structures primaires de métallothionéines (Kägi, 1993). Les tailles varient de 25 à 80 acides aminés. La figure 2B présente la séquence de quelques métallothionéines. La seule caractéristique de séquence commune à toutes ces protéines est la présence de doublets Cys-Cys ou de triplets Cys-X-Cys. Toutes ces cystéines participent à la fixation des ions métalliques.

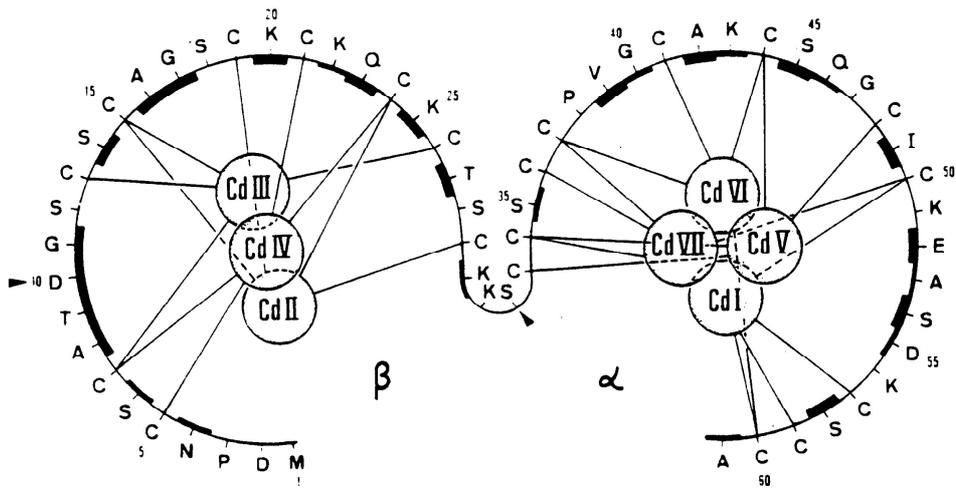
La structure spatiale de plusieurs métallothionéines de classe I a été déterminée par RMN et par cristallographie. Ces métallothionéines se présentent comme des protéines composées de deux domaines globulaires entourant chacun un noyau métallique (Figure 3A). Chez les mammifères le domaine α (extrémité C-terminale) fixe quatre ions (seulement trois chez le crabe) et le domaine β (extrémité N-terminale) en fixe trois (Figure 3B). Cette organisation n'est retrouvée dans aucune autre métalloprotéine, elle est spécifique des métallothionéines.

In vivo, une métallothionéine contient toujours des ions métalliques spécifiques. Il s'agit surtout des métaux essentiels que sont le zinc et le cuivre mais aussi du cadmium et du mercure, tous les deux non-essentiels. In vitro, il est possible de décharger les métaux d'une métallothionéine par acidification puis de recharger l'apoprotéine ainsi obtenue avec des ions très variés. Ces expériences de substitution ont montré que chaque métal possédait sa propre constante d'affinité. Chez les mammifères, par exemple, on obtient l'ordre d'affinité suivant: $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^+ > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$, Co^{2+} (Waalkes et Klaassen, 1984; Nielson et Winge, 1985). Il est à noter que certains ions (Ni^{2+} , Co^{2+} , Ag^{2+}) sont capables d'induire in vivo la transcription des gènes métallothionéine mais ne s'associent jamais aux protéines ainsi produites.

Propriétés biochimiques

Les métallothionéines sont des protéines solubles, thermo-résistantes et de faible poids moléculaire (inférieur à 10 kDa). Elles peuvent être détectées grâce à leur forte teneur en métaux (en utilisant la spectrophotométrie ou des ions radioactifs) ou en cystéines (détectées par marquage au ^{35}S). La méthode de purification couramment utilisée tire parti de ces caractéristiques biochimiques. Elle consiste en effet à extraire en présence de ^{109}Cd les protéines solubles et thermo-résistantes puis à les séparer par chromatographie d'exclusion. Les fractions de faible poids moléculaire et fixant le ^{109}Cd contiennent les métallothionéines.

A



B

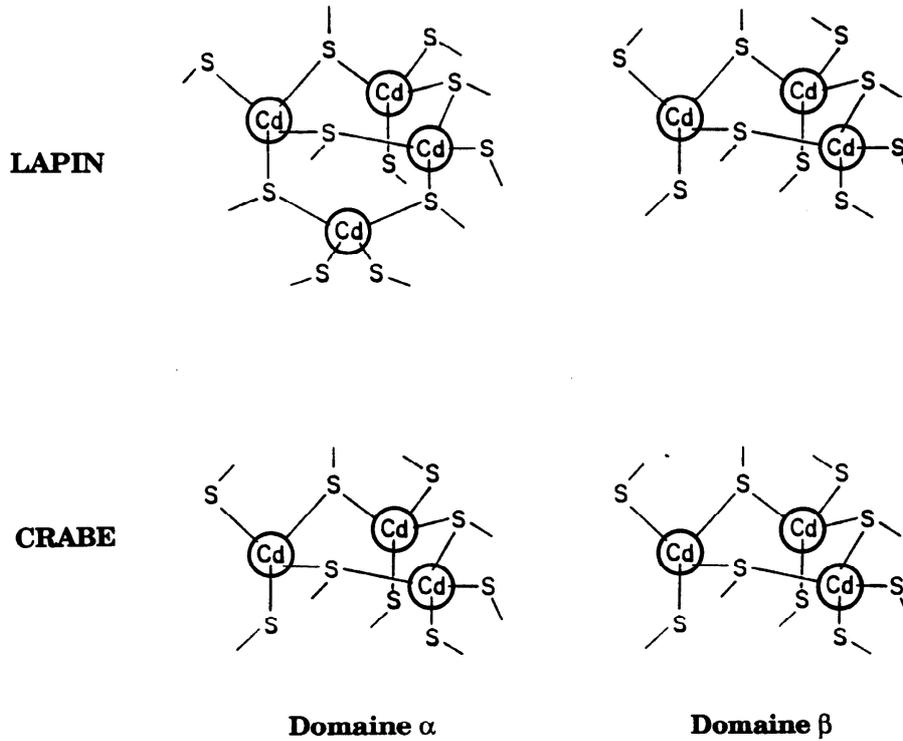


Figure 3: Structure spatiale des métallothionéines

A- Projection bi-dimensionnelle de la métallothionéine-2 de rat (d'après Schultze et al., 1988).

B- Schéma de la coordination des ions cadmium au sein des métallothionéines de lapin (7 Cd) et du crabe *Scylla serrata* (6 Cd) (d'après Otvos et al., 1982).

4. Organisation génétique et évolution

Organisation génétique

Un bref inventaire de la structure des gènes métallothionéine connus actuellement donne une idée de la diversité génétique de cette classe de protéines.

À ce jour, un seul gène métallothionéine a été cloné chez les procaryotes. Le gène *smtA* de la cyanobactérie *Synechococcus* code pour une protéine de 53 acides aminés qui ne ressemble à aucune autre métallothionéine. Il est inductible par le cuivre, le zinc et le cadmium (Robinson et al., 1990).

Chez les champignons les gènes métallothionéine sont inductibles par le cuivre et l'argent mais pas par le zinc et le cadmium. Ils présentent des structures spécifiques et extrêmement variées. La levure *Saccharomyces cerevisiae* possède un seul gène appelé *CUP1*, sans introns et codant pour une métallothionéine de 61 acides aminés (Karin et al., 1984; Butt et al., 1984). Chez *Candida glabrata*, par contre, il existe une petite famille multigénique composée d'un gène *MT1* et de probablement plusieurs gènes *MT2*. Ces gènes sans introns codent pour des protéines tellement différentes (62 acides aminés pour *MT1* et 51 pour *MT2*) qu'il est impossible de les aligner (Mehra et al., 1989). L'unique gène métallothionéine de *Neurospora crassa* était, en 1985, le plus petit gène connu interrompu par un intron. Il code pour une protéine de 26 acides aminés ayant un taux de similitude de 50% avec la partie N-terminale des métallothionéines de mammifères (Münger et al., 1985). La métallothionéine de 25 acides aminés du champignon *Agaricus bispora* ressemble à 80% à celle de *Neurospora* (Münger et Lerch 1985).

Une métallothionéine de classe II a été découverte chez le blé. Cette protéine de 81 acides aminés est codée par un gène sans intron qui n'est pas inductible par le zinc (Kawashima et al., 1992). Les autres phytométallothionéines sont caractérisées par la présence d'une région médiane ne correspondant pas à la composition des métallothionéines. Mais cette région est encadrée par deux parties semblables aux métallothionéines de la classe I. Des expériences in vitro menées sur la métallothionéine du pois suggèrent que la partie intercalaire subirait un clivage post-traductionnel (de Miranda et al., 1990). Les gènes identifiés chez le pois, le maïs, l'orge et la mimule tachetée sont étroitement apparentés (Robinson et al., 1993).

Les gènes métallothionéine clonés chez les invertébrés n'ont apparemment aucun lien de parenté entre eux. L'oursin *Strongylocentrotus purpuratus* contient un gène *SpMTA* et quatre à cinq gènes *SpMTB*, tous interrompus par trois introns. Les protéines MTA et MTB ont un taux de similitude de 83% comparable à ce qui est observé entre les isoformes de mammifères (Nemer et al., 1991). Chez la drosophile, les deux gènes homologues *Mto* et *Mtn* contiennent chacun un intron à la même position et codent pour des protéines n'ayant que 26% de similitude entre elles (Maroni et al., 1986; Silar et al., 1990). Chez le nématode *Caenorhabditis elegans* les deux gènes *mtl-1* et *mtl-2* sont également homologues. Ils contiennent chacun un intron dont la position est identique dans les deux gènes et ils codent pour des protéines qui se ressemblent à 65% (Freedman et al., 1993).

Des gènes métallothionéine ont été clonés dans plusieurs espèces de vertébrés: truite (Zafarullah et al., 1988), poule (Fernando et Andrews, 1989), pintade (Shartz et al., 1993), souris (Searle et al., 1984), rat (Andersen et al., 1986), hamster (Grady et al., 1990), lapin (Thirion et al., 1989), mouton (Peterson et al., 1988), homme (Foster et al., 1988). Au sein de chaque espèce, les gènes métallothionéine constituent une petite famille multigénique comportant de quatre (rat) à douze membres (homme). La structure des gènes (séquences de régulation et position des deux introns) est assez bien conservée entre les espèces de vertébrés. Au niveau des protéines, les taux de similitude intra- et inter-spécifiques sont de 80% en moyenne.

Évolution

Remarquons avant tout que la classification des métallothionéines couramment utilisée n'est pas compatible avec les relations phylogénétiques généralement admises (Figure 2A). Les contraintes structurales imposées à une protéine ayant des propriétés biochimiques de type métallothionéine peuvent en effet conduire, de façon indépendante et dans différents phylla, à la mise en place de motifs cystéines identiques. Autrement dit, la caractéristique commune à toutes les métallothionéines, l'abondance des cystéines, pourrait résulter d'une convergence évolutive.

Il est donc très difficile d'établir une phylogénie globale des métallothionéines. Elles offrent en effet peu de sites informatifs à cause de leur petite taille et elles ont de plus une composition en acides aminés très particulière. Errais et al. (1989) ont démontré que l'alignement de peptides aléatoires ayant la composition des métallothionéines aboutissait à un taux de similitude moyen de 25%. Avec un tel bruit de fond, il n'est pas étonnant que la comparaison des structures primaires des métallothionéines soient aussi peu informative. Elle demeure néanmoins possible en ce qui concerne les métallothionéines de classe I (Kägi, 1993) (Figure 4). Pour déterminer les vraies relations d'homologie entre les métallothionéines il est donc nécessaire d'utiliser d'autres critères, tels que la conservation du nombre et de la position des introns ou des motifs de régulation. Les gènes de vertébrés se ressemblent suffisamment selon tous ces critères pour que l'on puisse conclure à leur origine évolutive commune. L'établissement d'une phylogénie de l'ensemble des métallothionéines qui tienne compte de toutes les données disponibles (séquences et régulation) est un travail qui reste à faire.

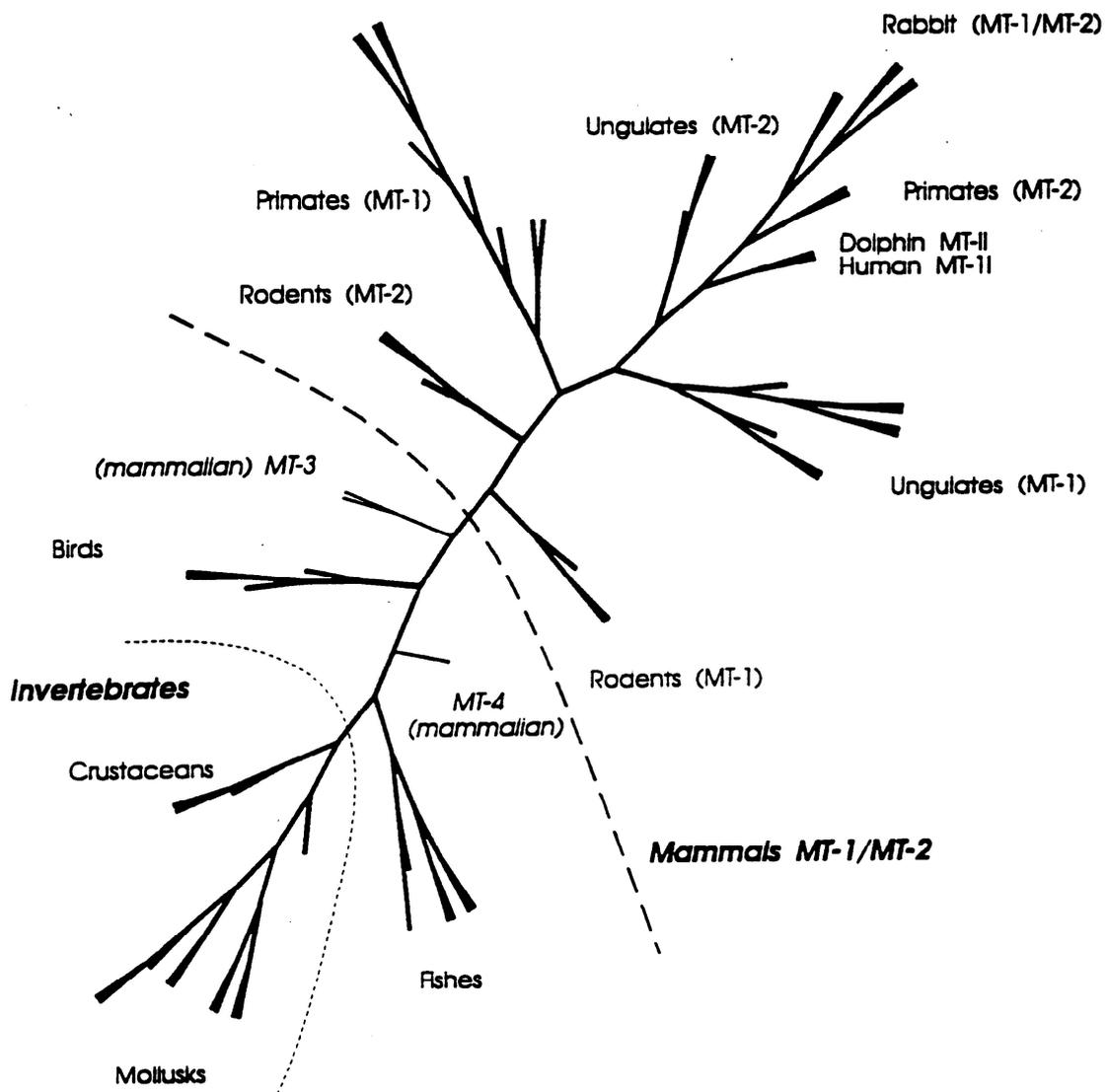


Figure 4: Arbre évolutif des métallothionéines de classe I.
 Cet arbre non raciné a été obtenu par une analyse de parcimonie (d'après Kägi, 1993).

II RÉGULATION ET FONCTION DES MÉTALLOTHIONÉINES

La régulation des métallothionéines est très complexe. Il est en effet difficile de trouver un dénominateur commun à toutes les molécules et les situations expérimentales qui sont capables d'induire la synthèse de ces protéines (Tableau 1). Néanmoins, quelques voies de régulation ont été étudiées assez profondément pour permettre de proposer des réponses quant à la fonction des métallothionéines.

Métaux Zn, Cu, Fe, Co, Ni, Bi Cd, Hg, Au, Ag	Oncogènes ras jun, fos	Promoteurs de tumeurs Esters de phorbol
Facteurs de croissance EGF IGF-1 Facteurs sériques Insuline	Cytokines Interleukines 1 et 6 Interférons alpha et gamma "Tumor Necrosis Factor"	
Agents inflammatoires Lipopolysaccharide Endotoxine Dextran	Seconds messagers cAMP Ca ²⁺ Diacylglycérol	Vitamines Acide rétinoïque Acide ascorbique
Conditions de stress Infection Inflammation Hyperoxygénation Laparotomie Épuisement physique Irradiation aux rayons X Irradiation aux UV	Hormones Glucocorticoïdes Progestérone Oestrogènes Glucagon Catécholamines Angiotensine II	Antibiotiques Cycloheximide Mitomycine Streptozotocine
Agents cytotoxiques Hydrocarbures Éthanol Isopropanol Formaldéhyde Acides gras Acide butyrique Chloroforme Tétrachlorure de carbone Bromobenzène	Iodoacétate EDTA Pénicillimine Acétaminophène Indométhacine	

Tableau 1: Liste des agents inducteurs de la synthèse des métallothionéines (d'après Kägi, 1991).

1. Métallothionéines et métaux

Induction métallique

La capacité des métaux à induire la synthèse des métallothionéines fut découverte par Piscator (1964) qui observa une augmentation du taux de métallothionéines dans le foie de lapins exposés au cadmium. Chez la plupart des eucaryotes supérieurs la synthèse des métallothionéines est inductible par toute une gamme de métaux comprenant notamment le cuivre, le zinc et le cadmium, alors que chez les champignons, seul le cuivre et l'argent (métal aux propriétés physico-chimiques proches du cuivre) semblent être inducteurs. Chez les mammifères, on observe une différence d'inductibilité entre les différentes isoformes. Chez l'homme, par exemple, le gène *MT-IIa* répond de la même façon au zinc et au cadmium alors que le gène *MT-Ia* n'est fortement inductible que par le cadmium (Richards et al., 1984).

Des expériences permettant de mesurer *in vitro* la vitesse de transcription des gènes métallothionéine de souris après induction au cadmium ont montré que la régulation métallique de ces gènes est transcriptionnelle (Durnam et Palmiter, 1981). Au début des années 80, l'inductibilité métallique des promoteurs de gènes métallothionéine (en particulier *MTI* de souris et *MT-IIa* de l'homme) a été intensivement étudiée par des techniques de "génétique inverse". Ces études ont permis l'identification des séquences de régulation métallique situées en cis et, tout récemment, des facteurs de transcription capables de s'y fixer.

Régulation métallique

Les séquences responsables de la régulation transcriptionnelle des métallothionéines par les métaux sont appelées MRE pour "Metal Responsive Elements" (Stuart et al., 1984; Carter et al., 1984). Elles sont présentes dans les promoteurs en plusieurs copies disposées dans les deux orientations possibles, assez proches du site d'initiation de la transcription (-200pb en général). Des comparaisons de séquences et des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de définir une séquence-consensus de huit nucléotides (Figure 5A). Les différents MRE d'un même promoteur n'ont pas tous le même pouvoir inducteur. En ce qui concerne le gène *MTI* murin, par exemple, MREd est le plus actif des six éléments présents dans ce promoteur (Stuart et al., 1985). D'autres éléments régulateurs (AP1, Sp1, GRE) sont souvent intercalés entre les différents MRE, ce qui suggère la possibilité d'interactions protéiques entre des facteurs de transcription nombreux et variés. La régulation métallique des métallothionéines pourrait ainsi dépendre à la fois d'un facteur de transcription dépendant des métaux, ou MRTF pour "Metallo-Regulatory Transcription Factor", mais aussi d'autres facteurs indépendants des métaux (Thiele, 1992). Cet "encombrement" autour des MRE est peut-être aussi responsable de la difficulté qu'ont rencontrée les chercheurs tentant d'isoler des MRTF chez les mammifères.

A

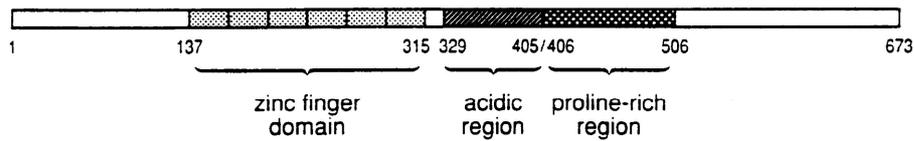
MRE consensus CTCTGCRNCGGCCC

ACE1 binding site TCY(4-6)GCTG

B

MAC1	M	I	I	F	N	G	N	K	Y	A	C	A	S	C	I	R	G	H	R	S	S	T	C	R	H	S	H	R	M	L	I	K	V	R	T	R	G	R	P	S
ACE1	M	V	V	I	N	G	V	K	Y	A	C	E	T	C	I	R	G	H	R	A	A	Q	C	T	H	T	D	G	P	L	Q	M	I	R	R	K	G	R	P	S
AMT1	M	V	V	I	N	G	V	K	Y	A	C	D	S	C	I	K	S	H	K	A	A	Q	C	E	H	N	D	R	P	L	K	I	L	K	P	R	G	R	P	P

C



D

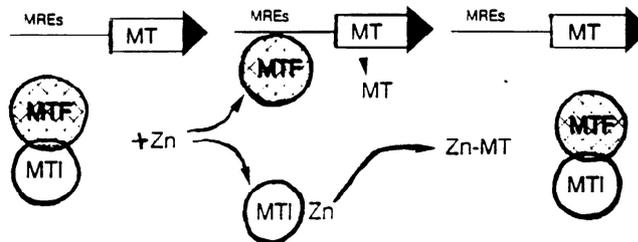


Figure 5: Régulation métallique de la transcription des gènes métallothionéine

A- Séquences consensus des MRE d'eucaryotes supérieurs et du site de fixation de ACE1 chez la levure (Thiele, 1992). B- Comparaison des facteurs MAC1, ACE1 et AMT1 de levure dans la région N-terminale conservée (Jungman et al., 1993). C- Schéma de la séquence protéique du facteur MTF1 de souris montrant les doigts de zinc et la région activatrice (Radtke et al., 1993). D- Modèle de la régulation des gènes métallothionéine par les métaux. La présence de zinc dissocie le complexe MTF1-MTI (inhibiteur), permettant ainsi à MTF1 d'interagir avec les MRE et d'activer la transcription du gène métallothionéine (Palmiter, 1994).

Toutes les stratégies utilisées consistaient à purifier les protéines se fixant sur les MRE et répondant au zinc. Plusieurs MRTF potentiels furent ainsi caractérisés biochimiquement chez la souris: MTF1 (Westin et Schaffner, 1988), MBF1 (Imbert et

al., 1989), MEP1 (Labbé et al., 1993). Malgré l'absence d'études de transcription in vitro, ces résultats suggèrent l'existence de plusieurs MRTF ayant une activité dépendante des métaux (Thiele, 1992).

Cette hypothèse fut récemment confirmée par les clonages de deux facteurs chez la souris: MTF1 (Radtke et al., 1993) et MafY (Xu, 1993). De façon intéressante, ces deux différents MRTF contiennent des séquences potentielles de doigts de zinc: six pour MTF1 (Figure 5B) et un seul pour MafY. La transcription de MTF1 est constitutive et n'est pas augmentée par addition de zinc, alors que son activité de fixation sur l'ADN est augmentée. Il y a donc une régulation traductionnelle ou post-traductionnelle de l'activité de MTF1. L'activité de Sp1, elle, n'est pas augmentée par le zinc (Radtke et al., 1993). Il semblerait que le zinc permette de libérer MTF1 de son inhibiteur spécifique (Palmiter 1994) (Figure 5D).

La régulation transcriptionnelle dépendante des métaux a d'abord été décrite chez les levures et mérite par conséquent d'être résumée ici (Thiele, 1992). L'unique gène métallothionéine de la levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae* est appelé *CUP1*. Son induction par le cuivre confère une meilleure résistance vis-à-vis de ce métal. Le gène *ACE1* code pour un facteur de transcription responsable de l'inductibilité métallique de *CUP1* (Thiele et al. 1988). Son site de fixation sur l'ADN a été déterminé (Figure 5A). La conformation active de la protéine ACE 1 nécessite la présence de cuivre. Cependant, la synthèse (transcription et traduction) de ce facteur n'est pas modifiée par l'addition de cuivre dans le milieu. La protéine AMT1 de la levure pathogène *Candida glabrata* ressemble beaucoup à ACE1 (Figure 5B). Les systèmes métallothionéine sont pourtant très différents entre ces deux espèces de levures. Un autre facteur de transcription, MAC1, ressemblant aux deux précédents, a récemment été isolé chez *Saccharomyces cerevisiae* (Figure 5B). D'un point de vue fonctionnel il est intéressant de savoir que, en plus de *CUP1*, *ACE1* régule le gène de la superoxyde dismutase (Cu-Zn SOD) et que *MAC1* contrôle l'expression de la catalase (Gralla et al., 1991; Jungman et al., 1993). En effet, ces deux enzymes constituent le principal système de défense contre les réactifs oxygénés. Ces relations inter-géniques vont dans le sens d'une implication des métallothionéines dans le système anti-oxydatif, comme nous le verrons au chapitre II-2.

Détoxification métallique

L'inductibilité métallique des gènes métallothionéine fit tout de suite penser que ces protéines pouvaient jouer un rôle dans la détoxification des métaux. Deux principaux types d'expériences permirent de confirmer ce rôle.

Premièrement, on observe une amplification des gènes métallothionéine dans des cellules sélectionnées pour leur résistance au cadmium. Dans une lignée cellulaire de souris résistante au cadmium, par exemple, le nombre de gène *MT1* est amplifié six fois (Beach et Palmiter, 1981). Chez la levure, l'amplification du gène *CUP1* confère une résistance accrue au cuivre (Hamer, 1986). Au niveau d'un organisme pluricellulaire entier, il a été montré que les duplications du gène métallothionéine *Mtn* trouvées dans des populations naturelles de drosophile étaient toutes associées à une meilleure résistance à l'intoxication par le cuivre ou le cadmium (Maroni et al., 1987; Lange et al., 1989).

Les organismes dépourvus de métallothionéines présentent une plus grande sensibilité à l'intoxication métallique. Ceci a été décrit chez la levure (Ecker et al., 1986) et chez la cyanobactérie *Synechococcus* (Turner et al., 1993). Récemment, deux équipes indépendantes ont obtenu par recombinaison homologue des souris mutantes pour les gènes *MT1* et *MT2* (Michalska et Choo, 1993; Masters et al., 1994). Ces lignées ne présentent pas d'autres phénotypes qu'une hyper-sensibilité à l'injection de cadmium.

Bien que le rôle des métallothionéines dans la détoxification métallique soit clairement démontré, il semble peu probable que ce soit la fonction première de ces protéines (Karin, 1985). En effet, certaines métallothionéines sont exprimées à un taux basal assez élevé, en dehors de toute exposition aux métaux toxiques. De plus, la faible concentration des ions métalliques dans les biotopes n'autorise probablement pas la formation d'une pression de sélection suffisante pour justifier l'existence d'un système de protection particulier. Par conséquent, il est raisonnable de penser que la fonction de détoxification métallique des métallothionéines est issue d'une fonction primaire plus générale dans le métabolisme des métaux.

Métabolisme des métaux

Il a été proposé que les métallothionéines jouaient le rôle d'un tampon intracellulaire autorégulé pour les ions cuivre et zinc (Richards, 1989). Leur présence dans des liquides extra-cellulaires comme le plasma, la bile et l'urine permet également de penser qu'elles participeraient au transport de ces ions. Cependant, les principaux transporteurs plasmatiques du cuivre sont l'albumine et la céruloplasmine (Chester, 1992). Le fort taux de zinc et de cuivre lié aux métallothionéines dans le foie des mammifères suggère également un rôle dans le stockage intra-cellulaire de ces ions. Enfin, les métallothionéines interviendraient dans l'absorption intestinale du cuivre et du zinc (Bremner, 1993). Pour le zinc, elles agiraient en collaboration avec une autre protéine riche en cystéine, la CRIP (Hempe et Cousins, 1991).

Un autre rôle fondamental des métallothionéines serait de réguler l'activité des métallo-protéines. Leur capacité de fixer les métaux et de les libérer autorise effectivement des échanges ioniques entre protéines. Une orientation de recherche intéressante pourrait être de considérer l'analogie entre les couples calmoduline/calcium et métallothionéine/cuivre-zinc. Cette hypothèse importante a été testée avec des enzymes et des facteurs de transcription. Il a été montré que la métallothionéine pouvait activer *in vitro* la pyridoxal kinase du cerveau, une enzyme dont le substrat est le Zn-ATP (Hao et al., 1993, Churchich et al., 1989). Des résultats comparables ont été obtenus avec la β -monooxygénase bovine (Markossian et al., 1988). Par ailleurs, l'apo-métallothionéine est capable d'inactiver de façon réversible les facteurs de transcription à doigts de zinc, Sp1 (Zeng et al., 1991a) et TFIIIA (Zeng et al., 1991b). Les résultats obtenus *in vitro* avec TFIIIA ont été confirmés *in vivo*. L'injection d'apo-métallothionéine dans l'ovocyte de xénope bloque en effet la synthèse d'ARN 5S qui dépend de ce facteur. Une activité normale est rétablie par injection de zinc (Zeng et al., 1991b). Les métallothionéines pourraient ainsi contrôler l'état d'activation des facteurs à doigts de zinc, notamment au cours du développement.

En conclusion, la nature des interactions entre les métallothionéines, les métaux et les métallo-protéines en condition naturelle dans un organisme entier demeure très

largement hypothétique. La viabilité et la fécondité normales des individus dont les gènes métallothionéine sont mutés semble indiquer que ces protéines ne sont pas essentielles dans des conditions de laboratoire. Il faudrait alors supposer que la redondance du système est plus importante que celle que nous connaissons. Nous pouvons également penser que les métallothionéines interviennent secondairement dans divers processus, afin d'aider les éléments spécifiques lorsqu'ils sont "débordés".

2. Métallothionéines et radicaux libres

Les radicaux libres sont des dérivés oxygénés très toxiques produits naturellement par l'activité respiratoire. Il s'agit de l'ion superoxyde O_2^- , du radical hydroxyle OH° et de l'eau oxygénée H_2O_2 . Chaque cellule possède donc un système de protection contre ces toxines qui peuvent attaquer toutes les macromolécules biologiques (protéines, lipides, acides nucléiques...) (Storz et al., 1990). Des enzymes spécifiques participent à cette détoxification (Figure 6A) mais aussi des antioxydants moins spécifiques (glutathion, transferrine, céruloplasmine). Cependant, aucun mécanisme de défense spécifique contre les radicaux hydroxyle (OH°) n'est connu. Récemment, l'implication des métallothionéines dans la protection contre les radicaux libres est devenue l'objet de nombreuses études (Sato et Bremner, 1993).

Induction par les radicaux libres

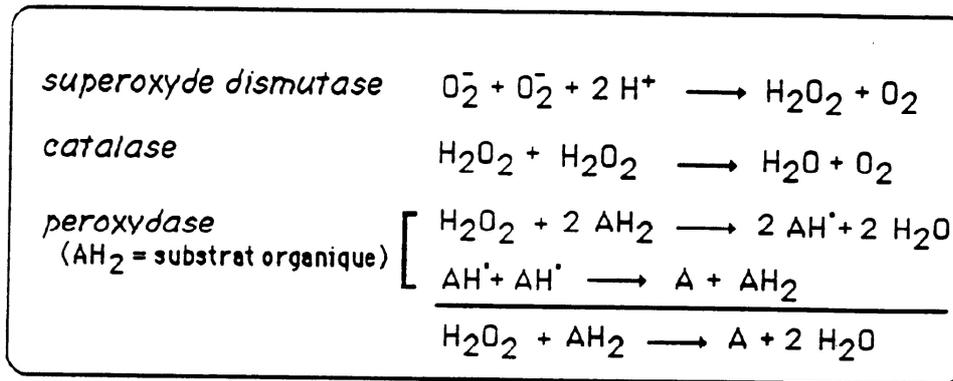
La synthèse des métallothionéines est inductible par de nombreux facteurs capables de générer la production de radicaux libres (Sato et Bremner, 1993). Ces facteurs peuvent être physiques (hyperoxygénation, irradiations aux UV ou aux rayons X...), chimiques (paraquat, tétrachlorure de carbone...) ou endogènes (cytokines).

Protection contre les radicaux libres

En 1985, Thornalley et Vasak ont montré que la métallothionéine de lapin était capable de piéger in vitro les radicaux hydroxyle OH° et les ions superoxyde O_2^- . Toutes les cystéines de la protéine seraient impliquées dans ce piégeage qui libérerait les métaux en oxydant les groupes thiols. L'ajout de métal et de glutathion réduit permet de récupérer une métallothionéine normale. Ces expériences menées in vitro suggéraient donc que les métallothionéines pouvaient jouer un rôle dans la protection contre le stress oxydatif en piégeant les radicaux libres.

Depuis 1985, de nombreuses études ont testé l'hypothèse d'un rôle des métallothionéines dans la protection contre les radicaux libres. Il a par exemple été montré que l'ADN de cellules de hamster privées de métallothionéines (par transfection avec un cDNA anti-sens) était plus sensible aux dommages provoqués par l'eau oxygénée. Inversement, l'ADN de cellules enrichies en métallothionéines (par induction au zinc) résiste mieux à un stress oxydatif (Chubatsu et Meneghini, 1993). De plus, dans ce dernier cas, les métallothionéines sont concentrées dans le noyau, une localisation indispensable pour protéger l'ADN...

A



B

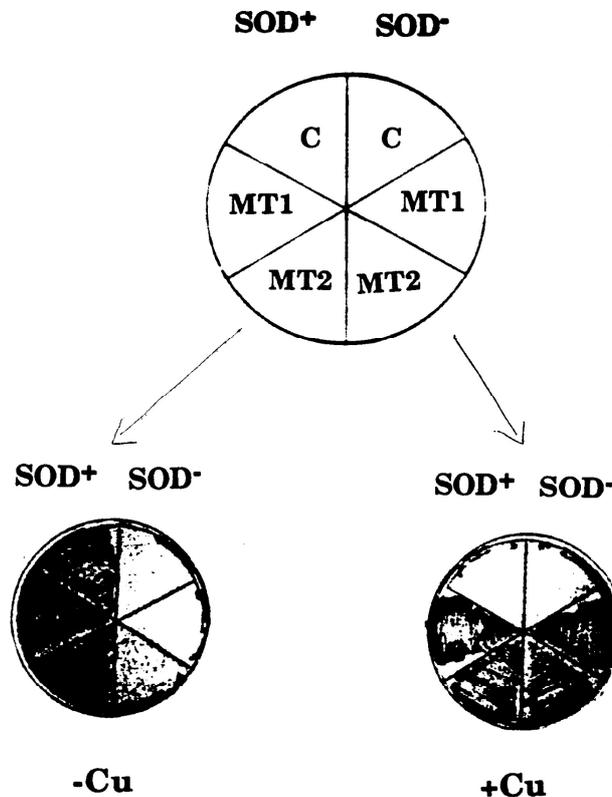


Figure 6: Protection contre les radicaux libres

A- Principales enzymes et réactions impliquées spécifiquement dans la protection contre les radicaux libres (Pelmont, 1989).

B- Les métallothionéines de singe peuvent se substituer fonctionnellement à la superoxyde dismutase (SOD) de levure. Des levures mutantes pour le gène *CUP1* sont cultivées sur un milieu aérobie privé de cystéine. De plus, elles sont SOD⁺ (sur la moitié gauche de chaque boîte) ou SOD⁻ (à droite). Dans ces conditions, un double mutant SOD⁻/*CUP1*⁻ meurt (quartiers blancs). Ce phénotype peut être sauvé après transformation avec un cDNA de MT1 ou MT2 de singe placé sous contrôle du promoteur *CUP1* et activé par du cuivre (Tamai et al., 1993). C= transformation avec un plasmide contrôle sans cDNA métallothionéine.

Des expériences menées *in vivo* ont également montré qu'une induction préalable par les métaux permettait une meilleure protection des organismes contre les radicaux libres (Sato et Bremner, 1993). Cependant, le manque de spécificité de ces traitements ne permet pas de confirmer l'hypothèse initiale. L'induction métallique peut en effet induire d'autres protéines protectrices.

À ce jour, la meilleure preuve d'un rôle anti-oxydant des métallothionéines a été obtenue chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Figure 6B). Une souche de levure mutante pour le gène de la superoxyde dismutase (*SOD1*) est très sensible au stress oxydatif. Elle a la possibilité de fermenter et ne peut survivre en aérobie que si le milieu est supplémenté en cystéine, lysine et méthionine. Sinon, toute activité respiratoire lui est fatale. Ce phénotype mutant peut être sauvé soit par l'induction du gène métallothionéine de levure, *CUP1*, soit par l'induction de transgènes contenant les cDNA de *MT1* ou *MT2* de singe (Tamai et al., 1993). Par conséquent, les métallothionéines de levure et de mammifère peuvent se substituer fonctionnellement à la SOD de levure. Ces auteurs ont également découvert que la protéine CUP1 possédait *in vitro* une activité anti-oxydante dépendante du cuivre. Rappelons enfin que le facteur de transcription ACE1 est responsable de la régulation par le cuivre des gènes *CUP1* et *SOD1* (Gralla et al., 1991). Tous ces résultats suggèrent fortement que les métallothionéines pourraient faire partie du système anti-oxydant des cellules eucaryotes.

Réponse immunitaire

Le système mitochondrial de transport d'électron n'est pas le seul producteur de radicaux libres. Les leucocytes phagocytaires utilisent en effet ces molécules pour tuer les cellules exogènes. Or l'induction des métallothionéines par différentes situations de stress impliquant le système immunitaire (Tableau 1) a suggéré que ces protéines étaient impliquées dans les mécanismes de défense de l'organisme (Cherian et Chan, 1993). La fonction anti-oxydante des métallothionéines pourrait être responsable de leur participation à la réponse immunitaire. L'induction des métallothionéines par un stress oxydatif se ferait, au moins partiellement, par l'intermédiaire de cytokines telles que l'interleukine-6 et le TNF- α , elles-mêmes sécrétés par les cellules du système immunitaire (Sato et al., 1993).

Malgré toutes les preuves montrant une induction des métallothionéines au cours de la réponse immunitaire, les mécanismes de ce mode de régulation demeurent inconnus. De même, la finalité de cette régulation est encore mal comprise. Même si la plupart des résultats suggèrent que les radicaux libres seraient la cible et/ou l'inducteur majeur des métallothionéines au cours de la réponse immunitaire, la preuve reste à apporter. Il n'est pas exclu, notamment, que les métaux, une fois libérés par les cellules tuées, jouent un rôle dans l'induction des métallothionéines au cours de la réponse immunitaire.

3. Métallothionéine et croissance neuronale: cas de GIF/MT3

L'isoforme mammalienne MT3 représente un cas à part parmi les métallothionéines puisqu'elle est la seule à posséder une fonction spécifique clairement établie qui est l'inhibition de la croissance neuronale.

Cette découverte provient de la mesure de l'activité neurotrophique dans le cerveau de malades atteints du syndrome d'Alzheimer. Une hypothèse attribuait la dégénérescence neuronale observée dans cette maladie à un manque d'inhibition des facteurs neurotrophiques, les neurones mourant "d'abondance". Uchida et al. (1991) confirmèrent cette hypothèse et purifièrent un facteur inhibiteur appelé GIF (Growth Inhibitory Factor) réprimé dans le cerveau des malades. La séquence de cette protéine révéla qu'il s'agissait d'une métallothionéine de 68 acides aminés, définissant un nouveau type d'isoforme baptisé MT3 (Uchida et al., 1991; Palmiter et al., 1992). Le cDNA humain a été cloné (Tsuji et al., 1992), ainsi que le gène homologue de souris (Palmiter et al., 1992) et le cDNA de rat (Kobayashi et al., 1993). La similitude entre ces trois protéines est grande (70-80%) et leur comparaison permet de définir la structure-type de l'isoforme MT3. Premièrement, la position des 20 cystéines est parfaitement conservée lorsque l'on aligne MT3 et les deux autres isoformes MT1 et MT2. Mais il existe deux types d'insertions qui caractérisent MT3: une thréonine en position 5 et six acides aminés en position C-terminale. De plus, la protéine MT3 est acide, contrairement à toutes les autres métallothionéines.

Le profil d'expression du gène *MT3* est également spécifique. Il est transcrit dans le système nerveux central mais pas dans le foie ni dans le rein et sa transcription est très faible dans le cerveau de malades atteints par la maladie d'Alzheimer (Tsuji et al., 1992). Ce gène n'est pas inductible par injection de zinc, de cadmium ou d'endotoxine bactérienne, contrairement aux autres métallothionéines (Palmiter et al., 1992). La protéine purifiée peut inhiber la croissance de neurones en culture (Uchida et al., 1991; Tsuji et al., 1992). In vivo, la protéine serait présente dans les astrocytes de la matière grise (Uchida et al., 1991).

Pour l'instant, la relation entre les spécificités fonctionnelles et structurales de MT3 n'est pas comprise (Kille et al., 1994). La MT3 humaine contient du cuivre et du zinc (Uchida et al., 1991), mais son expression dans le système nerveux semble indépendante des métaux. On sait par ailleurs que les métallothionéines MT1 et MT2 sont présentes dans les astrocytes du cerveau des mammifères et jouent probablement un rôle dans le métabolisme du zinc du système nerveux (Suzuki et al., 1993). Il a récemment été démontré que la dégénérescence neuronale de Alzheimer était en partie provoquée par un stress oxydatif important (Behl et al., 1994). Le fait que le gène *MT3* soit réprimé dans de telles conditions accentue sa différence avec les autres métallothionéines.

La protéine MT3 offre donc le cas assez provocant d'une métallothionéine dont l'activité biologique est connue mais probablement indépendante à la fois des métaux et des radicaux libres!... Il serait intéressant de savoir si une telle spécificité fonctionnelle existe dans les systèmes métallothionéine d'invertébrés.

4. Conclusion

L'étude fonctionnelle des métallothionéines a longtemps été axée sur la détoxification métallique. Néanmoins, ce rôle est probablement secondaire par rapport à une fonction plus générale dans le métabolisme métallique. Dans des conditions normales, les métallothionéines participeraient à l'homéostasie des métaux et, en cas de pollution métallique, leur synthèse serait induite afin de protéger l'organisme. Les métabolismes des ions métalliques et des radicaux libres étant étroitement liés, il est

intéressant de constater que les métallothionéines participent aux deux systèmes à la fois. N'auraient-elles que ces deux partenaires, métaux et radicaux libres, les métallothionéines pourraient intervenir dans une multitude de processus biologiques. Mais la question de leur spécificité, posée par exemple par MT3, demeure sans réponse.

III MÉTALLOTHIONÉINES ET DÉVELOPPEMENT

Un être vivant a besoin de métaux tout au long de sa vie. Il synthétise par ailleurs des métallothionéines à tous les stades de son développement. Étudier l'expression embryonnaire des métallothionéines devrait permettre d'identifier les fonctions normales de ces protéines.

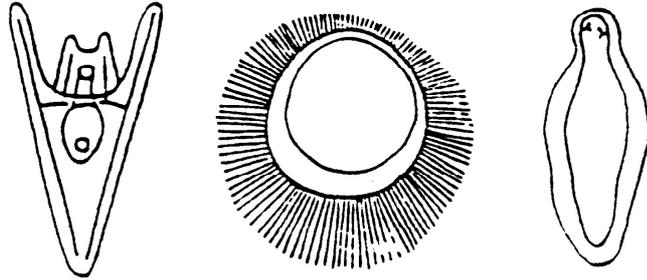
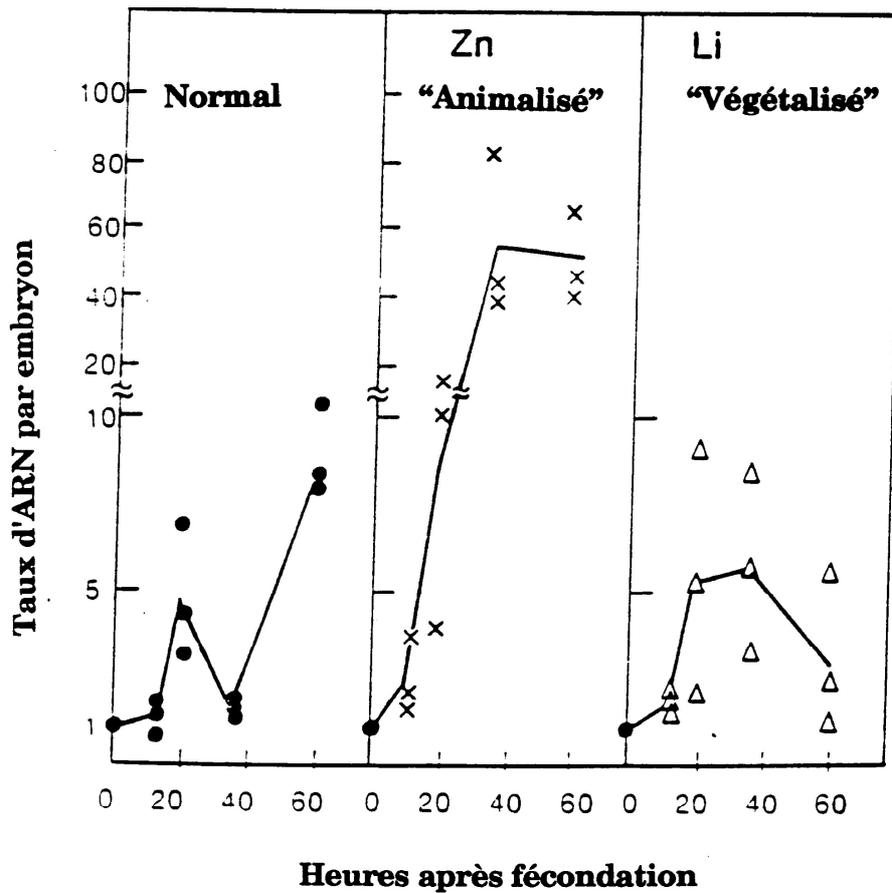
1. Métaux et développement

Des éléments essentiels

Lorsqu'ils sont présents à des concentrations normales et liés à des protéines, le cuivre et le zinc sont essentiels pour une embryogenèse correcte. Ces métaux déterminent en effet le bon fonctionnement de nombreuses enzymes et protéines régulatrices. Le zinc, par exemple, est le co-facteur essentiel des facteurs de transcription dits "à doigts de zinc". De nombreux régulateurs développementaux de la drosophile appartiennent à cette catégorie (*hunchback*, *Krüppel*, *odd skipped*...). Le zinc est également nécessaire à l'activité des métalloprotéinases, des enzymes qui sont impliquées dans la morphogenèse en remodelant la matrice extra-cellulaire (Matrisian, 1990). Si les métallothionéines sont effectivement des protéines échangeuses d'ions, alors elles pourraient jouer un important rôle indirect dans la régulation des processus développementaux de base.

Des éléments toxiques

Par ailleurs, à l'état libre, les ions métalliques sont toxiques car ils catalysent la formation de dérivés oxygénés capables de détruire tous les types de macro-molécules biologiques. Le cuivre, à cet égard, est un ion particulièrement réactif (Stadtman, 1990). Il peut être parfois nécessaire de pouvoir neutraliser de grandes quantités d'ions métalliques libérés dans certaines conditions normales. Les métallothionéines font partie des meilleurs candidats possibles pour effectuer ce piégeage. Un bon exemple d'une telle "intoxication naturelle" a été décrit chez un crustacé. Au cours de sa mue, le crabe bleu subit un renouvellement complet de son pigment respiratoire, l'hémocyanine, dont la dégradation libère de grandes quantités de cuivre. Les corrélations observées entre les variations de concentrations en cuivre, en hémocyanine et en métallothionéine permettent de penser que cette dernière joue un rôle dans la détoxification du cuivre au cours de la mue du crabe bleu (Engel et Brouwer, 1991).

A**B****Figure 7: Expression embryonnaire des métallothionéines**

A- Effet des métaux sur l'embryon d'oursin. Larve pluteus normale (à gauche), embryon "animalisé" par le zinc (au milieu) ou "végétalisé" par le lithium (à droite) (d'après Lallier, 1975).

B- Variation du taux d'ARNm de métallothionéine au cours du développement normal de l'oursin et pendant un développement "animalisé" ou "végétalisé". Le stade blastula est atteint vers 20 heures, le stade gastrula vers 40 heures et la larve pluteus vers 60 heures (d'après Nemer et al., 1984).

Des éléments tératogènes

Une autre preuve de l'importance des métaux pour le développement est apportée par l'étude de leurs effets tératogènes à des concentrations rendues artificiellement anormales (Hurley, 1981). Une déficience en zinc, par exemple, produit des anomalies chez le fœtus de souris et retarde sa croissance (Webb, 1987). Une surabondance de métal a aussi en général un effet tératogène. Un exemple bien décrit est celui des oursins (Figure 7). Une augmentation de la concentration en zinc dans le milieu d'élevage provoque une "animalisation". L'embryon ne différencie alors plus que de l'ectoderme. Ce phénomène peut être interprété comme un blocage du développement au stade blastula accompagné d'une différenciation anormale de l'ectoderme. Le cadmium et le mercure "animalisent" plus faiblement que le zinc alors que le lithium a un effet inverse puisqu'il "végétalise" l'embryon (Lallier, 1975; Nemer, 1986). C'est après le criblage d'une banque d'oursin avec des sondes provenant d'embryons animalisés ou non que le premier cDNA métallothionéine d'oursin a été cloné (Shepherd et al., 1983; Nemer et al., 1984).

L'importance des métaux pour le développement est donc un fait avéré et connu depuis longtemps. Mais cette connaissance ne fait que suggérer l'implication des métallothionéines dans ce processus. L'étude du profil d'expression des métallothionéines au cours de l'embryogenèse a permis de confirmer cette suggestion.

2. Expression embryonnaire des métallothionéines

Expression précoce et différentielle

La présence des métallothionéines dans les embryons a été observée dans des espèces très diverses. Chez les invertébrés, des métallothionéines embryonnaires ont été détectées chez l'oursin (Nemer et al., 1984), la drosophile (Silar et al., 1990), et l'huître (Ringwood et Brouwer, 1993). Chez les vertébrés, la transcription précoce des gènes métallothionéine a été observée chez le lapin (Andrews et al., 1987), la truite (Olsson et al., 1990), la souris (Andrews et al., 1991) et le xénope (J.P. Muller, communication personnelle). Même chez les plantes, les métallothionéines sont exprimées au cours de l'embryogenèse. Il a en effet été démontré que l'unique gène métallothionéine du blé était fortement exprimé dans des embryons immatures, alors que ses transcrits étaient indétectables dans des embryons après germination (Kawashima et al., 1992).

Chez les espèces où plusieurs gènes métallothionéine sont connus on observe qu'ils s'expriment de façon différentielle. Cette différence peut être quantitative et affecter le niveau d'expression des différents gènes ou qualitative et modifier le profil d'expression spatio-temporelle. Chez la truite *Salmo gairdneri*, par exemple, le gène *MTA* est toujours plus exprimé que le gène *MTB*. De plus, l'expression continue des gènes métallothionéine au cours de l'embryogenèse connaît deux pics. Le premier pic à la gastrulation est dû à l'augmentation conjointe du taux d'expression des deux gènes *MTA* et *MTB*, alors que seul *MTA* est responsable du deuxième pic au moment de l'éclosion. Il existe donc une différence entre la régulation temporelle des deux gènes (Olsson et al., 1990). Des résultats comparables ont été décrits chez l'oursin (Nemer et al., 1984), le lapin (Andrews et al., 1987), la drosophile (Silar et al., 1990) et la souris (Andrews et al., 1991). La variabilité d'expression des différents gènes de

métallothionéines à l'intérieur d'une même espèce semble indiquer l'existence d'une spécialisation fonctionnelle de chaque isoforme.

Deux systèmes ont été étudiés de façon approfondie et méritent donc d'être détaillés ici. Il s'agit des embryons d'oursin et de rongeurs.

Expression embryonnaire des métallothionéines chez les oursins

Chez l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus*, les deux gènes *SpMTA* et *SpMTB* sont exprimés dans l'ovocyte où l'ARNm *SpMTA* représente 95% des transcrits métallothionéine. La présence de métallothionéines dans l'ovocyte non fécondé n'a été observée que chez quatre espèces d'oursin parmi les huit étudiées. Dans les quatre autres espèces le zinc est fixé à une protéine encore non identifiée mais qui n'est pas une métallothionéine (Scudiero et al., 1994). Le taux d'expression de *SpMTA* atteint un pic dans la blastula puis diminue au cours de la gastrulation avant d'augmenter fortement au stade de la larve pluteus (Figure 7B). A ce dernier stade, les transcrits de *SpMTA* sont localisés exclusivement dans l'ectoderme aboral alors que les transcrits *SpMTB* sont présents dans l'ectoderme oral et l'intestin embryonnaire. L'addition de zinc dans le milieu d'élevage induit les deux gènes sans provoquer d'expression ectopique (Angerer et al., 1986; Wilkinson et Nemer, 1987; Nemer et al., 1991). Les études menées chez l'oursin *Paracentrotus lividus* ont montré un profil d'expression des métallothionéines comparable à celui de *Strongylocentrotus purpuratus* (De Prisco et al., 1991).

Chez les embryons d'oursin on observe donc une expression précoce et continue des gènes métallothionéine au cours de l'embryogenèse. Les isoformes se différencient par leur taux d'expression et leur localisation, ce qui suggère des fonctions différentes.

Expression embryonnaire des métallothionéines chez les rongeurs

Chez la souris, les deux gènes métallothionéine *MT1* et *MT2* sont exprimés dans l'ovocyte et jusqu'au stade blastula. Ils sont inductibles in vitro par le zinc et le cadmium dès le stade 4 cellules. Le gène *MT2* est toujours plus exprimé que le gène *MT1* (Andrews et al., 1991). Au site d'implantation du blastocyste dans la membrane utérine, on observe une forte expression des gènes métallothionéine et l'accumulation de monocytes et de neutrophiles. Ces cellules interviennent dans le processus d'inflammation locale qui accompagne l'implantation de l'embryon en synthétisant des cytokines et des radicaux libres, deux inducteurs des gènes métallothionéine (McMaster et al., 1993).

Beaucoup d'attention a été portée à l'expression hépatique des métallothionéines. Aussi bien chez la souris que chez le rat, les métallothionéines sont abondamment exprimées dans le foie fœtal. On observe une diminution de ce taux après la naissance et le taux mesuré dans le foie adulte est toujours inférieur à celui observé durant la vie fœtale (Ouelette, 1982; Piletz et al., 1983). La seule action régulatrice des métaux ne suffit pas pour expliquer ces modulations. Il a été montré que la corticostérone, une hormone glucocorticoïde, était responsable de l'induction du gène *MT1* dans le foie de souris en développement (Quaife et al., 1986).

Les métallothionéines sont cytoplasmiques dans le foie de fœtus de rat puis nucléaires juste après la naissance. Ensuite, la répartition s'équilibre progressivement entre le noyau et le cytoplasme (Chan et Cherian, 1993). Une localisation nucléaire des métallothionéines a également été démontrée dans le placenta et dans le rein fœtal (Nishimura et al., 1989; Hazelhoff-Roelfzemer et al., 1989). La présence de métallothionéines à zinc dans le noyau est peut-être significative d'une fonction de régulation de l'activité génique au cours du développement.

En dehors du foie, les gènes métallothionéine sont fortement exprimés dans les tissus environnant l'embryon tels que l'endoderme du sac vitellin et le placenta (Andrews et al., 1984). Ces organes piègent les métaux lors d'une intoxication de la mère avec du zinc ou du cadmium (De et al., 1989).

Les études menées sur les embryons de rongeur mettent en évidence une régulation très complexe. Le rôle des métallothionéines dans le développement semble être réalisé selon différentes voies: nutrition, détoxification, réponse immunitaire, régulation génique. Néanmoins, il faut savoir qu'une souris déficiente pour les gènes *MT1* et *MT2* (il existe au moins deux autres gènes chez la souris, *MT3* et *MT4*) se développe normalement (Michalska et Choo, 1993; Masters et al., 1994). Les métallothionéines seraient donc utiles mais non indispensables pour l'embryogenèse des mammifères.

3. Conclusion

La précocité ainsi que l'expression tissu-spécifique des métallothionéines au cours du développement suggèrent une certaine spécialisation fonctionnelle de ces protéines. Néanmoins, aucune étude exhaustive de l'expression embryonnaire de toutes les isoformes de métallothionéines d'une espèce donnée n'est encore disponible. Et si l'action des métallothionéines semble passer par des processus très divers, les premiers résultats de l'analyse génétique n'apportent pour l'instant aucun éclaircissement notoire. L'étude de l'expression développementale des métallothionéines a donc permis de confirmer l'existence d'un rôle fondamental de ces protéines, sans en préciser la nature et l'importance. Pour éclaircir ce point il convient de choisir un modèle expérimental permettant une analyse génétique et moléculaire. La souris est un bon modèle, la drosophile en est un autre, au développement encore mieux connu.

IV LE SYSTÈME MÉTALLOTHIONÉINE DE LA DROSOPHILE

Au milieu des années 80, la drosophile fut choisie comme organisme modèle pour l'étude des métallothionéines par deux laboratoires, celui de Gustavo Maroni à l'Université de Caroline du Nord et celui de Maurice Wegnez à l'Université d'Orsay. Pour comprendre la fonction de ces protéines dans un organisme pluricellulaire il convenait en effet de choisir un animal modèle permettant de combiner, comme chez la levure, des approches de génétique classique et de biologie moléculaire. Nous allons voir que, de 1985 à 1990, les deux gènes constituant le système métallothionéine de *Drosophila melanogaster*, *Mtn* et *Mto*, ont été clonés et que leur rôle dans la détoxification métallique a été en partie élucidé. La grande divergence structurale existant entre les deux gènes de ce système suggère une divergence fonctionnelle.

1. Deux gènes métallothionéine chez la drosophile: *Mtn* et *Mto*

Les deux stratégies de clonage employées reposent sur la propriété d'inductibilité transcriptionnelle des gènes métallothionéine par les métaux. Cette propriété permet de sélectionner par criblage différentiel d'une banque de cDNA les clones surexprimés après induction métallique.

Identification du gène *Mtn*

L'intoxication de larves de drosophiles par du cuivre ou du cadmium conduit à l'accumulation de ces métaux dans l'intestin où ils induisent l'apparition d'une petite protéine ayant les caractéristiques d'une métallothionéine (Maroni et Watson, 1985). Le premier cDNA métallothionéine de drosophile, baptisé *Mtn*, a été obtenu par criblage différentiel d'une banque cDNA de larves traitées au cuivre avec des sondes cDNA de larves induites ou non par du cuivre (Lastowski-Perry et al., 1985). Il code pour une protéine dont la séquence et la composition de ses 40 acides aminés sont caractéristiques des métallothionéines. L'utilisation de ce cDNA comme sonde a permis le clonage du gène *Mtn* qui contient un seul intron et possède des MRE dans son promoteur. Le gène *Mtn* est localisé sur le bras droit du chromosome III en 85E (Maroni et al., 1986).

Identification du gène *Mto*

L'équipe de M. Wegnez a d'abord choisi de sélectionner une lignée cellulaire résistante au cadmium. La lignée CdR200 résiste à des concentrations vingt fois supérieures à celles que supporte la lignée embryonnaire D dont elle est issue. Les cellules de cette lignée accumulent une petite protéine ayant les caractéristiques d'une métallothionéine (Debec et al., 1985). Un deuxième cDNA métallothionéine de drosophile, baptisé *Mto*, a été obtenu par criblage différentiel d'une banque cDNA de cellules CdR200 avec des sondes de cellules traitées ou non par du cadmium (Mokdad et al., 1987). Le cDNA *Mto* code pour une protéine de 43 acides aminés ayant les caractéristiques d'une métallothionéine. Le clonage du gène *Mto* a révélé, comme pour *Mtn*, la présence d'un seul intron et de MRE dans le promoteur. Le gène *Mto* est localisé sur le bras droit du chromosome III en 92E (Silar et al., 1990).

Existe-t-il d'autres gènes métallothionéine chez la drosophile?

Toutes les données disponibles à l'heure actuelle indiquent que le génome de la drosophile ne contient que deux gènes métallothionéine. En effet, l'utilisation de sondes *Mtn* ou *Mto* pour analyser l'ADN génomique par "Southern blotting" ou par hybridation sur chromosomes polytènes ne révèle pas d'autres gènes que ceux déjà connus. L'existence d'une troisième métallothionéine chez la drosophile supposerait alors que le gène correspondant diverge autant de *Mto* que de *Mtn* qui ne se ressemblent déjà qu'à 50% au niveau de la séquence nucléique. Il pourrait s'agir, par exemple, d'une métallothionéine de classe I comme il en existe chez le crabe, un autre arthropode. L'existence d'une troisième métallothionéine, bien que non prouvée, ne peut pas être définitivement exclue.

2. Comparaison structurale de *Mtn* et de *Mto*

Chez les vertébrés, deux métallothionéines de la même espèce se ressemblent en général à 80%. Chez la drosophile, par contre, la comparaison des séquences protéiques de *Mtn* et de *Mto* indique un très faible pourcentage de similitude égal à 26%. Ce chiffre est à rapprocher des 25% de similitude que l'on obtient en comparant deux métallothionéines aléatoires (Erraïss et al., 1989). En réalité, les séquences sont tellement différentes qu'il est très difficile de les aligner. Ces différences posent deux types de problèmes:

- les gènes *Mtn* et *Mto* ont-ils une origine évolutive commune?
- les protéines MTO et MTN ont-elles des fonctions différentes?

L'analyse de la structure des gènes permet de répondre à la première question. En effet, même si les sondes de ces gènes ne croisent pas à cause d'une divergence nucléotidique de 50%, deux caractéristiques permettent de soutenir l'hypothèse d'une origine évolutive commune entre les gènes *Mtn* et *Mto*. Premièrement, la position de l'unique intron de chacun des deux gènes est conservée quand on respecte le meilleur alignement des deux protéines (Figure 8A). Deuxièmement, on retrouve dans les régions régulatrices de ces deux gènes des motifs MRE et AP1 également présents dans tous les promoteurs de gènes métallothionéine de vertébrés et d'invertébrés (Figure 8B). Il est peu probable qu'un phénomène de convergence évolutive puisse générer de telles ressemblances.

La deuxième question concernant une possible divergence fonctionnelle entre les protéines MTO et MTN nécessite de plus amples recherches. Le chapitre suivant résume les principales données qui étaient disponibles en 1990.

3. Comparaison fonctionnelle de *Mtn* et de *Mto*

Détoxification métallique

Le premier rôle attribué aux métallothionéines de drosophile fut celui de la détoxification des métaux. En effet, l'étude préliminaire au clonage de *Mtn* avait montré une co-accumulation des ions cuivre et cadmium avec une métallothionéine dans une partie de l'intestin moyen larvaire (Maroni et Watson, 1985). Une étude ultra-structurale et électronique montra que, après intoxication des larves, le cuivre et le cadmium sont associés dans l'intestin moyen à des molécules soufrées localisées probablement dans des lysosomes (Lauverjat et al., 1989).

Par ailleurs, l'impossibilité de purifier la protéine MTN à partir d'extraits de drosophile avait suggéré que cette protéine puisse être séquestrée sous une forme insoluble dans des lysosomes (Silar et al., 1990). La présence de métallothionéines dans des lysosomes a déjà été mentionnée chez une blatte (Bouquegneau et al., 1985) et chez des mammifères (Richards, 1989). La protéine MTN a finalement pu être détectée à partir de cellules de *Saccharomyces cerevisiae* transformées par le cDNA *Mtn* sous contrôle d'un promoteur de levure (Silar et Wegnez, 1990). Contrairement à MTN, la purification de la protéine MTO ne pose aucun problème (Silar et al., 1990).

L'ensemble de ces indices suggéraient que les métallothionéines de la drosophile pouvaient intervenir dans la protection contre une intoxication par les métaux en piégeant ceux-ci au niveau de leur zone d'absorption, c'est-à-dire l'intestin.

L'inductibilité transcriptionnelle des gènes *Mtn* et *Mto* par les métaux est une condition nécessaire (mais non suffisante) pour qu'ils puissent jouer un rôle dans la détoxification métallique. Comme chez les vertébrés, on trouve dans les promoteurs de ces deux gènes les motifs MRE responsables de l'inductibilité métallique. La fonctionnalité de ces séquences n'a pas été démontrée chez la drosophile mais un tout petit fragment (373 pb) du gène *Mtn* contenant ses deux MRE constitue un promoteur inductible par le zinc dans des cellules de hamster (Otto et al., 1987). Quatre ions, le cadmium, le cuivre, le mercure et l'argent sont capables d'induire la transcription des gènes *Mtn* et *Mto* chez les mouches adultes (Silar et al., 1990). Le cadmium a un effet plus fort que le cuivre sur *Mto* alors que c'est l'inverse pour *Mtn*. L'inductibilité des gènes *Mtn* et *Mto* par les métaux ne prouve cependant pas qu'ils aient un rôle dans la détoxification métallique.

Une preuve fonctionnelle d'un tel rôle a été apportée pour *Mtn* par l'étude de mouches porteuses d'une duplication de ce gène. Six types de duplications de *Mtn* ont été trouvées dans les populations naturelles en Europe et en Amérique du Nord mais pas en Afrique centrale. Toutes sont associées à une surexpression des transcrits *Mtn* et à une résistance accrue à l'intoxication par le cuivre ou le cadmium (Maroni et al., 1987; Lange et al., 1990). Nous pouvons remarquer que les régions d'Europe et d'Amérique où ont été trouvées les duplications de *Mtn* connaissent une pollution industrielle plus importante que celles d'Afrique où aucune duplication n'a été trouvée. Signalons également que parmi les habitats préférés des drosophiles figurent les vignobles et les vergers où l'homme utilise abondamment des fongicides à base de sulfate de cuivre, lesquels réduisent la viabilité et la fécondité des mouches. Une duplication du gène *Mtn* pourrait donc conférer un avantage sélectif dans un environnement pollué par des métaux.

Contrairement à *Mtn*, aucune duplication du gène *Mto* n'a été trouvée dans des souches naturelles (Lange et al., 1990) ou de laboratoire (Silar et al., 1990). Les duplications de *Mto*, si elles existent, sont donc très rares. Ces observations suggèrent que le gène *Mto* n'avait probablement qu'une faible influence sur la résistance aux pollutions métalliques.

Expression développementale

L'équipe de M. Wegnez s'est rapidement intéressée au rôle potentiel de *Mtn* et *Mto* au cours du développement. Le profil d'expression temporelle de ces deux gènes a été établi par Northern blot (Silar et al., 1990) (Figure 9). Là encore on observe des différences importantes entre *Mtn* et *Mto*. Les transcrits *Mtn* sont détectés après la gastrulation, dans la deuxième moitié de l'embryogenèse qui correspond à la phase dite "d'organogenèse". Cette expression est maintenue pendant les phases larvaires et chez l'adulte. Les transcrits *Mto*, eux, sont présents tout au long de la vie embryonnaire et chez les larves. Ils sont aussi détectés dans les ovaires. Le niveau d'expression de *Mto* est globalement inférieur à celui de *Mtn*. Ces résultats suggèrent d'abord que les métallothionéines de drosophile peuvent jouer un rôle au cours du développement. L'expression très précoce de *Mto* est, à cet égard, particulièrement intéressante. L'expression différentielle des deux gènes montre par ailleurs qu'ils ont des modalités de régulation différentes.

4. Conclusion

Comparé à celui des vertébrés, le système métallothionéine de *Drosophila melanogaster* est à la fois simple et différencié. Simple, car il ne contient que deux gènes alors que le système des métallothionéines de vertébré s'organise en petites familles multigéniques. Cette faible redondance est évidemment très importante si l'on envisage une mutagenèse. C'est aussi un système bien différencié, tant sur le plan structural que régulateur. Ces divergences suggèrent l'existence d'une différence fonctionnelle entre les deux protéines. Il a été proposé que MTN serait plus particulièrement impliqué dans la détoxification métallique alors que le rôle de MTO concernerait principalement l'homéostasie des métaux (Silar et al., 1990).

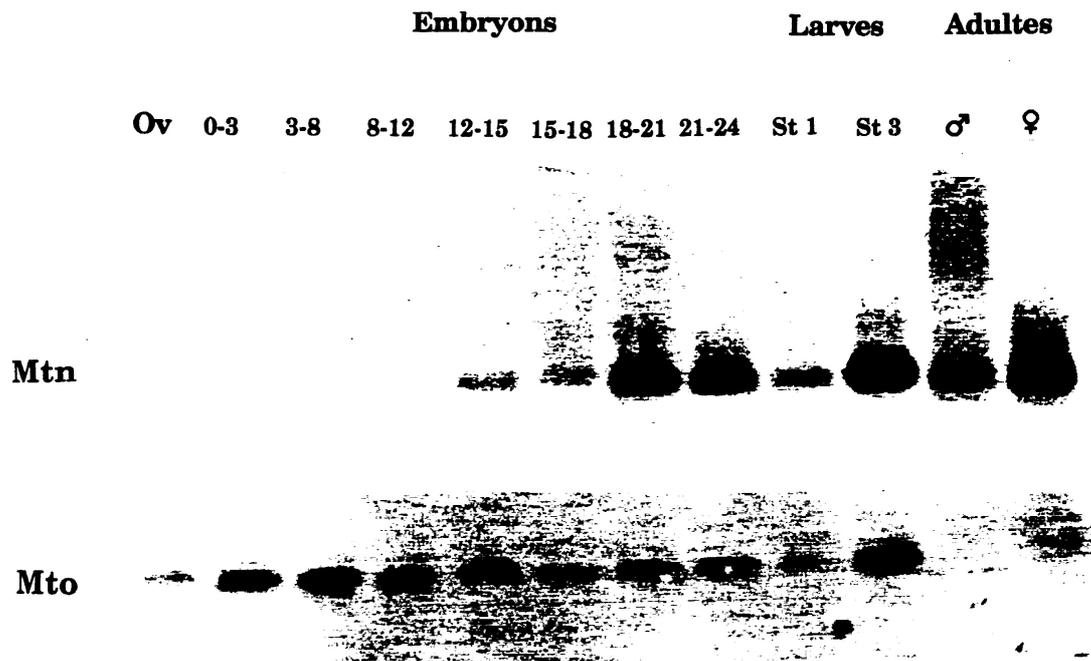


Figure 9: Expression temporelle des gènes métallothionéine chez la drosophile

Le gène *Mtn* est exprimé à partir de la deuxième moitié du développement embryonnaire et jusque chez l'adulte. *Mto* est transcrit pendant toute la vie embryonnaire et larvaire. L'expression ovarienne de *Mto* (Ov) explique probablement la présence d'un signal dans la piste correspondant aux femelles adultes. Pour *Mtn*, une sonde cDNA a été utilisée et le temps d'exposition est de 3 jours. Pour *Mto*, une sonde cRNA a été utilisée et le temps d'exposition est de 20 heures. Les niveaux d'intensité des signaux de ces deux "Northern blot" ne sont donc pas comparables. Les chiffres indiquent l'âge, en heures, des embryons. (d'après Silar et al., 1990)

RÉSULTATS

Chapitre I : Expression embryonnaire du gène *Mtn*

1. Résumé de l'article 1¹

Introduction

Les métallothionéines joueraient un rôle important au cours de l'embryogenèse en tant que protéines échangeuses d'ions. On sait en effet que de nombreux facteurs de transcription indispensables pour une différenciation correcte de l'embryon ont besoin de zinc. L'expression des métallothionéines au cours du développement a surtout été étudiée chez l'oursin et la souris. Pour ce genre d'étude, le système métallothionéine de la drosophile présente plusieurs avantages. Premièrement, il n'implique que deux gènes alors que les gènes métallothionéine des oursins et de la souris s'organisent en familles multigéniques de 5 et 4 membres, respectivement. De plus, la différenciation existant entre *Mtn* et *Mto* est très grande et reflète peut-être des spécialisations fonctionnelles assez éloignées. Ainsi, par l'étude de seulement deux gènes, nous pouvons espérer obtenir une vue d'ensemble des diverses voies physiologiques dans lesquelles sont impliquées les métallothionéines. Enfin, la drosophile est l'organisme dont le développement est le mieux connu. Afin de connaître le profil d'expression des métallothionéines au cours du développement précoce, j'ai entrepris une analyse par hybridation in situ sur ovaires et sur embryons entiers.

Résultats et discussion

Une des principales différences entre les deux gènes métallothionéine de la drosophile est l'expression spécifique de *Mto* au cours de la première moitié de l'embryogenèse. Aux autres stades, les deux gènes sont exprimés en même temps. Le gène *Mto* étant exprimé à un taux très faible, ses transcrits sont indétectables par hybridation in situ, même après induction au cuivre. Afin de connaître le(s) site(s) de l'expression embryonnaire de *Mto* il sera sans doute nécessaire de fabriquer des anticorps dirigés contre la protéine MTO.

L'expression ovarienne de *Mtn* est localisée dans les cellules folliculaires qui sont interposées entre l'ovocyte et l'hémolymphe. La surexpression de *Mtn* dans ces cellules après intoxication au cuivre laisse penser qu'elles sont impliquées dans la protection de l'ovocyte au cours de la vitellogenèse. Une analogie peut être faite avec les annexes extra-embryonnaires des mammifères qui protègent le fœtus et surexpriment également les métallothionéines.

Au cours de la deuxième partie de l'embryogenèse, les transcrits du gène *Mtn* sont présents dans les tubes de Malpighi, l'endoderme du mésentéron et certains hémocytes.

¹ Bonneton F. et Wegnez M. Developmental variability of metallothionein *Mtn* gene in the species of the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Developmental genetics*, 1995, 16: 253-263.

Les tubes de Malpighi jouent un rôle analogue à celui des reins chez les vertébrés et sont impliqués dans la détoxification métallique. La signification biologique de l'expression de *Mtn* dans cet organe est donc probablement liée à l'excrétion des métaux. Le fait qu'une intoxication de la mère par le cuivre induise la surexpression de ce gène dans les tubes de Malpighi renforce cette hypothèse et suggère que cet organe est déjà actif avant l'éclosion. Le rein est un des principaux sites d'expression des métallothionéines chez les mammifères adultes.

L'expression de *Mtn* dans l'intestin moyen suggère un rôle dans l'absorption des métaux. En effet, le mésentéron entoure progressivement tout le vitellus en cours de dégradation. Le vitellus étant une réserve nutritive, il est très probable que cette dégradation libère un grand nombre de métaux. Ainsi, *Mtn* pourrait aussi jouer un rôle dans l'absorption des métaux au niveau du mésentéron. Remarquons que le foie fœtal des rongeurs est un site de forte synthèse des métallothionéines.

Une étude de la répartition du zinc et du cuivre dans l'embryon permettrait sans doute de mieux comprendre la localisation embryonnaire de *Mtn*.

La présence des transcrits de *Mtn* dans ce qui est probablement une sous-population d'hémocytes est un peu inattendue et difficile à interpréter. Ces cellules se transforment en macrophages qui sont impliqués dans la réponse immunitaire, mais on ne sait pas quel pourrait être leur rôle dans l'embryon. Cette localisation pourrait révéler un rôle indépendant des métaux. En effet, la production locale de radicaux libres par des cellules du système immunitaire est un phénomène bien connu.

Deux allèles de *Mtn* (*Mtn*¹ et *Mtn*⁻³) ont été caractérisés chez *D. melanogaster*. Une différence du taux de transcription entre l'allèle *Mtn*¹ et l'allèle *Mtn*⁻³ ayant été décrite, j'ai analysé la localisation de ces transcrits dans les embryons. J'ai ainsi observé que l'expression de *Mtn*⁻³ était plus faible que celle de *Mtn*¹ dans le mésentéron. Dans une des souches étudiées, cette expression est même quasi nulle. Cette variabilité intraspécifique m'a amené à étudier le profil d'expression embryonnaire de *Mtn* dans les différentes espèces du sous-groupe *melanogaster*. En effet, nous savions que l'allèle *Mtn*¹ n'est trouvé que chez *D. melanogaster* alors que les sept autres espèces de ce sous-groupe ne possèdent que des gènes de type *Mtn*⁻³.

J'ai découvert une variabilité assez surprenante du profil d'expression embryonnaire de *Mtn* dans les espèces du sous-groupe *melanogaster*. Des différences temporelles, spatiales et quantitatives ont été observées. L'expression de *Mtn* dans les tubes de Malpighi est par exemple spécifique de *D. melanogaster* tandis que l'expression dans l'amnioséreuse, une annexe embryonnaire, n'est observée que dans les embryons de *D. mauritiana* et *D. sechellia*. Malgré cette variabilité, l'expression de *Mtn* dans le mésentéron est retrouvée chez toutes les espèces. Cette constance suggère fortement que la fonction première de *Mtn* dans l'embryon se joue dans l'intestin. L'expression des métallothionéines dans l'intestin étant retrouvée chez d'autres groupes (nématodes, échinodermes, vertébrés), ceci conforte l'hypothèse d'un rôle fondamental des métallothionéines dans la physiologie du tube digestif. Le gène *Mtn* représente un bon système modèle pour l'étude des mécanismes permettant l'apparition de nouveaux profils d'expression génique. Il n'a en effet été décrit aucun autre cas de variabilité aussi

importante du profil d'expression embryonnaire d'un gène entre des espèces aussi proches.

Chapitre II : Expression post-embryonnaire des gènes *Mtn* et *Mto*

1. Résumé de l'article 2²

Introduction

Afin de savoir si les métallothionéines de la drosophile étaient impliquées dans le métabolisme des métaux, une analyse de leur profil d'expression post-embryonnaire a été entreprise. En effet, la localisation et la physiologie des métaux aux stades larve et adulte ont été l'objet de nombreuses études. On sait notamment que le cuivre se trouve essentiellement dans le mésentéron, et le zinc dans les tubes de Malpighi. Ces métaux semblent localisés dans des vésicules cytoplasmiques (vacuoles ou lysosomes) riches en soufre. Le rôle du mésentéron et des tubes de Malpighi dans la nutrition et la détoxification des métaux étant connu, et la présence des métallothionéines dans ces organes étant suspectée, j'ai localisé les transcrits de *Mtn* et *Mto* à tous les stades post-embryonnaires (larve, pupa, adulte). Pour tester l'implication de ces gènes dans la réponse à une intoxication métallique, nous avons également analysé des animaux élevés sur des milieux contaminés en métaux.

Résultats et discussion

Les deux gènes métallothionéine de la drosophile ont des expressions spatiales restreintes au tractus digestif, et en partie différentes. Le gène *Mtn* est exprimé dans le mésentéron moyen et les tubes de Malpighi, alors que *Mto* n'est exprimé que dans une partie du mésentéron moyen. Le mésentéron moyen contient des régions bien connues pour leur capacité à accumuler les métaux ("cellules cuprophiles", "cellules à fer"). Ces résultats confirment que les métallothionéines ont toutes les caractéristiques requises pour jouer un rôle important dans la nutrition par les métaux chez la drosophile.

L'expression des gènes *Mtn* et *Mto* diffère aussi quantitativement et temporellement. *Mtn* est davantage exprimé dans l'adulte que dans la larve, et toujours à un taux supérieur à celui de *Mto* (10 à 20 fois). L'ensemble de ces différences suggère que *Mtn* pourrait être plus particulièrement spécialisé dans un rôle d'absorption et d'excrétion des métaux, alors que *Mto* interviendrait secondairement dans ces processus.

L'analyse de la localisation des transcrits métallothionéine après traitement par différents métaux (Cu, Zn, Fe, Cd) a montré que ces inductions ont pour effet essentiel d'augmenter le taux de transcription dans les régions où les gènes sont normalement exprimés. Le zinc est néanmoins capable d'induire l'expression de *Mto* dans les tubes de Malpighi. Le cuivre et le cadmium ont la propriété d'étendre le domaine d'expression des deux gènes à tout le mésentéron. Il est intéressant de noter que l'induction se fait selon une spécificité tissulaire dépendant du métal utilisé. Ce fait

² Durliat M., Bonneton F., Boissonneau E., André M. et Wegnez M. Expression of metallothionein genes during the post-embryonic development of *Drosophila melanogaster*. *Biometals*, 1995, 8: 339-351.

indique probablement que les voies métaboliques de chaque métal sont distinctes. Remarquons enfin que le zinc est un inducteur relativement inefficace, contrairement à ce qui est observé chez les vertébrés.

Cette étude montre que l'expression des gènes *Mtn* et *Mto* au cours de la vie post-embryonnaire est différentielle et inductible par les métaux. Ces résultats sont compatibles avec l'hypothèse selon laquelle les deux protéines correspondantes joueraient un rôle dans la métabolisation et la détoxification des métaux. Une étude d'immuno-localisation couplée à une analyse quantitative des ions métalliques devraient permettre de préciser le rôle des protéines MTN et MTO dans la physiologie des métaux.

Chapitre III : Étude de la régulation des gènes *Mtn* et *Mto* par transgénèse

1. Introduction

La régulation transcriptionnelle des gènes métallothionéine a surtout été étudiée in vitro. Afin d'étudier la régulation des gènes métallothionéine in vivo, des lignées transgéniques comportant un gène rapporteur sous le contrôle de différentes portions des promoteurs *Mtn* et *Mto* ont été construites. Nous avons placé en amont du gène de l'alcool déshydrogénase (*Adh*) la région promotrice de *Mtn* allant de -373 à +54. Ce fragment est en effet suffisant pour conférer la spécificité tissulaire et l'inductibilité par les métaux d'un gène placé en aval dans des lignées transgéniques de drosophile (Otto et al., 1987; Young et al., 1989). Aucune donnée n'étant disponible pour le gène *Mto*, nous avons utilisé deux régions promotrices de tailles différentes, une de 300 pb (-221; +107) et une autre de 1300 pb (-1220; +107).

L'obtention de lignées transgéniques permettra d'étudier la régulation développementale et tissulaire des gènes *Mtn* et *Mto*. Ces lignées constituent également des outils pratiques pour comprendre l'inductibilité des métallothionéines par différents facteurs de stress environnementaux et identifier ainsi leur participation à des voies métaboliques essentielles. Ainsi, la régulation des gènes *Mto* et *Mtn* par les métaux a été testée en induisant l'expression des transgènes *Mto-lacZ* et *Mtn-Adh* par différents ions métalliques dans les larves de troisième stade. Afin de connaître l'influence d'un stress affectant tous les tissus, contrairement au stress métallique qui touche en priorité le tractus digestif, nous avons soumis nos lignées à un choc thermique. Enfin, pour savoir si les gènes métallothionéine de la drosophile sont inductibles par les radicaux libres, un stress oxydatif a été appliqué à nos lignées transgéniques.

La duplication des gènes métallothionéines, qui permet d'augmenter la résistance à une intoxication par les métaux, est une réponse adaptative qui a été observée notamment chez la levure (Hamer, 1986) et dans des cellules de souris (Beach et Palmiter, 1981). Chez la drosophile, la meilleure preuve d'un rôle des métallothionéines dans la détoxification métallique a été apportée par l'étude des duplications de *Mtn*. Une souche de laboratoire sélectionnée pour sa résistance au cadmium contient une duplication en tandem du gène *Mtn* et ses larves produisent deux fois plus d'ARN *Mtn* que des larves sauvages (Otto et al., 1986). Il semble donc exister une corrélation entre la surexpression de *Mtn* et l'amélioration de la résistance aux métaux. Il a ensuite été découvert que des duplications du gène *Mtn* sont fréquentes

dans les populations naturelles de *D. melanogaster*. Elles sont toujours associées à une augmentation de la synthèse d'ARNm *Mtn* et à une meilleure résistance à des concentrations élevées en métaux (Maroni et al., 1987). Le fait que ces différentes duplications existent à des fréquences appréciables en Europe et en Amérique du Nord mais soient absentes en Afrique tropicale suggère qu'elles conféraient un avantage sélectif dans un environnement pollué par les métaux. Cependant, à une échelle spatiale plus restreinte (fonderies de zinc et mines de cuivre du sud-est des Etats-Unis), l'absence de corrélation entre la fréquence de duplications de *Mtn* et le taux de contamination métallique d'un site donné n'a pas permis de confirmer cette hypothèse (Lange et al., 1990). Selon les auteurs, l'importance des migrations entre ces populations locales pourrait masquer une sélection des duplications de *Mtn* à l'échelle de la population totale.

Contrairement à ce qui a été observé pour *Mtn*, aucune duplication du gène *Mto* n'a été trouvée dans des souches de laboratoire (Silar et al., 1990) ou dans des populations naturelles (Lange et al., 1990; Théodore et al., 1991). Par ailleurs, dans la lignée cellulaire CdR200 résistante au cadmium, le gène *Mto* est surexprimé (Mokdad et al., 1987) mais pas dupliqué (L. Théodore, communication personnelle). Afin de déterminer l'influence de duplications artificielles de *Mto* sur la résistance aux métaux, j'ai construit des lignées transgéniques comprenant la totalité de l'unité de transcription de *Mto* ainsi que 929 pb des régions situées en amont et 638 pb des séquences situées en aval de ce gène.

2. Matériels et méthodes

Construction des transgènes et obtention des lignées transgéniques

Deux fragments du promoteur de *Mto* ont été clonés dans le vecteur de transformation *pW-lacI* (Kuhn et al., 1988). Le clonage du fragment *DdeI-DdeI* (-221;+107) a donné la construction *Po* (Fig. 1A). La construction *Go* a été obtenue par clonage du fragment *BamHI-DdeI* (-1220; +107) (Fig. 1A). La transformation de la lignée germinale a été réalisée essentiellement selon la méthode de Rubin et Spradling (1982). Les constructions *Po* ou *Go* (500 ng/ μ l) ont été injectées dans des embryons w Δ 2-3. Les transformants ont été identifiés grâce à la coloration des yeux qui varie du jaune au rouge. Des lignées homozygotes ou hétérozygotes balancées ont été établies.

La construction *Pn* a été obtenue en clonant le fragment *EcoRI-StuI* (-373; +54) de *Mtn* en amont du gène *Adh* dans le vecteur *pCasper* (Fig. 1B). La transformation de la lignée germinale par ce transgène a été obtenue par coinjection du plasmide "helper" pHS Δ 2-3 dans une souche *Adh^{mul}*.

L'élément P[*Mto*] a été obtenu en introduisant le fragment *SspI* de 1567 pb de *Mto* au site *EcoRI-BamHI* du vecteur de transformation *PW8* (Fig. 1C). Ce plasmide de 8,5 kb contient deux pieds de P encadrant le gène *miniwhite* placé sous contrôle du promoteur *hsp70* (Klementz et al., 1987). La transformation a été réalisée dans les mêmes conditions que pour les constructions *Po* et *Go*.

Révélation de l'activité β -galactosidase

Pour la révélation au X-gal, les larves sont disséquées dans du PBS (NaCl 130 mM, Na₂HPO₄ 7 mM, NaH₂PO₄ 3 mM) contenant du MgCl₂ 1 mM, puis fixées pendant 15 minutes à 4°C dans du PBS-glutaraldéhyde 1%. Après trois lavages au PBS de 5 minutes chacun, les larves sont incubées à l'obscurité à 37°C pendant la nuit dans la solution de coloration (K₄Fe[CN]₆ 4 mM, K₃Fe[CN]₆ 3 mM, X-gal 0,2%, MgCl₂ 1 mM dans du PBS). Le montage est effectué dans du glycérol 100%.

Pour la révélation des transcrits du gène *lacZ* dans les embryons, la méthode d'hybridation avec une sonde ARN marquée à la digoxigénine est celle décrite dans l'article 1.

Pour l'immuno-révélation de la β-galactosidase, les embryons déchorionés sont d'abord fixés 30 minutes dans un mélange heptane/fixateur (paraformaldéhyde 4%, MgSO₄ 2 mM, EGTA 1 mM, PIPES 0,1M) (1:1), puis démembranés dans une solution heptane-méthanol 90%/ EGTA 10% (1:1). Après un lavage de deux heures à 4°C dans du PBT (BSA 1%, Triton 0,1%, azide 0,01% dans du PBS), les embryons sont resuspendus dans la solution d'anticorps anti β-galactosidase (monoclonal de souris, Boehringer) (500 ng/ml dans PBT), et mis en rotation à 4°C pendant la nuit. Après lavage dans du pbt (BSA 0,1%, Triton 0,1% dans PBS) supplémenté à 2% avec du sérum de cheval (kit Vectastain ABC, Vector laboratories), les embryons sont incubés pendant 2 heures à température ambiante dans du pbt contenant le second anticorps dilué au 1/400. Cet anticorps biotinylé est dirigé contre l'anticorps anti β-galactosidase. Après un lavage de 10 minutes dans du pbt puis deux lavages de 10 minutes dans du PTW (0,1% Tween 20 dans du PBS) les embryons sont incubés 30 minutes à température ambiante dans un mélange d'avidine et de peroxidase (kit Vectastain ABC). Après trois lavages de 5 minutes dans du PTW, les embryons sont incubés dans la solution de coloration (DAB 25%, H₂O₂ 0,25% dans PTW) pendant 15 minutes. Le montage s'effectue dans du Spurr (Ernest Fullam) après déshydratation.

Révélation de l'activité alcool-déshydrogénase (Ashburner, 1989)

Les larves sont disséquées dans du Ringer (KCl 182 mM, NaCl 46 mM, CaCl₂ 3 mM, Tris-HCl 10 mM) puis fixées pendant une heure sur glace dans du Ringer-glutaraldéhyde 1%. Après quatre lavages de 15 minutes chacun dans du Ringer glacé, les larves sont incubées à l'obscurité à température ambiante dans la solution de coloration (KPO₄ 40 mM, NBT 0,7 mg/ml, NAD 1,4 mg/ml, PMS 30 μg/ml, butanol 2,8%). La coloration dure environ 10 minutes. Ensuite, les larves sont rincées dans du Ringer puis fixées dans un mélange éthanol 100%/acide acétique 100% (3:1) pendant la nuit. Le montage est effectué dans du glycérol 100%.

Conditions d'induction

L'induction par les métaux est obtenue en élevant pendant 24 heures des larves sur un milieu standard hydraté avec différentes solutions métalliques: ZnSO₄, CuSO₄, CdCl₂, AgNO₃, Fe(II)SO₄, Fe(III)SO₄.

Pour le choc thermique, des adultes sont mis à pondre dans des tubes pendant 24 heures à 25°C, puis la descendance est élevée à 29°C et subit un passage quotidien de

deux heures à 37°C. Ce traitement est effectué jusqu'à l'apparition de larves de troisième stade qui sont alors analysées pour leur expression du gène rapporteur.

Un stress oxydatif est obtenu en faisant pondre des adultes sur du milieu hydraté avec de l'eau contenant du paraquat (méthyl viologène, Sigma) à la concentration finale de 10 mM. Les larves de troisième stade issues de ces pontes sont analysées pour leur expression du gène rapporteur.

Test de résistance

Le protocole utilisé est celui décrit par Otto et al. (1986). Des larves de premier stade (60 par tube) sont élevées sur un milieu "instantané" (Carolina Biological, North Carolina) hydraté à 0,2 g/ml avec une solution d'eau bidistillée supplémentée avec 4% d'extrait de levure et contenant ou ne contenant pas du CdCl₂ à la concentration finale de 0,3 mM. Le taux de résistance est calculé en faisant le rapport entre le nombre d'individus atteignant le stade pupe sur milieu non pollué et sur milieu pollué par le cadmium. Au moins deux tubes sont préparés et trois expériences indépendantes réalisées.

3. Résultats

Description des lignées transgéniques

Pour analyser la régulation du gène *Mto*, deux types de constructions ont été réalisées. Elles contiennent le gène *lacZ* placé sous le contrôle d'un "petit" (-221;+107) ou d'un "grand" (-1220; +107) promoteur de *Mto* (Fig. 1A). Deux lignées indépendantes contenant le petit fragment du promoteur de *Mto* ont été obtenues. Dans ces lignées les insertions sont à l'état homozygote, soit sur le chromosome X (*Po3*), soit sur le chromosome II (*Po7*) (Tableau 1). Deux lignées indépendantes contenant le grand fragment du promoteur de *Mto* contiennent des insertions homozygotes sur le chromosome II (*Go1* et *Go7*). Dans une troisième lignée (*Go22*), la construction *Go* étant insérée sur le chromosome III balancé TM6, celle-ci est conservée à l'état hétérozygote (Tableau 1).

Pour étudier la régulation de *Mtn*, nous avons analysé deux lignées indépendantes contenant chacune deux insertions, *Pn4161* et *Pn4162* (Tableau 1). La construction utilisée comprend le gène de l'alcool déshydrogénase (*Adh*) placé sous le contrôle du promoteur de *Mtn* (fragment *EcoRI-StuI* (-373; +54) (Fig. 1B).

Les effets d'une augmentation du nombre de copies du gène *Mto* ont été étudiés grâce à des lignées contenant l'élément P[*Mto*]. Cet élément comprend la totalité de l'unité de transcription de *Mto* ainsi que 929 pb des régions situées en amont et 638 pb des séquences situées en aval de ce gène (Fig. 1C). Dans trois d'entre elles, l'élément P[*Mto*] est inséré dans le chromosome II (*Co2*, *Co3*, *Co7*) et dans une autre il est situé sur le chromosome X (*Co10*). Toutes ces insertions sont à l'état homozygote. Dans une autre lignée (*Co4*), le transposon s'est inséré sur le chromosome III balancé TM6. Afin d'obtenir une lignée contenant le plus grand nombre possible d'éléments P[*Mto*], nous avons construit la lignée 4-5 Co. Cette lignée contient les insertions des lignées *Co10* (X), *Co3* (II) et *Co4* (III). Les mâles 4-5Co contiennent quatre éléments P[*Mto*] et les femelles cinq (Tableau 1).

Lignées	Chromosomes	Constructions
<i>Po3</i>	X	p <i>Mto</i> [-221; +107]- <i>lacZ</i>
<i>Po7</i>	II	
<i>Go1</i>	II	p <i>Mto</i> [-1220; +107]- <i>lacZ</i>
<i>Go7</i>	II	
<i>Go22</i>	III (TM6)	
<i>Pn4161</i>	2 insertions sur le III	p <i>Mtn</i> [-373; +54]- <i>Adh</i>
<i>Pn4162</i>	X et III	
<i>Co2</i>	II	gène <i>Mto</i> [-929; +638]
<i>Co3</i>	II	
<i>Co4</i>	III (TM6)	
<i>Co7</i>	II	
<i>Co10</i>	X	
<i>4-5Co</i>	X, II et III (TM6)	

Tableau 1: Liste des lignées transgéniques analysées dans cet article. La taille des promoteurs utilisés est indiquée pour chaque construction. Les lignées *Co* contiennent 1,5 kb de séquences génomiques de *Mto*. Les insertions de la lignée *4-5Co* sont celles des lignées *Co10* (X), *Co3* (II) et *Co4* (III).

Expression en conditions standards

En conditions standards, nous avons analysé l'expression développementale des transgènes dans l'embryon, puis dans les larves de troisième stade. Afin de faciliter la lecture des résultats et l'observation des figures, j'ai schématisé l'anatomie du mésentéron larvaire sur la Figure 2.

Les abréviations en anglais utilisées pour les figures 3, 4, 5, 6 et 7 sont les suivantes: Amg= Anterior midgut (mésentéron antérieur); Cc= Copper cells (cellules cuprophiles); Gc= Gastric cæca (cæca gastriques); Ic= Iron cells (cellules à fer); Mt= Malpighian tubules (tubes de Malpighi); Pmg= Posterior midgut (mésentéron postérieur); Pv= Proventriculus (Proventricule).

Expression du transgène dans les lignées Mto-lacZ

Le gène *lacZ* s'exprime différemment dans les embryons de chacune des trois souches *Go*. Les profils d'expression observés dans les lignées *Go1* et *Go22* se ressemblent en partie, alors qu'aucun signal n'est observé dans la lignée *Go7* (non montré). Cette diversité suggérant un effet des séquences régulatrices du site d'intégration (effet "enhancer trap"), j'ai remobilisé l'élément de la lignée *Go1*. L'analyse des deux nouvelles lignées ainsi générées est en cours.

Signalons que les méthodes utilisant l'anticorps anti- β -galactosidase ou le X-gal n'ont pas permis de révéler l'expression du gène *lacZ* dans les embryons de la lignée *Go1*. Ce signal n'a été détecté que par hybridation in situ, illustrant ainsi la sensibilité de cette technique.

Au stade larvaire, le gène *lacZ* ne s'exprime pas dans les lignées *Po* (Figs. 3A,4A). Par contre, les lignées *Go* présentent toutes la même expression de la β -galactosidase dans la région des "cellules à fer" du mésentéron (Fig. 3B). Aucun autre tissu larvaire n'est marqué.

Expression du transgène dans les lignées Mtn-Adh

Dans les embryons des lignées *Pn4161* et *Pn4162*, aucune expression de *l'Adh* n'a pu être révélée par coloration enzymatique. Par contre, les deux lignées *Pn* sont caractérisées par une expression de *l'Adh* dans les tubes de Malpighi et dans deux régions du mésentéron larvaire: les caeca gastriques et la région des cellules à fer (Fig. 3C).

Expression en conditions de stress

Inductibilité du transgène dans les lignées Mto-lacZ

L'expression du gène *lacZ* dans les souches *Po* peut être induite par addition de métaux au milieu d'élevage. Ainsi, le CuSO_4 0,5 mM induit une forte expression dans la région des cellules cuprophiles (Fig 4B). A la même concentration de 0,5 mM, le CdCl_2 induit une forte expression de la β -galactosidase dans les cellules à fer, site d'expression des constructions *Go* en conditions standards. Les caeca gastriques et le mésentéron postérieur sont marqués plus faiblement (Fig. 4C).

A concentration identique (0,5 mM), CuSO_4 et AgNO_3 ont des effets inducteurs identiques sur les constructions *Go*. Dans ces conditions, la β -galactosidase est très fortement exprimée dans l'ensemble du mésentéron et dans les tubes de Malpighi (Fig. 5A). Le proventricule et le proctodéon ne sont pas des sites d'expression. A la même concentration de 0,5 mM, le CdCl_2 induit une forte expression dans les tubes de Malpighi et le mésentéron, à l'exception de la partie antérieure de celui-ci (Fig. 5B). De plus, le cadmium induit une expression spécifique sous la forme de deux anneaux dans le proventricule (Fig. 5B). Le zinc et le fer sont les inducteurs les plus faibles. Le zinc induit l'expression du gène *lacZ* dans la région des cellules à fer et dans le mésentéron postérieur (Fig. 5C). Les deux formes de sulfate de fer induisent la même induction dans la région des cellules à fer et, avec une certaine variabilité, dans la région des cellules cuprophiles (Fig. 5D).

Après un choc thermique sur les lignées *Go*, on observe une induction de l'expression β -galactosidase essentiellement dans deux régions: les cellules à fer et le mésentéron postérieur. La région des cellules à cuivre présente une coloration plus faible (Fig. 6A).

L'expression du gène *lacZ* dans les souches *Go* peut également être induite par un stress oxydatif. Dans ces conditions, on observe une augmentation de la coloration dans les cellules à fer et, avec une certaine variabilité, dans les cellules à cuivre (Fig. 6B).

Inductibilité du transgène dans les lignées Mtn-Adh

Le gène de l'alcool déshydrogénase est fortement induit par les métaux dans les tubes de Malpighi et le mésentéron des lignées *Pn4161* et *Pn4162*. Cependant, la région des cellules cuprophiles est toujours moins marquée que le reste du mésentéron après induction par le cuivre (Fig. 7A) ou l'argent. Quant aux traitements par le zinc (Fig. 7B) ou le cadmium (Fig. 7C), ils n'induisent pas de coloration dans la région des cellules cuprophiles.

Remarquons également que, après induction par le cuivre, on observe une très forte expression de *l'Adh* dans les corps gras (Fig. 8A). Le cadmium induit une coloration moindre (Fig. 8B), tandis que le zinc, l'argent et le fer n'ont aucun effet sur l'expression du transgène *Mtn-Adh* dans les corps gras. L'analyse par hybridation in situ des corps gras d'une souche sauvage non transgénique (Orégon R) intoxiquée ou non par le cuivre a permis de confirmer ce résultat (Fig. 8C,D). En conditions standards, le gène *Mtn* n'est pas exprimé dans les corps gras (non montré).

Sur les souches *Pn*, le choc thermique a pour effet d'augmenter l'expression de l'alcool déshydrogénase au niveau des sites où elle s'exprime normalement en conditions standards, sans provoquer d'expressions ectopiques (non montré).

L'application d'un stress oxydatif aux souches *Pn* induit une forte expression spécifique du gène *Adh* dans le mésentéron antérieur et la région des cellules à fer. La région des cellules cuprophiles et le mésentéron postérieur donnent une réponse plus faible.

Duplications artificielles du gène *Mto* et résistance au cadmium³

Afin de déterminer si l'augmentation du nombre de copies du gène *Mto* était capable de conférer une meilleure résistance à l'intoxication métallique, des tests de résistance ont été menés sur les souches *Co2*, *Co3* et *4-5Co*. Une souche sauvage (Orégon) a été utilisée comme contrôle négatif. Une souche portant une duplication de *Mtn* (*Mtni60*) et décrite comme ayant une résistance accrue à l'intoxication métallique (Maroni et al., 1987) a été utilisée comme contrôle positif. Les résultats de ces tests montrent qu'il existe une corrélation positive entre le nombre de gènes *Mto* et une augmentation de la résistance au cadmium (Fig. 9). La souche la plus résistante est *4-5 Co* qui contient quatre ou cinq exemplaires du transgène P[*Mto*] en plus des deux copies endogènes de *Mto*. Les souches *Co2* (Fig. 9) et *Co3* (non montré) présentent des taux de résistance comparables à celui de la souche dupliquée pour *Mtn*.

³ Les résultats préliminaires obtenus avec les lignées *Co* n'ont jamais été publiés.

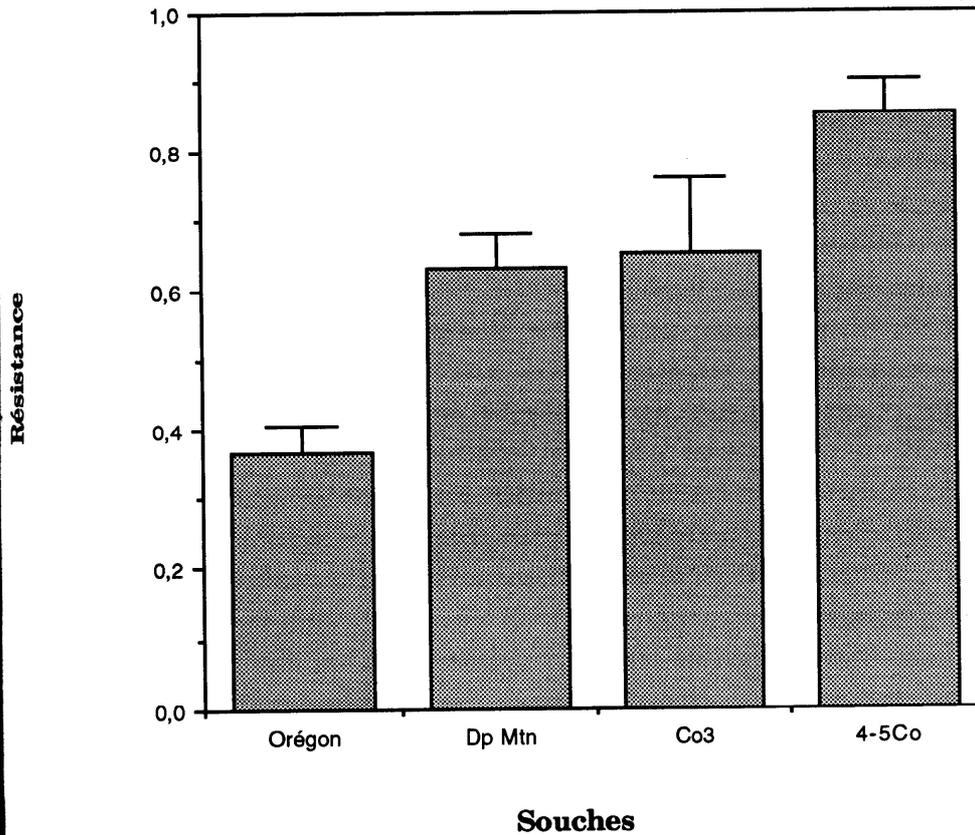


Figure 9: Résultats des tests de résistance. La valeur moyenne du taux de résistance ainsi que l'erreur standard sur trois expériences sont indiqués. *Orégon*: souche sauvage de référence. *Dp Mtn*: souche portant une duplication du gène *Mtn* (*Mtni60*). *Co3*: souche portant deux copies de l'élément P[*Mto*]. *4-5Co*: souche contenant 4 ou 5 exemplaires de l'élément P[*Mto*].

4. Discussion

Expression des transgènes dans les conditions standards

La transcription embryonnaire du gène *Mto* n'est pas détectable par hybridation in situ (voir Chapitre I des Résultats). Afin d'avoir une indication sur la localisation des transcrits de ce gène au cours du développement précoce nous avons produit des lignées transgéniques exprimant le gène *lacZ* sous le contrôle des régions régulatrices de *Mto*. Le gène *lacZ* s'exprime différemment dans les embryons des trois lignées *Go*. Avant

d'interpréter ces résultats, il est nécessaire de savoir si, dans une des lignées *Go*, l'expression observée correspond effectivement à la régulation du gène *lacZ* par le fragment de promoteur de *Mto* et non par des séquences régulatrices environnant le transgène (effet "enhancer trap"). Autrement dit, l'expression du gène *lacZ* reflète-t-elle bien l'expression du gène *Mto*? L'élément P[*Go-lacZ*] de la lignée *Go1* a donc été mobilisé afin de générer des lignées où ce transgène serait inséré à de nouveaux sites. Si nous observons que l'expression du gène *lacZ* est identique dans ces trois lignées indépendantes, alors nous pourrions considérer que ce profil est bien déterminé par le promoteur de *Mto*. Cette analyse est en cours et les résultats devraient être connus avant la soutenance de cette thèse.

L'analyse des différentes souches transgéniques permet de préciser les profils d'expression larvaires observés par hybridation in situ (Chapitre II des résultats). Les portions de promoteurs utilisées semblent en effet suffisantes pour conférer aux gènes *lacZ* et *Adh* une expression identique à celle de *Mto* et *Mtn*, respectivement. On constate ainsi que les deux gènes s'expriment dans la même portion du mésentéron où se trouvent les "cellules à fer", nommées ainsi pour leur capacité à accumuler le fer (Poulson et Bowen, 1952). La fonction de cette région du mésentéron est malheureusement inconnue.

Compte-tenu de la petite taille des caeca gastriques et de la difficulté d'identifier ces organes sur des coupes traitées pour une hybridation in situ, il est probable que ce site d'expression de *Mtn* soit passé inaperçu dans les expériences présentées au chapitre II.

Expression des transgènes dans des conditions de stress

Dans les souches *Po*, le gène *lacZ* ne s'exprime pas en conditions normales mais, après induction métallique, il présente une expression tissulaire semblable à celle des souches *Go*. Plus précisément, il s'exprime alors dans les sites où la transcription de *Go-lacZ* est la plus intense. Après induction par le cadmium, par exemple, la construction *Po-lacZ* est fortement exprimée dans la région des cellules à fer. Par conséquent, les 328 pb du promoteur de *Mto* inclus dans la construction *Po* contiennent les éléments nécessaires à la régulation tissulaire correcte de *Mto*. De plus, il existe probablement des séquences de régulation quantitative de la transcription du gène *Mto* dans la région de 1 kb que la construction *Go* possède en plus par rapport à la construction *Po*.

Les cinq métaux testés ont des effets inducteurs différents. A deux exceptions près, les réponses observées après inductions métalliques se situent toujours dans le mésentéron. Les deux exceptions concernent le proventricule (effet du cadmium sur *Go*) et les corps gras (effets du cuivre et du cadmium sur *Pn*).

Le fer apparaît comme le plus faible inducteur, que ce soit sur les souches *Go* ou *Pn*. Ce résultat confirme ceux présentés au Chapitre II. Nous avons testé le pouvoir inducteur du fer sur les promoteurs des gènes métallothionéine pour deux raisons. Premièrement, le seul site d'expression commun aux deux constructions est une région décrite comme étant la principale zone d'accumulation du fer dans l'intestin (Poulson et Bowen, 1952). D'autre part la ferritine, protéine de stockage du fer, étant capable de fixer aussi bien le fer que le zinc, le cuivre ou le cadmium (Price and Joshi, 1983), il était intéressant de savoir si les métallothionéines elles aussi pouvaient être impliquées

dans le métabolisme du fer. Nos résultats montrent que le fer est capable d'induire la transcription des gènes métallothionéine de drosophile. Comme il a été montré par ailleurs que l'apo-métallothionéine hépatique de lapin pouvait être chargée *in vitro* avec des ions Fe(II) (Good et Vasak, 1986), il est probable que les métallothionéines soient impliquées dans le métabolisme du fer.

Le cuivre a un très fort pouvoir inducteur sur toutes les constructions testées. Il est même capable d'induire *Mtn* dans les corps gras, le seul site d'expression de ce gène situé en dehors du tractus digestif. Les corps gras étant détruits par la méthode d'hybridation *in situ* décrite dans l'article 2, nous n'avions pas pu mettre en évidence l'expression de *Mtn* dans cet organe. Le zinc a un pouvoir inducteur plus faible que le cuivre. Il est à noter qu'il n'induit jamais l'expression des transgènes dans la région des cellules cuprophiles.

Les deux métaux non-essentiels, le cadmium et l'argent, ont été choisis en raison de leurs ressemblances physico-chimiques avec, respectivement, le zinc et le cuivre. Cette ressemblance serait responsable de la toxicité du cadmium et de l'argent qui, *in vivo*, se substitueraient au zinc et au cuivre sans pouvoir conférer exactement les mêmes fonctions. En accord avec cette hypothèse, il est intéressant de constater que cuivre et argent d'une part, et zinc et cadmium d'autre part, ont des effets identiques sur les souches *Go*.

L'expression exclusivement intestinale des constructions *Go* et *Pn* peut s'expliquer aussi bien par une régulation tissulaire spécifique que par l'accumulation préférentielle des métaux dans le tractus digestif. Cependant, alors qu'un choc thermique provoque un stress généralisé, les transgènes *Go* et *Pn* sont induits exclusivement dans le tube digestif où ils s'expriment normalement ou après induction métallique. Une explication alternative serait qu'un stress thermique provoque la libération des métaux normalement liés à des protéines. Dans ce cas, l'activation métallique des gènes métallothionéine serait réprimée dans les tissus autres que ceux du tractus digestif.

Par ailleurs, la possibilité d'induire l'expression de ces constructions par un stress oxydatif montre que les gènes *Mtn* et *Mto* pourraient être impliqués dans la protection contre les radicaux libres. Chez la drosophile, il existe des mutants de la superoxyde dismutase et de la catalase (Lindsley et Zimm, 1992). Cette espèce constitue donc un bon modèle pour tester le rôle anti-oxydant des métallothionéines.

Nos résultats montrent que l'activité des promoteurs métallothionéine de drosophile est régulée par des métaux, mais aussi par des facteurs développementaux et environnementaux. L'étude par transgénèse des deux gènes métallothionéine du nématode *Caenorhabditis elegans* a abouti à des conclusions comparables (Freedman et al., 1993). Les expériences décrites dans cet article indiquent que nos lignées transgéniques constituent de bons outils pour étudier les différents modes de régulation des gènes *Mtn* et *Mto*.

Duplications du gène *Mto* et résistance au cadmium

J'ai montré que la surexpression du gène *Mto* est capable d'augmenter *in vivo* la résistance à une haute concentration de cadmium. Ainsi, les deux gènes

métallothionéine de la drosophile peuvent intervenir dans la détoxification des métaux. Le fait que, contrairement à *Mtn*, aucune duplication de *Mto* n'ait été trouvée dans les populations naturelles est peut-être dû à des contraintes structurales propres à ce locus. Rappelons que les gènes *Mtn* et *Mto* se trouvent à des loci très éloignés, 85E et 92E, respectivement. On peut également supposé que la réponse adaptative du gène *Mto* à une augmentation de la pollution métallique consisterait en un accroissement de son taux de transcription. C'est par exemple ce qui est observé dans la lignée cellulaire CdR200. En effet, dans cette lignée résistante au cadmium, le gène *Mto* est surexprimé (Mokdad et al., 1987) mais non dupliqué (L. Théodore, communication personnelle). Ces résultats démontrent que si les gènes *Mto* et *Mtn* présentent d'importantes différences au niveau de leur régulation, les deux protéines partagent sans doute des fonctions voisines.

F. Bonneton, L. Théodore, P. Silar et M. Wegnez, en préparation ⁴

Remerciements

Je remercie Gustavo Maroni pour m'avoir fourni les lignées transgéniques *Mtn-Adh* et la souche portant la duplication *Mtni60*. Je remercie également Karine Bishay pour sa contribution à l'analyse des lignées transgéniques au cours d'un stage de maîtrise.

(Les références de cet article sont incluses dans la bibliographie située en fin d'ouvrage)

Chapitre IV : Tentative d'obtention d'un mutant du gène *Mtn* ⁵

1. Introduction

Pour élucider la fonction d'une protéine, une des meilleures stratégies consiste à rechercher des mutations inactivant le gène correspondant, puis à observer le phénotype induit par ce manque de protéine.

Des mutations amorphes (absence totale de produit) des gènes de métallothionéines ont été obtenus chez trois espèces. Une délétion du locus *smt* de la cyanobactérie *Synechococcus* est viable mais confère aux individus mutants un phénotype d'hypersensibilité au zinc et au cadmium (Turner et al., 1993). Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, une délétion du gène *CUP1* est viable, mais les mutants tolèrent moins bien des concentrations élevées de cuivre (Ecker et al., 1986; Thiele et al., 1988). Enfin, chez la souris, des mutants pour les gènes métallothionéine *MT1* et *MT2* ont été obtenus récemment (Michalska et Choo, 1993; Masters et al., 1994). Ils sont viables à l'état homozygote et fertiles. Leur développement se fait apparemment sans problème. Le seul phénotype anormal observé pour l'instant est une hypersensibilité au cadmium. Les animaux mutants auxquels a été injecté du sulfate de cadmium sont très malades et meurent parfois dans les 48 heures, alors que les témoins se portent bien (Masters et al., 1994). Il est important de signaler que le génome de la souris comporte au moins deux autres gènes métallothionéine, *MT3* et *MT4*. Alors que

⁴ Bonneton F., Théodore L., Silar P., Maroni G. et Wegnez M.. Response of *Drosophila* metallothionein promoters to metallic, heat-shock and oxidative stresses. FEBS Letters, 1996, 380: 33-38.

⁵ Résultats négatifs non publiés.

MT1 et *MT2* ont une expression ubiquitaire et inductible par les métaux, *MT3* n'est exprimé que dans le cerveau et sa synthèse n'est pas inductible par les ions métalliques (Palmiter et al., 1993). Quant à *MT4*, il n'est exprimé que dans certains épithéliums stratifiés (Quaife et al., 1994). Par conséquent, les mutants obtenus ne sont pas entièrement dépourvus de métallothionéine.

Ces expériences de mutagenèse confirment l'importance des métallothionéines dans la détoxification des métaux. Elles suggèrent également que les métallothionéines ne joueraient aucun rôle vital. En effet, leur absence (totale ou partielle) n'empêche pas un développement normal en condition de laboratoire. Ceci remet en cause l'hypothèse selon laquelle les métallothionéines auraient un rôle fondamental dans l'homéostasie du zinc et du cuivre, notamment en tant que protéines échangeuses d'ions. Cependant, compte tenu de l'importance des métaux pour l'organisme, on peut imaginer que leur système de régulation est très redondant. Ainsi, chez les mutants amorphes des gènes métallothionéine, d'autres protéines pourraient prendre le relais. Remarquons également que l'absence d'un phénotype aisément repérable peut dissimuler l'existence de fonctions néanmoins importantes. La mise en évidence de ces fonctions non vitales nécessite alors des expériences plus spécifiques. De plus, les conditions de laboratoire ne sont pas les conditions naturelles qui déterminent la sélection des gènes au cours de l'évolution.

Plusieurs tentatives de mutagenèse du gène *Mtn*, basées sur un crible négatif (recherche de mutants hypersensibles aux métaux), ont été réalisées sans succès par l'équipe de G. Maroni. Une mutagenèse avec un élément P marqué et la recherche des mutations par PCR a également échoué dans ce laboratoire. La difficulté du criblage négatif et la petite taille du locus *Mtn* (moins de 1 kb) ont sans doute contribué à ces échecs⁶. Des résultats récents obtenus au laboratoire m'ont incité à relancer ce projet dans ma dernière année de thèse.

Le principe de la mutagenèse par insertion de l'élément P suivie d'un criblage par PCR a d'abord été décrit par Ballinger et Benzer (1989) ainsi que par Kaiser et Goodwin (1990). Un résumé de cette méthode est présenté sur la Figure 1. Des résultats obtenus au laboratoire nous ont suggéré qu'une modification de cette technique serait susceptible d'augmenter l'efficacité de notre mutagenèse. Cette modification consiste à insérer des séquences régulatrices du gène à muter dans le transposon qui doit être mobilisé (Fig. 2A). En effet, il a été montré qu'un transposon contenant des séquences régulatrices du gène *polyhomeotic* s'insérait préférentiellement dans des gènes cibles de la protéine polyhomeotic (PH). Il a été suggéré que les séquences endogènes et transgènes seraient reconnues dans la lignée germinale par le même complexe protéique qui rapprocherait ainsi l'élément P d'un site d'insertion préférentielle (Fauvarque et Dura, 1993). Ce complexe incluerait les protéines PH et Polycomb (PC) qui interviennent notamment dans la maintenance de l'expression des gènes homéotiques.

Par ailleurs, il a été observé qu'un élément P contenant 1,7 kb de séquences génomiques de *Mtn* s'insérait préférentiellement dans des gènes qui interagissent avec

⁶ Le génome de la drosophile contient en réalité 4 gènes métallothionéines : *Mtn*=*MtnA* ; *Mto*=*MtnB* ; *MtnC* et *MtnD* sont proches de *MtnB* en séquence et sur le chromosome (Egli et al., 2003, EMBO J, 22 : 100-108). Leur mutagenèse a nécessité l'utilisation de la recombinaison homologue mise au point chez la drosophile en 2002: Egli et al., 2006, Mol Cell Biol, 26 : 2286-2296 ; Egli et al., 2006, Genes to Cells, 11 :647-658.

les protéines du groupe *Polycomb* (Théodore, 1992) ⁷. De plus, deux membres de ce groupe (*Posterior sex comb* et *polyhomeotic*) régulent l'expression de *Mtn* au cours du développement embryonnaire (L.Théodore, communication personnelle). Ainsi, il est probable qu'un élément P contenant le gène *Mtn* soit capable de s'insérer préférentiellement dans des gènes cibles du complexe protéique décrit plus haut, en particulier au locus *Mtn* (Fig. 2B).

2. Matériels et Méthodes

La première étape a consisté à mobiliser un élément P contenant le gène *Mtn*¹ (-373;+1328) et le marqueur de transformation *miniwhite* (Figure 2) dans une souche contenant le gène endogène *Mtn*³. Cet élément P[*Mtn* - *w+*] est localisé sur un chromosome II marqué (CyO) (Théodore, 1992). Après élimination de la source de transposase et du transposon initial, les individus restants possèdent des éléments P en de nouvelles localisations. Ces mouches sont mises à pondre par groupes de cent individus, leurs œufs sont récoltés et l'ADN est extrait selon la méthode de Kaiser et Goodwin (1990).

L'ADN est ensuite testé par PCR. Afin d'amplifier l'ADN situé entre le gène *Mtn*³ endogène et l'élément P[*Mtn* - *w+*], trois types d'amorces ont été utilisées. L'amorce de l'élément P correspond à la séquence de 31 pb située à l'extrémité de chaque "pied de P". Les deux amorces s'hybridant avec le gène *Mtn*³ ont été choisies dans la région de 50 pb située dans la partie 3' transcrite non traduite qui est spécifique de cet allèle (Théodore et al., 1991). L'amorce 5' permet une amplification de l'ADN dans la direction de l'extrémité 5' du gène *Mtn*³. L'amorce 3' permet une amplification de l'ADN dans la direction de l'extrémité 3' du gène *Mtn*³. L'allèle présent dans le transposon étant de type *Mtn*¹, il ne peut pas être reconnu par ces amorces. Le protocole de PCR utilisé est celui de Kaiser et Goodwin (1990).

Le produit des réactions PCR est ensuite analysé sur gel d'agarose 1%. Si un élément P est inséré dans ou à proximité du gène *Mtn*, alors l'ADN situé entre les deux amorces P et *Mtn*³ sera amplifié. La distance entre les amorces ne doit pas dépasser 2 à 3 kb environ (Kaiser et Goodwin, 1990).

Un faible signal d'amplification pouvant être invisible sur gel, un transfert sur filtre de nylon suivi d'une hybridation avec une sonde *Mtn* ont été systématiquement pratiqués (Sambrook et al., 1989).

Lorsqu'un lot d'ADN donne un signal positif, les mouches correspondantes sont divisées en sous-groupes, mises à pondre, et l'ADN de leurs œufs est testé de la même manière. On procède ainsi jusqu'à l'isolement de la (ou des) drosophile(s) responsable(s) du signal positif.

3. Résultats et discussion

Au début de ce travail, j'avais fait le pari que l'insertion préférentielle augmenterait la probabilité d'insertion d'un élément P au locus *Mtn*. Si tel avait été le

⁷ Fauchoux et al., Mol Genet Genomics, 2001, 265 :14-22.

cas, le nombre d'individus à analyser aurait été relativement plus faible que pour une mutagenèse classique, et ce travail aurait pu être réalisé durant ma dernière année de thèse. Malheureusement, dans les conditions de notre mutagenèse, il semble que le transposon P[*Mtn* - *w*+] soit incapable d'induire une insertion préférentielle.

En général, les individus transgéniques portant un élément P[*w*+] sont repérables par une coloration de l'œil uniformément rouge, due à l'expression du gène rapporteur *miniwhite*. Cependant, une importante fraction (11/61) des lignées transgéniques obtenues par L. Théodore (1992) et contenant un élément P[*Mtn* - *w*+] présente un phénotype de bigarrure de l'œil. C'est-à-dire que l'on observe une coloration hétérogène des yeux, certaines parties étant colorées, et d'autres non. Ce phénotype de "variégation" s'expliquerait par le fait que le transgène P[*Mtn* - *w*+] s'insère préférentiellement dans des gènes régulés par le groupe *Polycomb*. Or, les protéines codées par ces gènes induiraient une hétérochromatinisation ayant pour effet d'inactiver localement la transcription (Fauvarque et Dura, 1993). Ainsi, dans notre expérience de mutagenèse, après l'isolement des individus contenant l'élément P[*Mtn* - *w*+] à un nouveau site, nous nous attendions à observer une fréquence importante d'individus ayant des yeux bigarrés (Figure 2). Cette "variégation" représente la "preuve phénotypique" qu'un élément P[*Mtn* - *w*+] s'est inséré dans un locus cible du groupe *Polycomb*. Rappelons que le gène *Mtn* étant probablement lui-même une de ces cibles (Théodore, 1992), nous espérions augmenter l'efficacité d'insertion d'un transposon dans le locus *Mtn*.

Contrairement à ce qui était attendu, le taux de bigarrure observé après mobilisation de l'élément P[*Mtn-w*+] s'est révélé très inférieur à celui précédemment rapporté: 4/1640 contre 11/61 (Théodore, 1992). Ainsi, dans les conditions de notre mutagenèse, il semble que le transposon P[*Mtn* - *w*+] soit incapable d'induire une insertion préférentielle. Cette observation inattendue m'a incité à écourter la mutagenèse. De plus, le criblage moléculaire de ces 1640 drosophiles n'a pas permis d'observer de signaux positifs d'amplification de l'ADN, ni sur gel d'agarose (Fig. 3), ni après hybridation, que ce soit avec les amorces 5' ou 3'.

Une seule différence existe entre la mutagenèse que j'ai entreprise et celle de L. Théodore. Dans ce dernier cas, l'élément P[*Mtn-w*+] a été mobilisé en contexte mutant *red*. Or, l'expression du gène *Mtn* étant atypique dans ce contexte (voir le Chapitre I des Résultats), j'ai utilisé un contexte sauvage pour le locus *red* dans le cas de ma mutagenèse. Cette différence est peut-être responsable du faible taux de bigarrure que j'ai observé. Deux explications sont possibles.

Tout d'abord, la pigmentation des yeux est beaucoup plus foncée chez les mutants *red* (Lindsley et Zimm, 1992). Ainsi, cette mutation facilite la détection des phénotypes bigarrés en augmentant le contraste entre les zones colorées et celles qui ne le sont pas. Il faut savoir en effet que le gène *miniwhite*, à l'état hétérozygote, induit une coloration de l'œil qui est souvent assez faible (jaune à orange).

Une deuxième explication réside peut-être dans le fait que la mutation *red* (3-53.6) est génétiquement très proche du gène *trithorax* (3-54.2). Il se pourrait même que *red* soit un allèle hypomorphe de *trithorax* (L. Théodore, communication personnelle). Le gène *trithorax* fait partie d'un groupe de régulateurs qui agissent en synergie avec ceux du groupe *Polycomb* pour assurer le maintien de l'expression d'une centaine de

gènes cibles. Les protéines du groupe *trithorax* exercent une régulation positive alors que les protéines du groupe *Polycomb* exercent une régulation négative sur les gènes homéotiques (Paro, 1993; Kennison, 1993). Ainsi, compte-tenu des actions antagonistes existant entre ces deux types de régulateurs, il est possible que l'insertion préférentielle d'un élément P[*Mtn-w*⁺], qui est déterminée par les protéines du groupe *Polycomb*, soit facilitée en contexte *red* grâce à la dérégulation de *trithorax*.

La mutagenèse a néanmoins permis d'obtenir un résultat intéressant et plutôt inattendu. En effet, un des individus aux yeux bigarrés présentait un phénotype de bigarrure particulier: œil rouge dorsalement et blanc ventralement. Or, ce phénotype est caractéristique de tous les (rares) éléments P[*w*⁺] insérés dans la région chromosomique comprise entre 69CD et 70A (Fauvarque, 1994). La cartographie génétique de cette région, entreprise par Dario Coen et Sophie Netter (Institut Jacques Monod, Paris), semble définir 4 loci différents. Le transposon P[*Mtn-w*⁺] induisant un phénotype de type dorso-ventral s'est révélé être allélique à l'un de ces loci (Dario Coen, communications personnelles).⁸

⁸ Complexe iroquois : Netter et al., *Genetics*, 1998, 149 :257-275.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Notre étude de l'expression développementale et de l'inductibilité des deux gènes métallothionéine de la drosophile a apporté des informations sur l'évolution fonctionnelle de ce système. La caractérisation structurale du système métallothionéine de la drosophile avait montré que les deux protéines MTO et MTN ont des séquences très différentes (25% de similitude) (Mokdad et al., 1987). Cette importante différenciation suggérait une spécialisation fonctionnelle de chaque protéine (Silar et al., 1990). En accord avec cette hypothèse, nos résultats montrent que les gènes *Mtn* et *Mto* sont régulés de façons différentes. Cependant, au moins au cours de la vie post-embryonnaire, il semble que les deux protéines partagent des fonctions similaires.

Evolution divergente des deux gènes métallothionéine de la drosophile

La duplication génique est une source importante de diversité fonctionnelle. En effet, après la duplication, les deux nouveaux gènes peuvent suivre des destins différents. Les mutations indépendantes qui se produisent sont fixées ou non selon des contraintes sélectives propres à chaque gène. Hormis les cas d'évolution concertée (les gènes d'ARNr 5S, par exemple) où des mécanismes recombinatoires homogénéisent les séquences dupliquées, on observe en général une évolution divergente des gènes après duplication. Cette divergence peut affecter deux niveaux différents et non exclusifs: la séquence codante et les séquences de régulation. Le système métallothionéine de la drosophile offre un bon exemple de divergence, tant au niveau de la structure que de la régulation des deux gènes.

Rappelons d'abord que l'origine évolutive commune (l'homologie) des gènes *Mtn* et *Mto* est fortement suggérée par le fait que la position de leur unique intron est conservée (Erraiss et al., 1989). Le faible pourcentage (25%) de similitude observé entre les deux métallothionéines de la drosophile contraste fortement avec ce qui est observé chez les autres espèces de métazoaires. Chez les mammifères notamment, les différentes isoformes se ressemblent à 80% environ (Hamer, 1986). Ainsi, depuis la duplication de leur gène ancestral, les séquences des gènes *Mtn* et *Mto* ont fortement divergé.

La divergence de structure des gènes *Mtn* et *Mto* a été accompagnée par une différenciation à la fois quantitative et qualitative de leur système de régulation. On observe en effet que, contrairement à *Mtn*, les transcrits de *Mto* sont toujours difficiles à détecter en conditions standards (sans induction). Les profils d'expression diffèrent également dans le temps et dans l'espace. Dans la première moitié du développement embryonnaire (~12 heures), le seul gène métallothionéine exprimé est *Mto*. Dans les stades post-embryonnaires, la localisation des transcrits *Mtn* est beaucoup plus étendue que celle des transcrits de *Mto*. Le fait que *Mtn* soit fréquemment dupliqué dans les populations naturelles alors que *Mto* ne l'est pas constitue une autre différence importante entre les deux gènes. Remarquons que les duplications de *Mtn* sont arrangées en tandem sur des distances de 2 à 6 kb (Maroni et al., 1987), alors que les deux gènes *Mtn* et *Mto*, issus d'une très probable duplication d'un gène ancestral, sont très éloignés l'un de l'autre sur le chromosome III (85E pour *Mtn* et 92E pour *Mto*). La grande différence entre les environnements génomiques respectifs des deux gènes n'a probablement pas été sans influence sur l'évolution spécifique de leurs systèmes de régulation.

L'étude que nous avons menée sur l'expression interspécifique de *Mtn* illustre la relative rapidité d'évolution d'un système régulateur. En effet, alors que l'organisation structurale du gène est identique chez les différentes espèces testées, on constate que les profils d'expression sont différents. Il serait particulièrement intéressant d'étudier les séquences régulatrices du gène *Mtn* dans les espèces du sous-groupe *melanogaster*. La comparaison interspécifique de la séquence des différents gènes *Mtn* pourrait permettre d'identifier les éléments régulateurs situés en cis et responsables de la variabilité observée. Des expériences de transgénèse de *Drosophila melanogaster* avec des gènes *Mtn* d'espèces voisines apporteraient également des informations sur l'implication dans ce phénomène d'éventuels facteurs situés en trans. Nous pouvons concevoir que générer de nouvelles fonctions, et donc à terme de nouvelles espèces, peut se faire beaucoup plus rapidement par modulation de la régulation des gènes plutôt que par modification de leur structure primaire. Ainsi, le gène *Mtn* constitue un bon modèle pour étudier un processus fondamental de l'évolution.

Existe-t-il une spécialisation fonctionnelle des deux gènes métallothionéine de la drosophile ?

Nous venons de voir l'importance de la divergence qui existe entre les deux gènes *Mtn* et *Mto*. Cette constatation pose le problème de savoir si les deux protéines diffèrent au niveau de leur fonction. Rappelons que, chez les rongeurs, on trouve quatre types d'isoformes de métallothionéines régulées différemment. Et il est clair que la métallothionéine MT3 (= GIF: Growth Inhibitory Factor) possède une fonction spécifique d'inhibition de la croissance neuronale (Kille, 1994). Trouverons-nous chez la drosophile une telle spécialisation? Et dans quelles fonctions?

Malgré les différences décrites précédemment, un certain nombre de points communs rapprochent les gènes *Mtn* et *Mto*. D'abord, l'expression post-embryonnaire des deux gènes est restreinte au tractus digestif, ce qui suggère qu'ils sont tous les deux impliqués dans la métabolisation des métaux chez la drosophile. Nous n'observons pas d'expression dans d'autres tissus. Cette fonction potentielle est généralement proposée pour les métallothionéines d'autres organismes chez lesquels les principaux sites d'expression se trouvent aussi dans le tractus digestif (foie, intestin, rein). Une autre ressemblance fondamentale entre les deux gènes est leur fonction de détoxication. Il était déjà connu que la surexpression de *Mtn* conférait une meilleure résistance aux intoxications métalliques (Lange et al., 1990). En montrant qu'il en est de même pour *Mto*, nous apportons la preuve que la protéine MTO a potentiellement le même pouvoir de détoxication que MTN.

Nos résultats n'indiquent pas qu'il puisse exister une importante différence fonctionnelle entre les deux métallothionéines de drosophile. Néanmoins, vraisemblablement à cause d'un problème de seuil de détection de la technique d'hybridation in situ, il nous manque des informations en ce qui concerne l'expression spatiale de *Mto* dans l'embryon. Or, il est intéressant de constater que la transcription de *Mto* démarre dans les ovocytes et demeure à un taux constant mais faible tout au long de l'embryogenèse. Ce n'est pas le type de profil que nous attendons pour un gène impliqué dans la nutrition et la détoxication alors que *Mtn* possède lui un tel profil d'expression. De plus, seul *Mto* est exprimé dans la première moitié du développement embryonnaire. L'ensemble de ces indices permet de penser que, s'il existe une

différenciation fonctionnelle entre *Mtn* et *Mto*, elle pourrait bien se manifester au cours de l'embryogenèse. Si l'on admet que la protéine MTN serait plutôt impliquée dans les processus de métabolisation des métaux, alors il est tentant de penser que la spécialisation fonctionnelle de MTO concernerait plutôt l'homéostasie métallique. Dans cette optique, il est clair que l'obtention d'un mutant amorphe du gène *Mto* apparaît comme un objectif prioritaire. Il permettrait de tester l'action de ce gène sur les événements précoces de l'embryogenèse. Les nombreux facteurs à doigts de zinc exprimés durant cette période seront-ils sensibles à l'absence complète de la protéine MTO ?

Les métallothionéines: des protéines de nutrition et de stress?

Nous avons vu dans l'Introduction que les fonctions des métallothionéines sont probablement multiples et liées au métabolisme des métaux et des radicaux libres. Un des aspects de ce métabolisme concerne l'absorption et l'excrétion des ions métalliques. Un autre aspect est celui des situations de stress cellulaire dans lesquelles les radicaux libres sont très souvent impliqués.

Nos résultats sur la localisation de l'expression des gènes *Mtn* et *Mto* au cours du développement sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle les métallothionéines seraient impliquées dans l'absorption et l'excrétion des métaux. En effet, *Mtn* et *Mto* sont préférentiellement exprimés dans le mésentéron et les tubes de Malpighi, qui sont les principaux organes assurant l'absorption et l'excrétion des métaux chez la drosophile. Afin de confirmer cette interprétation, il serait nécessaire de connaître avec précision les sites majeurs de stockage des ions Cu^{2+} et Zn^{2+} aux différents stades de développement de la drosophile. L'étude de cette répartition a été faite chez la larve de troisième stade, mais pas chez l'embryon. Il serait notamment intéressant de savoir si la dégradation du vitellus en fin d'embryogenèse libère une grande quantité d'ions métalliques susceptibles d'induire la synthèse de *Mtn* dans le mésentéron. Pour compléter cette étude physiologique, il faudrait également connaître la localisation intra et extra-cellulaire des protéines MTN et MTO. Leur présence éventuelle dans des organites tels que les lysosomes ou les vacuoles de l'intestin ainsi que dans l'urine, l'hémolymphe ou le méconium renforcerait l'hypothèse d'un rôle de ces protéines dans l'excrétion et la détoxification des métaux.

J'ai testé l'implication éventuelle des gènes *Mtn* et *Mto* dans d'autres situations de stress que l'intoxication métallique. Ces deux gènes sont inductibles *in vivo* par un choc thermique et par un stress oxydatif. Les lignées transgéniques que nous avons construites constituent ainsi de bons outils pour l'étude de l'inductibilité des métallothionéines par des facteurs environnementaux. Ces résultats représentent également la première étape d'une étude du rôle protecteur de ces protéines contre les radicaux libres. Un nombre croissant de publications font en effet état d'un tel rôle pour les métallothionéines mais, en-dehors de la levure, ces travaux sont en général menés *in vitro* ou *ex vivo*, c'est-à-dire dans des conditions n'impliquant pas l'organisme entier (Sato et Bremner, 1993). Or la drosophile constitue un excellent modèle pour étudier la protection contre les radicaux libres. En effet, les gènes des deux principales enzymes de ce système protecteur, la catalase et la superoxyde dismutase, sont clonés et on dispose de mutants (Lindsley et Zimm, 1992) et de lignées transgéniques surexprimant ces protéines (Orr et Sohal, 1994). La participation de *Mtn* et de *Mto* à ces processus de protection pourrait ainsi être facilement testée en contexte mutant pour la catalase et la

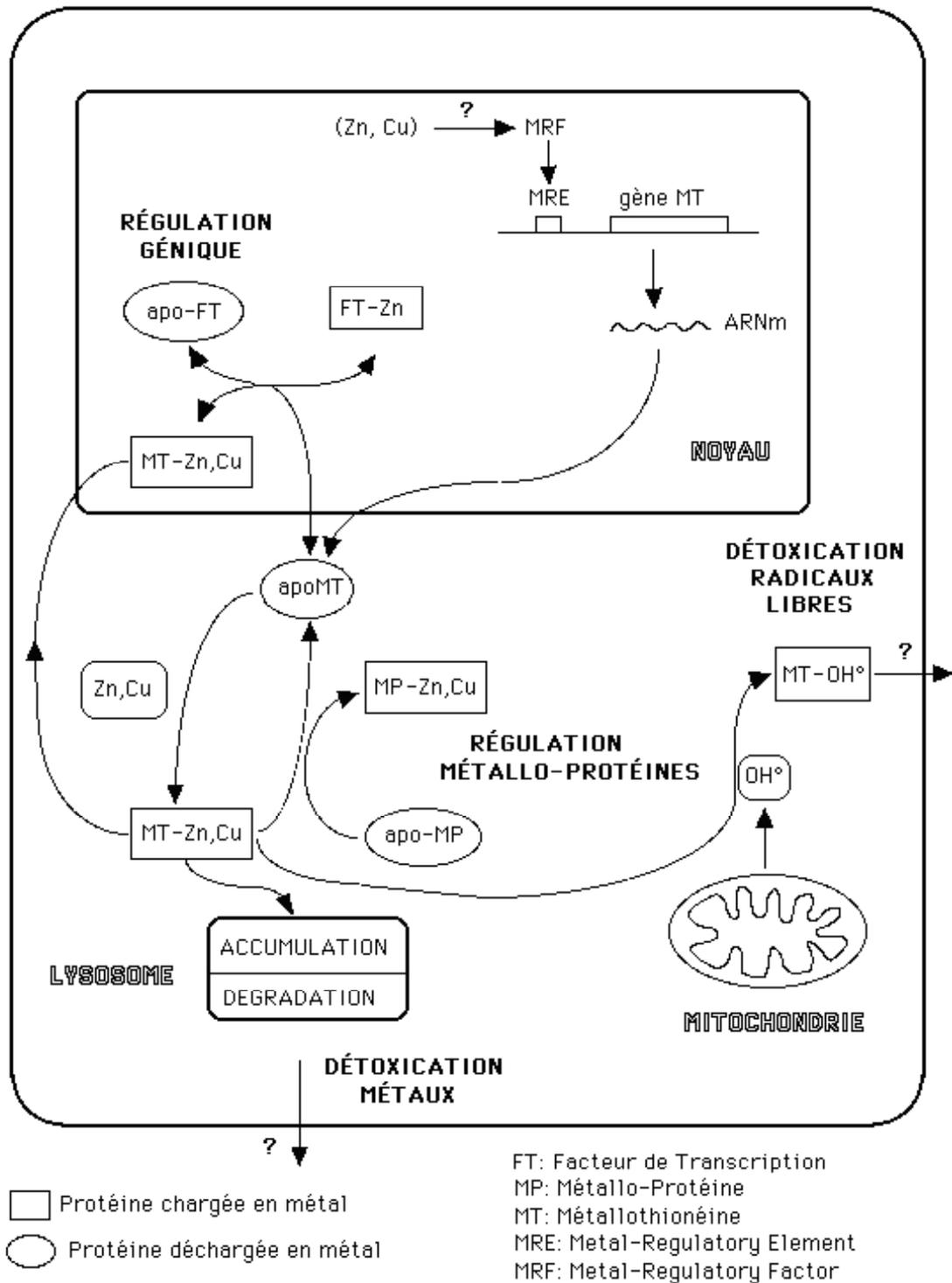
superoxyde dismutase. Il est également intéressant de signaler que la surexpression de ces enzymes augmente la durée de vie chez la drosophile (Orr et Sohal, 1994), soulignant le rôle des radicaux libres dans la sénescence. Si l'inductibilité des métallothionéines de drosophile par un stress oxydatif reflète une réelle fonction de détoxification, alors l'étude de ces protéines dans les mécanismes de vieillissement représenterait une voie de recherche nouvelle et passionnante.

Conclusion

Nos connaissances sur la physiologie des métaux et des radicaux libres comportent encore d'importantes lacunes, en particulier en ce qui concerne l'entrée, le stockage et la disponibilité des ions métalliques à l'intérieur de la cellule. Le métabolisme de ces éléments intègre par ailleurs deux aspects différents mais liés: l'homéostasie et la détoxification. En effet, bien que certains ions métalliques soient essentiels à la vie, leur concentration et leur fixation à un ligand doivent être étroitement contrôlés sinon ces éléments vitaux deviennent toxiques. Quant aux radicaux libres, capables de détruire toutes les macromolécules biologiques, ils sont produits normalement par la respiration. Ainsi, à cause de la double nature de ces métabolites, il est nécessaire que la cellule dispose à la fois d'un système homéostatique et de bons moyens de protection. Les données accumulées au cours de ces dernières années suggèrent fortement que les métallothionéines sont des protéines capables de remplir cette double fonction. Un modèle schématisant les principaux rôles attribués aux métallothionéines chez divers organismes est présenté sur la page 151.

Nos résultats s'intègrent à ceux d'un ensemble de travaux actuels qui cherchent à élucider la pléiotropie fonctionnelle des métallothionéines. L'enjeu de ces études est multiple. Il s'agit de comprendre la physiologie des métaux en conditions normales et après intoxication. L'importante pollution métallique de notre environnement urbain, routier ou industriel justifie amplement de tels efforts. La participation des métallothionéines dans la réponse à de nombreux stress normaux ou pathologiques incite également de nombreux médecins à s'intéresser au rôle de ces protéines dans différentes situations telles que le cancer, la sénescence et les maladies neurodégénératives. Enfin, la possibilité que les métallothionéines soient capables de réguler l'activité génique en contrôlant la disponibilité en zinc pour les facteurs de transcription dépendant de cet ion demeure l'hypothèse la moins étudiée à ce jour. Le travail qui reste à accomplir pour élucider les fonctions des métallothionéines devrait tirer profit de l'étude génétique de quelques organismes, parmi lesquels la drosophile est en première place.

Modèle des différents rôles des métallothionéines dans la cellule



BIBLIOGRAPHIE

- Akam, M. E., and J. R. Carlson. 1985. The detection of *Jonah* gene transcripts in *Drosophila* by in situ hybridization. *The EMBO Journal* 4:155-161.
- Andersen, R. D., B. W. Birren, S. J. Taplitz, and H. R. Herschman. 1986. Rat metallothionein-1 structural gene and three pseudogenes, one of which contains 5'-regulatory sequences. *Molecular and Cellular Biology* 6:302-314.
- Andrews, G. K., E. D. Adamson, and L. Gedamu. 1984. The ontogeny of expression of murine metallothionein: comparison with the *alpha-fetoprotein* gene. *Developmental Biology* 103:294-303.
- Andrews, G. K., Y. M. Huet, L. D. Lehman, and S. K. Dey. 1987. Metallothionein gene regulation in the preimplantation rabbit blastocyst. *Development* 100:463-469.
- Andrews, G. K., Y. Huet-Hudson, B. C. Paria, M. T. McMaster, S. K. De, and S. K. Dey. 1991. Metallothionein gene expression and metal regulation during preimplantation mouse embryo development. *Dev. Biol.* 145:13-27.
- Angerer, L. A., G. Kawczynski, D. G. Wilkinson, M. Nemer, and R. C. Angerer. 1986. Spatial patterns of metallothionein mRNA expression in the sea urchin embryo. *Developmental Biology* 116:543-547.
- Ashburner, M. 1989. *Drosophila*, a laboratory handbook. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Azpiazu, N., and M. Frasch. 1993. *tinman* and *bagpipe*: two homeo box genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of *Drosophila*. *Genes & Dev.* 7:1325-1340.
- Ballinger, D. G., and S. Benzer. 1989. Targeted gene mutations in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9402-9406.
- Beach, L. R., and R. D. Palmiter. 1981. Amplification of the metallothionein-I gene in cadmium-resistant mouse cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2110-2114.
- Behl, C., J. B. Davis, R. Lesley, and D. Schubert. 1994. Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity. *Cell* 77:817-827.
- Bernard, M. 1990. Cours de chimie minérale. Bordas, Paris.
- Bouqueneau, J. M., C. Ballan-Dufrançais, and A. Y. Jeantet. 1985. Storage of Hg in the ileum of *Blatella germanica*: biochemical characterization of metallothionein. *Comp. Biochem. Physiol.* 80C:95-98.
- Bownes, M. 1982. Embryogenesis. Pp. 67-94 in R. Ransom, ed. A handbook of *Drosophila* development. Elsevier Biomedical Press.
- Bremner, I. 1991. Nutritional and physiological significance of metallothionein. Pp. 25-35 in J. F. Riordan, and B. L. Vallee, eds. *Metallobiochemistry*. Academic Press, Inc.
- Bremner, I. 1993. Involvement of metallothionein in the regulation of mineral metabolism. Pp. 111-124 in K. T. Suzuki, N. Imura, and M. Kimura, eds. *Metallothionein III. Biological roles and medical implications*. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Brouwer, M., and T. Brouwer-Høxum. 1992. Glutathione-mediated transfer of copper(I) into american lobster apohemocyanin. *Biochemistry* 31:4096-4102.
- Bryant, P. J., and P. Levinson. 1985. Intrinsic growth control in the imaginal primordia of *Drosophila*, and the autonomous action of the lethal mutation causing overgrowth. *Developmental Biology*

107:355-363.

- Butt, T. R., E. Sternberg, J. Herd, and S. T. Crooke. 1984. Cloning and expression of a yeast copper metallothionein gene. *Gene* 27:23-33.
- Campos-Ortega, J. A., and V. Hartenstein. 1985. The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Springer-Verlag.
- Carlson, J. R., and D. S. Hogness. 1985. The *Jonah* genes: a new multigene family in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* 108:341-354.
- Carter, A. D., B. K. Felber, M. Jubier, C. J. Schmidt, and D. H. Hamer. 1984. Duplicated heavy metal control sequences of the mouse *metallothionein-I* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:7392-7396.
- Chan, H. M., and M. G. Cherian. 1993. Ontogenic changes in hepatic metallothionein isoforms in prenatal and newborn rats. *Biochem. Cell Biol.* 71:133-140.
- Cherian, M. G., and H. M. Chan. 1993. Biological functions of metallothionein- A review. Pp. 87-109 in K. T. Suzuki, N. Imura, and M. Kimura, eds. *Metallothionein III. Biological roles and medical implications*. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Chesters, J. K. 1992. Trace element-gene interactions. *Nutrition reviews* 50:217-223.
- Cho, K. W. Y., B. Blumberg, H. Steinbeisse, and E. M. De Robertis. 1991. Molecular nature of Spemann's organizer: the role of the *Xenopus* homeobox gene *gooseoid*. *Cell* 67:1111-1112.
- Chubatsu, L. S., and R. Meneghini. 1993. Metallothionein protects DNA from oxidative damage. *Biochem. J.* 281:193-198.
- Churchich, J. E., G. Scholz, and F. Kwok. 1989. Activation of pyridoxal kinase by metallothionein. *Biochimica et Biophysica Acta* 996:181-186.
- Cotton, F. A., and G. Wilkinson. 1980. *Advanced inorganic chemistry, a comprehensive text*. John Wiley and Sons, New York.
- De Miranda, J. R., M. A. Thomas, D. A. Thurman, and A. B. Tomsett. 1990. Metallothionein genes from the flowering plant *Mimulus guttatus*. *FEBS Letters* 260:277-280.
- De Prisco, P., R. Scudiero, V. Carginale, A. Capasso, E. Parisi, and B. De Petrocellis. 1991. Developmental changes of metallothionein content and synthesis in sea urchin *Paracentrotus lividus* embryos. *Cell Biology International Reports* 15:305-317.
- De, S. K., M. T. McMaster, S. K. Dey, and G. K. Andrews. 1989. Cell-specific metallothionein gene expression in mouse decidua and placentae. *Development* 107:611-621.
- Debec, A., R. Mokdad, and M. Wegnez. 1985. Metallothioneins and resistance to cadmium poisoning in *Drosophila* cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 127:143-152.
- Dickinson, W. J. 1991. The evolution of regulatory genes and patterns in *Drosophila*. *Evolutionary Biology* 25:127-173.
- Diederich, R. J., V. K. L. Merrill, M. A. Pultz, and T. C. Kaufman. 1989. Isolation, structure, and expression of *labial*, a homeotic gene of the Antennapedia Complex involved in *Drosophila* head development. *Genes Dev* 3:399-414.
- Dimitriadis, V. K., and C. D. Kastritsis. 1984. Ultrastructural analysis of the midgut of *Drosophila auraria* larvae. Morphological observations and their physiological implications. *can. J. Zool.* 62:659-669.

- Durnam, D. M., and R. D. Palmiter. 1981. Transcriptional regulation of the mouse *metallothionein-1* gene by heavy metals. *The Journal of Biological Chemistry* 256:5712-5716.
- Ecker, D. J., T. R. Butt, E. J. Sternberg, M. P. Neeper, C. Debouck, J. A. Gorman, and S. T. Crooke. 1986. Yeast metallothionein function in metal ion detoxification. *The Journal of Biological Chemistry* 261:16895-16900.
- Engel, D. W., and M. Brouwer. 1991. Short-term metallothionein and copper changes in blue crabs at ecdysis. *Biol. Bull.* 180:447-452.
- Engström, Y., L. Kadalayil, S. Sun, C. Samakovlis, D. Hultmark, and I. Faye. 1993. kB-like motifs regulate the induction of immune genes in *Drosophila*. *J. Mol. Biol.* 232:327-333.
- Erraiss, N., P. Silar, A. Cadic-Jacquier, R. Mokdad-Gargouri, and M. Wegnez. 1989. The metallothionein system of *Drosophila melanogaster*. Pp. 91-99 in D. H. Hamer, and D. R. Winge, eds. *Metal ion homeostasis*. Liss, A.R., New York.
- Fauvarque, M.-O., and J.-M. Dura. 1993. *polyhomeotic* regulatory sequences induce developmental regulator-dependent variegation and targeted P-element insertions in *Drosophila*. *Genes & Dev.* 7:1508-1520.
- Fauvarque-Marras, M.-O. 1994. Interactions génétiques et moléculaires au cours du développement de *Drosophila melanogaster* impliquant le gène *polyhomeotic*, un régulateur local de la structure chromatinienne. Paris XI.
- Fernando. 1989. *Gene* 81:117-183.
- Filshie, B., D. F. Poulson, and D. F. Waterhouse. 1971. Ultrastructure of the copper-accumulating region of the *Drosophila* larval midgut. *Tissue & Cell* 3:77-102.
- Fleig, R., U. Walldorf, W. J. Gehring, and K. Sander. 1992. Development of the deformed protein pattern in the embryo of the honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera). *Roux's Arch. Dev. Biol.* 201:235-242.
- Foster, R., N. Jahroudi, U. Varshney, and L. Gedamu. 1988. Structure and expression of the human metallothionein-IG gene. *The Journal of Biological Chemistry* 263:11528-11535.
- Freedman, J. H., L. W. Slice, D. Dixon, A. Fire, and C. S. Rubin. 1993. The novel metallothionein genes of *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Biological Chemistry* 268:2554-2564.
- Good, M., and M. Vasak. 1986. Iron(II)-substituted metallothionein: evidence for the existence of iron-thiolate clusters. *Biochemistry* 25:8353-8356.
- Grady, D. L., D. L. Robinson, and C. E. Hildebrand. 1990. Genomic sequence of the Chinese hamster *MT1* gene. *Nucleic Acids Research* 18:7149.
- Gralla, E. B., D. J. Thiele, P. Silar, and J. S. Valentine. 1991. ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8558-8562.
- Hamer, D. H. 1986. Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.* 55:913-951.
- Hamer, D. H., D. J. Thiele, and J. E. Lemontt. 1985. Function and autoregulation of yeast copperthionein. *Science* 228:685-690.
- Hao, R., R. F. Pfeiffer, and M. Ebadi. 1993. Purification and characterization of metallothionein and its activation of pyridoxal phosphokinase in trout (*Salmo gairdneri*) brain. *Comp. Biochem. Physiol.* 104B:293-298.

- Hazelhoff Roelfzema, W., C. Tohyama, H. Nishimura, N. Nishimura, and A. F. W. Morselt. 1989. Quantitative immunohistochemistry of metallothionein in rat placenta. *Histochemistry* 90:365-369.
- Hempe, J. M., and R. J. Cousins. 1991. Cysteine-rich intestinal protein binds zinc during transmucosal zinc transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9671-9674.
- Hoppler, S., and M. Bienz. 1994. Specification of a single cell type by a *Drosophila* homeotic gene. *Cell* 76:689-702.
- Hultmark, D. 1993. Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity. *TIG* 9:178-183.
- Hurley, L. S. 1981. Trace metals in mammalian development. *The John Hopkins Medical Journal* 148:1-10.
- Imbert, J., M. Zafarullah, V. C. Culotta, L. Gedamu, and D. Hamer. 1989. Transcription factor MBF-1 interacts with metal regulatory elements of higher eucayotic metallothionein genes. *Molecular and Cellular Biology* 9:5315-5323.
- Immerglück, K., P. A. Lawrence, and M. Bienz. 1990. Induction across germ layers in *Drosophila* mediated by a genetic cascade. *Cell* 62:261-268.
- Ip, Y. T., M. Reach, Y. Engström, L. Kadalayil, H. Cai, S. Gonzales-Crespo, K. Tatei, and M. Levine. 1993. *Dif*, a *dorsal*-related gene that mediates an immune response in *Drosophila*. *Cell* 75:753-763.
- Jungmann, J., H. Reins, J. Lee, A. Romeo, R. Hassett, D. Kosman, and S. Jentsch. 1993. MAC1, a nuclear regulatory protein related to cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. *The EMBO Journal* 12:5051-5056.
- Kaiser, K., and S. F. Goodwin. 1990. "Site-selected" transposon mutagenesis of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1686-1690.
- Karin, M. 1985. Metallothioneins: proteins in search of function. *Cell* 41:9-10.
- Karin, M., R. Najarian, A. Haslinger, P. Valenzuela, J. Welch, and S. Fogel. 1984. Primary structure and transcription of an amplified genetic locus: the *CUPI* locus of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:337-341.
- Kawashima, I., T. Kennedy, M. Chino, and B. G. Lane. 1992. Wheat E_c metallothionein genes. *Eur. J. Biochem.* 209:971-976.
- Kennison, J. A. 1993. Transcriptional activation of *Drosophila* homeotic genes from distant regulatory elements. *Trends in Genetics* 9:75-79.
- Kille, P., A. Hemmings, and E. A. Lunney. 1994. Memories of metallothionein. *Biochimica et Biophysica Acta* 1205:151-161.
- King, R. C. 1970. Ovarian development in *Drosophila melanogaster*. Academic Press, Inc.
- Klementz, R., U. Weber, and W. J. Gehring. 1987. The *white* gene as a marker in a new P-element vector for gene transfert in *Drosophila*. *Nucleic Acids Research* 15:3947-3959.
- Kobayashi, H., Y. Uchida, Y. Ihara, K. Nakajima, S. Kohsaka, T. Miyatake, and S. Tsuji. 1993. Molecular cloning of rat growth inhibitory factor cDNA and the expression in the central nervous system. *Molecular Brain Research* 19:188-194.
- Kojima, Y. 1991. Definitions and nomenclature of metallothioneins. Pp. 8-10 in J. F. Riordan, and B. L.

- Vallee, eds. Metallobiochemistry. Academic Press.
- Kuhn, R., U. Schäfer, and M. Schäfer. 1988. pW-ATG-lac, P-element vectors for *lacZ* transcriptional gene fusions in *Drosophila*. *Nucleic Acids Research* 16:4163.
- Kägi, J. H. R. 1991. Overview of metallothionein. Pp. 613-626 in J. F. Riordan, and B. L. Vallee, eds. *Metallobiochemistry*. Birkhäuser Verlag.
- Kägi, J. H. R. 1993. Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins: an overview. Pp. 29-55 in K. T. Suzuki, N. Imura, and M. Kimura, eds. *Metallothionein III. Biological roles and medical implications*. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Kägi, J. H. R., and Y. Kojima. 1987. Chemistry and biochemistry of metallothionein. Pp. 25-61 in J. H. R. Kägi, and Y. Kojima, eds. *Metallothionein II*. Birkhäuser Verlag.
- Kägi, J. H. R., and B. L. Vallee. 1961. Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. II. Physicochemical properties. *The Journal of Biological Chemistry* 236:2435-2442.
- Kägi, J. H. R., and B. L. Vallee. 1960. Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *The Journal of Biological Chemistry* 235:3460-3465.
- Labbé, S., L. Larouche, D. Mailhot, and C. Séguin. 1993. Purification of mouse MEP-1, a nuclear protein which binds to the metal regulatory elements of genes encoding metallothionein. *Nucleic Acids Research* 21:1549-1554.
- Lachaise, D., M.-L. Cariou, J. R. David, F. Lemeunier, L. Tsacas, and M. Ashburner. 1988. Historical biogeography of the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Evol. Biol.* 22:159-225.
- Lallier, R. 1975. Animalization and vegetalization. Pp. 5317-5321 in G. Czihak, ed. *The sea urchin embryo*. Springer-Verlag, Berlin.
- Lange, B. W., C. H. Langley, and S. W. 1990. Molecular evolution of *Drosophila* metallothionein genes. *Genetics* 126:921-932.
- Lastowski-Perry, D., E. Otto, and G. Maroni. 1985. Nucleotide sequence and expression of a *Drosophila* metallothionein. *The Journal of Biological Chemistry* 260:1527-1530.
- Lauverjat, S., C. Ballan-Dufrancais, and M. Wegnez. 1989. Detoxification of cadmium. Ultrastructural study and electron-probe microanalysis of the midgut in a cadmium-resistant strain of *Drosophila melanogaster*. *Biology of Metals* 2:97-107.
- Lawrence, P. A. 1992. *The making of a fly*. Blackwell Scientific Publications.
- Lee, W., A. Haslinger, M. Karin, and R. Tjian. 1987. Two factors that bind and activate the human metallothionein IIA gene in vitro also interact with the SV40 promoter and enhancer regions. *Nature* 325:368-372.
- Lindsley, D. L., and G. G. Zimm. 1992. *The genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, Inc.
- Maliuga, D. P. 1941. Cadmium and organisms. *Doklady Akad. Nauk., U.S.S.R.* 31:145-147.
- Marchal-Ségault, D., C. Briancçon, S. Halpern, P. Fragu, and G. Laugé. 1990. Secondary ion mass spectrometry analysis of the copper distribution in *Drosophila melanogaster* chronically intoxicated with Bordeaux mixture. *Biol. Cell.* 70:129-132.
- Margoshes, M., and B. L. Vallee. 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society* 79:4813.

- Markossian, K. A., V. Z. Melkonyan, N. A. Paitan, and R. M. Nalbandyan. 1988. On the transfer between dopamine β -monooxygenase and Cu-thionein. *Biophys. Res. Commun.* 153:558-563.
- Maroni, G. 1990. Animal metallothioneins. Pp. 216-229 in A. J. Shaw, ed. *Heavy-metal tolerance in plants: evolutionary aspects*. CRC Press, Florida, USA.
- Maroni, G., E. Otto, and D. Lastowski-Perry. 1986. Molecular and cytogenetic characterization of a metallothionein gene of *Drosophila*. *Genetics* 112:493-504.
- Maroni, G., and D. Watson. 1985. Uptake and binding of cadmium, copper and zinc by *Drosophila melanogaster* larvae. *Insect Biochem.* 15:55-63.
- Maroni, G., J. Wise, J. E. Young, and E. Otto. 1987. Metallothionein gene duplications and metal tolerance in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 117:739-744.
- Masters, B. A., E. J. Kelly, C. J. Quaipe, and R. L. Brinster. 1994. Targeted disruption of *metallothionein I and II* genes increases sensitivity to cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:584-588.
- Mastrippolito, R., M. Bendali, Y. Charon, M. Leblanc, B. Martin, H. Tricoire, and L. Valentin. 1991. SOFI: a bidimensional detector for fast direct on-line quantification of Beta particles on blots. *Biotechniques* 11:778-782.
- Matrisian, L. M. 1990. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *TIG* 6:121-125.
- McCormick, C. C. 1984. The tissue-specific accumulation of hepatic zinc metallothionein following parenteral iron loading. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 176:392-402.
- McMasters, M. T., S. K. Dey, and G. K. Andrews. 1993. Association of monocytes and neutrophils with early events of blastocyst implantation in mice. *Journal of Reproduction and Fertility* 99:561-569.
- Mehra, R. K., J. R. Garey, T. R. Butt, W. R. Gray, and D. R. Winge. 1989. *Candida glabrata* metallothioneins. *The Journal of Biological Chemistry* 264:19747-19753.
- Michalska, A. E., and K. H. A. Choo. 1993. Targeting and germ-line transmission of a null mutation at the metallothionein I and II loci in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8088-8092.
- Miller, A. 1965. The internal anatomy and histology of the imago of *Drosophila melanogaster*. Pp. 420-534 in M. Demerec, ed. *Biology of Drosophila*. Hafner Publishing Company.
- Mitchell, M. A., and A. J. Carlosle. 1991. Plasma zinc as an index of vitellogenin production and reproductive status in the domestic fowl. *Comp. Biochem. Physiol.* 100A:719-724.
- Mokdad, R., A. Debec, and M. Wegnez. 1987. Metallothionein genes in *Drosophila melanogaster* constitute a dual system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2658-2662.
- Münger, K., U. A. Germann, and K. Lerch. 1985a. Isolation and structural organization of the *Neurospora crassa* copper metallothionein gene. *The EMBO Journal* 4:2665-2668.
- Münger, K., and K. Lerch. 1985b. Copper metallothionein from the fungus *Agaricus bisporus*: chemical and spectroscopic properties. *Biochemistry* 24:6751-6756.
- Nagy, L. M., and S. Carroll. 1994. Conservation of *wingless* patterning functions in the short-germ embryos of *Tribolium castaneum*. *Nature* 367:460-463.
- Nemer, M. 1986. An altered series of ectodermal gene expressions accompanying the reversible suspension of differentiation in the zinc-animalized sea urchin embryo. *Developmental Biology* 114:214-224.

- Nemer, M., R. D. Thornton, E. W. Stuebing, and P. Harlow. 1991. Structure, spatial, and temporal expression of two sea urchin metallothionein genes, *SpMTBI* and *SpMTA*. *J. Biol. Chem.* 266:6586-6593.
- Nemer, M., E. C. Travaglini, E. Rondinelli, and J. D'Alonzo. 1984. Developmental regulation, induction, and embryonic tissue specificity of sea urchin metallothionein gene expression. *Dev. Biol.* 102:471-482.
- Nielson, K. B., and D. R. Winge. 1985. Independence of the domains of metallothionein in metal binding. *J. Biol. Chem.* 266:6586-6593.
- Nishimura, H., N. Nishimura, and C. Tohyama. 1989. Immunohistochemical localization of metallothionein in developing rat tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 37:715-722.
- Olsson, P., M. Zafarullah, R. Foster, T. Hamor, and L. Gedamu. 1990. Developmental regulation of metallothionein mRNA, zinc and copper levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Eur. J. Biochem.* 193:229-235.
- Orr, W. C., and R. S. Sohal. 1994. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 263:1128-1130.
- Otto, E., J. M. Allen, J. E. Young, R. D. Palmiter, and G. Maroni. 1987. A DNA segment controlling metal-regulated expression of the *Drosophila melanogaster* metallothionein gene *Mtn*. *Molecular and Cellular Biology* 7:1710-1715.
- Otto, E., J. E. Young, and G. Maroni. 1986. Structure and expression of a tandem duplication of the *Drosophila* metallothionein gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:6025-6029.
- Ouellette, A. J. 1982. Metallothionein mRNA expression in fetal mouse organs. *Developmental Biology* 92:240-246.
- Palmiter, R. D. 1994. Regulation of metallothionein genes by heavy-metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1219-1223.
- Palmiter, R. D., R. L. Brinster, R. E. Hammer, M. E. Trumbauer, M. G. Rosenfeld, N. C. Birnberg, and R. M. Evans. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300:611-615.
- Palmiter, R. D., S. D. Findley, T. E. Whitmore, and D. M. Durnam. 1992. MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6333-6337.
- Palmiter, R. D., E. P. Sandgren, D. M. Koeller, S. D. Findley, and R. L. Brinster. 1993. Metallothionein genes and their regulation in transgenic mice. Pp. 399-406 in K. T. Suzuki, N. Imura, and M. Kimura, eds. *Metallothionein III. Biological roles and medical implications*. Birkhäuser Verlag.
- Paro, R. 1993. Mechanisms of heritable gene repression during development of *Drosophila*. *Current Opinion in Cell Biology* 5:999-1005.
- Patel, N. H., B. G. Condron, and K. Zinn. 1994. Pair-rule expression patterns of *even-skipped* are found in both short- and long-germ beetles. *Nature* 367:429-434.
- Patel, N. H., E. Martin-Blanco, K. G. Coleman, S. J. Poole, M. C. Ellis, T. B. Kornberg, and C. S. Goodman. 1989. Expression of *engrailed* proteins in arthropods, annelids, and chordates. *Cell* 58:955-968.
- Perkins, K. K., A. Admon, N. Patel, and R. Tjian. 1990. The *Drosophila* Fos-related AP-1 protein is a developmentally regulated transcription factor. *Genes & Dev.* 4:822-834.

- Peterson, M. G., F. Hannan, and J. F. B. Mercer. 1988. The sheep metallothionein gene family. *Eur. J. Biochem.* 174:417-424.
- Piletz, J. E., R. D. Andersen, B. W. Birren, and H. R. Herschman. 1983. Metallothionein synthesis in foetal, neonatal and maternal rat liver. *Eur. J. Biochem.* 131:489-495.
- Piscator, M. 1964. *Nord. Hyg. Tidskr.* 45:76-82.
- Poulson, D. F., and V. T. Bowen. 1952. Organization and function of the inorganic constituents of nuclei. *Exp. Cell. Res.* 2:161-179.
- Poulson, D. F., V. T. Bowen, R. M. Hilse, and A. C. Rubinson. 1952. The copper metabolism of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 38:912-921.
- Price, D., and J. G. Joshi. 1982. Ferritin: a zinc detoxicant and a zinc ion donor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:3116-3119.
- Price, D. J., and J. G. Joshi. 1983. Ferritin-binding of beryllium and other divalent metal ions. *J. Biol. Chem.* 258:10873-10880.
- Quaife, C., R. E. Hammer, N. K. Mottet, and R. D. Palmiter. 1986. Glucocorticoid regulation of metallothionein during murine development. *Developmental Biology* 118:549-555.
- Quaife, C. J., S. D. Findley, J. C. Erickson, G. J. Froelick, E. J. Kelly, B. P. Zambrowicz, and R. D. Palmiter. 1994. Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry* 33:7250-7259.
- Rabinow, L., and W. J. Dickinson. 1986. Complex cis-acting regulators and locus structure of *Drosophila* tissue-specific ADH variants. *Genetics* 112:523-537.
- Radtke, F., R. Heuchel, O. Georgiev, M. Hergersberg, M. Gariglio, Z. Dembic, and W. Schaffner. 1993. Cloned transcription factor MTF-1 activates the mouse metallothionein I promoter. *The EMBO Journal* 12:1355-1362.
- Richards, M. P. 1989. Recent developments in trace element metabolism and function: role of metallothionein in copper and zinc metabolism. *Journal of Nutrition* 119:1062-1070.
- Richards, R. I., A. Heguy, and M. Karin. 1984. Structural and functional analysis of the human metallothionein-1A gene: differential induction by metal ions and glucocorticoids. *Cell* 37:263-272.
- Ringwood, A. H., and M. Brouwer. 1993. Expression of constitutive and metal-inducible metallothioneins in oyster embryos (*Crassostrea virginica*). *Comp. Biochem. Physiol.* 106B:523-529.
- Robinson, N. J., A. Gupta, A. P. Fordham-Skelton, R. R. D. Croy, B. A. Whitton, and J. W. Huckle. 1990. Prokaryotic metallothionein gene characterization and expression: chromosome crawling by ligation-mediated PCR. *Proc. R. Soc. Lond. B* 242:241-247.
- Robinson, N. J., A. M. Tommey, C. Kuske, and P. J. Jackson. 1993. Plant metallothioneins. *Biochem. J.* 295:1-10.
- Rubin, G. M., and A. C. Spradling. 1982. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218:348-353.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sato, M., and I. Bremner. 1993. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radicals Biology &*

Medicine 14:325-337.

- Sato, M., M. Sasaki, and H. Hojo. 1993. Induction of metallothionein synthesis by oxidative stress and possible role in acute phase response. Pp. 125-140 in K. T. Suzuki, N. Imura, and M. Kimura, eds. *Metallothionein III. Biological roles and medical implications*. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Scudiero, R., C. Capasso, P. P. De Prisco, A. Capasso, S. Filosa, and E. Parisi. 1994. Metal-binding proteins in eggs of various sea urchin species. *Cell Biology International* 18:47-53.
- Searle, P. F., B. L. Davidson, G. W. Stuart, T. M. Wilkie, G. Norstedt, and R. Palmiter. 1984. Regulation, linkage, and sequence of mouse metallothionein 1 and 2 genes. *Molecular and Cellular Biology* 4:1121-1230.
- Shartzer, K. L., K. Kage, R. J. Sobieski, and G. K. Andrews. 1993. Evolution of avian metallothionein: DNA sequence of the turkey metallothionein gene and metallothioneins cDNAs from pheasant and quail. *J. Mol. Evol.* 36:255-262.
- Shepherd, G. W., E. Rondinelli, and M. Nemer. 1983. Differences in abundance of individual RNAs in normal and animalized sea urchin embryos. *Dev. Biol.* 96:520-528.
- Silar, P., L. Théodore, R. Mokdad, N. Errais, A. Cadic, and M. Wegnez. 1990. Metallothionein *Mto* gene of *Drosophila melanogaster*: structure and regulation. *J. Mol. Biol.* 215:217-224.
- Silar, P., and M. Wegnez. 1990. Expression of the *Drosophila melanogaster* metallothionein genes in yeast. *FEBS letters* 269:273-276.
- Sohal, R. S., and R. E. Lamb. 1979. Storage-excretion of metallic cations in the adult housefly, *Musca domestica*. *J. Insect Physiol.* 25:119-124.
- Sohal, R. S., P. D. Peters, and T. A. Hall. 1976. Fine structure and X-ray microanalysis of mineralized concretions in the Malpighian tubules of the housefly, *Musca domestica*. *Tissue & Cell* 8:447-458.
- Stadtman, E. R. 1990. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Biology & Medicine* 9:315-325.
- Storz, G., L. A. Tartaglia, S. B. Farr, and B. N. Ames. 1990. Bacterial defenses against oxidative stress. *TIG* 6:363-368.
- Stuart, G. W., P. F. Searle, H. Y. Chen, R. L. Brinster, and R. D. Palmiter. 1984. A 12-base-pair DNA motif that is repeated several times in metallothionein gene promoters confers metal regulation to a heterologous gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7318-7322.
- Stuart, G. W., P. F. Searle, and R. D. Palmiter. 1985. Multiple metal regulatory elements in mouse metallothionein-I promoter. *Nature* 317:828-831.
- Suzuki, K., K. Nakajima, U. Kawaharada, K. Uehara, F. Hara, N. Otaki, M. Kimura, and Y. Tamura. 1993. Metallothionein in the human brain. *Acta Histochemica et Cytochemica* 25:617-622.
- Ségalat, L., and L. J-A. 1992. Détection par PCR de mutations chez la drosophile. *Médecine/Sciences* 8:714-716.
- Tamai, K. T., E. B. Gralla, L. M. Ellerby, J. S. Valentine, and D. J. Thiele. 1993. Yeast and mammalian metallothioneins functionally substitute for yeast copper-zinc superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8013-8017.
- Tapp, R. L., and A. Hockaday. 1977. Combined histochemical and X-ray microanalytical studies on the copper-accumulating granules in the midgut of larval *Drosophila*. *J. Cell Sci.* 26:201-215.

- Tautz, D., and C. Pfeifle. 1989. A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*. *Chromosoma* 98:81-85.
- Tepass, U., and V. Hartenstein. 1994. Epithelium formation in the *Drosophila* midgut depends on the interaction of endoderm and mesoderm. *Development* 120:579-590.
- Terra, W. R., F. P. Espinoza-Fuentes, A. F. Ribeiro, and C. Ferreira. 1988. The larval midgut of the housefly (*Musca domestica*): ultrastructure, fluid fluxes and ion secretion in relation to the organization of digestion. *J. Insect Physiol.* 34:463-472.
- Thiele, D. J. 1988. *ACE1* regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene. *Molecular and Cellular Biology* 8:2745-2752.
- Thiele, D. J. 1992. Metal-regulated transcription in eukaryotes. *Nucleic Acids Research* 20:1183-1191.
- Thirion, J. P., Y. C. Tam, M. Hassan, and G. Boulay. 1989. Genetic evidence for a metallothionein gene family in New Zealand rabbit. Pp. 31-47 in D. H. Hamer, and D. R. Winge, eds. *Metal ion homeostasis: molecular biology and chemistry*. Alan R. Liss.
- Thornalley, P. J., and M. Vasak. 1985a. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochimica et Biophysica Acta* 827:36-44.
- Thornalley, P. J., and M. Vasak. 1985b. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochimica et Biophysica Acta* 827.
- Théodore, L. 1992. Évolution fonctionnelle des métallothionéines chez la drosophile. Paris XI.
- Théodore, L., A. Ho, and G. Maroni. 1991. Recent evolutionary history of the metallothionein gene *Mtn* in *Drosophila*. *Genet. Res.* 58:203-210.
- Tsuji, S., H. Kobayashi, Y. Uchida, Y. Ihara, and T. Miyatake. 1992. Molecular cloning of human growth inhibitory factor cDNA and its down-regulation in Alzheimer's disease. *The EMBO Journal* 11:4843-4850.
- Turner, J. S., A. P. Morby, B. A. Whitton, A. Gupta, and N. J. Robinson. 1993. Construction of Zn²⁺/Cd²⁺ hypersensitive cyanobacterial mutants lacking a functional metallothionein locus. *The Journal of Biological Chemistry* 268:4494-4498.
- Uchida, Y., K. Takio, K. Titani, Y. Ihara, and M. Tomonaga. 1991. The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* 7:337-347.
- Vallee, B. L. 1991. Introduction to metallothionein. Pp. 3-7 in J. F. Riordan, and B. L. Vallee, eds. *Metallobiochemistry*. Academic Press.
- Voinar, A. O. 1950. The occurrence and role of cadmium in the organisms of animals and man. *Akad. Nauk. S.S.S.R.*:580-583.
- Waalkes, M. P., and C. D. Klaassen. 1984. Relative in vitro affinity of hepatic metallothionein for metals. *Toxic. Letters* 20:33-39.
- Webb, M. 1987. Metallothionein in regeneration, reproduction and development. Pp. 483-498 in J. H. R. Kägi, and Y. Kojima, eds. *Metallothionein II*. Birkhäuser Verlag.
- Wessing, A., and D. Eichelberg. 1978. Malpighian tubules, rectal papillae and excretion. Pp. 1-42 in M. Ashburner, and T. R. F. Wright, eds. *The genetics and biology of Drosophila*. Academic Press,

London.

- Westin, G., and W. Schaffner. 1988. A zinc-responsive factor interacts with a metal-regulated enhancer element (MRE) of the mouse *metallothionein-I* gene. *The EMBO Journal* 7:3763-3770.
- Wilkinson, D. G., and M. Nemer. 1987. Metallothionein genes *Mta* and *Mtb* expressed under distinct quantitative and tissue-specific regulation in sea urchin embryos. *Molecular and Cellular Biology* 7:48-58.
- Williams, R. J. P. 1990. The mineral elements in homeostasis and morphogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* 18:689-705.
- Winge, D. R., K. B. Nielson, W. R. Gray, and D. H. Hamer. 1985. Yeast metallothionein. *The Journal of Biological Chemistry* 260:14464-14470.
- Xu, C. 1993. cDNA cloning of a mouse factor that activates transcription from a metal response element of the mouse *metallothionein-I* gene in yeast. *DNA and cell biology* 12:517-525.
- Young, J. E., E. Otto, R. A. Fridell, H. Johansen, M. Rosenberg, and G. Maroni. 1989. Metal-regulated synthesis of a bacterial galaktokinase in *Drosophila* larvae. *Insect Biochem.* 19:251-255.
- Zafarullah, M., K. Bonham, and L. Gedamu. 1988. *Molecular and Cellular Biology* 8:4469-4476.
- Zeng, J., R. Heuchel, W. Schaffner, and J. H. R. Kägi. 1991b. Thionein (apometallothionein) can modulate DNA binding and transcription activation by zinc finger containing factor Sp1. *FEBS letters* 279:310-312.
- Zeng, J., B. L. Vallee, and J. H. R. Kägi. 1991a. Zinc transfer from transcription factor IIIA fingers to thionein clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9984-9988.
- Zhong, W., F. M. Sladek, and J. E. Darnell. 1993. The expression pattern of a *Drosophila* homolog to the mouse transcription factor HNF-4 suggests a determinative role in gut formation. *EMBO J.* 12:537-544.
- Zierold, K., and A. Wessing. 1990. Mass dense vacuoles in *Drosophila* Malpighian tubules contain zinc, not sodium. A reinvestigation by X-ray microanalysis of cryosections. *European Journal of Cell Biology* 53:222-226.