

# MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE DE PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL SUR *ENCHYTRAEUS ALBIDUS*

Laetitia PEDRONI\* (1), Andréa Oudot (1), Isabelle LAMY (1), Juliette FABURE (1)

(1) UMR 1402 ECOSYS INRAE - AgroParisTech, RD 10 Route de St Cyr 78000 Versailles

SEFA, 28-29 juin 2021

**L'objectif de cette étude est de mettre en place un biomarqueur précoce d'exposition à des contaminants métalliques chez le modèle biologique *E. albidus*, par le suivi de la réponse transcriptomique de la métallothionéine (MT).**

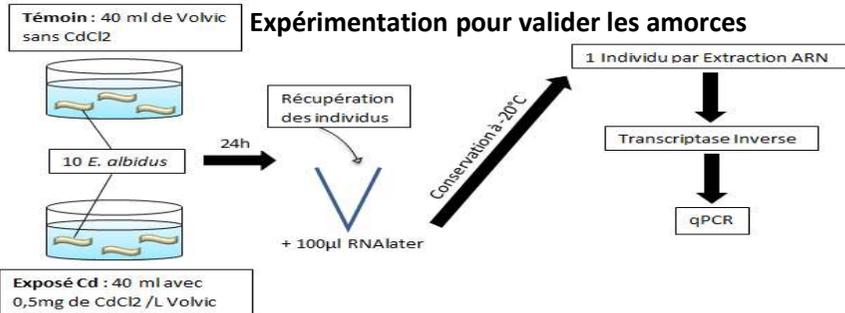
Les MT sont des protéines riches en cystéines de petite taille (5-10kDa) exprimées par l'organisme en présence de métaux. Elles se lient à plusieurs types de métaux afin de détoxifier et protéger les cellules et tissus de l'organisme. (1) Chez *Enchytraeus albidus*, il existe des séquences nucléiques présentant un site reconnu comme MT (2) et dont la protéine attendue est de 25kDa. Cela rappelle la protéine riche en cystéine (CRP) de 25kDa inducible au Cadmium (Cd) de *Enchytraeus buchholzi* (3), un gène ayant une activité de MT mais n'appartenant pas à cette superfamille de par sa grande taille. La protéine MT d'*E. albidus* est induite par la présence de Cd (4) et est probablement comme CRP une Metallothioneine-like.

→ Afin de pouvoir étudier l'expression de cette MT-like, des amorces ont été créées sur la zone la plus conservée de ces séquences, puis testées et validées sur des enchytréides exposés à du  $CdCl_2$

## Choix des amorces

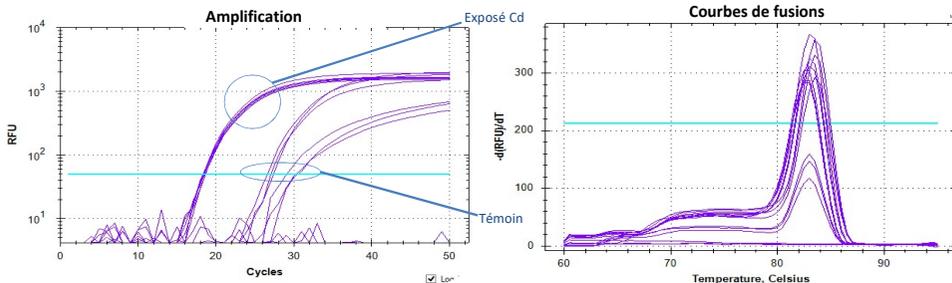
- ✓ 20 nucléotides, Tm de 60°C, GC% à 55-60 (Primers3©)
- ✓ Alignées une seule fois sur les séquences d'origines
- ✓ Non alignées par blastn sur *E. buchholzi* et toute la base de donnée de NCBI
- ✓ Pas de dimère d'amorce, self-dimère ou d'épingle (Beacon Designer™)

## Expérimentation pour valider les amorces

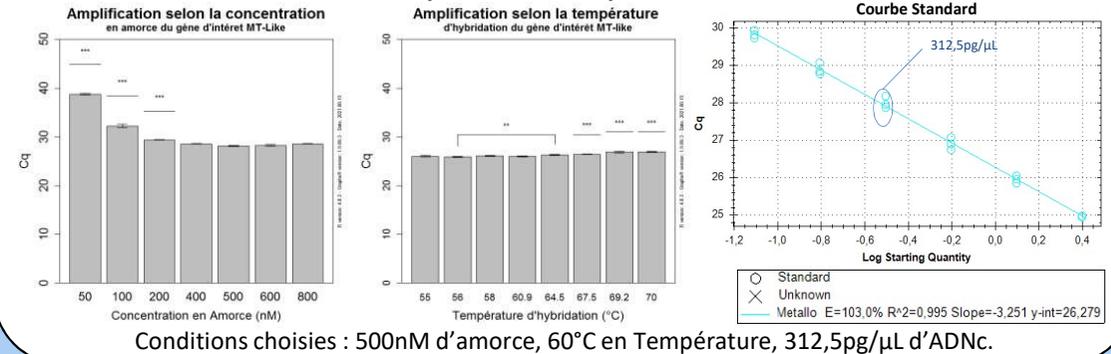


## Validation des amorces

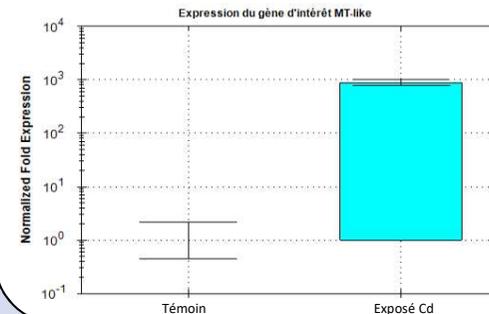
- ✓ Différence d'au moins 2 Cycles (Cq) entre le Témoin et l'Exposé Cd
- ✓ Tous les répliquas pour un échantillon ont amplifiés
- ✓ Un seul amplicon de 129 pb
- ✓ Courbes de fusions non bosselées avec un seul pic défini
- ✓ Pas d'amplification pour les No-RT d'enchytréides et les ADNc de *Aporrectodea caliginosa*. (spécificité des amorces à *E. albidus*)



## Optimisation du protocole



## Interprétation des expérimentations



Les gènes de l'ATPase et la Myosin (5) ont des valeurs de stabilité et d'écart-type faibles et sont donc considérés comme homogènes. (CFXManager™, BestKeeper©) Ils sont utilisés comme gènes de références pour normaliser les résultats. L'échantillon Témoin est considéré comme le control de l'analyse.

Il y a ici une différence d'expression significative entre le Témoin et l'Exposé Cd.

## Conclusion

Les amorces créées pour la MT-like, permettent bien d'observer une augmentation de l'expression de l'ARN MT-like dès 24h après la mise en contact avec un milieu contaminé avec 0,5 mg de Cd/L.

Il faut ensuite vérifier la cinétique de l'expression du gène pour pouvoir l'utiliser de manière optimale comme biomarqueur précoce d'exposition aux pollutions métalliques.

## Remerciements

- (1) Cette étude a été financée en partie dans le cadre des projets LIFE-Adsorb (LIFE17/ENV/FR/000398-LIFE ADSORB) et BBI Demonstration project GRACE (745012).
- (2) Merci à Dick Roelof pour les séquences nucléiques d'*E. albidus*, et à Véronique Etievant pour son aide technique.

AgroParisTech  
Talents d'une planète soutenable

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INRAE

LIFE

GRACE

UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY

## Références

- (1) Shinichiro Takahashi, 2012 : Molecular functions of metallothionein and its role in hematological malignancies
- (2) Amorim et al, 2014 : Population-specific transcriptional differences associated with freeze tolerance in a terrestrial worm
- (3) Willuhn et al.,1994 : cDNA Cloning of a Cadmium-inducible mRNA Encoding a Novel Cysteine-rich, Non-metallothionein 25-kDa Protein in an Enchytraeid Earthworm
- (4) Amorim et al, 2011 : Reproduction and biochemical responses in *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta) to zinc or cadmium exposures
- (5) Amorim M.J. B. et al., 2012 : Differential gene expression analysis in *Enchytraeus albidus* exposed to natural and chemical stressors at different exposure periods