

ETUDE MÉTHODOLOGIQUE SUR L'APPLICATION DES MARQUEURS  
MOLÉCULAIRES PRÉCOCES À LA SURVEILLANCE  
ÉCOTOXICOLOGIQUE DES COURS D'EAU

FENET H., CASELLAS C.

Responsable scientifique : J. BONTOUX

DÉPARTEMENT SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT ET SANTÉ PUBLIQUE  
UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER 1  
FACULTÉ DE PHARMACIE  
Av. Charles Flahault - 34060 MONTPELLIER

• MARS 19%

# Table des matières

<b>Introduction</b> .....	<b>3</b>
<b>1ère PARTIE</b> .....	<b>11</b>
<b>Etude bibliographique sur les marqueurs moléculaires précoces en médecine humaine</b> .....	<b>11</b>
1-1- INTRODUCTION .....	12
1-2- DÉFINITIONS .....	13
1-3- CLASSIFICATIONS.....	13
1-4- HIÉRARCHISATION DES DIFFÉRENTES CLASSES DE BIOMARQUEURS DE L'EXPOSITION À LA MALADIE .....	15
1-5- LES DIFFÉRENTS BIOMARQUEURS .....	18
1-5-1- Dosage de la substance ou de ses <b>métabolites</b> "Internal Dose Marker" .....	18
1-5-1-1- Tests sélectifs.....	18
1-5-1-2- Tests non <b>sélectifs</b> d'exposition globale .....	20
1-5-2- Marqueurs de dose biologique effective "Biologically Effective Dose Marker" .....	22
1-5-2-1- Les adduits.....	22
1-5-2-2- <b>Métallothionéine</b> urinaire.....	26
1-5-3- Marqueurs de réponse biologique "Biological Response Marker" .....	26
2-5-3-1- Modifications <b>cytogénétiques</b> dans les cellules humaines.....	26
1-5-3-2- La synthèse non programmée <b>d'ADN</b> (UDS).....	30
1-5-3-3- Activation d'oncogènes (Brandt-rauf , 1991).....	31
1-5-3-4 Effets biochimiques de l'exposition au plomb .....	32
1-5-3-5- Inhibition de <b>l'acétylcholinesterase</b> .....	33
1-5-4- Marqueurs de pathologie " <b>disease</b> marker" .....	34
1-5-5- Facteurs de susceptibilité.....	34
1-6- INTÉRÊTS DES BIOMARQUEURS .....	36
1-7- APPLICATIONS EN ÉPIDÉMIOLOGIE .....	37

<b>2ème PARTIE</b> .....	<b>42</b>
<b>Applications de biomarqueurs à la surveillance écotoxicologique de cours d'eau</b> .....	<b>42</b>
2- 1- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....	43
2-1-1- Modèle utilisé : “Caging” de l’anguille.....	43
2- 1- 1- 1- L’anguille européenne : <b>Anguilla anguilla</b> .....	<b>43</b>
2-1-2-2- La technique du caging.....	<b>46</b>
2- 1-2- Les marqueurs biologiques.....	47
2-1-2-1- <b>Activité EROD</b> .....	47
2-1-2-2- <b>Activité GST</b> .....	49
La <b>présence</b> de polluants comme les <b>métaux</b> peut <b>interférer</b> avec la mesure de la GST. Certains métaux comme le cadmium pourrait inhiber l' <b>activité GST</b> (Georges et al., <b>1985</b> )... <b>49</b>	
2-1-2-3- <b>Métallothionéines et métaux</b> .....	50
2-1-2-4- <b>Activité acétylcholinestérasique AChE</b> .....	54
2-2- MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	56
2-2-1- Les poissons.....	56
2-2-2- Les cages .....	56
2-2-3- Les sites <b>d'études in situ</b> .....	<b>57</b>
3-2-3-1- Premier site d'études <b>Mèze</b> .....	<b>57</b>
2-2-3-2- Canal de la Robine (Aude) et Aude .....	57
2-2-4- Les campagnes terrains .....	<b>59</b>
2-2-5- Induction en laboratoire.....	59
2-2-6- Les échantillons biologiques.....	60
2-2-7- Etudes <b>de</b> l'influence de la congélation.....	60
2-2-8- <b>Préparation</b> des microsomes et du cytosol <b>hépatiques</b> .....	61
2-2-9- Analyses biochimiques .....	61
2-2-9-1- EROD .....	61
2-2-9-2- GST.....	61
2-2-9-3- Métaux .....	<b>61</b>
2-2-9-4- AChE.....	62
2-2- 10- Analyses des résultats .....	<b>62</b>
2-3- RÉSULTATS .....	63
2-3-1- Induction en laboratoire.....	<b>63</b>
2-3-2- influence de la <b>congélation</b> .....	64
2-3-2-1- Congélation du foie .....	64
2-3-2-2- Congélation du cerveaux.....	65
2-3-3- Essais <b>terrains</b> -.....	<b>65</b>
2-3-3-1- Site de <b>Mèze</b> - Avril 1994-.....	<b>65</b>
2-3-3-2- Site de la Robine et de l'Aude- Juin 1994.....	66
2-3-3-2- Site de la Robine et de l'Aude- Janvier 1995 .....	71
2-4- DISCUSSION.....	73
<b>Conclusion</b> .....	<b>80</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>87</b>

## Convention d'étude N° 9399010

### Etude méthodologique sur l'application des marqueurs moléculaires précoces à la surveillance écotoxicologique des cours d'eau.

Les travaux **exposés** dans ce rapport sont en partie financés par le Contrat-Plan-Etat-Région-Languedoc-Roussillon : "***Les marqueurs moléculaires précoces. Application à la surveillance écotoxicologique des étangs littoraux***".

Cette étude a été **réalisée** en collaboration avec le laboratoire de Toxicologie marine de la Faculté de Médecine de Nice, Docteur M. Lafaurie, M. Roméo et M. Gnassia-Barelli.

¶

Les cours d'eau retenus pour cette étude ont été choisis après concertation avec la DIREN Languedoc-Roussillon.

Cette étude a été **réalisée** avec la participation de **Nunez-Delgado A.** (post-doctorant, Santiago de Compostela) et de Bonnet M., Joulia J.M., Schmitt D. (étudiants en D.E.A au Département Sciences de l'**Environnement** et Santé Publique de le **Faculté** de Pharmacie de Montpellier).

## RESUME :

La principale **difficulté rencontrée** dans les **études** d'épidémiologie environnementale se situe au niveau de l'impossibilité qu'il y a le plus souvent, de quantifier la dose effective de contaminant qu'a absorbé chaque individu objet de **l'étude**. Pour **remédier à** cet état de fait, il est proposé, depuis quelques **années**, de faire appel **à** la mesure de marqueurs biologiques, **démarche** qui déplace l'évaluation de la dose d'exposition du milieu extérieur **à** l'individu vers l'organisme de l'individu lui-même.

Dans le cadre de l'étude d'un écosystème, l'évolution de l'écotoxicologie vers des indicateurs moléculaires ouvre une approche nouvelle sur **l'évaluation** des effets des toxiques sur le milieu. L'utilisation de marqueurs moléculaires permet de mesurer l'exposition **à différents** polluants ou leur effet sur la santé des organismes vivants. Cette approche donne des informations intégrées sur la santé de **l'écosystème**.

Le programme proposé répond **à** deux objectifs :

- Etayer, par une recherche bibliographique, l'intérêt et les limites de la détermination des marqueurs moléculaires précoces en tant que signaux "d'impact santé humaine".
- Etudier sur le plan méthodologique les possibilités pratiques de mise en œuvre **à** moyen terme d'une biosurveillance des cours d'eau basée sur les marqueurs moléculaires précoces .

**MOTS CLES** : Toxicologie humaine, écotoxicologie, marqueurs **moléculaires**, cours d'eau, santé d'un écosystème, **santé** humaine.

Le risque écologique résulte de l'exposition de populations, de **communautés** ou d'écosystèmes à des stress chimiques, physiques ou biologiques agissant individuellement ou par combinaison sur des échelles spatiales et temporelles différentes qui incluent divers types d'écosystèmes. Vu la complexité du sujet abordé et pour avoir une **méthodologie** de base pour l'évaluation du risque, l'Agence pour la Protection de l'**Environnement** des États Unis développe des lignes directrices pour la conduite de l'évaluation du risque **écologique**. Cette méthodologie est issue de l'approche de l'évaluation du risque pour la santé de l'homme et passe par les étapes suivantes :

- Formulation du problème.
- Analyse et caractérisation de l'exposition et de l'effet sur l'écosystème.
- Caractérisation du risque : limites des données et incertitudes.

La figure 1 développe le contenu de ces trois étapes.

La différence fondamentale qui existe entre l'approche pour la santé de l'homme et l'évaluation écologique est la définition de l'échelon à protéger. L'organisme humain est fortement organisé et hautement homéostatique, dans les écosystèmes, il existe une grande diversité d'espèces possédant de nombreux mécanismes de rétrocontrôle positifs et négatifs et des niveaux relativement faibles **d'homéostasie**. Il n'existe pas de mesure simple universelle de la santé écologique qui soit analogue aux mesures utilisées dans l'évaluation du risque pour la santé humaine. La sélection de la valeur environnementale qui doit être protégée a été étudiée pour l'homme mais reste une notion beaucoup plus difficile à appréhender au niveau d'un écosystème. Chaque étude peut avoir une finalité différente ("endpoint **assessment**") alors que les études pour la santé de l'homme **bénéficient** d'une connaissance des priorités en santé publique qui permettent une bien meilleure **caractérisation** de cette finalité (EPA, 1992).

La **matrice** tridimensionnelle (figure 2) permet de situer les variables retenues pour une étude dans l'ensemble des données intervenant dans l'évaluation du risque écologique, de définir l'écosystème à risque, d'effectuer une détermination des caractéristiques écologiques et du type de stress, de son mode d'action et de ses réponses au niveau des différents échelons de l'organisation de l'écosystème **à risque** (individu, population, communauté et Ccosystème).

Scientific Issues in Ecological Risk Assessment

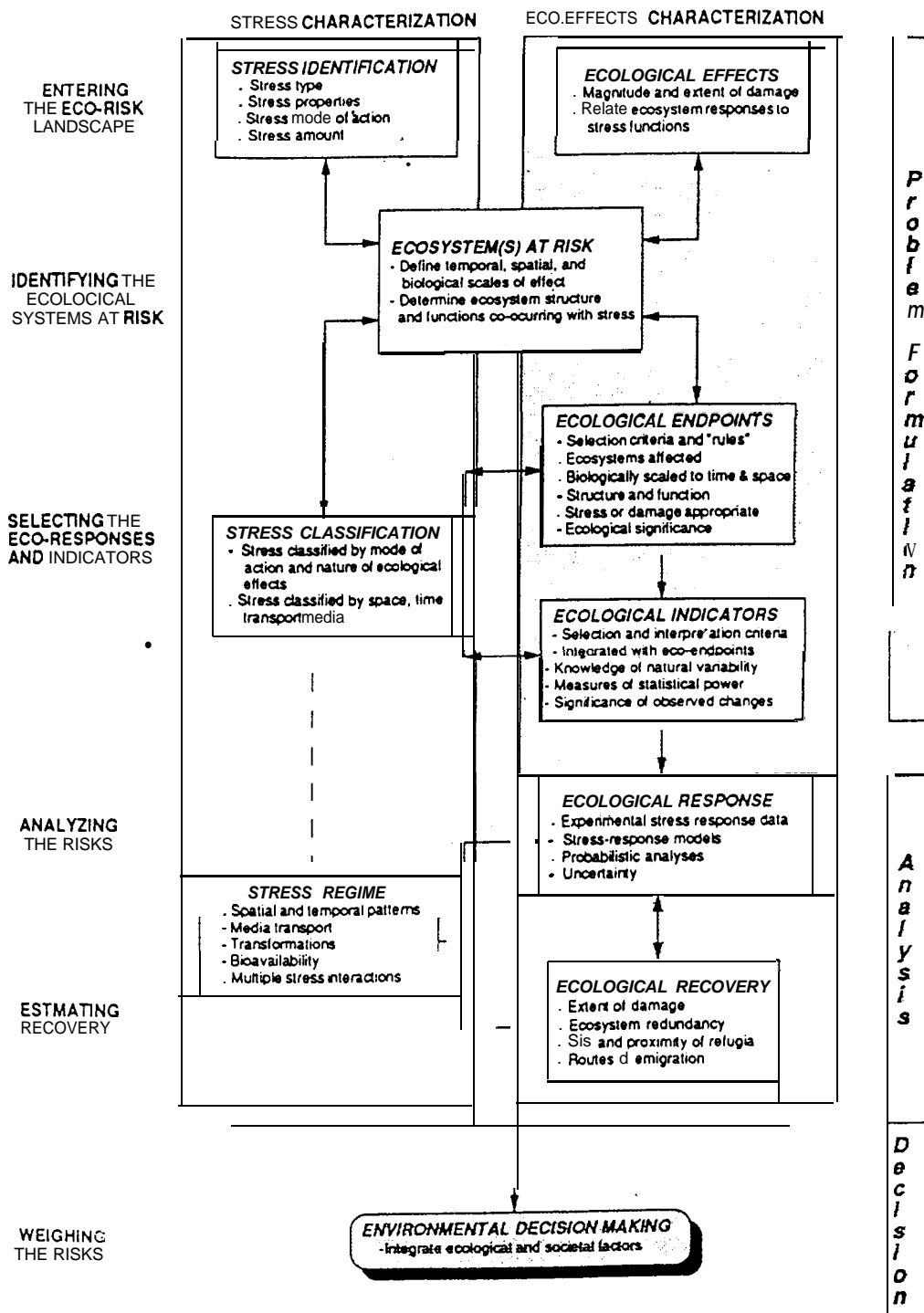


Figure 1 : Les questions scientifiques dans l'évaluation du risque écologique. (d'après Report on Ecological Risk Assessment, EPA, 1992).

Three-Dimensional Matrix of Ecological Risk Organizing Principles

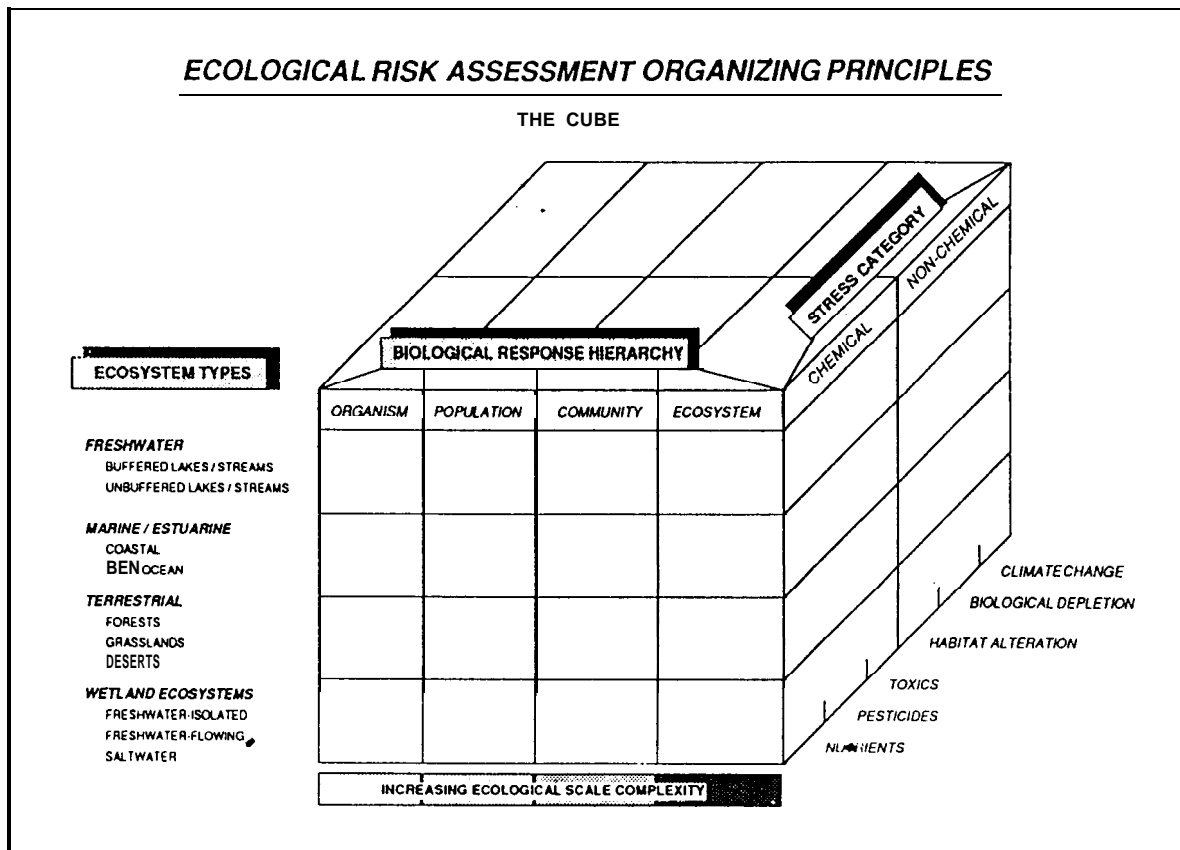


Figure 2 : Matrice tridimensionnelle des principes d'organisation de l'évaluation du risque écologique. (d'après Report on Ecological Risk Assessment, EPA, 1992).

4

Au niveau d'un écosystème, les rejets toxiques qui contaminent le milieu aquatique provoquent des perturbations qui ne sont pas toujours facilement identifiables et/ou mesurables. La surveillance basée exclusivement sur la mesure de la concentration des polluants peut conclure à tort qu'il n'y a pas de problème parce qu'il n'y a pas de dépassement des critères pour les paramètres mesurés alors qu'en fait l'écosystème peut être affecté par un polluant non mesuré. Également, cette approche ne tient pas compte des effets inhibiteurs, additifs et synergiques des différents polluants et donc de leur effet à long terme sur la santé de l'écosystème. De plus dans les cours d'eau, les sources de pollution peuvent être ponctuelles et donc facilement identifiables (rejets d'industries) ou bien diffuses et fonction des intempéries (activités agricoles).



Pour qu'une pollution cause des effets nocifs à un Ccosystème, il faut d'abord qu'une des populations qui compose cet écosystème ait été affectée. Auparavant, il faut que les individus qui la composent soient touchés, donc que le polluant ait **altéré** son comportement ou un de ses organes. L'action des polluants dans le milieu naturel commence aux niveaux **inférieurs** de l'organisation (cellules, tissus) pour se répercuter ensuite aux niveaux supérieurs : individu, population et écosystème.

On trouve toujours à la base une interaction entre la ou les **molécules** de polluant et les réactions biochimiques au sein de l'organisme et à mesure que les mécanismes de protection de l'individu diminuent l'action du toxique évolue d'un niveau d'organisation du vivant **à** un autre (Holgate, 1979 cité par Sheehan et al. 1984).

Sans nécessairement affecter le comportement des individus exposés, certains polluants peuvent s'accumuler dans les cellules jusqu'à un certain seuil **au-delà** duquel l'organisme aura une réponse biochimique pour éliminer ou neutraliser le polluant. Le diagramme ci-après (Sheehan, 1984) résume les séquences et l'échelle temporelle d'action des polluants sur le vivant. Il montre ainsi que les marqueurs moléculaires sont des indicateurs précoces de la perturbation de l'écosystème.

La détection d'une perturbation à un stade précoce permettrait une action plus rapide et moins coûteuse.

L'évolution de l'écotoxicologie vers des indicateurs moléculaires ouvre une approche nouvelle sur l'évaluation des effets des toxiques sur un écosystème. L'utilisation de biomarqueurs donne des informations utiles concernant l'exposition des individus au stress. Actuellement des travaux supplémentaires sont nécessaires pour la compréhension de l'implication des biomarqueurs d'effets toxiques au niveau de l'individu et de la population.

Plusieurs démarches sont possibles pour déterminer les marqueurs moléculaires précoces sur la faune ; elles dépendent d'abord des espèces faunistiques, voire floristiques, choisies comme capteurs de pollution toxique, elles dépendent ensuite du choix des marqueurs **évalués**.

**La faible** mobilité, associée à leurs capacités remarquables de concentration, a fait des mollusques **filtreurs** un support expérimental **d'intérêt** prioritaire, que ce soit en eau marine ou en eau douce. Ils sont l'objet d'études en cours.

Le compartiment poissons **représente** un autre niveau dans l'organisation d'un écosystème et qui a l'avantage d'être constitué par des vertébrés. Parce qu'ils sont une source potentielle de toxiques pour les humains et à cause de leur importance économique, les poissons ont fait l'objet de nombreuses études sur l'accumulation des toxiques. L'utilisation du poisson comme modèle de contamination est courant.

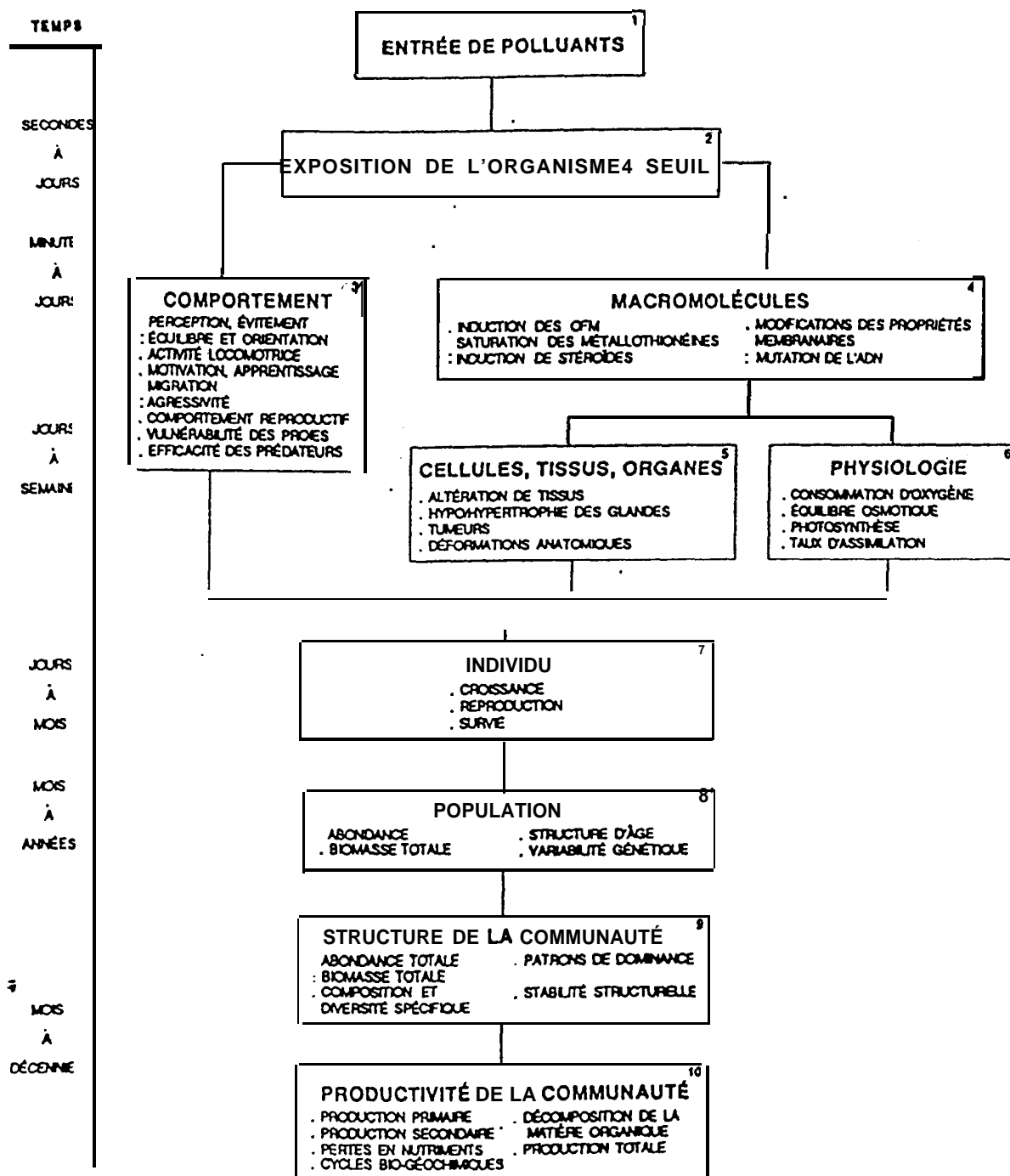


Figure 3 : Progression de l'effet des polluants sur le milieu  
(d'après Sheehan, 1984)