



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

C. R. Biologies 326 (2003) 659–672



Pharmacologie, toxicologie

Le mécanisme de défense multixénobiotique (MDMX) chez les bivalves

Sandrine Pain*, Marc Parant

Laboratoire ESE CNRS FRE 2635, UFR Sci-FA, université de Metz, campus Bridoux, av. du Général-Delestraint, 57070 Metz, France

Reçu le 28 avril 2003 ; accepté le 11 juin 2003

Présenté par Jean-Yves Lallemand

Résumé

Le mécanisme de défense multixénobiotique (MDMX) consiste en un système de pompes membranaires capables d'expulser les composés organiques hors de la cellule. Chez les bivalves, le MDMX incarne un système de protection contre l'action toxique d'une grande variété de xénobiotiques organiques, en limitant leur accumulation cellulaire. Depuis la dernière décennie, un intérêt grandissant se porte sur son utilisation potentielle en tant que biomarqueur de pollution. Cet article résume les connaissances fondamentales sur le MDMX chez les bivalves, ainsi que les méthodes de mesure mises en œuvre pour son étude. Enfin, il résume les principaux résultats de travaux effectués en laboratoire et in situ qui ont permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle le MDMX pourrait être utilisé en tant que biomarqueur de stress environnemental, plutôt qu'en tant que biomarqueur de pollution. *Pour citer cet article : S. Pain, M. Parant, C. R. Biologies 326 (2003).*

© 2003 Académie des sciences. Publié par Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Multixenobiotic defence mechanism (MXDM) in bivalves. Multixenobiotic defence mechanism (MXDM) consists in a cellular system that functions as membrane extrusion pumps effluxing organic compounds out of the cells. In bivalves, it represents a primordial protection against toxic effects of organic xenobiotics in preventing their cellular accumulation. It has raised attention during the last decade for its potential to be used as a biomarker of pollution. This article reviews the fundamental knowledge on the MXDM system in bivalves and the methods proposed to assess its activity. Finally, it reviews the major results of laboratory and field studies that enabled to hypothesise that MXDM could be used as a biomarker of environmental stress rather than of pollutant exposure. *To cite this article: S. Pain, M. Parant, C. R. Biologies 326 (2003).*

© 2003 Académie des sciences. Publié par Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Mots-clés : MDMX ; MXR ; bivalves ; P-glycoprotéine ; biomarqueur ; exposition à un stress environnemental

Keywords : MXDM ; MXR ; bivalves ; P-glycoprotein ; biomarker ; exposure to environmental stress

Abridged English version

Freshwater and marine ecosystems have become endangered for years because of pollution, in particular because of chemical pollution. Organisms living

* Auteur correspondant.
Adresses e-mail : sandrine.pain@univ-metz.fr (S. Pain),
parant@sciences.univ-metz.fr (M. Parant).

in these damaged ecosystems have developed defence mechanisms in order to protect themselves against xenobiotics. The most studied cellular defence system is the metabolism of xenobiotics, which consists in modifying their chemical properties to decrease toxicity and to facilitate their elimination. Another cellular defence system has been described, which prevents xenobiotics from entering cells. This multixenobiotic defence mechanism (MXDM, also called multixenobiotic resistance mechanism, MXRM) was discovered in a freshwater bivalve mollusc, *Anodonta cygnea*. Other organisms such as sponges, worms, gastropods or fish were shown to possess this defence system. MXDM can protect cells from toxic compounds in limiting entry and in facilitating efflux of these compounds. It is similar to the well-known 'multidrug resistance' (MDR) characterised in mammals by resistance of tumour cells, which limits accumulation of cytotoxic drugs, then leading to failure of treatment. The enhanced efflux of a wide variety of compounds is mediated by a membrane P-glycoprotein weighing 170 kDa (Pgp or P170).

This paper aims first to review the fundamental knowledge on the MXDM system in bivalves and the methods proposed to assess its activity. Finally, it reviews the major results of laboratory and field studies that enabled to hypothesise that MXDM could be used as a biomarker of environmental stress.

Evidence of MXDM presence and function was demonstrated in bivalves tissues particularly exposed to pollution of aquatic ecosystems such as gills and digestive gland, but also in lysosomal membrane of hemocytes and in embryonic or larval tissues.

Little is known about biochemical properties of MXDM in bivalves and numerous data are transposed from studies in tumour cell lines in mammals. Few genetic studies are available, but it was shown that partial cDNA obtained from the blue mussel (*Mytilus edulis*), the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and from the mussel *Perna perna* shared similarities with mammalian MDR genes. P-glycoprotein homologues have been identified in several freshwater and marine species and their molecular weight reach 120 to 240 kDa. As it was shown in mammals, these membrane proteins are ATP-dependent pumps that efflux moderately hydrophobic compounds. Compounds that were shown to interact with the MXDM and the associated membrane pumps are cytotoxic drugs, fluores-

cent dyes, environmental pollutants and also natural compounds such as algal or bacterial products.

Methods have been developed to enable MXDM detection. Indirect methods consist in assessing binding of substrates on membrane vesicles or in measuring associated ATPase activity. Western blot and immunochemistry can also be used to detect P-glycoprotein homologues with an appropriate antibody. Direct methods enable to assess the MXDM activity in measuring the accumulation or the efflux of fluorescent or radioactive substrates.

Freshwater and marine bivalves are often used as sentinel organisms and are subject of many studies aiming to understand and use MXDM as a biomarker of exposure to polluted waters. At the present time, research focus on characteristics of MXDM activation and on parameters that affect the reaction of this mechanism.

Results from in the field studies showed that it was possible to detect evidence of MXDM activity in quite every organism investigated so far. However, measured MXDM activity is variable at the species level and even at the population level. Based on this, it was hypothesised that this variability could reflect the resistance, or the sensitivity of aquatic species.

MXDM inducibility was demonstrated in organisms exposed to pollution. As MXDM belongs to defence systems, it has been suggested that the measure of its activity could reflect exposure of organisms to potentially harmful compounds. This hypothesis was supported by works demonstrating that increase in MXDM response was correlated with the degree of pollution. However, other studies did not observe such a correlation. Considering the low substrate specificity of MXDM system that can transport pollutants as well as natural compounds, it is not surprising that a direct correlation is difficult to establish.

The finding that naturally occurring compounds called chemosensitizers could saturate the MXDM system, hence promoting the accumulation of potentially toxic xenobiotics by saturating membrane pumps raised the question of MXDM fragility. The relevance of such MXDM chemosensitizers has been investigated and results showed that their presence led to the apparition of toxic effects in bivalves exposed to toxic compounds below the non-observed effect concentration. So, considering chemosensitizers in the as-

assessment of environmental risk can render our interpretation of ecotoxicological data more accurate.

Seasonal variations of MXDM activity in polluted and unpolluted sites were studied and results showed an elevated MXDM response during the warmer months. The hypothesis that the defence system activity could be affected by environmental parameters such as temperature or algal proliferation has been proposed and then supported by results of laboratory studies.

Comparison of MXDM response with that of biomarkers such as heat shock protein (HSP) or lysosomal destabilisation suggests that MXDM could be considered as a general biomarker of exposure to environmental stress.

Taken together, these data provide evidence that MXDM could be used as a suitable biomarker of environmental stress. However, further investigations are still needed to better understand how its function can be integrated in the global physiology of organisms in order to correctly distinguish effects of chemical pollution.

1. Introduction

Les êtres vivants évoluent à l'heure actuelle dans des milieux endommagés par différents types de pollution. La pollution chimique par les xénobiotiques (composés exogènes) constitue une grande part des agressions constamment subies par les organismes. Les milieux aquatiques drainent et recueillent la majorité de cette contamination chimique. Cependant, bien qu'il existe une altération de la biodiversité dans certains de ces milieux, on constate que les organismes qui subsistent se sont adaptés à ces stress constants. Certaines espèces sont même capables de survivre et de se reproduire dans des milieux considérablement dégradés. L'adaptation des êtres vivants à ces milieux se traduit, entre autres, par la mise en place et le développement de systèmes de défense. Les premières barrières sont mises en place au niveau de l'organisme entier et constituent des protections physiques contre la pénétration des xénobiotiques (coquille, peau...). Au niveau cellulaire, la protection s'organise essentiellement autour de deux voies principales : la voie de biotransformation des xénobiotiques, qui permet la neutralisation puis l'élimination des molécules toxiques,

et un mécanisme de transport membranaire des xénobiotiques, qui limite l'accès de ces molécules à la cellule et favorise leur élimination. L'activité de ce mécanisme a été mise en évidence chez un mollusque bivalve dulçaquicole *Anodonta cygnea* dès 1989 [1], avant d'être également observée chez d'autres espèces aquatiques, notamment chez les éponges, les mollusques gastéropodes et les poissons [2]. Il a rapidement été montré que cette voie est analogue au système de « résistance multidrogue » (MDR ; *Multi-Drug Resistance*) identifié chez les mammifères [3]. Par analogie avec ce système, le mécanisme identifié dans les populations naturelles a été appelé MXR pour *MultiXenobiotic Resistance* ou résistance multixénobiotique. On peut souligner que, bien qu'elle ait été adoptée par nombre d'auteurs, la terminologie « MXR » et plus précisément le terme « résistance » ne sont peut-être pas les plus adéquats. En effet, la résistance peut être définie comme une adaptation héréditaire conduisant à une diminution de la sensibilité [4]. Si les connaissances acquises chez les mammifères permettent d'utiliser cette notion dans le cas des cellules cancéreuses, trop peu de données sont disponibles chez les organismes aquatiques pour avancer l'existence d'une résistance au sens strict. Par conséquent, nous préférons utiliser le terme « défense » et nous désignerons ce mécanisme MDMX pour mécanisme de défense multixénobiotique [5–7].

Le travail présenté ici vise à rassembler et discuter les données existantes concernant l'activité MDMX chez les mollusques bivalves. À ce jour, la majorité des travaux publiés sur ce sujet s'orientent vers l'utilisation du MDMX en tant que biomarqueur de stress environnemental. Dans ce contexte, nous nous attacherons plus particulièrement à analyser les données relatives à la mise en place d'un biomarqueur en dégageant les avantages, les inconvénients et les questions encore posées.

2. Aspects moléculaires et biochimiques

2.1. Localisation tissulaire

Chez les bivalves, la présence du MDMX a été mise en évidence au niveau de tissus particulièrement exposés à la pollution de leur milieu (branchies, manteau) ou impliqués dans la détoxification des contaminants

assimilés par les organismes (glande digestive) [1,8]. L'existence d'un MDMX fonctionnel a également été montrée au niveau des membranes lysosomales des hémocytes chez la moule *Mytilus sp.* [9]. Enfin, les larves de certains bivalves marins sont également dotées d'un système MDMX [10–12]. Bien que ce système ait été détecté dans différents tissus, il est à noter que la plupart des auteurs travaillent quasiment exclusivement à partir des tissus branchiaux (Tableau 1).

2.2. Gènes, protéines et mécanisme d'action

Chez les mollusques bivalves, très peu d'études sont entièrement consacrées à la description des aspects biochimiques associés au MDMX. À l'heure actuelle, la majorité des connaissances est obtenue par comparaison avec les transporteurs décrits chez les mammifères.

Sur le plan génétique, les seules données disponibles concernent trois espèces marines, la moule bleue *Mytilus edulis*, l'huître du Pacifique *Crassostrea gigas* et la moule *Perna perna* (Tableau 1). Chez ces espèces, des gènes apparentés à la famille MDR ont été mis en évidence et des ADN complémentaires ont été amplifiés [8,12–14]. À l'heure actuelle, les techniques de biologie moléculaire ne sont employées que pour la caractérisation des gènes et aucune évaluation quantitative n'a été mise en œuvre.

Chez les mammifères, le produit des gènes *mdr* est une protéine membranaire glycosylée de 170 kDa, couramment appelée Pgp pour P-glycoprotéine [3,15]. Chez les organismes aquatiques, les protéines responsables du fonctionnement du MDMX sont reconnues par les anticorps fabriqués contre les Pgps mammaliennes, suggérant une certaine homologie entre ces protéines. Pour cette raison, elles ont été appelées Pgps-*like*. Cependant, aucune autre donnée structurale ne vient confirmer cette homologie supposée. Chez les bivalves, les tailles des protéines immunoréactives s'échelonnent entre 120 et 240 kDa (Tableau 1) ; la variabilité des tailles obtenues reflète probablement les variations du taux de glycosylation des protéines.

Le transport des composés substrats est précédé d'une étape de liaison des molécules sur un ou plusieurs sites spécifiques des Pgps [16]. Chez les bivalves, la liaison des substrats a été mise en évidence et est exploitée en tant que méthode d'évaluation de la présence du MDMX [1,17,18] (Section 3.1.1). Le

transport des substrats par les Pgps est un mécanisme dépendant de l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. Les Pgps présentent une activité ATPasique intrinsèque, qui est amplifiée par la liaison des substrats sur le transporteur [19]. Chez les bivalves, une activité ATPasique a également été détectée [17,18] et sa mesure a été exploitée en tant que méthode d'évaluation du fonctionnement MDMX [7] (Section 3.1.2).

2.3. Substrats et inhibiteurs du MDMX

Les nombreux travaux concernant la résistance MDR chez les mammifères ont montré que les Pgps peuvent transporter une très grande variété de composés organiques de structures et de propriétés chimiques très différentes [3,15]. Chez les bivalves, aucune étude théorique n'est disponible en ce qui concerne les substrats du MDMX. Cependant, plusieurs auteurs ont utilisé des substrats reconnus du système MDR et ont pu observer une interaction avec le MDMX des bivalves, ce qui atteste leur qualité de substrats chez ces organismes. Sur la base de ces données, l'étude du MDMX chez les bivalves a été menée en développant des méthodes de mesure utilisant ces composés substrats. Ainsi, les colorants fluorescents tels que les rhodamines B et 123 [10,20–26], les anthracyclines [5] et les alcaloïdes de la pervenche [18,27–29] sont couramment utilisés comme substrats des Pgps-*like*. De la même manière, les composés inhibiteurs tels que le vérapamil ou la cyclosporine A sont utilisés pour moduler l'activité de transport [1,17,18,22,27–29].

Différents types de substrats environnementaux, c'est-à-dire de substrats naturels ou anthropiques présents dans les écosystèmes sont susceptibles d'interagir avec le MDMX. Des études ont notamment permis de montrer le potentiel substrat de substances naturelles telles que les toxines ou les métabolites produits par les algues [26,30]. Outre les substances naturelles, les contaminants environnementaux d'origine anthropique peuvent également interagir avec le MDMX des bivalves. Ainsi, des composés modérément hydrophobes (dacthal, sulfallate et pentachlorophénol) se sont avérés substrats chez deux espèces de moules marines. En revanche, le potentiel substrat de composés fortement hydrophobes (DDT, DDD, DDE, Arochlor 1254) a été mis en évidence uniquement chez l'une des deux espèces [20,21]. Malgré des résultats parfois contradictoires, l'ensemble de

Tableau 1

Le MDMX chez les bivalves marins et dulçaquicoles au niveau de différents tissus chez les adultes (branchies, Br ; manteau, M ; hépatopancréas, HP ; hémocytes, Hém) et chez les embryons (E), les larves (L ; trocophores, Lt ; véligères, Lv ; pédivéligères, Lpv) ou les juvéniles (Juv). Le MDMX a été mis en évidence par les méthodes de *binding*, d'accumulation, d'efflux, par des techniques de biologie moléculaire (BM), ou par *Western Blot* (WB, anticorps utilisé, (monoclonal, M ou polyclonal P)). Les tailles des fragments d'ADNc obtenus (paire de bases, pb) en biologie moléculaire et les tailles des protéines détectées par *Western Blot* (kDa) sont indiquées dans la colonne « résultats ». Les résultats des travaux utilisant les autres méthodes sont résumés par un signe + lorsqu'un ou plusieurs éléments attestant l'existence du MDMX ont été détectés et par un signe – lorsqu'aucun de ces éléments n'a pu être mis en évidence

Organismes	Tissus	Méthodes	Résultats	Références
Bivalves marins				
<i>Mytilus edulis</i>	Br	WB C219 (M)	220/240 kDa	[13]
	Br	BM	+	[13]
	Br	BM	350/2500 pb	[8]
	Hém	Accumulation	+	[9]
	Hém	WB C219 (M)	170 kDa	[9]
	E/L	Accumulation	+	[10]
<i>Mytilus californianus</i>	Br	WBAb-1 (P)/C219 (M)	170 kDa	[20]
	Br	Accumulation/efflux	+	[20]
	Br	WB C219 (M)	170 kDa	[24,25]
	Br	Accumulation	+	[24,25]
	Br	Accumulation/efflux	+	[26]
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Br, M, HP	<i>Binding</i> /accumulation	+	[17]
	Br	Accumulation	+	[27]
	Br	WB C219 (M)	145/220/240 kDa	[21]
	Br	Accumulation/efflux	+	[21]
	Br	WB anti-C (P)	140 kDa	[28,51]
	Br	Accumulation	+	[28,51]
	Br	Accumulation/efflux	+	[51]
	Br	WB C219 (M)	(50/70) 130/230 kDa	[59]
	Br	WB C219 (M)	+	[14]
<i>Perna perna</i>	Br	BM	+	[14]
	Br	WB C219 (M)	+	[14]
<i>Crassostrea gigas</i>	Br	WB C219 (M)	220/240 kDa	[13]
	Br	BM	+	[13]
	Br	Accumulation	+	[12]
	E	BM	–	[12]
	Lt	BM	–	[12]
	Lv	BM	233 pb	[12]
	Lpv	BM	233 pb	[12]
	Juv	BM	233 pb	[12]
<i>Crassostrea virginica</i>	Br	WB C219 (M)	170 kDa	[11,58]
	E	Accumulation	+	[11]
Bivalves dulçaquicoles				
<i>Anodonta cygnea</i>	Br, M, HP	<i>Binding</i>	+	[1]
	Br	WB anti-C (P)	–	[51]
	Br	Accumulation/efflux	+	[51]
<i>Corbicula fluminea</i>	Br	WB C219 (M)	135 kDa	[18]
	Br	WB anti-C (P)	(85)/135 kDa	[18]
	Br	<i>Binding</i> /accumulation	+	[18]
	Br	Accumulation	+	[29]
<i>Dreissena polymorpha</i>	Br	WB anti-C (P)	–	[51]
	Br	Accumulation/efflux	+	[7,30,51]
	Br	WB C219 (M)	120 kDa	[57]

la littérature considère généralement que les composés modérément hydrophobes sont de bons substrats, alors que les composés très hydrophobes ne sont que

de très médiocres substrats. Parmi les hydrocarbures, le 2-acétylaminofluorène et le 2-aminoanthracène ont été montrés comme interagissant avec le MDMX

Tableau 2

Induction du MDMX chez différentes espèces de bivalves après exposition à des composés substrats en laboratoire ou à une contamination naturelle in situ. L'induction du MDMX est estimée par la mesure de l'augmentation du titre protéique, par la réduction de l'accumulation cellulaire de composés traceurs et/ou par l'augmentation de l'activité d'efflux de ces composés. Les amplitudes de l'induction sont présentées relativement au résultat obtenu dans le témoin. Lorsque les données chiffrées ne sont pas disponibles, la mise en évidence d'une induction significative est signalée par le symbole +

Paramètres mesurés	Organismes	Exposition	Durée de l'exposition (jours)	Résultats par rapport au témoin	Références	
Augmentation du titre protéique	Marins	<i>Mytilus edulis</i>	Vincristine	19 à 29	×1,5 à 2,5	[9]
		<i>Mytilus californianus</i>	Chlorthal/PCB (5 ppm)	3	+	[24]
			Chlorthal/PCP/DDE (1/5 ppm)	1 à 3	+	[25]
		<i>Crassostrea gigas</i>	CdCl ₂ (500 ppb)/NaAsO ₃ (1/5 ppm)	1 à 3	+	[25]
			12 sites contaminés	30	+ (1 site)	[62]
Réduction de l'accumulation	Marins	<i>Mytilus edulis</i>	Vincristine (5/10 µg ml ⁻¹)	19 à 29	35/48%	[9]
		<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Site contaminé	3	62%	[27]
			Rhodamine 123/Diesel-2-oil	4	45 à 50%	[23]
		<i>Mytilus californianus</i>	Chlorthal/PCB (5 ppm)	3	>75%/50%	[24]
			Chlorthal/PCP/DDE (1/5 ppm)	1 à 3	>50%	[25]
	Dulçaquicoles	<i>Corbicula fluminea</i>	CdCl ₂ (500 ppb)/NaAsO ₃ (1/5 ppm)	1 à 3	50%/40 à 80%	[25]
			Diesel-2-oil	3	43%	[29]
			Eau + sédiments du Rhin	3	28%	[29]
Augmentation de l'efflux	Dulçaquicoles	<i>Dreissena polymorpha</i>	Site contaminé	21	×4,5	[7]

chez deux espèces dulçaquicoles [18,27,29,31]. En revanche, le benzo[a]pyrène s'est révélé n'être qu'un piètre substrat du MDMX chez l'huître *Crassostrea gigas* [12]. Un mélange d'hydrocarbures appelé « diesel-2-oil » s'est également montré capable d'interagir avec le MDMX [27,29]. D'autres études ont démontré que des échantillons prélevés dans les milieux naturels, tels que des concentrés d'eau ou des extraits de sédiments, contenaient des composés capables de moduler l'activité de transport MDMX, et donc, des composés potentiellement substrats ou inhibiteurs compétitifs [22,32,33].

3. Méthodes d'évaluation de l'activité MDMX chez les bivalves

3.1. Méthodes indirectes

3.1.1. Mesure de la fixation des substrats (binding)

La mesure du taux de liaison d'un substrat radioactif sur des préparations membranaires permet de quantifier les sites de fixation accessibles, et donc d'estimer la quantité de protéines impliquées dans l'activité

MDMX [34]. Pour cela, des vésicules membranaires sont préparées à partir des tissus étudiés selon la méthode décrite par Riordan et Ling [35]. Elles sont incubées dans un milieu contenant un substrat radiomarqué, puis les liaisons totales et non spécifiques des substrats sont évaluées [36,37]. L'ensemble de ces travaux a montré que la liaison mesurée est saturable, sensible à la trypsine et au vérapamil. L'inconvénient majeur de cette technique est qu'elle donne une mesure statique des capacités des cellules à lier les substrats, et qu'elle ne permet en aucun cas de corréler directement cette mesure à l'activité MDMX.

3.1.2. Mesure de l'activité ATPasique associée à l'activité MDMX

Le transport actif des substrats par la voie MDMX s'accompagne de la production de phosphate inorganique (Pi) conséquente à l'hydrolyse de l'ATP. L'activité ATPasique peut être évaluée par une méthode colorimétrique [7] qui permet de mesurer de manière indirecte l'activité du MDMX en évaluant la quantité de Pi produit. Cette méthode présente l'inconvénient majeur de ne permettre l'obtention que de faibles signaux ; il est effectivement difficile de neutraliser

toutes les autres sources de Pi et de fortes concentrations en Pi non spécifique sont systématiquement observées. Bien que cette méthode ne soit pas suffisamment sensible pour permettre son utilisation unique dans le cadre d'études in situ, elle peut constituer un complément d'information et venir confirmer l'activation du MDMX [7].

3.1.3. Mesure immunochimique

Plusieurs anticorps monoclonaux et polyclonaux ont été décrits pour la détection des protéines de la famille MDR [38]; le plus utilisé reste sans nul doute l'anticorps monoclonal C219. Cet anticorps a permis la détection de protéines MDR/MDMX chez de nombreux organismes, allant des mammifères jusqu'à une grande variété d'invertébrés et même d'organismes végétaux. Il est dirigé contre une séquence épitope hautement conservée qui est située dans la région cytoplasmique de la moitié C-terminale de la Pgp, à proximité du site de liaison de l'ATP [39,40]. Cet anticorps présente l'avantage de détecter toutes les isoformes identifiées chez les mammifères [41], facilitant ainsi la détection d'homologues chez des organismes très éloignés sur le plan phylogénétique. Cependant, il peut également réagir avec d'autres transporteurs tels que les Pgps sœurs, ainsi qu'avec la myosine [39,41,42]. L'utilisation de témoins positifs et négatifs est donc primordiale pour s'assurer de la validité des résultats obtenus en utilisant cet anticorps. Le témoin positif le plus couramment utilisé est constitué de vésicules membranaires préparées à partir de cortex de surrénales de bovins mâles, qui est un tissu riche en Pgps [43]. Des préparations de rein humain [5] ainsi que des lignées cellulaires mammaliennes surexprimant les Pgps [20,21] ont également été utilisées comme témoin positif. À notre connaissance, un seul exemple de témoin négatif est disponible dans la littérature; les auteurs utilisent des œufs d'oursins dépourvus de système de transport MDMX [21].

L'utilisation d'anticorps anti-Pgp a été principalement exploitée par l'intermédiaire du *Western blot*. Cette technique a été utilisée pour mettre en évidence la présence du MDMX chez divers bivalves (Tableau 1). En complément, Galgani et al. ont mis au point une technique dite de *dot blot* qui permet d'estimer la quantité de protéines détectées en mesurant la densité optique des spots obtenus [21]. L'intérêt de cette méthode réside dans la possibilité de discrimi-

ner plusieurs échantillons en fonction de la quantité de Pgps-like détectées et éventuellement de relier cette mesure à la pollution des sites de provenance des organismes [21].

On peut regretter qu'à ce jour, les techniques d'immunohistochimie n'aient jamais été mises en œuvre chez les bivalves, car leur application a permis d'étudier de manière efficace la localisation de Pgps-like dans les tissus d'autres espèces tels que le foie chez les poissons [44–47], et l'hépatopancréas chez le crabe *Carcinus maenas* [48], ainsi qu'au niveau des membranes cellulaires chez deux espèces d'éponges [49].

3.2. Méthodes directes

3.2.1. Mesure de l'accumulation d'un substrat

Le principe de la méthode d'accumulation est basé sur la relation inversement proportionnelle entre la quantité de substrat accumulée à l'intérieur d'une cellule et l'activité MDMX présente dans les membranes de cette cellule. Cette méthode est couramment utilisée chez les bivalves et a été adaptée par différents auteurs à l'évaluation de l'accumulation dans les tissus [17] et les cellules isolées [9,20]. La méthode consiste à exposer les tissus ou les cellules à un substrat qui peut être radioactif ou fluorescent, puis à visualiser l'accumulation du substrat dans les cellules en référence à la mesure effectuée en présence d'un inhibiteur du MDMX [50].

3.2.2. Mesure de l'efflux d'un substrat

La méthode d'efflux consiste à évaluer la quantité de substrats prise en charge par le MDMX et libérée dans le milieu extérieur. Initialement développée pour mesurer l'activité d'efflux sur des tissus ou des cellules isolées [20], cette méthode a été adaptée pour l'utilisation chez des organismes vivants [7,22]. Elle consiste à exposer dans un premier temps les organismes vivants, les tissus ou les cellules à un substrat fluorescent (Rhodamine B, 123) qui s'accumule en grande quantité dans les cellules. Après la période d'exposition, les organismes, tissus ou cellules sont lavés puis replacés dans un milieu propre. Les cellules rejettent alors le colorant qu'elles ont accumulé auparavant de manière proportionnelle à l'activité MDMX. Le phénomène peut être observé en mesurant, soit l'augmentation de la fluorescence dans le milieu [7,22], soit la di-

minution de fluorescence dans les cellules ou les tissus étudiés [20,21]. L'addition d'un inhibiteur spécifique (vérapamil, cyclosporine A) permet d'inhiber l'efflux de colorant et, ainsi, d'évaluer avec précision la part du rejet attribuée à l'activité MDMX [7,50,51].

3.2.3. Exploitation des méthodes d'accumulation et d'efflux

Les deux méthodes précédemment décrites figurent parmi les plus utilisées parce qu'elles permettent une mesure simple et directe de l'activité en s'appuyant sur l'aspect fonctionnel. Elles sont complémentaires et permettent, lorsqu'elles sont employées conjointement de confirmer et d'affiner les résultats obtenus [50].

Ces méthodes peuvent être exploitées de différentes manières. Une première application consiste à les utiliser pour évaluer l'activité MDMX chez des organismes placés en situation de stress (laboratoire ou in situ). La comparaison des activités mesurées permet alors d'évaluer la modulation du niveau de défense cellulaire des organismes dans le milieu où ils ont été placés [7,50].

Enfin, en se basant sur le principe de l'inhibition compétitive, il est également possible d'identifier des substrats potentiels du mécanisme MDMX en évaluant l'effet d'un composé donné sur la cinétique d'accumulation ou d'efflux d'un substrat traceur. Le même principe est utilisé pour mesurer l'effet d'une eau naturelle [22,50]. La comparaison des résultats obtenus en présence ou en absence de l'eau à tester permet d'évaluer l'intensité d'interaction des composés présents dans l'eau avec le mécanisme MDMX. Plus l'interaction est importante, plus les composés présents dans l'eau sont susceptibles d'amener les organismes à une situation de défense cellulaire extrême. La composition du milieu testé représente donc un potentiel toxique pour la cellule et il est à surveiller avec la plus grande attention [32,52].

4. Comportement de l'activité MDMX

La présence et/ou le fonctionnement du MDMX ont été mis en évidence par diverses techniques chez de nombreuses espèces aquatiques marines ou dulçaquicoles. Seules une espèce de gastéropode [53] et quelques espèces d'échinodermes [54–56] semblent

dépourvues de MDMX, puisque aucune des caractéristiques habituelles n'a pu être identifiée chez les adultes ou les larves de ces organismes. Bien que les données disponibles à l'heure actuelle soient peut-être encore trop réduites [55], certains auteurs ont avancé l'hypothèse selon laquelle ce système pourrait exister de manière constitutive chez toutes les espèces, sauf chez les plus pollusensibles [5,6] ou au cours des premiers stades de développement [12]. Selon cette hypothèse, l'activité MDMX, lorsqu'elle existe, présenterait un niveau constitutif basal susceptible d'être induit en réponse à l'apparition et/ou à l'amplification d'un stress.

4.1. Activité constitutive

L'hypothèse selon laquelle l'activité MDMX pourrait exister de manière constitutive chez toutes les espèces a été suggérée à la suite de l'observation de la présence et/ou d'un niveau d'activité mesurable, même chez des organismes vivant sur des sites de bonne qualité et n'ayant jamais été confrontés à de fortes pollutions de leur milieu [5,6]. Le niveau de cette activité constitutive s'est avéré variable au sein d'une même espèce en fonction de la qualité des sites d'origine des populations étudiées. Ainsi, les organismes provenant des sites les plus contaminés présentent un niveau d'activité MDMX ou d'expression des *Pgps-like* significativement plus élevé que celui mesuré chez les organismes prélevés sur les sites non contaminés [13,17,23,27,28]. Les résultats d'une étude comparant les niveaux d'activité dépurée chez six espèces de mollusques (bivalves et gastéropodes marins ou dulçaquicoles) ont montré que l'activité mesurée présentait les mêmes caractéristiques chez toutes ces espèces, mais les plus tolérantes, vivant sur des sites fortement contaminés, présentaient des niveaux d'activité plus élevés que ceux mesurés chez les plus sensibles, vivant dans des milieux de bonne qualité [51].

Ces exemples montrent que le niveau constitutif de l'activité MDMX peut être différent d'une population à l'autre (échelle intraspécifique) et d'une espèce à l'autre (échelle interspécifique). En effet, toutes les populations ou espèces n'ont pas les mêmes besoins de protection, puisqu'elles ne sont exposées, ni aux mêmes stress, ni aux mêmes niveaux de stress en fonction de la qualité de leur milieu. La variabilité

du niveau constitutif mesuré dans les populations naturelles pose alors la question des capacités de réaction et d'induction du MDMX.

4.2. Induction du MDMX

L'induction du MDMX se traduit généralement par une augmentation de l'activité d'efflux des substrats et/ou par une augmentation de la quantité de Pggs-like. La littérature présente des exemples de travaux ayant mesuré l'amplitude de l'induction chez des organismes exposés à une contamination naturelle *in situ* ou artificielle en laboratoire par rapport aux témoins non exposés. Les exemples présentés dans le Tableau 2 mettent en évidence la difficulté de résumer l'ensemble des données, d'une part, parce que les résultats sont obtenus par la mesure de différents paramètres et, d'autre part, parce que les résultats obtenus pour un même paramètre sont très variables du fait de la diversité des organismes utilisés et des conditions d'exposition étudiées. Afin de préciser les données concernant l'amplitude de la réaction du MDMX, il serait intéressant de disposer d'études sur plusieurs populations d'une même espèce, mais d'origines différentes et d'études sur plusieurs espèces de même origine et exposées au même stress. Obtiendrait-on des capacités d'induction variables selon les espèces et/ou variables selon l'origine et la sensibilité des différentes populations? À notre connaissance, ce type d'étude n'a pas encore été mis en œuvre et la question de la capacité de réaction et de l'amplitude de cette réaction est toujours d'actualité.

La réaction d'induction semble être un phénomène assez rapide dans la mesure où des niveaux induits ont été mesurés après trois à quatre jours d'exposition (Tableau 2). D'autres travaux ont montré une réaction d'induction après des temps d'exposition plus longs, suggérant que l'induction pourrait se maintenir dans le temps (Tableau 2).

Une autre caractéristique du processus d'induction de l'activité MDMX a été mise en évidence par les travaux de Kurelec [27]. Il a en effet montré que l'état induit était corrélé à une diminution de la sensibilité à un inhibiteur, le vérapamil. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait qu'à l'état induit, le MDMX limite l'entrée de l'inhibiteur dans la cellule et/ou le rejette activement, ne lui permettant plus de remplir son rôle.

L'ensemble des travaux cités précédemment met en évidence l'inductibilité du MDMX lorsque les organismes sont exposés à une charge organique anormalement élevée. L'induction mesurée reflète la nécessité pour les organismes d'accroître leurs capacités de défense face à un environnement agressif et en ce sens, reflète le niveau d'exposition des organismes. L'induction peut alors être considérée comme le reflet du degré de contamination des sites étudiés. Des travaux ont appuyé cette hypothèse en montrant l'existence d'une corrélation entre la quantité de protéines ou l'activité MDMX et le niveau de contamination organique des sites d'origine des bivalves étudiés [13,28,57].

Cependant, cette corrélation ne semble pas systématique. Ainsi les niveaux d'expression des Pggs-like dans les branchies de bivalves marins n'étaient corrélés ni au degré de pollution des sites d'origine [58], ni aux taux de contaminants environnementaux accumulés dans les tissus des organismes [59]. Dans une autre étude, le niveau d'expression des Pggs-like chez *Mytilus galloprovincialis* était corrélé au degré de pollution, excepté dans le cas du site le plus contaminé [28]. D'autres auteurs ont décrit une situation similaire, c'est-à-dire une induction particulièrement faible, voire même absente, chez des organismes provenant de sites fortement contaminés ou chez des organismes exposés à de fortes doses de polluants [60]. L'absence de corrélation significative entre l'induction et la contamination des sites naturels peut toutefois s'expliquer par la difficulté de disposer d'un paramètre de contamination globale. En effet, la contamination des milieux aquatiques est généralement évaluée par des dosages de quelques composés ou par la réaction de biomarqueurs spécifiques d'une catégorie de contaminants. Cependant, le MDMX est défini comme un mécanisme de défense global, qui réagit face à un cumul de composés organiques, comprenant aussi bien des contaminants anthropiques que des substances naturelles. Par conséquent, il n'est pas surprenant qu'une corrélation entre l'induction de l'activité MDMX et un ou plusieurs indicateurs (biologiques ou physico-chimiques) de la contamination des eaux soit difficile à établir de manière certaine [33]. En laboratoire, l'exposition de bivalves marins à différents contaminants a permis de montrer une activité et une expression des Pggs-like plus prononcées dans les doses d'exposition les plus fortes [9,25]. Cependant, quelques exemples pris chez les poissons font état d'une absence de cor-

rélation entre l'induction de l'activité ou du titre protéique et les doses de xénobiotiques appliquées [46]. Ce type de résultat, à savoir une absence ou une réduction de l'induction dans le cas d'une exposition forte à des composés substrats, peut s'expliquer, soit par l'apparition d'un effet toxique, soit par un phénomène de saturation ou d'inhibition du MDMX.

4.3. Saturation/inhibition du MDMX

Le MDMX possède une capacité intrinsèque à gérer une charge organique. Il possède également une capacité d'induction lorsque cette charge augmente. Mais lorsqu'elle devient trop importante, les composés organiques s'accumulent au sein des cellules et le système est saturé. La saturation du mécanisme entraîne l'inhibition de l'efflux des substances toxiques susceptibles d'être également présentes dans la cellule. La sensibilité de la cellule aux polluants environnementaux peut ainsi être accentuée et la survenue d'un effet toxique est alors envisageable. Ces substances, capables d'induire une hypersensibilité aux xénobiotiques toxiques en neutralisant le MDMX, ont été appelées « chimiosensibilisants » (*chemosensitizers* [5]). Quelques travaux ont souligné l'importance à accorder à ces composés [6,31,32,52]. Il a en effet été démontré que l'addition d'inhibiteurs du MDMX génère l'apparition d'effets génotoxiques chez des bivalves exposés à des hydrocarbures à des doses inférieures à la concentration sans effet [18,29]. De la même manière, la présence de chimiosensibilisants a entraîné l'augmentation de la fréquence d'apparition de malformations chez des embryons et des larves exposés à des composés toxiques [10]. Ces exemples démontrent clairement l'impact que peuvent exercer les chimiosensibilisants : des inhibiteurs naturels du MDMX sont capables de transformer la concentration sans effet de produits toxiques (NOEC, *No-Observed-Effect Concentration*) en concentration provoquant un effet (OEC, *Observed-Effect Concentration*). L'interprétation de tels résultats en terme de risque écotoxicologique laisse entrevoir la possibilité que des contaminants environnementaux à des concentrations inférieures aux normes de toxicité puissent exercer leurs effets toxiques sur les organismes, si le MDMX est débordé. Devant l'importance que prennent ces composés dans l'évaluation du risque écotoxicologique, des

méthodes de quantification ont été développées [50] (Section 3.2.3).

4.4. Variations physiologiques saisonnières

Des suivis annuels de l'activité MDMX chez des bivalves marins ont permis la mise en évidence d'un cycle saisonnier [11,58,59]. Les niveaux d'activité sont en effet plus élevés en été et en automne. Cette induction de l'activité ne pouvait en aucun cas être reliée à l'apparition de pollution. En revanche, elle coïncidait avec l'augmentation de la température de l'eau et le développement de blooms algaux. Ces observations in situ ont été appuyées par des travaux en laboratoire, montrant l'induction du MDMX chez des moules marines exposées à des chocs thermiques [24,25]. Des travaux ont également mis en évidence l'action modulatrice d'extraits d'algues sur le transport MDMX [26,30].

La mise en évidence d'une activité MDMX élevée pendant les mois chauds pose la question de savoir si cette activité est proche de son maximum pendant ces périodes, l'augmentation de température étant vécue comme un stress important. Dans ce cas, la capacité d'induction est probablement réduite, ce qui suppose qu'en cas d'apparition d'un stress lié à une charge organique toxique, le MDMX pourrait se trouver saturé et l'apparition d'effets toxiques n'en serait que plus rapide [61].

4.5. Comparaison de la réaction du MDMX avec celles de biomarqueurs

Parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement, les biomarqueurs sont utilisés afin d'estimer l'impact des polluants sur les organismes. Si le MDMX présente quelques atouts intéressants pour incarner un biomarqueur chez les bivalves, il reste encore à comparer sa réaction avec celle de biomarqueurs avérés.

4.5.1. Comparaison avec la réaction de biomarqueurs d'exposition

4.5.1.1. Métabolisme des xénobiotiques.

En ce qui concerne les systèmes de phase I, les données acquises chez les bivalves sont très limitées. Il semblerait cependant que les inducteurs de ces systèmes, ou tout au moins certains d'entre eux, puissent également être

substrats du MDMX. Il faut souligner, cependant, que cette hypothèse a été émise à partir de comparaisons de la réaction des deux systèmes chez des organismes différents (bivalves et poissons) exposés aux mêmes conditions [28].

En ce qui concerne les systèmes de phase II, quelques données sont disponibles chez les bivalves. Une activité GST (Glutathion-S-Transferase) particulièrement élevée a en effet été mesurée dans les tissus présentant une forte activité MDMX [1,17]. Au cours d'une étude multimarqueur sur plusieurs espèces de bivalves et gastéropodes marins, Bresler et al. [60] ont également observé une relation entre la présence du MDMX et une forte activité GST, particulièrement sur les sites les plus contaminés.

4.5.1.2. Exposition à un stress général. La réponse du MDMX a également été confrontée à celle de biomarqueurs de stress général, comme les protéines de choc thermique [25,59] et la stabilité du système lysosomal [60,62]. Ces quelques exemples ont montré des profils de réaction similaires et confortent ainsi les hypothèses selon lesquelles le MDMX pourrait être considéré comme un marqueur généraliste, mettant en évidence l'exposition à un stress environnemental global.

4.5.2. Comparaison avec la réaction de biomarqueur d'effets

Quelques études ont mis en évidence une corrélation entre la réaction du MDMX et celles de biomarqueurs d'effets. Ainsi, l'inhibition du MDMX chez des organismes exposés au 2-acétylaminoanthracène entraîne l'apparition d'effets génotoxiques [6]. Une corrélation négative a été mise en évidence entre l'apparition de micronoyaux et l'activité MDMX [60]. En effet, une activité MDMX induite assure une protection des cellules et limite l'exposition aux xénobiotiques, limitant ainsi l'apparition des effets. Au contraire, l'inhibition du système de défense favorise l'accumulation des xénobiotiques et à terme, la survenue des effets.

D'autres études multimarqueurs ont étudié des biomarqueurs d'effets en parallèle à l'activité MDMX, comme, par exemple, la lipéroxidation lipidique [62], marqueur de stress oxydant et la mesure de l'activité acétylcholinestérase [59,60], marqueur d'effet neuro-

toxique. Mais jusqu'à présent, aucune corrélation significative n'a pu être établie de manière certaine.

5. Conclusions et perspectives

5.1. Le MDMX, un biomarqueur ?

Les propriétés du MDMX et sa place au sein de la défense cellulaire en font un mécanisme de défense de première ligne, protégeant les organismes contre l'entrée et l'accumulation des xénobiotiques dans les cellules. L'ensemble des travaux effectués à tous les niveaux d'organisation animale montre une absence de spécificité à un type particulier de contaminant. Le MDMX réagit plutôt face à un cumul de composés organiques substrats. La comparaison de la réaction du MDMX avec celle d'autres activités utilisées comme biomarqueur semble confirmer deux points.

- Le MDMX est un système de défense cellulaire précoce, situé en amont des autres systèmes identifiés aujourd'hui. En effet, son action se situe dès l'entrée des xénobiotiques dans la membrane cellulaire. Sa précocité et son inductibilité en présence de pollution lui confèrent des qualités indispensables pour constituer un biomarqueur d'exposition [5,55,61]. La mesure de l'activité MDMX permet, en effet, de détecter une activation anormale du système de défense, et ainsi de détecter une situation stressante avant qu'elle n'ait un impact marqué sur les organismes. L'étude de la réponse d'autres biomarqueurs et des dosages physico-chimiques viendront compléter et confirmer le diagnostic, en apportant des précisions concernant les sources potentielles de ce stress et les effets prévisibles.
- L'activation du MDMX répond à l'apparition d'un stress global. Il a été montré que le MDMX transportait de grandes variétés de composés organiques et que certains de ces composés étaient capables d'induire le système de défense. Cependant, le système peut être induit de manière non spécifique par des composés non-substrats ou par des chocs thermiques. De plus les études comparant la réponse du MDMX avec celles d'autres biomarqueurs montrent que le MDMX présente un pattern d'induction proche de ceux des biomar-

queurs généralistes, comme les protéines HSP et la fragilité lysosomale [2,25].

L'étude du MDMX offre, en outre, la possibilité de mesurer la quantité de composés chimiosensibilisants dans le milieu. On évalue ainsi la quantité de composés susceptibles d'interagir avec le MDMX et d'en inhiber le fonctionnement normal, permettant ainsi l'évaluation de l'aptitude du milieu aquatique à favoriser la toxicité de polluants par inhibition du MDMX.

5.2. Perspectives

L'amélioration des connaissances fondamentales concernant le système MDMX, encore relativement restreintes chez les organismes sentinelles tels que les bivalves, favoriserait une meilleure compréhension des processus de défense et de détoxification cellulaire et, en conséquence, faciliterait son utilisation dans le cadre du suivi de la qualité des milieux aquatiques.

Sur le plan génétique, la caractérisation des gènes permettrait de certifier l'appartenance à la famille MDR/MDMX, tout en trouvant une utilisation en bio-surveillance notamment dans la réalisation de puces à ADN [63]. L'acquisition de données concernant les caractéristiques biochimiques et structurales des Pgps-like permettrait d'améliorer la précision de la détection immunologique. Connaître la structure permettrait de surcroît l'étude des substrats avérés et potentiels et de leur interaction avec les protéines dans le but de mieux comprendre les mécanismes régissant l'activité de transport. En termes d'écotoxicologie, ce type de résultats faciliterait la connaissance des polluants potentiellement pris en charge par le MDMX et permettrait de caractériser plus précisément les paramètres de l'évaluation du risque environnemental.

Parallèlement à l'étude des paramètres biochimiques, les paramètres biologiques et écologiques régissant le MDMX nécessitent encore l'amélioration des connaissances. Un certain nombre de paramètres doivent en effet être correctement maîtrisés pour la mise en place et l'utilisation des biomarqueurs [64]. Dans cette optique, il est primordial de déterminer la relation dose-effet. L'activité MDMX pourrait, par exemple, être reliée à des paramètres témoins de la qualité des eaux naturelles sur la base des critères mis en place par les agences ou les réseaux chargés de la surveillance des milieux aquatiques. De même, il semble essen-

tiel de connaître, pour chaque espèce ou population sentinelles, les niveaux d'induction maximum et les seuils faisant basculer l'organisme d'une situation de défense à une situation d'apparition d'effets délétères. Mais ce type de travail ne pourra se faire sans intégrer le MDMX au sein de la physiologie globale de l'organisme. En effet, la compréhension des variations naturelles de l'activité dues à des processus physiologiques (cycle reproducteur) ou à des facteurs extérieurs (température, disponibilité en nourriture) permettront de mieux distinguer l'effet d'un stress anthropique.

Au vu de l'ensemble des résultats actuellement publiés, il semble que le MDMX présente un réel potentiel pour constituer un nouvel outil de surveillance de la qualité des écosystèmes aquatiques. En revanche, il reste à déterminer si le MDMX peut être utilisé en tant que biomarqueur de stress polluant et incarner ainsi un nouvel outil d'évaluation du risque environnemental pour les populations naturelles.

Références

- [1] B. Kurelec, B. Pivcevic, Distinct glutathione-dependant enzyme activities and a verapamil-sensitive binding of xenobiotics in a fresh-water mussel *Anodonta cygnea*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164 (2) (1989) 934–940.
- [2] S.M. Bard, Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms, *Aquat. Toxicol.* 48 (4) (2000) 357–389.
- [3] M.M. Gottesman, I. Pastan, Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter, *Annu. Rev. Biochem.* 62 (1993) 385–427.
- [4] L. Lagadic, T. Caquet, J.-C. Amiard, Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions, in: L. Lagadic, T. Caquet, J.-C. Amiard, F. Ramade (Eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux*, Masson, Paris, 1997, pp. 1–9.
- [5] B. Kurelec, The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms, *Crit. Rev. Toxicol.* 22 (1) (1992) 23–43.
- [6] B. Kurelec, Inhibition of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms: ecotoxic consequences, *Sci. Total Environ.* 171 (1995) 197–204.
- [7] M. Parant, S. Pain, Potential use of multixenobiotic defense mechanism (MXDM) in *Dreissena polymorpha* as a biomarker for the monitoring of freshwater pollution, *Water Res.* 35 (15) (2001) 3743–3748.
- [8] C. Minier, F. Galgani, Multi-xenobiotic resistance in *Mytilus edulis*, *Mar. Environ. Res.* 39 (1995) 267–270.
- [9] C. Minier, M.N. Moore, Induction of multixenobiotic resistance in mussel blood cells, *Mar. Environ. Res.* 42 (1–4) (1996) 389–392.
- [10] I. McFadzen, N.A. Eufemia, C. Heath, D. Epel, M.N. Moore, D.M. Lowe, Multidrug resistance in the embryos and larvae of

- the mussel *Mytilus edulis*, Mar. Environ. Res. 50 (2000) 319–323.
- [11] C.J. Keppler, A.H. Ringwood, Expression of P-glycoprotein in southeastern oysters *Crassostrea virginica*, Mar. Environ. Res. 52 (2001) 81–96.
- [12] C. Minier, C. Lelong, N. Djemel, F. Rodet, R. Tutundjian, P. Favrel, M. Mathieu, F. Leboulenger, Expression and activity of a multixenobiotic resistance system in the pacific oyster *Crassostrea gigas*, Mar. Environ. Res. 54 (2002) 455–459.
- [13] C. Minier, F. Akcha, F. Galgani, P-glycoprotein expression in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* in polluted seawater, Comp. Biochem. Physiol. 106B (1993) 1029–1036.
- [14] E.D. Grimm, M.F. Terenzi, G.H. Goldman, A.C.D. Bainy, H. Terenzi, Identification of homologs of the mammalian P-glycoprotein in the mussel, *Perna perna*, Mar. Environ. Res. 50 (2000) 331–335.
- [15] J.A. Endicott, V. Ling, The Biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance, Annu. Rev. Biochem. 58 (1989) 137–171.
- [16] U.A. Germann, T.C. Chambers, Molecular analysis of the multidrug transporter, P-glycoprotein, Cytotechnology 27 (1–3) (1998) 31–60.
- [17] B. Kurelec, B. Pivcevic, Evidence for a multixenobiotic resistance mechanism in the mussel *Mytilus galloprovincialis*, Aquat. Toxicol. 19 (1991) 291–302.
- [18] P. Waldmann, B. Pivcevic, W.E.G. Müller, R.K. Zahn, B. Kurelec, Increased genotoxicity of acetylaminofluorene by modulators of multixenobiotic resistance mechanism: studies with the freshwater clam *Corbicula fluminea*, Mutat. Res. 342 (1995) 113–123.
- [19] A.B. Shapiro, V. Ling, ATPase activity of purified and reconstituted P-glycoprotein from chinese hamster ovary cells, J. Biol. Chem. 269 (1994) 3745–3754.
- [20] R. Cornwall, B. Holland Toomey, B. Bard, C. Bacon, W.M. Jarman, D. Epel, Characterization of multixenobiotic/multidrug transport in the gills of the mussel *Mytilus californianus* and identification of environmental substrates, Aquat. Toxicol. 31 (4) (1995) 277–296.
- [21] F. Galgani, R. Cornwall, B. Toomey, D. Epel, Interaction of environmental xenobiotics with a multixenobiotic defense mechanism in the bay mussel *Mytilus Galloprovincialis* from the coast of California, Environ. Toxicol. Chem. 15 (3) (1996) 325–331.
- [22] T. Smital, B. Kurelec, Inhibitors of the multixenobiotic resistance mechanism in natural waters: In vivo demonstration of their effects, Environ. Toxicol. Chem. 16 (10) (1997) 2164–2170.
- [23] T. Smital, B. Kurelec, The activity of multixenobiotic resistance mechanism determined by rhodamine B-efflux method as a biomarker of exposure, Mar. Environ. Res. 46 (1–5) (1998) 443–447.
- [24] N.A. Eufemia, D. Epel, The multixenobiotic defense mechanism in mussels is induced by substrates and non-substrates: implications for a general stress response, Mar. Environ. Res. 46 (1–5) (1998) 401–405.
- [25] N.A. Eufemia, D. Epel, Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stress, Aquat. Toxicol. 49 (1–2) (2000) 89–100.
- [26] N. Eufemia, S. Clerte, S. Girshick, D. Epel, Algal products as naturally occurring substrates for P-glycoprotein in *Mytilus californianus*, Mar. Biol. 140 (2002) 343–353.
- [27] B. Kurelec, Reversion of the multixenobiotic resistance mechanism in gills of a marine mussel *Mytilus galloprovincialis* by a model inhibitor and environmental modulators of P170-glycoprotein, Aquat. Toxicol. 33 (1995) 93–103.
- [28] B. Kurelec, C. Krca, D. Lucic, Expression of multixenobiotic resistance mechanism in a marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of exposure to polluted environments, Comp. Biochem. Physiol. C 113 (2) (1996) 283–289.
- [29] B. Kurelec, P. Waldmann, K.R. Zahn, The modulation of protective effects of the multixenobiotic resistance mechanism in a clam *Corbicula fluminea*, Mar. Environ. Res. 42 (1–4) (1996) 383–387.
- [30] H.C. Schröder, F.A. Badria, S.N. Ayyad, R. Batel, M. Wiens, H.M.A. Hassanein, B. Kurelec, W.E.G. Müller, Inhibitory effects of extracts from the marine alga *Caulerpa taxifolia* and of toxin from *Caulerpa racemosa* on multixenobiotic resistance in the marine sponge *Geodia cydonium*, Environ. Toxicol. Pharmacol. 5 (1998) 119–126.
- [31] S. Britvic, B. Kurelec, The effects of inhibitors of multixenobiotic resistance mechanism on the production of mutagens by *Dreissena polymorpha* in water spiked with premutagens, Aquat. Toxicol. 47 (2) (1999) 107–116.
- [32] T. Smital, B. Kurelec, The chemosensitizers of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic invertebrates: a new class of pollutants, Mutat. Res. 399 (1) (1998) 43–53.
- [33] B. Kurelec, S. Britvic, B. Pivcevic, T. Smital, Fragility of multixenobiotic resistance in aquatic organisms enhances the complexity of risk assessment, Mar. Environ. Res. 46 (1–5) (1998) 415–419.
- [34] M. Horio, M.M. Gottesman, I. Pastan, ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells, Proc. Natl Acad. Sci. USA 85 (1988) 3580.
- [35] J.R. Riordan, V. Ling, Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability, J. Biol. Chem. 254 (1979) 12701–12705.
- [36] M.M. Cornwell, M.M. Gottesman, I.H. Pastan, Increased vinblastine binding to membrane vesicles from multidrug resistant KB cells, J. Biol. Chem. 261 (17) (1986) 7921–7928.
- [37] M. Naito, H. Hamada, T. Tsuruo, ATP/Mg²⁺-dependent binding of vincristine to the plasma membrane of multidrug resistant K562 cells, J. Biol. Chem. 263 (1988) 11887–11891.
- [38] W.T. Beck, T.M. Grogan, C.M. Willman, C. Cordon-Cardo, D.M. Parham, J.F. Kuttesch, M. Andreeff, S.E. Bates, C.W. Berard, J.M. Boyett, N.A. Brophy, H.J. Broxterman, H.S.L. Chan, W.S. Dalton, M. Dietel, A.T. Fojo, R.D. Gascoyne, D. Head, P.J. Houghton, D. Kumar Srivastava, M. Lehnert, C.P. Leith, E. Paietta, Z.P. Pavelic, L. Rimsza, I.B. Roninson, B.I. Sikic, P.R. Twentyman, R. Warnke, R. Weinstein, Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients' tumors: consensus recommendations, Cancer Res. 56 (1996) 3010–3020.

- [39] E. Georges, G. Bradley, J. Garipey, V. Ling, Detection of P-glycoprotein isoforms by gene-specific monoclonal antibodies, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87 (1990) 152–156.
- [40] J.M.H. van den Elsen, D.A. Kuntz, F.J. Hoedemaeker, D.R. Rose, Antibody C219 recognizes an α -helical epitope on P-glycoprotein, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96 (24) (1999) 13679–13684.
- [41] N. Kartner, D. Everden-Porelle, G. Bradley, V. Ling, Detection of P-glycoprotein in multidrug resistant cell lines by monoclonal antibodies, *Nature* 316 (6031) (1985) 820–823.
- [42] S. Childs, R.L. Yeh, E. Georges, V. Ling, Identification of a sister gene to P-glycoprotein, *Cancer Res.* 55 (10) (1995) 2029–2034.
- [43] G. Bradley, E. Georges, V. Ling, Sex-dependent and independent expression of the P-glycoprotein isoforms in chinese hamster, *J. Cell Physiol.* 145 (1990) 398–408.
- [44] K.M. Kleinow, A.M. Doi, A.A. Smith, Distribution and inducibility of P-glycoprotein in the catfish: immunohistochemical detection using the mammalian C-219 monoclonal, *Mar. Environ. Res.* 50 (2000) 313–318.
- [45] J.A. Albertus, R.O. Laine, Enhanced xenobiotic transporter expression in normal teleost hepatocytes: response to environmental and chemotherapeutic toxins, *J. Exp. Biol.* 204 (2001) 217–227.
- [46] A. Sturm, J.P. Cravedi, H. Segner, Prochloraz and nonylphenol diethoxylate inhibit an *mdr1-like* activity *in vitro*, but do not alter hepatic levels of P-glycoprotein in trout exposed *in vivo*, *Aquat. Toxicol.* 53 (2001) 215–228.
- [47] S.M. Bard, B.R. Woodin, J.J. Stegeman, Expression of P-glycoprotein and cytochrome P450 1A in intertidal fish (*Anoplarchus purpureus*) exposed to environmental contaminants, *Aquat. Toxicol.* 60 (2002) 17–32.
- [48] A. Köhler, B. Lauritzen, D. Jansen, P. Böttcher, L. Teguliwa, G. Krüner, K. Broeg, Detection of P-glycoprotein mediated MDR/MXR in *Carcinus maenas* hepatopancreas by immunogold-silver labeling, *Mar. Environ. Res.* 46 (1–5) (1998) 411–414.
- [49] B. Kurelec, S. Krca, B. Pivcevic, D. Ugarkovic, M. Bachmann, G. Imsiecke, W.E.G. Müller, Expression of P-glycoprotein gene in marine sponges. Identification and characterization of the 125 kDa drug-binding glycoprotein, *Carcinogenesis* 13 (1) (1992) 69–76.
- [50] B. Kurelec, T. Smital, B. Pivcevic, N. Eufemia, D. Epel, Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein, and chemosensitizers, *Ecotoxicology* 9 (5) (2000) 307–327.
- [51] T. Smital, R. Sauerborn, B. Pivcevic, S. Krca, B. Kurelec, Interspecies differences in P-glycoprotein mediated activity of multixenobiotic resistance mechanism in several marine and freshwater invertebrates, *Comp. Biochem. Physiol. C* 126 (2) (2000) 175–186.
- [52] B. Kurelec, A new type of hazardous chemical: the chemosensitizers of multixenobiotic resistance, *Environ. Health Persp.* 105 (Suppl. 4) (1997) 855–860.
- [53] B. Kurelec, D. Lucic, B. Pivcevic, S. Krca, Induction and reversion of multixenobiotic resistance in the marine snail *Monodonta turbinata*, *Mar. Biol.* 123 (1995) 305–312.
- [54] B.H. Toomey, D. Epel, Multixenobiotic resistance in *Urechis caupo* embryos: protection from environmental toxins, *Biol. Bull.* 185 (3) (1993) 355–364.
- [55] D. Epel, Use of multidrug transporters as a first line defense against toxins in aquatic organisms, *Comp. Biochem. Physiol. A* 120 (1998) 23–28.
- [56] A.M. Hamdoun, F.J. Griffin, G.N. Cherr, Tolerance to biodegraded crude oil in marine invertebrate embryos and larvae is associated with expression of a multixenobiotic resistance transporter, *Aquat. Toxicol.* 61 (2002) 127–140.
- [57] A. Jaouen, C. Galap, C. Minier, R. Tutundjian, F. Le Boulenger, Bioaccumulation of pollutants and measures of biomarkers in the Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) from downstream river Seine, *Bull. Soc. Zool. Fr.* 125 (3) (2000) 239–249.
- [58] C. Keppler, A.H. Ringwood, Expression of P-glycoprotein in the gills of oysters, *Crassostrea virginica*: seasonal and pollutant related effects, *Aquat. Toxicol.* 54 (3–4) (2001) 195–204.
- [59] C. Minier, V. Borghi, M.N. Moore, C. Porte, Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*, *Aquat. Toxicol.* 50 (2000) 167–176.
- [60] V. Bresler, V. Bissinger, A. Abelson, H. Dizer, A. Sturm, R. Kratke, L. Fishelson, P.D. Hansen, Marine molluscs and fish as biomarkers of pollution stress in littoral regions of the Red Sea, Mediterranean Sea and North Sea, *Helgolander Mar. Res.* 53 (1999) 219–243.
- [61] C. Minier, N. Eufemia, D. Epel, The multi-xenobiotic resistance phenotype as a tool to biomonitor the environment, *Biomarkers* 4 (6) (1999) 442–454.
- [62] A.H. Ringwood, D.E. Connors, C.J. Keppler, A.A. DiNovo, Biomarker studies with juvenile oysters (*Crassostrea virginica*) deployed *in situ*, *Biomarkers* 4 (6) (1999) 400–414.
- [63] R. Tutundjian, Caractérisation d'un système de résistance multixénobiotique (MXR) chez le turbot (*Scophthalmus maximus*), thèse, université du Havre, 2001, 164 p.
- [64] A. Ringwood, M. Hameedi, R. Lee, M. Brouwer, E. Peters, G. Scott, S. Luoma, R. DiGiulio, M. Depledge, S. Steinert, S. Teh, R. Van Beneden, G. Winston, D. Epel, C. Minier, J. Narbonne, L. Peters, G. Roesijadi, A. Viarengo, I. Werner, R. Anderson, L. Burnett, F. Chu, L. Oliver, K. Paynter, Bivalve Biomarker Workshop: overview and discussion group summaries, *Biomarkers* 4 (6) (1999) 391–399.