INFLUENCE DU CADMIUM (Cd^{++}) SUR L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DU RÉCEPTEUR DES OESTROGÈNES DE LA TRUITE ARC-EN-CIEL (*ONCORHYNCHUS MYKISS*).

R. LE GUEVEL, F. PETIT, P. LE GOFF, Y. VALOTAIRE et F. PAKDEL

Équipe d'Endocrinologie Moléculaire de la Reproduction, UPRES-A 6026,
Université de Rennes I, 35042 Rennes Cedex, France.

RÉSUMÉ

De nombreuses publications font l'état de l'action négative du cadmium (Cd^{++}) sur la vitellogenèse chez les poissons. Le mécanisme d'action de ce métal n'étant pas clairement établi, une étude a été entreprise afin de déterminer si l'effet du cadmium passait par une action sur l'activité biologique du récepteur des oestrogènes de la truite arc-en-ciel (rtER). Cette étude a été réalisée dans un système de levures recombinantes, exprimant de manière stable rtER, et dans des hépatocytes de truite en culture primaire. Dans la levure, rtER activé par l'oestradiol (E2) contrôle spécifiquement l'expression d'un gène rapporteur codant pour l'enzyme β -Galactosidase. Une concentration en Cd^{++} de 10 μM diminue de 45 % l'expression stimulée par l'oestradiol du gène rapporteur dans les levures recombinantes. De même, dans les hépatocytes, l'expression du gène de la vitellogénine (VTG), gène sous le contrôle positif de E2, est diminuée de 65 %. Le cadmium n'affecte pas la liaison de E2 à son récepteur et seule l'activité hormono-dépendante est affectée par ce métal. Les résultats de cette étude montrent que l'effet négatif du cadmium sur l'action de l'oestradiol passe vraisemblablement par une action directe de ce métal sur la fonction de transactivation hormono-dépendante de rtER.

EFFECT OF CADMIUM (Cd^{++}) ON RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) ESTROGEN RECEPTOR BIOLOGICAL ACTIVITY.

ABSTRACT

Numerous publications have related the negative action of cadmium (Cd^{++}) on vitellogenesis in fishes. This action is not clearly established. The aim of the present study was to determine if the cadmium-mediated decrease of vitellogenesis was a process interfering with the rainbow trout estrogen receptor (rtER) activity. The effect of cadmium on rtER activity was studied in a recombinant yeast system expressing highly and stably rtER and in trout hepatocyte cultures. In yeast system, rtER activated by estradiol (E2) regulates specifically the expression of the β -Galactosidase reporter gene. The E2-stimulation of the reporter gene expression was reduced by 45 % under 10 μM Cd^{++} treatment. In rainbow trout hepatocytes cell culture, the vitellogenin (VTG) gene expression, positively regulated by E2, was also reduced by 65 % after Cd^{++} treatment. Cadmium does not affect the estradiol binding capacity of the receptor and only the hormone-dependent activity of rtER was affected by this metal. This study shows that the negative effect of Cd^{++} on estradiol action was probably mediated by a direct effect on the hormone-dependent transactivation function of rtER.

INTRODUCTION

Le cadmium, métal n'ayant pas de rôle biologique est, sous la forme Cd^{++} , un polluant insidieux du milieu terrestre comme du milieu aquatique (JENSEN et BRO-RASMUSSEN, 1992) du fait de son accumulation progressive chez de nombreuses espèces animales et de son temps de demi-élimination de plusieurs dizaines d'années dans les organismes. Contrairement aux molécules organiques, il n'existe pas de systèmes enzymatiques de dégradation des métaux lourds. Le mécanisme cellulaire de l'élimination de ces ions passe par un cryptage par fixation des métaux sur des résidus cystéines de protéines de faible masse moléculaire : les métalothionéines, protéines induites par les métaux lourds (BRUCE JACOBSON et TURNER, 1980 ; BROWN *et al.*, 1994 ; GEORGE *et al.*, 1996). L'action toxique du cadmium s'exerce tant au niveau de l'inhibition de l'activité de nombreuses enzymes (GILL *et al.*, 1991 ; KUDO et WAKU, 1996) qu'au niveau de l'homéostasie de certains ions essentiels comme le cuivre, le fer, le calcium et le zinc (CHMIELNICKA et BOGUSLAW, 1996 ; SOUZA *et al.*, 1996) par compétition directe du cadmium sur les sites de fixation de ces ions sur certaines protéines (BRUCE JACOBSON et TURNER, 1980 ; OLSSON *et al.*, 1995). Le cadmium peut interagir avec l'ADN et dans certains cas, il est capable de provoquer des altérations de l'ADN et interférer dans les processus de réparation de l'ADN (BRUCE JACOBSON et TURNER, 1980 ; WAALKES *et al.*, 1992a, 1992b ; BEYERSMANN et HECHTENBERG, 1997). De nombreuses études ont démontré l'action néfaste du cadmium sur les fonctions de reproduction chez les mammifères et chez les poissons [*i.e.* altérations de la synthèse des hormones stéroïdiennes (KIME, 1984 ; PIASEK et LASKEY, 1994), apoptose du tissu interstitiel testiculaire (XU *et al.*, 1996), diminution de la vitellogénèse chez les poissons (OLSSON *et al.*, 1995 ; PEREIRA *et al.*, 1992, 1993)]. Ainsi, chez la truite fario soumise à un traitement chronique par le cadmium, l'ovogenèse est retardée tandis que chez la truite arc-en-ciel le même traitement provoque un blocage du développement de l'oeuf (BROWN *et al.*, 1994). L'injection de cadmium chez la truite arc-en-ciel provoque une inhibition de l'expression stimulée par l'oestradiol du messenger de la vitellogénine (OLSSON *et al.*, 1995). La vitellogénèse est une étape fondamentale de la reproduction des espèces animales ovipares. En effet, la vitellogénine est une protéine synthétisée dans le foie, sous le contrôle de l'oestradiol, et libérée dans la circulation sanguine pour être finalement incorporée dans les ovocytes comme protéine de réserve. Il est évident que tous les facteurs environnementaux (comme les polluants), affectant la production de vitellogénine au niveau hépatique, seront des facteurs limitants de la reproduction chez les espèces sensibles comme la truite arc-en-ciel et les salmonidés en général (BUHL et HAMILTON, 1991). Dans l'étude que nous avons entreprise, nous nous sommes attachés à déterminer si les effets négatifs du cadmium sur les fonctions de la reproduction chez la truite passaient par une action directe ou indirecte au niveau de la régulation de gènes par l'oestradiol, hormone clef de la reproduction. Pour cela, nous avons réalisé l'étude de l'action du cadmium sur l'activité de transactivation hormono-dépendante du récepteur des oestrogènes exprimé dans un système de levures recombinantes. Le récepteur des oestrogènes exprimé dans la levure présente toutes les caractéristiques fonctionnelles du récepteur dans son contexte cellulaire normal (PAKDEL *et al.*, 1997) et possède le double avantage de permettre un criblage rapide d'un grand nombre de molécules et de mettre en évidence des effets directs des molécules étudiées sur la protéine d'intérêt, en l'occurrence le récepteur des oestrogènes. Dans ce système, l'induction hormono-dépendante de l'activité β -Galactosidase est strictement sous le contrôle de l'oestradiol (PETIT *et al.*, 1995). L'action du cadmium sur l'activité transactivatrice de rER a été testée dans ce système ainsi que celle du zinc, du cobalt, du nickel, du manganèse et du cuivre. Cette étude a été réalisée en parallèle sur des cellules d'hépatocytes de truite en culture primaire afin de vérifier si les résultats observés dans le système de levure étaient transposables à un système cellulaire plus complexe et plus proche des conditions physiologiques. Dans le système d'hépatocytes en culture en agrégats, les

caractéristiques fonctionnelles du tissu hépatique sont exprimées pendant au moins un mois (FLOURIOT *et al.*, 1993), en particulier, l'expression oestrogéno-dépendante des gènes du récepteur de l'oestradiol et de la vitellogénine est maintenue. La forte induction du messenger vitellogénine par les oestrogènes fait de cette molécule un excellent témoin de l'activité oestrogénique dans ce système cellulaire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souche de levure

La souche utilisée dans cette étude est : BJ-ECZ (a *leu2 trp1 ura3-52 prb1-1122 pep4-3 prc1-407 gal2* : URA3-2ERE-CYC1-lacZ) (WRENN et KATZENELLENBOGEN, 1993). Cette souche contient, intégré dans son génome, un gène rapporteur constitué de deux éléments de réponse aux oestrogènes (ERE), du promoteur du gène de la cytochrome C1 et du gène lacZ codant pour la β -Galactosidase de *E. coli*. Ce gène rapporteur est sous le contrôle strict du récepteur aux oestrogènes et en l'absence de ce dernier, aucune activité transcriptionnelle du gène rapporteur n'est observée, que ce soit en présence ou en l'absence d'oestradiol. Les levures sont transformées par le plasmide YEprTER (vecteur d'expression du récepteur des oestrogènes de la truite arc-en-ciel qui permet la transcription et traduction constitutive de rTER) en utilisant la méthode à l'acétate de lithium. Les levures recombinantes sont sélectionnées sur milieu CM (complete minimal medium) sans uracil et tryptophane (PETIT *et al.*, 1995). Dans ces levures, rTER est activé par E2, l'effet maximal étant obtenu pour une concentration d'oestradiol de 10 nM, ce qui permet l'induction du gène rapporteur et l'expression de l'enzyme β -Galactosidase dont l'activité enzymatique peut être mesurée par colorimétrie. En l'absence d'hormone, une activité de base dépendante de la présence de rTER est observée et représente 10 à 15 % de l'activité maximale induite par E2.

Détermination de l'activité β -Galactosidase

Le test β -Galactosidase est effectué, comme décrit par PETIT *et al.* (1995), sur plusieurs clones indépendants, la β -Galactosidase est induite spécifiquement pendant 4 heures par 10 nM de 17 β -oestradiol en présence ou non de Cd⁺⁺ ou d'autres métaux lourds (Zn⁺⁺, Cu⁺⁺, Ni⁺⁺, Co⁺⁺, Mn⁺⁺). L'activité β -Galactosidase est déterminée par l'hydrolyse du substrat NpGal (o-nitrophenyl β -D-galactopyranoside), la formation du produit coloré est quantifiée par spectrophotométrie à 420 nM. L'activité β -Galactosidase est exprimée en unité de MILLER qui corrige l'activité enzymatique par le nombre de cellules et par le temps de réaction enzymatique (MILLER, 1972).

Extrait protéique

Les levures sont cultivées dans 50 ml de milieu sélectif à 30°C sous agitation vigoureuse à 300 r.p.m. jusqu'à l'obtention d'une absorbance de 1,5-2 à 600 nm. Les cellules sont récupérées et après digestion de la paroi par la lyticase (Sigma), les sphéroplastes sont lysés selon McDONNELL *et al.* (1991). L'extrait cellulaire brut contenant la protéine rTER sera utilisé pour les expériences de liaison avec l'oestradiol.

Compétition du cadmium sur la liaison de E2 à son récepteur

Quatre-vingt-dix μ g de protéines de l'extrait cellulaire sont incubés 16 heures à 4°C avec 20 nM de [³H]oestradiol en l'absence ou en présence de concentrations croissantes de CdCl₂. La liaison spécifique avec le [³H]oestradiol est déterminée après traitement au charbon dextran (PAKDEL et KATZENELLENBOGEN, 1992).

Culture d'agrégats d'hépatocytes et traitement

Des truites arc-en-ciel mâles (*Oncorhynchus mykiss*) de 250-750 g sont fournies par l'élevage du Drennec, France. Le foie est dissocié par perfusion à la collagénase A (Boehringer), comme décrit par SEGLEN (1973), et adapté à la truite (MAITRE *et al.*, 1986). Les hépatocytes ($1-2 \times 10^7$ cellules/5 ml de milieu par boîte) sont incubés à 18°C dans des boîtes de Pétri non traitées de 60 mm (Falcon) dans le milieu DMEM/Ham's F12 (1:1) sans rouge de phénol, avec L-glutamine, 15 mM Hepes, 15 mM TES, 12 mM NaHCO_3 , 1 % antibiotiques (pénicilline, streptomycine et amphotéricine B ; Sigma) et 2 % (V/V) ultrosor SF (Biosepra). Les agrégats sont obtenus par agitation orbitale à 55 r.p.m. pendant 7 jours. Après formation, les agrégats sont traités par 1 μM de 17 β -oestradiol en présence ou non de CdCl_2 (10 μM) ou CuCl_2 (100 μM). Bien que ce système permette des études sur 1 mois, le cadmium pouvant avoir des effets toxiques à long terme, le traitement n'est appliqué que pendant 48 heures, pour éviter de masquer un effet spécifique sur rtER par un effet toxique à long terme. De plus, les gènes de rtER et de la vitellogénine étant rapidement induits par E2, ce temps de traitement est largement suffisant pour obtenir une forte expression de ces deux gènes oestrogéno-dépendants.

Analyse des ARNm par slot blot

Les ARN totaux sont préparés par la méthode LiCl-urée (AUFFRAY et ROUGEON, 1980) modifiée par VAILLANT *et al.* (1988). Quatre μg d'ARN sont déposés en double sur une membrane de Nylon Biodyne A (Pall) en utilisant un appareil à slot blot Bio-Rad. La membrane est préhybridée à 42°C pendant 6 heures et hybridée en conditions stringentes avec une sonde ADNc radioactive du récepteur des oestrogènes (rtER), de la vitellogénine (VTG) ou de l'actine (Ac) de truite arc-en-ciel marquée au ^{32}P (PAKDEL *et al.*, 1989). Après lavage, la membrane est mise en autoradiographie pendant 48 heures à -70°C. La quantité relative d'ARN est déterminée par densitométrie des spots, les taux d'ARN rtER et VTG sont corrigés par rapport au messager actine pour chaque dépôt.

RÉSULTATS

Effet du cadmium sur l'activité biologique du récepteur des oestrogènes exprimé dans un système de levure

Le système de levures recombinantes, contenant un gène rapporteur sous le contrôle du récepteur des oestrogènes de truite arc-en-ciel exprimé de manière constitutive, a été utilisé pour tester l'action de Cd^{++} sur l'activité biologique du récepteur. Comme illustré par la Figure 1, dans ce système, en l'absence d'hormone rtER est capable d'activer le gène rapporteur faiblement mais de manière significative par rapport aux cellules n'exprimant pas le récepteur. Cette activité basale est associée à la fonction de transactivation hormono-indépendante du récepteur. En présence d'E2, la transcription du gène rapporteur est multipliée par un facteur d'environ 6 à 7 (Figure 1, contrôle), ce qui reflète l'activité hormono-dépendante du rtER dans la levure. Un traitement par Cd^{++} à une concentration de 1 μM et 10 μM provoque une diminution de l'induction du gène rapporteur de 20 et 45 % respectivement. En revanche, l'expression basale n'est pas affectée par le cadmium. Les autres métaux lourds testés à la concentration de 10 μM , contrairement au cadmium à la même concentration, sont sans effet sur l'activité transcriptionnelle de rtER.

Figure 1

Effet de divers métaux lourds sur l'activité transcriptionnelle de rtER exprimé dans un système de levures recombinantes. Les métaux sont ajoutés au milieu de culture en présence ou non d'oestradiol 10 nM. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'induction maximale par l'oestradiol en l'absence de métal et représentent la moyenne $\pm$ SEM de clones indépendants : $n = 16$ pour les contrôles, $n = 3$ pour Cd 0,1 μ M, $n = 7$ pour Cd 1 μ M, $n = 11$ pour Cd 10 μ M, $n = 5$ pour Cu, Co, Ni et Mn.

Figure 1

Effect of several heavy metals on the transcriptional activity of rtER expressed in a yeast system. Heavy metals are added in culture medium with or without estradiol 10 nM. Results are expressed in percentage of maximal estradiol induction without metal and represent the mean $\pm$ SEM of independent clones, $n = 16$ for controls, $n = 3$ for Cd 0.1 μ M, $n = 7$ for Cd 1 μ M, $n = 11$ for Cd 10 μ M, $n = 5$ for Cu, Co, Ni and Mn.

Effet du cadmium sur l'induction du gène de la vitellogénine dans les hépatocytes en culture en agrégats

La diminution d'activité transactivatrice du récepteur observée dans les levures recombinantes cultivées en présence de cadmium ne présume en rien de l'action du cadmium dans des systèmes plus élaborés et plus proches des conditions physiologiques. Il était donc nécessaire de vérifier si le même phénomène était observé dans des hépatocytes de truite, cellules cibles de l'oestradiol *in vivo*.

La potentialité anti-oestrogénique, révélée dans le système de levure, est retrouvée dans les hépatocytes en culture comme le montre la Figure 2. Dans cette expérience, l'expression de deux gènes cibles de l'oestradiol a été analysée : le gène de rtER et de la VTG. En l'absence d'oestradiol, les ARN messagers de rtER et de la VTG sont indétectables tandis que sous stimulation oestrogénique ces messagers sont fortement induits. Les résultats, obtenus en présence de cadmium, montrent une différence de sensibilité de ces deux gènes oestrogéno-dépendants vis-à-vis de ce métal. Une concentration de 10 μM provoque une diminution de 65 % de l'induction du messageur VTG tandis qu'à la même concentration, le messageur rtER n'est pas significativement affecté. Par contre à une concentration de 100 μM , l'expression de ces deux messagers est complètement inhibée et devient indétectable. Le cuivre à une concentration de 100 μM n'a aucun effet inhibiteur sur l'induction de l'expression du gène vitellogénine par E2 (Figure 2B). Le cadmium est donc capable de bloquer l'action de l'oestradiol sur les gènes cibles étudiés dans des hépatocytes en culture.

Figure 2

Effet du cadmium 10 μM et 100 μM ($n = 3$) sur l'induction par l'oestradiol 1 μM des gènes de la vitellogénine (VTG) et du récepteur des oestrogènes (rtER) (Figure 2A) ainsi que l'effet du cuivre 100 μM ($n = 4$) sur l'induction du gène de la vitellogénine (Figure 2B) dans des hépatocytes de truite en culture en agrégats. Le taux d'ARNm est corrigé par l'ARNm actine. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle stimulé par l'oestradiol seul +/- SEM, $n = 3$ (n.d. : non dosable).

Figure 2

Effect of cadmium 10 μM and 100 μM ($n = 3$) on the induction by 1 μM estradiol of vitellogenin (VTG) and estradiol receptor (rtER) genes expression (Figure 2A) and effect of copper 100 μM ($n = 4$) on the induction of vitellogenin gene expression (Figure 2B) in trout hepatocyte aggregate cultures. The level of mRNA is corrected by actin mRNA. Results are expressed in percentage of estradiol-stimulated control +/- SEM, $n = 3$ (n.d. : non dosable).

Effet du cadmium sur la liaison de E2 à son récepteur

Certains auteurs ont montré que Cd^{++} ainsi que d'autres ions, comme l'ion arsénite, pouvaient inhiber la liaison des hormones glucocorticoïdes à leur récepteur par interaction directe de Cd^{++} avec des groupements « thiol » (SH) de cystéines vicinales au niveau du site de liaison hormonale (SIMONS *et al.*, 1990). Afin de vérifier si le même mécanisme était mis en jeu dans le cas du récepteur des oestrogènes de la truite arc-en-ciel, nous avons effectué une expérience de compétition entre le $[^3\text{H}]$ oestradiol et Cd^{++} . Les résultats sont rassemblés à la Figure 3 et montrent que, contrairement au récepteur des hormones glucocorticoïdes, le cadmium n'inhibe pas la liaison de l'oestradiol à son récepteur même à une concentration en Cd^{++} 10 000 fois supérieure à l'oestradiol tritié.

Figure 3

Effet *in vitro* du cadmium sur la liaison du $[^3\text{H}]$ oestradiol à son récepteur. Quarante-vingt-dix μg de protéines sont incubés 16 heures à 4°C avec 20 nM de $[^3\text{H}]$ oestradiol en l'absence ou en présence de concentrations croissantes de CdCl_2 .

Figure 3

***In vitro* effect of cadmium on $[^3\text{H}]$ estradiol binding to its receptor.** Ninety μg of proteins were incubated at 4°C for 16 hours with 20 nM of $[^3\text{H}]$ estradiol in the absence or presence of increasing concentrations of CdCl_2 .

DISCUSSION

Les résultats présentés dans cette étude montrent que, dans nos conditions expérimentales en système de levures recombinantes, l'ion Cd^{++} inhibe l'action du récepteur aux oestrogènes et cela seulement après activation par E2 ; les autres métaux testés à la concentration de 10 μM n'affectent pas l'induction du gène rapporteur par E2. L'effet du cadmium se manifeste par une diminution de l'expression induite par l'oestradiol du gène rapporteur codant pour la β -Galactosidase. Les résultats obtenus dans le système

de levure montrent qu'il s'agit d'une action directe du cadmium sur le récepteur. En effet, dans ce système d'expression simplifié, le gène rapporteur est sous le contrôle strict du récepteur des oestrogènes et de l'oestradiol, il n'y a donc pas d'intervention d'autres facteurs contrairement aux systèmes cellulaires plus complexes où l'action d'un xénobiotique peut se manifester à différents niveaux. L'absence d'action du cadmium sur l'activité basale du gène rapporteur dans le système de levure (activité dépendante de la présence de rtER et qui peut donc servir de contrôle interne) témoigne d'un effet spécifique sur la fonction transactivatrice hormono-dépendante. En effet, l'activité basale en l'absence d'oestradiol dans la levure reflète la capacité de rtER à se fixer spontanément sur les éléments de réponse des oestrogènes du gène rapporteur. Cette fixation faible peut fortement augmenter une fois le récepteur activé par l'hormone, du fait de la dimérisation induite par E2. Le fait que le cadmium ne modifie pas l'activité basale démontre d'autre part l'absence d'effet sur des systèmes enzymatiques et sur les mécanismes transcriptionnel et traductionnel de base de la cellule. En effet, si l'action du cadmium, dans nos conditions expérimentales, passait par l'inhibition d'enzymes nécessaires au bon fonctionnement de la cellule et/ou par une perturbation générale de la machinerie cellulaire et donc de l'activité de synthèse de la cellule, l'activité basale de rtER devrait aussi diminuer du fait de la baisse du taux intracellulaire de cette protéine et de l'enzyme β -Galactosidase. De même, un effet génotoxique est à exclure car cela se manifesterait aussi par une diminution de l'activité transcriptionnelle basale de rtER ainsi qu'une diminution du nombre de cellules mesuré par la DO 600 au terme de l'expérience (la DO 600 double pendant les quatre heures d'incubation), cette diminution n'a jamais été observée dans nos conditions expérimentales (résultats non montrés). Le fait que l'activité basale, hormono-indépendante, ne soit pas affectée par ce métal démontre que le mécanisme d'action du cadmium passe par une action en aval de l'activation du récepteur par l'oestradiol et semble spécifique au récepteur de l'oestradiol.

L'effet observé dans les levures est retrouvé dans les hépatocytes en culture primaire comme le témoigne la diminution (65 %) de l'induction par l'oestradiol du gène de la vitellogénine pour une concentration de 10 μ M et une inhibition totale à 100 μ M. Par contre, il n'est pas observé d'effet du cadmium sur l'expression du gène rtER à la concentration de 10 μ M. Ce résultat différentiel pourrait être expliqué par une différence de sensibilité de ces deux gènes à l'action de rtER (activés par E2 et traités par le cadmium) en fonction de l'environnement promoteur des gènes. A une concentration de 10 μ M, rtER serait faiblement affecté par le cadmium et le promoteur du gène de rtER serait peu sensible à la modification de rtER tandis que le promoteur du gène de la VTG serait lui plus sensible à cette modification de la protéine rtER par le cadmium. A la concentration en cadmium de 100 μ M rtER pourrait être fortement affecté, ce qui provoquerait une totale inactivation de son action transactivatrice. Cependant, à cette concentration, un effet toxique sur la cellule n'est pas à exclure.

Au vu des résultats obtenus dans les levures, il est légitime de penser que dans les hépatocytes le cadmium agirait par action directe sur le récepteur. Cependant, il n'est pas à exclure que dans ces cellules, l'action du cadmium pourrait aussi être due à une interférence avec l'homéostasie de certains ions divalents comme le calcium.

S'il apparaît clairement que le cadmium affecte la transactivation hormono-dépendante du gène rapporteur dans les levures et l'expression du gène de la vitellogénine dans les hépatocytes, le mécanisme d'action de ce métal est quant à lui beaucoup moins clair. Aucune action du cadmium sur la liaison de l'oestradiol à son récepteur n'a été mise en évidence ce qui suggère, contrairement au récepteur des glucocorticoïdes (SIMONS *et al.*, 1990), qu'il n'y a pas de cystéines vicinales impliquées dans la liaison de l'hormone.

Les récepteurs des hormones stéroïdiennes, comme de nombreux facteurs de transcription, sont caractérisés par une structure dite en « doigts de zinc » constituée par huit cystéines formant un complexe organo-métallique avec deux ions Zn^{++} . Cette structure, indispensable au fonctionnement du récepteur, permet d'une part de stabiliser le récepteur dans une conformation dimérique et d'autre part, permet une interaction du récepteur avec l'ADN au niveau des éléments régulateurs des gènes cibles. Certains travaux ont montré que le zinc pouvait être remplacé par d'autres métaux au sein de la structure en doigts de zinc des récepteurs stéroïdiens (PREDKY et SARKAR, 1994). Ainsi, si le zinc est substitué par du nickel, le récepteur est incapable de se fixer aux éléments de réponse du récepteur de l'oestradiol (ERE), la même substitution par du cobalt permet au récepteur de se fixer mais avec une affinité 10 fois moins forte. Par contre, une substitution par le cadmium ne modifie pas l'affinité du récepteur pour l'ADN. La substitution de métaux, obtenue *in vitro*, ne semble pas être le mécanisme mis en jeu dans les systèmes cellulaires *in vivo*. En effet, deux arguments plaident pour l'absence d'un tel mécanisme : **(1)** le remplacement du zinc par le cadmium ne modifie pas la liaison du récepteur à l'ADN dans les expériences *in vitro* décrites par SARKAR et *al.* Or, nos résultats montrent que le cadmium affecte l'action biologique du récepteur aux oestrogènes, tandis que le cobalt et le nickel sont sans effet, contrairement aux expériences de substitution décrites par ces auteurs ; **(2)** l'effet du cadmium ne se manifeste pas sur l'activité basale qui représente la capacité du récepteur à se fixer sur l'ADN en l'absence d'hormone. Si le mécanisme impliquait une substitution du zinc, cet effet serait aussi observable sur cette activité de base. Pour les mêmes raisons, il est peu probable que le cadmium agisse par action directe sur l'ADN au niveau des promoteurs des gènes cibles en gênant l'interaction du récepteur avec ADN.

L'hypothèse la plus probable serait que le cadmium bloquerait le changement de conformation du récepteur induit par E2 (changement indispensable à l'action du récepteur), ce qui empêcherait de la transactivation hormono-dépendante. Ce phénomène pourrait s'exercer selon plusieurs mécanismes possibles : **(1)** le cadmium empêcherait la dimérisation hormono-dépendante sans affecter cette dernière, ce qui expliquerait l'absence d'effet du cadmium sur l'activité de base ; **(2)** le cadmium diminuerait l'interaction du récepteur activé avec l'ADN ; **(3)** le cadmium diminuerait l'interaction entre le récepteur activé et la machinerie transcriptionnelle de base et/ou des co-activateurs de la transcription.

CONCLUSION

Les résultats de cette étude tendent à montrer que les observations relatées dans la littérature concernant l'impact négatif du cadmium sur les fonctions de la reproduction chez les salmonidés pourraient passer en partie par une inhibition de l'action de l'oestradiol directement au niveau de son récepteur et en conséquence, par une action directe sur les gènes cibles de l'oestradiol, comme par exemple sur le gène de la vitellogénine. Au niveau physiologique, les pollutions par le cadmium pourraient être un facteur limitant le succès de la reproduction des salmonidés, notamment pendant la vitellogenèse.

BIBLIOGRAPHIE

- AUFFRAY C., ROUGEON F., 1980. Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA. *European Journal of Biochemistry*, 107, 306-314.
- BEYERSMANN D., HECHTENBERG S., 1997. Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 144 (2), 247-261.

- BROWN V., SHURBEN D., MILLER W., CRANE M., 1994. Cadmium toxicity to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum and brown trout *Salmo trutta* L. over extended exposure periods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 29, 38-46.
- BRUCE JACOBSON K., TURNER J.E., 1980. The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids. *Toxicology*, 16, 1-37.
- BUHL K.J., HAMILTON S.J., 1991. Relative sensitivity of early life stage of arctic grayling coho salmon, and rainbow trout to nine inorganics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 22, 184-197.
- CHMIELNICKA J., BOGUSLAW S., 1996. Cadmium interaction with essential metals (Zn, Cu, Fe), metabolism metallothionein, and ceruloplasmin in pregnant rats and fetuses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 35, 277-281.
- FLOURIOT G., VAILLANT C., SALBERT G., PELLISSERO C., GUIRAUD J.M., VALOTAIRE Y., 1993. Monolayer and aggregate cultures of rainbow trout hepatocytes : long-term and stable liver-specific expression in aggregates. *Journal of Cell Science*, 105, 407-416.
- GEORGE S.G., KEITH T., WRIGHT J., 1996. Regulation of metallothionein in teleosts : induction of MT mRNA and protein by cadmium in hepatic and extrahepatic tissue of marine flatfish, the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 113C (2), 109-105.
- GILL T.S., TEWARI H., PANDE J., 1991. *In vivo* and *in vitro* effects of cadmium on selected enzymes in different organs of the fish *Barbus conchoniensis* Ham. (rosy barb). *Comp. Biochem. Physiol.*, 100, 501-505.
- JENSEN A., BRO-RASMUSSEN F., 1992. Environmental cadmium in Europe. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 125, 101-181.
- KIME D.E., 1984. The effect of cadmium on steroidogenesis by testes of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Toxicol. Lett.*, 22, 83-88.
- KUDO N., WAKU K., 1996. Cadmium suppresses delta 9 desaturase activity in rat hepatocytes. *Toxicology*, 114, 101-111.
- MAITRE J.L., VALOTAIRE Y., GUGUEN-GUILLOUZO C., 1986. Estradiol-17 β stimulation of vitellogenin synthesis in primary culture of male rainbow trout hepatocytes. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 22, 337-342.
- MCDONNELL D.P., NAWAZ Z., DENSMORE C., WEIGEL N.L., PHAM T.A., CLARK J.H., O'MALLEY B.W., 1991. High level expression of biologically active estrogen receptor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 39, 291-297.
- MILLER J.H., 1972. Experiments in genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- OLSSON P.E., KLING P., PETTERSON C., SILVERSAND C., 1995. Interaction of cadmium and oestradiol-17 β on metallothionein and vitellogenin synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochemical Journal*, 307, 197-203.
- PAKDEL F., LE GUELLEC C., VAILLANT C., LE ROUX M.G., VALOTAIRE Y., 1989. Identification and estrogen induction of two estrogen receptors (ER) messenger ribonucleic acids in the rainbow trout liver : sequence homology with other ERs. *Molecular Endocrinology*, 3, 44-51.
- PAKDEL F., KATZENELLENBOGEN B.S., 1992. Human estrogen receptor mutants with altered estrogen and antiestrogen ligand discrimination. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 3429-3437.
- PAKDEL F., PETIT F., VALOTAIRE Y., 1997. Expression of rainbow trout estrogen receptor in *Escherichia coli* and yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Recent Advance in Marine Biotechnology*, 1, 455-473.

- PEREIRA J.J., ZISKOWSKI J., MERCALDO-ALLEN R., LUEDKE D., GOULD E., 1992. Vitellogenin studies in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from Long Island Sound and Boston Harbor. *Estuaries*, 15, 289-297.
- PEREIRA J.J., MERCALDO-ALLEN R., KUROPAT C., LUEDKE D., SENNEFELDER G., 1993. Effect of cadmium accumulation on serum vitellogenin levels and hepatosomatic and gonadosomatic indices of winter flounder (*Pleuronectes americanus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 24, 427-431.
- PETIT F., VALOTAIRE Y., PAKDEL F., 1995. Differential functional activities of rainbow trout and human estrogen receptors expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 233, 584-592.
- PIASEK M., LASKEY J.W., 1994. Acute cadmium exposure and ovarian steroidogenesis in cycling and pregnant rats. *Reproductive Toxicology*, 8, 495-507.
- PREDKY P.F., SARKAR B., 1994. Effect of replacement of « zinc finger » zinc on estrogen receptor DNA interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 5842-5846.
- SEGLEN P.O., 1973. Preparation of rat liver cells. Effect of ions and chelators on tissue dispersion. *Experimental Cell Research*, 76, 25-30.
- SIMONS S.S., CHAKRABORTI K.P., CAVANAUGH A.H., 1990. Arsenite and cadmium (II) as probes of glucocorticoid receptor structure and function. *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 1938-1945.
- SOUZA V., BUCIO L., JAY D., CHAVEZ E., GUTIERREZ-RUIZ M.C., 1996. Effect of cadmium on calcium transport in a human fetal hepatic cell line (WRL-68) cells. *Toxicology*, 112, 97-104.
- VAILLANT C., LE GUELLEC C., PAKDEL F., VALOTAIRE Y., 1988. Vitellogenin gene expression in primary culture of male rainbow trout hepatocytes. *General and Comparative Endocrinology*, 70, 284-290.
- WAALKES M.P., REHM S., PERATONI A.O., COOGAN T.P., 1992a. Cadmium exposure in rats and tumours of the prostate. In *Cadmium in the Human Environment : Toxicity and Carcinogenicity*, Nordberg G.F., Herber R.F.M. and Alessio L. editors, Lyon, IARC Sci. Publ., 391-400.
- WAALKES M.P., COOGAN T.P., BARTER A., 1992b. Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium. *Crit. Rev. Toxicol.*, 22, 175-201.
- WRENN C.K., KATZENELLENBOGEN B.S., 1993. Structure-function analysis of the human estrogen receptor by region-specific mutagenesis and phenotypic screening in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 24089-24098.
- XU C., JOHNSON J.E., SINGH P.K., JONES M.M., YAN H., CARTER C.E., 1996. *In vivo* studies of cadmium-induced apoptosis in testicular tissue of the rat and its modulation by a chelating agent. *Toxicology*, 107, 1-8.