



Journées ECCOREV
Ecotoxicologie en Milieux Aquatiques Méditerranéens & Santé Humaine

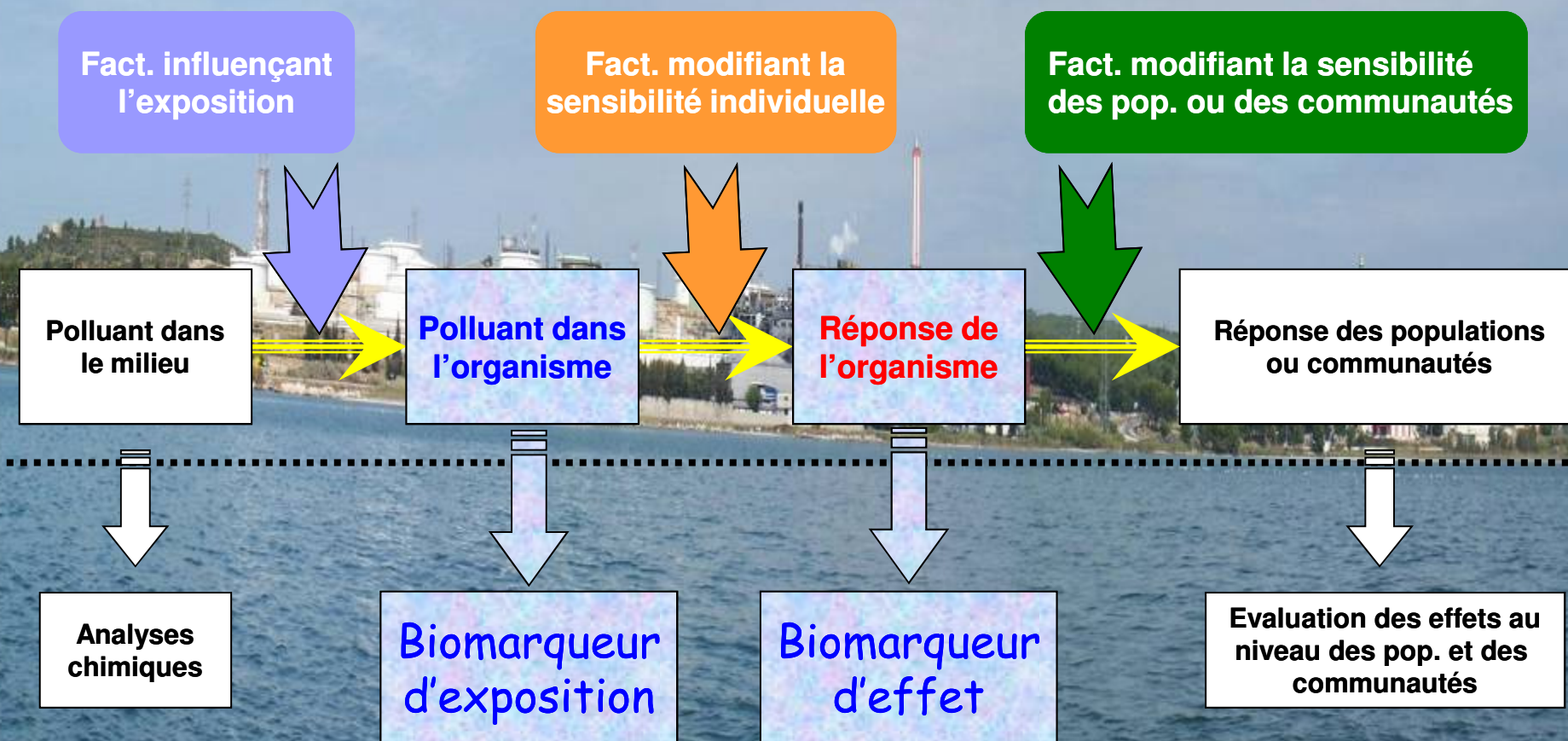
Utilisation de biomarqueurs animaux dans le
diagnostic écotoxicologique précoce

Xavier Moreau (UMR 6116-IMEP)



Biomarqueurs ? késaco??

Place des biomarqueurs dans l'évaluation écotoxicologique



Biomarqueurs ? késaco??

méthodologie initialement développée à des fins de « biomonitoring »

Utilisation depuis les années 1960

Définitions :

Week 1995: *réponse biologique à un produit chimique (pesticide, HAP, ETM,...) qui induit un stress et peut donner une estimation ou une mesure de l'effet toxique potentiel.*

Lagadic 1997 : *Changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant*

Ramade 2007: *en reprenant Lagadic 1997 correspondent à des structures biologiques ou processus physiotoxicologiques caractérisant la réaction d'un organisme face à son exposition à un xénobiotique*

Biomarqueurs ? késaco??

Rôle fonctionnel :
Maintenance de l'homéostasie des organismes

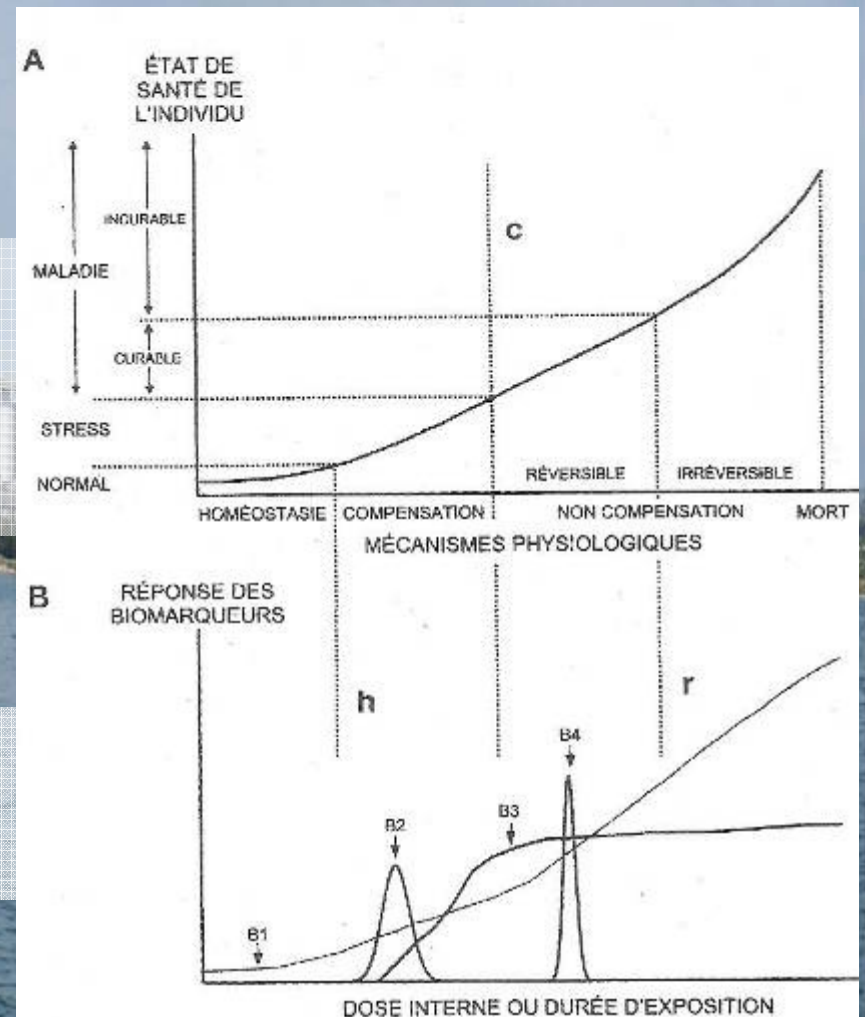
Outil à manipuler délicatement car nécessite une parfaite connaissance des facteurs biotiques et abiotiques du milieu ainsi que les fluctuations naturelles du biomarqueur

Biomarqueurs ? késaco??

Terminologie et classification

Biomarqueur de compensation : réactions pour limiter des effets toxiques des polluants
= réaction de protection et de défense
= **biomarqueur de défense**

Biomarqueur de non-compensation : traduit des effets négatifs irréversibles
= **biomarqueur de dommage**



Biomarqueurs ? késaco??

Terminologie et classification

- **Indices de stress généraux :**
réponse de l'organisme à des polluants sans permettre de déterminer leur nature
- **Indices de stress spécifiques :**
réponse de l'organisme à une famille de polluants

Biomarqueurs ? késaco??

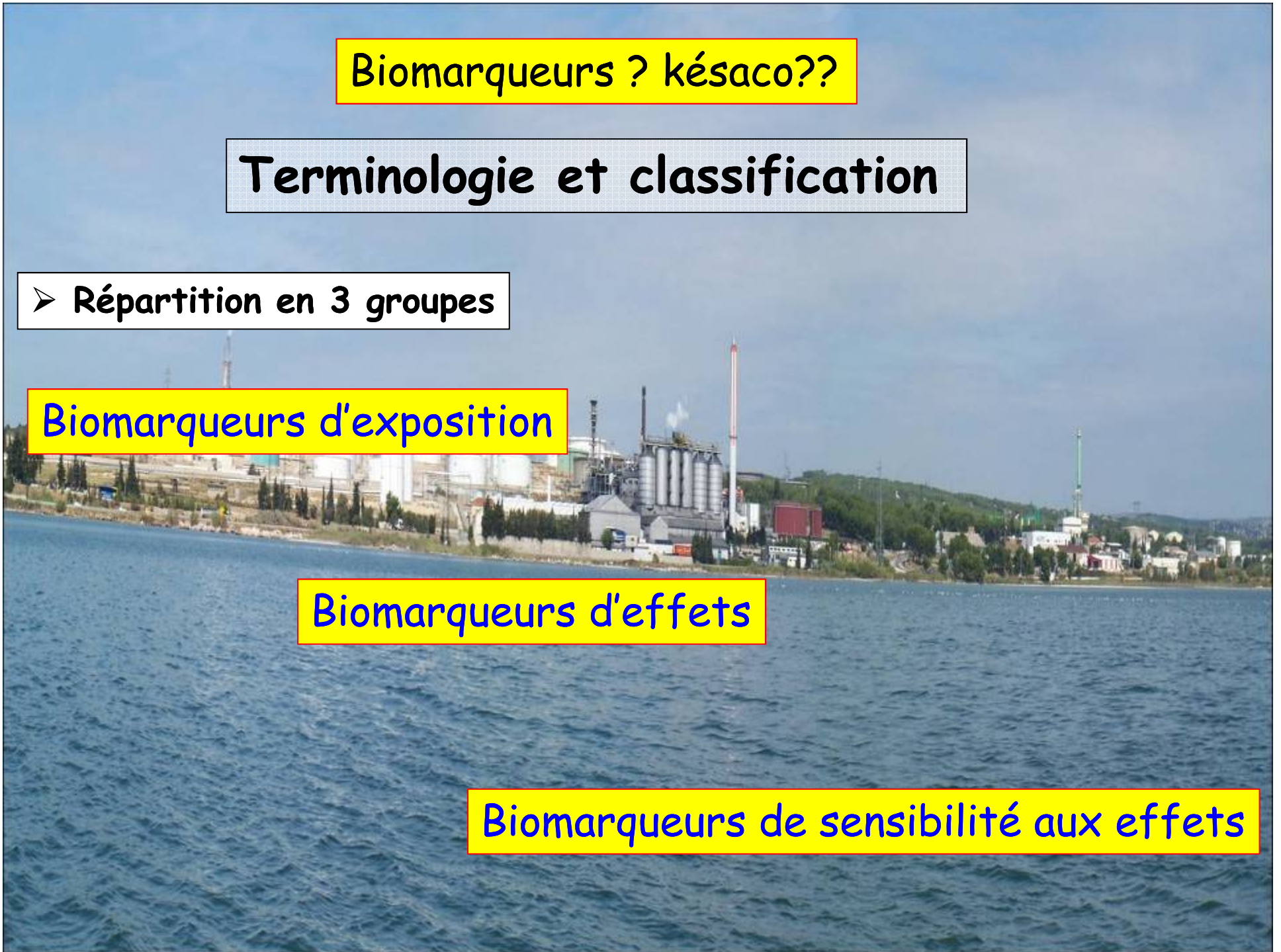
Terminologie et classification

➤ Répartition en 3 groupes

Biomarqueurs d'exposition

Biomarqueurs d'effets

Biomarqueurs de sensibilité aux effets



Biomarqueurs ? késaco??

Qualités attendues

- **Précocité** (dans le temps) = principe des biomarqueurs
- **Sensibilité** (par rapport à la concentration en polluant)
- **Spécificité** (vis à vis de polluants ou de classe de polluants)
- **Pertinence écologique** (prévisions des effets sur l'écosystème)
- **Stabilité/répétabilité** et **durée** de la réponse
- **Facilité** de mesure
- Existence de **références** (ou connaissance des facteurs de variation)

Les Principaux Biomarqueurs

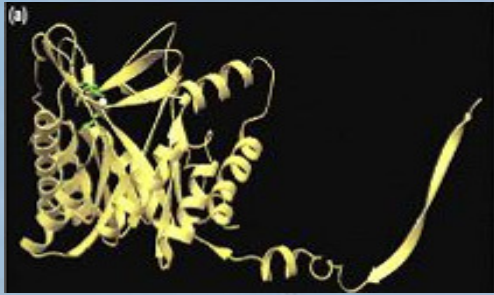
Contaminant	Biomarqueurs	
	Nature	Type
HAPs	Induction des cytochromes P450 Adduits à l'ADN	enzymatique biochimique
Organochlorés	Induction de la GST et la GPx	enzymatique
Métaux toxiques	Métallothionéines	biochimique
Pesticides, HAPs	(-) ou (+) de la SOD	enzymatique
OPs et carbamates	(-) des cholinestérases	enzymatique
Métaux, organochlorés, pesticides, HAPs	Lésions tissulaires	histologique
Métaux, organochlorés, pesticides, phénols	(-) de paramètres immunitaires	biochimique
Organochlorés	Taux de rétinol et rétinoïdes	biochimique
Métaux, organochlorés, pesticides	Protéines de stress	biochimique
Stress chimique aspécifique	Morphologie tissulaire, Charge en adénylates	anatomique biochimique

Biomarqueurs d'exposition

- permettent de considérer la présence du polluant dans le biotope,
- indiquent que le polluant a pénétré dans l'organisme,
- sont le résultat d'interaction entre le polluant et des molécules biologiques
- utiles si les contaminants sont instables et difficiles à rechercher par analyse chimique

- Biomarqueurs d'exposition aux métaux et métalloïdes toxiques
- Biomarqueurs d'exposition aux insecticides organophosphorés et carbamates
- Biomarqueurs d'exposition aux HAPs
- Biomarqueurs d'exposition aux organochlorés
- Biomarqueurs d'exposition aux polluants génotoxiques

Biomarqueurs d'exposition aux métaux et métalloïdes toxiques



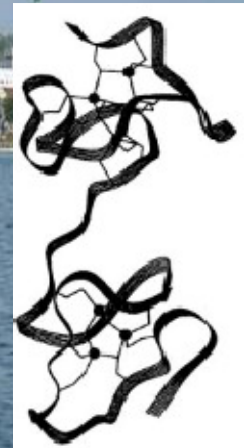
<http://culturesciences.chimie.ens.fr/dossiers-chimie-societe-article-ToxicologiePbEau.html>

Déshydratase de l'acide delta-aminolévulinique (ALAD) :

- * Inhibition causant une élévation d'acide aminolévulinique (pro-oxydant) et une production de ROS via les réactions de Fenton.
- * Spécifique d'une exposition au plomb
- * Utilisé dès les années 1970

Métallothionéines :

- * Protéines soufrées, riches en cystéines, inductibles par les métaux
- * Détoxification des métaux et métalloïdes toxiques
- * Variations d'un groupe taxonomique à l'autre
- * Induction complexe car beaucoup de facteurs (antibiotiques, molécules de l'inflammation et cytokines, oncogènes, facteurs de croissance, hormones, stress oxydatif...)



Métallothionéines

<http://culturesciences.chimie.ens.fr/dossiers-chimie-societe-article-ToxicologiePbEau.html>

Acétylcholinésterase (AChE) :

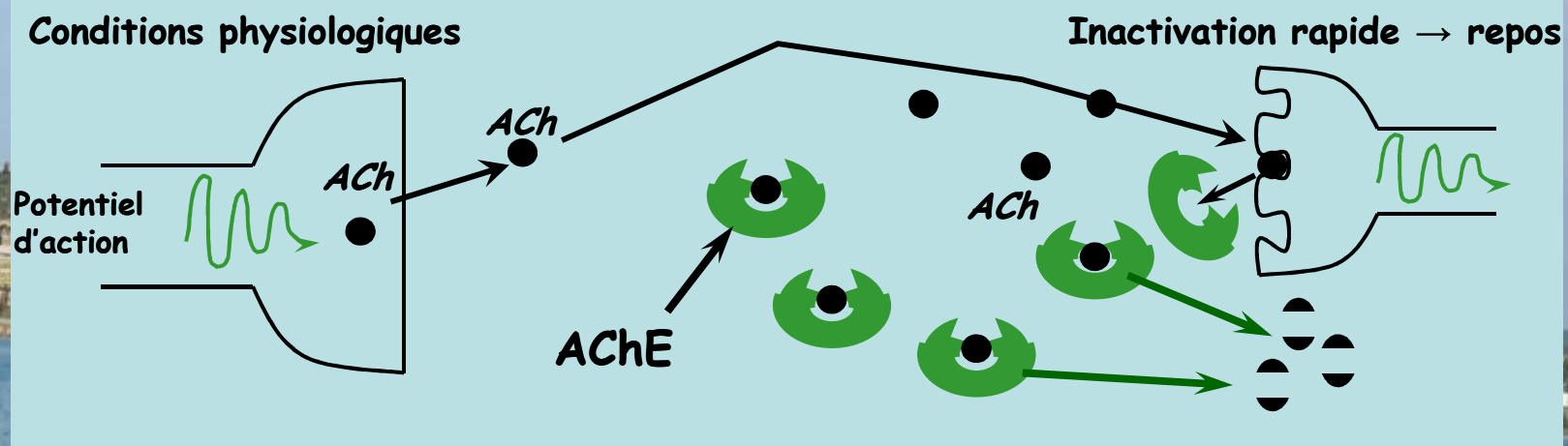
- * Inhibition par les métaux lourds

Biomarqueurs d'exposition aux insecticides organophosphorés et carbamates

L'Acétylcholinestérase (AChE) :

* Estérase de type B; enzyme du système nerveux impliquée dans la transmission du message et la contraction musculaire

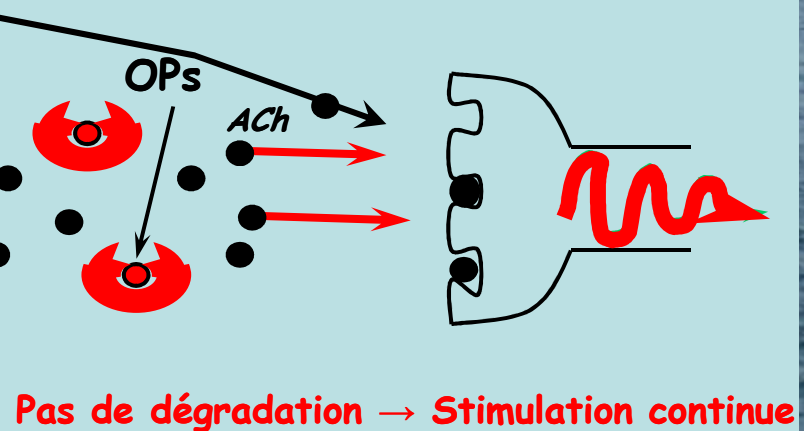
Conditions physiologiques



Potentiel d'action

En présence d'OPs

AChE inhibée



Biomarqueurs d'exposition aux insecticides organophosphorés et carbamates

L'Acétylcholinestérase (AChE) :

- * Mesure de l'inhibition de l'activité enzymatique
- * Inhibition réversible pour les carbamates
- * Inhibition irréversible pour les OPs

Précautions :

- * Inhibition ou Augmentation par des métaux (Cd) selon le taxon
- * Inhibition par des HAPs (benzo[a]pyrène)
- * Influencée par des facteurs abiotiques: salinité, température

Biomarqueurs d'exposition aux HAPs

Le système à cytochrome P450 (CYP450) :

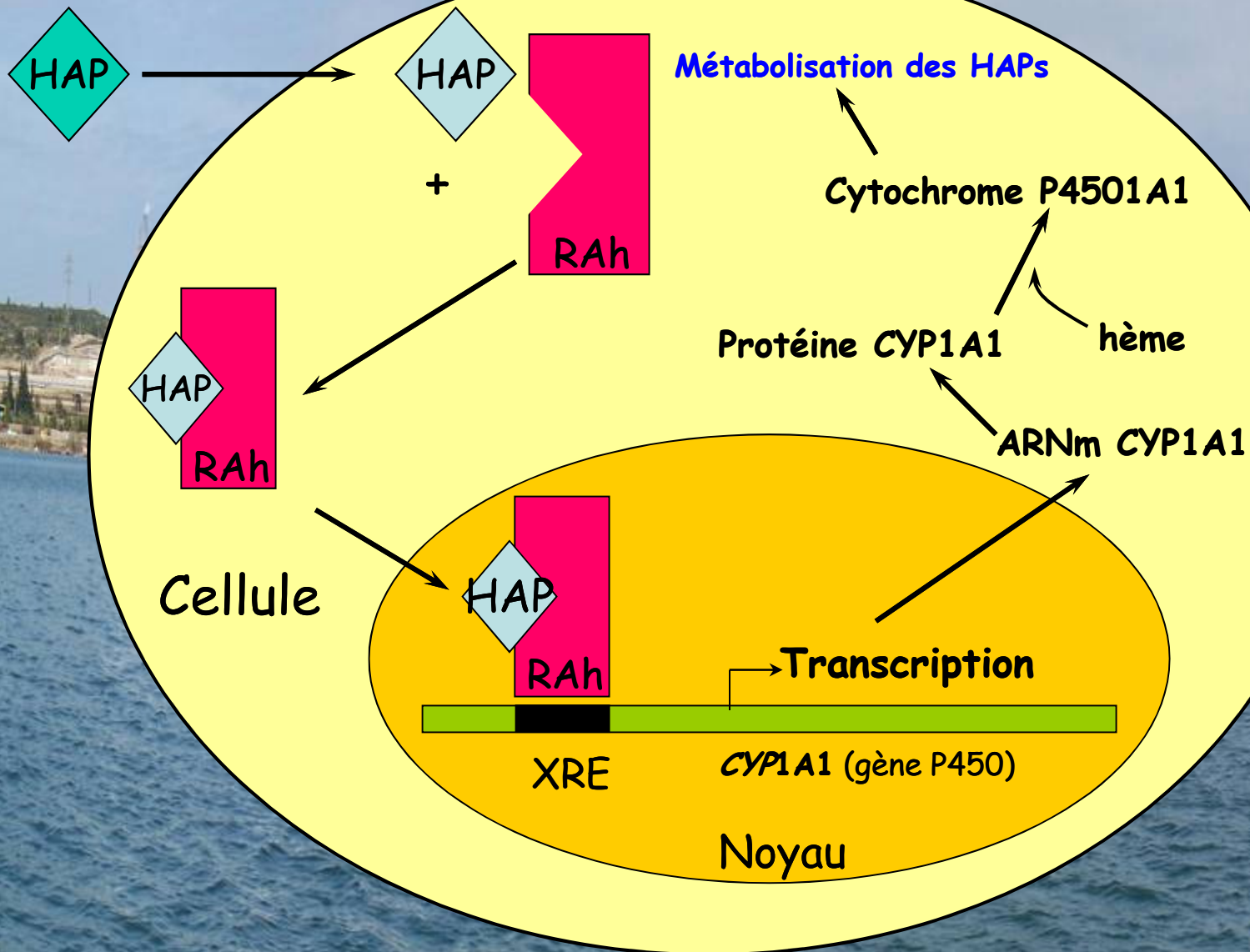
- * Présents dans tous les tissus (réticulum endoplasmique lisse, mitochondrie, enveloppe nucléaire)
- * Complexe multi-enzymatique à mono-oxygénases (500 ADNc clonés) composé, entre autres, de 2 flavoprotéines et 2 hémoprotéines
- * Catalysant les processus d'oxydation des polluants
- * Fortement inducible par HAPs mais aussi par des dioxines et les PCBs (ex cytochromes 1A)

Les adduits à l'ADN :

- * Liaison covalente entre un métabolite électrophile d'un HAP (bioactivation par les CYP450) et un nucléotide de l'ADN
- * Induction de mutations, d'altération de la structure de l'ADN

Biomarqueurs d'exposition aux HAPs

Induction du cytochrome P450 1A



Biomarqueurs d'exposition aux organochlorés

Le système à cytochrome P450 (CYP450)

- * Forte induction aux PCBs

La P450-aromatase

- * Forte induction aux dioxines et aux « *dioxin-like* »

Les glucuroyl-transférases et les glutathion-S-transférases

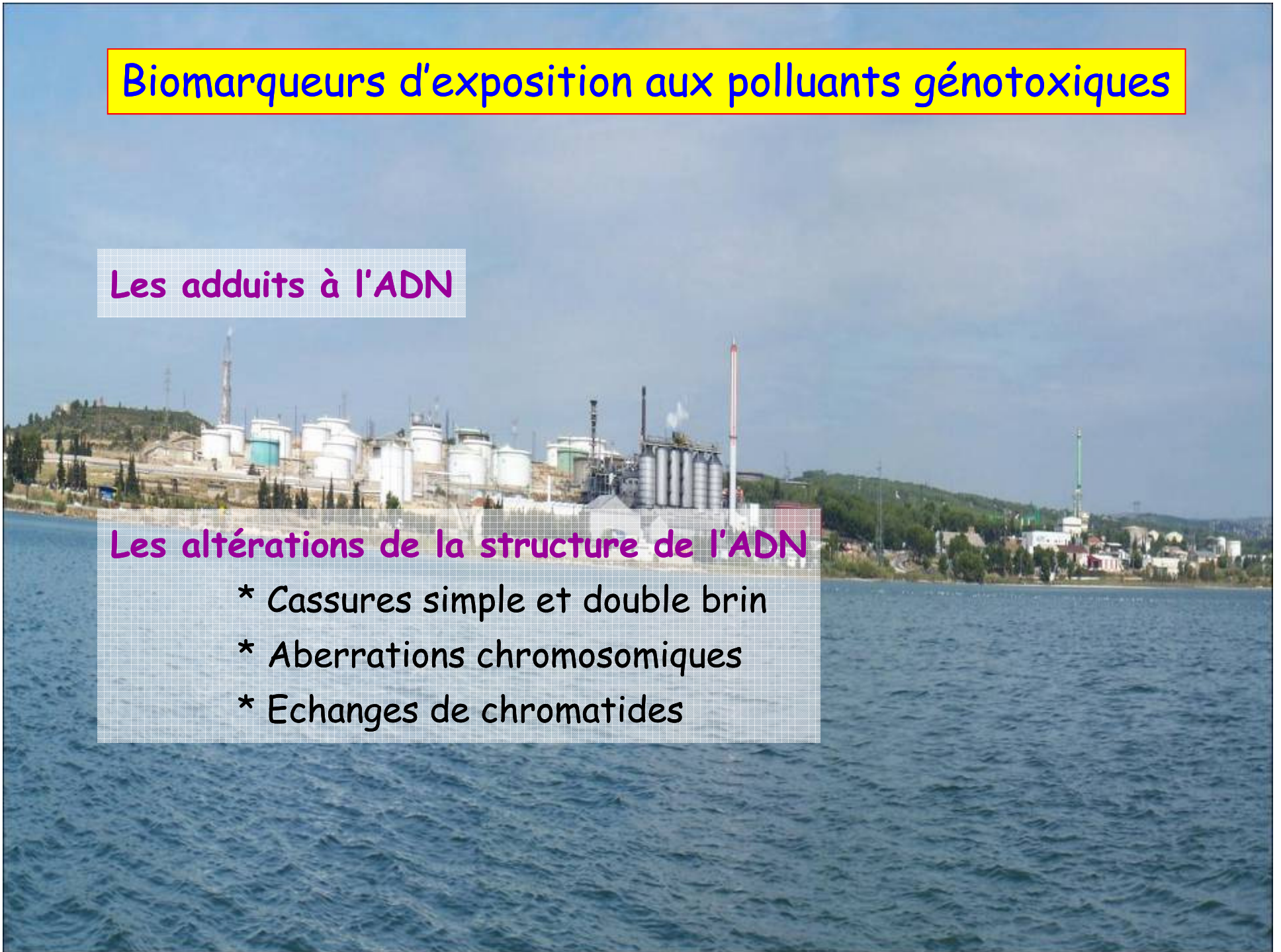
- * Enzymes multifonctionnelles cytosoliques impliquées dans le transport et la biosynthèse intracellulaire
- * Réalisent la **conjugaison** d'un métabolite d'un polluant avec l'**acide UDP-glucuronique** ou avec le **glutathion**

Biomarqueurs d'exposition aux polluants génotoxiques

Les adduits à l'ADN

Les altérations de la structure de l'ADN

- * Cassures simple et double brin
- * Aberrations chromosomiques
- * Echanges de chromatides





Biomarqueurs d'effets

- traduisent les conséquences physio-pathologiques de l'exposition à un polluant

- Protéines de choc thermique (hsp)
- Enzymes et « endpoints » du stress oxydant
Superoxyde dismutase, Catalase, Glutathion peroxydase, peroxydation lipidique,...

Distinction non absolue entre biomarqueurs d'**exposition** et d'**effet** :

- degré d'inhibition de l'ACHé = mesure du niveau de perturbation du syst. nerveux

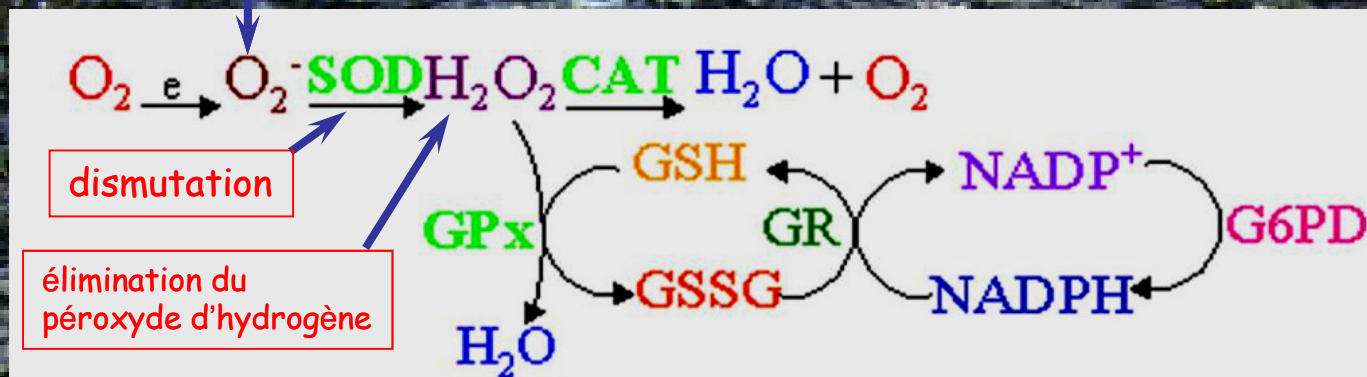
Biomarqueurs d'effets

Protéines de choc thermique (hsp) :

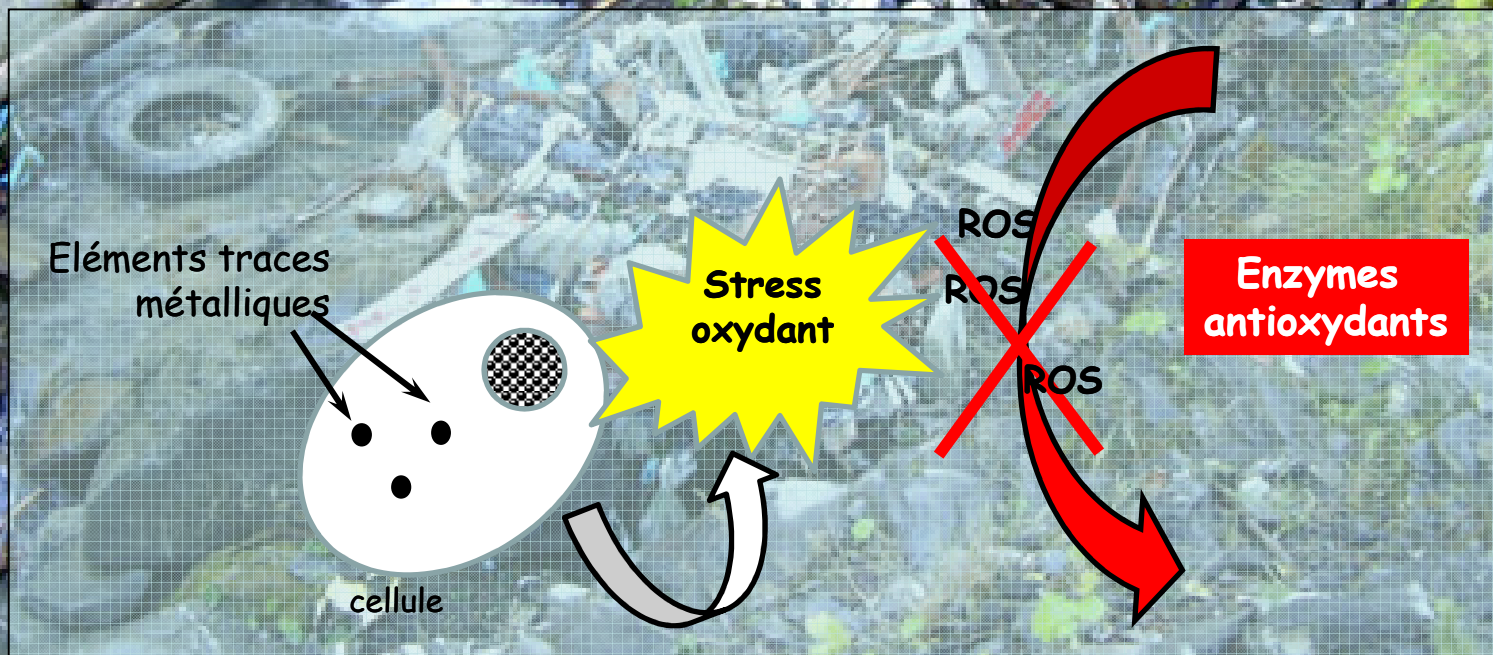
- * Protéines **chaperones** (cytoplasme, mitochondrie, noyau)
- * Ubiquistes, conservées (bactéries jusqu'à l'Homme)
- * **Constitutives** : conformation des protéines, trafic cellulaire (mitochondrie)
- * **Inductibles** par des nombreux « stress » :
 - Température,
 - Métaux (cadmium, plomb, cuivre, arséniate de sodium, mercure, argent),
 - Pesticides (diazinon, paraquat)
 - Organochlorés

Biomarqueurs d'effets

Anion superoxyde



Enzymes et « endpoints » du stress oxydant





Biomarqueurs d'effets

Variations fonction des tissus et des molécules de contaminant

Activité enzymatique de la SOD

HAPs : inhibition au niveau biliaire et hépatique / augmentation musculaire
PCBs : inhibition au niveau musculaire

Catalase

HAPs : inhibition au niveau biliaire / augmentation hépatique et musculaire
PCBs : augmentation au niveau musculaire

Glutathion peroxydase

HAPs : inhibition au niveau hépatique / augmentation musculaire
PCBs : augmentation au niveau musculaire et hépatique



Biomarqueurs de sensibilité aux effets

Permettent de mettre en évidence les variations
d'origine génétique de la réponse
(liées au polymorphisme génétique des individus d'une même
population ou communauté)

Augmentation du taux de glutathion-S-transférases ou des monooxygénases

Diminution moindre de l'activité AChE vis-à-vis des OPs

⇒ **Résistance**

Limites de l'utilisation des biomarqueurs

Le biomarqueur n'a une signification écotoxicologique **QUE** lorsqu'il permet la description, l'explication voire la prédiction des effets de polluants (sur les populations)

Après identification du biomarqueur : calibration (effet dose-réponse, variations saisonnières, niveaux de base...)

Précocité (= principe des biomarqueurs)

⇒ Quel(s) biomarqueur(s) choisir au niveau individuel pour prédire les effets sur les populations et les communautés



Limites de l'utilisation des biomarqueurs

Nécessité de mettre en place une **approche multiparamétrique**

↳ **Association de biomarqueurs où la réponse (rapide) traduit :**

l'exposition des individus

les effets au niveau de l'individu

les effets potentiels au niveau des populations et des communautés



Pour utilisation des biomarqueurs *in situ* et en routine

↳ **Nécessité de trouver des sites/organismes de référence (témoins)**

PERSPECTIVES de l'utilisation des biomarqueurs

Apport de la Toxicogénomique

(application de la génomique à la toxicologie environnementale)

Identification des changements des profils d'expression en ARNm en réponse à des conditions expérimentales

↳ Puce à ADN, banques soustractives avec la PCR Temps-Réel

- Quantification de la «sur-» ou «sous-» expression de gènes en réponse à une perturbation environnementale.

PERSEPECTIVES de l'utilisation des biomarqueurs

Biomarqueurs à découvrir...

Cui et coll. (2007) & Owen (2008) :
analyses bioinformatiques (du type Gene Ontology) sur des **banques de données génétiques (vers de terre)**,

↳ **expression différentielle d'un groupe de 8100 gènes après exposition métallique :**
29% liés à un processus physiologique
38% liés une fonction moléculaire.



**Environ 60 à 70% de gènes où modification de l'expression (fonction inconnue):
gènes candidats au titre de biomarqueur métallique.**

Merci de votre attention





Exemple chez le **poisson**, biomarqueurs utilisés pour évaluer l'état de santé et le statut toxicologique dans des réseaux de surveillance de l'environnement.

Biomarqueur	Description	Contaminants détectés
Activité EROD	Enzyme de biotransformation induite par les hydrocarbures planaires	PCBs, HAPs et dioxines
Acétylcholinestérase (AChE)	Enzyme impliquée dans la transmission nerveuse	OPs, carbamates
Métallothionéines (MT)	Piégeur de métaux, protection contre le stress oxydant	Métaux lourds et inducteurs de stress oxydant
Amino-levulinic acid deshydratase (ALAD)	Enzyme impliquée dans le métabolisme des acides aminés	Plomb majoritairement
Stabilité des lysosomes	Rôle dans les lésions du foie	Marqueur général de santé
Domages à l'ADN	Altération de la structure de l'ADN	Composés génotoxiques
Agrégation des macrophages	1ère ligne de défense du système immunitaire	Contaminants multiples