Approche multi-biomarqueurs pour la surveillance des écosystèmes aquatiques

> WILFRIED SANCHEZ, JEAN-MARC PORCHER

La directive européenne cadre sur l'eau (Directive 2000/60/CE) propose un cadre réglementaire pour la politique de l'eau au niveau communautaire afin d'améliorer, de protéger et de prévenir les dégradations de la qualité de l'eau en Europe. Cette directive fixe pour objectif de parvenir à un bon état écologique et chimique des eaux d'ici à 2015. Pour ce faire, elle prévoit l'établissement de programmes de surveillance de la qualité des eaux portant sur la détermination de paramètres chimiques et écologiques, afin de dresser un tableau cohérent et complet de l'état des eaux en Europe. Ces deux approches, bien que complémentaires, ne permettent toutefois pas de prendre en compte la complexité de la contamination et les effets précoces de celle-ci sur les organismes. Afin de combler cette lacune, un axe majeur de recherche en écotoxicologie au cours des 25 dernières années a consisté dans le développement de biomarqueurs. Les biomarqueurs se définissent comme un changement observable ou mesurable à différents niveaux d'organisation biologique qui reflète l'exposition d'un organisme à au moins un polluant. Ces outils biologiques permettent donc d'appréhender les effets précoces de la contamination sur les organismes en prenant en considération la biodisponibilité des contaminants, leur métabolisation et les interactions entre molécules. Toutefois, afin de prendre en compte la complexité de la contamination et de ses effets, il est nécessaire de recourir à un ensemble de biomarqueurs décrivant une large gamme d'effets [1, 2].

Les travaux menés à l'INERIS s'inscrivent dans une stratégie globale sur l'utilisation des biomarqueurs dans un contexte de multi-pollution. Ils visent plus particulièrement à développer un ensemble cohérent de biomarqueurs reflétant les effets de la contamination sur différentes fonctions physiologiques d'un organisme, et à déterminer les conditions et les limites d'utilisation de ces biomarqueurs dans un contexte de biosurveillance des milieux aquatiques.

L'ÉPINOCHE À TROIS ÉPINES COMME ESPÈCE MODÈLE

Dans le cadre des études menées à l'INERIS, plusieurs espèces de poissons sont utilisées telles que le chevaine *(Leuciscus cephalus),* le gardon *(Rutilus rutilus),* le chabot *(Cottus gobio)* et l'épinoche à trois épines *(Gasterosteus aculeatus).* Ces espèces sont essentiellement choisies en raison de leur large distribution dans les hydrosystèmes français et européens mais aussi en fonction des connaissances disponibles pour chaque espèce et de leur utilisation préalable comme espèce sentinelle en écotoxicologie. Dans ce contexte, l'épinoche apparaît comme un modèle biologique particulièrement intéressant. En effet, l'utilisation de cette espèce dans différentes disciplines a contribué à l'acquisition de nombreuses connaissances relatives à la biologie, à l'histoire de vie, au comportement ou encore à l'écologie de l'épinoche. De plus, la petite taille de ce poisson facilite son maintien et son utilisation dans des conditions de laboratoire. *In situ,* l'épinoche est une espèce non migratrice, largement distribuée dans l'hémisphère nord où elle colonise les milieux aquatiques continentaux, estuariens et côtiers, offrant alors la possibilité d'utiliser cette espèce dans des programmes de surveillance de l'environnement. Plus spécifiquement, différentes études ont mis en lumière la pertinence de la mesure de différents biomarqueurs chez des épinoches collectées dans les milieux naturels afin d'évaluer les effets précoces de la contamination chez le poisson [3]. Parmi ces biomarqueurs figure la spiggin, une protéine spécifique de l'épinoche dont la synthèse est placée sous contrôle androgénique, et qui est utilisable comme marqueur d'androgénicité, offrant alors

#1

BIOMARQUEUR	TYPE D'EFFET	MOLÉCULES DE RÉFÉRENCE
Activité 7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD)	Biotransformation	β-naphtoflavone
Glutathion-S-transférase (GST)	Biotransformation / Stress oxydant	Prochloraz
Superoxyde Dismutase (SOD)	Stress oxydant	Cuivre
Catalase (CAT)	Stress oxydant	Cuivre
Glutathion Peroxydase (GPx)	Stress oxydant	Cuivre
Glutathion total (GSH)	Stress oxydant	Cuivre
Lipoperoxydation (TBARS)	Stress oxydant	Cadmium, Diuron
Acétylcholinestérase (AChE)	Neurotoxicité	Fénitrothion
Vitellogénine (VTG)	Perturbation endocrinienne	17β-oestradiol
Spiggin (SPG)	Perturbation endocrinienne	17α-méthyltestostérone

> Tableau 1 : biomarqueurs utilisés à l'INERIS pour la surveillance des milieux aquatiques. Pour chaque paramètre, le type d'effet associé et les molécules de référence utilisées pour la caractérisation des réponses sont présentés.

un avantage indéniable à l'épinoche par rapport aux autres espèces couramment employées en écotoxicologie de terrain.

DÉVELOPPEMENT ET CARACTÉRISATION DES BIOMARQUEURS EN CONDITIONS CONTRÔLÉES

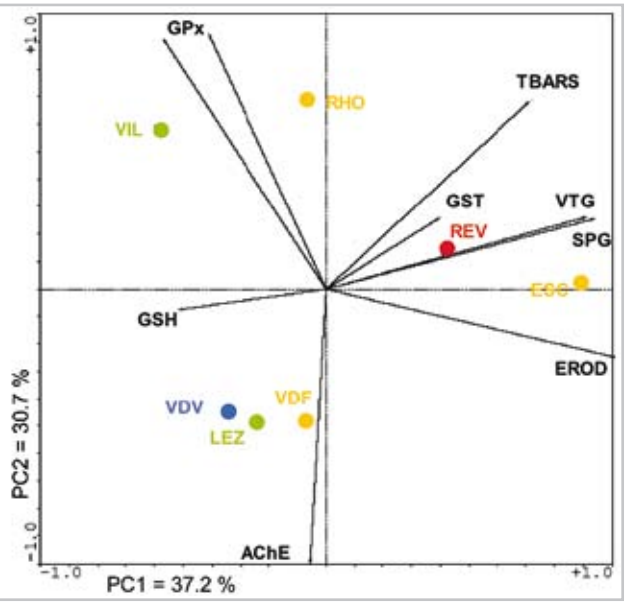
Préalablement à l'étude et l'application des biomarqueurs *in situ,* une étape permettant le développement et l'optimisation des méthodes de dosage mais également la caractérisation des biomarqueurs en conditions contrôlées s'avère nécessaire. Dans un premier temps, plusieurs dosages de biomarqueurs classiquement utilisés en écotoxicologie ont été optimisés chez différentes espèces. Parmi les biomarqueurs d'intérêts figurent des enzymes de biotransformation, des marqueurs du stress oxydant ainsi qu'un marqueur de neurotoxicité (tableau 1). De plus, afin de prendre en compte l'exposition des organismes à des polluants de type perturbateurs endocriniens, des méthodes de dosage immuno-enzymatiques ont été développées pour le dosage de la vitellogénine, un biomarqueur d'oestrogénicité chez les poissons mâles [4], mais également pour le dosage de la spiggin, un marqueur d'androgénicité spécifique des épinoches femelles [5].

Suite aux développements méthodologiques, la réponse des biomarqueurs est caractérisée, en conditions contrôlées, à l'aide de substances de référence et/ou de contaminants environnementaux (tableau 1) afin de déterminer la spécificité, la sensibilité, l'inductibilité et la réversibilité de chaque paramètre. Les données obtenues permettent de positionner les espèces étudiées les unes par rapport aux autres sur la base de l'inductibilité ou de la sensibilité des réponses. Par exemple, l'activité EROD de l'épinoche se caractérise par un facteur maximal d'induction de 18 obtenu suite à une exposition de 72 heures à 2,7 µM de β-naphtoflavone [6]. Ce résultat met alors en avant, chez l'épinoche, une inductibilité de l'activité EROD comparable à celle qui est rapportée chez des espèces de cyprinidés comme le chevaine et le gardon. Les résultats de ces expérimentations en conditions contrôlées permettent également d'établir un certain nombre de conditions et de limites pour l'utilisation des biomarqueurs notamment aux travers de l'étude de la réversibilité des réponses. Ils fournissent aussi une base d'interprétation des résultats acquis *in situ* en permettant de positionner ces derniers par rapport à des valeurs obtenues dans des conditions déterminées (*e.g.* induction maximale, dépuration, interaction entre inducteurs et inhibiteurs).

ÉVALUATION DES BIOMARQUEURS SUR LE TERRAIN

La caractérisation des biomarqueurs est également réalisée *in situ,* dans différents contextes, afin de prendre en compte la complexité du milieu et de sa contamination. Une première étape consiste à déterminer l'influence de facteurs biotiques et abiotiques sur les niveaux de base des biomarqueurs. Pour ce faire, des épinoches ont été échantillonnées mensuellement sur un site de référence pendant une période de six mois compatible avec les contraintes liées à

#1

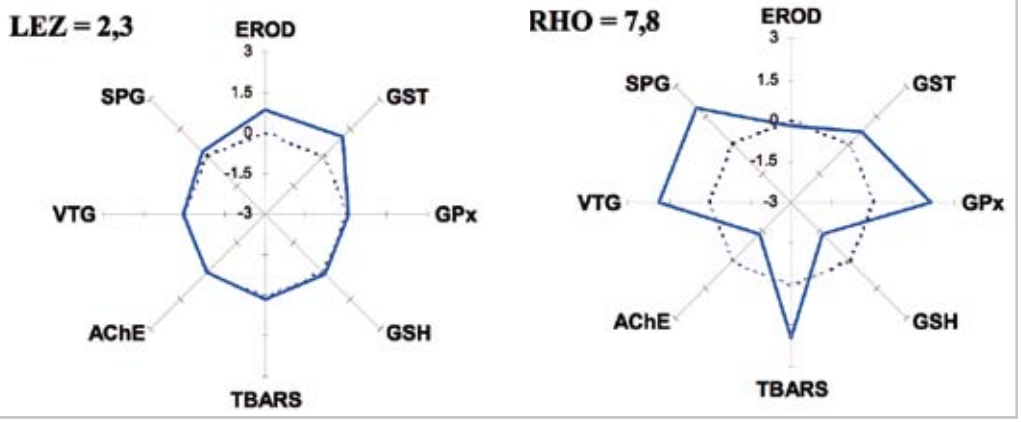


> Analyse en Composante Principale obtenue suite à la mesure de 8 biomarqueurs sur 7 sites d'échantillonnage caractérisés par des contaminations qualitativement et quantitativement différentes. Cette analyse met en avant la complémentarité des paramètres étudiés et la relation entre les sites d'étude et la réponse des biomarqueurs. Les couleurs des sites se réfèrent à la classe d'Indice Poisson Rivière (IPR, données ONEMA).

l'échantillonnage des poissons (avril à octobre). Les résultats obtenus ont mis en avant l'impérative nécessité de prendre en considération des facteurs aussi variés que le sexe des individus, leur statut reproducteur ou encore leur taille afin de pouvoir utiliser les données recueillies dans un contexte de surveillance de l'environnement. De plus, ces résultats donnent la possibilité d'édicter certaines règles d'échantillonnage permettant de limiter la variabilité des biomarqueurs en n'utilisant que des poissons adultes hors de leur période de reproduction et dans une classe de taille relativement restreinte [7]. Forts de la connaissance d'un certain nombre de limites des biomarqueurs, ces derniers ont été mesurés chez des épinoches échantillonnées dans différents cours d'eau du Nord de la France caractérisés par des profils de contamination variés. Ce travail, réalisé en collaboration avec l'Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA), a permis de mettre en évidence la complémentarité des biomarqueurs sélectionnés, le pouvoir discriminant de cette batterie (figure 1) et l'intérêt de recourir à une telle approche pour la caractérisation des effets précoces de la contamination chez le poisson [8]. De plus, la confrontation des mesures de biomarqueurs à d'autres données environnementales telles que des données qualitatives et/ou quantitatives sur la contamination du milieu, mais aussi des mesures populationnelles visant à évaluer les effets de la contamination de l'environnement au sein des populations et des communautés a permis la démonstration de l'intérêt d'une approche multi-paramétrique pour la caractérisation de la contamination des sites et des effets.

Enfin, dans un objectif de synthèse et de vulgarisation des résultats obtenus, un indice écotoxicologique a été développé et validé [9]. Cet indice qui s'appuie sur le principe d'écart à la référence édicté par la Directive européenne

#2



> Indices biomarqueurs calculés sur deux sites. La Lézarde (LEZ) est un site faiblement contaminé, peu impacté par la pollution et qui présente une valeur d'indice faible. La Rhonelle (RHO) est un site contaminé par des activités urbaines et agricoles et qui présente une réponse des biomarqueurs plus importante reflétée par une valeur d'indice biomarqueurs élevée.

cadre sur l'eau combine une valeur numérique reflétant l'intensité des effets mesurés et une représentation graphique permettant de visualiser la réponse spécifique de chaque biomarqueur. À l'image des biomarqueurs, cet indice permet la discrimination des sites sur la base de la réponse des biomarqueurs (figure 2) et apporte une information complémentaire à celle d'autres indices classiquement utilisés pour la gestion des milieux aquatiques qui sont basés sur la contamination chimique des milieux ou sur la perturbation des communautés [9]. Son applicabilité dans le cadre de réseaux pérennes de surveillance des milieux aquatiques tels qu'ils sont définis par la Directive européenne cadre sur l'eau reste toutefois à valider.

SUMMARY

To assess the effects of contamination at low organisation levels, several studies have focused on biomarker utilization as indicators of chemical exposure and early responses of aquatic organisms. However, to evaluate the various responses to pollutant mixtures in organisms, the usefulness of a set of complementary biomarkers has been demonstrated and is now applied in environmental biomonitoring programs. In this context, the selected sentinel species appears as a critical factor for an accurate description of pollution effects in organisms. The stickleback is a pollution-tolerant fish which inhabit most aquatic ecosystems in the northern hemisphere. It has been proposed as a suitable fish species for detecting endocrine disruption induced by environmental pollutants and appears as an interesting model fish species for environmental biomonitoring. However, few data describe biomarker responses in wild stickleback populations.

In the present work, a set of biomarkers including biotransformation enzymes, oxidative stress parameters, neurotoxicity marker but also estrogenic and androgenic end-points was developed and validated.

Firstly, biomarker assays were set up in the stickleback. Indeed, several biomarkers such as EROD and acetylcholinesterase activities are classically employed in various fish species but methodological adaptation is required. Moreover, specific immuno-enzymatic assays were developed to quantify endocrine disruption biomarkers such as vitellogenin and spiggin. Secondly, this set of biochemical biomarkers was validated *in situ*. Sticklebacks collected monthly in a reference was used to determine basal level of investigated parameters but also to characterise the effects of gender and sampling season on biomarker responses. According to the results of this experiment, male and female fish from sites sampled in Autumn and characterised by various contamination levels were analysed. This study showed that biomarker responses in stickleback are valuable parameters to describe the effects of contamination in aquatic organisms. Moreover, biomarkers appear as complementary tools with other environmental parameters including chemical analysis in water and sediment but also population disturbances. In the last step, an ecotoxicological indicator was set-up to summarize biomarker responses recorded in investigated sites. This indicator allows site ranking based on biomarker measurement and provides a complementary data to other environmental indicators.

[RÉFÉRENCES

[1] Van der Oost R., Goksoyr A., Celander M., Heida H., Vermeulen N.P.E., 1996. *Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel* (Anguilla anguilla). *II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses.* Aquatic Toxicology 36, 189-222.

[2] Sanchez W., Ait-Aissa S., Palluel O., Ditche J.-M., Porcher J.-M., 2007. *Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback* (Gasterosteus aculeatus L.) *sampled in contaminated streams.* Ecotoxicology 16, 279-287.

[3] Katsiadaki I., 2007. *The use of the stickleback as a sentinel and model species in ecotoxicology.* In: Östlund-Nilsson S., Mayer I., Huntingford F.A. (Eds.), Biology of the three-spined stickleback. CRC Press, Boca Raton, London, New York, pp. 319-351.

[4] Flammarion P., Brion F., Babut M., Garric J., Migeon B., Noury P., Thybaud E., 2000. *Induction of fish vitellogenin and alterations in testicular structure: preliminary results of estrogenic effects in chub* (Leucinus cephalus). Ecotoxicology 9, 127-135.

[5] Sanchez W., Goin C., Brion F., Olsson P.-E., Goksoyr A., Porcher J.-M., 2008. *A new ELISA for the three-spined stickleback* (Gasterosteus aculeatus L.) *spiggin, using antibodies against synthetic peptide.* Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 147, 129-137.

[6] Sanchez W., Piccini B., Porcher J.-M., 2008. *Effect of prochloraz fungicide on biotransformation enzymes and oxidative stress parameters in three-spined stickleback* (Gasterosteus aculeatus L.). Journal of Environmental Science and Health Part B: Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes, 43 (1), 65-70.

[7] Sanchez W., Piccini B., Ditche J.-M., Porcher J.-M., 2008. *Assessment of seasonal variability of biomarkers in three-spined stickleback* (Gasterosteus aculeatus L.) *from a low contaminated stream: implication for environmental biomonitoring.* Environment International, 34 (6), 791-798.

[8] Sanchez W., Katsiadaki I., Piccini B., Ditche J.-M., Porcher J.-M., 2008. *Biomarker responses in wild three-spined stickleback* (Gasterosteus aculeatus L.) *as a useful tool for freshwater biomonitoring : a multiparametric approach.* Environment International, 34 (4), 490-498.

[9] Sanchez W., 2007. Approche *multi-biomarqueurs chez l'épinoche à trois épines* (Gasterosteus aculeatus L.) : *un modèle pour la surveillance des écosystèmes aquatiques continentaux.* Thèse de doctorat du Muséum national d'Histoire Naturelle, 149p + annexes.