

**Université Blaise Pascal**  
**N°D.U. : 2282**

**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE,  
AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT**  
**N° d'ordre : 590**

# **Thèse**

**pour obtenir le grade de DOCTEUR D'UNIVERSITE**  
**Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire**  
**Présentée et soutenue publiquement par**

**VALTON Emeline**

**le 19 Octobre 2012**

**Développement de biomarqueur Sentinelle en réponse à la pollution  
aquatique à partir de l'expression de protéines de phénotype  
« Multidrug Resistance » dans les érythrocytes  
de la truite *Salmo trutta fario***

**Membres du jury :**

**Président :**

**M. AMBLARD Christian**, DR CNRS, LMGE, Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand)

**Rapporteurs :**

**M. MONTUELLE Bernard**, DR, INRA CARRTEL, Université de Savoie (Thonon les Bains)

**M. ROBIDOUX Pierre Yves**, Professeur, CNRC, (Montréal, Canada)

**Examineur :**

**M. GRES Pierre**, Chargé de mission, FDPPMA 42 (La Fouillouse)

**Directrice de thèse :**

**Mme BAMDAD Mahchid**, Professeur, ERTICa, Université d'Auvergne (Clermont-Ferrand)

LMGE, UMR-CNRS 6023  
Université Blaise Pascal  
24 Avenue des Landais, 63177 Aubière cedex



*A mes parents,  
Merci pour vos encouragements,  
Et pour votre soutien tout au long de ces années,  
Si j'en suis là c'est grâce à vous...  
Un énorme merci,  
A ma famille  
A tous les êtres qui me sont chers...*



*Je remercie sincèrement,*

*Monsieur Christian Amblard, directeur de l'UMR CNRS 6023 pour m'avoir accueilli et autorisé à réaliser ce travail au sein du laboratoire LMGE. Je lui présente également toute ma gratitude et reconnaissance pour la co-direction de ma thèse, pour sa disponibilité, son soutien et ses précieux conseils tout au long de ce travail.*

*Monsieur Téléphore Sime-Ngando, l'actuel directeur de l'UMR CNRS 6023 pour m'avoir autorisé de continuer ce travail au sein du laboratoire.*

*Messieurs Pierre-Yves Robidoux et Bernard Montuelle pour avoir aimablement accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que Monsieur Pierre Grès pour avoir accepté de juger ce travail.*

*Monsieur Guy Godet, Président de la Fédération Départementale pour le Pêche et la Protection du Milieu Aquatique du Puy-de-Dôme, et Monsieur François Desmolles, Chargé de Mission, pour m'avoir accueilli au sein de la Fédération pour la réalisation de ce travail.*

*Monsieur Jean-Marc Lavest, directeur de l'IUT, Monsieur Denis Ardid, Mesdames Christine Pizzocaro et Emmanuelle Mounetou, de m'avoir permis de terminer ma thèse en m'acceptant sur un poste d'ATER. Merci pour votre écoute, vos précieux conseils, vos soutiens et de m'avoir permis de finaliser ma thèse dans une ambiance chaleureuse.*

*Madame Frédérique Penault-Llorca, directrice de l'équipe ERTICa, pour son soutien et ses précieux conseils.*

*Madame Mahchid Bamdad, ma directrice de thèse, pour sa disponibilité, sa confiance, son écoute, son soutien et ses conseils, tout au long de ces années. Cette aventure, commencé par une discussion sur un trottoir de Montréal, n'aurait jamais vu le jour sans ta persévérance, ton courage, et ton aide... Cette aventure a connu des virages plus ou moins formidables, mais sache que je suis fière d'avoir parcouru ce chemin sinueux à tes côtés... Je te dirais tout simplement merci je n'ai pas assez de mots pour te signifier toute ma gratitude et mon respect...*

*Ces travaux de recherches ont pu être menés à bien grâce au soutien et l'accompagnement de Pascale Marion, Jean-Sébastien Guez et Isabelle Ouillon d'Auvergne Valorisation-Clermont Université et du CNRS, et au soutien financier du Conseil Régional d'Auvergne et des Fonds Européen de Développement Régional (FEDER) par une bourse de thèse Innovation dont j'ai bénéficié pendant trois ans et d'une aide financière FEDER pour la réalisation de ce projet. Je souhaite leur exprimer toutes mes reconnaissances et gratitude pour leur aide et soutien et surtout d'avoir cru à ce projet*



*Je tiens à remercier,*

*Tous les membres de l'équipe « Interactions hôtes-parasites » pour m'avoir fait une petite place parmi vous, ainsi que mes collègues du LMGE, pour leur accueil, leurs conseils, et leur gentillesse.*

*Un grand merci à Christine Pizzocaro et Emmanuelle Moutenou, de m'avoir fait découvrir le monde de l'enseignement dans la bonne humeur. Je garderais un très bon souvenir de mes séances de TP de Chimie à l'IUT...*

*Carole et Robin, qui ont fait de mon bureau un lieu de bonne humeur et de joies, ainsi que mes collègues de l'IUT de m'avoir fait une petite place parmi la grande famille de l'IUT.*

*François, Luc, Marc C., Marc M, Nouari et Jean-No, ainsi eu tout mes « petits retraités » de la Fédé, pour votre accueil, votre disponibilité et votre bonne humeur pendant les journées pêches. Sans vous, la partie terrain n'aurait pas été possible. Merci de m'avoir accepté dans ce clan si masculin de la pêche et de m'avoir tant appris...*

*Un grand merci à Laurianne, Micka, Ivan, Benoit, Flo, Fred, Lulu, Jean, Gérald, Marie-Paule, Agnès, Marlène, Aurélie, Philippe, Aline, Mathieu, Amélie et j'en oublie sûrement mais la liste serait trop longue... pour m'avoir supporté tout au long de ces années et de m'avoir permis d'avoir des moments de détente et de plaisirs, cette thèse n'aurait pas eu la même saveur sans vous...*

*Merci aux 500 truites d'avoir donnée votre vie à la science...*



## Sommaire

### Liste des Abréviations

### Glossaire

### Introduction Générale..... 1

### Chapitre I : Synthèse Bibliographique..... 5

### A. La pollution..... 6

I. Définition de la pollution.....	6
II. Origine des pollutions.....	6
II.1. La production des diverses sources d'énergies.....	6
II.1.a Le charbon.....	6
II.1.b Le pétrole.....	7
II.1.c L'énergie nucléaire.....	7
II.2. Les activités industrielles.....	8
II.2.a La métallurgie et les industries extractives afférentes.....	8
II.2.b L'industrie chimique.....	8
II.2.c Les nanoparticules.....	9
II.3. L'activité agricole.....	9
III. Classification des polluants.....	10
III.1. Les polluants de nature biologique.....	11
III.2. Les polluants de nature physique.....	11
III.2.a La radioactivité.....	11
III.2.b La pollution thermique.....	11
III.2.c Le colmatage par les matières en suspension.....	12
III.3. Les polluants de nature chimique.....	12
III.3.a Les substances minérales.....	12
III.3.b Les substances organiques.....	13
III.3.c Les substances métalliques.....	13
III.3.d Les hydrocarbures aromatiques polycycliques.....	13
IV. Circulation des polluants.....	15
IV.1. Passage des polluants dans l'atmosphère.....	16
IV.2. Transfert des polluants de l'atmosphère dans les sols et les eaux.....	16
V. Réglementation concernant la pollution des milieux aquatiques.....	17
VI. La pollution aquatique en région Auvergne.....	18
VI.1. Collecte des données physico-chimiques.....	19
VI.1.a Acteurs et organisation du réseau de surveillance.....	19
VI.1.b Programmes de gestion de l'eau.....	19
VI.1.c Cas particulier des pesticides : le réseau Phyt'eauvergne.....	20
VI.2. Collecte de données biologiques.....	21

### B. Les biomarqueurs..... 23

I. Définition d'un biomarqueur.....	24
II. Les différents types de biomarqueur.....	25
II.1. La classification selon Lagadic (1997).....	26
II.1.a Les biomarqueurs d'exposition.....	26
II.1.b Les biomarqueurs d'effets.....	26
II.1.c Les biomarqueurs de sensibilité ou de susceptibilité.....	26
II.2. La classification de De Lafontaine (2000).....	27
II.2.a Les biomarqueurs de défense.....	27
II.2.b Les biomarqueurs de dommages.....	27
II.3. Les critères d'évaluation d'un biomarqueur et leurs limites d'application.....	28



II.3.a	Les critères d'évaluation d'un biomarqueur .....	28
II.3.b	Les limites d'application des biomarqueurs.....	28
III.	Les biomarqueurs utilisés en milieu aquatique .....	29
III.1.	L'éthoxyrésorufine- <i>O</i> -dééthylase (EROD) .....	29
III.2.	Les métallothionéines.....	30
III.3.	L'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE).....	31
<b>C.</b>	<b>Les Salmonidés, une famille sentinelle de l'environnement.....</b>	<b>33</b>
I.	Etude des communautés piscicoles.....	33
II.	Etude des réponses des individus .....	34
III.	Etudes des réactions physiologiques et cellulaires des individus.....	35
<b>D.</b>	<b>Le modèle retenu : la Truite <i>Salmo trutta fario</i> .....</b>	<b>36</b>
I.	Anatomie de la truite <i>Salmo trutta fario</i> .....	36
I.1.	Anatomie générale de la truite fario.....	36
I.2.	Anatomie et physiologie de la truite.....	37
II.	Répartition géographique de la truite fario .....	38
III.	Description de l'habitat de la truite fario .....	38
III.1.	Les caractéristiques physiques de la rivière .....	39
III.1.a	Le courant de la rivière.....	39
III.1.b	La morphologie du lit.....	39
III.1.c	La granulométrie des fonds.....	40
III.1.d	La lumière .....	40
III.1.e	La température .....	41
III.2.	Les caractéristiques chimiques de la rivière.....	41
III.2.a	L'oxygène dissous .....	41
III.2.b	Les autres paramètres chimiques .....	41
III.3.	La végétation des berges .....	42
IV.	Le cycle de vie de la truite fario .....	42
IV.1.	La ponte hivernale.....	43
IV.2.	L'incubation.....	43
IV.3.	La résorption de la vésicule vitelline.....	43
IV.4.	L'émergence .....	43
IV.5.	La croissance.....	43
IV.6.	La maturité sexuelle .....	44
V.	Mœurs et comportement.....	44
<b>E.</b>	<b>Les transporteurs de type « ATP-binding cassette proteins » (ABC) : .....</b>	<b>45</b>
I.	Les protéines « Multidrug Resistance ».....	45
I.1.	La P-gp.....	46
I.1.a	Généralités .....	46
I.1.b	Structure.....	48
I.1.c	Fonctions.....	48
I.2.	La BCRP .....	49
I.2.a	Généralités .....	49
I.2.b	Structure.....	50
I.2.c	Fonction.....	50
II.	Notion de « chimio-immunité ».....	51
II.1.	« Chimio-immunité » et métabolisme des toxiques.....	51
II.2.	« Chimio-immunité » innée.....	52
II.3.	« Chimio-immunité » adaptative, mémoire et hypersensibilité .....	52
<b>F.</b>	<b>Les protéines MDR : un biomarqueur potentiel pour l'environnement .....</b>	<b>54</b>
	<b>Résultats Expérimentaux .....</b>	<b>57</b>
	<b>Chapitre II : Mise au point du biomarqueur Sentinelle et sa validation en milieu naturel .</b>	<b>58</b>



<b>A. Aquatic sentinel biomarker development based on co-expression of Multidrug Resistance proteins in brown trout erythrocytes .....</b>	<b>62</b>
I. Introduction .....	63
II. Materials and methods.....	65
II.1. Fish and red blood cells sampling .....	65
II.2. Ethics.....	66
II.3. Development of primary erythrocyte culture .....	66
II.4. Cell counting in primary erythrocyte culture.....	66
II.5. BaP cell culture exposure .....	66
II.6. MDR proteins expression by Western blot analysis.....	66
II.7. Flow cytometry analysis of BaP uptake .....	67
II.8. Statistical analysis .....	68
III. Results .....	68
III.1. Development of primary culture of brown trout erythrocytes .....	68
III.2. ABCG2-like protein and P-gp co-expression in erythrocytes of brown trout in primary culture .....	68
III.3. BaP effect on trout red blood cells .....	69
III.4. MDR pump activity of trout erythrocytes .....	69
III.5. Co-expression of ABCG2-like protein and P-gp in trout erythrocytes in the presence of benzo[a]pyrene .....	70
III.6. ABCG2-like protein and P-gp co-expression in wild brown trout erythrocytes living in different rivers.....	71
IV. Discussion .....	72
<b>B. Test du biomarqueur « Sentinelle » sur des truites fario provenant de différentes rivières du département du Puy-de-Dôme (Auvergne, France).....</b>	<b>80</b>
I. Introduction – Présentation de l'étude.....	80
II. Matériel et Méthodes .....	82
II.1. Les « indices poissons » utilisés.....	82
II.1.a L'Indice Poisson Rivière .....	82
II.1.b L'Indice de population de Truite .....	83
II.2. Etude de l'expression des protéines MDR par la technique du Western-Blot .....	84
II.3. Analyse statistique .....	84
II.4. Sites d'étude .....	84
II.4.a La Couze Chaudefour - Couze Chambon.....	85
II.4.b La Couze Pavin.....	85
II.4.c La Dore .....	85
II.4.d Le ruisseau de Grandrif.....	85
III. Résultats et Discussion.....	86
III.1. Réponse du biomarqueur Sentinelle chez des truites fario prélevées sur deux sites présentant un niveau de pollution contrastée.....	86
III.2. Réponse du biomarqueur Sentinelle chez des truites fario provenant de l'amont et de l'aval d'un site contaminé .....	88
III.2.a Station « Poyet » située sur la Dore.....	88
III.2.b Site en amont et en aval de la station d'épuration de "Chadernolle" .....	89
III.3. Réponse du biomarqueur Sentinelle chez des truites prélevées sur différentes zones d'une même rivière.....	90
III.3.a Station « Plaine du Gelat » (station la plus en amont) .....	91
III.3.b Station « Lomprat».....	91
III.3.c Station « Chidrac» .....	91
III.3.d Station « Issoire» (la plus en aval) .....	92
IV. Conclusion.....	93
<b>Chapitre III : Variabilité interspécifique et saisonnière du biomarqueur Sentinelle et son efficacité en pisciculture.....</b>	<b>94</b>



<b>ABCG2-like-protein and P-gp coexpression levels in erythrocytes from farmed fish: a potential sentinel water pollution biomarker .....</b>	<b>97</b>
I. Introduction .....	98
II. Materials and methods.....	100
II.1. Fish model.....	100
II.2. Ethics.....	100
II.3. Anesthesia and blood samples.....	100
II.4. MDR expression studies by Western Blot Analysis.....	100
II.5. Statistical analysis .....	101
III. Results .....	101
III.1. ABCG2-like protein and P-gp coexpression level in the erythrocytes of brown trout, rainbow trout and Arctic char from “La Villetour” fish farm .....	101
III.2. ABCG2-like and P-gp coexpression levels in erythrocytes from brown trout raised in the fish farm “Le Moulin de Pagnat” during different seasons.....	102
III.3. Comparison of ABCG2-like and P-gp erythrocytes coexpression level in brown trout from “Le Moulin de Pagnat” and “La Villetour” fish farms.....	103
IV. Discussion .....	103
<b>Discussion générale et Perspectives .....</b>	<b>109</b>
<b>A. Rappel du contexte et des objectifs de l’étude .....</b>	<b>110</b>
<b>B. Mise en évidence de l’expression des protéines MDR dans les érythrocytes de truite</b>	<b>114</b>
<b>C. Mise au point de la culture <i>in vitro</i> des globules rouges.....</b>	<b>115</b>
<b>D. Modalités d’expression des protéines MDR en présence d’un polluant .....</b>	<b>116</b>
<b>E. Test du biomarqueur « Sentinelle » en milieu naturel .....</b>	<b>118</b>
I. Etude de la réponse du biomarqueur « Sentinelle » au niveau de deux rivières de qualité différente .....	118
II. Etude du biomarqueur « Sentinelle » à l’amont et à l’aval de sites contaminés.....	120
III. Etude de la réponse du biomarqueur le long du gradient amont/aval d’une rivière ...	121
<b>F. Variabilité interspécifique et saisonnière de l’expression des protéines MDR .....</b>	<b>122</b>
<b>G. Test du biomarqueur « Sentinelle » en pisciculture .....</b>	<b>123</b>
<b>H. Intérêts et limites du biomarqueur « Sentinelle » proposé.....</b>	<b>124</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>129</b>



## Liste des Abréviations

ABC : « ATP-Binding-Cassette »

ATP : Adénosine-5'-TriPhosphate

DCE : Directive Cadre sur l'Eau

DREAL : Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement

FDPPMA : Fédération Départementale pour la Pêche et la Protection des Milieux Aquatiques

HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique

IPR : Indice Poisson Rivière

IPT : Indice de Population Truite

kDa : kiloDalton

LEMA : Loi sur l'Eau et les Milieux Aquatiques

MDR : « Multidrug Resistance »

NBD : Domaine de Liaison au Nucléotide

ONEMA : Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques

P-gp : « Permeability-glycoprotein »

SAGE : Schéma d'Aménagement et de Gestion des Eaux

SDAGE : Schéma Directeur d'Aménagement et de Gestion des Eaux

TMD : Domaine TransMembranaire



## Glossaire

0+: poisson né dans l'année

1+: poisson ayant passé un hiver dans le cours d'eau

2+: poisson ayant passé deux hivers dans le cours d'eau

Abiotique : se dit d'un facteur écologique indépendant des êtres vivants. Ex : salinité, température, climat...

Biotique: se dit d'un facteur écologique lié aux êtres vivants. Ex : ressources alimentaires, parasitisme...

Degré/jour: unité permettant d'estimer la durée d'un développement, notamment l'incubation des œufs de poissons, d'insectes ou de vertébrés poïkilothermes, en tenant compte de la température. Cette unité est obtenue en multipliant le temps par la température moyenne au cours de ce nombre spécifique de jours. Exemple : 400 degrés/jour signifie une durée d'incubation de 40 jours dans une eau à 10°C, ou alors 80 jours dans 5°C.

Demi-vie : temps nécessaire pour qu'une substance (molécule, médicament, noyau radioactif, ou autres) perde la moitié de son activité pharmacologique, physiologique ou radioactive.

Dulçaquicole: qualifie un organisme qui vit et se reproduit en eaux douces.

Eaux côtière: eaux de surface situées entre la ligne de base servant pour la mesure de la largeur des eaux territoriales et une distance d'un mille marin.

Eaux territoriale: zone de mer adjacente sur laquelle s'exerce la souveraineté de l'Etat côtier au-delà de son territoire et de ses eaux intérieures (largeur maximale : 12 milles marins soit 22,2 km à partir de la ligne de base).

Eaux de transition (ou saumâtre): eaux de surface situées à proximité des embouchures de rivières ou de fleuves, qui sont partiellement salines en raison de leur proximité des eaux côtières mais qui restent fondamentalement influencées par des courants d'eau douce.

Macrostome: se dit d'un organisme ayant une grande bouche.

Mésologique: se dit d'un facteur écologique lié aux caractéristiques du milieu.

Morphe: différentes formes d'une espèce, dont les différences sont sous l'effet d'un polymorphisme non génétique.

Nanoparticule: élément ayant une taille nanométrique, entre 1 et 100 nanomètres.

Off shore : se dit des installations pétrolières installées au large des côtes.

Pipeline : conduite destinée à l'acheminement de matière, ici le pétrole.

Polluant Organique Persistant: substance qui ne se dégrade pas naturellement et qui peut donc s'accumuler dans les organismes vivants et être transportée sur de longues distances.

Rhéotactisme: réaction de locomotion orientée et obligatoire d'organismes mobiles. Elle est déclenchée et entretenue par un courant d'eau et s'effectue soit dans sa direction (rhéotaxie positive), soit dans la direction contraire (rhéotaxie négative).

Stérile minier: roche ou fraction du minerai ne contenant pas de minéraux exploitables.



# **Introduction Générale**



Depuis de nombreuses années, l'eau est menacée par des sources de pollution multiples. La dégradation de la qualité de l'eau engendre une perturbation globale de l'ensemble des écosystèmes. La protection de cette ressource est donc devenue un enjeu majeur et, de ce fait, de nombreuses normes et directives, aussi bien au niveau national qu'eupéen, ont été établies. Ainsi, la Directive Cadre sur l'Eau (DCE.2000/60/CE, 2000), établie par le parlement Européen, fixe l'objectif d'atteindre un « bon état chimique et écologiques des eaux superficielles et un bon état chimique et quantitatif des eaux souterraines » d'ici 2015.

Pour maintenir ou améliorer la qualité de la ressource en eau, il est nécessaire, dans un premier temps, d'améliorer les méthodologies d'évaluation de l'impact des polluants dans les milieux aquatiques par la mise en place de nouveaux outils de surveillance de la qualité des eaux. A l'heure actuelle, l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques s'effectue, soit par des analyses physico-chimiques, soit par des analyses de données biologiques. Les analyses physico-chimiques permettent d'obtenir des informations sur la nature et la concentration des polluants rencontrés dans les cours d'eau. Par contre, elles n'apportent pas d'information sur l'état de perturbation des organismes vivants dans ces milieux. C'est pourquoi, en complément des analyses physico-chimiques, des analyses des données biologiques sont également utilisées. Les quatre indices biologiques les plus couramment utilisés sont les suivants : (i) l'Indice Biologique Normal Globalisé (macro-invertébré (IBGN)), (ii) l'Indice Biologique Macrophytique en Rivière (IBMR), (iii) l'Indice Poisson Rivière (IPR) et l'Indice Biologique Diatomée (IBD). Ces indices permettent d'évaluer l'état biologique (structure et fonctionnement) des écosystèmes aquatiques.

Ils sont basés sur l'identification et le dénombrement de différentes communautés, pouvant être perturbées par une pollution donnée du cours d'eau. Cependant, l'identification et le dénombrement de ces communautés exigent des connaissances taxonomiques particulières, et ne sont donc réalisables que par des spécialistes du domaine. De plus, la réalisation de ces inventaires nécessite un temps considérable. En outre, chacun de ces indices est basé sur l'analyse d'une seule communauté biologique qui n'est pas obligatoirement représentative de l'ensemble des communautés présentes dans le milieu. Enfin, il existe un délai, plus ou moins long selon le groupe biologique considéré, entre l'apparition de la pollution dans le milieu et les changements de structure et de fonctionnement des communautés qui en résultent. Ce délai peut être une difficulté



supplémentaire pour mettre en œuvre, suffisamment tôt, les mesures de gestion adaptée qui s'imposent.

En conséquence et afin de compléter les indices biologiques disponibles, nous proposons de développer un outil biologique de détection de la pollution de l'eau, basé sur une réponse moléculaire directe et défensive d'un organisme intégrant des conditions des milieux aquatiques. En effet, nous avons orienté nos travaux sur le développement d'un biomarqueur précoce intitulé « Sentinelle » à partir de la coexpression de deux protéines « Multidrug Resistance » (MDR), la protéine ABCG2-like et la Permeability-glycoprotein (P-gp), dans les globules rouges de la truite *Salmo trutta fario*, en réponse à la pollution aquatique. Les protéines MDR sont des protéines de défense membranaire à l'échelle cellulaire, et elles reconnaissent de nombreux polluants de structure et de propriétés très variées. Par ailleurs, le milieu sanguin est le carrefour d'échanges entre les molécules physiologiques et les xénobiotiques. De ce fait, les cellules sanguines, et notamment les globules rouges nucléés des poissons, peuvent représenter un excellent modèle pour le développement d'un biomarqueur de susceptibilité. Enfin, la truite (*Salmo trutta fario*), de la famille des Salmonidés, est un organisme prédateur et intégrant de la qualité des milieux, qui se développe aussi bien dans les rivières naturelles qu'en élevage.

Le biomarqueur Sentinelle, développé au cours de ces travaux a pour vocation d'informer, de façon très précoce sur la qualité des milieux aquatiques. La validation de ce biomarqueur a été réalisée en laboratoire et sur le terrain.

L'objectif global poursuivi est d'obtenir un indicateur précoce et intégrant du niveau de pollution des écosystèmes aquatiques.

Ce biomarqueur pourrait être utilisé en complément de la palette d'outils disponibles actuellement pour estimer la qualité des milieux aquatiques. A cet effet, nos travaux ont fait l'objet d'un dépôt de brevet, et s'inscrivent dans le cadre d'un projet de création d'une entreprise de prestations de service en environnement. Cette entreprise proposerait d'analyser la qualité des cours d'eau, ou le niveau de pollution global, *via* l'utilisation du biomarqueur Sentinelle.



## Organisation générale du manuscrit :

La première partie de ce mémoire (**Chapitre I**) relate le contexte bibliographique dans lequel s'inscrit ce travail. Des informations sur les pollutions et, notamment, sur la pollution aquatique sont apportées avant d'aborder les principales caractéristiques et critères d'évaluation des biomarqueurs. Puis, le modèle biologique d'étude, la truite (*Salmo trutta fario*), ainsi que les fonctionnalités des protéines de phénotypes « MultiDrug Resistance » sont traités.

Les résultats que nous avons obtenus sont exposés sous forme de trois articles (deux soumis et un en cours de préparation).

Le **deuxième chapitre** est divisé en deux sous-parties. La première sous-partie concerne la mise au point du biomarqueur Sentinelle à partir des cultures *in vitro* d'érythrocytes de truite fario (conditions contrôlées) et sa validation dans trois rivières présentant, « potentiellement », des niveaux de pollution différents. La deuxième sous-partie aborde la validation du biomarqueur Sentinelle sur des truites fario sauvages prélevées dans différentes rivières du département du Puy-de-Dôme.

Enfin, dans le **troisième chapitre**, l'existence des variations interspécifiques au sein de la famille des Salmonidés, ainsi que la variabilité saisonnière, dans un environnement semi-contrôlé (les piscicultures), ont été recherchées. Enfin, la pertinence de l'utilisation du biomarqueur Sentinelle dans ces conditions d'élevages a été testée.

Ce mémoire se termine par une discussion générale qui concerne les principaux résultats obtenus et les perspectives qui s'en dégagent.



# **Chapitre I : Synthèse Bibliographique**

?



?

Les différents types de pollution et leur impact sur l'environnement

?

## **A. La pollution**

La pollution de l'environnement et son impact sur la santé représentent, à l'heure actuelle, un enjeu majeur en santé publique. En effet, de nombreux polluants, de propriétés et de structure très variées, sont à l'origine de la contamination de notre environnement (air, eau et sol), mais également des êtres vivants se trouvant dans ces milieux.

### **I. Définition de la pollution**

La pollution est « *une modification défavorable du milieu naturel qui apparaît en totalité ou en partie comme le sous-produit d'une action humaine, au travers d'effets directs et indirects, altérant les critères de répartition des flux d'énergie, des niveaux de radiation, de la constitution physico-chimique du milieu naturel et de l'abondance des espèces vivantes. Ces modifications peuvent affecter l'homme directement ou au travers des ressources en produits agricoles, en eau, et autres produits biologiques* » (Ramade, 2007).

### **II. Origine des pollutions**

La pollution peut être d'origine naturelle ou anthropique. Actuellement, on considère que les principales causes de pollution de l'environnement sont principalement liées à (i) la production des diverses sources d'énergies, (ii) les activités industrielles et (iii) les activités agricoles (Ramade, 2007) (Figure 1).

#### **II.1. La production des diverses sources d'énergies**

La production des diverses sources d'énergies représente l'une des causes majeures de la pollution de la biosphère. Les sources énergétiques sont principalement le charbon, le pétrole et le nucléaire.

##### *II.1.a Le charbon*

Le charbon génère, en l'absence de dispositif d'épuration, de nombreuses particules ainsi que des émissions gazeuses (tel que les oxydes d'azote et de soufre). De plus, la combustion du charbon engendre la production d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ainsi que diverses molécules toxiques.



### *II.1.b Le pétrole*

La deuxième source énergétique, qui engendre des perturbations de l'environnement, est le pétrole. L'utilisation de ce dernier, de son extraction jusqu'à son utilisation, peut provoquer la contamination de différents milieux. En effet, l'extraction et le transport des produits pétroliers à travers les océans et les eaux continentales, peuvent provoquer des marées noires, aussi bien au niveau des puits *off shores\** que lors des accidents de pétroliers ou la rupture de *pipeline\**. Ces marées noires et autres fuites de pétrole contaminent les eaux et les écosystèmes dulçaquicoles\* et terrestres, en particulier par des polluants organiques persistants\* tels que les hydrocarbures aromatiques. De plus, l'utilisation des produits pétroliers, comme les carburants, n'a cessé d'augmenter ces dernières années (Ramade, 2007). Cette utilisation intensive engendre une pollution atmosphérique par diverses particules et gaz libérés lors de la combustion des produits pétroliers (gaz carbonique, oxyde de carbone, de soufre, d'azote, hydrocarbures imbrulés, dérivés de plomb...).

D'autres sources énergétiques ont vu, également, leur utilisation augmentée, c'est le cas de l'énergie nucléaire.

### *II.1.c L'énergie nucléaire*

Le nucléaire représente en France une source non négligeable d'énergie. En effet 75 % de notre électricité est produite par les centrales nucléaires (World.Nuclear.Association). L'utilisation de ce type d'énergie suscite de nombreuses inquiétudes lors de son utilisation comme source d'énergie. En effet, la question d'une pollution généralisée et insidieuse, provoquée par les rejets d'effluents dilués radioactifs dans les airs et les eaux, est régulièrement soulevée. Ces derniers proviennent des réacteurs nucléaires mais aussi des usines de retraitement des combustibles irradiés, indispensables à leur stockage. De plus, les catastrophes de Tchernobyl en 1986 et, plus récemment, celle de Fukushima en 2011, ont montré les dimensions réelles des conséquences qui résulteraient d'une contamination radioactive produite par un accident impliquant une installation nucléaire civile (Cristaldi M et al., 1991; Katata et al., 2012).



## **II.2. Les activités industrielles**

Les activités industrielles mettent en circulation dans la biosphère d'innombrables composés minéraux ou organiques de toxicité souvent élevée, peu dégradables, voire indestructibles tels que les métaux lourds. Ces activités industrielles peuvent se regrouper en deux grands secteurs : la métallurgie et les industries extractives afférentes, et l'industrie chimique moderne. Un secteur en plein essor est également à l'origine d'une source de contamination, il s'agit des nanotechnologies.

### *II.2.a La métallurgie et les industries extractives afférentes*

Elles représentent l'une des premières causes majeures de la pollution de l'environnement, d'origine industrielle. Les pollutions liées aux activités métallurgiques n'ont cessé d'augmenter depuis le début de l'ère industrielle. L'accroissement de la production de métaux non ferreux (Aluminium, Zinc, Plomb...) s'est accompagné d'une augmentation des quantités de polluants atmosphériques rejetés par ces industries à la fois sous forme particulaire mais également sous forme de gaz toxique, tel que le dioxyde de soufre. De plus les « stériles miniers\* » ont contribué à une dévastation des sols fertiles. En effet, ces « stériles » sont constitués par les restes des sols et roches, extraits une fois le minerai récupéré. Le lessivage de ces sols par les pluies provoque une pollution des eaux de surface par de nombreux métaux et métalloïdes toxiques encore présents dans ces « stériles ». De plus, les pluies engendrent des phénomènes de transformations biogéochimiques conduisant à une acidification des milieux par l'acide sulfurique (Ramade, 2007).

### *II.2.b L'industrie chimique*

L'industrie chimique moderne est à l'origine de nombreuses contaminations. Les industriels utilisent de plus en plus des composés, naturels ou non, tels que l'arsenic, le molybdène, le mercure, le nickel... L'utilisation de ces composés augmente leur concentration dans la biosphère et donc leur impact sur les différents milieux.

L'industrie chimique organique est également une source de pollution de l'environnement. Le nombre de composés artificiels synthétisés ne cesse en effet d'augmenter depuis de nombreuses années. En effet, à l'heure actuelle, seulement un tiers des substances chimiques commercialisées dans le monde a été évalué pour leur impact potentiel sur la santé humaine et leurs risques écotoxicologiques.



Outre les différents composés de synthèse, l'industrie est également productrice de nombreux autres agents polluants tels que les molécules dites « inertes » comme les matières plastiques. Ces matières, tels que le polychloréthylène ou les polyuréthanes, sont à la fois toxiques par la présence des monomères qui les constituent mais également par les traces de différents additifs qu'ils contiennent, comme les agents plastifiants, et les stabilisants dont la toxicité n'est pas toujours bien évaluée (Ramade, 2007).

### *II.2.c Les nanoparticules*

L'utilisation des nanoparticules\* par les industriels est en plein essor depuis plusieurs années. Elles entrent dans la composition de divers produits pour la santé (crème solaire et cosmétiques), l'industrie du bâtiment (enduits extérieurs, peintures et vernis d'ameublement), mais aussi comme catalyseurs de carburant. Les nanoparticules, malgré l'avancée technologique qu'elles représentent, sont des contaminants potentiels de tous les milieux, qu'elles soient utilisées seules ou en synergie avec d'autres composés (Quadros and Marr, 2010). Des études concernant des nanoparticules d'argent ont montré une toxicité sur l'embryon du poisson-zèbre, *Danio rerio*, mais aussi des effets génotoxiques et cytotoxiques sur des lignées cellulaires de poisson Médaka, *Oryzias latipes* (Bai et al., 2010; Wise et al., 2010).

### **II.3. L'activité agricole**

Une autre source importante de la pollution de notre environnement est liée à l'activité agricole. En effet, le développement de l'agriculture intensive depuis de nombreuses années a engendré une augmentation de la consommation d'engrais et de pesticides, dans le but d'augmenter les rendements agricoles. La hausse de l'utilisation de ces produits chimiques s'est accompagnée d'une pollution accrue des eaux continentales, des terres cultivées, mais aussi des productions animales et végétales, par les divers contaminants minéraux et organiques.

La consommation mondiale d'engrais chimiques est passée de 50 millions de tonnes en 1950 à 180 millions de tonnes en 2007 (Wikipédia.en.français). Cette utilisation de fertilisants a généré de nombreux abus engendrant une pollution des eaux de surface ainsi que des nappes phréatiques dans un grand nombre de pays. En effet, beaucoup de ces



fertilisants se retrouvent à des niveaux de concentrations bien plus importants que celles admises dans ces milieux.

Parallèlement à cette augmentation de la consommation en engrais, l'utilisation de pesticides s'est également accrue aux cours de ces dernières décennies (Ramade, 2007). Les pesticides (insecticides, fongicides, herbicides...) sont responsables d'une pollution croissante des nappes phréatiques. En France, plus de quatre cents pesticides sont homologués pour des usages agricoles, aussi bien pour les usages professionnels que particuliers. Les quantités de ces substances déversées dans l'environnement sont considérables. A titre d'exemple, le D.D.T. (Dichlorodiphényltrichloroéthane), insecticide utilisé pour lutter contre les moustiques transmettant le paludisme, le typhus, ainsi que d'autres insectes vecteurs de maladies, et également comme insecticide agricole, a été développé au début de la seconde guerre mondiale. Depuis son invention, trois millions de tonnes ont été déversés dans la biosphère. Cet insecticide fait parti des polluants organiques persistants et sa demi-vie\* est d'environ 20 ans. Bien qu'il fût interdit en Europe et aux Etats-Unis au cours des années 1970-1980, il subsiste toujours des quantités considérables de ce contaminant dans l'environnement. En 2006, presque trente ans après l'interdiction du DDT, l'Organisation Mondiale de la Santé a annoncé qu'il sera de nouveau utilisé comme l'un des trois principaux outils dans la lutte contre le paludisme. De ce fait, il a recommandé la pulvérisation des pièces dans les pays à transmission du paludisme constante et élevée (OMS, 2006). Trois ans après cette recommandation, l'OMS a retiré son approbation pour son utilisation dans la lutte antivectorielle, et vise à ce qu'il ne soit plus utilisé d'ici 2020 (Convention.Genève, 2009).

L'utilisation des polluants organiques persistants a des conséquences au moment de leur dispersion dans les différents milieux mais aussi tout au long de leur processus de dégradation qui peut prendre plusieurs années et engendrer des sous-produits qui sont quelques fois, plus toxiques que les molécules-mères.

### **III. Classification des polluants**

La classification des types de polluants peut se faire selon de nombreux critères. Mais la plus utilisée est celle qui regroupe les agents polluants selon leur nature. Il y a donc des polluants de nature biologique, de nature physique ou encore des polluants de nature chimique.



### **III.1. Les polluants de nature biologique**

Ce type de pollution est dû aux agents pathogènes, ou agents « vecteurs de maladies », généralement présents dans les déchets produits par des individus infectés et qui se retrouvent dans les eaux usées. Les eaux des villes contiennent généralement des bactéries, des virus, des protozoaires, des vers parasites, qui peuvent provoquer des maladies aussi bien chez l'homme que chez les animaux. Les maladies les plus fréquemment transmises par l'eau sont la typhoïde, le choléra, la dysenterie bactérienne, la poliomyélite et les hépatites virales. Ces problèmes de contamination sont retrouvés dans les pays du tiers-monde mais également dans une moindre mesure dans les pays industrialisés.

### **III.2. Les polluants de nature physique**

Ce type de polluants regroupe plus particulièrement les substances radioactives ainsi que la pollution thermique. Le colmatage par les matières en suspensions est également une source de pollution physique.

#### *III.2.a La radioactivité*

Des polluants radioactifs peuvent se retrouver dans les milieux aquatiques, mais également dans l'atmosphère et les sols. Concernant la pollution des cours d'eaux, ils proviennent généralement des déversements d'eaux de refroidissement des centrales nucléaires, des hôpitaux et des mines d'uranium. L'uranium et le thorium en sont des exemples. Ces polluants peuvent également venir d'isotopes naturels comme le radon. Ceux-ci sont très dangereux et peuvent prendre des milliers d'années avant de perdre leur caractère toxique pour l'environnement.

#### *III.2.b La pollution thermique*

Cette pollution se rencontre plus particulièrement à proximité des industries rejetant de l'eau chaude produite au cours des processus industriels ou refroidissant les installations. Le rejet d'une eau plus chaude que celle du milieu naturel peut engendrer des effets aussi bien biologiques, physiques que chimiques. En effet, l'augmentation de température va entraîner une perturbation du milieu aquatique, avec une diminution de la quantité en oxygène dissous de l'eau. Ceci va entraîner une perturbation du métabolisme des organismes et



microorganismes aquatiques comme par exemple une hyperventilation chez les poissons, donc un stress important.

La pollution thermique peut également être engendrée par les plans d'eau présents sur les cours d'eau des bassins versants.

### *III.2.c Le colmatage par les matières en suspension*

Les matières en suspension (MES) sont des matières fines minérales ou organiques insolubles visibles à l'œil nu, qui contribuent à la turbidité de l'eau. Elles sont à l'origine d'une dégradation de la qualité biologique des cours d'eau. En effet, les MES, par la production de sédiments, vont engendrer des colmatages des cours d'eau, ainsi que des branchies des poissons. De plus, elles peuvent transférer les substances polluantes associées aux particules et constituer une réserve de pollution potentielle dans les sédiments. Elles proviennent de rejets urbains, industriels et/ou agricoles ainsi que des phénomènes d'érosion des sols (liés notamment aux précipitations). Enfin, par leur effet obscurcissant, les MES diminuent la photosynthèse, et donc engendrent un manque d'oxygénation du cours d'eau.

## **III.3. Les polluants de nature chimique**

Les polluants de nature chimique regroupent les substances minérales, organiques et métalliques.

### *III.3.a Les substances minérales*

Ces substances, qui contiennent par exemple de l'azote et du phosphore, stimulent la croissance des végétaux et des algues mais lorsque ces minéraux sont en concentration trop importante, ils peuvent amplifier le phénomène d'eutrophisation entraînant une prolifération excessive des végétaux aquatiques et notamment des algues. Ces substances minérales proviennent des déjections animales et humaines, mais aussi des résidus végétaux, des dépôts atmosphériques et du lessivage d'engrais répandus sur les terrains agricoles et résidentiels.

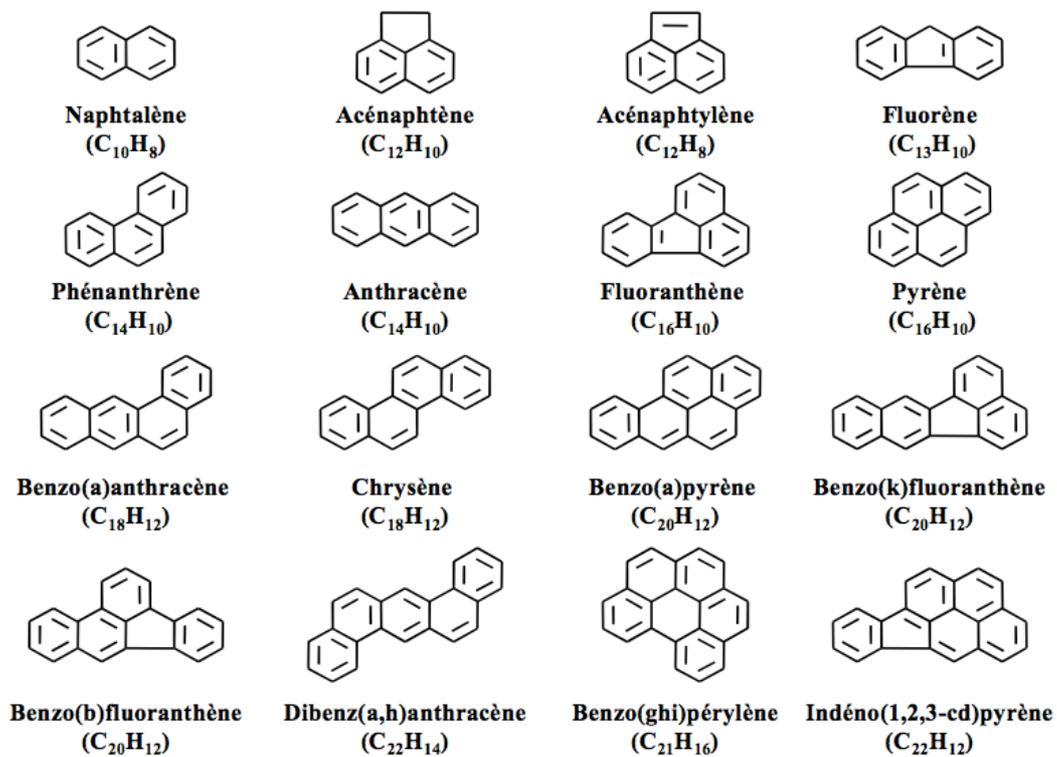


Figure 2 : Formulation chimique des seize Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques déclarés comme substances prioritaires, c'est-à-dire que leurs émissions et leurs rejets dans l'environnement doivent être réduites par l'Agence pour la Protection de l'Environnement américaine. (Gourlay, 2004)

### *III.3.b Les substances organiques*

Les matières organiques peuvent être d'origine naturelle, comme les sucres, les acides aminés et les acides gras, ou de synthèse, c'est-à-dire produites par l'homme. Ces dernières substances regroupent les pesticides, les solvants, et tous les produits chimiques industriels et les plastiques. Ces produits peuvent provenir du ruissellement des eaux de surface des zones agricoles, des décharges ou du rejet des déchets des industries dans les cours d'eau. Ces composés peuvent également s'infiltrer dans les eaux souterraines, comme c'est le cas pour les pesticides.

### *III.3.c Les substances métalliques*

Une autre classe de produits chimiques responsable de nombreuses pollutions des cours d'eau est celle regroupant tous les produits chimiques composés de métaux tels que les sels métalliques et les métaux lourds. Ces composés ne sont pas dégradés ou décomposés facilement. Généralement ces produits proviennent d'usines, de mines, de ruissellements de cultures irriguées, des forages de pétroles mais aussi des effluents des réseaux des eaux pluviales.

Les métaux lourds retrouvés le plus souvent dans la pollution des cours d'eau sont le mercure, le plomb, le cadmium, le chrome, l'étain et l'aluminium.

L'une des principales classes de substances chimiques responsables de la contamination de l'environnement est constituée par les hydrocarbures aromatiques (HAP). Dans le cadre de nos travaux, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à cette classe de polluants.

### *III.3.d Les hydrocarbures aromatiques polycycliques*

#### *i. Généralités*

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) constituent l'une des sources principales de la pollution des milieux atmosphérique, édaphique et aquatique. Ils sont constitués de composés hydrocarbonés comprenant au moins deux noyaux aromatiques condensés de façon linéaire, angulaire ou en grappe (Menzie et al., 1992). Plusieurs isomères peuvent exister sous différentes formes substituées (alkyl, nitro, hydroxyl, amino,...) (Figure 2). Compte tenu du nombre considérable de substitutions possibles, il est

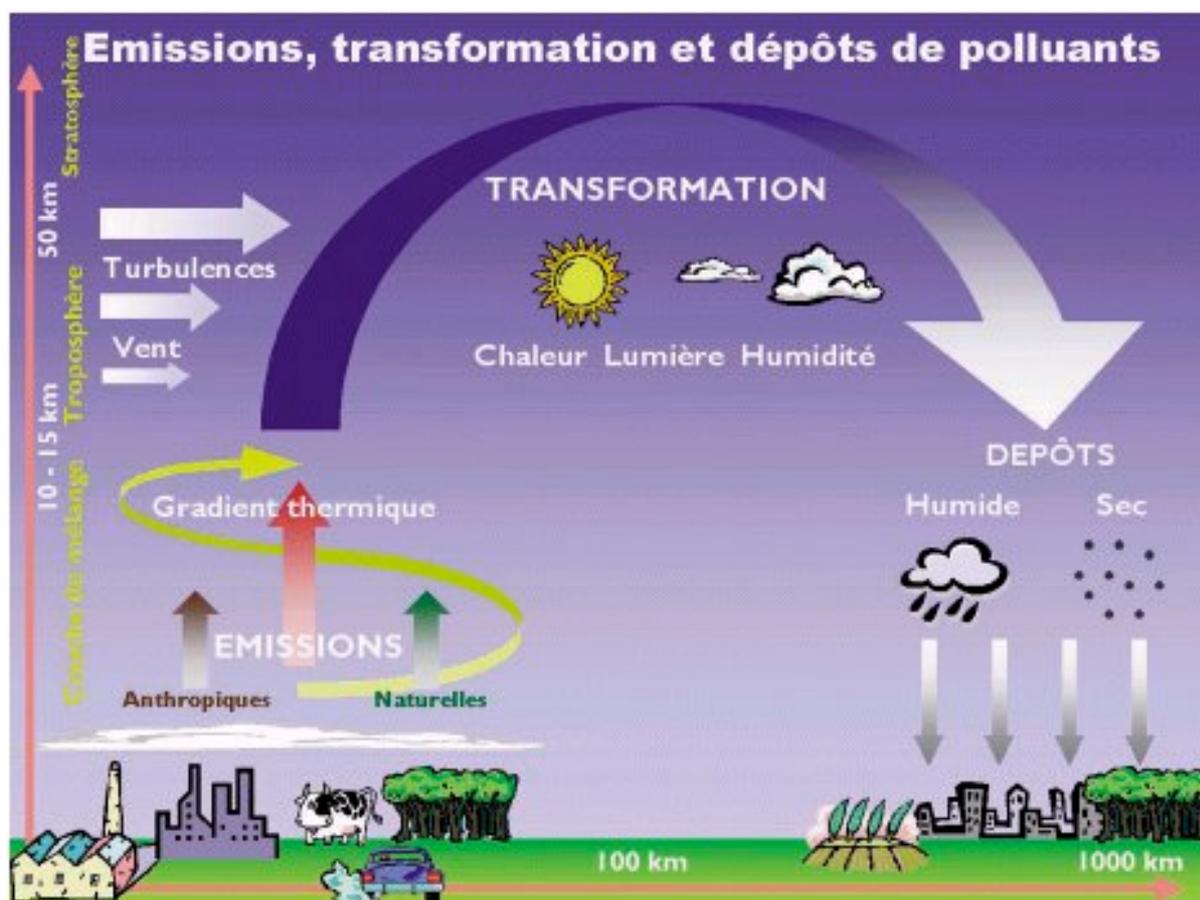


Figure 3 : Emission et circulation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques dans les différents milieux atmosphérique, édaphique et aquatique dans l'environnement.

très délicat de dénombrer tous les composés de cette famille. La figure 2 présente les seize HAP principalement étudiés et recherchés dans l'environnement car déclarés comme substances prioritaires par l'Agence pour la Protection de l'Environnement américaine (Keith and Teillard, 1979).

### *ii. Origine des HAP et présence dans les milieux aquatiques*

Les HAP ont diverses origines mais ils sont produits, principalement, à la suite de la combustion incomplète de la matière organique (bois, charbon, pétrole) à haute température qui aboutit à leur émission dans l'atmosphère. Par les mouvements atmosphériques, ces molécules et leurs dérivés sont souvent transportés très loin de leur lieu d'émission dans l'air. Suite aux processus de précipitation et de ruissellement, les HAP se retrouvent ensuite dans les milieux édaphique et aquatique (Figure 3) (McElroy et al., 1989; Neff, 1979). Ils représentent également une des sources de contamination importantes lors du déversement du pétrole dans l'environnement. Ils sont prédominants dans les zones urbaines.

De plus, en raison de leur propriété hydrophobe, les HAP se fixent préférentiellement sur les particules et se concentrent dans les sédiments (concentrations en HAP du  $\mu\text{g}/\text{kg}$  au  $\text{mg}/\text{kg}$ ).

De par leurs propriétés cytotoxiques, génotoxiques et cancérigènes, les HAP présentent un réel risque pour la santé (INERIS, 2006).

### *iii. Mécanisme de toxicité des HAP*

Par leur caractère lipophile, les HAP s'accumulent dans les organismes vivants, préférentiellement dans les tissus lipidiques. La plupart des organismes ont la capacité de les métaboliser par l'action d'un complexe enzymatique, appelé le complexe cytochrome P450. La remobilisation des HAP métabolisés permet leur excrétion de l'organisme mais également les rendent encore plus toxiques. Il s'agit d'une réaction de bioactivation. En effet, les HAP deviennent plus toxiques principalement lorsque les métabolites hydrophiles se fixent par des liaisons covalentes sur les structures cellulaires (protéines, ADN). La modification de l'ADN induit alors des effets mutagènes et cancérigènes. D'autre part, les HAP sont photodégradables, ce qui peut aussi induire une photo-toxicité. Ce mode d'activation engendre une augmentation de la toxicité des composés préalablement présents dans les organismes. La photo-toxicité correspond à la formation d'espèce radicalaire et d'oxygène activé par transfert d'énergie d'une molécule d'HAP excitée par les rayonnements UV vers

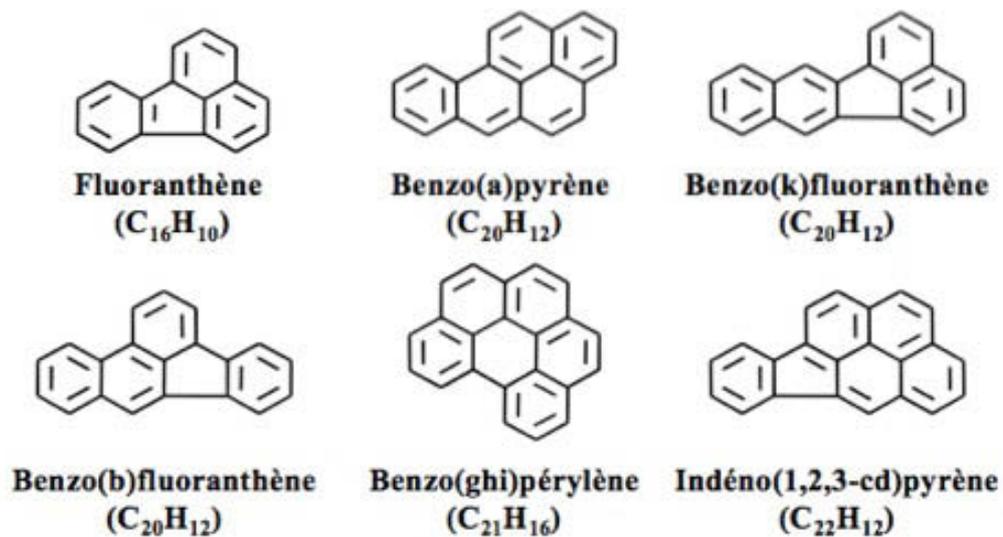


Figure 4 : Les six Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques recherchés dans les milieux aquatiques, dont leur concentration est prise en compte pour le classement de qualité des cours d'eau (Agence.de.l'eau, 2003).

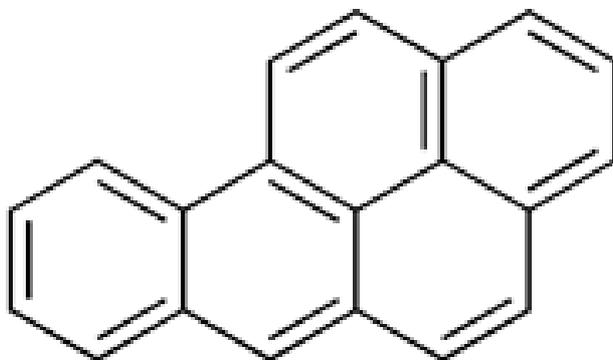


Figure 5 : Structure chimique du Benzo[a]pyrène, Hydrocarbure Aromatique Polycyclique modèle. Le B[a]P est composé de cinq cycles benzéniques et appartient à la famille des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques de formule brute  $C_{20}H_{12}$ .

un atome d'oxygène. Certains HAP sont plus particulièrement photo-toxiques que d'autres, c'est le cas du pyrène, du benzo[a]pyrène, du phénanthrène et de l'anthracène (Gourlay, 2004).

#### *iv. Normes concernant les HAP dans les milieux aquatiques*

En Europe, les seuils de concentrations en HAP dans l'eau potable sont de 100 ng/L pour l'ensemble de tous les HAP, et de 10 ng/L pour le benzo[a]pyrène (B[a]P), le HAP modèle, de propriétés cytotoxique, génotoxique et cancérigène. Par ailleurs, à titre d'exemple, l'Organisation Mondiale pour la Santé définit les limites pour l'eau potable à 5 µg/l pour le fluoranthène et de 0,7 µg/L pour le B[a]P.

Dans le cadre de la mise en place de la surveillance de la qualité des eaux, des normes pour les HAP ont été définies pour pouvoir déterminer l'état de contamination de l'eau. En France, seuls six HAP sont recherchés dans les milieux aquatiques : le fluoranthène, le benzo[a]pyrène, le benzo[k]fluoranthène, le benzo[b]fluoranthène, le benzo[g,h,i]pérylène et l'indéno[1,2,3-c,d]pyrène (Figure 4). Ainsi, les concentrations en HAP sont prises en compte, entre autres critères, pour le classement des cours d'eau selon la capacité des milieux à permettre l'équilibre biologique. Pour un classement en qualité moyenne, les teneurs en B[a]P dans l'eau ne doivent pas dépasser 80 ng/L. Pour un classement en très bonne qualité, les normes pour le B[a]P doivent être inférieures à 0,03 ng/l (Agences.de.l'eau, 2003).

Le benzo[a]pyrène (Figure 5), HAP modèle, est présent lors des combustions naturelles (éruptions volcaniques et feux de forêts) mais les principaux rejets dans l'environnement sont dus à l'activité humaine, telle que l'utilisation du charbon et du kérosène ainsi que la fumée de cigarette. De plus, par sa structure lipophile composée de cinq noyaux benzéniques, le B[a]P pénètre aisément la membrane cellulaire des organismes, engendrant ainsi des perturbations au niveau des organismes.

#### **IV. Circulation des polluants**

La présence des polluants dans l'environnement est un phénomène complexe qui ne se limite pas au voisinage des points de rejet. En effet, les circulations atmosphérique et hydrologique vont engendrer une dispersion progressive des polluants dans tous les écosystèmes.



#### **IV.1. Passage des polluants dans l'atmosphère**

La circulation atmosphérique joue un rôle fondamental dans la répartition des agents polluants. Tout composé, qu'il soit minéral ou organique, mais aussi liquide, gazeux ou solide, peut théoriquement passer dans l'air. Pour les composés gazeux, ce passage s'effectue directement. Alors que pour les composés liquides, ce passage s'effectuera sous forme d'aérosol, par évaporation et sous forme de fines particules pour les composés solides. De nombreux composés polluants introduits par l'homme sont déjà présents en quantité infime dans l'atmosphère, c'est le cas, par exemple, de l'oxyde d'azote ou du mercure. D'autres substances polluantes ne doivent leur présence dans l'atmosphère qu'à leur utilisation par l'homme, c'est le cas pour les pesticides ou les substances organiques de synthèse.

La contamination du milieu atmosphérique par les différents polluants s'effectue sous l'influence des paramètres météorologiques, tels que la pression, la turbulence atmosphérique, le vent, et la température. Les polluants se dispersent généralement assez facilement quand les turbulences atmosphériques sont assez fortes (période de basses pressions). Ce sont plutôt les périodes anticycloniques (hautes pressions) qui entraînent les épisodes de pollutions. Plus le vent est important, plus la dispersion de la pollution s'étend sur une surface importante. La température agit sur la chimie et sur les émissions des polluants. En effet, le froid diminue la volatilité de certains gaz et augmente les rejets automobiles et des bâtiments, tandis que la chaleur estivale entraîne la formation photochimique de l'ozone et l'évaporation des composés organiques volatils.

#### **IV.2. Transfert des polluants de l'atmosphère dans les sols et les eaux**

Après un temps de séjour dépendant essentiellement de l'altitude et des propriétés physico-chimiques des polluants, ceux-ci vont retourner à la surface de la biosphère. Deux processus sont à l'origine de ce transfert vers les sols ou les eaux. Il s'agit, soit des dépôts secs, soit des dépôts humides.

Les dépôts secs, comme leur nom l'indique, s'effectuent en l'absence de toutes précipitations et va donc ramener à la surface les particules solides et les polluants qu'elles renferment.



Les dépôts humides s'effectuent grâce aux précipitations : pluies, neige, grêle et brouillard. Ce type de transfert est le plus efficace et concerne également les polluants gazeux.

Dans le cadre de nos travaux, nous nous intéresserons plus spécifiquement à la pollution des milieux aquatiques.

## **V. Réglementation concernant la pollution des milieux aquatiques**

Toutes les formes de pollution sont soumises à réglementation. En effet, afin de protéger notre environnement, différentes normes et directives ont été établies, aussi bien niveau national qu'au niveau européen. Les normes de qualité environnementale concernent la présence dans les eaux de surface de substances ou de groupes de substances identifiés comme pouvant avoir un impact sur l'environnement aquatique et les organismes vivant dans ces milieux. Les normes de qualité environnementale sont basées sur des limites de concentration de xénobiotiques, c'est-à-dire que la concentration de ces substances ne doit pas dépasser un certain seuil dans l'eau.

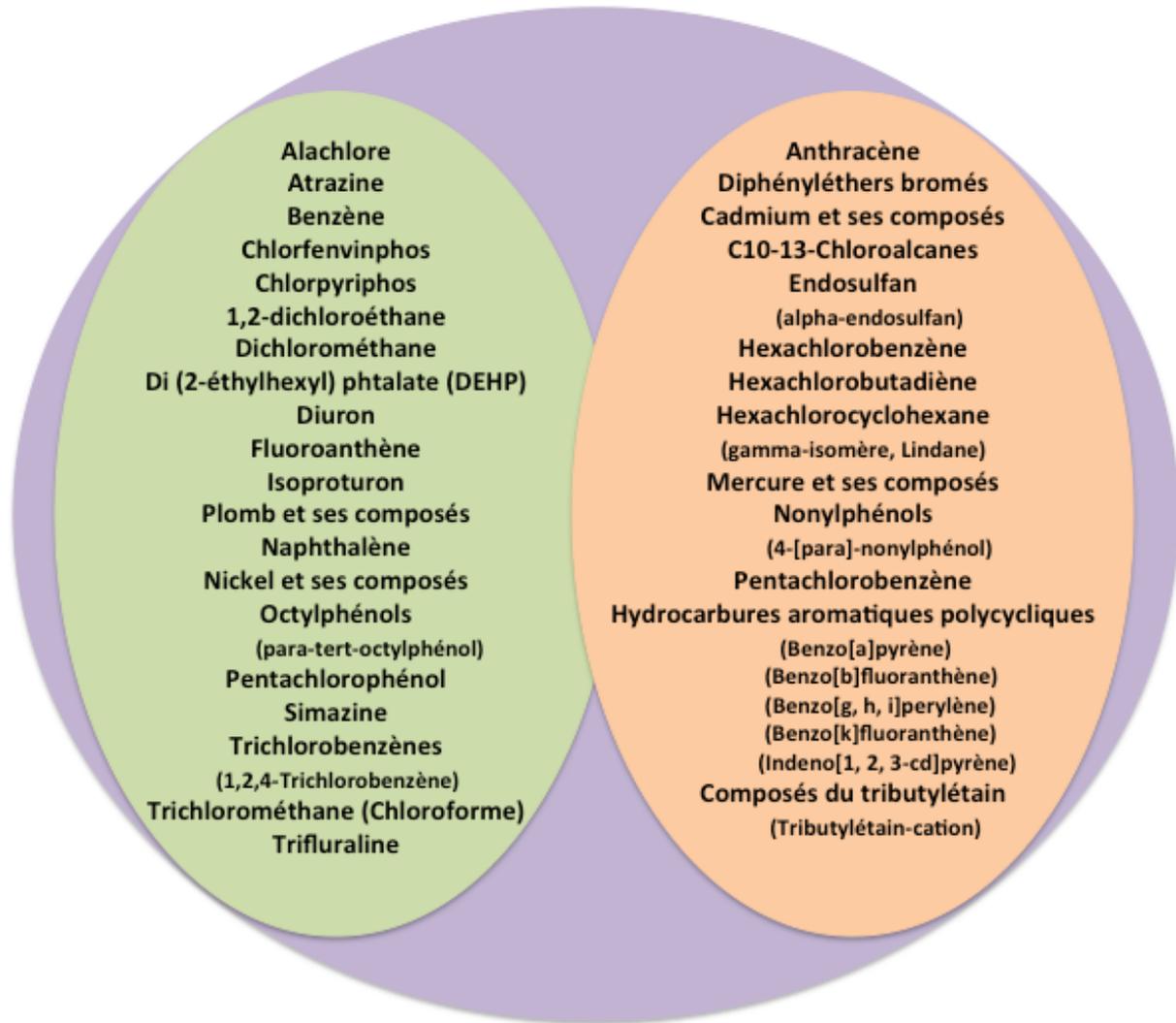
Il existe deux types de normes proposées.

La première fixe une valeur ou une concentration moyenne de la substance calculée sur une période d'un an. Ce type de norme permet de garantir la qualité du milieu aquatique, à long terme. La deuxième fixe la concentration maximale admissible d'une substance donnée et mesurée de manière ponctuelle. Cette seconde norme permet de limiter les pics de pollution à court terme (Directive.2008/105/CE, 2008).

Selon le milieu aquatique que l'on considère, les normes sont différentes. En effet, pour une même substance polluante, une norme particulière pourra être fixée pour les eaux de surface intérieures (les rivières et les lacs) et une autre, pour les autres eaux de surfaces, tels que les eaux de transition\* (saumâtre), les eaux côtières\* et territoriales\*.

En 2000, le parlement européen a adopté une directive sur la pollution de l'eau applicable dans les différents états membres de l'union. Cette directive, nommée Directive Cadre sur l'Eau (DCE.2000/60/CE, 2000), fixe l'objectif d'atteindre un « bon état » chimique et écologique des eaux superficielles (intérieures, côtières et de transition) et un bon état chimique et quantitatif des eaux souterraines à l'horizon 2015.

Un « bon état » des eaux se définit comme une eau permettant une vie animale et



Les OZ de df de EE de : s es f s de g de s f n de s de g de  
A raj j j yOj y. E j j P  
p y de d de y b y l y y é pl b q msy sé py é su pl l q b d y Qui p p  
è Rh v è μ μ ( T μ 1 μ μ 6  
p y de d de B y RO y b y l y y é pl b q msy sé py é su pl l q y bi i q m y é b  
q b d y h μ p è μ Rh v è μ μ ( T μ 1 μ μ 6

végétale riche et variée, exempte de produits toxiques et disponible en quantité suffisante pour tous les usages. La DCE vise également un arrêt de la détérioration des eaux, ainsi que la suppression ou la diminution des rejets des substances polluantes, dont trente-trois sont classées prioritaires (Figure 6).

Ces substances sont des composés appartenant à différentes familles telles que les métaux, les dérivés du pétrole, les pesticides, les solvants et les détergents ou encore différentes substances provenant de l'industrie. Elles sont présentes à l'état de traces (de l'ordre du microgramme ou même du nanogramme par litre) dans l'environnement. Il faut noter que parmi ces 33 substances, l'émission de 13 d'entre elles devra être supprimées d'ici 2015 ou réduites de 50%, et l'émission de 20 autres devrait être réduite de 30% (Figure 6). Cette directive est fondée sur une démarche de planification et de programmation de la gestion de l'eau par bassin versant. Cette directive européenne a été mise en droit français par la promulgation de la Loi sur l'Eau et les Milieux Aquatiques (LEMA) du 30 décembre 2006 (LEMA, 2006). De plus cette même année, le parlement européen a adopté le règlement REACH, (« Registration, Evaluation and Autorisation of CHemicals », soit « enRegistrement, Evaluation et Autorisation des produits CHimiques »). Ce règlement impose, entre autres, d'évaluer les risques toxicologiques et écotoxicologiques liés à l'utilisation et à la présence dans l'environnement des substances chimiques nouvelles et existantes, produites ou importées en quantité supérieure à une tonne par (REACH, 2006).

La mise en œuvre de telles réglementations au sein de la communauté européenne mobilise depuis plusieurs années la communauté scientifique afin de rechercher de nouveaux outils de surveillance de la qualité des écosystèmes ainsi que l'amélioration des méthodes d'évaluation des polluants dans les milieux aquatiques.

## **VI. La pollution aquatique en région Auvergne**

En Auvergne, le suivi de la qualité des cours d'eaux est effectué grâce à la collecte des données physico-chimiques et à la collecte des données biologiques sur les différentes rivières de la région. Celles-ci permettent d'estimer l'état général de contamination de ces milieux.



## **VI.1. Collecte des données physico-chimiques.**

### *VI.1.a Acteurs et organisation du réseau de surveillance*

En Auvergne, les organismes prenant en charge la surveillance des cours d'eaux sont (i) l'agences de l'eau Loire-Bretagne et Adour-Garonne, (ii) l'Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA), (iii) la Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement (DREAL.Auvergne) et (iv) les collectivités territoriales. Ces organismes ont pour mission le suivi de l'évolution de la qualité des cours d'eaux et l'évaluation de l'impact des rejets liés aux activités humaines, c'est-à-dire les rejets de stations d'épuration, mais aussi les rejets des activités industrielles.

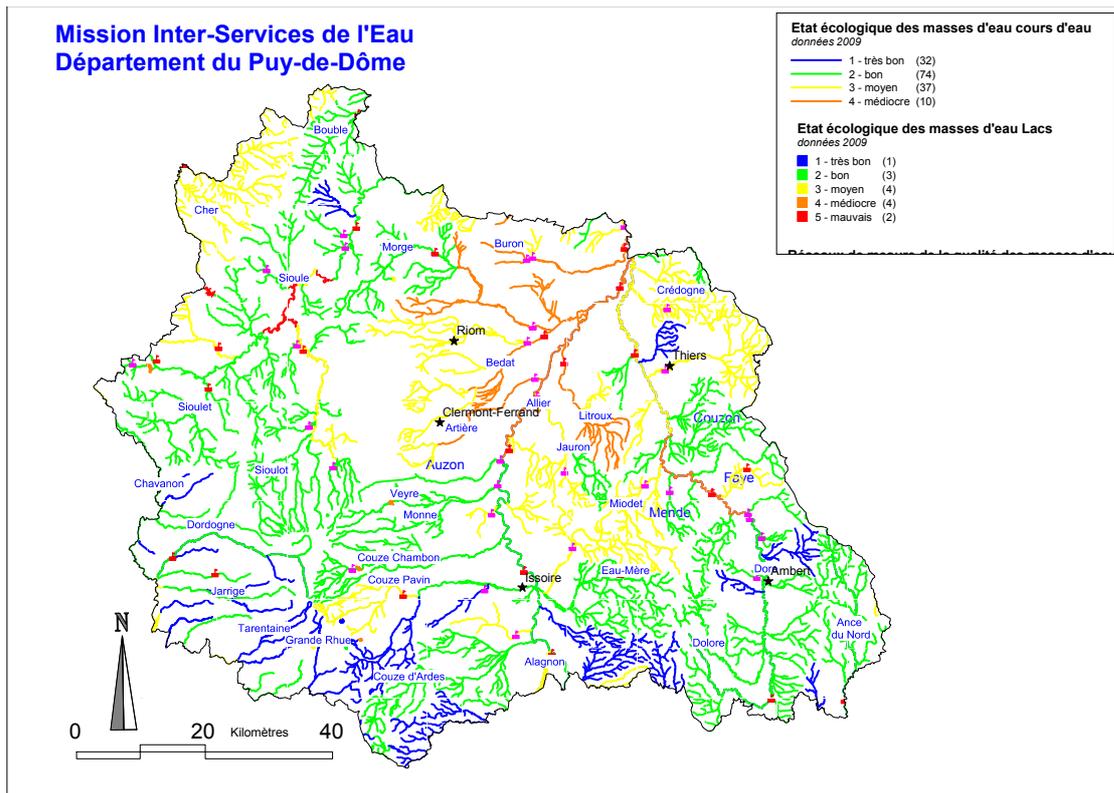
L'ensemble de ces organismes rassemble un réseau comprenant un peu plus de 150 stations de mesures. Ces organismes, en particulier la DREAL, ont également mis en place un programme de surveillance basé sur deux réseaux de contrôle.

Le premier réseau intitulé réseau de contrôle de surveillance (RCS) permet une estimation de l'état général des cours d'eaux d'Auvergne. Il a été mis en place en 2007 et concerne 74 stations de mesures dans la région.

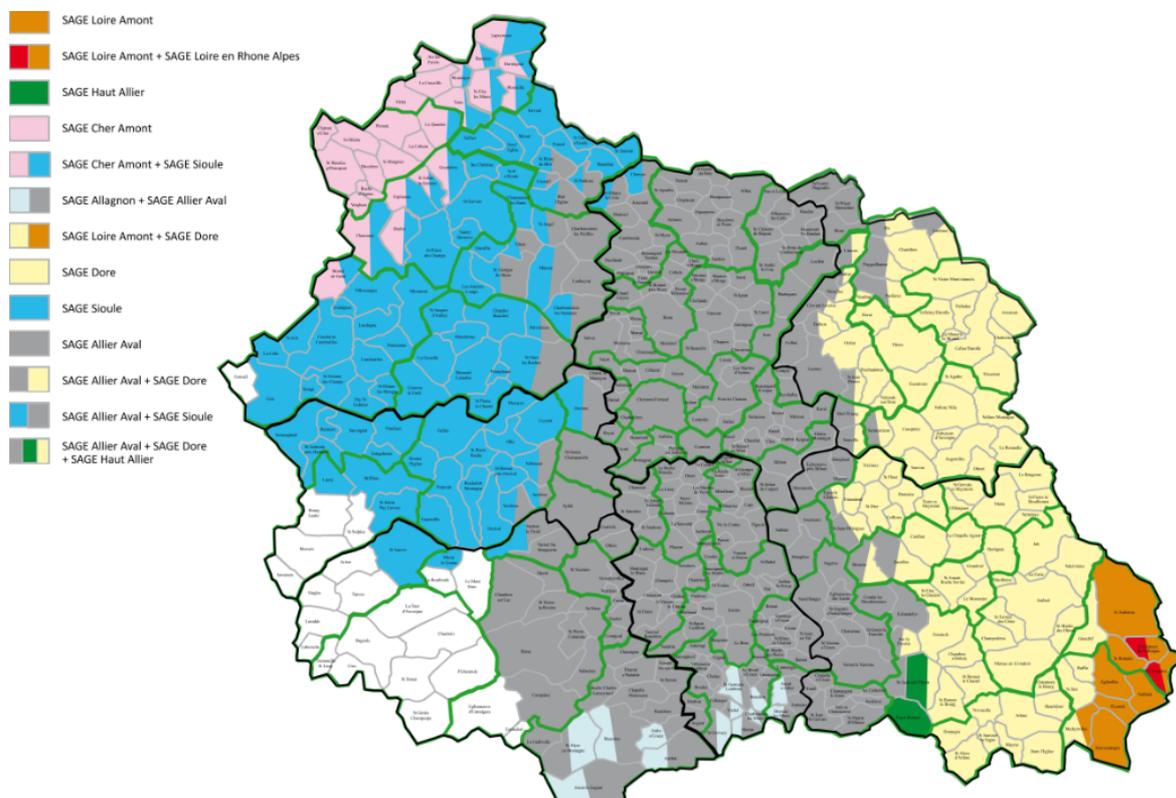
Le deuxième réseau inclut plus particulièrement des contrôles opérationnels (RCO), destinés à assurer un suivi des différents cours d'eaux risquant de ne pas atteindre les objectifs fixés par la DCE en 2015. Ces contrôles opérationnels, qui ont débuté en 2010, regroupent 141 stations et concernent des mesures physico-chimiques (DREAL.Auvergne).

### *VI.1.b Programmes de gestion de l'eau*

Les organismes agréés ont mis en place des programmes de gestion de l'eau, regroupés sous le terme de « Schéma Directeur d'Aménagement et de Gestion des Eaux » (SDAGE). Il décrit des plans d'action à mettre en œuvre pour diminuer, voire arrêter la dégradation des eaux et retrouver ainsi un « bon état » des eaux superficielles et souterraines. En Auvergne, deux SDAGE ont été mis en place, il s'agit du SDAGE du bassin Loire-Bretagne et de celui d'Adour-Garonne. Ces deux programmes, mis en place pour la période 2010-2015, définissent les grandes orientations pour obtenir une gestion équilibrée des ressources en eaux, ainsi que les objectifs de bonne qualité des cours d'eaux des deux grands bassins versants recouvrant la région.



**Figure 7 : Carte représentative de l'état des cours d'eau du département du Puy-de-Dôme. (DREAL.Auvergne)**



**Figure 8 : Répartition des Schéma d'Aménagement de Gestion de l'Eau dans le département du Puy de Dôme. (Chambre.d'agriculture.du.Puy.de.Dôme)**

Pour le SDAGE du bassin Loire-Bretagne, l'objectif est d'atteindre 61% des eaux de surface en bon état pour 2015 contre 15% à l'heure actuelle (Agence.de.l'eau.Loire.Bretagne, 2009).

Concernant le bassin Adour-Garonne, deuxième bassin versant de la région Auvergne, le SDAGE prévoit un « bon état » général sur 60% de ces cours d'eaux en 2015 (Agence.de.l'eau.Adour.Garonne, 2010). (Figure 7).

Les SDAGE des deux bassins versants sont accompagnés par des Schémas d'Aménagement et de Gestion des Eaux (SAGE). Ils déclinent les grandes orientations définies, applicables à l'échelle d'un bassin versant et de ses cours d'eaux. Concernant le département du Puy-de-Dôme, huit SAGE ont été mis en place pour la gestion des différents cours d'eaux du département. Il s'agit du SAGE Allier Aval, SAGE Sioule, SAGE Dore, SAGE Cher Amont, SAGE Alagnon, SAGE Haut Allier, SAGE Loire Amont et le SAGE Loire Rhône-Alpes (Chambre.d'Agriculture.du.Puy-de-Dôme) (Figure 8).

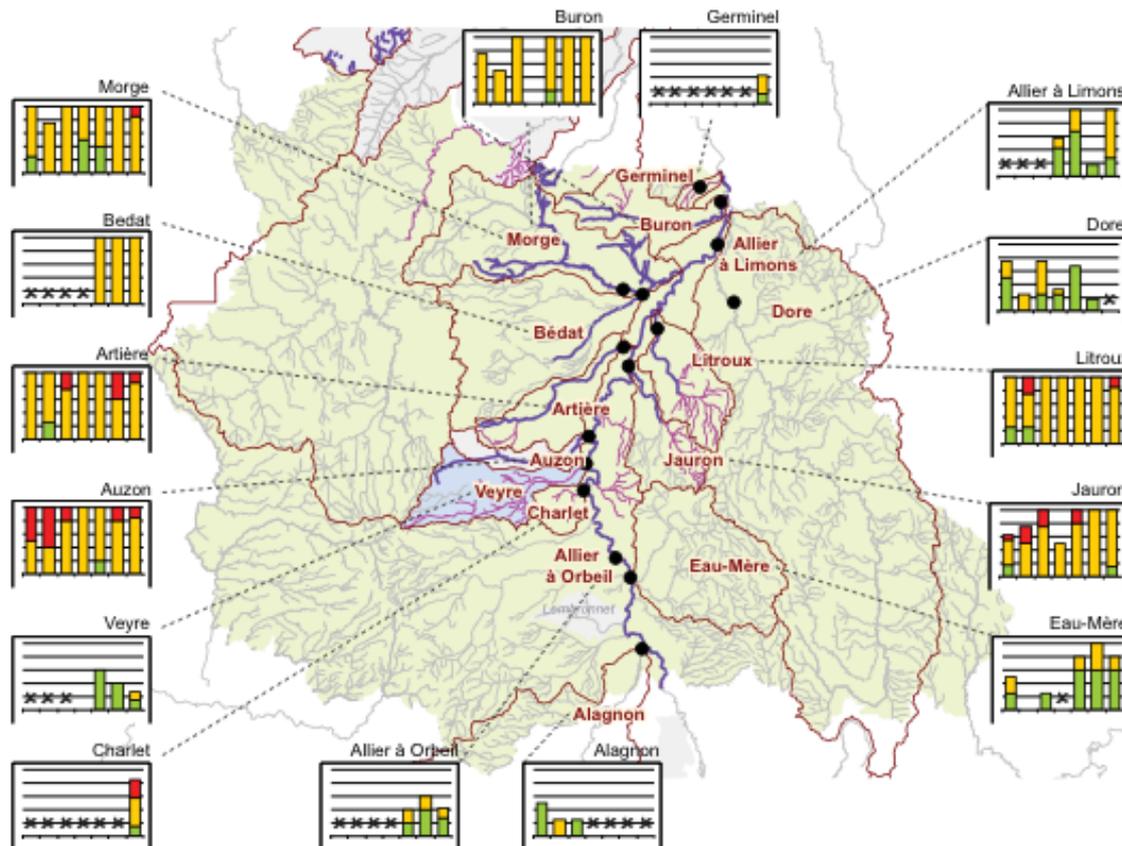
En plus de ces programmes de surveillance de la qualité de l'eau en Auvergne, il existe un réseau suivant plus particulièrement la qualité des eaux superficielles et souterraines en contenu de pesticides, intitulé réseau PHYT'EAUVERGNE.

#### *VI.1.c Cas particulier des pesticides : le réseau Phyt'eauvergne*

Ce réseau réalise un suivi des cours d'eaux au niveau de l'état de contamination en pesticides. Une étude a été réalisée entre 2004 et 2010 sur 59 cours d'eau de la région et a permis la réalisation d'une synthèse (Phyt'Eauvergne, 2011). Concernant plus particulièrement le département du Puy-de-Dôme, quinze cours d'eaux ont été suivis durant les années 2004 à 2010.

Durant ces années, différents prélèvements ont été effectués et environ 250 molécules appartenant à la famille des pesticides ont été recherchées. Sur ces quinze cours d'eaux analysés, aucun n'est exempt de pollution par les pesticides. Trois cours d'eaux : l'Auzon, l'Artière et le Litroux ont au moins eu une détection à chaque prélèvement effectué (Figure 9).

En 2010, plusieurs cours d'eaux présentaient des contaminations fréquentes et très élevées par les pesticides, à savoir l'Artière, l'Auzon, le Bedat, le Jauron, le Litroux, la Morge et le Buron. Ces secteurs présentant une contamination régulière, avec un grand nombre et



**Figure 9 : Carte du suivi de l'état de contamination des cours d'eau du Puy-de-Dôme en pesticides.**

Les valeurs "seuil" des normes de potabilité (l'eau consommable), sont utilisées, comme indicateur du niveau de contamination, que ce soit en eaux superficielles ou en eaux souterraines. Pour une molécule donnée, les normes de potabilité sont : potable si la concentration est inférieure à 0,1 µg/L, probabilisable si la concentration est comprise entre 0,1 µg/L et 2 µg/L, et non potable si la concentration est supérieure à 2 µg/L.

La couleur Rouge indique que sur cinq prélèvements, un présente au moins une concentration supérieur à 2 µg/L.

La couleur Orange indique que sur cinq prélèvements, deux présentent au moins une concentration comprise entre 0,1 µg/L et 2 µg/L.

La couleur Verte indique que sur cinq prélèvements, deux présentent au moins une concentration inférieure à 0,1 µg/L (Phyt'Eauvergne, 2011)

une grande variété de pesticides détectés, sont ceux situés en zones de cultures et/ou en zones urbanisées.

Cette étude a également montré que sur l'ensemble des prélèvements effectués durant les sept années de suivis, 90% de pesticides rencontrés appartenaient à la famille des herbicides (Phyt'Eauvergne, 2011). A noter également qu'une détection sur deux, concerne un pesticide d'usage agricole ; et qu'une détection sur deux concerne un pesticide à usage multiple (pesticide employé pour l'entretien des voies de communication et des espaces urbanisés, ou encore pour le traitement par les particuliers ou les agriculteurs).

Les différents réseaux et programmes de surveillance cités ci-dessus, s'intéressent plus particulièrement aux données physico-chimiques mesurées dans les différents cours d'eaux du département ou de la région et permettent d'avoir une bonne estimation de la qualité des cours d'eaux. Mais cette estimation ne prend pas en compte l'état des organismes vivants dans ces milieux. C'est pourquoi il existe également des indices basés sur la collecte de données biologiques.

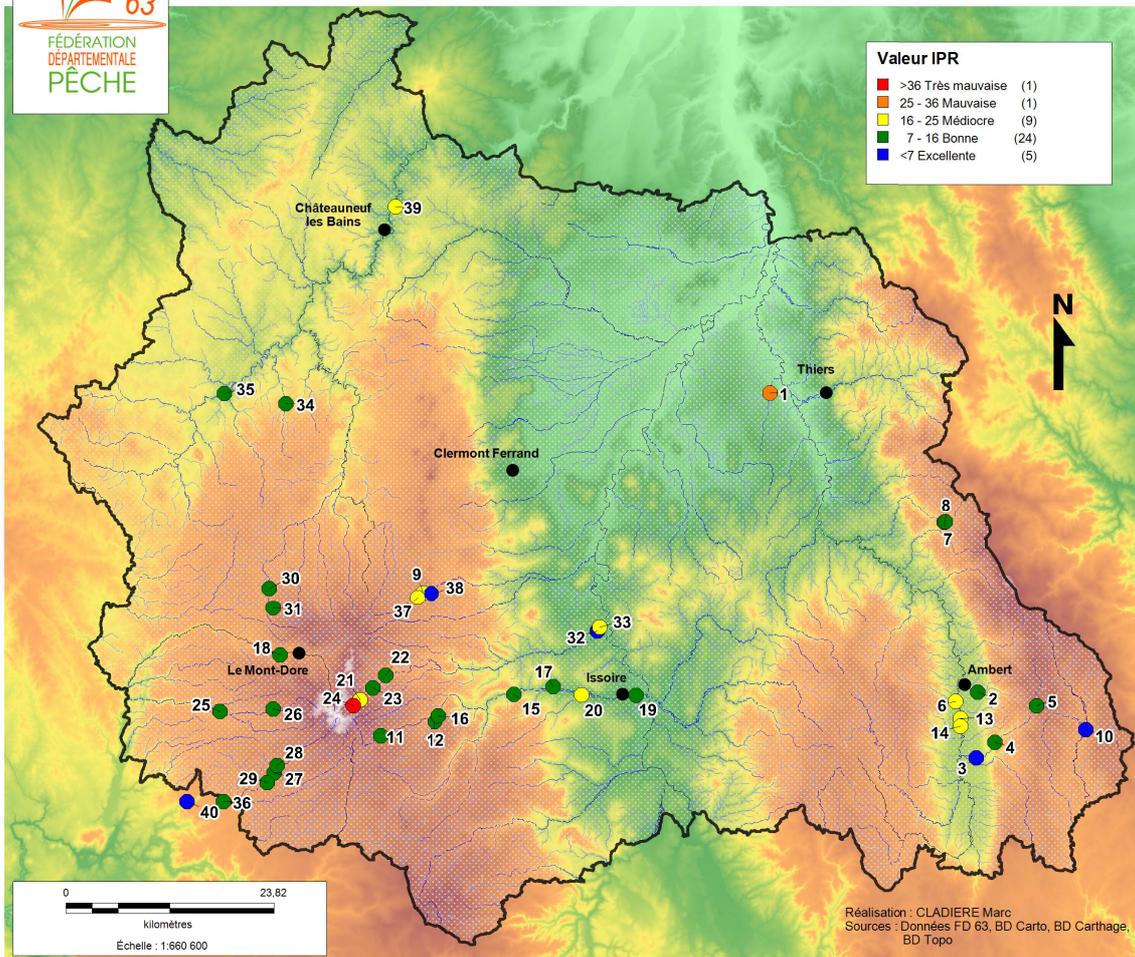
## **VI.2. Collecte de données biologiques**

Concernant les données biologiques, la qualité des cours d'eau est estimée à partir de différents indices qui sont l'Indice Poisson Rivière (IPR), l'Indice Biologique Normal Globalisé (IBGN), l'Indice Biologique Diatomée (IBD) et l'Indice Biologique Macrophytique en Rivière (IBMR). L'IPR est un indice permettant l'évaluation de la qualité d'un cours d'eau suite à l'analyse des peuplements de poissons. L'IBGN, quant à lui, permet l'évaluation de la qualité du cours d'eau au moyen d'une analyse des macro-invertébrés présents dans ce cours d'eau. L'IBD est basée sur l'étude des diatomées, qui sont des algues silicieuses microscopiques vivant fixées sur les galets des lits des cours d'eau. Ces algues, étant très sensible aux conditions environnementales, permettent par l'inventaire des peuplements d'apprécier les niveaux de pollution organique et d'eutrophisation. L'Indice Biologique Macrophytique en Rivière (IBMR) est fondé sur l'examen des macrophytes pour déterminer le statut trophique des rivières, applicable aux parties continentales des cours d'eau naturels ou artificialisés.

Les valeurs de ces indices dépendent à la fois de la qualité du milieu physique (structure des fonds, diversité des habitats, état des berges...) et de la qualité de l'eau.



## Pêches électriques 2010 (analyse par valeur IPR)



?

Les résultats de la campagne de pêche électrique 2010 ont été analysés par la Fédération Départementale Pêche 63. Les résultats sont présentés sur la carte ci-dessus. Les points de pêche sont classés par ordre décroissant de leur valeur IPR. Les points de pêche avec une valeur IPR supérieure à 36 sont considérés comme étant de très mauvaise qualité. Les points de pêche avec une valeur IPR inférieure à 7 sont considérés comme étant de très bonne qualité. Les points de pêche avec une valeur IPR comprise entre 7 et 16 sont considérés comme étant de bonne qualité. Les points de pêche avec une valeur IPR comprise entre 16 et 25 sont considérés comme étant de médiocre qualité. Les points de pêche avec une valeur IPR comprise entre 25 et 36 sont considérés comme étant de mauvaise qualité. Les points de pêche avec une valeur IPR supérieure à 36 sont considérés comme étant de très mauvaise qualité.

?

?

A l'échelle du département du Puy-de-Dôme, un des organismes réalisant l'estimation de ces indices est la Fédération Départementale pour la Pêche et la Protection du Milieu Aquatique (FDPPMA). En effet, la FDPPMA réalise tous les ans un suivi des différents cours d'eau, pendant la période allant de juin à septembre, par pêche électrique d'inventaire. Cette technique de pêche permet le calcul de l'Indice Poisson Rivière.

L'IPR permet de classer les cours d'eaux selon cinq catégories de qualité : (i) excellente, (ii) bonne, (iii) médiocre, (iv) mauvaise et (v) très mauvaise. Pour l'année 2010, quarante sites de prélèvements à travers le département ont été analysés. Sur ces quarante sites, un seul a été classé de qualité très mauvaise, un autre classé de qualité mauvaise, neuf sites sont en qualité médiocre, vingt quatre sites en bonne qualité et enfin, cinq sites en qualité excellente (Figure 10).

L'analyse des données physico-chimiques et biologiques des différents cours d'eau du département montre que la situation est plutôt correcte au niveau de l'état de contamination des différents milieux aquatiques malgré la présence de plusieurs sites en très mauvais état écologique (DIREN, 2008a, b).



## **B. Les biomarqueurs**

Depuis plusieurs décennies, les activités humaines engendrent une dégradation croissante de notre environnement. Ceci est dû, en grande partie, à la dispersion croissante de substances de synthèses ou naturelles polluantes. Cela entraîne des conséquences néfastes, pour la santé humaine mais aussi pour le fonctionnement des écosystèmes. Ainsi, il est important de pouvoir identifier et quantifier les substances chimiques présentes dans notre environnement mais aussi de connaître les effets de ces polluants sur les organismes vivant dans ces milieux.

L'identification et la quantification des substances polluantes dans les milieux aquatiques se font principalement par des analyses de type physico-chimiques. Or ces analyses présentent de nombreux inconvénients tels que ceux liés aux stratégies d'échantillonnage, aux difficultés analytiques, à la sensibilité des méthodes de détection et au coût généralement élevé des campagnes de prélèvements.

De plus, certains toxiques échappent à la surveillance mise en place par les services de gestion de l'environnement, soit parce qu'il s'agit d'une molécule nouvelle, soit parce que leurs métabolites ne sont pas encore connus et donc sont très difficiles à doser. En outre, ce sont généralement des cocktails de différentes molécules qui sont retrouvés dans les milieux naturels. Une autre limite des analyses physico-chimiques est la concentration généralement trop faible des molécules présentes dans l'environnement par rapport au seuil de détection analytique (Narbonne, 1998).

Pour connaître le niveau de pollution d'un milieu, il faut donc rechercher les différentes substances potentiellement présentes afin d'avoir une analyse assez fine du niveau de contamination. Or cela implique de multiplier le nombre d'analyses et donc le coût. Par ailleurs, la seule analyse des substances chimiques ne renseigne pas, ou très peu, sur l'état biologique des organismes vivants, ni ne peut quantifier la biodisponibilité des polluants dans les organismes (Dutka, 1998). C'est la raison pour laquelle, depuis quelques années, la notion de biosurveillance est apparue.

Cette notion repose sur l'étude des réponses biologiques des organismes aux polluants, et donc s'appuie sur l'utilisation de biomarqueurs, afin d'apporter des compléments d'informations sur la nature et le niveau de contamination chimique mais aussi sur l'état physiologique des organismes vivants occupant les écosystèmes notamment aquatiques.



## I. Définition d'un biomarqueur

Un biomarqueur se définit comme une caractéristique biologique mesurable liée à un processus normal ou non (Atkinson et al., 2001).

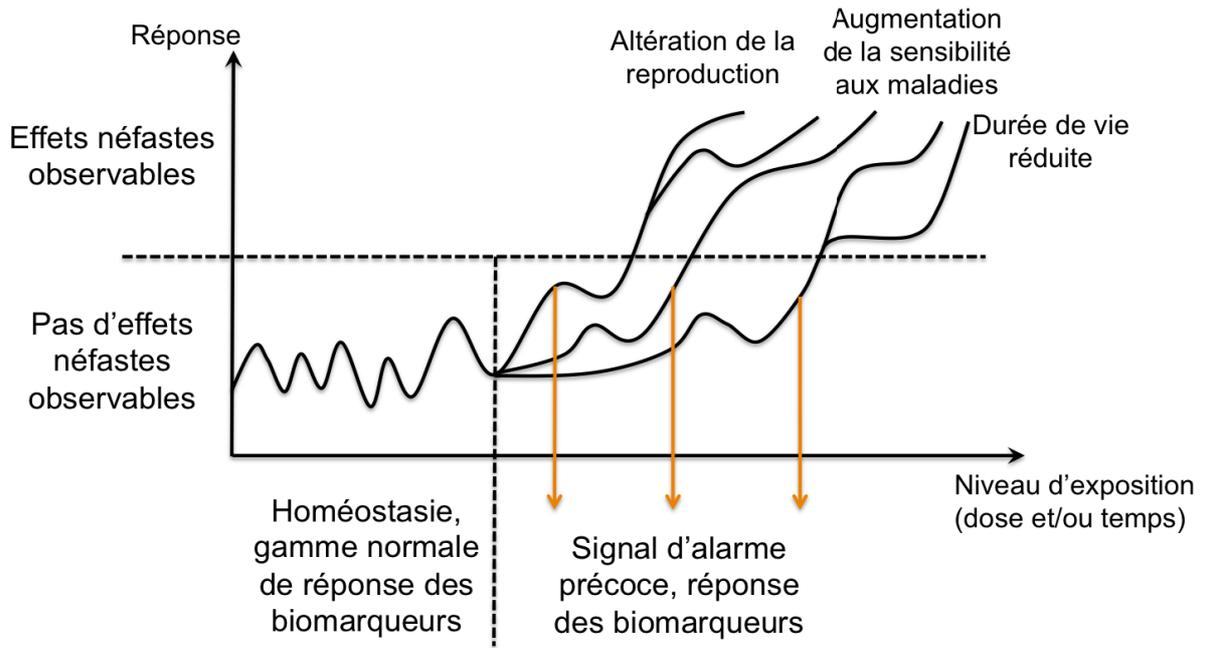
Au niveau médical, un biomarqueur peut être utilisé dans le cadre d'un dépistage/diagnostic d'une pathologie comme les cancers ou la maladie d'Alzheimer, d'une réponse à un traitement médical, d'une rechute après un traitement et/ou d'une toxicité de molécule. Le biomarqueur est alors, le plus souvent, une protéine dont la concentration peut-être mesurée dans le sang ou une molécule détectable dans l'urine.

Depuis plusieurs décennies maintenant, les écotoxicologues se sont intéressés à cette méthodologie pour l'appliquer à la surveillance de l'environnement. Cette biosurveillance s'attache donc à mieux définir les effets des xénobiotiques sur les populations, les communautés et les écosystèmes exposés. En effet, dans le domaine de l'environnement, un biomarqueur se définit comme « un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, et/ou comportemental qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins, une substance chimique à caractère polluant » (Lagadic et al., 1997)

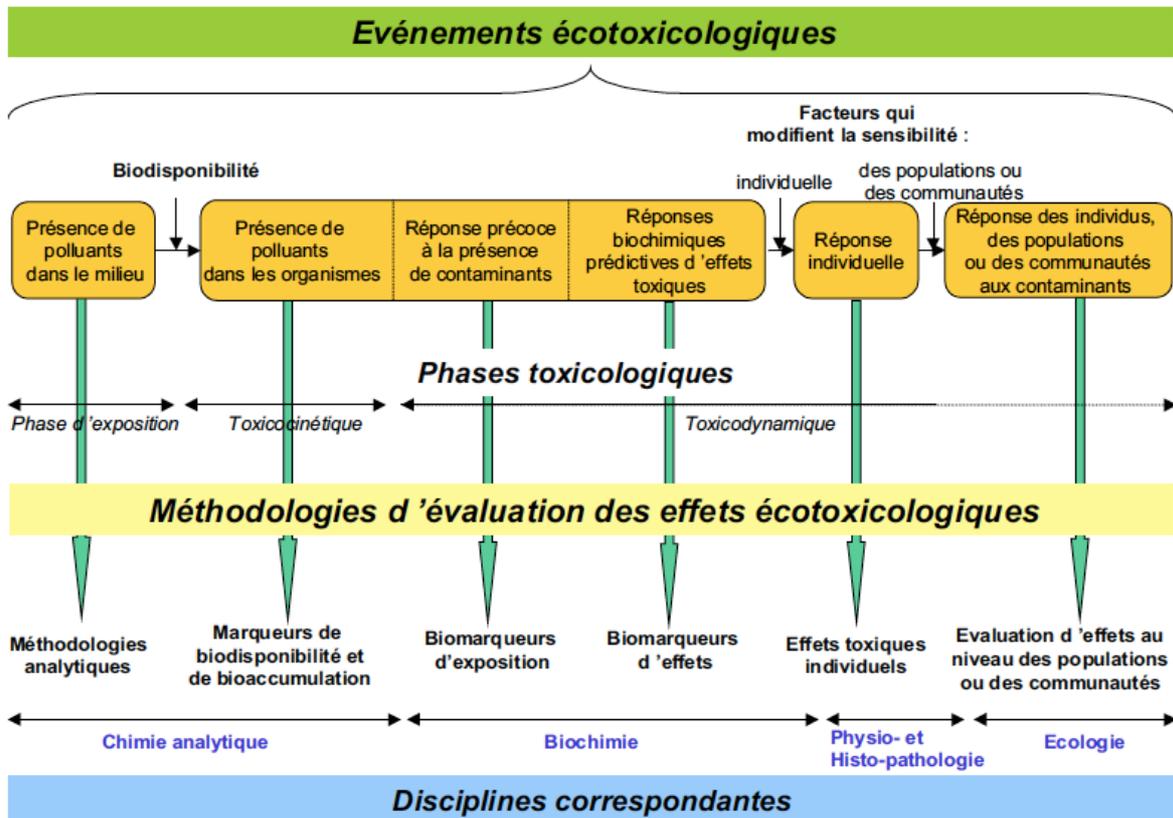
Dans ce contexte, un biomarqueur peut donc être considéré comme une réponse biologique à un xénobiotique (une substance étrangère à l'organisme), qui peut être mesurée dans les tissus ou organes de l'organisme (ex : foie) ou dans les liquides physiologiques tels que les urines, le sang ou la lymphe. Cette réponse indique une variation du « statut normal » de l'organisme sans que l'organisme entier soit modifié (Van Der Oost et al., 2003).

Depledge (1994) considère qu'en-deçà d'une certaine pression toxique (durée d'exposition et/ou concentration), les biomarqueur vont contribuer à maintenir l'homéostasie de l'organisme, en d'autres termes, ils tamponnent l'action des polluants sur l'individu.

Lors d'une augmentation trop importante de la dose interne de xénobiotiques ou de la durée d'exposition, des réactions de compensation sont mises en place par l'organisme afin de limiter les effets toxiques des polluants. Ces réactions, de dégradation ou de détoxification, permettent de réduire l'effet toxique des contaminants. Ils traduisent une atteinte à l'organisme mais sans mettre en jeu sa survie.



?  
 ? ?és??v???: s??dr f?? er ??du ??f Lé????? ????s??r f??c: ?d??s?: er d??d??s??r du ??d?  
 ?: s??o: edf er ??é??e? ef Lé??dr ??r f??er ??ér n??é?????gés??o: edf er ?Au e? ???  
 ?h?: s??r ?? s??edf??f??g?? j EP?  
 ?  
 ?



? ?és?? v??n ???: s??dr f?? er ? ???d u f??e??e??g??d? : ?su ??ffr f?? ? ,n??g??s? g??d s d Lé??  
 ???efe?e??g?? Lé??d??s??s??s?? j ( ?

Lorsque les doses de xénobiotiques sont trop fortes ou l'exposition trop longue, ces réactions de compensation ne suffisent plus à limiter les effets des toxiques, car les capacités de défense de l'organisme sont saturées. A ce stade, l'état de santé de l'organisme évolue vers des effets irréversibles dont l'issue est fatale à plus ou moins long terme, même lorsque l'exposition aux contaminants est terminée (Figure 11) (Depledge, 1994; Lagadic et al., 1997).

Plus la limite de non-compensation est atteinte pour une dose faible et/ou suite à une exposition rapide, plus l'organisme est considéré comme vulnérable (Depledge, 1994; Lagadic et al., 1997).

L'utilisation des biomarqueurs permet de palier aux difficultés rencontrées par les analyses physico-chimiques. En effet, la spécificité du biomarqueur pour certaines classes de polluants permet de révéler leur présence mais également leur biodisponibilité ainsi que les effets précoces sur les organismes (Amiard et al., 1998). Ainsi, les biomarqueurs sont un complément indispensable dans la surveillance des pollutions aquatiques.

De plus, la surveillance de la pollution, notamment aquatique, par l'utilisation des biomarqueurs peut s'effectuer à différents niveaux d'organisation, allant de l'individu jusqu'au niveau de la communauté (analyse des indices biocénotiques) (Figure 12) (Lagadic et al., 1997)

Dans le cadre de nos travaux, nous nous intéresserons uniquement à la notion de biomarqueur dans le domaine de l'environnement et notamment, à ceux appliqués aux organismes des milieux aquatiques.

## **II. Les différents types de biomarqueur**

Selon l'importance de l'exposition et le degré d'intoxication des individus, deux classifications de biomarqueurs sont proposées dans la littérature. La première, et la plus fréquemment utilisée, est celle décrite par Lagadic et *al.* de 1997 et reprise, en 2000, par Cajaraville et *al.* (Cajaraville et al., 2000; Lagadic et al., 1997). Elle répertorie les biomarqueurs selon trois grandes classes. La deuxième a été décrite par De Lafontaine et al en 2000 et classe les biomarqueurs selon deux groupes (Tableau 1) (De Lafontaine et al., 2000).

**Tableau 1 : Les différents types de biomarqueurs et quelques exemples.**

<b>Catégories de biomarqueurs</b>	<b>Description</b>	<b>Exemples</b>	<b>Références</b>
D'exposition	Témoin de la pénétration du polluant dans l'organisme	Conjugaison au GSH, formation d'adduits à l'ADN, induction de MT	<i>(Carajaville et al., 2000 ; Lagadic et al., 1997)</i>
D'effet	Témoin de l'effet, toxique ou non, sur une cible critique, après entrée du xénobiotique dans l'organisme	Cassures à l'ADN, enzymes du stress oxydant, réponse lysosomales	
De sensibilité / susceptibilité	Témoin de variations génétiques de la réponse par les polluants	Augmentation de la quantité de GST, baisse de sensibilité des AchE	
De défense	Réaction de défense d'un organisme exposé à un contaminant	Induction des MT ou de l'activité EROD	<i>(De Lafontaine et al, 2000)</i>
De dommage	Altération directe causée à l'organisme par les contaminants toxiques	Cassures à l'ADN, produits de la LPO ; niveaux de VG	

*Abbréviations : AChE :acétylcholinestérases ; EROD : activité 7-éthoxyrésorufine O-dééthylase ; GSH : glutathion ; GST :glutathion S-transférases ; LPO : lipoperoxydation ; MT : métallothionéines ; VG : protéines de type vitellogénine.*

## **II.1. La classification selon Lagadic (1997)**

Selon cette classification, les biomarqueurs sont situés à différents niveaux des mécanismes d'altération toxique ; allant de la cause à l'effet. Ils peuvent se mesurer de la première interaction de l'agent toxique avec la cellule jusqu'aux atteintes structurelles et fonctionnelles de l'organisme.

### *II.1.a Les biomarqueurs d'exposition*

Il s'agit des premiers biomarqueurs décrits. Ce sont des indicateurs de la contamination des systèmes biologiques par un ou plusieurs xénobiotique(s). Ils sont généralement impliqués dans les mécanismes de métabolisation/détoxication des xénobiotiques (ex : le complexe de cytochrome P450) ou dans les mécanismes de défense cellulaire (ex : glutathion-S-transférase). Leurs variations peuvent être spécifiques ou non d'une classe de contaminants, comme par exemple l'induction des métallothionéines par les métaux lourds.

### *II.1.b Les biomarqueurs d'effets*

Ils permettent de montrer l'entrée du xénobiotique dans l'organisme par l'action de son effet, toxique ou non, sur une cible critique. Ils signalent donc des conséquences physiopathologiques de l'exposition aux xénobiotiques. Ces conséquences peuvent entraîner une incapacité à se reproduire voire, à plus long terme, la mort de l'organisme.

Ces biomarqueurs peut être de deux types : les biomarqueurs d'effets non spécifiques qui décrivent les effets provoqués par un grand nombre de facteurs de stress (comme par exemple le changement de poids d'un organisme) et les biomarqueurs d'effets spécifiques, qui décrivent les réponses de l'organisme à une classe de xénobiotiques en particulier. Les biomarqueurs d'effets spécifiques sont généralement des réponses biochimiques, immunologiques ou des altérations histopathologiques et cellulaires (cassures de l'ADN, enzymes du stress oxydant, réponses lysosomales).

### *II.1.c Les biomarqueurs de sensibilité ou de susceptibilité*

Ils indiquent la capacité innée ou acquise d'un organisme à répondre à un stress induit par l'exposition à une substance xénobiotique spécifique. Ces biomarqueurs traduisent généralement les variations de sensibilité, comme la résistance aux contaminants. A titre d'exemple, la baisse de sensibilité aux acétylcholinestérases est le témoin d'une résistance



aux insecticides (Bocquene et al., 1993; Flammarion et al., 2000; Payne et al., 1996). Ces variations peuvent résulter d'une exposition précédente à un xénobiotique ou à des différences génétiques interindividuelles.

## **II.2. La classification de De Lafontaine (2000)**

Une deuxième classification, qui semble plus appropriée dans le cadre de la biosurveillance, a été proposée par De Lafontaine et al en 2000 (De Lafontaine et al., 2000). Ces auteurs répertorient les biomarqueurs en deux grandes classes, les biomarqueurs de défense et les biomarqueurs de dommages. Cette classification permet de lever l'ambiguïté du terme « effet » qui peut-être bénéfique ou néfaste (Amiard-Triquet and Amiard, 2008).

### *II.2.a Les biomarqueurs de défense*

Les biomarqueurs de défense permettent aux organismes de lutter et de survivre en présence de polluants. Cette classe va donc regrouper les différents biomarqueurs traduisant une ou des réactions de défense de l'organisme lorsque celui-ci est exposé à un ou des contaminants. C'est le cas, par exemple, de l'induction de métallothionéines en réponse à une contamination par certains métaux lourds ou encore de la mesure de l'activité diéthyléthoxyrésorufine déshydrogénase (EROD) qui met en évidence une induction des mécanismes de détoxification de l'organisme.

### *II.2.b Les biomarqueurs de dommages*

Les biomarqueurs de dommages traduisent une atteinte biologique plus ou moins importante pouvant conduire à une incapacité pour l'individu de se reproduire voire de vivre. Les principaux biomarqueurs de dommages sont des marqueurs moléculaires (cortisol, stress oxydant, peroxydation des lipides...), des marqueurs de génotoxicité (adduits à l'ADN, micronoyaux et test Comet), des marqueurs subcellulaires et cellulaires (marqueurs immunologiques), des marqueurs cytologiques et des marqueurs physiologiques. Ces biomarqueurs de dommages permettent d'obtenir une bonne évaluation de l'état de santé des individus d'une espèce donnée.



### **II.3. Les critères d'évaluation d'un biomarqueur et leurs limites d'application**

Afin d'évaluer un biomarqueur, six critères doivent être disponibles ou établis (Stegeman et al., 1992; Van Der Oost et al., 2003).

#### *II.3.a Les critères d'évaluation d'un biomarqueur*

- Le biomarqueur utilisé doit être facile à réaliser, d'un coût peu élevé, et s'effectuer selon des normes de qualité,
- La réponse du biomarqueur doit être sensible à l'effet du xénobiotique afin de constituer un paramètre d'alarme précoce,
- Les données de bases sur ce biomarqueur doivent être connues afin de pouvoir discerner les variations naturelles des variations liées à la présence d'un polluant,
- Les impacts des facteurs de confusion du biomarqueur doivent être connus. Les facteurs de confusion sont des facteurs présentant une association avec le facteur de risque examiné et qui peut influencer le résultat,
- Les mécanismes sous-jacents des relations entre la réponse du biomarqueur et l'exposition au polluant (que ce soit la dose ou la durée d'exposition) doivent être établis,
- Enfin, la signification toxicologique du biomarqueur, c'est-à-dire les relations entre sa réponse et l'impact à long terme sur l'organisme, doit être précisée.

De plus, Van Der Oost et al. (2003) rajoutent à ces critères, qu'un biomarqueur devra être, si possible, non invasif ou non-destructif afin de faciliter le suivi des pollutions sur les espèces protégées ou menacées.

#### *II.3.b Les limites d'application des biomarqueurs*

Un biomarqueur parfait et universel n'existe pas. Selon les conditions d'utilisation du biomarqueur, celui-ci peut apporter une réponse erronée, voire aucune réponse. En effet, de nombreux facteurs peuvent influencer la physiologie d'un organisme et donc la réponse du biomarqueur.

Tout d'abord, il existe des facteurs propres à l'individu, ce sont les facteurs intrinsèques. Il s'agit, par exemple, de l'espèce, du sexe, de l'âge, du poids et du régime alimentaire de l'individu. Il peut également s'agir des caractéristiques génétiques de l'espèce considérée. D'autres facteurs peuvent influencer la réponse de l'organisme à une contamination par un polluant, il s'agit des facteurs extrinsèques. Ces derniers, relatifs à l'environnement, sont



notamment les saisons, la durée et le taux d'exposition, de même que l'interaction avec les autres espèces. En effet, ces paramètres peuvent influencer le degré d'exposition organisme/toxique, c'est-à-dire modifier la quantité de toxique potentiellement assimilable par l'organisme. De même, des facteurs abiotiques\* tels que la température ou la salinité peuvent également avoir une influence sur la réponse du biomarqueur (Amiard et al., 1998). Si l'influence de ces facteurs est contrôlable en conditions de laboratoire, en conditions naturelles l'interprétation de la réponse des biomarqueurs devient plus délicate. La standardisation des réponses est ainsi difficile à obtenir tant la gamme de réponses dites/considérées comme « normales » peut s'avérer large et donc très difficile à caractériser (Amiard et al., 1998).

Pour atténuer cette contrainte et cette difficulté de standardisation dans le milieu naturel, le choix d'un site de référence représente un point très important pour la fiabilité de la réponse du biomarqueur. Ce site devra se situer dans une zone d'une contamination nulle, voire très faible. De plus, une comparaison des réponses entre sites de niveaux de contamination différents est fortement recommandée, afin d'obtenir la meilleure estimation possible du degré de contamination du milieu.

### **III. Les biomarqueurs utilisés en milieu aquatique**

Les biomarqueurs ayant fait l'objet d'une validation à la fois en laboratoire et sur le terrain sont appelés « *core biomarkers* » (Pampanin et al., 2006). Ces « *core biomarkers* » englobent différents marqueurs tels que la stabilité de la membrane lysosomale, l'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE), les métallothionéines (MT), l'éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) et les métabolites fluorescents de la bile (FACs). Trois de ces biomarqueurs sont le plus souvent utilisés.

#### **III.1. L'éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD)**

Le premier biomarqueur reconnu, a été l'activité de l'enzyme éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD). Cette enzyme est une monooxygénase à fonction mixte (MFO) dépendante du cytochrome P450. Les monooxygénases sont des enzymes permettant la biotransformation des polluants hydrophobes en composés hydrosolubles. Elles permettent l'incorporation d'un atome d'oxygène sur les structures hydrophobes par attaque radicalaire en les transformant en métabolites hydrosolubles qui pourront alors être conjugués puis



excrétés. Leur induction permet de renseigner sur l'exposition des organismes cibles à des polluants majeurs de l'environnement tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), les polychlorobiphényles (PCBs) et les organochlorés. L'induction est classiquement mesurée dans le foie, mais elle peut également être significative dans d'autres tissus (Jönsson et al., 2010).

Havelková et al. (2008) ont étudié l'expression ou l'activité de quatre biomarqueurs du foie (cytochrome P450 1A (CYP1A), EROD, Glutathion-S-transférase (GST) et Glutathion (GSH)) sur deux espèces de poissons, la truite *Salmo trutta fario* et le chevin *Leuciscus cephalus L.*, pour évaluer l'état de contamination de plusieurs rivières de République tchèque. Les quatre biomarqueurs sélectionnés permettent d'évaluer le métabolisme des xénobiotiques. En effet, l'expression de CYP1A et la mesure de l'activité EROD permettent d'évaluer le fonctionnement de la phase I du système de détoxification de l'organisme. L'activité catalytique de la GST (Glutathion-S-transférase) et l'expression de la GSH (Glutathion) permettent d'évaluer la réponse de la phase II du système de détoxification. Leurs résultats ont montré des valeurs d'expression différentes des différents biomarqueurs selon les sites. Les sites les plus pollués montrent les valeurs les plus élevées. De plus, les mesures des polluants dans les sédiments de ces rivières ont confirmé ces différences. Cette étude confirme l'intérêt de l'utilisation de tels biomarqueurs pour la surveillance de la pollution de l'environnement aquatique.

Le biomarqueur « EROD », mais aussi ceux liés à l'activité du cytochrome P450, se sont avérés, être des marqueurs très adaptés à la surveillance des environnements aquatiques (Flammarion et al., 2000; Valdehita et al., 2012; Vindimian et al., 1991).

### **III.2. Les métallothionéines**

Les métallothionéines sont une famille de protéines cytoplasmiques de faible poids moléculaire (12-15kDa), riches en cystéine et montrant une forte affinité pour les ions métalliques. Ces protéines ont été mises en évidence pour la première fois en 1957 dans le rein du cheval (Margoshes and Vallee, 1957). Depuis, de nombreuses études ont montré leur présence dans diverses espèces, essentiellement des poissons, des crustacés et des mollusques, aussi bien aux stades adultes que larvaires (Amiard et al., 2006; Roesijadi, 1994). Chez ces espèces, ces protéines sont principalement présentes dans les tissus impliqués dans la prise en charge, le stockage et l'excrétion des métaux tels que les tissus



branchiaux, digestifs, rénaux mais aussi les tissus musculaires et nerveux. Les métallothionéines assurent de nombreuses fonctions biologiques. En effet, elles participent aux processus homéostatiques des métaux physiologiques comme le zinc et le cuivre mais aussi à la détoxification des métaux non essentiels tels que le mercure et le cadmium. Vasak (2005) a également montré leur rôle dans les mécanismes de protection contre le stress oxydant, les processus apoptotiques et la régulation des cellules nerveuses. La synthèse des métallothionéines est généralement induite par les métaux essentiels ou non comme le cuivre, le zinc, le cadmium, le mercure et l'argent, mais aussi, dans une moindre mesure, par des composés organiques comme certains pesticides ou antibiotiques. Malheureusement, les concentrations de métallothionéines varient dans les différents tissus, non seulement en fonction de leur stade de développement, de l'âge, du sexe, de la taille et de l'état nutritionnel des organismes, mais aussi en fonction de leur développement gonadique sous contrôle hormonal. Cette variabilité d'induction et les différents facteurs biotiques ou abiotiques qui influencent la synthèse des métallothionéines, ont engendrés de nombreux débats concernant leur utilisation en tant que biomarqueurs (Amiard et al., 2006).

### **III.3. L'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE)**

La mesure de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) et, plus particulièrement, de son inhibition est l'un des meilleurs indices de contamination par les pesticides organophosphorés et carbamates (Bocquene et al., 1993; Payne et al., 1996). L'inhibition est provoquée également, mais de manière non spécifique, par des contaminations métalliques (Flammarion et al., 2000).

Pour les poissons des milieux aquatiques continentaux, cette mesure s'effectue généralement sur le muscle.

D'une manière plus générale, à travers ces trois exemples, on constate que les différents biomarqueurs aquatiques se révèlent d'une grande importance pour évaluer l'exposition et les effets de différents contaminants, tels que les métaux, les xénobiotiques organiques et les composés organométalliques, et ceux-ci peuvent être mesurés par différentes approches moléculaires, comme des tests biochimiques, des tests d'immunodétection ou des mesures de fluorescences (Sarkar et al., 2006). Ces différents tests sont généralement réalisés dans des conditions contrôlées (biotests) et à différentes échelles d'organisations biologiques,



allant de la cellule (test *in vitro*) à la communauté (mésocosme), en passant par des organismes *in toto* (test mono et multi spécifique).



## **C. Les Salmonidés, une famille sentinelle de l'environnement**

En raison de leur régime alimentaire, les salmonidés sont des poissons situés au sommet des réseaux trophiques. De ce fait, ce sont des organismes intégrateurs de la qualité des milieux aquatiques.

De plus, ce sont également des organismes bioaccumulateurs. En effet, comme beaucoup d'autres organismes, certains de leurs tissus et/ou organes (sang, peau, foie, entre autres...) peuvent absorber et/ou concentrer des xénobiotiques (polluants ou autres) suite à une exposition à moyen et/ou long-terme dans un environnement contaminé.

Toutes ces caractéristiques font des salmonidés un excellent modèle pour l'étude de la qualité des milieux aquatiques et de ce fait, ils peuvent être considérés, comme des organismes « sentinelles ». Ces derniers se définissent comme des organismes dont le comportement, la survie, ou d'autres caractéristiques (physiologiques, cellulaire, moléculaire et/ou autres) peuvent servir d'indicateurs préventifs ou de « sonnette d'alarme » de l'état de l'environnement.

A l'heure actuelle, de nombreuses méthodologies d'évaluation de la qualité des milieux aquatiques font appel au modèle poisson. Ces méthodes sont basées, soit (i) sur l'étude des communautés (richesse, abondance...), soit (ii) sur les réponses des individus (réactions comportementales, reproduction...), (iii) soit sur les réactions physiologiques et cellulaires (réactions enzymatiques,...).

### **I. Etude des communautés piscicoles**

Une des méthodes permettant de suivre l'évolution de la qualité des milieux aquatiques est basée sur un suivi des communautés piscicoles des rivières. Pour estimer la communauté piscicole d'une rivière, la méthodologie couramment utilisée est la pêche électrique. Cette technique, relativement inoffensive pour les animaux, utilise le pouvoir à la fois attractif et inhibiteur de l'électricité de fort voltage et de faible ampérage, sur les poissons. Elle permet un recensement des espèces et une caractérisation des peuplements, sans impact sur ceux-ci. Différentes méthodes de pêche électrique sont envisageables selon les cours d'eau et l'objectif suivi : soit les pêches exhaustives, soit les pêches partielles. Ces pêches permettent une prospection de la communauté piscicole. Les données recueillies permettent une



évaluation de la densité ou de la biomasse des populations présentes ainsi qu'une étude de la structure en taille des populations. Ces différents types de pêches électriques ne peuvent être réalisés que par des organismes habilités, sous arrêté préfectoral, tels que l'Office National des Eaux et des Milieux Aquatiques (ONEMA), les Fédérations Départementales pour la Pêche et la Protection du Milieu Aquatique (FDPPMA) et des bureaux d'études sollicités pour estimer les communautés piscicoles.

## **II. Etude des réponses des individus**

Une autre méthode permettant d'estimer la qualité des milieux aquatiques est basée sur les réponses physiologiques des individus, c'est-à-dire des réactions comportementales des poissons lorsque ceux-ci sont soumis à un polluant. Les réactions comportementales analysées peuvent être basées, soit sur des perturbations des mouvements individuels du poisson, soit sur des altérations des mouvements de nages.

Les perturbations concernant les mouvements individuels du poisson sont, généralement, de type évitement ou attraction. En effet, si le poisson perçoit le polluant comme nocif, celui-ci va fuir la zone contaminée afin de diminuer le temps de contact avec celui-ci. Au contraire, il peut arriver que le polluant ne soit pas perçu comme nocif, et donc que le poisson reste dans la zone, augmentant par conséquent le temps de contact avec le polluant, engendrant ainsi des perturbations plus profondes pour l'organisme (Kane et al., 2005).

Les polluants peuvent également entraîner des altérations des mouvements de nage du poisson, tels que la vitesse de nage, la fréquence des mouvements ou la posture lors de la nage. L'analyse de ces mouvements, qu'ils soient individuels ou de groupes, a largement été utilisée dans les systèmes automatisés de biosurveillance en raison de leur sensibilité uniforme pour de nombreux contaminants (Kane et al., 2005).

Il existe même sur le marché des toximètres à poissons permettant une surveillance en continu de leurs comportements dans un réservoir sous l'influence constant du cours d'eau à échantillonner. Ces toximètres analysent en continu, *via* des images vidéo, différents paramètres des mouvements du poisson, tels que la vitesse de nage, l'apparition de tremblements ou de mouvements circulaires. Un indice de toxicité est calculé en permanence, et dès que celui-ci dépasse une valeur seuil, un système d'alerte est activé. Cet appareillage permet ainsi une détection des substances toxiques dans les rivières, les



réservoirs, les systèmes d'approvisionnement en eaux, ainsi que dans les usines de traitements des eaux.

### **III. Etudes des réactions physiologiques et cellulaires des individus**

Une troisième méthodologie permettant l'estimation de la qualité des milieux aquatiques est basée sur les réactions physiologiques et cellulaires des individus. Les réactions physiologiques et cellulaires des individus font généralement intervenir des réponses enzymatiques, chez les individus soumis à un polluant. Ces paramètres sont généralement des variables biologiques dont le taux ou l'activité va être modifiée en présence d'un polluant. Celui-ci peut conduire à une induction et/ou une inhibition des diverses protéines et enzymes impliquées dans le métabolisme et l'excrétion de xénobiotiques.

Roesijadi (1994) ont montré par exemple, que les métallothionéines étaient des protéines induites chez un grand nombre d'organismes aquatiques en présence de métaux lourds (mercure, cadmium, plomb, zinc, etc...). Les métallothionéines jouent, en effet, un rôle dans la régulation des éléments métalliques essentiels (cuivre, zinc) mais aussi dans la détoxification des métaux lourds, comme le cadmium et le mercure.

D'autres classes de produits chimiques peuvent induire des réponses précises de la part de certaines enzymes ou protéines. Elles regroupent des composés organochlorés (PCB, dioxines, DDT) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Ces composés vont induire des oxygénases à fonction mixte (MFO), telles que les monooxygénases à cytochrome P450, impliquées dans leur biotransformation et élimination (Hung et al., 2012). Dans le cadre de notre étude, le modèle de poisson choisi pour le développement de biomarqueurs moléculaires est la truite *Salmo trutta fario*.

?

?

Nageoire adipeuse  
orangée



© Marc Mestas

Nageoire caudale  
à pédoncule large  
et peu échancré

Robe tachetée de point  
rouge

Mâchoire atteignant ou  
dépassant l'arrière de  
l'œil

?

?

?

réservé f i o d y ém m b p m p l c p s sé b c p s  
ém m b p p s c

?

?

## **D. Le modèle retenu : la Truite *Salmo trutta fario***

La truite *Salmo trutta fario*, appelée plus communément truite fario (Figure 13) ou truite commune, est un poisson de la famille des salmonidés. Elle appartient à cette famille avec les genres *Salvelinus* et *Oncorhynchus*. Seulement deux espèces appartiennent, à l'heure actuelle, au genre *Salmo*, il s'agit des espèces *Salmo trutta* et *Salmo salar*, le saumon atlantique. La truite commune présente un comportement migrateur facultatif (Baglinière, 1991), mais également une grande capacité d'adaptation à différents milieux. Il existe trois morphes\* de la truite *Salmo trutta* :

- la truite fario, *Salmo trutta fario*, qui est la forme vivant en rivières,
- la truite de mer, *Salmo trutta trutta*, qui a migré en mer,
- la truite des lacs, *Salmo trutta lacustris*, dont la croissance s'effectue en lac.

Dans le cadre de notre étude, nous nous intéressons plus particulièrement à la truite de rivière, *Salmo trutta fario*.

### **I. Anatomie de la truite *Salmo trutta fario***

#### **I.1. Anatomie générale de la truite fario**

La truite *Salmo trutta fario* (Figure 13) possède un corps fusiforme et une silhouette élancée favorable à une nage rapide. Elle possède une tête relativement pointue et une bouche largement fendue armée de petites dents acérées. Cette caractéristique la classe parmi les poissons macrostomes\*.

Pour être adaptée à la flottabilité, la truite dispose d'une vessie natatoire qui se remplit d'air et qui est reliée par un tube étroit vers l'œsophage et la bouche. La truite peut gonfler ou dégonfler cette vessie afin de s'adapter à la profondeur du cours d'eau.

La truite fario peut mesurer de 20 à 65 centimètres selon son milieu. En effet, la truite des ruisseaux atteindra à peine 20 cm tandis que celle des plaines pourra mesurer jusqu'à 65 cm. Son anatomie particulière lui confère des caractéristiques permettant une reconnaissance facile de ce poisson dans les rivières. Trois signes caractéristiques sont ainsi utilisés pour la reconnaître : sa nageoire caudale est droite voire convexe à pédoncule large et son maxillaire dépasse son œil. De plus sa robe bien tachetée jusqu'en dessous de la ligne latérale, et son adipeuse bien orangée permettent une reconnaissance aisée (Figure 13).



## **I.2. Anatomie et physiologie de la truite**

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux organes et à la physiologie de la truite lui permettant de se protéger contre les agressions liées à la pollution de l'environnement.

La peau est la première barrière de protection contre les agressions environnementales. De plus, elle assure l'intégrité osmotique du poisson. Elle se compose de deux couches, l'épiderme couvert de mucus, ayant un rôle protecteur, et le derme, beaucoup plus épais.

L'appareil respiratoire des truites fario se compose des branchies localisées de part et d'autre du pharynx. Les branchies des poissons sont composées de fines lamelles contenant un réseau de capillaires sanguins, portés par quatre arcs branchiaux et protégés par les opercules. Sur les arcs branchiaux, des branchiospines sont implantés. Il s'agit des petites épines orientées vers l'avant qui permettent de guider la nourriture vers l'œsophage. La grande surface des branchies facilite l'échange du dioxygène et du dioxyde de carbone dissous dans l'eau. Les poissons absorbent l'eau riche en dioxygène par la bouche et le font circuler sur les branchies. Le sang des capillaires va alors se charger en dioxygène, les filaments branchiaux peuvent capter jusqu'à 85% du dioxygène de l'eau. C'est également par les branchies que les polluants peuvent entrer en contact avec le système sanguin du poisson et donc le contaminer.

Le système digestif de la truite permet de dégrader les grandes particules en substrats plus fins, qui seront ensuite absorbés par les parois intestinales, puis transportés par le système circulatoire jusqu'aux organes, où ils seront utilisés comme nutriments par les cellules. Le foie de la truite est situé face à l'estomac et joue le rôle d'un organe digestif accessoire. Celui-ci va sécréter la bile, qui sera emmagasinée dans la vésicule biliaire. Le foie intervient également dans la détoxification de xénobiotiques tels que les pesticides, les médicaments ou les métaux lourds.

Chez la truite et les salmonidés, le rein est une structure longue, de couleur rouge-noir foncé, qui se trouve le long de la colonne vertébrale, et s'étend de la région postérieure de la tête jusqu'à l'anus. Le rein est divisé en trois sections : antérieure, médiane et postérieure. Sa fonction la plus importante consiste à réguler l'équilibre hydrominéral interne. De plus, le rein antérieur intervient dans la production des globules rouges et blancs du poisson. Les cellules sanguines, que ce soit les érythrocytes ou les leucocytes sont toutes nucléées. Les érythrocytes sont plutôt de forme ovale. Parmi les leucocytes, cinq sous-groupes de globules



blancs existent. Il s'agit des granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), des lymphocytes, des monocytes et des thrombocytes granuleux (Ministère.des.Pêches.et.des.Océans.du.Canada, 2004).

## **II. Répartition géographique de la truite fario**

La truite fario vit dans tous les cours d'eau d'Europe. Elle est retrouvée de l'Islande jusqu'en l'Espagne ainsi qu'en Europe Occidentale. De plus, on retrouve également des truites fario à l'état naturel dans les montagnes de l'Atlas, de la Sardaigne ou encore de la Corse, mais du fait de leur isolement, ces populations ont évolué au cours du temps pour devenir des sous-espèces à part entière.

Malgré son aire de répartition originelle importante, l'Homme n'a toutefois cessé d'implanter la truite fario dans d'autres pays. Une des premières motivations pour étendre l'aire de répartition de la truite fut le développement de la pêche sportive de cette espèce à travers le monde. De ce fait, la truite fario est également retrouvée dans des pays tels que l'Australie, la Nouvelle-Zélande, 46 états des Etats-Unis, le Canada, l'Amérique du Sud, etc... (Calviac, 2001).

La distribution de la truite dans son aire de répartition est fonction des caractéristiques du milieu suivantes :

- une eau inférieure à 19°C en été,
- des vitesses de courant moyennes à fortes,
- une présence d'habitats favorables à sa reproduction, sa nutrition, et sa protection.

En Région Auvergne, la truite Fario est présente sur la majorité des cours d'eau des deux bassins versant couvrant cette région, le bassin versant de la Loire et le bassin versant de la Garonne. Au niveau du département du Puy-de-Dôme, la truite fario est présente dans 7 500 kilomètres de cours d'eau sur les 7 800 que compte le département.

## **III. Description de l'habitat de la truite fario**

Malgré son aire de répartition importante, la truite fario ne peuple pas tous les cours d'eau et se présente en plus ou moins grande abondance. L'un des principaux facteurs régulant les populations des truites fario est l'habitat.



L'habitat se définit, du point de vue théorique, comme « l'ensemble des éléments du biotope dont la truite se sert pour la satisfaction de ses besoins et par extension, l'ensemble des biotopes où l'espèce se trouve » (Blondel, 1979). L'habitat trutticole se définit à la fois à partir des paramètres biotiques\* et mésologiques\*.

Les paramètres biotiques concernent plus particulièrement l'ensemble des interactions entre les organismes, tel que les ressources alimentaires, les relations trophiques de prédation, le parasitisme, etc... Toutefois ces paramètres sont difficilement quantifiables.

Les paramètres mésologiques regroupent toutes les caractéristiques propres au milieu et servent à caractériser l'habitat.

### **III.1. Les caractéristiques physiques de la rivière**

Les caractéristiques physiques de la rivière concernent le courant, la morphologie de son lit et la granulométrie de ses fonds, la température de l'eau et l'éclairement :

#### *III.1.a Le courant de la rivière*

Le courant de la rivière représente un paramètre essentiel à prendre en compte dans la description de l'habitat trutticole. Le courant entre en jeu de deux manières distinctes dans la description de l'habitat. Tout d'abord, d'une manière directe, en facilitant la dévalaison des juvéniles, favorisant ainsi la dispersion de l'espèce. La truite fario est un poisson morphologiquement apte à nager contre le courant. Cette caractéristique lui permet de se maintenir la tête dans le courant afin de surveiller l'arrivée de ses proies, et de les capturer assez rapidement. De plus, la truite montre un rhéotactisme\*. Le courant joue un rôle indirect par sa répercussion l'oxygénation des frayères, la modification et la sélection des substrats, la dérive de nourriture (Baglinière and Maisse, 1991).

#### *III.1.b La morphologie du lit*

Un autre facteur mésologique à prendre en compte pour la description de l'habitat trutticole est la morphologie du lit de la rivière. Les truites apprécient plus une rivière étroite et profonde qu'une rivière large et peu profonde. L'habitat et la température du cours d'eau en aval sont plus défavorables au développement de la truite. En effet, plus la rivière est large et peu profonde, plus l'eau est exposée à l'influence du vent et au soleil, et donc elle se réchauffe plus rapidement. De même, lorsque la rivière est trop large les risques



d'envasement et de perte de courant sont plus importants. Les rivières les plus favorables au développement des truites fario ont une pente de 0,5 à 2%. Cependant, la truite fario se retrouve également dans les cours de montagne, pour cela il est nécessaire que la rivière soit parcourue de gros blocs et de trous sous les berges qui permettent aux truites de s'y cacher. La nécessité de trouver des caches dans les rivières est primordiale dès que leur pente dépasse 7% (Calviac, 2001).

### *III.1.c La granulométrie des fonds*

Un autre caractère physique de la rivière à prendre en compte est la granulométrie des fonds. Elle est la résultante de la vitesse du courant, de la profondeur et de la nature géologique du bassin versant. Lorsque le fond de la rivière est constitué d'une granulométrie grossière, la formation de caches naturelles servant de refuges contre les prédateurs est importante. Le substrat grossier permet également à la truite de l'utiliser comme abri, contre les vitesses de courant élevées. Plus le cours d'eau est diversifié au niveau de sa granulométrie, plus la diversité de la population en termes de structuration d'âge sera respectée. De plus, elle est essentielle pour la reproduction. En effet, la granulométrie des fonds est importante pour les frayères : choix du site, réussite de ponte, creusement (Baglinière and Maisse, 1991). Si la granulométrie est trop fine (sable, vase), les œufs manquent d'oxygène et les frayères se colmatent et à *contrario*, si la granulométrie est trop grossière, la truite ne peut pas y creuser sa frayère (Calviac, 2001).

### *III.1.d La lumière*

La lumière a un rôle essentiel aussi bien sur le développement du poisson que sur le développement de l'habitat piscicole. Celle-ci a une influence sur le positionnement et l'orientation de la truite, à la fois par la vision et le phototactisme. Les alevins présentent un phototactisme négatif, c'est-à-dire qu'ils ont tendance à fuir la lumière, qui devient positif lors de la résorption de la vésicule vitelline entraînant alors la nage libre du poisson. Les truites âgées retrouvent un phototactisme négatif leur permettant de chercher des abris. Un autre rôle de la lumière est de modifier certains paramètres de l'habitat tels que la température et l'oxygène dissous issu de la photosynthèse des plantes et microalgues aquatiques.



### *III.1.e La température*

La truite fario est considérée comme une sténotherme d'eau froide, c'est-à-dire que c'est un organisme ne tolérant que de faibles variations de température autour de sa température moyenne. Les températures optimales pour la croissance de la truite dans les milieux naturels, sont comprises entre 7 et 19 °C. Au-delà du seuil de 19 °C, les truites rentrent en stress physiologiques et cessent de s'alimenter. À partir de 23 °C, on peut observer les premières mortalités. La température létale de la truite fario est de 25 °C (Baglinière and Maisse, 1991).

La température de l'eau va également avoir une influence indirecte sur d'autres paramètres, tels que la teneur en oxygène dissous, mais aussi sur le développement des invertébrés benthiques et sur la croissance des végétaux.

## **III.2. Les caractéristiques chimiques de la rivière**

### *III.2.a L'oxygène dissous*

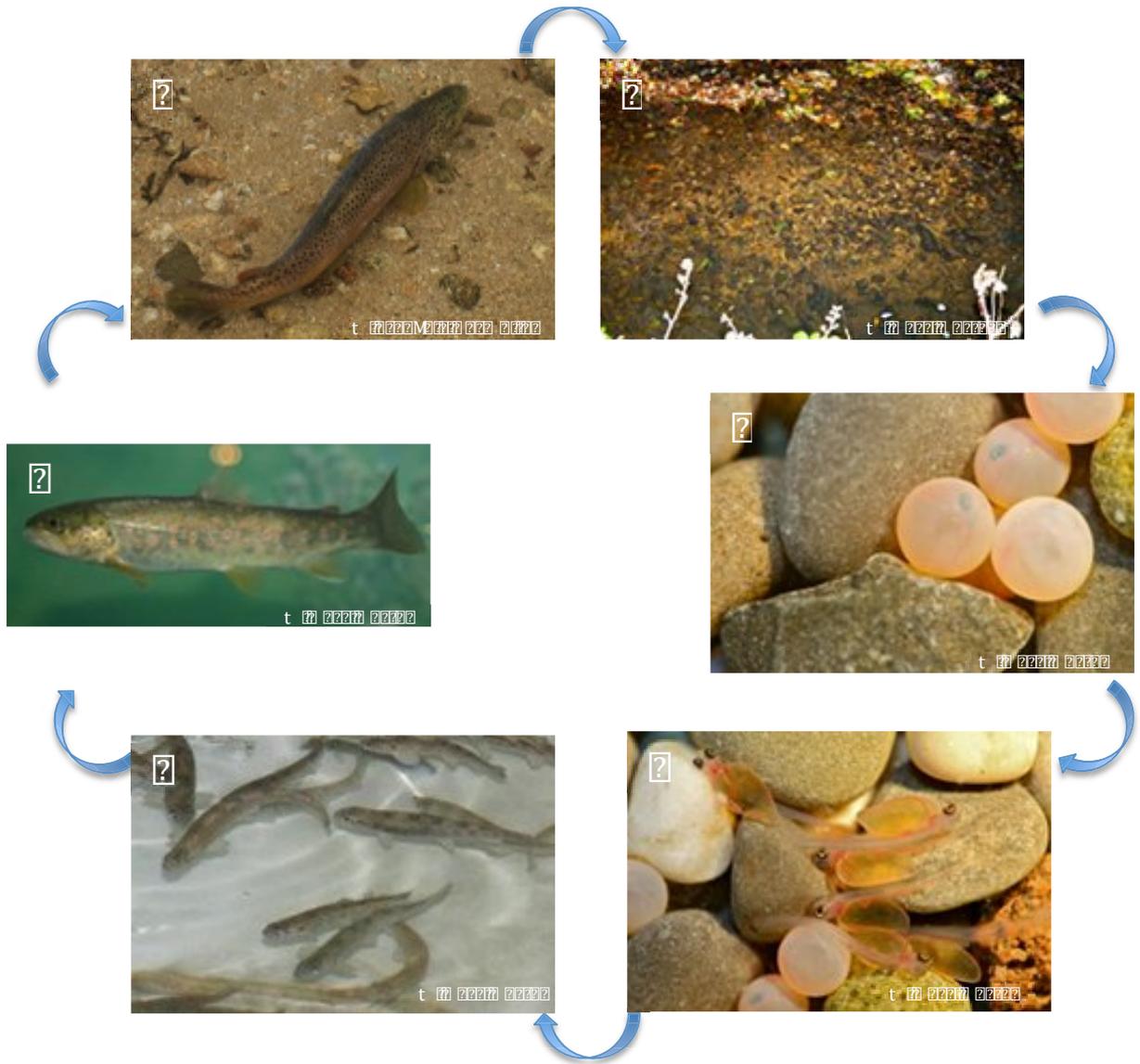
L'oxygène dissous est un critère primordial dans la vie de la truite fario qui est considérée comme une espèce très exigeante vis-à-vis de ce paramètre. Pour cette espèce, la concentration d'oxygène dissous doit être supérieure à 5mg/L avec un taux de saturation également supérieur à 80%. Par ailleurs, la teneur en oxygène dissous est en corrélation directe avec la température de l'eau. En effet, dans une eau à 5°C, la concentration de l'oxygène dissous sera de 13mg/L à saturation, tandis que dans une eau à 25°C, ce taux ne sera plus que de 6,5mg/L (Baglinière and Maisse, 1991).

### *III.2.b Les autres paramètres chimiques*

D'autres paramètres chimiques de la qualité de l'eau vont intervenir directement ou indirectement sur la qualité de l'habitat de la truite. Ces différents paramètres sont le pH, les concentrations de différents ions, tels que le calcium, le phosphore et les nitrates, ainsi que la présence de matières en suspension.

Pour que la truite ait un développement optimal, le pH de l'eau doit être compris entre 5 et 9,5. Des études antérieures ont démontré qu'un pH inférieur à 7 pouvait entraîner des effets néfastes sur la reproduction des truites en induisant la diminution de la fertilité des spermatozoïdes. De plus, des pH inférieurs à 4,5 entraînent la mort des alevins. Différents ions, notamment le calcium, les nitrates et le phosphore, impactent la valeur trophique de

?



?

?

? Résultat (évaluation) : du fait que les poissons ont des œufs qui se développent dans l'eau, y compris les poissons qui se reproduisent dans les rivières et les lacs, ils ont des œufs qui se développent dans l'eau. Les poissons qui se reproduisent dans les rivières et les lacs ont des œufs qui se développent dans l'eau. Les poissons qui se reproduisent dans les rivières et les lacs ont des œufs qui se développent dans l'eau.

?

?

?

?

?

?

?

?

l'eau. En effet, selon leur concentration, ces ions ont une influence sur la richesse en plancton, en périphyton, en algues et en plantes de la rivière (Baglinière and Maise, 1991). A titre d'exemple, les rivières granitiques sont moins productives que les rivières à eaux calcaires.

De plus, certains ions, comme les nitrites et l'ammonium, l'aluminium et les métaux lourds vont engendrer des toxicités aiguës (Baglinière and Maise, 1991). Un des derniers paramètres influençant la vie de la truite dans les rivières est la présence ou non de matières en suspension. Plus la rivière en sera chargée, plus il y aura un risque de colmatage des branchies de la truite et de colmatage des frayères.

### **III.3. La végétation des berges**

Les rivières à truites sont, la plupart du temps, des rivières avec des berges boisées, au moins partiellement. En effet, la végétation rivulaire surplombant l'eau ou y trempant, offre des zones d'ombres et de nombreux abris aux poissons. De plus, les macrophytes, végétaux aquatiques visibles à l'œil nu, vont avoir des effets indirects sur l'habitat de la rivière. Les macrophytes, par leur photosynthèse, vont entraîner une modification du pH et de l'oxygénation de l'eau. De plus, ils vont constituer un support pour la faune d'invertébrés dont la truite peut se nourrir. En effet lorsque les insectes tombent, ils se retrouvent dans la rivière et donc constituent une source de nourriture supplémentaire aux truites. De plus, une végétation très importante va engendrer une modification du courant, une sédimentation plus ou moins forte des sédiments ainsi qu'un colmatage possible des zones de frayères (Baglinière, 1991).

## **IV. Le cycle de vie de la truite fario**

Le cycle de vie de la truite Fario (Figure 14) peut être résumé en six étapes (AAPPMA.du.Breuchin.et.de.la.Haute.Lanterne):

- la ponte hivernale,
- l'incubation,
- la résorption de la vésicule vitelline,
- l'émergence,
- la croissance,
- et la maturité sexuelle.



#### **IV.1. La ponte hivernale**

La ponte hivernale, également nommé frai intervient dans des eaux froides, idéalement entre 6,5 et 9°C et bien oxygénées ( $[O_2] > 5,5$  mg/L), sur la période d'octobre à janvier. Les zones de reproduction sont généralement retrouvées dans les radiers et dans les plats courant, soit des milieux peu profonds (Baglinière, 1991). Les frayères sont caractérisées par des vitesses moyennes (40 à 60 cm/sec), des hauteurs d'eau de 30 à 40 cm et une granulométrie moyennement grossière (cailloux fins – 16 à 32 mm) (Richard, 1999).

#### **IV.2. L'incubation**

L'incubation, d'une durée de 400 degré/jour\*, dépend beaucoup de l'environnement (température, nourriture, oxygénation). En effet, l'eau doit être claire, oxygénée et de bonne qualité (toute pollution peut compromettre la survie des œufs).

#### **IV.3. La résorption de la vésicule vitelline**

La résorption de la vésicule vitelline, d'une durée de 360 degré/jour\*, correspond au moment où l'alevin sortant de l'œuf reste dans la frayère. Il ne peut pas encore nager et se nourrit grâce aux réserves contenues dans la vésicule vitelline qui se résorbe petit à petit.

#### **IV.4. L'émergence**

L'émergence correspond au moment où l'alevin sort de la frayère pour remplir en surface sa vessie natatoire d'air, après environ 3 mois passés sous les graviers. Cet alevin devient nageant et doit désormais trouver de la nourriture et un territoire.

#### **IV.5. La croissance**

La croissance de l'alevin permet à celui-ci d'augmenter sa taille ainsi que la dimension de son territoire. La truite de plaine sera généralement plus grosse que celle de montagne, car l'eau est moins riche en nourriture, et la rivière est plus étroite. En effet, la nature des sédiments sur lesquels coule la rivière détermine la vitesse de croissance des truites. Les ruisseaux coulant sur un substrat granitique ou tourbeux, aux eaux très acides et à la température basse sont moins favorables à une croissance rapide que les rivières traversant les sols calcaires. En effet, la température de l'eau pour une nutrition optimum doit être



comprise en 12 et 16°C. À peine 10 % des alevins survivront à ces premiers mois difficiles (Calviac, 2001).

#### **IV.6. La maturité sexuelle**

La maturité sexuelle de la truite fario est généralement atteinte à l'âge de 3 ans pour les femelles et 2 ans pour les mâles. Mais cette maturation peut avoir lieu plus précocement lorsque que la croissance de la truite se fait dans des conditions optimales.

#### **v. Mœurs et comportement**

Cette truite, bien que considérée comme sédentaire, effectue d'importants déplacements en phase de reproduction et de dévalaison (de 5 à 20 km) dans le réseau hydrologique.

La truite présente un comportement de prédateur diurne et nocturne. Il s'agit d'un poisson exclusivement carnivore, elle peut consommer aussi bien des insectes aquatiques ou aériens, des larves, des vers, des mollusques que des petits poissons. Lorsqu'elle atteint une taille de 30 cm, elle consomme principalement de petits poissons comme les Vairons, les Chabots. De plus, la truite rentre dans la chaîne alimentaire de l'Homme et donc son état de santé peut influencer celui de l'Homme.

Pour notre étude, les prélèvements en milieu naturel, ont été effectués durant la période estivale, afin d'obtenir une image la plus fidèle possible de la structure de la population, et de ne pas perturber le cycle de vie de la truite. De plus, les individus prélevés mesuraient entre 16 et 20 cm, ce qui correspond pour notre région à des individus ayant au moins passés deux ans dans le cours d'eau.

**Table 2 : Les différents membres de la superfamille des transporteurs « ATP Binding Cassette (ABC) ».**

<b>Sous Familles</b>	<b>Membres</b>
<b>ABCA</b>	ABCA1 à ABCA12
<b>ABCB</b>	ABCB1 à ABCB11
<b>ABCC</b>	ABCC1 à ABCC12
<b>ABCD</b>	ABCD1 à ABCD4
<b>ABCE</b>	ABCE1
<b>ABCF</b>	ABCF1 à ABCF3
<b>ABCG</b>	ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, ABCG8

## **E. Les transporteurs de type « ATP-binding cassette proteins » (ABC) :**

Les transporteurs de type « ATP-binding cassette proteins » (ABC) sont majoritairement des glycoprotéines membranaires très conservées au cours de l'évolution. Ils sont retrouvés chez les procaryotes et les eucaryotes, notamment chez les parasites, les plantes, les mammifères, dont l'Homme (Leslie et al., 2005). Dans le génome humain, 49 gènes correspondant aux ABC transporteurs ont été identifiés, mais seulement 47 transporteurs ont été mis en évidence jusqu'à présent. La comparaison des séquences des différents transporteurs permet de les classer en 7 sous-familles allant de A à G (Tableau 2). Bien que fonctionnant sur le même principe, ces sous familles présentent des structures, des fonctions et des arrangements différents.

Ces transporteurs membranaires sont impliqués dans le transport d'une large gamme de substrats tels que les xénobiotiques et leurs métabolites endogènes (molécules organiques et inorganiques, cations et/ou anions), ainsi que d'autres substrats endogènes comme les lipides, les sucres/polysaccharides, les acides aminés/peptides/protéines, les anions inorganiques, les vitamines (Raaijmakers, 2007; Sarkadi et al., 2006). Les protéines « Multidrug Resistance » font partie de la famille des ABC transporteurs.

### **I. Les protéines « Multidrug Resistance »**

La notion de protéines « Multidrug Resistance » est apparue au milieu des années 1970 (Danø, 1973; Juliano and Ling, 1976). Chez l'homme ainsi que chez les autres mammifères, les protéines « MDR » sont reconnues comme étant responsables de la chimiorésistance ou résistance croisée des cellules tumorales vis-à-vis d'agents anticancéreux. A l'heure actuelle, ces protéines sont plutôt reconnues comme étant un acteur majeur de défense à l'échelle cellulaire, d'où la notion de « multixenobiotic resistance » (MXR). En effet, très ubiquitaires, leur présence a été démontrée chez de nombreux organismes, procaryotes ou eucaryotes, et chez les modèles animal et végétal (Bamdad et al., 1999; Bamdad et al., 1997; Dudler and Sidler, 1998; Geisler et al., 2005; Gerlach et al., 1986; Krogstad et al., 1992; Kurelec, 1992; Loncar et al., 2010; Vache et al., 2007; Vache et al., 2006; Zaja et al., 2007). En réalité, ces protéines intitulées « MultiDrugs Resistance » sont des transporteurs membranaires de type



ATPasique avec un rôle détoxificateur. Elles sont à l'origine de l'efflux actif de xénobiotiques du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire. De plus, dans les conditions de contamination du milieu, leur expression augmenterait, afin d'expulser plus efficacement les différents types de xénobiotique (médicaments et/ou polluants) vers le milieu extracellulaire. Ce mécanisme permettrait donc de créer une « barrière de défense » à l'échelle cellulaire en réponse aux xénobiotiques (Bamdad et al., 1999; Bamdad et al., 1997; Sarkadi et al., 2006; Vache et al., 2007; Vache et al., 2006).

Chez l'Homme et les autres mammifères, les trois principaux types de protéines MDR comprennent les sous-familles de l'ABCB (ABCB1/MDR1/ « Permeability-glycoprotein » ou P-gp), l'ABCC (ABCC1/ « Multidrug resistance Related Protein » ou MRP1, ABCC2/MRP2, probablement aussi ABCC3-6, et ABCC10-11) et le ABCG (ABCG2/MXR/ « Breast Cancer Resistance Protein » ou BCRP) (Natarajan et al., 2012; Sarkadi et al., 2006). Dans le cadre de nos travaux, nous nous sommes intéressés à deux d'entre elles, la P-gp et la BCRP.

## **I.1. La P-gp**

### *I.1.a Généralités*

Chez l'Homme, la « Permeability-glycoprotein » ou la « P-gp » est codée par le gène *abcb1*, également appelé *mdr1*. Elle appartient à la sous-famille des ABC transporteurs de type B. La P-gp est la première glycoprotéine qui fut identifiée comme étant responsable du phénotype « Multidrug Resistance » (MDR) ou « la résistance croisée des cellules tumorales vis-à-vis d'agents anticancéreux » et, de ce fait, elle est extrêmement connue et étudiée (Litman et al., 2001). Très ubiquitaire, la P-gp est exprimée dans de nombreuses espèces procaryotes et eucaryotes, de type animal ou végétal.

En effet, chez l'homme et les autres mammifères, plusieurs tissus et organes normaux expriment naturellement le gène MDR1. C'est le cas de la barrière hématoencéphalique, de la glande surrénale, du pancréas, du foie et du rein, des cellules hématopoïétiques, des cellules souches, etc...

Cette glycoprotéine est également naturellement exprimée chez les bactéries (Gerlach et al., 1986), le protozoaire cilié d'eau douce *Tetrahymena pyriformis* (Bamdad et al., 1999; Bamdad et al., 1997; Camarès O, 2004), les parasites (Bottova et al., 2009; Krogstad et al., 1992), les invertébrés aquatiques comme le mollusque bivalve dulçaquicole *Anodonta*



*cygnera* (Kurelec, 1992; Kurelec and Pivčević, 1989), les mollusques gastéropodes et les éponges (Bard, 2000), les poissons (Bard, 2000; Loncar et al., 2010; Zaja et al., 2007), les insectes comme *Drosophila melanogaster* (Vache et al., 2007; Vache et al., 2006), et les plantes (Dudler and Sidler, 1998; Geisler et al., 2005).

Concernant les organismes aquatiques, comme indiqué ci-dessus, des protéines de type MDR intitulées P-gp ou « P-gp-like » ont été décrites chez un grand nombre d'entre eux, comme les protozoaires d'eau douce, les éponges, les moules, les huîtres, les palourdes, les vers et les poissons (Bard, 2000; Kurelec, 1992; Kurelec and Pivčević, 1989; Loncar et al., 2010; Zaja et al., 2007).

Les protéines P-gp retrouvées, soit au niveau cellulaire, soit au niveau tissulaire, présentent des poids moléculaires variables compris entre 66 et 170 kDa. En effet, l'expression de deux « P-gp-like » de poids moléculaire de 66 et de 96 kDa a été mise en évidence chez le cilié *Tetrahymena pyriformis* (Bamdad et al., 1999; Bamdad et al., 1997; Camarès O, 2004). L'expression d'une P-gp de 110 kDa a été démontrée dans le tissu épidermal et le tractus digestif antérieur du ver aquatique adulte, *Urechis caupo* (Holland Toomey and Epel, 1993). Une P-gp de 125 à 130 kDa a été identifiée dans les membranes des cellules des éponges marines *Geodia cydonium*, *Verongia aerophoba* et *Suberites domuncula* (Kurelec, 1992) et une de 170 kDa dans les branchies des moules *Mytilus californianus*, *Mytilus galloprovincialis* et *Mytilus edulis* (Eufemia and Epel, 2000; Minier and Moore, 1996; Smital et al., 2003). Cette différence de poids moléculaire observée entre les différentes P-gp est due à l'état de glycosylation retrouvée.

Chez les organismes aquatiques vertébrés, l'expression de la P-gp a été démontrée chez les poissons guppy (Hemmer et al., 1995). Chez la truite arc-en-ciel, l'expression d'une P-gp de 170 kDa a été mise en évidence dans le foie et des hépatocytes en culture (Sturm et al., 2001). En 2011, Fischer et al ont recherché la présence des plusieurs transporteurs ABC dans différentes lignées cellulaires issues de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), notamment, des transcrits ABCB1 dans les différentes lignées cellulaires issus de différents tissus ou organes de la truite. En effet, ABCB1 est faiblement exprimée dans les lignées issues des gonades, moyennement exprimée dans le foie et l'intestin et plus fortement exprimée dans les lignées issues des branchies et du cerveau (Fischer et al., 2011).



### *1.1.b Structure*

La structure de référence pour la P-gp est celle décrite chez l'homme. La P-gp est une glycoprotéine transmembranaire présentant un poids moléculaire de 170 kDa. Elle est composée de deux domaines transmembranaires (TMD) et de deux domaines de liaisons aux nucléotides (NBD) (Figure 15). Ces deux domaines sont reliés entre eux par un domaine de liaison (ou région « linker ») qui peut être plus ou moins phosphorylé par différentes kinases (Chambers et al., 1992; Mellado and Horwitz, 1987).

Le domaine transmembranaire (TMD) est composé de six fragments organisés en hélice  $\alpha$ . Les domaines de liaison aux nucléotides (NBD) sont des sites de fixation de l'ATP qui sont localisés du côté cytoplasmique. Ils sont caractérisés par la présence de trois motifs structuraux hautement conservés entre les espèces.

Le premier motif rencontré est le motif Walker A (P-loop) constitué d'une séquence riche en glycine (GS/CGKS). Le deuxième est le motif Walker B, constitué de la séquence ILLLDE et enfin, le troisième motif caractéristique est le motif C qui représente la signature spécifique des protéines ABC avec la séquence LSGGQ/E. Des domaines en boucles caractéristiques sont également retrouvés dans ces domaines NBD : la boucle Q ou « Q-loop » et la boucle D ou « D-loop ». Le motif de signature des protéines ABC est spécifique de cette famille de protéines alors que les motifs Walker A et B sont retrouvés dans de nombreuses autres protéines utilisant l'ATP (Hyde et al., 1990; Walker et al., 1982).

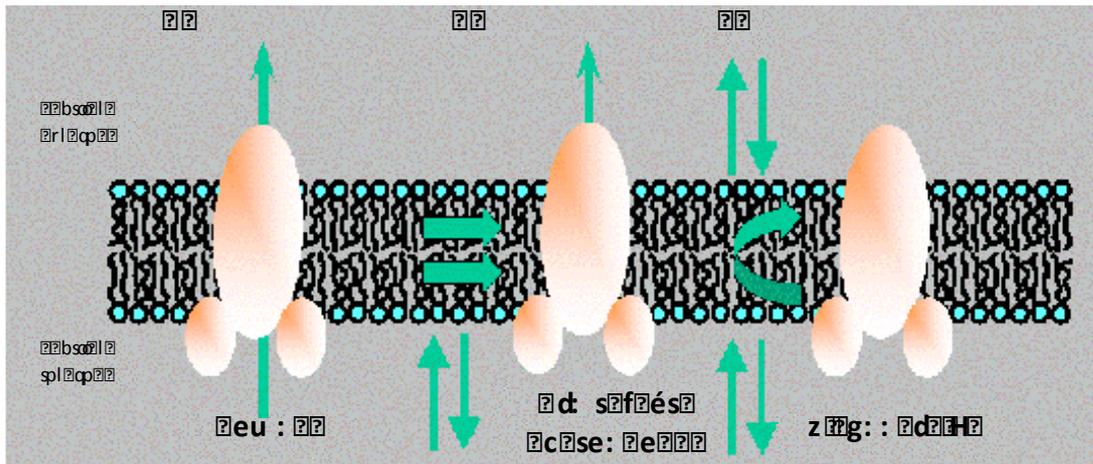
Suite à l'association de ces deux domaines, l'ATP est hydrolysé en présence de  $Mg^{2+}$  ou, plus rarement, avec d'autres cations bivalents comme  $Ca^{2+}$ , fournissant ainsi l'énergie nécessaire au transport des différentes molécules.

### *1.1.c Fonctions*

Appartenant à la famille des transporteurs ABC, le rôle majeur de la P-gp est donc l'élimination par efflux d'un grand nombre de composés hydrophobes, généralement de haut poids moléculaire (Tableau 3). Trois hypothèses différentes décrivent le mode de transport des substrats par la « pompe » P-gp (Figure 16).

La première théorie, la plus ancienne et la plus controversée, est celle qui attribue une fonction de pompe d'efflux de xénobiotique à la P-gp. En effet, elle suggère que la P-gp expulserait directement, les substrats rentrés dans les cellules, du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire.

?



?

A cell membrane is a phospholipid bilayer that separates the cell from its environment. It is composed of hydrophilic heads and hydrophobic tails. Transporters are embedded in the membrane, allowing for the movement of substances across it. The diagram shows three transporters: one for absorption (eu :), one for secretion (d szállítás), and one for lateral movement (g: d). Green arrows indicate the direction of transport.

?

?

La seconde théorie intitulée « Flippase » suppose que la P-gp n'a accès à son substrat qu'au sein de la bicouche lipidique membranaire. En effet, d'après cette hypothèse, la P-gp serait responsable d'une translocation de substrat du feuillet interne de la membrane cellulaire vers le feuillet externe, en mettant en jeu un mécanisme de « flippase ». De cette manière, le xénobiotique serait expulsé vers le milieu extracellulaire via le feuillet externe de la membrane (Chen et al., 2001).

La dernière hypothèse, la plus défendue actuellement, est basée sur un mode de transport intitulé « aspirateur hydrophobe ». Dans ce cas, le substrat passe du milieu intracellulaire dans les deux feuillets interne et externe et la P-gp accéderait à son substrat via le feuillet interne (Shapiro and Ling, 1997).

Concernant les substrats pris en charge par la P-gp, il s'agit, en général, des molécules hydrophobes, de haut poids moléculaire et présentant des cycles aromatiques. De ce fait, la P-gp reconnaît des substrats de structure et de propriétés très variées, tels que des médicaments, et notamment les anticancéreux, des antifongiques, des pesticides, des anthelminthiques, des acaricides, des métaux lourds, des hydrocarbures aromatiques polycycliques (Sarkadi et al., 2006).

## **I.2. La BCRP**

### *1.2.a Généralités*

Chez l'Homme, cette glycoprotéine est codée par le gène *abcg2*, situé sur le chromosome 4. Elle est retrouvée également sous la dénomination de « Mitoxantrone Resistance-associated Protein » (MXR), « ABC transporter expressed in the placenta » (ABCP) ou « Breast Cancer Resistance Protein » (BCRP). Cette glycoprotéine a été identifiée pour la première fois dans une lignée cellulaire issue d'un cancer du sein (Allikmets et al., 1998; Doyle et al., 1998). Outre les cellules cancéreuses, ABCG2 est exprimée naturellement chez l'Homme au niveau de nombreux organes comme le placenta où elle joue un rôle de protection du fœtus contre les xénobiotiques présents dans la circulation sanguine maternelle. Mais cette protéine est également présente au niveau de nombreux organes et tissus, tels que les testicules, l'intestin, le foie, les cellules souches hématopoïétiques, les glandes mammaires et la barrière hématoencéphalique (Maliapaard et al., 2001; Natarajan et al., 2012; Robey et al., 2007). Cette glycoprotéine a également été identifiée chez d'autres espèces, telles que la souris (Allen et al., 1999) et le porc (Eisenblätter et al., 2003) .



Outre les mammifères, ABCG2 est une protéine MDR encore très peu étudiée chez les organismes aquatiques. A l'heure actuelle, seule son expression génique a été analysée chez le poisson zèbre (*Danio rerio*), et la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Dean and Annilo, 2005; Zaja et al., 2008b). En effet, l'expression des transcrits d'ABCG2 a été mise en évidence dans le foie et dans les cultures primaires d'hépatocytes de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Au niveau du foie de la truite arc-en-ciel, l'expression des transcrits d'ABCG2 est 42 fois supérieure à celle des transcrits d'ABCB1. Cette étude montre l'existence des deux transporteurs majoritairement impliqués dans le transport des xénobiotiques (Zaja et al., 2008b).

De plus, une autre étude, réalisée par Fischer (2011), a montré l'expression des transcrits d'ABCG2 dans différentes lignées cellulaires dérivées de différents tissus de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). En effet, la présence des transcrits d'ABCG2 a été retrouvée dans les lignées dérivées du foie, des branchies, du cerveau, des gonades et de l'intestin de la truite, mais avec des proportions différentes (Fischer et al., 2011).

### *1.2.b Structure*

Le poids moléculaire de BCRP est de l'ordre de 72 kDa. Elle ne possède qu'un seul domaine TMD et un seul domaine NBD (Figure 17). Pour former une pompe fonctionnelle, la BCRP s'assemble avec une autre protéine BCRP, par l'intermédiaire des ponts disulfures, afin de former un transporteur entier avec la capacité d'efflux de xénobiotiques (Natarajan et al., 2012; Sarkadi et al., 2006).

### *1.2.c Fonction*

La BCRP a, comme molécules cibles, une grande variété de xénobiotiques, principalement des agents chimiothérapeutiques (mitoxantrone, doxorubicine, etc...) et certains antibiotiques (tétracyclines, fluoroquinolones, etc...), mais également des métabolites intracellulaires (Velamakanni et al., 2007). De plus, il a été démontré qu'elle avait aussi un rôle dans l'excrétion de substances endogènes telles que les acides biliaires.



## **II. Notion de « chimio-immunité »**

La fonction ultime du système immunitaire est de rechercher et de détruire les agents étrangers à l'organisme (microorganismes, virus...) et/ ou les composés toxiques hydrophiles dans notre corps. Cependant, ce système classique est pratiquement inefficace dans le cas des molécules toxiques hydrophobes. En effet, de par leur caractéristique hydrophobe, ces molécules peuvent aisément passer la barrière de la membrane cellulaire. La protection des cellules vis-à-vis des molécules toxiques hydrophobes est alors due aux mécanismes de transports et aux métabolismes de détoxification.

Sarkadi et al. (2006), suggèrent donc que les protéines MDR participent d'une manière active à un système de défense similaire au système immunitaire, et que le « réseau » formé par ces transporteurs contribue majoritairement à la « chimio-immunité » des organismes vivants. Les protéines MDR majoritairement impliquées dans le transport des composés toxiques sont principalement la protéine P-gp et la protéine ABCG2.

### **II.1. « Chimio-immunité » et métabolisme des toxiques**

La notion de « chimio-immunité » se définit par une action coordonnée des systèmes de transports spécifiques et de métabolisation cellulaire à l'encontre des xénobiotiques. Cette action coordonnée des deux systèmes peut se résumer en quatre phases.

La première, nommée phase 0, correspond à l'efflux des xénobiotiques avant que ceux-ci ne pénètrent dans le milieu intracellulaire (Stieger and Meier, 1998; Van Montfoort et al., 2003). Dans cette phase, les protéines MDR vont « pomper » les composés toxiques hydrophobes, soit lorsque ceux-ci se trouvent au niveau de la membrane cellulaire, soit lorsqu'il se trouve dans l'environnement proche de cette membrane. Cette phase 0 permet un « pompage préventif » avant une atteinte du milieu intracellulaire par les composés toxiques (Sarkadi et al., 2006).

Lorsque le xénobiotique pénètre dans la cellule, l'organisme met alors en place un système de défense, nommé système de détoxification. Ce dernier met en jeu, différentes réactions enzymatiques afin de modifier le xénobiotique et faciliter son élimination par la cellule. Ce système est composé de deux phases :

- la phase I, ou fonctionnalisation, se caractérise par l'oxydation du composé à éliminer. Les réactions enzymatiques, intervenant dans la phase de fonctionnalisation ou phase I, font intervenir des monooxygénases, généralement appartenant à la famille des



cytochromes P450. Ces enzymes utilisent l'oxygène et des cofacteurs comme le NADH pour ajouter un groupement réactif, tel qu'un groupement hydroxyl, afin d'obtenir un composé réactif. Cette première phase permet l'obtention d'un métabolite intermédiaire qui a la particularité d'être plus polaire et donc plus soluble que le composé initial. Néanmoins, cette transformation peut rendre le métabolite intermédiaire plus toxique. Il s'agit alors d'une réaction de bioactivation.

- la phase II ou de conjugaison fait intervenir différentes enzymes, telles que les glutathion-S-transférases (GST), les UDP-glucuronosyltransférases (UDPGT), les sulphotransférases (ST) et les époxydes hydrolases (EH). Ces enzymes peuvent prendre en charge des xénobiotiques entrant dans la cellule, et les composés préalablement modifiés par les enzymes de phase I, afin de les transformer en composés solubles dans l'eau. Ils pourront alors être éliminés de l'organisme, par la suite, à travers la bile et l'urine.

Suite aux phases I et II du système de détoxification, le xénobiotique ou les composés modifiés doivent être éliminés de la cellule. Cette élimination correspond à la phase III et fait intervenir les protéines de type MDR. Cette phase d'élimination des composés détoxifiés permet de limiter leur accumulation dans le milieu intracellulaire.

## **II.2. « Chimio-immunité » innée**

Les protéines MDR, impliquées dans les mécanismes de transports des composés toxiques, doivent réagir avec un nombre important de composés, qui, pour la plupart, n'ont jamais été rencontrés par l'organisme. Cette étape de reconnaissance est donc une phase essentielle dans la mise en place des mécanismes de défense. Les deux transporteurs MDR les plus impliqués dans ce phénomène sont les protéines P-gp et ABCG2. Ces deux protéines doivent donc reconnaître et éliminer des milliers de composés hydrophobes différents sans pour autant éliminer les molécules essentielles à l'organisme. Cette différenciation par les deux protéines est encore un mécanisme inconnu. En effet, peu d'informations sont disponibles concernant la manière dont les protéines reconnaissent les molécules étrangères.

## **II.3. « Chimio-immunité » adaptative, mémoire et hypersensibilité**

Sarkadi et al. (2006) posent également l'hypothèse que la résistance aux xénobiotiques, via les transporteurs, peut montrer une phase d'adaptation, avec l'augmentation de la



spécificité et de l'efficacité des transporteurs MDR vis-à-vis des composés toxiques, comme c'est le cas pour le système immunitaire classique.

De nombreuses données indiquent une augmentation de l'expression des transporteurs MDR dans les cellules suite à une induction par les agents cytotoxiques. Ce mécanisme peut conduire à une hypersensibilisation des cellules. Cette hypersensibilité va se traduire par l'expulsion de composés chimiques qui ne sont pas des substrats des deux protéines MDR. Ce phénomène a été observé pour des espèces aquatiques tels que les moules (Shuilleabhain et al., 2005; Smital et al., 2004).

Le mécanisme de « chimio-immunité » semble très proche du système immunitaire classique. L'action conjointe de ces deux mécanismes permettrait une lutte réelle contre les molécules étrangères à notre organisme.



## F. Les protéines MDR : un biomarqueur potentiel pour l'environnement

La pollution de l'environnement, qu'elle soit édaphique, atmosphérique ou aquatique, a un impact non négligeable sur les organismes colonisant les milieux contaminés. Cependant, de nombreuses espèces survivent et s'adaptent à ces différentes contaminations. Généralement, cette adaptation s'accompagne par la mise en place de système de défense au sein de ces organismes (Pain and Parant, 2003), notamment par le renforcement de la voie de métabolisation/détoxification de xénobiotiques, et également par la voie des transporteurs de type « Multidrug Resistance » (MDR) induisant l'efflux de xénobiotiques ou des métabolites issus de xénobiotiques vers le milieu extracellulaire.

Notre groupe de recherche, dans lequel cette thèse a été préparée, s'intéresse depuis de nombreuses années au développement de biomarqueurs prédictifs à partir de l'expression de la P-gp chez différents organismes. En effet, les travaux antérieurs de l'équipe ont démontré que cette glycoprotéine MDR a la capacité d'expulser vers le milieu extracellulaire, différents types de xénobiotiques notamment différents Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP). De plus, dans des conditions de contamination du milieu par ces contaminants, son expression augmente afin de créer une barrière membranaire de défense à l'échelle cellulaire vis-à-vis de ces substances toxiques. Cette augmentation d'expression peut être quantifiée à l'échelle cellulaire et moléculaire. Cette propriété de la P-gp comme étant un outil de détection de la pollution de l'environnement a été mise en évidence en réponse à une pollution atmosphérique par les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques, ainsi qu'en réponse à une pollution aquatique par les mêmes polluants. En effet, les travaux antérieurs de l'équipe basés sur l'étude de l'expression du complexe « mdr/P-gp » chez un organisme modèle, la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster*, en réponse à la pollution atmosphérique par les HAP (Vache et al., 2007; Vache et al., 2006) ont mis en évidence une induction de type dose-dépendante de la P-gp chez la drosophile en réponse à une exposition de concentration croissante de Benzo-a-pyrène (B[a]P) en conditions contrôlées ou dans le milieu naturel (Vache et al., 2006). Ces travaux ont tout d'abord permis de mettre en évidence l'expression ubiquitaire de la P-gp chez la drosophile



adulte retrouvée au niveau de la tête, du thorax et de l'abdomen ainsi que dans les antennes, les pièces buccales et les organes reproducteurs. Suite à ces résultats, des expériences d'exposition des drosophiles à un HAP modèle le benzo[a]pyrène, au laboratoire et ensuite sur le terrain, à proximité d'une usine de charbon de bois dont l'atmosphère était contaminée par un ensemble de HAP, ont clairement montré une réponse de type dose-dépendante du complexe mdr/P-gp des drosophiles. De plus, la réponse est extrêmement sensible car au laboratoire, elle est obtenue après un temps d'exposition minimum de six secondes et parfaitement quantifiable, car elle peut être mesurée aussi bien chez la mouche entière que sur les échantillons d'organes ou de tissus.

Par la suite, des expériences menées sur le terrain ont également montré une réponse dose-dépendante de la P-gp des drosophiles exposées dans des conditions non contrôlées, à de faibles ou de fortes concentrations en HAP (Vache et al., 2006).

De même, d'autres travaux ont déjà été menés au sein de notre équipe, sur l'étude de l'expression de la P-gp chez le protozoaire cilié d'eau douce, *Tetrahymena pyriformis* en réponse à une pollution aquatique par les HAP (Bamdad et al., 1999; Bamdad et al., 1997; Camarès O, 2004). Ces travaux ont également montré une nette induction dose dépendante de l'expression de la P-gp en présence des concentrations croissantes de benzo[a]pyrène dans le milieu de culture de *Tetrahymena pyriformis*. En parallèle, les expériences de « screening » des HAP utilisant la cytométrie en flux ont montré que la P-gp reconnaît de nombreux HAP ayant des structures de trois à cinq cycles benzéniques.

Dans les deux modèles étudiés par notre équipe, l'induction de la P-gp par le xénobiotique est (i) très rapide et apparaît après une très courte exposition aux xénobiotiques (de quelques secondes à quelques heures), (ii) sensible (gamme de concentrations allant des nM aux  $\mu$ M), (iii) reproductible.

De nombreuses autres études ont également montré une augmentation du niveau d'expression des transporteurs MDR, notamment la protéine P-gp dans des organismes aquatiques vivant dans des milieux contaminés. Minier (2006) ont observée une variation de l'expression des protéines MXR d'huitres et de moules selon le niveau de contamination des sites par des polluants organiques. Ces auteurs ont également suivi l'expression de la P-gp dans les branchies et les hémocytes de la moule, *Mytilus edulis*. Dans cette étude, les chercheurs ont mesuré l'activité de transport de la P-gp à travers la capacité des hémocytes de la moule à expulser un substrat de la P-gp, la rhodamine 123 (un colorant vital et reconnu



comme étant une molécule cible pour la P-gp des mammifères). Dans cette étude, les cellules sanguines de moules échantillonnées chez les moules prélevées dans un zone contaminée par des hydrocarbures aromatiques polycycliques montrent une accumulation faible du colorant par rapport aux cellules des animaux provenant d'une zone saine. De plus, cette diminution d'accumulation de la Rhodamine est associée à une augmentation de l'expression des protéines MDR dans les cellules de la zone contaminée (Minier and Moore, 1996).

Ce mécanisme de résistance aux « multixénobiotiques » permet aux organismes aquatiques de renforcer leur système de détoxification en limitant l'entrée des polluants dans les organismes et en facilitant leur expulsion ou celle des métabolites créés par le système de détoxification.



# Résultats Expérimentaux



## **Chapitre II : Mise au point du biomarqueur Sentinelle et sa validation en milieu naturel**



L'objet de nos travaux de recherche concerne le développement d'un biomarqueur sentinelle en réponse à la pollution aquatique. Le biomarqueur proposé est basé sur le niveau d'expression de deux protéines de phénotype « MultiDrug Resistance », la protéine ABCG2-like et la P-gp, dans les globules rouges de la truite fario.

**Dans ce contexte, nous avons commencé nos travaux par l'étude de l'expression et de la quantification de la protéine ABCG2-like et de la P-gp dans les globules rouges de la truite fario.** Cette étude a été réalisée grâce à la technique de Western-blot, utilisant l'anticorps monoclonal anti-P-gp C219 sur des culots secs obtenus à partir des globules rouges de la truite fario. Ces expériences ont mis en évidence l'expression de la protéine ABCG2-like, d'un poids moléculaire de 75 kDa, et de la P-gp, de poids moléculaire de 140 kDa. Après la mise en évidence de l'expression de ces protéines MDR dans les érythrocytes de truite, nous avons cherché à montrer leur induction par la présence de xénobiotiques. Cette expérience ne pouvant être réalisée qu'en conditions *in vitro*, des cultures primaires de globules rouges de truite ont donc été développées. Pour cela, nous avons testé différentes conditions de cultures telles que (i) le nombre de cellules nécessaires à l'ensemencement, (ii) le type de milieu de culture adapté à ces types de cellules, (iii) les différents réactifs nécessaires à la réalisation de la culture et le maintien en vie des cellules sanguines, (iv) l'addition ou non du sérum de veau fœtal, (v) la température d'incubation adaptée aux érythrocytes de truite ainsi que (vi) la nécessité ou non d'une agitation. Ces différentes expériences nous ont permis d'obtenir les conditions optimales pour la mise en culture des érythrocytes de truite fario.

**A la suite de la détermination des conditions optimales de cultures, nous avons pu analyser les modalités d'expression de la protéine ABCG2-like et de la P-gp,** après exposition à des concentrations croissantes de xénobiotique. Le polluant modèle, choisi pour ces expériences, est le Benzo[a]pyrène (B[a]P), de propriété cytotoxique, génotoxique et cancérigène, et appartenant à la famille des Hydrocarbures Aromatiques Polycyclique (HAP). En effet, chez d'autres organismes modèles, les HAP, et notamment le B[a]P, sont reconnus comme étant la cible de la P-gp et à l'origine d'une induction de son expression (Bamdad et al., 1999; Bamdad et al., 1997; Vache et al., 2007; Vache et al., 2006). L'exposition des cultures d'érythrocytes aux concentrations croissantes de B[a]P ont montré



une nette induction des deux protéines MDR, ainsi qu'une réponse relais de la P-gp et de la protéine ABCG2-like en réponse au xénobiotique testé.

Parallèlement à ces expériences, nous avons aussi analysé l'impact de la toxicité du B[a]P sur la croissance des érythrocytes en culture primaire au cours du temps. Aucune toxicité du B[a]P sur les érythrocytes de truite fario n'a été relevée. De plus, nous avons également vérifié la fonctionnalité des pompes MDR (Influx/efflux) des érythrocytes de truite par la technique de cytométrie en flux en présence du B[a]P et d'autres molécules cibles pour les protéines MDR. Ces différentes expériences ont montré une activité des pompes MDR en réponse aux molécules analysées.

**Afin de tester en milieu naturel les résultats obtenus en conditions contrôlées**, nous avons analysé l'expression des deux protéines MDR dans des globules rouges de truites fario prélevées dans trois rivières présentant « potentiellement » des niveaux de pollution différentes. Les érythrocytes des truites prélevées dans une zone présentant une contamination très faible, ont montré une expression uniquement de la protéine ABCG2-like. Lorsque les truites sont prélevées dans un site présentant une pollution sensiblement plus élevée, une expression de la protéine ABCG2-like et de la P-gp est observée, et cette expression est nettement plus forte lorsque les truites proviennent d'un site présentant une pollution élevée.

Les différents résultats obtenus sont rapportés dans la publication n°1 intitulée « **Aquatic sentinel biomarker development from coexpression of P-gp and ABCG2-like protein of brown trout erythrocytes** » (soumise) et ont fait l'objet d'un brevet, déposé le 09 décembre 2011 sous le n°11 61429.

**Suite à ces premiers résultats, il était nécessaire de démontrer la pertinence de l'utilisation de ce biomarqueur sentinelle par rapport aux indices existants.** Pour cela, le niveau de coexpression des deux protéines MDR a été analysé sur des truites fario sauvages prélevées dans différentes rivières, en parallèle de l'analyse des valeurs données par deux indices utilisés classiquement pour déterminer la qualité des milieux aquatiques. Ces deux indices sont l'Indice Poisson Rivière (IPR) et l'Indice de Population de Truite (IPT). Le biomarqueur sentinelle a tout d'abord été testé au niveau de deux zones de rivière



présentant des pollutions contrastées. Chez des truites fario provenant d'une rivière très peu contaminée, seule la protéine ABCG2-like est exprimée. Alors que les érythrocytes de truite fario provenant d'une portion de rivière significativement contaminée expriment les deux protéines. Nous avons ensuite analysé le niveau d'expression des deux protéines MDR dans des érythrocytes de truites fario provenant de l'amont et de l'aval d'un site soumis à pollution. Les résultats obtenus montrent une augmentation significative de l'expression, soit de l'une des deux protéines, soit des deux protéines, indiquant ainsi un degré de contamination différent entre l'amont et l'aval du site examiné. Nous avons, enfin, étudié le niveau de coexpression des protéines ABCG2-like et P-gp chez des truites fario prélevées sur différentes zones d'une même rivière, le long d'un gradient amont-aval de qualité des eaux. Les résultats montrent une coexpression des deux protéines MDR, indiquant une contamination sur tous les sites analysés. Cependant, une contamination plus importante d'un des sites est révélée par une augmentation significative de la P-gp.

L'ensemble de ces résultats a permis de montrer la capacité du biomarqueur sentinelle à mettre en évidence les différents degrés de pollution d'un cours d'eau. De plus, le biomarqueur sentinelle, qui résulte d'une mesure rapide et reproductible, apporte des informations complémentaires et plus intégratives que celles fournies par les indices IPR et IPT.

Les différents résultats obtenus sur les truites fario issues des différents cours d'eau sont présentés dans le chapitre intitulé « **Test du biomarqueur « Sentinelle » sur des truites fario provenant de différentes rivières du département du Puy-de-Dôme** » (article en préparation).



## **A. Aquatic sentinel biomarker development based on co-expression of Multidrug Resistance proteins in brown trout erythrocytes**

Emeline VALTON<sup>1-2-3</sup>, Christian AMBLARD<sup>1-2</sup>, & Mahchid BAMDAD<sup>1-2-3\*</sup>

1 – Clermont Université – Université Blaise Pascal - LMGE – UMR CNRS 6023 - U.F.R. Sciences et Technologies- 24, avenue des Landais, BP 80026- 63171 AUBIERE CEDEX France.

2 – CNRS, UMR 6023, LMGE, F-63177 Aubière, France

3 – present address: Clermont Université - Université d’Auvergne - ERTICA site IUT – EA Institut Universitaire de Technologie, département génie biologique, Ensemble universitaire des Cèzeaux, B.P. 86 - 63172 AUBIERE CEDEX France.

\*Corresponding author

Key words: Erythrocytes; Brown trout; P-gp; ABCG2-like protein; BaP, sentinel biomarker

Short title: MDR trout erythrocytes, sentinel aquatic biomarker

### **Abstract**

Fish, particularly salmonids, are integrative organisms with regard to environmental conditions, especially water quality. The bloodstream is the site of transport and accumulation of physiological molecules and xenobiotics. Multidrug resistance (MDR) proteins are ubiquitous “detoxification membrane transporters” that are involved in the cellular efflux of xenobiotics.

This study investigated the development of sentinel biomarkers based on the expression of two major MDR erythrocyte proteins in the brown trout’s response to aquatic pollution. After developing a primary erythrocyte culture, the MDR biomarker was developed in a controlled medium. Western blot analysis showed that, in cell culture, the erythrocytes co-expressed 140-kDa P-gp and 75-kDa ABCG2-like proteins. Trout erythrocytes exposed to benzo-a-pyren (BaP), a target MDR pollutant, showed no toxicity. Flow cytometry analysis in the presence of various MDR target compounds showed that the erythrocytes acted as detoxification efflux pumps. Exposure of erythrocyte cell cultures to increasing concentrations of BaP increased, in a dose-dependent manner, the expression of ABCG2-like



protein and P-gp. However, in the presence of low concentrations of BaP, ABCG2-like protein expression predominated, whereas with high BaP concentrations, P-gp expression predominated. The biomarker was then developed in a natural environment, using the erythrocytes of brown trout collected from three river sites located in the Auvergne region of France, each with different degrees of pollution. In “*Vallée Chaudefour*”, a natural site with little pollution, only the ABCG2-like protein was expressed. In “*Lomprat*” water station, located in a small village with some domestic pollution, there was a similar expression of the ABCG2-like protein, together with a significantly increased expression of P-gp. At the “*Issoire*” water station, located in a small industrial town, the expression of both MDR proteins was significantly increased. *In vitro* and field experiments suggest that, in brown trout erythrocytes, ABCG2-like protein has a vanguard protective function and P-gp has a defensive function and that their expression is modulated according to the degree of aquatic pollution. This suggests that trout MDR erythrocytes could be used as sentinel biomarkers for aquatic pollution. Sentinel biomarkers could be used as a predictive biological tool to detect the degree of water pollution.

## I. Introduction

Environmental pollution and its impact on inducing pernicious diseases have become major issues in public health and the preservation of biodiversity. There are many pollutants, with various structures and properties, that circulate in the air, soil and water and contaminate all the organisms in their ecosystems. The pollutants also flow through the contaminated organisms *via* the food chain, to man. Thus, environmental pollution may cause chronic toxicity in contaminated organisms, inducing ill health. Most pollutants reach rivers, lakes, aquifers and oceans through rainfall and runoff water.

Currently, aquatic pollution analysis is carried out mainly by environmental management services using physico-chemical measures or biological indicators such as diatoms or macro-invertebrates. However, these methods have many limitations. Indeed, some toxins, such as new drugs and their metabolites, which are not well documented, have not been detected by physico-chemical means. Very low concentrations of many such pollutants have not been monitored (Narbonne, 1998). Moreover, the pollution generally results from a cocktail of different pollutants in the natural environment. Therefore, their synergistic and/or antagonist effects cannot be identified by standard physico-chemical analyses (Dutka, 1998). Hence in recent years, the concept of biomonitoring has been increasingly developed. It is based on the

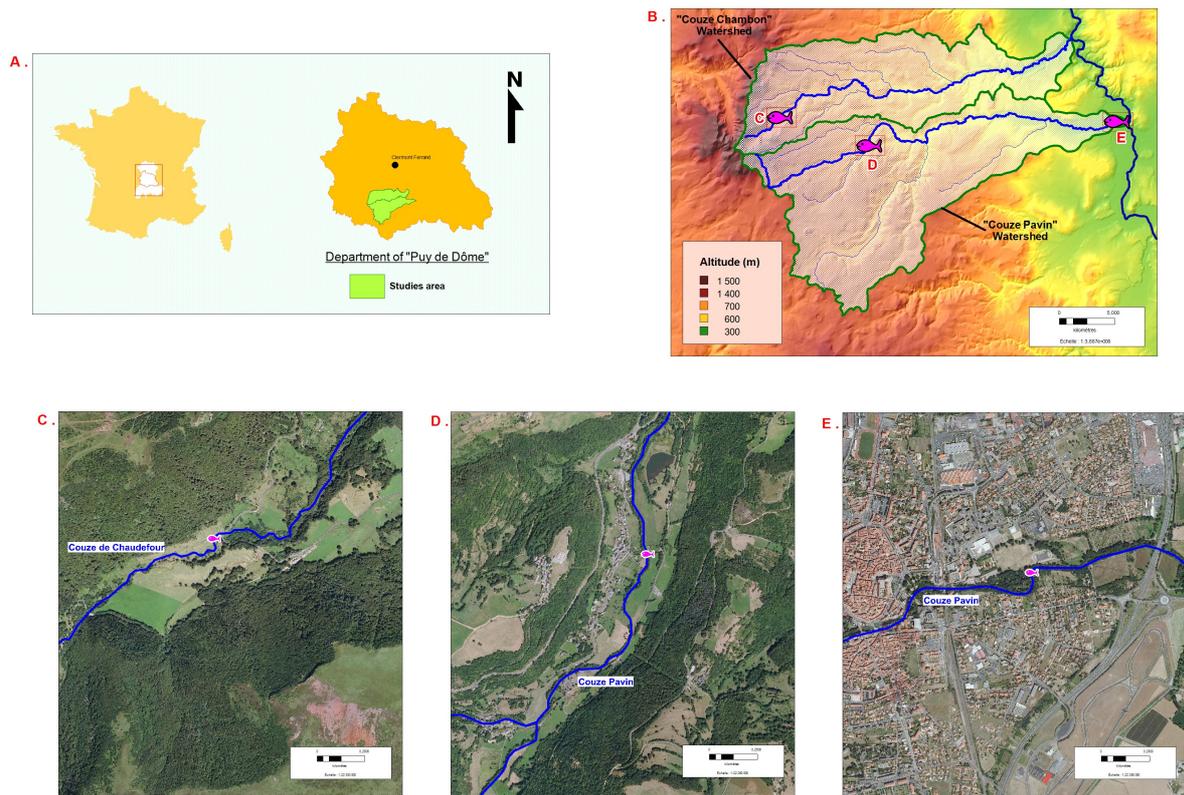


use of biomarkers to study the biological responses of organisms to pollutants (Lagadic *et al.*, 1997).

Fish, particularly salmonids, are integrative organisms with regard to environmental conditions and water quality. Moreover, they are "bioaccumulation" organisms (Mortensen *et al.*, 2011). This refers to the absorption and storage of various xenobiotics within living organisms, after long-term exposure to a contaminated environment. Salmonids, being predators, are at the top of the aquatic food chain. Thus they represent a suitable model for aquatic ecosystem analysis (Celander, 2011). Among the Salmonidae, *Salmo trutta fario* or brown trout, native to rivers and also fish-farmed, provide a ubiquitous and highly sensitive index of water quality.

The blood circulation is a hub for the trade and transport of a variety of physiological molecules and for passage and accumulation of xenobiotics (drugs and/or pollutants). The various pollutants are found either directly in the blood or in organs, tissues and cells, before being gradually released into the bloodstream. Erythrocytes comprise the major cellular component of the blood and in fish they are nucleated (Soldatov, 2005).

Multidrug Resistance (MDR) proteins have been described largely in cancer cells as membrane transporters involved in resistance to chemotherapy (Sarkadi *et al.*, 2006). In reality, MDR membrane transporters belong to the ubiquitous, evolutionarily conserved family of the ATP-binding cassette (ABC) proteins. They are found in practically all living organisms from prokaryotes to eukaryotes (Bamdad *et al.*, 1999; Bamdad *et al.*, 1997; Camarès O, 2004; Dudler and Sidler, 1998; Geisler *et al.*, 2005; Gerlach *et al.*, 1986; Krogstad *et al.*, 1992; Kurelec, 1992; Loncar *et al.*, 2010; Sarkadi *et al.*, 2006; Sturm *et al.*, 2001; Vache *et al.*, 2007; Vache *et al.*, 2006; Zaja *et al.*, 2007). MDR phenotype proteins are membrane detoxification pumps causing xenobiotics efflux from cells. They recognize varied molecules, including hydrophobic compounds, to amphipathic anions and cations, such as heavy metals and the majority of pharmaceutical drugs (Bamdad *et al.*, 1999; Bamdad *et al.*, 1997; Einicker-Lamas *et al.*, 2003; Marquez B, 2011; Sarkadi *et al.*, 2006; Vache *et al.*, 2007; Vache *et al.*, 2006). Due to this property, MDR proteins are involved in natural defense mechanisms of cells, tissues and organs, and form an essential part of the innate defense system known as "chemo-immunity" (Sarkadi *et al.*, 2006). In man, two major MDR proteins include members of the ABCB (ABCB1/MDR1/P-gp) and ABCG (ABCG2/Brest Cancer resistance Protein) sub-families (Natarajan *et al.*, 2012; Sarkadi *et al.*, 2006).



**Figure 1. Maps showing the situation of the three natural sampling sites in Auvergne - FRANCE**

A: Location of Puy-de-Dôme department in France

B: Location of the three sampling sites. Pink fish represent the sampling site.

C: Location of "Vallée de Chaudefour" site, situated in a nature reserve, free from human activity.

D: Location of "Lomprat" site, situated in a very small village with about 200 habitants, free from any industrial activities.

E: Location of "Issoire" site, situated in the center of the town of "Issoire", which is a very small industrial town with 12,000 inhabitants.

Our previous studies have focused on the ABCB1/ P-gp expression mode in the ciliated freshwater protozoan *Tetrahymena pyriformis* (Bamdad *et al.*, 1999; Bamdad *et al.*, 1997; Camarès O, 2004) and the vinegar fly *Drosophila melanogaster* after exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) pollutants (Vache *et al.*, 2007; Vache *et al.*, 2006). In these experiments, carried out in lab and field, we demonstrated a dose-dependent response of ABCB1 /P-gp after exposure to increasing concentrations of various PAHs. The ABCB1/P-gp in *Tetrahymena pyriformis* and *Drosophila melanogaster* were induced in response to both aquatic and air contamination by different classes of PAHs.

MDR proteins being ubiquitous and inducible by various xenobiotics, they may prove to be an excellent tool to use as biomarkers. This study focused on the co-expression of two major MDR proteins, the ABCG2 protein and P-gp in the red blood cells of the brown trout. MDR biomarker development was carried out first in the laboratory by developing primary erythrocyte cultures. The MDR proteins response was analyzed in the primary erythrocyte culture after exposure to increasing concentrations of benzo-a-pyren (BaP), a highly toxic PAH model. Then, MDR protein used as a biomarker was tested in wild brown trout from different rivers.

## **II. Materials and methods**

### **II.1. Fish and red blood cells sampling**

For the development of primary erythrocyte cultures, the brown trout (*Salmo trutta fario*) were obtained from the “*Le Moulin de Pagnat*” fish farm, in Saint-Saturnin, France.

For the field experiment, brown trout (*Salmo trutta fario*) were collected from different rivers of the “*Puy-de-Dôme*” (Auvergne, France) (Fig. 1a, b). The first site was located in the “*Vallée de Chaudefour*” reserve (Fig. 1c). The other sites were located in the “*Couze Pavin*” river, at “*Lomprat*” village (Fig. 1d) and the town of “*Issoire*” (Fig. 1e). At each sample site, at least three fish about 16 to 20 cm long were used. All fish (farmed or wild) were anesthetized using a mixture of clove oil in 70% alcohol. Blood samples were taken from the heart into lithium heparinate (anticoagulant). They were stored rapidly at 4°C in the field. In the laboratory, 500 µL of cells blood were washed twice in 1 mL of PBS, with centrifugation at 2000 rpm for 10 minutes. The erythrocytes were counted in each sample *via* Malassez cell counting and the samples were stored at -20°C.



## **II.2. Ethics**

According to the European Directive 2010/63/UE, ethical approval was not required for this study. The work was performed in close cooperation with the Federation of Fishing and Protection of the Aquatic Environment of Puy-de-Dôme, Auvergne, France. Fish were anesthetized with an overdose of a natural anesthetic in accordance with the EU Directive 2010/63/UE.

## **II.3. Development of primary erythrocyte culture**

The primary erythrocyte culture was developed using three different culture media: Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), Minimum Essential Medium (MEM) and Leibovitz's medium (L-15) (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA). Each medium was supplemented with 10% fetal calf serum, 1% penicillin/streptomycin, 1% fungizone and 1% L-glutamine (all from Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA). The erythrocytes were seeded in 25-ml flasks at one million cells per mL in each culture medium, under different temperature conditions (11°C, 15°C, 18°C and 21°C) with or without shaking.

## **II.4. Cell counting in primary erythrocyte culture**

Erythrocytes in primary culture were counted using a Beckman Coulter™ Z-2 cell counter. The rate of cell growth was assessed using the ratio of the number of cells (N) at time T to the number of cells (N<sub>0</sub>) at time T<sub>0</sub> (beginning of the experiment).

## **II.5. BaP cell culture exposure**

Benzo-a-pyren (BaP) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The final DMSO concentration in the cultures was always 0.1%. For each experiment, 10<sup>6</sup> cells/mL were seeded in 10 mL of L-15 medium. The cultures were then exposed to increasing concentrations of BaP (10 μM, 20 μM and 30 μM). In parallel, a control culture and a control culture treated with 0.1% DMSO (0.1% DMSO control) were maintained. The final DMSO concentration in all conditions of culture, with or without BaP, was kept at 0.1%. All experiments were performed, at least, in triplicate.

## **II.6. MDR proteins expression by Western blot analysis**

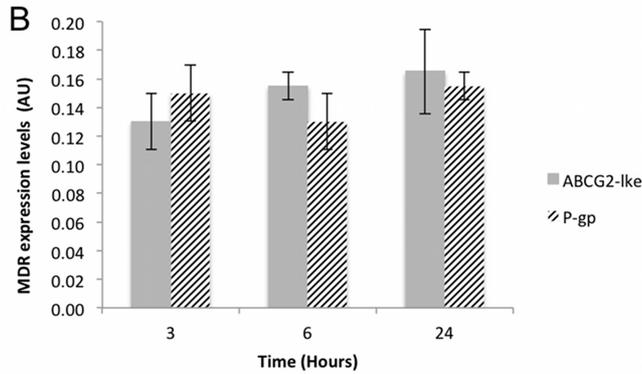
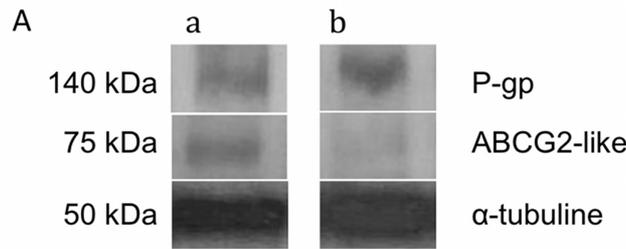
For each experiment, the cultures were collected and centrifuged (2000 rpm, 10 min at 4°C) and the pellet recovered in 1 ml of lysis buffer (20 mM tris-HCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA,



6  $\mu\text{M}$   $\beta$ -mercaptoethanol, and a 0.1% protease inhibitor cocktail, pH 7.5) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until protein extraction. For protein extraction, the sample was sonicated (5 x 5s at  $4^{\circ}\text{C}$ ) and the supernatant was conserved at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Protein concentrations were determined using the Bradford assay with bovine serum albumin (BSA) as standard. Extracts were diluted to  $100\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  protein with sample buffer (1.25M tris-HCl, 20% sodium dodecyl sulfate, 20% glycerol, 2M dithiothreitol, 0.5% bromophenol blue, pH 6.8) and loaded onto a 7.5% polyacrylamide gel. Electrophoresis was carried out at a constant voltage of 120 V. Proteins were then transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane using a Hoeffler® semi-dry system. Transfer was carried out for 1h 30 at constant amperage of 0.8 mA per  $\text{cm}^2$ . Membranes were fixed in PBS 0.1% triton X100 containing 5% (w/v) non-fat dry milk, and then incubated with the primary monoclonal antibody anti-P-gp C219 (1:500, Calbiochem) and mouse monoclonal antitubulin antibody DM1A (1:5000, Sigma) in PBS 0.1% triton X100 (PBS-T) for one night at  $4^{\circ}\text{C}$ . After three 10-min washes with PBS-T, the membranes were incubated in the presence of the secondary antibody, a horseradish-peroxidase (HRP)-coupled goat anti-mouse (1:4000, Promega), for 1 h at room temperature in TBS-T. After three 10-min washes with PBS-T, immune complexes were visualized by chemiluminescence (ECL+ Western blotting detection reagent, Amersham) according to the manufacturer's specifications. The intensities of P-gp, ABCG2-like and control tubulin bands were analyzed by densitometry using Quantity-One software (BioRad), and P-gp and ABGC2-like expression levels were determined in relation to the tubulin controls.

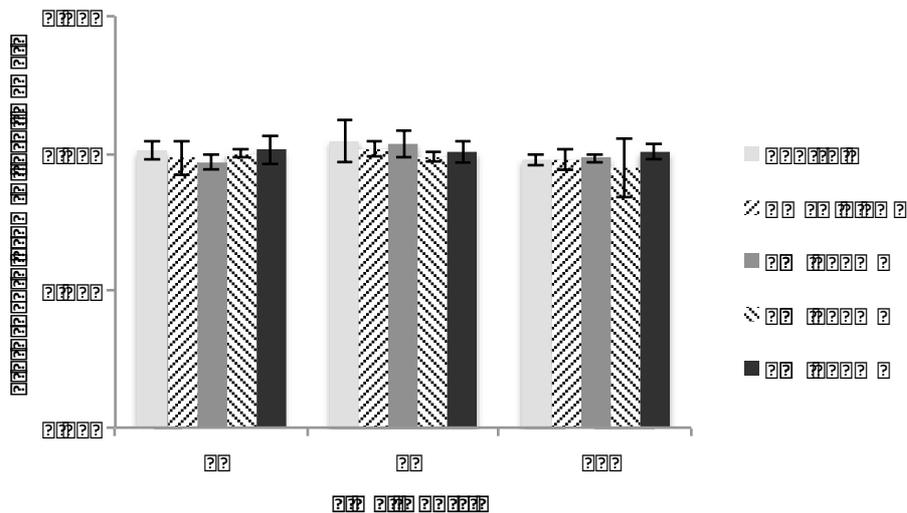
## II.7. Flow cytometry analysis of BaP uptake

BaP being a fluorescent molecule, its uptake in red blood cells was measured by Flow cytometry (FCM) using a FACS BD LSRII flow cytometer (Becton Dickinson) as described in Bamdad *et al.* (Bamdad *et al.*, 1999; Bamdad *et al.*, 1997). For these experiments, red blood cells in primary culture were exposed to  $10\ \mu\text{M}$  BaP for 3 h, with or without cyclosporin and verapamil, two non-fluorescent target compounds for MDR pumps. PAHs were excited at 355 nm in a LightwaveXcyte™ at output power of 20 mW. Fluorescence intensities were obtained using a  $405\pm 10$  nm band-pass filter. For each cytometric parameter investigated, 10,000 events (cells) were analyzed per condition. Mean fluorescence of a given population was expressed in arbitrary fluorescence units (Klimecki *et al.*) on a log scale. Each experiment was performed, at least, in triplicate.



Résultat : L'analyse de l'expression des protéines ABCG2-like et P-gp a été réalisée par Western blot et densitométrie. Les résultats ont été exprimés en unités arbitraires (AU). Les données sont présentées dans le tableau ci-dessous.

L'analyse de l'expression des protéines ABCG2-like et P-gp a été réalisée par Western blot et densitométrie. Les résultats ont été exprimés en unités arbitraires (AU). Les données sont présentées dans le tableau ci-dessous.



Résultat : L'analyse de l'expression des protéines ABCG2-like et P-gp a été réalisée par Western blot et densitométrie. Les résultats ont été exprimés en unités arbitraires (AU). Les données sont présentées dans le tableau ci-dessous.

L'analyse de l'expression des protéines ABCG2-like et P-gp a été réalisée par Western blot et densitométrie. Les résultats ont été exprimés en unités arbitraires (AU). Les données sont présentées dans le tableau ci-dessous.

## **II.8. Statistical analysis**

Data were expressed as means  $\pm$  confidence interval of  $n$  independent experiments. Each experiment was performed at least in triplicate and statistically compared using ANOVA and a Student's t-test. The comparison was applied to each culture condition and control group *versus* BaP-treated groups and  $P < 0.05$  was considered statistically significant. For the flow cytometry experiments, quantitative data were relative to a control, which varied for each experiment. Only one representative experiment is presented in Figure 4, but we obtained the same pattern three times.

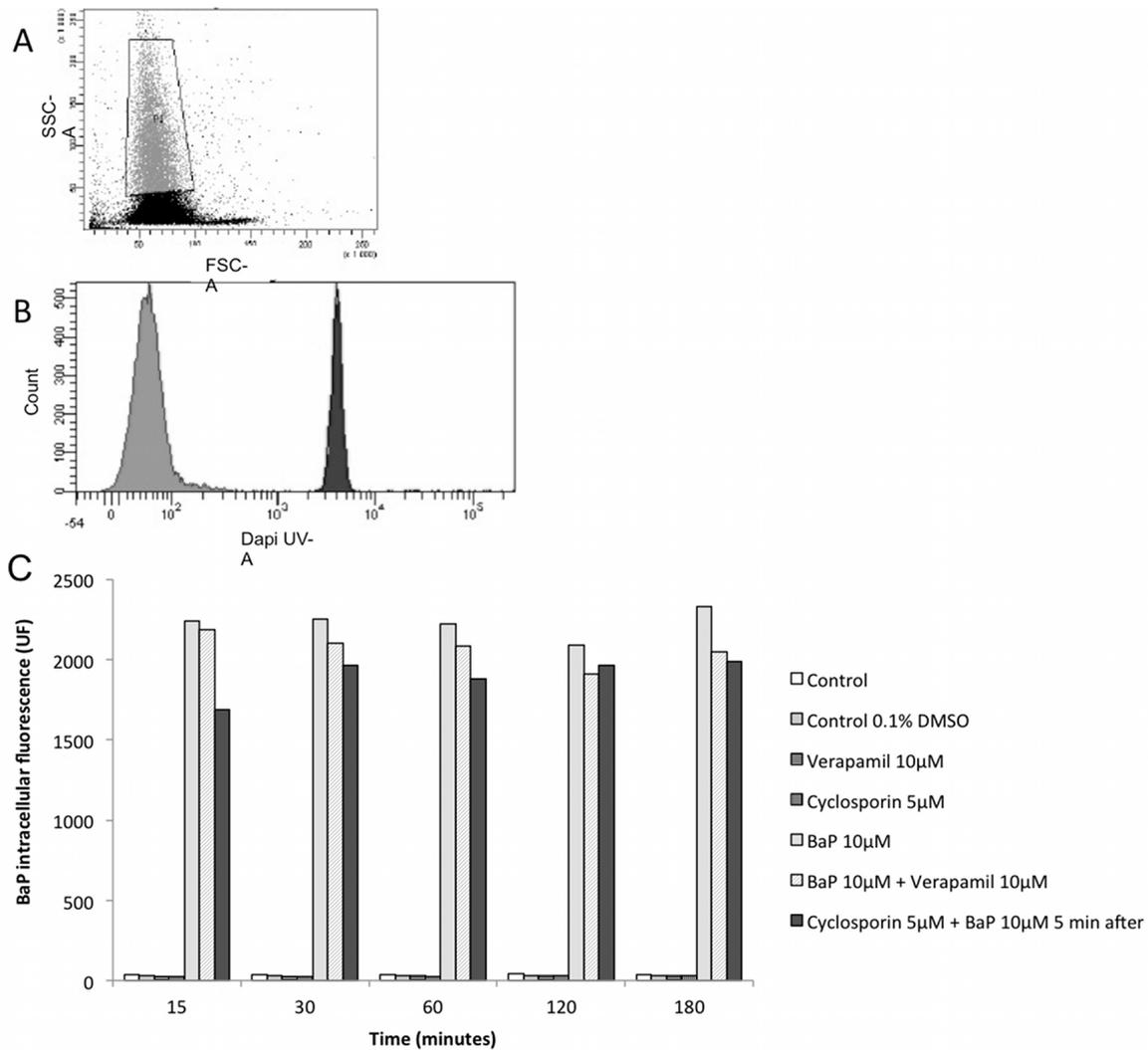
## **III. Results**

### **III.1. Development of primary culture of brown trout erythrocytes**

For the development of primary erythrocyte culture, three culture media (i) Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), (ii) Minimum Essential Medium (MEM), and (iii) Leibovitz's medium (L-15) were tested, under different conditions of temperature and stirring. Firstly, for each medium, the best temperature and stirring conditions were applied. The best conditions obtained were 21°C and 45 rpm (data not shown). These conditions were then used to track erythrocyte growth rates, in the three tested media. The results presented in Figure 2a showed that in all media, the cell growth rate remained relatively stable during 5 hours, *i.e.* the short term, with a yield close to 1. In the longer term (from 1 to 5 days), erythrocyte growth rate remained close to 1 in L-15 and IMDM media, but fell slightly in MEM medium. These results suggest that the both L-15 and IMDM media may be used for trout red blood cell culture. However, a comparison of cell morphology and cell membrane shape in primary cultures of L-15 and IMDM media (Fig. 2b) showed that the erythrocytes in L15 medium were less damaged and their cell membranes remained intact. Thus, for further experiments, L15 medium was chosen.

### **III.2. ABCG2-like protein and P-gp co-expression in erythrocytes of brown trout in primary culture**

Basal expression of MDR transporter proteins was studied in the red blood cells of brown trout in primary culture during 24 h, using Western blot analysis. The results showed that (Fig. 3a) the monoclonal anti-P-gp antibody C219 marked two proteins. A 140 kDa P-gp and a second protein with a MW of 75 kDa which in man and mammals matches to a MDR protein called ABCG2 protein. Moreover, the sequence alignment of rainbow trout P-gp and



**Figure 5. BaP uptake in trout erythrocytes measured by flow cytometry analysis**

**A:** Flow cytometry profile of trout erythrocytes. The gate contained the point-cloud profile of erythrocytes in control cells. Cell size is expressed by forward scatter = FSC-A (x-axis), and intracellular structure complexity is expressed by side scatter = SSC-A (y-axis).

**B:** Profile of BaP-treated trout erythrocytes in primary cultures. BaP was naturally fluorescent in UV.

Grey histogram: FCM fluorescence profile for control cells and/or 0.1% DMSO control.

Black histogram: FCM fluorescence profile of trout erythrocytes treated with 10 µM BaP for 1h 30. FU: Fluorescence Unit (x-axis), with cell numbers on the y-axis.

In flow cytometer technology, fluorescence intensity (FU) may be different at the beginning of each experiment (T0) because of the calibration of the instrument. Thus, the values obtained for several experiments cannot be added and averaged. For this reason, the results presented above, reflect a representative experiment, among several others made.

**C: BaP uptake in erythrocyte culture in the presence of verapamil or cyclosporin**

The red blood cells were treated with 10 µM BaP and 10 µM verapamil, added at the same time, or 5 µM cyclosporin added first followed 5 min later by 10 µM BaP. Verapamil and cyclosporin are non-fluorescent compounds in UV. The histogram showed the BaP intracellular fluorescence profile in trout erythrocytes, over time. Intracellular fluorescence is indicated in Fluorescence Units (FU).

ABCG2 available in Genbank with the epitopes “VQEALD” and “VQAALD” recognized by C219 antibody (Van Den Elsen *et al.*, 1999) was checked *via* CLUSTALW. The results confirmed that C219 antibody recognized the epitope VQAALD in both P-gp and ABCG2 in trout (data not shown). Thus, the 75 kDa band in brown trout erythrocytes is called “ABCG2-like protein”. The monoclonal anti-tubulin antibody DM1A, labelled a tubulin protein, had a molecular weight of about 50 kDa, and was used as the internal protein control. In primary erythrocyte culture, the expression level of ABCG2-like protein was  $0.13 \text{ AU} \pm 0.02$ ,  $0.16 \pm 0.01 \text{ AU}$  and  $0.17 \pm 0.03 \text{ AU}$  and that of P-gp was  $0.15 \text{ AU} \pm 0.02$ ,  $0.13 \pm 0.02 \text{ AU}$  and  $0.16 \pm 0.01 \text{ AU}$ , after 3 h, 6 h and 24 h, respectively (Fig. 3b). A Student’s t-test performed with a risk of 0.05 showed that the expression level of ABCG2 proteins was not significantly different over time. It was the same for P-gp expression over time.

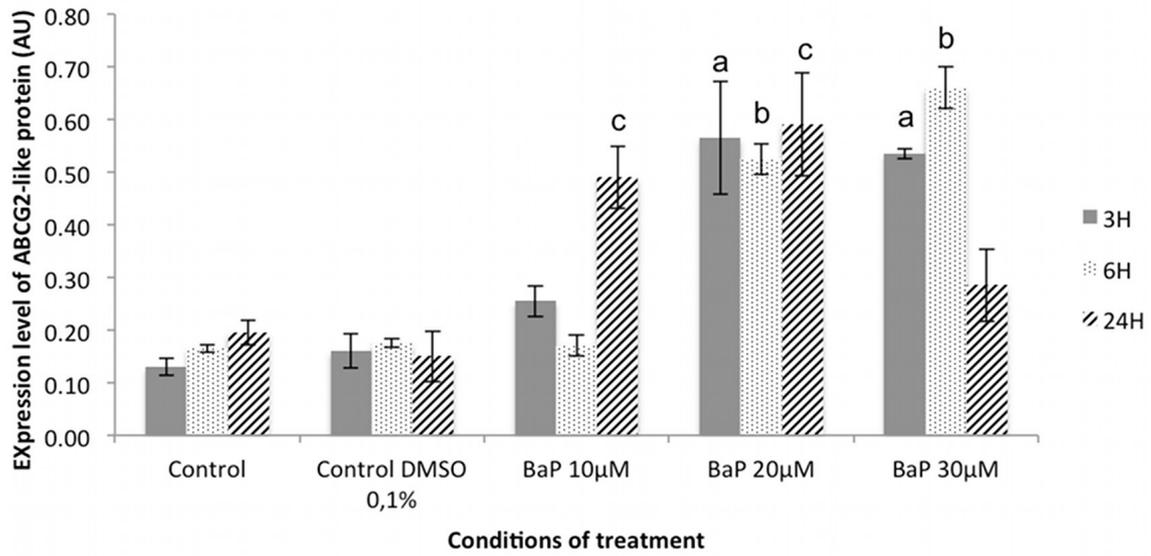
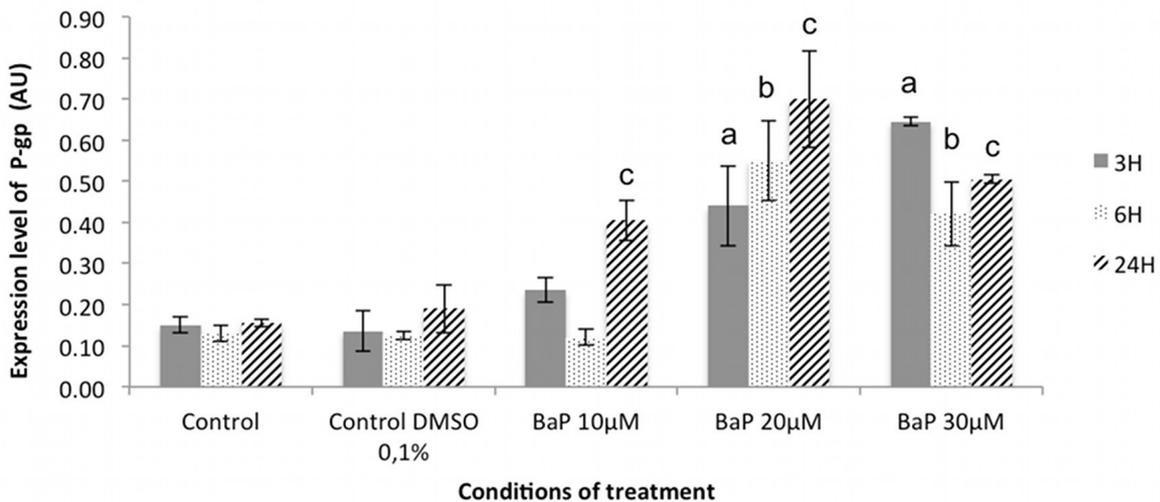
### **III.3. BaP effect on trout red blood cells**

The toxicity of 10, 20 and 30  $\mu\text{M}$  BaP on cultured trout erythrocytes was then studied by cell count analysis over time, using a particular counter Z-2. In presence of BaP at 10, 20 and 30  $\mu\text{M}$  (Fig. 4), erythrocyte growth rate remained stable during 24 h, and no sign of BaP toxicity was detected.

### **III.4. MDR pump activity of trout erythrocytes**

The activity of erythrocyte MDR pumps was then analyzed *via* a BaP uptake experiment using flow cytometry (FCM) (Fig. 5). Indeed, BaP being fluorescent molecule, its influx and efflux through erythrocytes may be followed in the presence or absence of other MDR target compounds, such as verapamil and cyclosporin (non-fluorescent compounds). The FCM profile analysis (Fig. 5a) showed the same homogeneous distribution of erythrocytes between control cells, 0.1% DMSO control cultures and erythrocytes treated with 10  $\mu\text{M}$  BaP, during the experiment. The flow cytometry fluorescence profile (Fig. 5b) clearly demonstrated that BaP entered the cells but did not perturb them.

The kinetics of BaP uptake (10  $\mu\text{M}$ ) was then followed in the presence of 10  $\mu\text{M}$  verapamil over time (Fig. 5c). The results were expressed in Fluorescence Units (Klimecki *et al.*), using a log scale. In the presence of verapamil, BaP accumulated more rapidly in the cells for 15 min (2240 FU for BaP *vs.* 2189 FU for BaP+verapamil). Then, from 30 min to 3 h, in cells treated with BaP+verapamil, intracellular fluorescence rates remained still lower than in BaP treated cells (2342 FU for BaP *vs.* 2046 FU for BaP+verapamil at 3 h), revealing that BaP efflux remained more active when in combination with verapamil than with BaP alone.

**A****B**

**Figure 6. Induction of ABCG2-like protein and P-gp expression in trout red blood cells after exposure to BaP**

**A:** ABCG2-like protein expression.

**B:** P-gp expression

Trout red blood cells were exposed to 10, 20 and 30 µM of BaP. After 3 h, 6 h and 24 h of treatment, the cells were recovered to perform protein extraction. Following extraction, Western blotting was performed, and protein expression was quantified using Quantity One software (Biorad®). AU: Arbitrary Units.

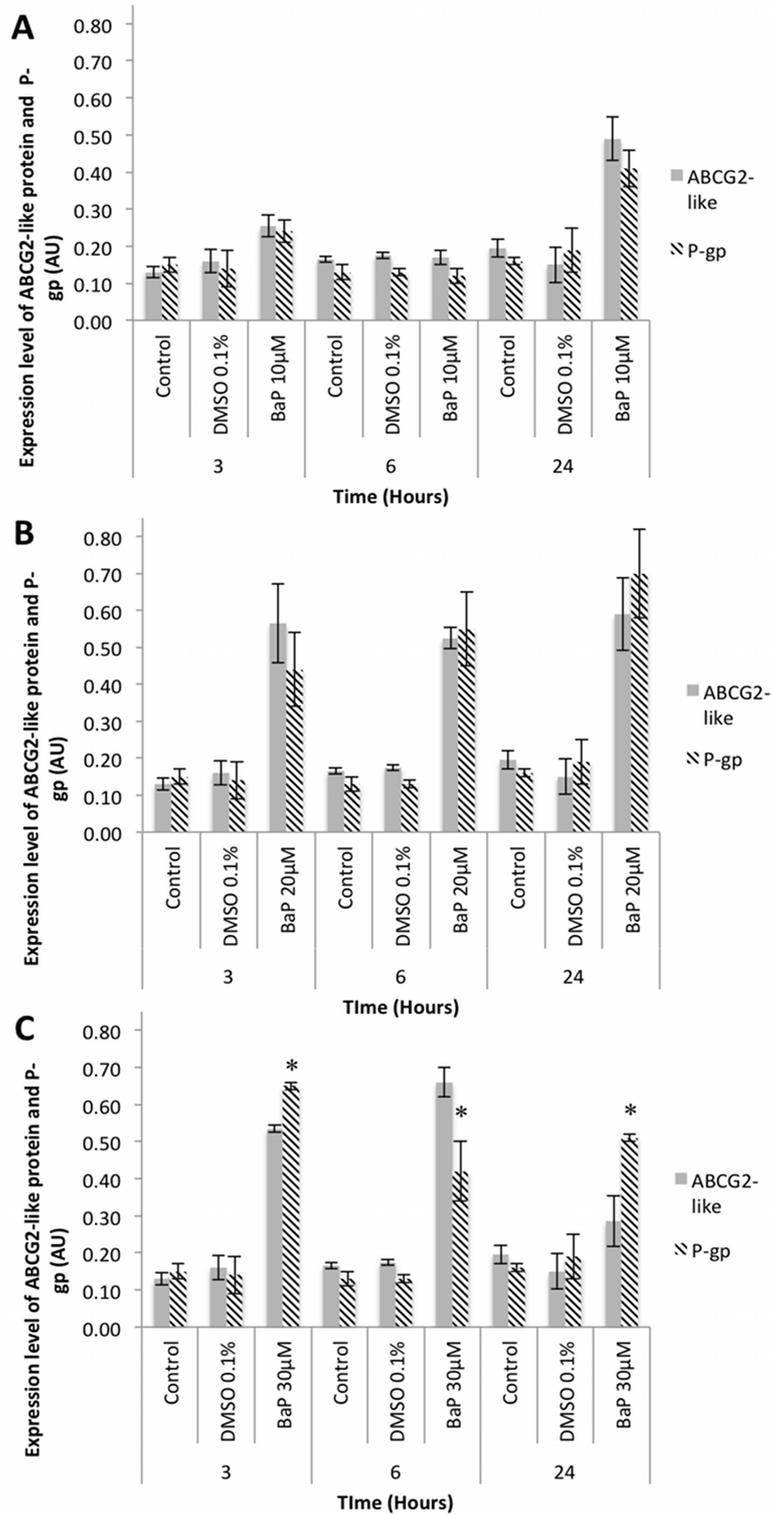
a, b and c indicate significant differences (p < 0.05) MDR protein expression between treated conditions and controls, respectively, at time 3 h, 6 h and 24 h.

In the presence of 5  $\mu$ M cyclosporin, added to the cell culture 5 min before 10  $\mu$ M BaP, intracellular fluorescence remained low for 15 min (2240 FU for BaP vs. 1688 FU for BaP+Cyclo). Then, at 30 min, it increased (2255 FU for BaP vs. 1964 FU for BaP+Cyclo) and then varied slightly over time (2332 FU for BaP vs. 1990 FU for BaP+Cyclo). The intracellular fluorescence profile revealed that BaP efflux was more active in combination with cyclosporin than with BaP alone.

### **III.5. Co-expression of ABCG2-like protein and P-gp in trout erythrocytes in the presence of benzo[a]pyrene**

The expression levels of ABCG2-like protein and P-gp in trout erythrocytes were then determined at 3 h, 6 h and 24 h in the presence of increasing concentrations of BaP (10, 20 and 30  $\mu$ M) using Western blot analysis (Fig 6a). Control and DMSO 0.1% control cultures were also performed. ABCG2-like protein expression levels in red blood cells in both controls remained relatively constant over time (Fig 6a). The level of ABCG2-like protein in the control erythrocytes was  $0.13 \pm 0.02$ ,  $0.17 \pm 0.01$  and  $0.20 \pm 0.02$  after 3 h, 6 h and 24 h, respectively. The level of ABCG2-like protein in the 0.1% DMSO control was  $0.16 \pm 0.03$  AU for 3 h,  $0.18 \pm 0.01$  AU for 6 h and  $0.15 \pm 0.05$  AU for 24 h. Statistical analysis showed no significant difference between control cells and the 0.1% DMSO control. Therefore, we concluded that 0.1% DMSO had no effect on the expression of ABCG2-like protein in trout erythrocytes. In the presence of 10  $\mu$ M BaP, ABCG2-like expression remained relatively close to controls after 6 h ( $0.17 \pm 0.03$  AU at 6 h). Then, it increased significantly at 24 h ( $0.49 \pm 0.06$  AU). In the presence of 20  $\mu$ M BaP, ABCG2-like expression increased clearly and remained high over time, with  $0.57 \pm 0.011$  AU,  $0.53 \pm 0.03$  AU and  $0.59 \pm 0.11$  AU, after 3 h, 6 h and 24 h, respectively. With 30  $\mu$ M BaP exposure, ABCG2-like expression remained high during 6 h ( $0.66 \pm 0.04$  AU) and then fell by half at 24 h ( $0.29 \pm 0.07$  AU).

P-gp expression levels in trout erythrocytes (Fig. 6b) remained stable during 24 h ( $0.16 \pm 0.01$  and  $0.19 \pm 0.06$  UA, respectively), in control cells and 0.1% DMSO control cells. Statistical analysis showed no significant difference between control cells and 0.1% DMSO control. Consequently, we concluded that 0.1% DMSO had no effect the P-gp expression in trout erythrocytes. The addition of 10  $\mu$ M BaP (Fig. 6b) to cell culture did not change the expression of P-gp for 6 h, which remained close to the control values ( $0.12 \pm 0.02$  AU). P-gp rate only increased after 24 h of BaP exposure ( $0.41 \pm 0.05$  AU). In contrast, in the presence of 20 or 30  $\mu$ M BaP, P-gp expression increased clearly in the trout erythrocytes and remained



**Figure 7. Co-expression of ABCG2-like and P-gp protein in trout erythrocyte primary cultures in the presence of BaP**

Co-expression of ABCG2-like protein and P-gp protein was studied by Western blot analysis, and their expression levels were quantified using Quantity One software (Biorad®). AU: Arbitrary Units. Red blood cells were treated for 3 h, 6 h and 24 h with (A): 10  $\mu$ M BaP, (B): 20  $\mu$ M BaP, and (C): 30  $\mu$ M BaP. d indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ) between ABCG2-like protein expression and P-gp expression.

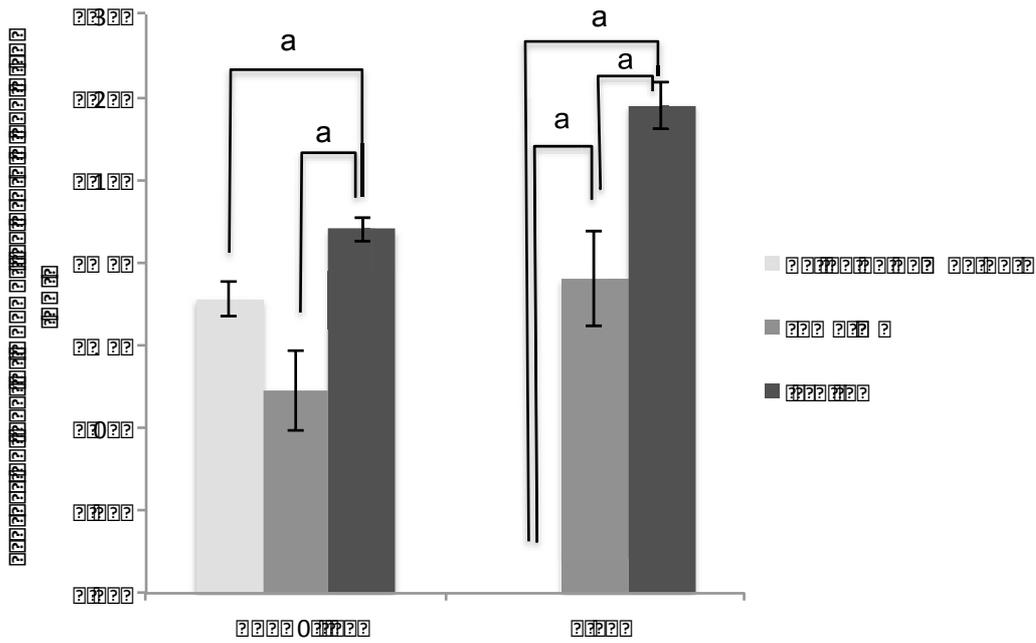
high throughout the experiment. After 20  $\mu\text{M}$  BaP exposure, the P-gp rate regularly increased over time, to  $0.44 \pm 0.1$  AU,  $0.55 \pm 0.1$  AU and  $0.70 \pm 0.1$  AU after 3 h, 6 h and 24 h, respectively. In presence of 30  $\mu\text{M}$  BaP, P-gp expression level remained high ( $0.65 \pm 0.01$  AU,  $0.42 \pm 0.08$  AU and  $0.51 \pm 0.01$  AU after 3 h, 6 h and 24 h, respectively).

The co-expression profile of ABCG2-like protein and P-gp in trout erythrocytes over time, with or without BaP, are presented in Figure 7. With 10  $\mu\text{M}$  BaP (Fig. 7a), the level of P-gp and ABCG2 expression in trout erythrocyte remained stable and close to that of controls for the first six hours. There was no significant difference between controls and treated cultures. Only after 24 hours of BaP treatment, was a clearly significant increase in ABCG2-like protein and P-gp detected. However, the expression of these two MDR proteins remained similar at 24 h, and no significant difference was noted between P-gp and ABCG2-like expression levels.

In contrast, in the presence of 20  $\mu\text{M}$  BaP (Fig. 7b), both ABCG2-like and P-gp expression clearly increased throughout the experiment, compared to controls. Nevertheless, despite this induction, the expression levels of both MDR proteins remained similar in trout erythrocytes throughout the experiment, in treated cultures. With 30  $\mu\text{M}$  BaP (Fig. 7c), P-gp and ABCG2-like expression levels were significantly different in trout erythrocytes between controls and treated cultures. A clear induction of the two MDR protein expressions was detected in BaP-treated cultures. However, in the presence of 30  $\mu\text{M}$  BaP, the expression level of ABCG2-like protein remained lower than P-gp at 3 h and 24 h., whereas at 6 h, the expression level of ABCG2-like protein remained higher than that of P-gp.

### **III.6. ABCG2-like protein and P-gp co-expression in wild brown trout erythrocytes living in different rivers**

The level of co-expression of ABCG2-like protein and P-gp was then analyzed in erythrocytes of wild trout from different rivers (Fig. 8). For these experiments, three river water stations were selected. (i) “*Vallée de Chaudefour*”, (ii) “*Lomprat*” and (iii) “*Issoire*” (Fig. 1). The expression level of ABCG2-like protein and P-gp in trout erythrocytes from the “*Vallée de Chaudefour*” was  $0.36 \pm 0.06$  AU and  $0.00 \pm 0.00$  AU, respectively. For brown trout from “*Lomprat*”, ABCG2-like protein and P-gp expression levels were  $0.24 \pm 0.05$  AU and  $0.38 \pm 0.06$  AU, respectively (Fig. 8). The expression level of these two MDR proteins in trout erythrocytes from “*Issoire*” was  $0.42 \pm 0.02$  AU for ABCG2-like protein, and  $0.59 \pm 0.03$  AU for P-gp. To determine whether the location influenced the expression level of both



Résultat de la séance de travail : les élèves ont pu identifier les différents types de données (qualitatives et quantitatives) et les représenter sur un diagramme à barres. Ils ont également pu comparer les données et interpréter les résultats.

MDR proteins in red blood cells, a Student's t-test was performed with a risk of 0.05. A significant difference was noted for ABCG2-like protein expression in the erythrocytes of fishes from "Lomprat" and "Issoire". For the expression of P-gp, a significant difference was detected between the three sampling stations.

#### **IV. Discussion**

For decades, an increasing dispersion of natural and synthetic pollutants has degraded the environment, notably aquatic ecosystems. This has led to harmful consequences for human health and for ecosystems. Currently, the detection and the quantification of pollutants in aquatic environments is carried out mainly by physico-chemical methods. However, these methods provide no information on the health of organisms in the contaminated environments. Another method, developed in recent years, is bio-monitoring. It is based on the use of biomarkers. The latter is defined as "an observable and/or measurable change at the molecular, biochemical, cellular, physiological, and/or behavioral level, revealing past or present exposure of an individual to, at least, a chemical nature pollutant" (Lagadic *et al.*, 1997; Van Der Oost *et al.*, 2003). The use of biomarkers can overcome the difficulties encountered by physico-chemical analysis. Indeed, the specificity of the biomarker for certain classes of pollutant can reveal their presence and their bioavailability, and their early effects on organisms (Amiard *et al.*, 1998). At present, biological indices for determining the water quality are based mainly on diatoms or macro-invertebrates (De Jonge *et al.*, 2008). Thus, biomarkers are a necessary adjunct in monitoring water pollution.

MDR transporters are evolutionarily well-conserved trans-membrane proteins naturally expressed in all prokaryotic and eukaryotic organisms, from micro-organisms to plants and animals (Bamdad *et al.*, 1999; Bamdad *et al.*, 1997; Camarès O, 2004; Dudler and Sidler, 1998; Geisler *et al.*, 2005; Gerlach *et al.*, 1986; Krogstad *et al.*, 1992; Kurelec, 1992; Loncar *et al.*, 2010; Sarkadi *et al.*, 2006; Sturm *et al.*, 2001; Vache *et al.*, 2007; Vache *et al.*, 2006; Zaja *et al.*, 2007). They are membrane detoxification pumps involved in defence against xenobiotics, at cellular level. MDR transporter expression may be increased in the presence of different xenobiotics, particularly PAH pollutants (Bamdad *et al.*, 1999; Bamdad *et al.*, 1997; Vache *et al.*, 2007; Vache *et al.*, 2006). In addition, MDR proteins recognize various xenobiotics with diverse structures and properties, such as drugs, antifungals, pesticides, anthelmintics, acaricides, PAHs, heavy metals, among others (Bamdad *et al.*, 1999; Bamdad



*et al.*, 1997; Einicker-Lamas *et al.*, 2003; Marquez B, 2011; Sarkadi *et al.*, 2006; Vache *et al.*, 2007; Vache *et al.*, 2006). Taken together, these properties make MDR transporters excellent candidates for sentinel biomarker development. To this end, this study focused on the interest of using the simultaneous responses of two MDR transporters in trout erythrocytes in response to water pollution. MDR proteins expressed by blood cells were selected because the bloodstream, circulating throughout the body, is the site of transport and accumulation of physiological molecules and various pollutants. In addition, fish red blood cells, being nucleated, are an excellent model to study aquatic pollution (Soldatov, 2005). The fish model used for these studies was *Salmo trutta fario* (brown trout), which can live in most rivers.

In order to develop this biomarker, it was first necessary to investigate the expression of MDR transporter proteins in brown trout erythrocytes and their ability to induce response to xenobiotics. For this, it was essential to conduct this study in a controlled environment. For this purpose, the best conditions for *in vitro* culture of trout erythrocytes, such as type of medium, cell density, temperature and stirring have been defined. The results showed that it was possible to achieve primary cultures from trout erythrocytes, over time. The best conditions for primary *in vitro* culture of trout erythrocytes used Leibovitz's medium (L-15) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, 1% fungizone and 1% L-glutamine, at a temperature of 21°C with stirring at 45 rpm. The development of primary blood cell cultures in the trout model opens up a broader scope for other fish models or for those species with nucleated erythrocytes. In future, this *in vitro* culture model may be used for cytotoxicity studies on various xenobiotics and in other applications directly linked to fish health.

The expression of MDR protein was then investigated in the erythrocytes of brown trout in primary culture using Western blot analysis, with the monoclonal antibody anti-P-gp C219. The latter, clearly marked two proteins with 75 kDa and 140 kDa in the trout erythrocytes. The 140-kDa protein was identified as P-gp. Indeed, the 140-kDa P-gp expression has already been cited in hepatocyte cell culture of *Oncorhynchus mykiss* (Sturm *et al.*, 2001) and a fish hepatoma cell line (Zaja *et al.*, 2007). Therefore, for a P-gp-positive control in our experiments, we used the brown trout liver extract which also presented a molecular weight of 140 kDa. Moreover, the molecular weight of P-gp can vary between species. For example, the monoclonal anti-P-gp used here (*i.e.* C219 P-gp) recognized a P-gp of 170 kDa in man, 140 kDa in *Drosophila melanogaster* and 55 kDa in cattle (Beaulieu *et al.*, 1995; Sarkadi *et al.*, 2006; Vache *et al.*, 2007; Vache *et al.*, 2006). In the freshwater ciliated protozoan



*Tetrahymena pyriformis*, another anti-Pgp Ab1 recognizes two P-gp of 66 kDa and 96 kDa (Bamdad *et al.*, 1999; Bamdad *et al.*, 1997). Therefore, the second 75-kDa MDR protein, labelled here by C219, may be another MDR protein. Moreover, in man, blood cells, notably hematopoietic stem cells, have been reported to express another MDR protein, called BCRP and/or ABCG2 protein, with this same molecular weight of 75 kDa (Natarajan *et al.*, 2012). Further, gene expression analysis of MDR transporters in seven rainbow trout tissues (liver, kidney, proximal intestine, distal intestine, gonads, gills and brain) has already demonstrated the expression of ABCG2 transcripts in this model (Loncar *et al.*, 2010). Thus, the 75-kDa MDR protein identified in brown trout erythrocytes has been named “ABCG2-like”. Furthermore, the expression kinetic of MDR proteins was analyzed over time (during 24 h). Quantification of expression levels of P-gp and ABCG2-like protein in trout erythrocytes were stable over time for each MDR protein. These results validate the first step of ABCG2-like protein and P-gp use as a biomarker.

For the second step of the biomarker development, it was necessary to analyze the response of MDR proteins to xenobiotics. For this purpose, the test pollutant used was BaP, which is a cytotoxic, genotoxic and carcinogenic pollutant in the PAH class. Moreover, BaP, like several other PAHs, has been shown to induce P-gp in other models, in response to aquatic or atmospheric pollution (Bamdad *et al.*, 1999; Bamdad *et al.*, 1997; Vache *et al.*, 2007; Vache *et al.*, 2006). For this, the toxic impact over time of increasing concentrations of BaP (10, 20 and 30  $\mu$ M) on trout erythrocytes in primary culture was tested first. No sign of toxicity was detected in the presence of various BaP concentrations, probably due to the detoxification action of MDRs in the blood cells. Similar responses have already been detected in the ciliated protozoan model *Tetrahymena pyriformis* and in SL2 *Drosophila melanogaster* cell culture in the presence of similar concentrations of BaP and other PAHs (Bamdad *et al.*, 1997; Vache *et al.*, 2006). To verify this hypothesis, the BaP uptake by trout erythrocytes was analyzed over time, using flow cytometry (FCM). BaP being naturally fluorescent in UV, this uptake may be followed in trout erythrocytes. These experiments were carried out in the presence of verapamil and cyclosporin, two non-fluorescent target MDR compounds. Firstly, the FCM profile showed that BaP rapidly entered trout erythrocytes and did not perturb the homogeneity of cell populations, during the experimental period. Secondly, the intracellular fluorescence in erythrocytes treated with BaP and verapamil, or with BaP and cyclosporin, remained less than in those treated with BaP alone. These results suggest that for MDR pumps of trout erythrocytes, verapamil and/or cyclosporin are the competitors of BaP. However, in the presence of BaP/verapamil or BaP/cyclosporin, a more rapid efflux of BaP



was detected. In trout erythrocytes, as in in most species, such as man, mammal, protozoans and *Drosophila*, verapamil is known to be a competitor molecule for MDR pump (Bamdad *et al.*, 1997; Sarkadi *et al.*, 2006). In contrast, cyclosporin is recognized more as an inhibitor of MDR pumps (Bamdad *et al.*, 1997; Sarkadi *et al.*, 2006). Thus, the non-toxicity of BaP for trout erythrocytes could be related to a defence system conferred by the MDR protein membrane. These results suggest that MDR pumps in trout erythrocytes were active in responding to the various xenobiotics and thus validate their use as biomarker.

Another step in the development of a sentinel biomarker was to test the ability of MDR proteins to induce response to xenobiotics. This hypothesis was then checked by both ABCG2-like protein and P-gp expression, in trout erythrocytes in primary cell cultures, with or without BaP, over time. The ABCG2-like and P-gp expression study on control cells and the 0.1% DMSO controls showed a stable and similar co-expression of both MDR proteins over 24 h, with mean expression levels of  $0.15 \pm 0.03$  and  $0.16 \pm 0.03$ , respectively. 0.1% DMSO does not appear to affect the expression of the two MDR proteins. In contrast, with increasing concentrations of BaP, there was a clear induction of expression of both MDR proteins. However, the responses of ABCG2-like and P-gp seemed to differ in the presence of low and higher concentrations of BaP. Indeed, in the presence of a low BaP concentration (10 $\mu$ M), the expression levels of ABCG2-like ( $0.21 \pm 0.02$ ) and P-gp ( $0.18 \pm 0.03$ ) remained similar and close to controls during the first hours of treatment. Only after 24 h, was a clear induction of the two MDR proteins detected, when their ratios were 3-fold higher than controls (averaging  $0.45 \pm 0.06$  for the two MDR proteins together). In the presence of higher BaP concentrations (20 or 30  $\mu$ M), both the MDR proteins were clearly induced. At 20  $\mu$ M BaP, ABCG2-like and P-gp were co-expressed similarly over time, at a ratio 3.5-fold higher than controls (averaging  $0.56 \pm 0.1$  for the two MDR proteins together). At 30  $\mu$ M BaP, ABCG2-like and P-gp were highly co-expressed but with variable levels over time. Indeed, at 3 h, P-gp expression was 1.2-fold higher than ABCG2-like, but this trend was reversed after 6 h, when ABCG2-like expression became 1.5-fold higher. After 24 h of treatment with 30  $\mu$ M BaP, P-gp ratio had again increased to a reach a level 1.8-fold higher than ABCG2-like expression. These results suggest that, in presence of higher concentrations of BaP, these two MDR proteins play complementary protective roles against this xenobiotic. In trout erythrocytes, MDR proteins are directly involved in the mechanisms of cellular defense against xenobiotics. For P-gp response against PAHs, similar results have already been described in other models in response to water and air pollution (Bamdad *et al.*, 1999; Bamdad *et al.*, 1997; Vache *et al.*, 2007; Vache *et al.*, 2006). Similarly in man, notably in



hematopoietic stem cells, ABCG2 protein plays a key role in cellular defence mechanisms against drugs (Natarajan *et al.*, 2012; Raaijmakers, 2007). All these findings suggest that the co-expression of these two MDR proteins can be exploited for the development of a biomarker in the context of water pollution by PAHs and validate the use of a sentinel biomarker in a controlled medium.

The final step in biomarker development required field validation. For this, wild brown trout were collected in three river stations (i) "*Vallée Chaudefour*", (ii) "*Lomprat*" and (iii) "*Issoire*" which differ in water quality (Figure 1).

In trout erythrocytes from "*Vallée de Chaudefour*", there was a total absence of P-gp expression, while ABCG2-like protein was present ( $0.36 \pm 0.06$  AU). The "*Vallée de Chaudefour*" water station represented an uncontaminated river. It is located in a nature reserve, free from human activity (Fig.1). These results suggest that in wild brown trout in an uncontaminated river, only the ABCG2-like protein is expressed.

"*Lomprat*" water station is located in a very small village with about 200 inhabitants, free from any industrial activities. Here, the two MDR proteins were expressed in the red blood cells of brown trout ( $0.24 \pm 0.05$  AU for ABCG2-like protein and  $0.38 \pm 0.06$  AU for P-gp). The t-test revealed a similar expression for the ABCG2-like protein between "*Vallée de Chaudefour*" and "*Lomprat*" water stations, and a significant increase in the expression of P-gp. These results suggest that in a river containing some domestic pollution, the brown trout erythrocytes express both MDR proteins, with P-gp expression higher than ABCG2-like protein.

Finally, in "*Issoire*", the brown trout erythrocytes expressed significantly higher MDR proteins ( $0.43 \pm 0.02$  AU for ABCG2-like protein and  $0.59 \pm 0.03$  AU for P-gp) than the fish from "*Vallée de Chaudefour*" and/or "*Lomprat*". Indeed, "*Issoire*" is a small industrial town with 12,000 inhabitants and the river station is located in the city center. These results show that in wild brown trout living in a contaminated river, the expression of two MDR proteins in erythrocytes was significantly induced.

All the results from the *in vitro* experiments with primary trout erythrocyte cultures and those from wild trout, showed the complementary and relay response of both major MDR proteins, *i.e.* ABCG2-like protein and P-gp, to aquatic pollution. In brown trout erythrocytes, ABCG2-like proteins acts as a vanguard protective protein against low pollution, in complement to P-gp which acts as a "defensive" protective protein in higher pollution. All this suggests that trout erythrocyte MDR proteins could be used as a useful biomarker for identifying the degree



of pollution of aquatic ecosystems. This biological tool offers a considerable advantage since it provides effective response to the increasing need for preventive measures.

### Acknowledgments

This work was funded by grants from the Regional Council of Auvergne and the European Regional Development Fund. The authors wish to express their gratitude to Dr. François Desmolles for helpful discussion, Marc Cladière for the maps, Christelle Blavignac for technical assistance with flow cytometry and Auvergne Valuation for supporting the project.

### References

- Amiard, J.C., Caquet, T., Lagadic, L., 1998. Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement., in: Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. (Eds.), Lavoisier ed, Paris, pp. XXI-XXXI.
- Bamdad, M., Brousseau, P., Denizeau, F., 1999. Identification of a multidrug resistance-like system in *Tetrahymena pyriformis*: evidence for a new detoxication mechanism in freshwater ciliates. *FEBS Lett* 456, 389-393.
- Bamdad, M., Reader, S., Grolière, C.A., Bohatier, J., Denizeau, F., 1997. Uptake and efflux of polycyclic aromatic hydrocarbons by "*Tetrahymena pyriformis*": Evidence for a resistance mechanism. *Cytometry* 28, 170-175.
- Beaulieu, E., Demeule, M., Pouliot, J.F., Averill-Bates, D.A., Murphy, G.F., Beliveau, R., 1995. P-glycoprotein of blood brain barrier: cross-reactivity of Mab C219 with a 190 kDa protein in bovine and rat isolated brain capillaries. *Biochim Biophys Acta* 1233, 27-32.
- Camarès O, D.F., Bamdad M, 2004. *Tetrahymena pyriformis* partial *mdr1* gene for putative P-glycoprotein. EMBL Nucleotide sequence Database.
- Celander, M.C., 2011. Cocktail effects on biomarker responses in fish. *Aquatic Toxicology* 105, 72-77.
- De Jonge, M., Van de Vijver, B., Blust, R., Bervoets, L., 2008. Responses of aquatic organisms to metal pollution in a lowland river in Flanders: A comparison of diatoms and macroinvertebrates. *Science of The Total Environment* 407, 615-629.
- Dudler, R., Sidler, M., 1998. Arabidopsis MDR genes: molecular cloning and protein chemical aspects. *Methods Enzymol* 292, 162-173.
- Dutka, B.J., 1998. Foreword, in: *Microscale testing in aquatic toxicology* Wells, P.G., Lee, K., Blaise, C. (Eds.), CRC Press ed.
- Einicker-Lamas, M., Morales, M.M., Miranda, K., Garcia-Abreu, J., Oliveira, A.J.F., Silva, F.L.S., Oliveira, M.M., 2003. P-glycoprotein-like protein contributes to cadmium resistance in *Euglena gracilis*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 173, 559-564.
- Geisler, M., Blakeslee, J.J., Bouchard, R., Lee, O.R., Vincenzetti, V., Bandyopadhyay, A., Titapiwatanakun, B., Peer, W.A., Bailly, A., Richards, E.L., Ejendal, K.F., Smith, A.P., Baroux, C., Grossniklaus, U., Muller, A., Hrycyna, C.A., Dudler, R., Murphy, A.S., Martinoia, E., 2005. Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J* 44, 179-194.



- Gerlach, J.H., Endicott, J.A., Juranka, P.F., Henderson, G., Sarangi, F., Deuchars, K.L., Ling, V., 1986. Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature* 324, 485-489.
- Krogstad, D.J., Gluzman, I.Y., Herwaldt, B.L., Schlesinger, P.H., Wellems, T.E., 1992. Energy dependence of chloroquine accumulation and chloroquine efflux in *Plasmodium falciparum*. *Biochem Pharmacol* 43, 57-62.
- Kurelec, B., 1992. The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Crit Rev Toxicol* 22, 23-43.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., 1997. Biomarqueurs en Ecotoxicologie: principes et définitions, in: *Des biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux*. Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. (Eds.), Masson ed, Paris, pp. 1-7
- Loncar, J., Popovic, M., Zaja, R., Smital, T., 2010. Gene expression analysis of the ABC efflux transporters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 151, 209-215.
- Marquez B, V.B.F., 2011. ABC multidrug transporters: target for modulation of drug pharmacokinetics and drug-drug interactions. *Current Drug Targets* 12, 600-620.
- Mortensen, A.S., Letcher, R.J., Cangialosi, M.V., Chu, S., Arukwe, A., 2011. Tissue bioaccumulation patterns, xenobiotic biotransformation and steroid hormone levels in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed a diet containing perfluoroactane sulfonic or perfluorooctane carboxylic acids. *Chemosphere* 83, 1035-1044.
- Narbonne, J.F., 1998. Historique-Fondements biologiques de l'utilisation de biomarqueurs en écotoxicologie., in: *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*. Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. (Eds.), Lavoisier ed, Paris, pp. 1-7.
- Natarajan, K., Xie, Y., Baer, M.R., Ross, D.D., 2012. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochemical Pharmacology* 83, 1084-1103.
- Raaijmakers, M.H., 2007. ATP-binding-cassette transporters in hematopoietic stem cells and their utility as therapeutic targets in acute and chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 21, 2094-2102.
- Sarkadi, B., Homolya, L., Szakacs, G., Varadi, A., 2006. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol Rev* 86, 1179-1236.
- Soldatov, A.A., 2005. [Red blood system in fish: peculiarities of its organisation and function]. *Zh Evol Biokhim Fiziol* 41, 217-223.
- Sturm, A., Ziemann, C., Hirsch-Ernst, K.I., Segner, H., 2001. Expression and functional activity of P-glycoprotein in cultured hepatocytes from *Oncorhynchus mykiss*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281, R1119-1126.
- Vache, C., Camares, O., Cardoso-Ferreira, M.C., Dastugue, B., Creveaux, I., Vaury, C., Bamdad, M., 2007. A potential genomic biomarker for the detection of polycyclic aromatic hydrocarbon pollutants: multidrug resistance gene 49 in *Drosophila melanogaster*. *Environ Toxicol Chem* 26, 1418-1424.
- Vache, C., Camares, O., De Graeve, F., Dastugue, B., Meiniel, A., Vaury, C., Pellier, S., Leoz-Garziandia, E., Bamdad, M., 2006. *Drosophila melanogaster* p-glycoprotein: a membrane detoxification system toward polycyclic aromatic hydrocarbon pollutants. *Environ Toxicol Chem* 25, 572-580.
- Van Den Elsen, J.M., Kuntz, D.A., Hoedemaeker, F.J., Rose, D.R., 1999. Antibody C219 recognizes an alpha-helical epitope on P-glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 13679-13684.



Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149.

Zaja, R., Klobucar, R.S., Smital, T., 2007. Detection and functional characterization of Pgp1 (ABCB1) and MRP3 (ABCC3) efflux transporters in the PLHC-1 fish hepatoma cell line. *Aquatic Toxicology* 81, 365-376.



## **B. Test du biomarqueur « Sentinelle » sur des truites fario provenant de différentes rivières du département du Puy-de-Dôme (Auvergne, France).**

### **I. Introduction – Présentation de l'étude**

Nos travaux de recherche visent au développement d'un biomarqueur Sentinelle basé sur l'expression de deux protéines de phénotype « Multidrug Resistance » dans les globules rouges du modèle poisson, en réponse à une pollution aquatique.

Parmi les différentes familles de poissons, nous avons choisi de travailler sur les Salmonidés. En effet, ces derniers sont des organismes intégrateurs de la qualité des milieux aquatiques. De plus, ils sont des organismes bioaccumulateurs. Ces caractéristiques font des salmonidés des organismes potentiellement « sentinelles », c'est-à-dire que leur comportement, leurs caractéristiques physiologiques, entre autres, peuvent servir d'indicateur précoce de l'état de l'environnement (Moutou and Joseph-Enriquez, 1991). Les Salmonidés regroupent les poissons du genre *Salmo*, *Salvelinus* et *Oncorhynchus*. Nous avons choisi de travailler plus particulièrement sur l'espèce *Salmo trutta fario*, communément appelé la truite fario. Cette espèce est présente dans les différents cours d'eaux de la Région d'Auvergne et du territoire français à l'état sauvage. Elle est également élevée en captivité dans les piscicultures. De plus, selon le type d'activité de la pisciculture, *Salmo trutta fario* est destinée soit au repeuplement des rivières, soit à la consommation.

La première étape du développement du biomarqueur Sentinelle a consisté en la recherche de l'expression des deux protéines MDR d'intérêt dans les globules rouges de truites fario. Nos travaux ont mis en évidence l'expression d'une protéine de type ABCG2, intitulée « ABCG2-like » de 75 kDa et d'une P-gp de 140 kDa dans les érythrocytes de la truite.

La seconde étape du développement du biomarqueur « Sentinelle » a concerné l'étude de la modulation de l'expression des deux protéines MDR d'intérêt dans les érythrocytes de truites fario, par des polluants. Pour ce faire, nous avons donc développé des cultures primaires de globules rouges de truite fario afin de pouvoir réaliser des expériences en conditions contrôlées. Pour le xénobiotique à tester, notre choix a été porté sur le Benzo-[a]-



pyrène (B[a]P), un polluant modèle de la famille des Hydrocarbures Aromatiques Polycyclique (HAP), reconnu comme étant la cible des protéines MDR et notamment la P-gp, et sur laquelle l'équipe a déjà une longue expertise. Nous avons, dans un premier temps, reconfirmé l'expression basale de la protéine ABCG2-like et de la P-gp, dans les globules rouges de la truite fario en culture primaire. Ensuite, nous avons démontré que l'exposition des cultures primaires d'érythrocytes à des concentrations croissantes de B[a]P, induisait une réponse de type dose dépendante des deux protéines MDR. L'ensemble de ces résultats montrent clairement l'implication directe de ces deux protéines MDR des globules rouges de truite, dans le mécanisme de défense cellulaire à l'encontre de xénobiotiques et permettent ainsi de valider le biomarqueur Sentinelle, que nous avons retenu dans des conditions *in vitro*. Ces résultats sont décrits dans la publication n°1 intitulée « **Aquatic sentinel biomarker development form coexpression of P-gp and ABCG2-like protein of Brown trout erythrocytes** » (soumise).

Les résultats obtenus au laboratoire ont validé l'intérêt du biomarqueur Sentinelle en réponse à une pollution aquatique à partir des protéines MDR des globules rouges de truites fario, dans des conditions *in vitro*. Toutefois, il restait à démontrer la pertinence de l'utilisation du biomarqueur Sentinelle sur des truites sauvages prélevées dans les différents cours d'eau du département du Puy-de-Dôme (Auvergne, France). Pour cela, une collaboration a été établie entre notre équipe de recherche et « la Fédération Départementale pour la Pêche et pour la Protection du Milieu Aquatique du Puy-de-Dôme » (FDPPMA). Nous avons donc accompagné les membres de la Fédération de la Pêche lors de leur campagne de « pêche d'inventaire » réalisée sur les différents cours d'eau du département. La campagne de pêche d'inventaire a pour objectif d'estimer le peuplement piscicole des rivières, ainsi que la qualité des milieux, *via* le calcul de l'indice Poisson Rivière (IPR) (Oberdorff et al., 2001; Oberdorff et al., 2002). Un deuxième indice plus spécifique à la population de truite fario a été développé pour ce projet par la FDPPMA du Puy-de-Dôme. Cet indice détermine également la qualité du milieu pour la population de truites fario. Lors de nos travaux, les valeurs du biomarqueur Sentinelle ont été analysées en complément des valeurs données par ces deux indices. En effet, l'Indice Poisson Rivière (IPR) et l'Indice de Population de Truite (IPT) donnent des informations sur la qualité du milieu, d'une manière générale pour l'IPR, et plus spécifiquement pour le modèle d'étude (la truite fario) pour l'IPT.

**Tableau 1. Liste des sept métriques intervenant dans le calcul de l'Indice Poisson Rivière.**

Métrique	Réponse à l'augmentation des pressions humaines
Nombre total d'espèces	↗ ou ↘
Nombre d'espèces rhéophiles (organisme aimant évoluer dans les zones de courants)	↘
Nombre d'espèces lithophiles (organisme dépendant des fonds pierreux et/ou frayant sur un substrat composé de graviers)	↘
Densité d'individus tolérants	↗
Densité d'individus invertivores (organisme se nourrissant essentiellement d'invertébrés)	↘
Densité d'individus omnivores	↗
Densité totale d'individus	↗ ou ↘

**Tableau 2. Classe de qualité du milieu définit selon le score de l'Indice Poisson Rivière.**

Note de l'IPR	Classe de qualité	
<7	Excellente	
]7-16]	Bonne	
]16-25]	Médiocre	
]25-36]	Mauvaise	
>36	Très mauvaise	

Le biomarqueur Sentinelle donnerait, quant à lui une information plus particulièrement sur l'état de contamination des organismes vivant dans ces milieux. Afin de valider le biomarqueur Sentinelle en conditions naturelles, le niveau de coexpression de la protéine ABCG2-like et de la P-gp a été analysé dans les érythrocytes de truites fario provenant des différentes rivières du Puy-de-Dôme.

## **II. Matériel et Méthodes**

### **II.1. Les « indices poissons » utilisés**

#### *II.1.a L'Indice Poisson Rivière*

L'Indice Poisson Rivière (IPR) est un outil permettant d'évaluer l'écart entre la composition réelle du peuplement sur une station donnée et la composition du peuplement attendue en situation de référence. Dans le cadre du Programme national Indices Poissons (1996-2001), cet indice fut développé par le Conseil Supérieur de la Pêche, devenu maintenant l'Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques, et par la suite, il a été normalisé en mai 2004 (ONEMA, 2006). La version normalisée de cet indice est basée sur le calcul de sept caractéristiques de peuplement (ou sept métriques) (Tableau 1).

Un score est associé à chaque métrique. Il est déterminé en fonction de l'écart entre le résultat de l'échantillonnage et la valeur de la métrique attendue en situation de référence. La valeur finale de l'IPR correspond à la somme des scores des 7 métriques. Lorsque le peuplement évalué est, en tout point, conforme au peuplement attendu en situation de référence, la valeur de l'IPR est égale à zéro. Par contre, plus les caractéristiques du peuplement échantillonné s'éloignent de celles du peuplement de référence, plus l'IPR augmente. Cet indice n'a pas de limite, mais dans la pratique l'IPR dépasse rarement la valeur de 150, dans les situations les plus altérées.

En fonction des scores de l'IPR, cinq classes de qualité du milieu ont été définies, allant d'excellent à très mauvais (Tableau 2).

L'IPR peut s'appliquer aux différents cours d'eau de France métropolitaine, mais son utilisation est impossible pour évaluer la qualité des cours d'eau de Corse et des zones montagneuses en raison de la faune piscicole particulière retrouvée dans ces régions. En effet, un ensemble de 34 espèces piscicoles ou groupe d'espèces (Tableau 3) est utilisé pour le calcul des différentes métriques. Ces espèces sont les plus représentées à l'échelle du territoire français, et pour lesquelles la modélisation de leur répartition a été possible.

**Tableau 3. Liste des espèces intervenant dans le calcul des différentes métriques pour l'Indice Poisson Rivière.**

<b>Familles</b>	<b>Espèces</b>	<b>Nom commun</b>
Petromyzontidae	<i>Lampetra planeri</i>	Lamproie de Planer
Anguillidae	<i>Anguilla anguilla</i>	Anguille
Salmonidae	<i>Salmo trutta fario</i> <i>Salmo salar</i>	Truite brune Saumon
Thamallidae	<i>Thymallus thymallus</i>	Ombre commun
Esocidae	<i>Esax lucius</i>	Brochet
Cyprinidae	<i>Phoxinus phoxinus</i> <i>Gobio gobio</i> <i>Leuciscus leuciscus</i> <i>Leuciscus cephalus</i> <i>Leuciscus souffla</i> <i>Chondrostoma nasus</i> <i>Chondrostoma toxostoma</i> <i>Barbus barbus</i> <i>Barbus meridionalis</i> <i>Cyprinus carpio</i> <i>Carassius sp.</i> <i>Tinca tinca</i> <i>Blicca bjoerkna et Abramis brama</i> <i>Rutilus rutilus</i> <i>Scardinius erythrophthalmus</i> <i>Rhodeus amarus</i> <i>Alburnoides bipunctatus</i> <i>Alburnus alburnus</i>	Vairon Goujon Vandoise Chevaine Blageon Hotu Toxostome Barbeau Barbeau méridional Carpe Carassins Tanche Brèmes Gardon Rotengle Bouvière Spirlin Ablette
Cobitidae	<i>Barbatula barbatula</i>	Loche franche
Ictaluridae	<i>Ictalurus melas</i>	Poisson-chat
Gadidae	<i>Lota lota</i>	Lote
Gasterosteidae	<i>Gasterosteus aculeatus</i> <i>Pungitius pungitius</i>	Epinoche Epinochette
Centrarchidae	<i>Lepomis gibbosus</i>	Perche soleil
Percidae	<i>Perca fluviatilis</i> <i>Stizostedion lucioperca</i> <i>Gymnocephalus cernuus</i>	Perche Sandre Grémille
Cottidae	<i>Cottus gabis</i>	Chabot

Seulement, dans le cas des cours d'eau de la Corse et de montagnes, peu d'espèces sont retrouvées parmi les trente-quatre, faussant ainsi les scores de l'IPR en les sous évaluant. De plus, l'IPR ne prend en compte ni la biomasse, ni la taille des individus capturés lors de l'échantillonnage. Dans les cours d'eau qui présentent peu d'espèces (1 à 3 espèces), les altérations se manifestent tout d'abord par une modification de la structure d'âge des populations. Or, l'IPR n'apporte que peu d'information sur la structuration des populations piscicoles. Cependant malgré ces limites, à l'heure actuelle, l'IPR constitue encore largement un indice utilisé pour l'estimation de la qualité du milieu dans les cours d'eau du territoire français.

### *II.1.b L'Indice de population de Truite*

Dans le cadre de notre étude, la Fédération de pêche a également mis en place un indice propre à la population de truite (IPT), prenant en compte la correspondance typologique et l'estimation de la structure de la population. Cet indice est un outil d'expertise interne à la FDPPMA du Puy-de-Dôme. La correspondance typologique est basée sur la classification de Verneaux (Verneaux, 1973). En effet, les caractéristiques morphodynamiques du cours d'eau (température, dureté, section mouillée à l'étiage, pente,...), permettent de définir une typologie des cours d'eau, exprimée en dix niveau, de B0 à B9. A chaque niveau typologique, un peuplement piscicole théorique, en termes d'espèces et de densité, peut être défini et comparé au peuplement réellement retrouvé sur le cours d'eau.

L'estimation de la structure de la population s'effectue par l'analyse des classes d'âges en corrélation avec les habitats disponibles et la mésologie du cours d'eau. En effet, en fonction des connaissances sur la granulométrie, les habitats du cours d'eau, une structure de la population peut être définie et donc comparé à la population réellement retrouvée au niveau du cours d'eau.

Cet indice est donc basé sur la somme de ces deux métriques, et est compris entre 0 et 8. Plus l'indice est élevé, plus l'environnement est délétère pour la population trutticole. Les résultats obtenus avec le biomarqueur Sentinelle ont été comparés à ceux obtenus avec l'indice propre de la population de truite.

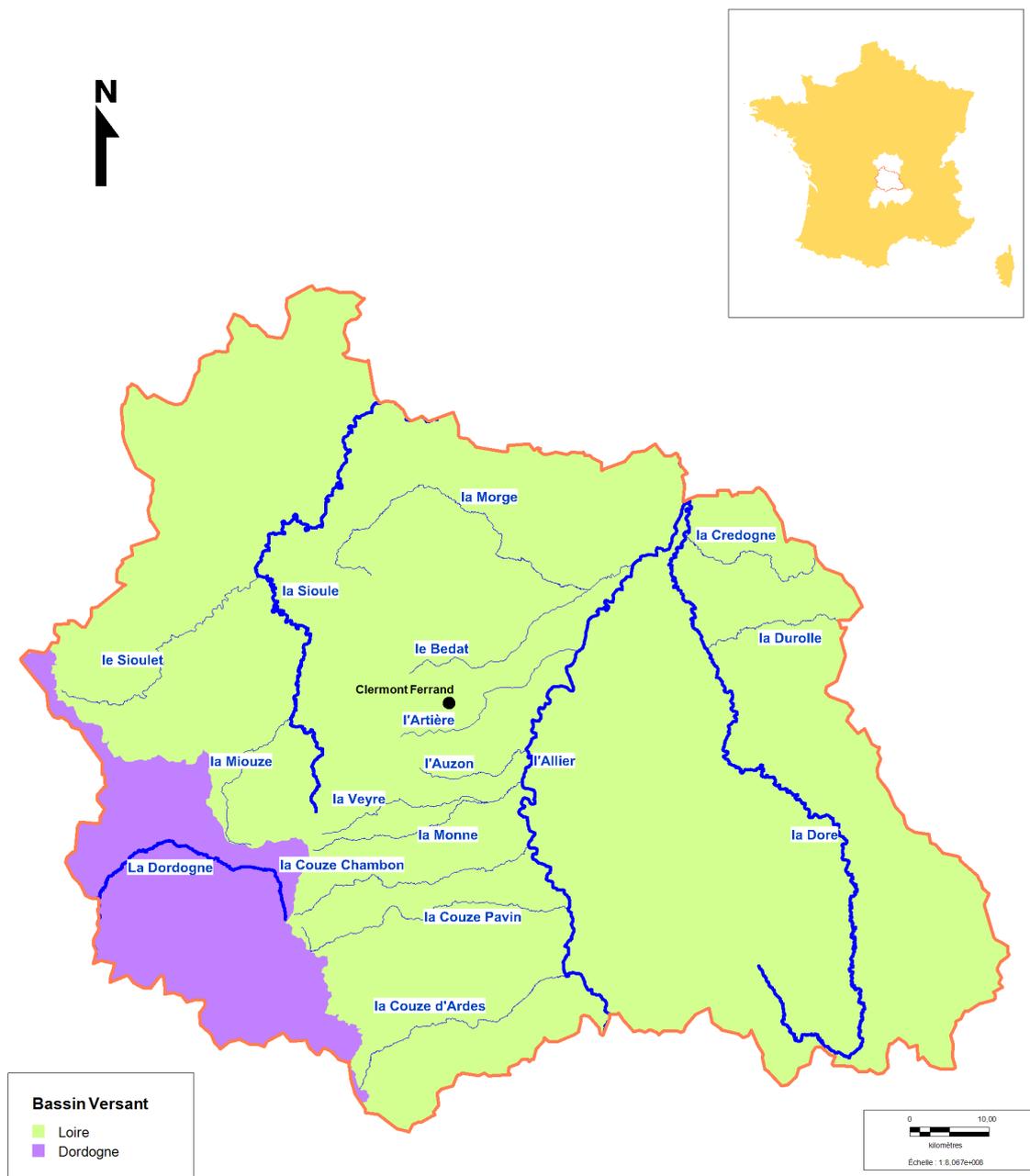


Figure 1. Carte représentant les principaux cours d'eau du département du Puy-de-Dôme.

## **II.2. Etude de l'expression des protéines MDR par la technique du Western-Blot**

Sur chacun des sites, des prélèvements sanguins ont été effectués sur des truites fario 2+, c'est-à-dire ayant passé deux hivers dans la rivière, et mesurant entre 16 et 20 cm. Ces prélèvements ont été conservés à 4°C sur le site d'échantillonnage, puis ramener au laboratoire et congeler afin d'être analysés, par la suite, grâce à la technique de Western blot. Le protocole utilisé pour le western-blot est décrit en détail dans les publications n°1 et 2 du manuscrit.

## **II.3. Analyse statistique**

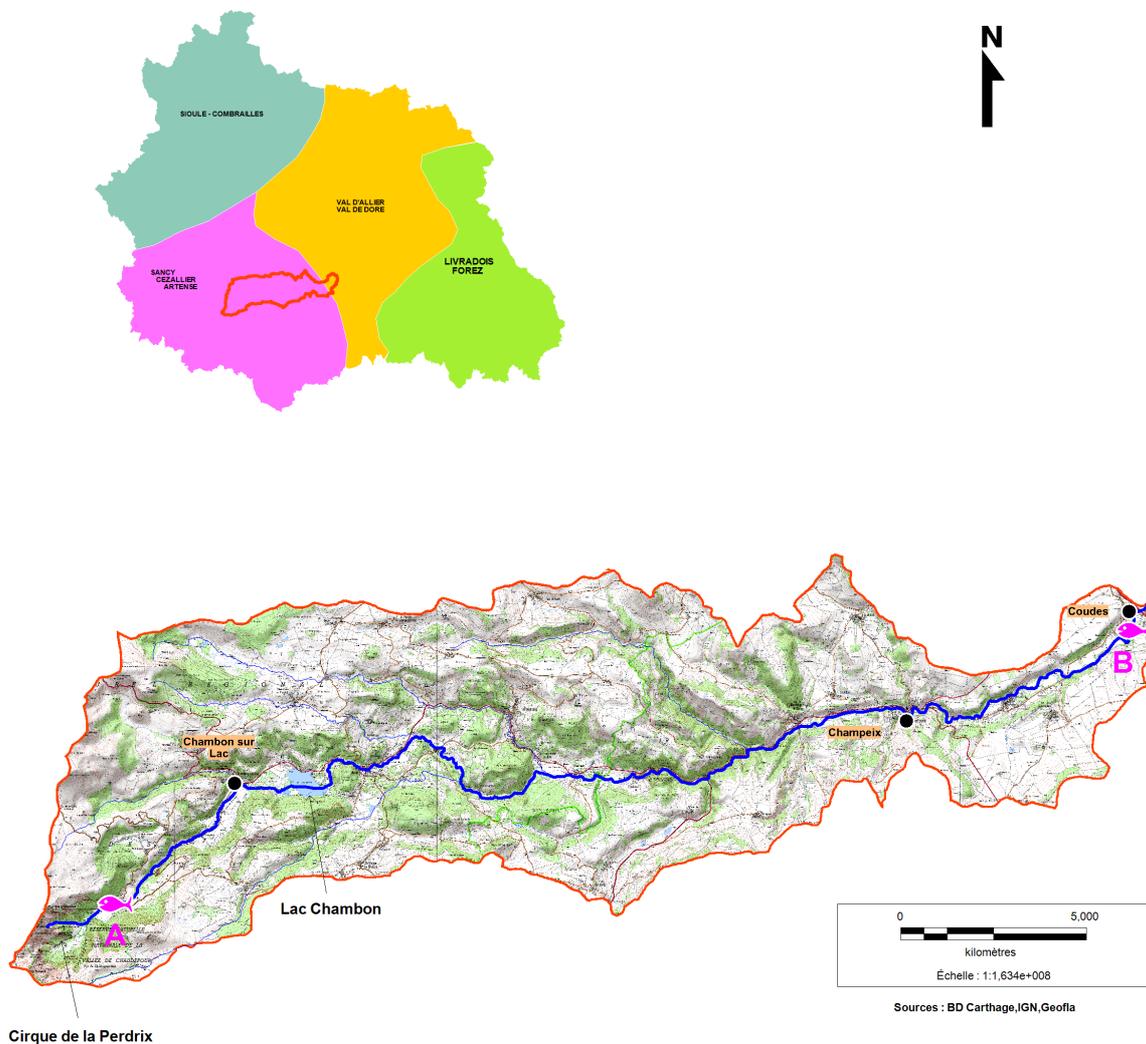
Les données obtenues sont exprimées en unité arbitraire (moyenne  $\pm$  écart-type). Chaque expérience a été réalisée au moins en triplicats. Les comparaisons d'expressions des protéines MDR entre les sites ont été réalisées à l'aide du test t de Student. Le niveau nominal de signification est de 5% dans tous les tests.

## **II.4. Sites d'étude**

Le département du Puy-de-Dôme possède un réseau hydrographique dense et varié. Deux grands bassins hydrographiques traversent le département : le bassin hydrographique de la Loire et le bassin hydrographique de l'Adour-Garonne. Les grands cours d'eau rencontrés dans le département sont la rivière Allier, la Sioule, la Dore et la Dordogne (Figure 1).

Au niveau du bassin hydrographique de la Loire, la rivière principale est l'Allier. En rive droite de la rivière Allier, le principal affluent est la Dore qui reçoit la Dolore, la Durolle et la Credogne. En rive gauche de la rivière Allier, les principaux affluents sont la Couze d'Ardes, la Couze Pavin, la Couze Chambon, la Veyre, la Monne, l'Auzon, l'Artière, la Morge qui reçoit le Bedat, et la Sioule, qui reçoit quant à elle la Miouze et le Sioulet (Figure 1).

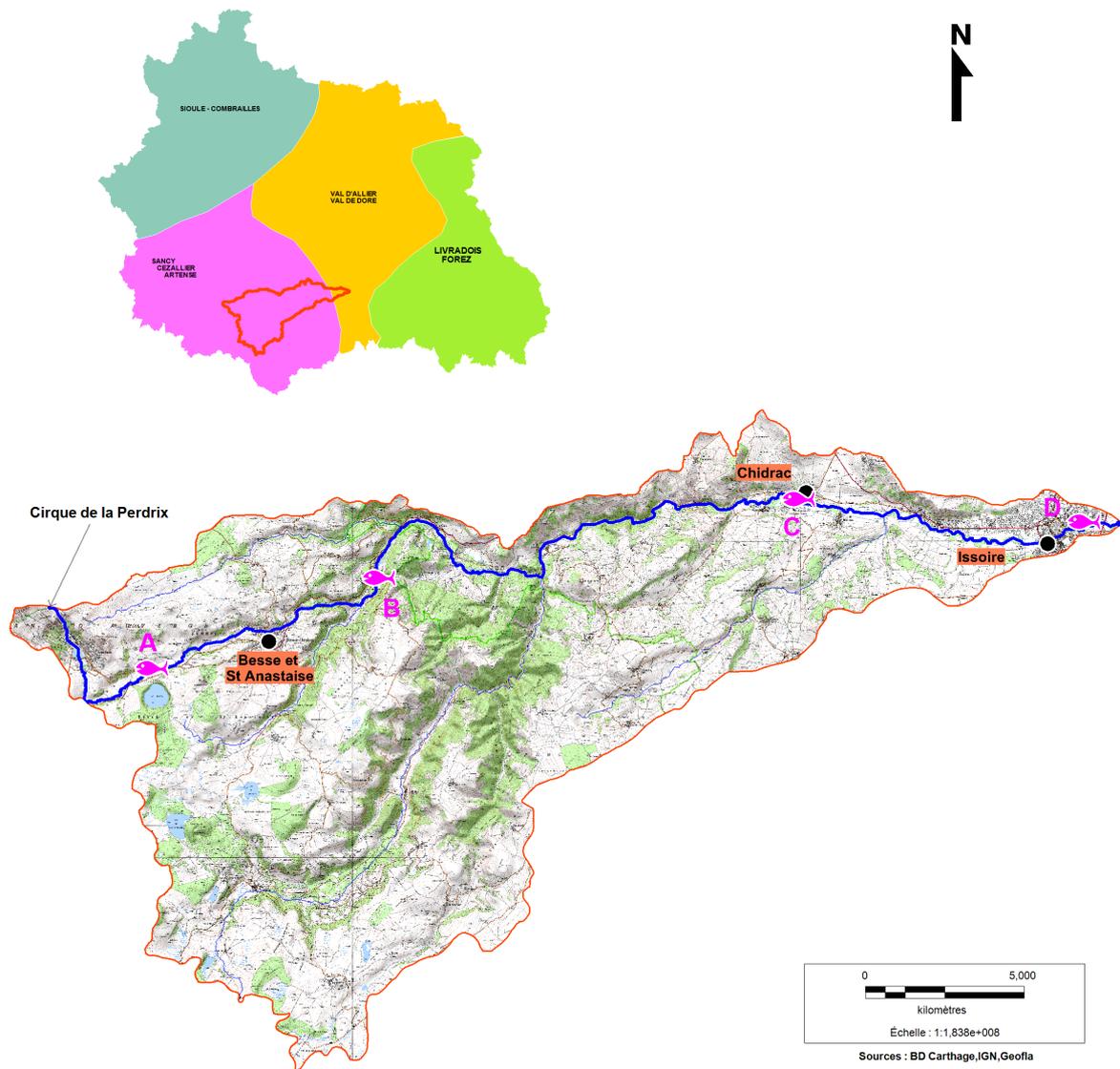
Au niveau du bassin hydrographique de l'Adour-Garonne, le bassin versant rencontré est celui de la Dordogne, qui prend sa source dans les monts Dore et draine quelques communes avant de se diriger vers les départements voisins (Figure 1). Ce bassin ne couvre que 10% du département.



**Figure 2. Situation géographique de la rivière Couze Chaudefour-Couze Chambon, et localisation des deux sites de prélèvements sur deux sites de niveau de pollution contrastée.**

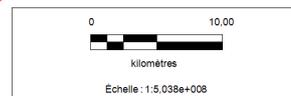
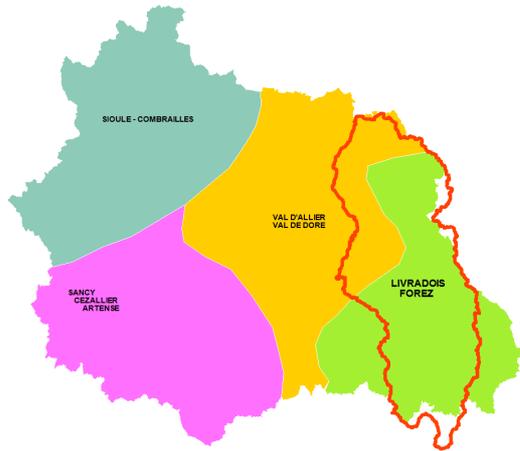
A : site de la réserve de la Vallée de Chaudefour, pratiquement exempt de pollution.

B : site à hauteur de Coudes, sur la Couze Chambon, où différents types de pollution (rejets domestiques, produits phytosanitaires et lessivage de routes) affectent la rivière.



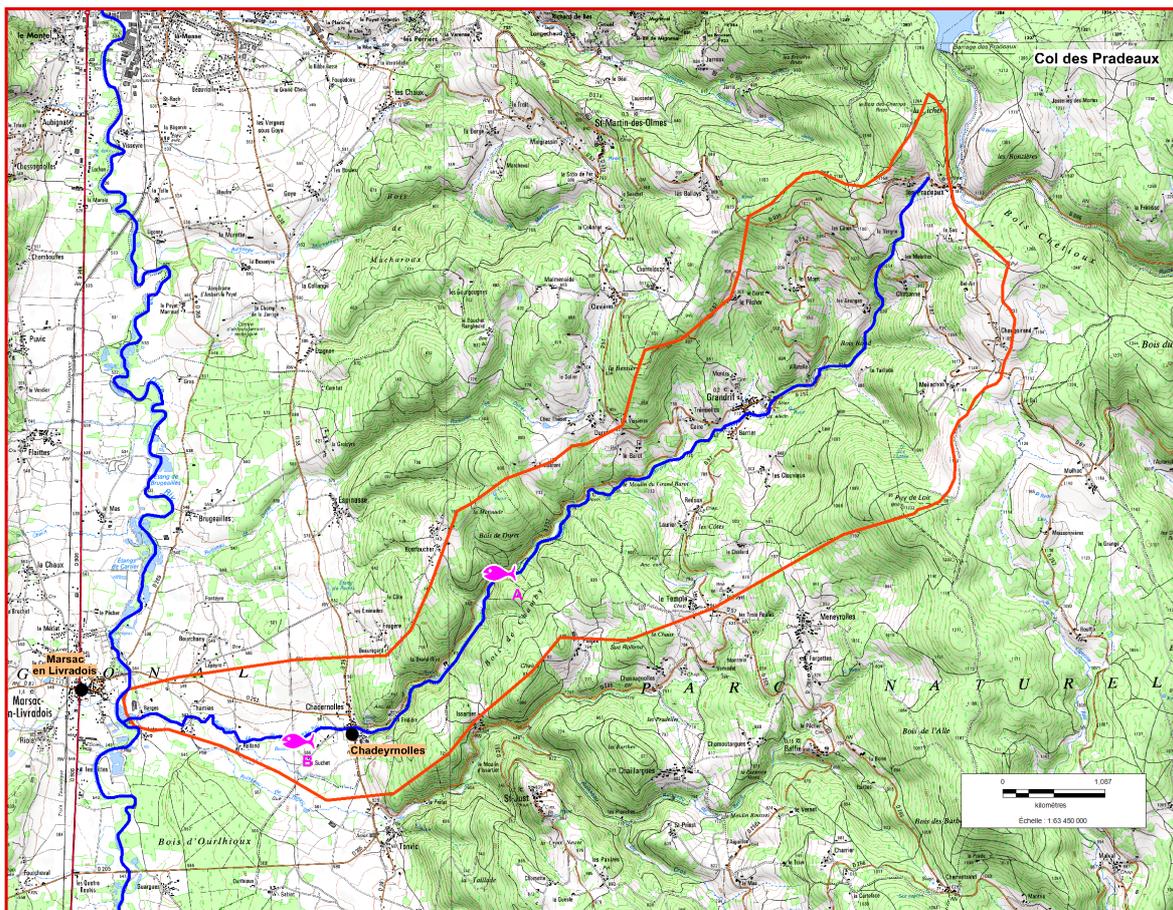
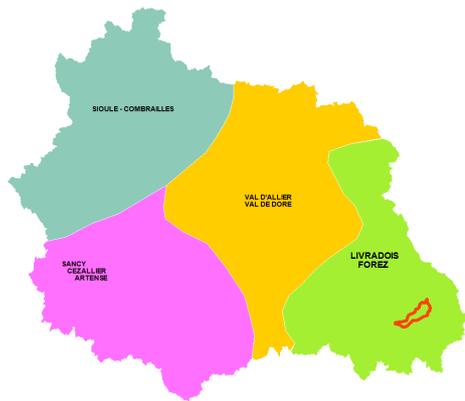
**Figure 3. Situation géographique de la rivière Couze Pavin et localisation des quatre sites de prélèvements sur différentes zones d'une même rivière.**

Les truites fario ont été prélevées sur des stations situées sur le gradient amont-aval de la rivière Couze Pavin : « Plane du Gelat » (A), « Lomprat » (B), « Chidrac » (C) et « Issoire » (D).



Sources : BD Carthage,IGN,Geofa

Figure 4. Situation géographique de la rivière Dore.



Sources : BD Carthage,IGN,Geofa

Figure 5. Situation géographique du ruisseau de Grandrif.

**Tableau 4. Résultat de l'expression de la protéines ABCG2-like et de la P-gp (exprimé en unité arbitraire) des globules rouges des truites fario de 19 sites analysées**

N° Site	Rivière	Station	ABCG2-like	P-gp
1	Couze Chambon	Coudes	0,73±0,04	0,57±0,05
2	Couze Chambon	Bief Coudes	0,28±0,13	0,53±0,18
3	Grandrif	Amont Chadernolles	0,26±0,01	0,24±0,04
4	Grandrif	Aval Chadernolles	0,51±0,01	0,42±0,03
5	Couze Chaudesfour	Pont D36	0,36±0,06	0,00
10	Verdeix	Le Trador	0,32±0,08	0,57±0,09
11	Dore	Amont Poyet	0,28±0,02	0,26±0,03
12	Dore	Aval Poyet	0,48±0,03	0,30±0,08
14	Couze Pavin	Issoire	0,42±0,02	0,59±0,03
15	Couze Pavin	Lomprat	0,24±0,05	0,38±0,06
20	Couze Pavin	Chidrac	0,35±0,04	0,94±0,05
23	Tarentaine	Moulin de Covy	0,29±0,12	0,23±0,02
24	Tarentaine	Pont des Anes	0,19±0,06	0,20±0,04
25	Couze Pavin	Plaine du Gelat	0,34±0,05	0,59±0,04
28	Durolle	Aval STEP Thiers	0,45±0,04	0,55±0,12
29	Durolle	Barrage Membrun	0,37±0,04	0,24±0,02
30	Durolle	Usine-Gare	0,53±0,11	0,39±0,08
31	Veyre	Pont de Passadou	0,56±0,12	0,35±0,05
32	Ance du Nord	No Kill	0,35±0,02	0,23±0,08

Nous allons détailler les différents cours d'eau dont les résultats seront exposés afin de valider la pertinence du biomarqueur Sentinelle en réponse à une pollution aquatique. Ces cours d'eau sont :

- la rivière Couze Chaudefour – Couze Chambon
- la rivière Couze Pavin
- la rivière Dore
- le ruisseau Grandrif

#### *II.4.a La Couze Chaudefour - Couze Chambon*

Ces deux rivières sont situées dans le bassin halieutique du Sancy-Cézallier-Artense (Figure 2). La Couze Chaudefour prend sa source dans le cirque du Puy de la Perdrix, et du Puy Ferrand à 1700 mètres d'altitude dans la réserve naturelle de la vallée de Chaudefour. La Couze Chaudefour prend le nom de Couze Chambon au niveau du Lac Chambon. Elle déverse ensuite ses alluvions dans le Lac Chambon, puis descend en méandres jusqu'à la rivière Allier, qu'elle rejoint au niveau du village de Coudes. C'est une rivière de première catégorie assez étroite aux berges très boisées et avec un débit compris entre 5 et 10 m<sup>3</sup>, et d'une longueur d'environ 40 kilomètres.

#### *II.4.b La Couze Pavin*

La Couze Pavin est également située dans le bassin halieutique du Sancy-Cézallier-Artense (Figure 3). Elle prend sa source à 1700 mètres d'altitude dans le cirque de la Perdrix, au niveau du versant sud-est du Puy de Paillaret. Son parcours est long de plus de 47 kilomètres et elle se jette dans l'Allier au niveau d'Issoire.

#### *II.4.c La Dore*

La Dore prend sa source dans le bassin halieutique du Livradois-Forez avant de cheminer dans le secteur du Val d'Allier-Val de Dore et de se jeter dans l'Allier, en rive droite, à la hauteur de Ris en amont de Saint-Yorre et en aval de Puy-Guillaume (Figure 4). De sa source à sa confluence avec l'Allier, la Dore parcourt environ 140 km. Elle prend sa source à 1040 mètres d'altitude dans les bois de Pégoire, elle est appelée ruisseau de Berny puis ruisseau d'Aubianges avant de prendre son nom définitif à son arrivée sur le territoire de Doranges. La Dore constitue la véritable épine dorsale du parc naturel régional Livradois-Forez.

#### *II.4.d Le ruisseau de Grandrif*

Le ruisseau de Grandrif se situe dans le secteur halieutique du Livradois-Forez dans la commune de Marsac-en-Livradois (Figure 5). Ce ruisseau possède deux sources : l'une au



niveau du col des Pradeaux à 1200 mètres d'altitude et la deuxième provient du barrage des Pradeaux, qui lui est alimenté par le ruisseau de l'Enfer qui entre en confluence avec l'Ance du Nord, rivière appartenant au bassin versant de la Loire. Le ruisseau de Grandrif, d'une longueur de 13,5 kilomètres, est soumis aux variations du niveau du barrage des Pradeaux, et donc connaît des variations tant sur son plan morphologique que sur le plan de son fonctionnement piscicole.

### **III. Résultats et Discussion**

Le tableau 4 regroupe les niveaux d'expression de la protéine ABCG2-like et de la P-gp pour les 19 sites analysés. Nous détaillerons ci-dessous les résultats obtenus sur un certain nombre de sites caractéristiques qui nous ont permis de valider l'utilisation du biomarqueur Sentinelle.

#### **III.1. Réponse du biomarqueur Sentinelle chez des truites fario prélevées sur deux sites présentant un niveau de pollution contrastée.**

Le biomarqueur Sentinelle a été premièrement testé au niveau de deux zones présentant un niveau de pollution très différent : (i) le site de la réserve de la Vallée de Chaudefour qui est reconnu comme étant pratiquement exempt de toute pollution et (ii) la Couze Chambon à hauteur de Coudes où différentes pollutions (rejets domestiques, produits phytosanitaires et lessivage de routes) affectent la rivière (Figure 2).

Le site de la Vallée de Chaudefour représente un site de référence. Les résultats présentés sur la figure 6 montrent que le taux d'expression de la protéine ABCG2-like est de  $0,36 \pm 0,02$  UA, alors que le taux d'expression de la P-gp est nul, dans les globules rouges des truites fario provenant de la réserve de la Vallée de Chaudefour. Ces résultats montrent que, chez les truites fario sauvages vivant dans une rivière non contaminée, la seule protéine MDR exprimée est l'ABCG2-like. De plus, le calcul de l'indice de la population de truite est de 1, caractéristique d'une zone de très bonne qualité pour la population de la truite. Par contre, l'IPR mesuré sur ce site révèle une valeur de 17, traduisant une zone de qualité médiocre. Ce mauvais score de l'IPR s'explique par le fait que toutes les espèces nécessaires à son calcul ne sont pas présentes dans cette partie très amont du cours d'eau. En effet, seul la truite fario est présente au niveau de la zone d'échantillonnage et en faible densité. Cette zone est située en tête de bassin versant de la Couze Chaudefour et en moyenne montagne

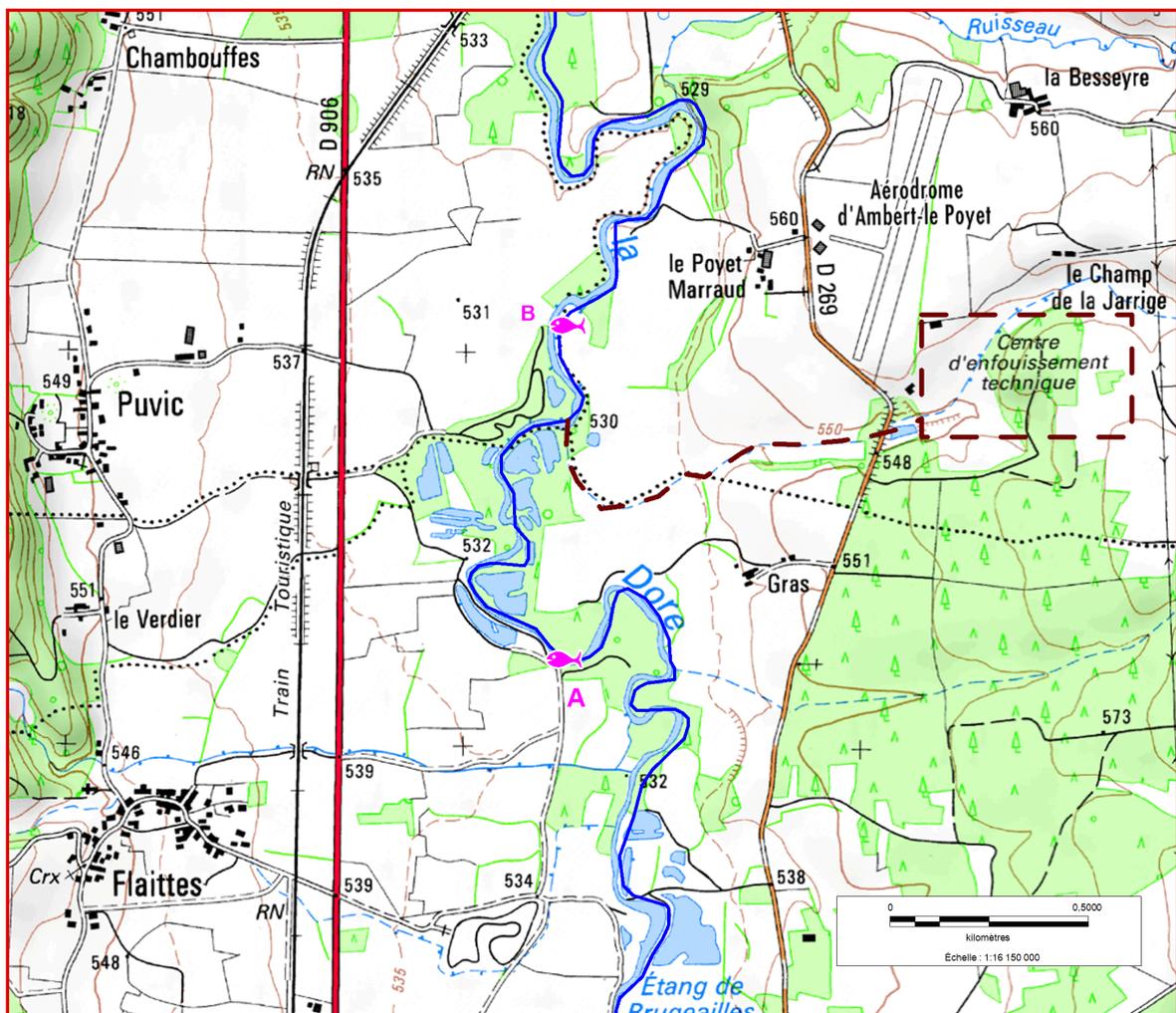
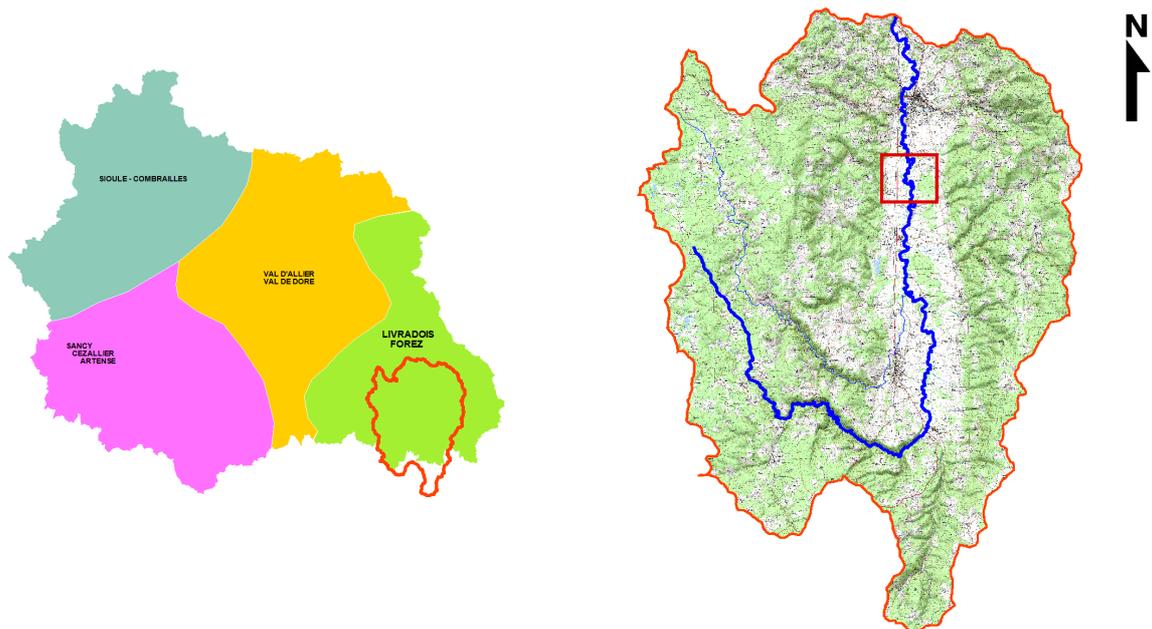


Figure 7. Localisation des sites de prélèvements de truite fario provenant de l'amont (A) et de l'aval (B) de la station « Poyet », situé sur la rivière « Dore ».

(Figure 2). Ces caractéristiques environnementales ne sont pas favorables au développement des espèces piscicoles. De plus, cette vallée a subi un violent orage en 1994 engendrant de nombreux obstacles sur le cours d'eau. Par ailleurs, l'Homme a construit de nombreux obstacles (buses, seuils) pour les espèces piscicoles sur cette rivière. Ces résultats montrent clairement que le seul facteur IPR, considéré de façon isolée, ne peut être considéré comme représentatif de la qualité des cours d'eau de cette rivière, et le biomarqueur Sentinelle peut ainsi apporter une réponse complémentaire pour désigner le degré de pollution de ce cours d'eau.

Au niveau du village de Coudes, situé sur la Couze Chambon, les érythrocytes de truite fario montrent une coexpression des deux protéines MDR. En effet, le niveau d'expression de la protéine ABCG2-like et de la P-gp est, respectivement, de  $0,73 \text{ UA} \pm 0,04 \text{ UA}$  et  $0,57 \text{ UA} \pm 0,05 \text{ UA}$  (Figure 6). Pour déterminer si le degré de contamination de l'eau a influencé le niveau d'expression des deux protéines MDR dans les globules rouges, un test t de Student a été réalisé avec un risque de 0,05. Une différence significative a été notée pour les deux protéines MDR dans les érythrocytes, entre les deux sites. Les résultats du biomarqueur Sentinelle montre une augmentation de la protéine ABCG2-like et de la P-gp dans les cellules sanguines des truites fario prélevées au niveau de la station contaminée. Ces augmentations indiquent que le mécanisme de défense cellulaire a été mis en jeu afin de protéger l'organisme contre une contamination présente dans l'eau de la rivière. L'analyse de l'indice de la population de truite calculé sur ce site, montre un indice de 5, indiquant une mauvaise qualité du site pour l'espèce truite fario. En effet, la densité de truite est très faible par rapport à celle attendue en situation de référence et sa population est non structurée. L'IPR réalisé sur ce site donne une valeur de 16, indiquant une bonne qualité du milieu. En effet, même si beaucoup d'espèces piscicoles sont présentes, leurs densités sont faibles par rapport à la densité attendue, notamment pour les individus invertivores, tels que la truite, l'ombre, et les individus rhéophiles, tel que le chabot. Pour ce site, les résultats obtenus pour le biomarqueur Sentinelle sont en accord avec les indices IPT et IPR mesurés, validant ainsi l'intérêt de l'utilisation du biomarqueur Sentinelle sur deux zones de contamination très différentes.



### **III.2. Réponse du biomarqueur Sentinelle chez des truites fario provenant de l'amont et de l'aval d'un site contaminé**

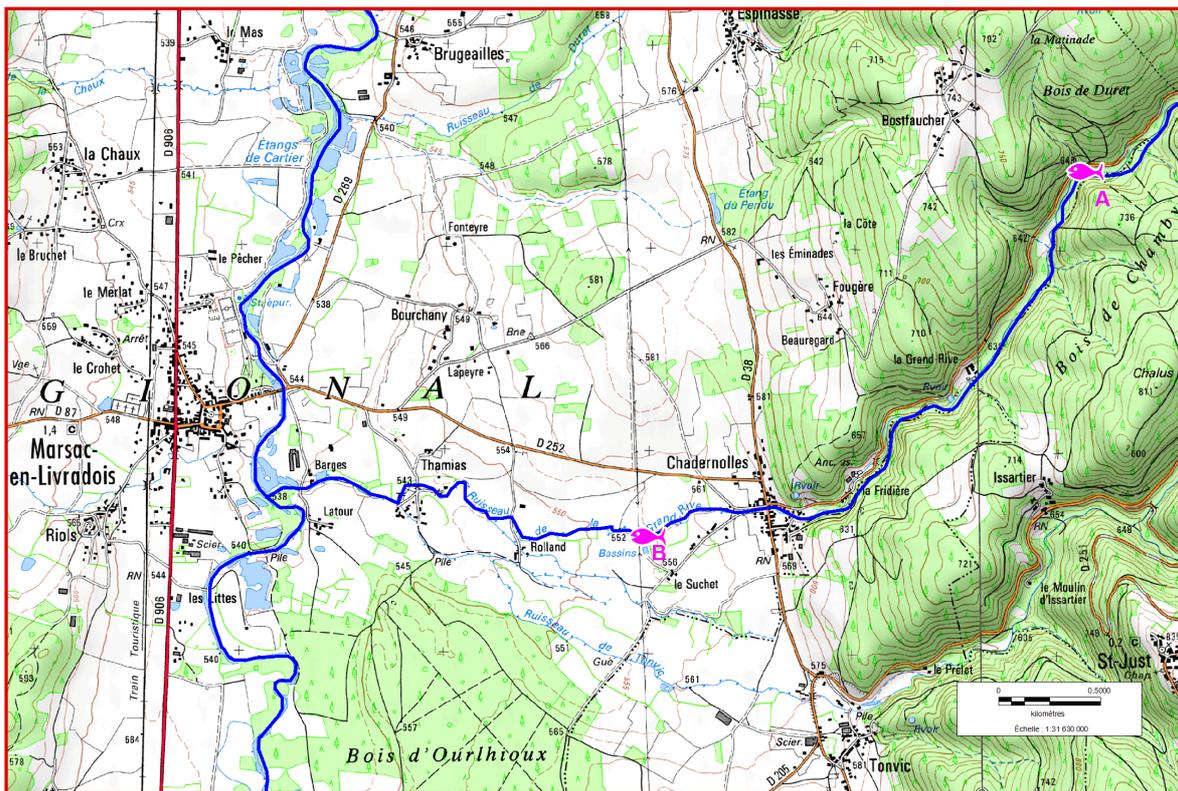
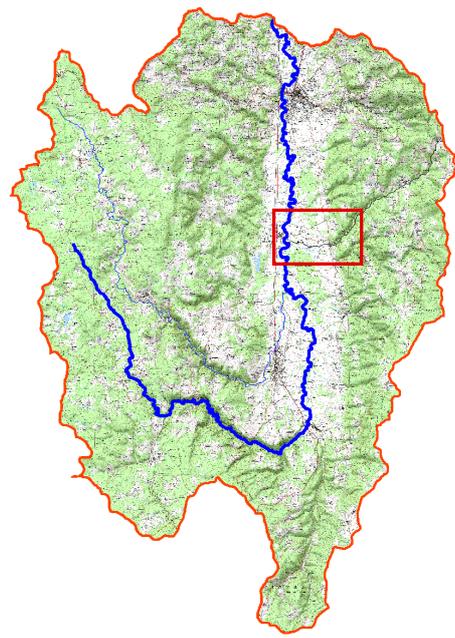
Nous avons poursuivi ces travaux en amont et en aval de deux sites, reconnu comme étant contaminé. Le premier est situé sur la rivière « Dore » au niveau de la décharge « Poyet » (Figure 7). Le deuxième est localisé sur le ruisseau « Grandrif » au niveau de la station d'épuration de "Chadernolles" (Figure 9).

#### *III.2.a Station « Poyet » située sur la Dore*

Le premier site est situé sur la rivière « Dore » au niveau de la décharge « Poyet » (Figure 7).

En amont du site « Poyet », le niveau d'expression des deux protéines MDR est de  $0,28 \pm 0,02$  UA pour la protéine ABCG2-like et de  $0,26 \pm 0,03$  UA pour la P-gp dans les globules rouges de truite fario (Figure 8). Dans cette zone, les deux protéines MDR sont exprimées avec un taux comparable indiquant une contamination de l'eau de cette rivière. Le calcul de l'indice de la population de truite montre une valeur de 4. En effet, pour ce site, nous avons observé une faible densité de truites avec une déstructuration de la population par une absence d'alevins (0+). De plus, ce site présente des habitats défavorables au développement de la truite par la présence de nombreux faciès lenthiques, c'est-à-dire des zones présentant de faibles courants. Cependant, l'IPR, calculé pour ce site, montre un score de 16, indiquant une bonne qualité du milieu en amont de la décharge. Cette note est due à la présence d'espèces indésirables, comme le poisson-chat et la perche soleil, qui sont des espèces d'étang, et non de cours d'eau. De plus, il manque des espèces cibles ou alors leur densité est faible par rapport à la densité théorique.

En aval du site « Poyet », le taux d'expression de la protéine ABCG2-like est de  $0,48 \pm 0,03$  UA et celui de la P-gp de  $0,30 \pm 0,08$  UA (Figure 8). Selon le test de Student, seule l'expression de la protéine ABCG2-like est significativement différente entre l'amont et en aval de la décharge située sur la rivière « Dore ». Ces résultats indiquent une qualité médiocre de l'eau sur ce site avec une légère aggravation de l'état de contamination en aval de cette rivière, relevée par des taux d'expressions plus élevés à cette dernière station. L'indice de population truite est de 2 pour ce site. En effet, une faible densité de truites est observée dans cette zone due probablement à l'absence de 0+. Par contre, ce site présente une qualité d'habitats relativement bonne. En effet, en aval de la décharge « Poyet », un habitat plus favorable est retrouvé avec la présence de radiers et de plats courants



Sources : BD Carthage,IGN,Geofia

Figure 9. Localisation des sites de prélèvements de truite fario provenant de l'amont (A) et de l'aval (B) de la station d'épuration de « Chandernolles », situé sur le ruisseau « Grandrif ».

permettant théoriquement un développement plus aisé de la truite. L'IPR calculé est de 17, indiquant une qualité médiocre du milieu. Cette mauvaise note est également due à la présence d'espèces indésirables, ainsi qu'au manque d'espèces cibles et/ou une densité faible par rapport à la densité théorique.

Malgré la présence d'un habitat plus favorable à la truite en aval de la décharge « Poyet » (IPT favorable), le biomarqueur Sentinelle indique une dégradation de la qualité de l'eau au niveau de ce site. Ces résultats laissent supposer que le biomarqueur Sentinelle donne une information directe et ciblée sur l'état des organismes vivants en lien avec le degré de pollution du cours d'eau alors que l'IPT et l'IPR donnent une information plus générale sur les conditions de l'habitat favorables ou pas au développement de la truite ou d'autres espèces piscicoles.

### *III.2.b Site en amont et en aval de la station d'épuration de "Chadernolle"*

Dans le but d'analyser la réponse du biomarqueur Sentinelle en amont et aval d'une zone contaminée, nous avons choisi un deuxième site situé en amont et en aval d'une station d'épuration (Figure 9). L'étude de l'expression de la protéine ABCG2-like et de P-gp a donc été effectuée sur des truites provenant du ruisseau « Grandrif ». Pour ce site, les résultats sont présentés sur la figure 10.

En amont du site, le niveau d'expression des protéines MDR dans les globules rouges de truite fario est de  $0,26 \pm 0,01$  UA pour ABCG2-like et  $0,24 \pm 0,04$  UA pour la P-gp. L'indice population de truite est de 0, ce qui indique une bonne qualité du site pour la truite fario. En effet, la structure de la population trutticole est assez bonne par rapport à la situation théorique malgré un manque de truites 2+. L'Indice Poissons Rivière est de 14 pour le site en amont, indiquant une bonne qualité du milieu. Ce score est dû en partie à la présence seulement de deux espèces piscicoles, la truite et le goujon, qui lui normalement ne devrait pas se trouver dans ce cours d'eau. De plus, l'espèce Chabot est manquante.

Les résultats obtenus par l'IPT et l'IPR laissent supposer une qualité d'eau de rivière acceptable. Le biomarqueur Sentinelle indique clairement un taux d'expression comparable des deux protéines MDR révélant la présence d'une contamination du cours d'eau.

A l'aval du site, le taux d'expression des protéines ABCG2-like est de  $0,51 \pm 0,01$  UA et le taux d'expression de la P-gp est de  $0,42 \pm 0,03$  UA (Figure 10). Selon le test t de Student, l'expression des deux protéines MDR est significativement différente entre l'amont et en



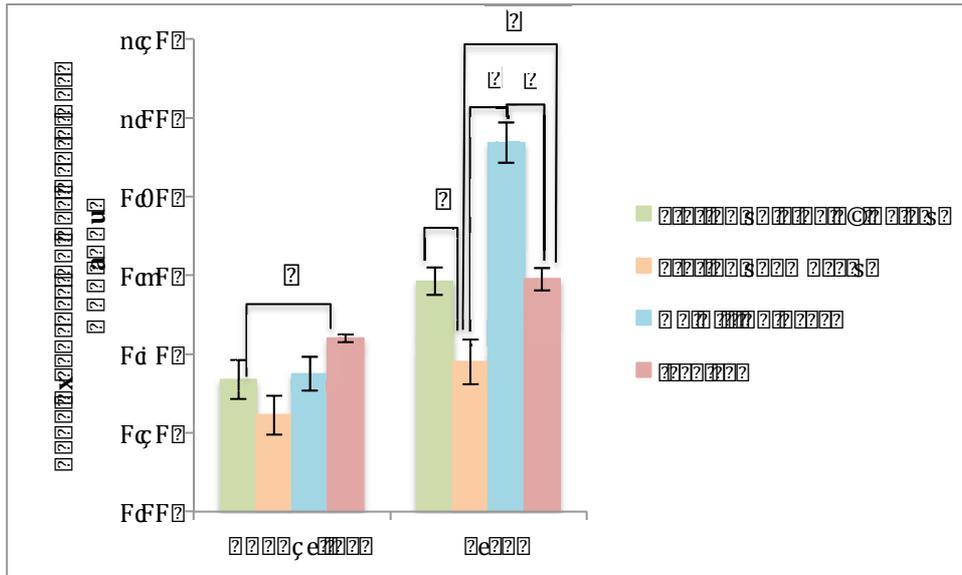
aval de l'usine de traitement des eaux usées de "Chadernolles", situé sur la rivière « Grandrif ». En effet, le taux d'expression de ces deux protéines a quasiment doublé en aval du site montrant un niveau de contamination plus important de l'eau dans cette zone de rivière. La station d'épuration de « Chadernolles » est constituée d'un système de lagunage naturel, c'est-à-dire une technique naturelle d'épuration des eaux basée sur la déséutrophisation. Il s'inspire des systèmes naturels d'épuration et de filtration par des micro-organismes, des algues et des plantes aquatiques. Ce système collecte un hameau ainsi qu'un camping privé très fréquenté en période estivale. Cette station est prévue pour épurer les eaux d'une population équivalente à 150 habitants. Ce système permet une très bonne élimination des pollutions microbiologiques mais est inefficace sur les pollutions chimiques. Le biomarqueur Sentinelle révèle une insuffisance d'efficacité de la station d'épuration.

Cependant, pour ce site, l'indice population de truite est de 1, indiquant une zone de bonne qualité pour la population truite, malgré une structuration artificialisée avec une surabondance de 0+, et un manque de 1+ et 2+. Quant à l'IPR, sa valeur de 4, indique également une qualité d'eau excellente. En effet, toutes les espèces que l'on doit retrouver au niveau du peuplement théorique sont présentes, avec même pour certaines une densité supérieure à la densité attendue, sauf pour le vairon. Ces données confirment à nouveau la sensibilité du biomarqueur Sentinelle qui relate le degré de la pollution d'un cours d'eau et se distinguent des réponses des indices utilisés à l'heure actuelle par la FDPPMA du Puy-de-Dôme, qui détermine plutôt la qualité du milieu par des caractéristiques typologiques et l'estimation quantitative de la population de poissons.

Ces résultats montrent l'intérêt du biomarqueur Sentinelle en tant que nouvel outil d'estimation du degré de la pollution de l'eau, qui apporte une information plus précise que les indices utilisés actuellement.

### **III.3. Réponse du biomarqueur Sentinelle chez des truites prélevées sur différentes zones d'une même rivière.**

Toujours dans l'objectif de la validation du biomarqueur Sentinelle, nous avons poursuivi ces travaux par l'étude de l'expression des deux protéines MDR dans des stations situées sur le gradient amont-aval de la rivière « Couze Pavin ».



**Figure 11. Coexpression des protéines ABCG2-like et P-gp dans les érythrocytes de truites fario prélevées sur quatre sites, situés sur un gradient amont-aval de la rivière « Couze Pavin ».**

Les stations "Plaine du Gelat", "Lomprat", "Chidrac" et «Issoire» sont respectivement situées de l'amont vers l'aval de la rivière. Les protéines MDR ont été analysées à partir de l'extrait de protéines totales des globules rouges par la technique du western blot, et quantifiées à l'aide du logiciel QuantityOne (Biorad ®). UA: unités arbitraires. a indique des différences significatives ( $p < 0,05$ ) pour l'expression des protéines MDR entre deux sites.

Pour ces expériences, les truites fario ont été prélevées sur quatre sites de cette rivière : « Plaine du Gelat », « Lomprat », « Chidrac » et « Issoire » (Figure 3). Le niveau d'expression des deux protéines MDR a été analysé dans des globules rouges des truites fario provenant de chacun des sites.

### *III.3.a Station « Plaine du Gelat » (station la plus en amont)*

Sur la station « Plaine du Gelat », les taux d'expression des protéines MDR dans les globules rouges des truites fario sont de  $0,34 \pm 0,05$  UA pour la protéine ABCG2-like et de  $0,59 \pm 0,04$  UA pour la P-gp (Figure 11). Concernant le calcul des autres indices, l'IPT est bon (1) car la densité et la structure de la population truite est conforme à celle attendue. L'IPR est également assez bon (10). Ce score est dû à l'absence de l'espèce Chabot au niveau du site de prélèvements. Sur ce site, le biomarqueur Sentinelle indique un taux de P-gp relativement élevé chez les truites, reflétant un état de contamination significatif du cours d'eau, alors que les valeurs des indices IPT et IPR, indiquent une bonne qualité du milieu.

### *III.3.b Station « Lomprat »*

Au niveau des érythrocytes des truites fario prélevées sur ce site, un taux d'expression de  $0,25 \pm 0,05$  UA pour la protéine ABCG2-like et de  $0,38 \pm 0,06$  UA pour la P-gp a été détecté (Figure 11). En comparaison avec le site précédent, le test de Student révèle une expression similaire pour la protéine ABCG2-like et une diminution significative de l'expression de la protéine P-gp. Ceci laisse penser que le site de « Lomprat » présente une contamination moindre par rapport au site de la « Plaine du Gelat », situé pourtant plus en amont. Cette observation peut s'expliquer par le fait qu'à une centaine de mètres en aval du point de prélèvement, la Couze Pavin reçoit comme affluent, le ruisseau de Vaucoux, qui alimente à hauteur de 40 % la Couze Pavin. Or, ce ruisseau est d'une qualité d'eau excellente, et entraîne donc une dilution de la Couze Pavin au niveau de la confluence. De plus, l'IPT sur cette zone est excellent (0), pour les mêmes raisons évoquées que pour le site de la « Plaine du Gelat ». L'IPR est également bon (11), malgré une absence d'individus concernant les espèces de chabot et de vairon. Pour ce site, les résultats obtenus pour le biomarqueur Sentinelle, l'IPT et l'IPR indiquent une bonne qualité du milieu.

### *III.3.c Station « Chidrac »*

Au niveau des globules rouges des truites fario provenant du site de Chidrac, les taux d'expression des protéines MDR sont de  $0,35 \pm 0,04$  UA pour la protéine ABCG2-like et de  $0,94 \pm 0,05$  UA pour la P-gp (Figure 11). Le test t de Student révèle une expression similaire



de la protéine ABCG2-like entre ce site et les deux sites précédents. Par contre, pour la protéine P-gp, le test indique une augmentation d'expression significative pour ce site en comparaison avec les sites de la « Plaine du Gelat et de « Lomprat ». L'augmentation de la P-gp suggère qu'il existe une pollution plus importante dans cette zone de rivière que pour les sites plus en amont.

L'IPT (4) et l'IPR (11) indiquent un milieu de qualité satisfaisante. Cependant, la densité du peuplement piscicole, truites incluses, retrouvée est faible par rapport à celle attendue en théorie. Le niveau de contamination de cette zone de la Couze Pavin, révélé par le biomarqueur Sentinelle peut alors expliquer la faiblesse des populations observées.

#### *III.3.d Station « Issoire » (la plus en aval)*

Les érythrocytes de truite fario présentent un niveau d'expression de  $0,44 \pm 0,01$  UA pour la protéine ABCG2-like et de  $0,59 \pm 0,03$  UA pour la P-gp (Figure 11). Le test de Student révèle une augmentation significative de la protéine ABCG2-like entre ce site et les trois précédents, révélant une faible augmentation de la pollution du milieu. Quant à la P-gp, son expression diminue significativement par rapport au site de Chidrac, révélant une diminution faible de la toxicité du cours d'eau à ce niveau. Par ailleurs, la comparaison de l'expression de la P-gp entre le site amont (« Plaine du Gelat ») et le site aval (« Issoire ») montre une toxicité similaire de la rivière. Ces résultats montrent que le biomarqueur Sentinelle répond directement au degré de la pollution du site analysé. Quant aux deux autres paramètres, ils indiquent une qualité bonne de la rivière (IPT : 1, IPR : 11). En effet, toutes les espèces attendues sont présentes avec de bonnes densités, malgré l'absence de chabots et de lamproies de Planer.

L'ensemble de ces résultats montre que la protéine ABCG2-like et la P-gp sont exprimées dans les globules de rouges de truites fario, tout au long de la rivière « Couze Pavin ». Ceci indique la présence d'une contamination de l'eau sur tous les sites analysés. De plus, le biomarqueur Sentinelle a permis de révéler un degré de contamination différent sur chacun des sites. En effet, sur le site Lomprat, une baisse de la pollution de l'eau est détectée par une diminution significative de l'expression des deux protéines MDR. Cette faible pollution serait due à la dilution des eaux de la Couze Pavin qui reçoit à ce niveau, comme affluent, le ruisseau de Vaucoux de très bonne qualité. Par ailleurs, sur le site de Chidrac, une augmentation du degré de la pollution de l'eau est observée par une



augmentation significative de la P-gp. Des problèmes causés par les dysfonctionnements de stations d'épuration, situés en amont de ce site de prélèvement, peuvent être à l'origine de cette hausse de pollution. En effet, la Couze Pavin traverse différents villages, qui sont de l'amont vers l'aval : Saurier, Saint-Floret et Saint Vincent. Ces trois villages sont équipés de stations d'épuration dont deux d'entre elles rencontrent des problèmes de fonctionnement, notamment celle du village de Saint Vincent. Cette station fonctionne *via* une épuration de type « lit planté de roseaux ». Ce principe repose sur l'existence de deux étages de filtres en série, garnis de graviers et de sable, sur lesquels se fixent des bactéries épuratrices. La station de Saint Vincent montre un fonctionnement défaillant depuis de nombreuses années. En effet, la charge hydraulique gérée par la station est trois fois plus importante que ce qu'elle peut traiter, et le deuxième filtre est rarement utilisé.

#### **IV. Conclusion**

L'ensemble des tests réalisés sur les truites fario issues de cours d'eau naturels ont montré que le biomarqueur Sentinelle était capable de mettre en évidence les différents degrés de pollution d'un cours d'eau en relation directe avec son environnement. L'intérêt du biomarqueur Sentinelle réside dans sa sensibilité et sa capacité intégratrice. En effet, il est directement basé sur la réponse des protéines détoxificatrices des globules rouges de truites fario en réponse à un niveau de pollution global. De plus, la réponse de type « relais » des deux protéines détoxificatrices, (i) la protéine ABCG2-like et (ii) la P-gp, mises en évidence en condition *in vitro* et confirmée dans le milieu naturel, représente un atout majeur permettant de déterminer les différents degrés de pollution d'un cours d'eau. De ce fait, les informations apportées par le biomarqueur Sentinelle sont plus intégratives que celles fournies, par exemple, par le calcul des indices de truite et IPR. Ce biomarqueur doit permettre ainsi de compléter les outils disponibles pour la surveillance de l'état écologique des cours d'eau.



**Chapitre III : Variabilité  
interspécifique et saisonnière du  
biomarqueur Sentinelle et son  
efficience en pisciculture**



La première partie de nos travaux de recherche a concerné le développement d'un biomarqueur sentinelle basé sur deux protéines MDR, exprimées au niveau d'érythrocytes de truites fario en réponse à différents niveaux de pollution aquatique. Les résultats des différentes expériences réalisées ont permis la mise en évidence d'une modulation de l'expression de la protéine ABCG2-like et de la P-gp chez les érythrocytes de truites fario sauvages, en fonction du degré de contamination des cours d'eau étudiés.

En complément de ces résultats, nous avons cherché à savoir si, par rapport à l'expression de ces deux protéines, il existait, d'une part, des variations interspécifiques au sein de la famille des Salmonidés, et d'autre part, une variabilité saisonnière. Ces expérimentations étant conduites en piscicultures, c'est à dire dans un environnement semi-contrôlé, avec des conditions particulières (densité élevée de poissons, apport important de nourriture) nous avons également cherché à savoir si le biomarqueur sentinelle, dont on a pu juger de la pertinence en milieu naturel, était encore efficient dans ces conditions d'élevage.

Dans ce contexte, nous avons tout d'abord recherché le niveau d'expression de la protéine ABCG2-like et de la P-gp dans les érythrocytes de trois espèces de Salmonidés fréquemment élevées dans les piscicultures, *Salmo trutta fario*, *Oncorhynchus mykiss*, et *Salvelinus alpinus*, provenant d'un même élevage. La comparaison de la coexpression de la protéine ABCG2-like et de la P-gp dans les érythrocytes de ces trois espèces n'a pas montré de différence significative.

Afin de déterminer si la qualité de l'eau alimentant la pisciculture pouvait avoir un effet sur l'expression de deux protéines MDR, nous avons poursuivi nos recherches sur une seule espèce de la famille des Salmonidés, la truite fario. Cette espèce a été choisie en raison de sa présence dans la majorité des cours d'eau de France et de très nombreuses piscicultures. Les premières expériences ont consisté à étudier la variabilité saisonnière de l'expression des deux protéines MDR chez des globules rouges de truites fario provenant d'une même pisciculture. Pour cela, nous avons analysé l'expression des deux protéines dans les érythrocytes des truites fario sur une période de 10 mois. Aucune différence significative, à la fois pour l'expression de la protéine ABCG2-like et pour la protéine P-gp, n'a été détectée. Ces études, réalisées sur des poissons provenant de la même pisciculture, révèlent l'absence d'un effet saisonnier, renforçant ainsi la pertinence de l'utilisation de ce biomarqueur sentinelle.



Nous avons, enfin, analysé l'expression des deux protéines MDR dans des érythrocytes de truites fario provenant de deux piscicultures alimentées par des eaux de qualité différente. Le taux d'expression de la protéine ABCG2-like et la P-gp est significativement augmenté dans les érythrocytes de truites fario exposées à une eau de rivière plus contaminée. Ces résultats suggèrent que le niveau de coexpression de la protéine P-gp et de la protéine ABCG2-like des érythrocytes de Salmonidés peut refléter la qualité de l'eau des piscicultures dans laquelle se développent les poissons élevés.

Les différents résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication intitulé « **ABCG2-like-protein and P-gp coexpression levels in erythrocytes from farmed fish: a potential sentinel water pollution biomarker** » (soumise).



# ABCG2-like-protein and P-gp coexpression levels in erythrocytes from farmed fish: a potential sentinel water pollution biomarker

Emeline VALTON<sup>1,2,3</sup>, Christian AMBLARD<sup>3,4</sup>, Ivan WAWRZYNIAK<sup>3,4</sup>, François DESMOLLES<sup>5</sup>, Fabrice KWIATKOWSKI<sup>1,2</sup>, Frédéric DELBAC<sup>3,4</sup>, Frédérique PENAULT-LLORCA<sup>1,2★</sup> & Mahchid BAMDAD<sup>1,2★#</sup>

1 – Clermont Université - Université d’Auvergne - ERTICa– EA 4677 - Institut Universitaire de Technologie, département génie biologique, Ensemble universitaire des Cézeaux, B.P. 86 - 63172 AUBIERE CEDEX France.

2 - Clermont Université - Université d’Auvergne - ERTICa – EA 4677- Centre Jean Perrin, 58 Rue Montalembert, BP 392 - 63011 CLERMONT-FERRAND CEDEX France.

3 – Clermont Université – Université Blaise Pascal - LMGE – UMR CNRS 6023 - U.F.R. Sciences et Technologies- 24, avenue des Landais, BP 80026- 63171 AUBIERE CEDEX France.

4 – CNRS, UMR 6023, LMGE, F-63177 Aubière, France

5 - Fédération pour la Pêche et la Protection du Milieu Aquatique du Puy de Dôme (F.P.P.M.A. 63), 14 Allée des Eaux et Forêts, Site de Marmilhat Sud, 63370 LEMPDES CEDEX France.

\*Contributed equally to the work

#Corresponding author

**Key words:** Fish farming, Erythrocytes, MDR proteins, Biomarker.

## Abstract

Physiological molecules and xenobiotics are transported in the bloodstream. Multidrug Resistance (MDR) proteins are detoxification membrane pumps, responsible for the efflux of xenobiotics from cells. To describe the effect of water pollution on aquatic organisms, we focused our study on the coexpression of two major MDR proteins, P-gp and ABCG2-like protein in the erythrocytes of *Salmonidae* fish. Firstly, the comparison of coexpression of MDR proteins in the erythrocytes of three species of the *Salmonidae* family from the same fish farm showed no interspecies variations between *Salmo trutta fario*, *Oncorhynchus mykiss* and *Salvelinus alpinus*. Therefore, *Salmo trutta fario* was selected as a study model because it is a common river fish. Secondly, a stable level of both MDR proteins, tested all year around in the erythrocytes of this species, revealed the absence of any seasonal effect. However, a comparison of the erythrocytes of fish from two different fish farms revealed a striking difference in P-gp and ABCG2-like protein levels, suggesting a direct causative effect of their natural environment, *i.e.* the degree of water pollution in the river running through the fish farm.



These data suggest that the level of coexpression of P-gp and ABCG2-like protein in the erythrocytes of *Salmonidae* may reflect the degree of pollution of rivers and fish farms. The MDR of fish erythrocytes may be used as a sentinel biomarker of water contamination providing a rapid overview of the health of an aquatic ecosystem.

## I. Introduction

Aquatic pollution is defined as "deterioration" causing a disturbance of the aquatic ecosystem and/or making it injurious to health. It is particularly due to industrial-type (chemical, food, oil, etc.), domestic (sewage) and agricultural (fertilizers, pesticides, etc.) activities. Many pollutants with various structures and properties are found in aquatic environments such as rivers, lakes, oceans, aquifers and groundwater. Aquatic contamination also affects all the organisms living in these ecosystems. Indeed, a high concentration of toxic pollutants in an aquatic system can either eliminate the most sensitive species and/or cause a chronic contamination of the more resistant organisms inducing metabolism alterations (Relyea and Hoverman, 2006).

Bioaccumulation refers to the absorption and storage of various xenobiotics in living organisms, after long-term exposure to a contaminated environment. Like many other aquatic species, fish are bioaccumulation organisms which can store xenobiotics in their tissues and organs (Mortensen et al., 2011). The bloodstream circulating throughout the body is the site of transport of physiological molecules and various pollutants. Thus, fish blood cells and specifically nucleated erythrocytes (Soldatov, 2005), are an excellent model for studying aquatic pollution.

Multidrug Resistance (MDR) proteins were discovered to be membrane transporters well-known for their direct implication in chemotherapy resistance in cancer (Raaijmakers, 2007; Sarkadi et al., 2006). These proteins, belonging to the superfamily of ATP-Binding-Cassette (ABC) transporters, are well-conserved through evolution and naturally expressed in practically all living organisms. Indeed, the so-called ABCB1/MDR1/P-glycoprotein, a member of ABCB subfamilies, was the first MDR protein identified in various organisms such as bacteria (Gerlach et al., 1986), parasites (Krogstad et al., 1992), protozoa (Bamdad et al., 1999; Bamdad et al., 1997; Camarès O, 2004), aquatic invertebrates (Kurelec, 1992), fish (Loncar et al., 2010; Sturm et al., 2001; Zaja et al., 2007), *Drosophila* (Vache et al., 2007; Vache et al., 2006), plants (Dudler and Sidler, 1998; Geisler et al., 2005) and mammals (Raaijmakers, 2007; Sarkadi et al., 2006). ABCG2 protein or Breast Cancer Resistance



Protein (BCRP), a member of ABCG subfamilies, is another major MDR protein that has been identified more recently. Its expression has been described more in human tissue, such as gut, bile canaliculi, placenta, blood stem cells, blood-testis and blood-brain barriers (Raaijmakers, 2007). ABCG2 gene expression was also recently described in rainbow trout (Loncar et al., 2010). Functionally, MDR proteins are membrane detoxification pumps causing the efflux of xenobiotics and/or metabolites from normal cells. Thus, in cancer cells, their overexpression leads to the rapid efflux of chemotherapeutic agents from cells, resulting in chemoresistance. MDR target molecules are structurally diverse including drugs, pollutants, toxins, etc. P-gp recognizes preferentially hydrophobic compounds, whereas the ABCG2 protein can transport hydrophobic drugs and/or large-type anionic drug conjugates (Natarajan et al., 2012; Raaijmakers, 2007; Sarkadi et al., 2006). Due to this property, MDR proteins are involved in natural defense mechanisms in cells, tissues and organs and are essential parts of an innate defense system known as “chemoimmunity” (Sarkadi et al., 2006). Our previous works focused on ABCB1/P-gp expression in freshwater ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis* and in *Drosophila melanogaster*. In these two models, we demonstrated basal expression of ABCB1/P-gp which increases after the exposure of organisms to increasing concentrations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) pollutants. In both cases, P-gp response was dose-dependent and reacted to contamination of air and/or water pollution by various classes of PAHs (Bamdad et al., 1999; Bamdad et al., 1997; Camarès O, 2004; Vache et al., 2007; Vache et al., 2006). Assuming that the expression level of MDR proteins can be used as a predictive biomarker to environmental contamination detection, we focused our work on P-gp and ABCG2-like protein coexpression in the erythrocytes of *Salmonidae* fish raised in two fish farms exposed to different river water quality.

The purpose of this study was to provide evidence of the existence of two major MDR proteins *i.e.*, ABCG2-like protein and P-gp in the erythrocytes of *Salmonidae* fish which can be used as sentinel biomarkers for detecting aquatic pollution. Western blot analysis demonstrated a similar level of coexpression of ABCG2-like protein and P-gp in the erythrocytes of *Salmo trutta fario*, *Oncorhynchus mykiss* and *Salvelinus alpinus* from the same fish farm, revealing no interspecies variations between the three fish species from the *Salmonidae* family. Thus, *Salmo trutta fario* (brown trout), a common river fish, was used as the study model for the following experiments. We then demonstrated that the level of expression of both MDR proteins remained stable in the erythrocytes of brown trout from the same fish farm during different seasons. Interestingly, the coexpression level of P-gp and



ABG2-like protein differed significantly in the erythrocytes of brown trout raised in two different fish farms that were geographically distant and irrigated by different rivers and thus exposed to different water qualities. These results highlight the existence of a real detoxification system membrane in the erythrocytes of *Salmonidae* fish, which directly respond to aquatic contamination.

## **II. Materials and methods**

### **II.1. Fish model**

Brown trout (*Salmo trutta fario*) were obtained from “Le Moulin de Pagnat” fish farm, Saint Saturnin, France, irrigated by the river Veyre (Fig. 4A). Brown trout (*Salmo trutta fario*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and arctic char (*Salvelinus alpinus*) were obtained from “La Villetour” fish farm, Besse-et-Saint-Anastaise, France, irrigated by the “Couze Pavin” river (Fig. 4B). The size of all fish collected for these experiments was always between 16 and 20 cm.

### **II.2. Ethics**

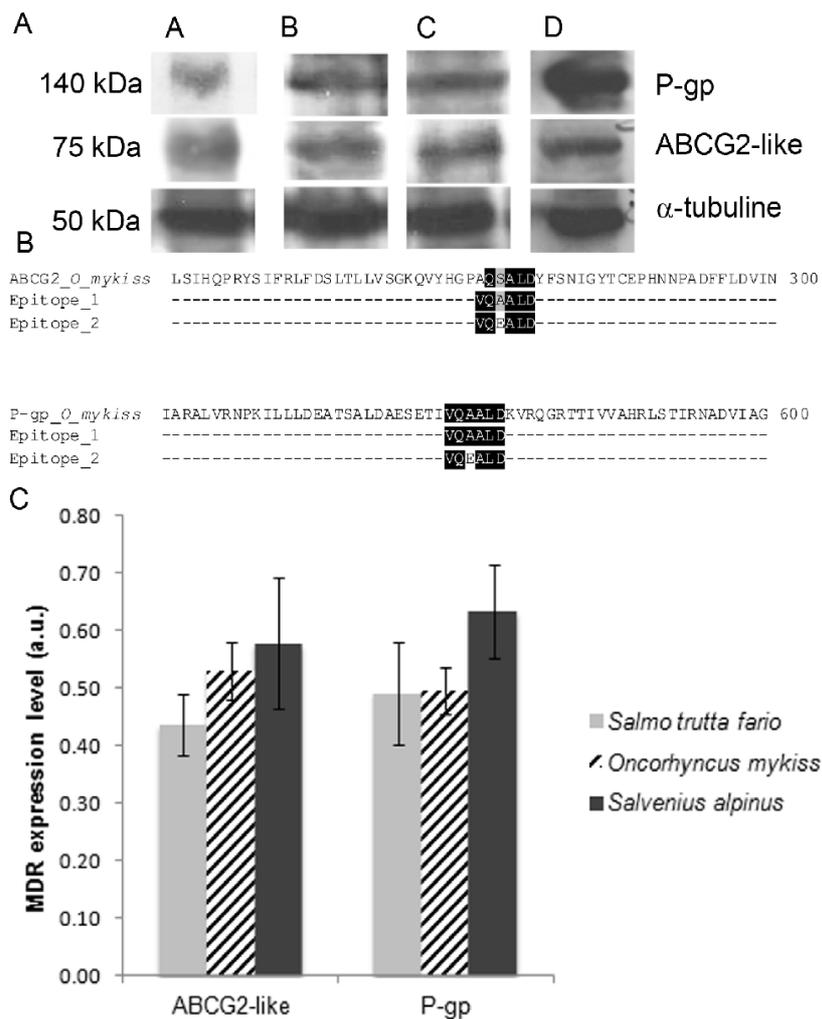
According to the European Directive 2010/63/UE, ethical approval was not required for this study. These works were performed in close cooperation with the Federation of Fishing and Protection of the Aquatic Environment of Puy-de-Dôme, Auvergne, France. Fish were anesthetized with an overdose of a natural anesthetic in accordance with EU Directive 2010/63/UE.

### **II.3. Anesthesia and blood samples**

Fish were anesthetized using a mix of clove oil in alcohol at 70%. Blood samples were taken by intracardiac draining on lithium heparinate. 100  $\mu$ L of blood were taken and stored at -20°C.

### **II.4. MDR expression studies by Western Blot Analysis**

For protein extraction, 1 ml of lysis buffer (20 mM tris HCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 6  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol, and 0.1% protease inhibitors cocktail, pH 7.5) was added to the sample. The sample was sonicated (5 x 5 s at 4°C) and the supernatant was conserved at -20°C. Protein concentrations of samples were determined using the Bradford assay with bovine serum albumin (BSA) as a standard. Extracts were diluted to 100  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> protein with



**Figure 1. Basal coexpression of ABCG2-like protein and P-gp in three species of *Salmonidae***

Erythrocytes were taken from different species of *Salmonidae*: *Salmo trutta fario*, *Oncorhynchus mykiss* and *Salvelinus alpinus*. Fish were collected in “La Villetour” fish farming irrigated by the “Couze Pavin” river.

**A. ABCG2-like-protein and P-gp coexpression by Western Blot analysis**

Two Multidrug Resistance proteins (MDR) were analyzed in total protein extract from erythrocyte pellets of *Salmo trutta fario* (A), *Oncorhynchus mykiss* (B), *Salvelinus alpinus* (C) and *Salmo trutta fario* liver (D) (used as positive control). P-gp weighed 140 kDa and ABCG2-like protein weighed 75 kDa.  $\alpha$ -tubulin (50 kDa) was used as an internal control on protein cells.

**B. Multiple sequence alignment of *Oncorhynchus mykiss* ABCG2 and P-gp with the two different epitopes (VQAALD and VQEALD) recognized by C219 antibody**

The alignment was performed using ClustalW. Conserved residues and similar residues are shaded in black and grey, respectively.

**C. Coexpression levels of ABCG2-like and P-gp in the erythrocytes of different species of *Salmonidae***

Proteins were analyzed in total protein extract from erythrocyte pellets by Western Blot analysis. Protein expression was quantified using QuantityOne software (Biorad®). a.u.: Arbitrary Units. Error bars are 1 SD about the mean of technical triplicate measurements. No significant difference was observed between the different species of *Salmonidae*.

sample buffer (1.25 M Tris HCl, 20% Sodium Dodecyl Sulfate, 20% Glycerol, 2 M Dithiothreitol, 0.5% Bromophenol Blue, pH 6.8) and loaded onto a 7.5% polyacrylamide gel. Electrophoresis was carried out at a constant voltage of 120 V. Proteins were then transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane using a Hoeffer® semi-dry system. Membranes were blocked in PBS 0.1% triton X100 containing 5% (w/v) non-fat dry milk, and then incubated with primary monoclonal antibodies anti-P-gp C219 (1:500, Calbiochem) and mouse monoclonal antitubulin antibody DM1A (1:10000, Sigma) in PBS 0.1% triton X100 (PBS-T) for one night at 4°C. After three 10-min. washes with PBS-T, the membranes were incubated in the presence of the second antibody, a horseradish-peroxidase (HRP)-coupled goat anti-mouse (1:4000, Promega), for 1 hour at room temperature in TBS-T. After three 10-min. washes with PBS-T, immune complexes were visualized by chemiluminescence (ECL+ Western Blotting detection reagent, Amersham) according to the manufacturer's specifications. The intensities of P-gp, ABCG2-like and control tubulin bands were analyzed by densitometry using Quantity-One software (Bio Rad), and P-gp and ABCG2-like expression levels were determined in relation to the tubulin controls.

## **II.5. Statistical analysis**

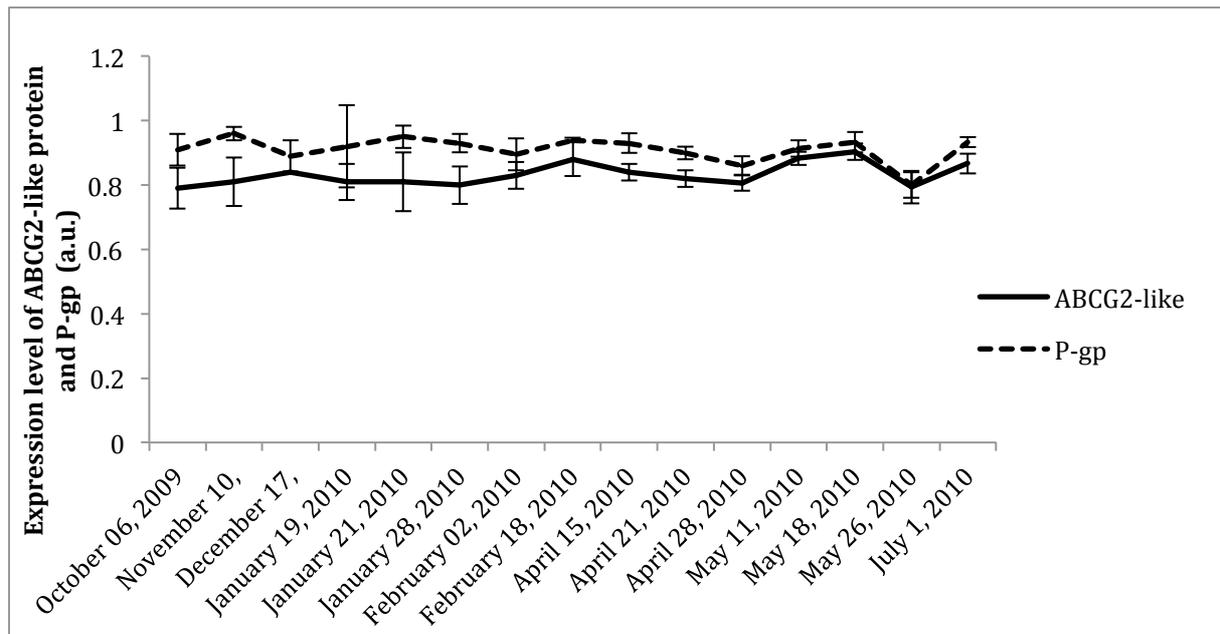
Data were expressed as the means  $\pm$  standard error (SD). Each experiment was performed at least in triplicate. Comparisons of expressions between fish species were done using Student's t-test or ANOVA. Pearson correlation and ANOVA were used to check if any difference or trend was noted throughout seasons. The nominal level of significance was 5% in all tests unless otherwise specified.

## **III. Results**

### **III.1. ABCG2-like protein and P-gp coexpression level in the erythrocytes of brown trout, rainbow trout and Arctic char from "La Villetour" fish farm**

The expression of ABCG2-like protein and P-gp was analyzed in the erythrocytes of *Salmo trutta fario* (brown trout), *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout) and *Salvelinus alpinus* (arctic char), belonging to the *Salmonidae* family. The fish were collected from "La Villetour" fish farm irrigated by the "Couze Pavin" river.

After collecting blood samples from each *Salmonidae* species, MDR protein expression was analyzed on erythrocyte pellets, by Western blotting, using the monoclonal anti-P-gp antibody C219 (Figure 1A). A trout liver extract was used as a positive MDR control (Sturm et al.,



**Figure 2. Coexpression of ABCG2-like protein and P-gp in erythrocytes of brown trout during different months**

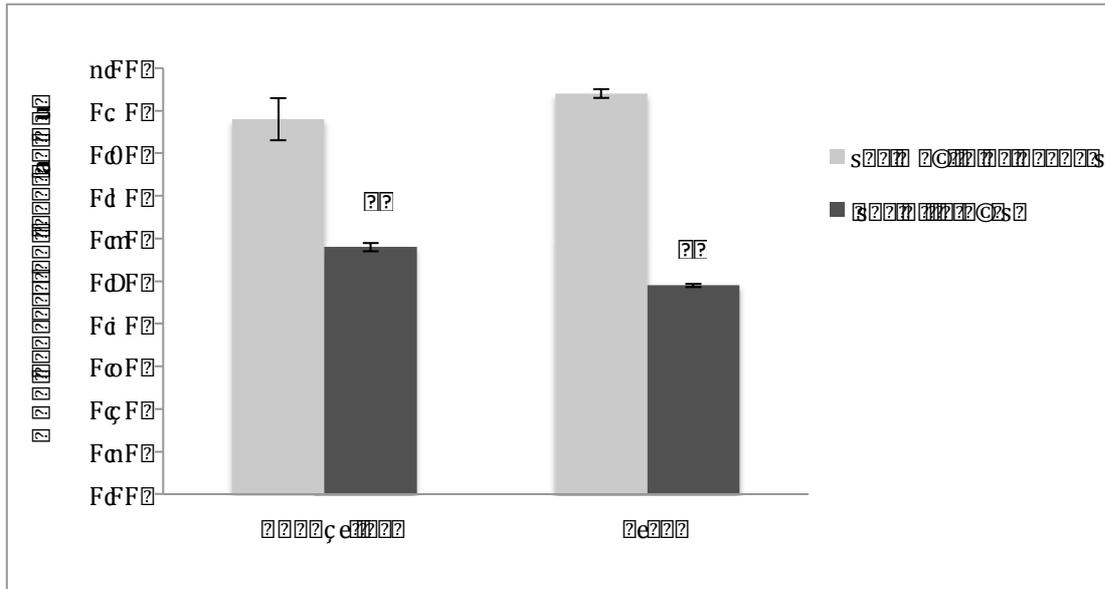
The erythrocytes of brown trout from the “Le Moulin de Pagnat” fish farm irrigated by the “Veyre” river were collected from October 2009 to July 2010. Proteins were analyzed in total protein extract from erythrocyte pellets by Western Blot analysis. Protein expression was quantified using QuantityOne software (Biorad®). a.u.: Arbitrary Units. Error bars are 1 SD about the mean of technical triplicate measurements. No significant difference was observed between the expression of levels of P-gp and ABCG2-like-protein in brown trout erythrocytes during different seasons.

2001; Zaja et al., 2007). The internal control was a 50 kDa tubulin labeled by the monoclonal anti-tubulin antibody DM1A (Fig. 1A). The C219 antibody labeled two proteins with molecular weights (MW) of 140 and 75 kDa in the erythrocytes of the three species. The band of 140 kDa corresponded to the MW of P-gp in most organisms (Fig. 1A) (Sturm et al., 2001; Vache et al., 2006). The 75 kDa band corresponded to the MW of ABCG2 protein identified recently in mammal cells (Natarajan et al., 2012; Raaijmakers, 2007). Therefore, the 75 kDa protein highlighted in the erythrocytes of the three *Salmonidae* species was called “ABCG2-like protein”. The recognition of both P-gp and ABCG2 protein sequences by the C219 antibody was checked by sequence alignment of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) P-gp and ABCG2 protein, available in Genbank, with the epitopes “VQEALD” and “VQAALD” recognized by C219 antibody (Van Den Elsen et al., 1999) via CLUSTALW. The results (Fig. 1B) confirmed that C219 antibody recognized both epitopes in P-gp and ABCG2 protein in *Oncorhynchus mykiss*.

The coexpression level of these two MDR proteins in the erythrocytes of each species of the *Salmonidae* family was then quantified by Quantity-One software (Fig. 1C). The level of ABCG2-like protein expression in erythrocytes was  $0.44 \pm 0.05$  a.u. for brown trout,  $0.53 \pm 0.05$  a.u. for rainbow trout and  $0.58 \pm 0.11$  a.u. for arctic char. In these freshwater fish, P-gp expression rates were  $0.49 \pm 0.009$  a.u.,  $0.5 \pm 0.04$  a.u. and  $0.63 \pm 0.08$  a.u., respectively (Fig. 1C). To determine whether interspecies variability influenced the expression level of both MDR proteins in erythrocytes, a Student's t-test was performed with a risk of 0.05. No significant difference was noted in the expression of the two MDR proteins in the erythrocytes of the three species analyzed.

### **III.2. ABCG2-like and P-gp coexpression levels in erythrocytes from brown trout raised in the fish farm “Le Moulin de Pagnat” during different seasons**

For these experiments, brown trout from “Le Moulin de Pagnat” fish farm irrigated by the Veyre river was used as the experimental *Salmonidae* model. The expression rate of ABCG2-like and P-gp in erythrocytes was monitored over a period of ten months, from October 2009 to July 2010, using western blot analysis. The results (Fig. 2) showed that the expression level of ABCG2-like and P-gp remained relatively stable throughout the seasons with a mean value of  $0.83 \pm 0.02$  a.u. for ABCG2-like protein and of  $0.91 \pm 0.03$  a.u. for P-gp. To determine whether the change of season influenced the level of MDR protein expression, in line with



Résultat: s'addresse à l'élève et se réfère à la scolarité de l'élève et à son développement personnel et social.

Le programme de l'école maternelle est basé sur les apprentissages fondamentaux et les compétences transversales.

Les apprentissages fondamentaux sont : le langage oral, le langage écrit, les mathématiques, les sciences et la culture.

Les compétences transversales sont : la communication, le raisonnement, la résolution de problèmes, la coopération et la citoyenneté.

Le programme de l'école maternelle est basé sur les apprentissages fondamentaux et les compétences transversales.

Les apprentissages fondamentaux sont : le langage oral, le langage écrit, les mathématiques, les sciences et la culture.

Les compétences transversales sont : la communication, le raisonnement, la résolution de problèmes, la coopération et la citoyenneté.

putative seasonal xenobiotic accumulation, a correlation analysis between time and expression was performed. No significant trend was observed ( $r = 0.39$  for P-gp and  $0.42$  for ABCG2-like protein). These results confirmed that the expression levels of P-gp and ABCG2-like protein in the erythrocytes of brown trout are not affected by seasons.

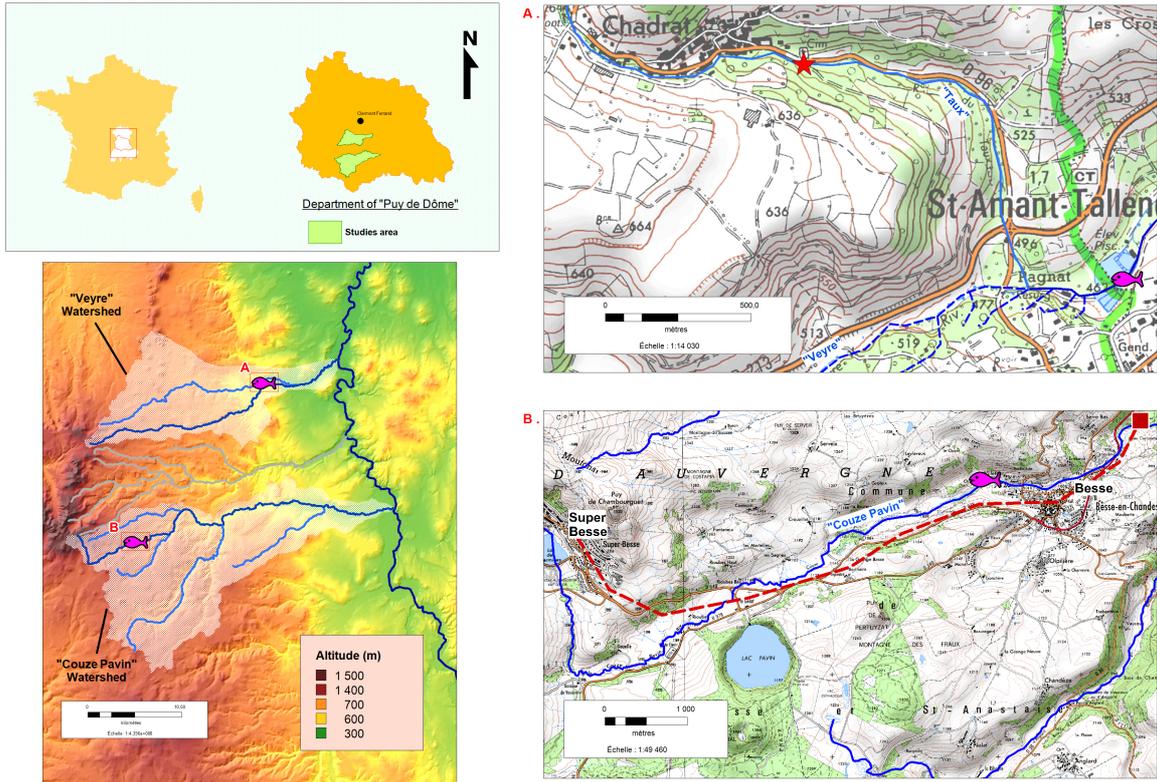
### **III.3. Comparison of ABCG2-like and P-gp erythrocytes coexpression level in brown trout from “Le Moulin de Pagnat” and “La Villetour” fish farms**

For these experiments, blood samples of brown trout from “Le Moulin de Pagnat” and from “La Villetour” fish farm were used. The coexpression level of both MDR proteins in trout erythrocytes was studied by western blot analysis under the same conditions, as cited above (Fig. 3). In the erythrocytes of brown trout from “Le Moulin de Pagnat”, the expression level of ABCG2-like protein was  $0.88 \pm 0.05$  a.u. and that of P-gp was  $0.94 \pm 0.01$  a.u. In contrast, MDR protein expression levels in the erythrocytes of brown trout from “La Villetour” were lower, *i.e.*:  $0.58 \pm 0.1$  a.u. for the ABCG2-like protein and  $0.49 \pm 0.004$  a.u. for P-gp. Fish from the two farms harboured significantly different erythrocyte levels of P-gp and ABCG2-like protein ( $p < 0.01$ ).

## **IV. Discussion**

Environmental pollution, through its impact on living organisms, is a major public health problem. Indeed, many pollutants with varied properties and structures circulate in air, soil and water and contaminate our environment. The majority of these pollutants reaches aquatic ecosystems particularly *via* rain and streaming water and thus contaminate rivers, lakes and sea. Water pollution affects all organisms living in aquatic ecosystems. At present, aquatic contamination is controlled mainly by physicochemical methods, but these methods do not provide information on the degree of contamination of organisms living in these polluted environments (Relyea and Hoverman, 2006). Therefore, the use of a biological tool as a surrogate biomarker of pollution, providing informations on (i) the degree of environmental contamination and (ii) the health of *in situ* living organisms, would represent a major step in evaluating damage caused by pollution before implementing the necessary preventive measures.

Ubiquitous Multidrug Resistance (MDR) proteins constitute a natural mechanism of defence at the cellular level, expressed in a wide range of organisms from prokaryote to eukaryote (Bamdad et al., 1999; Bamdad et al., 1997; Camarès O, 2004; Dudler and Sidler, 1998;



**Figure 4. Maps showing the location of the two fish farms “Le Moulin de Pagnat” and “La Villetour” in Auvergne -FRANCE**

Pink fish represent the fish farms. A: Location of “Le Moulin de Pagnat” fish farm in the village of “Saint Saturnin”. The red star indicates the place where domestic waste from the village of “Chadrat” drains into the river. Chadrat, located upstream to the fish farm, does not have a sewage processing plant. This waste goes directly into the stream called “Tau” which then flows into the Veyre river upstream of the fish farm.

B: Location of "La Villetour" fish farm, situated in “Besse et Saint Anastaise”. The red line represents the network of domestic waste collection at the Superbesse ski resort. This network reaches the sewage processing plant located 2 km downstream of the fish farm. There is no point of discharge into the “Couze Pavin” river.

Geisler et al., 2005; Gerlach et al., 1986; Krogstad et al., 1992; Kurelec, 1992; Loncar et al., 2010; Natarajan et al., 2012; Raaijmakers, 2007; Sarkadi et al., 2006; Sturm et al., 2001; Vache et al., 2007; Vache et al., 2006; Zaja et al., 2007). They are the membrane detoxification pumps responsible for the efflux of xenobiotics from cells (Sarkadi et al., 2006). MDR proteins recognize various compounds such as (i) many pollutants, from heavy metals to PAHs (Bamdad et al., 1999; Bamdad et al., 1997; Einicker-Lamas et al., 2003; Kurelec, 1992; Marquez B, 2011; Vache et al., 2007; Vache et al., 2006), and (ii) almost the majority of pharmaceutical drugs (Natarajan et al., 2012; Sarkadi et al., 2006). Moreover, the response of MDR proteins to xenobiotic cell aggression is dose-dependent (Bamdad et al., 1999; Bamdad et al., 1997; Camarès O, 2004; Vache et al., 2007; Vache et al., 2006). All these properties suggested that MDR proteins can be used as a surrogate marker of environmental pollution and of the degree of contamination of living organisms.

In order to develop a sentinel biomarker of aquatic pollution, we focused our work on the coexpression level of two MDR proteins, P-gp and ABCG2-like proteins, in the erythrocytes of a fish species. *Salmonidae* being predators situated at the top of the food chain, they constitute a choice model for studying aquatic pollution. For biomarker development, we selected *Salmonidae* species from fish farms. They are a suitable model for analyzing the aquatic ecosystem (Celandier, 2011) and are a highly sensitive model for water quality studies. For these experiments, two fish farms were selected in the central part of France. “La Villetour” situated in “Besse-et-Saint-Anastaise” and irrigated by the “Couze Pavin” river offers an halieutic-driven activity focusing on fish production for restocking rivers (Fig. 4A). “Le Moulin de Pagnat”, located in the village of “Saint Saturnin” and irrigated by the river “Veyre” focuses on fish production for consumption (Fig. 4B).

Firstly, basal ABCG2-like protein and P-gp coexpression was analyzed by western blotting in the erythrocytes of three fish species of the *Salmonidae* family, *i.e.* brown trout, rainbow trout and arctic char, collected from the “La Villetour” fish farm. The monoclonal antibody C219 labeled two MDR proteins with MW 75 and 140 kDa. The 75 kDa protein highlighted in the erythrocytes of the three *Salmonidae* species was called “ABCG2-like protein”. This MDR protein has been identified mainly in human tissue and hematopoietic stem cells (Natarajan et al., 2012; Raaijmakers, 2007). Moreover, ABCG2 transcript gene expression has already been identified in seven tissues of rainbow trout (liver, kidney, proximal intestine, distal intestine, gonads, gills and brain) (Sturm et al., 2001). Furthermore, sequence alignment of rainbow trout P-gp and ABCG2 proteins, available in Genbank, with both epitopes recognized by



C219 antibody (Van Den Elsen et al., 1999) confirmed our results. Similarly, the MDR protein of 140 kDa highlighted in the erythrocytes of three *Salmonidae* species corresponded to the MW of P-gp in various organisms, *i.e.* a P-gp of 170 kDa in man (Zaja et al., 2007), a P-gp of 140 kDa in *Drosophila melanogaster* (Vache et al., 2006), in hepatocyte cell culture and fish cell line (Loncar et al., 2010; Zaja et al., 2007). The quantification of the expression level of ABCG2-like protein (mean:  $0.52 \pm 0.07$  a.u.) and P-gp (mean:  $0.54 \pm 0.07$  a.u.) by Quantity-One software revealed no interspecies variation. These results suggest firstly the existence of a real defence barrier in the membranes of erythrocytes of the *Salmonidae* family. Secondly, the status of MDR coexpression appears to be independent of the species. The coexpression level of both MDR proteins in *Salmonidae* erythrocytes may be a direct causative effect of the natural environment, *i.e.* the quality of the river running through the fish farm. To check this hypothesis, we selected the brown trout species for the following experiments. This choice was targeted by the fact that the brown trout is one of the most common species found in rivers in Auvergne and throughout France. Moreover, they can grow in captivity, on fish farms as well as in rivers; this is essential for future biomarker validation in the field (*i.e.* in rivers).

Thereafter, the effect of season variability on MDR coexpression levels on brown trout erythrocytes from the “Le Moulin de Pagnat” fish farm was analyzed for about one year. The expression level of ABCG2-like protein ( $0.83 \pm 0.02$  a.u.) and P-gp ( $0.91 \pm 0.03$  a.u.) in brown trout erythrocytes seemed to remain stable over the seasons, revealing a stability of MDR protein expression over time. The absence of a seasonal effect on MDR protein expression reinforces their future use as an aquatic biomarker. However, the coexpression level of ABCG2-like protein and P-gp in brown trout erythrocytes from the “Le Moulin de Pagnat” fish farm was 1.9 fold higher than those from “La Villetour” fish farm. The difference between these two fish farms lies in the fact that “Le Moulin de Pagnat” is irrigated by the river “Veyre” and “La Villetour” by the river “Couze Pavin”. These results suggest a direct relationship between the expression levels of MDR proteins in fish erythrocytes and the degree of contamination of river. To check this hypothesis, we extended these experiments to brown trout collected at the same time in each fish farm. As in our previous results, the expression level of ABCG2-like protein and P-gp in the erythrocytes of brown trout from the “Le Moulin de Pagnat” fish farm remained higher ( $0.88 \pm 0.05$  a.u. for ABCG2-like and  $0.94 \pm 0.01$  a.u. for P-gp) than those from “La Villetour” fish farm ( $0.58 \pm 0.1$  a.u. for ABCG2-like protein and  $0.49 \pm 0.004$  a.u. for P-gp). A Student’s t-test performed with a risk of 0.01



showed that the expression level of both MDR proteins was significantly different in these two fish farms suggesting more contamination in the “Veyre” river than in the “Couze Pavin” river. These observations are supported by the fact that these two fish farms differ with regard to the watersheds where they are located, especially in their mode of water supply (Fig. 4). “Le Moulin de Pagnat” fish farm is located on the river “Veyre” (Puy-de-Dôme, France). Upstream to this fish farm, the water quality is degraded by the poor quality of two tributaries (Martin, 2005). The small “Chadrat” village has no sewage system and all its wastewater drains into the small stream just upstream to the fish farm (Fig. 4A). Consequently, the fish farm receives polluted water. Moreover, this fish farm produces fish for human consumption which involves intense feeding to increase weight gain. In contrast, the “La Villetour” fish farm of Besse-et-St Anastaise is located at the top of the “Couze Pavin” watershed (Puy-de-Dôme, France) where the only pollution is related to agricultural spraying rich in organic matter. All domestic wastewaters are collected and processed in the sewage plant located 2 km downstream of the fish farm. The water supply for this fish farm is provided by the river “Couze Pavin” but also, and for a significant portion, by spring water protected from any pollutant (Fig. 4B). Consequently, the quality of the water on this fish farm can be described as good to very good for most parameters usually analyzed. In addition, this fish farm does not produce fish for human consumption, but for restocking whatever the species, and feeding is reduced. Moreover the Fish Based Index (FBI) (Oberdorff et al., 2001; Oberdorff et al., 2002) published by the Federation of Fishing and Protection of the Aquatic Environment of “Puy de Dome” confirms our results. The FBI is an index to assess the quality of rivers in France based on the study of the fish population. According to standard No NFT90-344, the higher the FBI score, the more the river is polluted. The FBI of the Veyre river scored 18, indicating a poor water quality of river water. In contrast, the FBI of the “Couze Pavin” river scored 8, indicating the good quality of river water.

These results suggest that the coexpression level of two major MDR proteins, ABCG2-like protein and P-gp in *Salmonidae* erythrocytes can be used as sentinel biomarkers to evaluate the degree of river contamination and also the health status of fish in fish farms. At present, no direct method or standard exists to determine the degree of contamination of fish farms in relation to the quality of their aquatic environment. The “sentinel biomarker” could serve as a tool for detecting this type of contamination. Validation of sentinel aquatic biomarker from wild fish living in different rivers is currently underway.



## Acknowledgments

E. Valton is recipient of the “Innovation” fellowship from the Regional Council of Auvergne and the European Regional Development Fund. The authors wish to express their gratitude to Dr. Anne Cayre for the helpful discussion, Marc Cladière for the production of maps, the European Regional Development Fund and the Regional Council of Auvergne, and to Auvergne Valuation for their support of this project.

## References

- Bamdad, M., Brousseau, P., Denizeau, F., 1999. Identification of a multidrug resistance-like system in *Tetrahymena pyriformis*: evidence for a new detoxication mechanism in freshwater ciliates. *FEBS Lett* 456, 389-393.
- Bamdad, M., Reader, S., Grolière, C.A., Bohatier, J., Denizeau, F., 1997. Uptake and efflux of polycyclic aromatic hydrocarbons by "*Tetrahymena pyriformis*" : Evidence for a resistance mechanism. *Cytometry* 28, 170-175.
- Camarès O, D.F., Bamdad M, 2004. *Tetrahymena pyriformis* partial *mdr1* gene for putative P-glycoprotein. EMBL Nucleotide sequence Database.
- Celander, M.C., 2011. Cocktail effects on biomarker responses in fish. *Aquatic Toxicology* 105, 72-77.
- Dudler, R., Sidler, M., 1998. Arabidopsis MDR genes: molecular cloning and protein chemical aspects. *Methods Enzymol* 292, 162-173.
- Einicker-Lamas, M., Morales, M.M., Miranda, K., Garcia-Abreu, J., Oliveira, A.J.F., Silva, F.L.S., Oliveira, M.M., 2003. P-glycoprotein-like protein contributes to cadmium resistance in *Euglena gracilis*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 173, 559-564.
- Geisler, M., Blakeslee, J.J., Bouchard, R., Lee, O.R., Vincenzetti, V., Bandyopadhyay, A., Titapiwatanakun, B., Peer, W.A., Bailly, A., Richards, E.L., Ejendal, K.F., Smith, A.P., Baroux, C., Grossniklaus, U., Muller, A., Hrycyna, C.A., Dudler, R., Murphy, A.S., Martinoia, E., 2005. Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J* 44, 179-194.
- Gerlach, J.H., Endicott, J.A., Juranka, P.F., Henderson, G., Sarangi, F., Deuchars, K.L., Ling, V., 1986. Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature* 324, 485-489.
- Krogstad, D.J., Gluzman, I.Y., Herwaldt, B.L., Schlesinger, P.H., Wellems, T.E., 1992. Energy dependence of chloroquine accumulation and chloroquine efflux in *Plasmodium falciparum*. *Biochem Pharmacol* 43, 57-62.
- Kurelec, B., 1992. The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Crit Rev Toxicol* 22, 23-43.
- Loncar, J., Popovic, M., Zaja, R., Smital, T., 2010. Gene expression analysis of the ABC efflux transporters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 151, 209-215.
- Marquez B, V.B.F., 2011. ABC multidrug transporters: target for modulation of drug pharmacokinetics and drug-drug interactions. *Current Drug Targets* 12, 600-620.
- Martin, J., 2005. Etude hydrobiologique et piscicole du bassin versant de la Veyre aval. Fédération de Pêche du Puy de Dôme, p. 32.
- Mortensen, A.S., Letcher, R.J., Cangialosi, M.V., Chu, S., Arukwe, A., 2011. Tissue bioaccumulation patterns, xenobiotic biotransformation and steroid hormone levels in Atlantic



salmon (*Salmo salar*) fed a diet containing perfluoroactane sulfonic or perfluorooctane carboxylic acids. *Chemosphere* 83, 1035-1044.

Natarajan, K., Xie, Y., Baer, M.R., Ross, D.D., 2012. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochemical Pharmacology* 83, 1084-1103.

Oberdorff, T., Pont, D., Hugueny, B., Chessel, D., 2001. A probabilistic model characterizing fish assemblages of French rivers: a framework for environmental assessment. *Freshwater Biology* 46, 399-415.

Oberdorff, T., Pont, D., Hugueny, B., Porcher, J.-P., 2002. Development and validation of a fish-based index for the assessment of 'river health' in France. *Freshwater Biology* 47, 1720-1734.

Raaijmakers, M.H., 2007. ATP-binding-cassette transporters in hematopoietic stem cells and their utility as therapeutical targets in acute and chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 21, 2094-2102.

Relyea, R., Hoverman, J., 2006. Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. *Ecology Letters* 9, 1157-1171.

Sarkadi, B., Homolya, L., Szakacs, G., Varadi, A., 2006. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol Rev* 86, 1179-1236.

Soldatov, A.A., 2005. [Red blood system in fish: peculiarities of its organisation and function]. *Zh Evol Biokhim Fiziol* 41, 217-223.

Sturm, A., Ziemann, C., Hirsch-Ernst, K.I., Segner, H., 2001. Expression and functional activity of P-glycoprotein in cultured hepatocytes from *Oncorhynchus mykiss*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281, R1119-1126.

Vache, C., Camares, O., Cardoso-Ferreira, M.C., Dastugue, B., Creveaux, I., Vaury, C., Bamdad, M., 2007. A potential genomic biomarker for the detection of polycyclic aromatic hydrocarbon pollutants: multidrug resistance gene 49 in *Drosophila melanogaster*. *Environ Toxicol Chem* 26, 1418-1424.

Vache, C., Camares, O., De Graeve, F., Dastugue, B., Meiniel, A., Vaury, C., Pellier, S., Leoz-Garziandia, E., Bamdad, M., 2006. *Drosophila melanogaster* p-glycoprotein: a membrane detoxification system toward polycyclic aromatic hydrocarbon pollutants. *Environ Toxicol Chem* 25, 572-580.

Van Den Elsen, J.M., Kuntz, D.A., Hoedemaeker, F.J., Rose, D.R., 1999. Antibody C219 recognizes an alpha-helical epitope on P-glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 13679-13684.

Zaja, R., Klobucar, R.S., Smital, T., 2007. Detection and functional characterization of Pgp1 (ABCB1) and MRP3 (ABCC3) efflux transporters in the PLHC-1 fish hepatoma cell line. *Aquatic Toxicology* 81, 365-376.



## **Discussion générale et Perspectives**



## **A. Rappel du contexte et des objectifs de l'étude**

L'environnement subit de nombreuses pollutions engendrant des perturbations sur les écosystèmes, ainsi que l'induction de maladies pernicieuses chez l'Homme. En effet, une multitude de polluants, de propriétés et de structure très variées, circulent dans l'air, le sol et l'eau et contaminent ainsi notre environnement ainsi que tous les organismes vivant dans ces milieux. Au cours du temps, les différents polluants peuvent s'accumuler dans les organismes colonisant ces milieux contaminés et être transférés à travers la chaîne alimentaire, jusqu'à l'Homme. De cette manière, la pollution généralisée de l'environnement peut se traduire par un véritable problème de toxicité chronique engendrant chez les individus contaminés un risque réel pour leur santé.

La méthodologie mise en œuvre actuellement pour la mesure et le contrôle de la pollution est principalement de nature physico-chimique, mais celle-ci n'apporte quasiment pas d'informations sur l'état de santé des organismes contaminés. Une nouvelle approche, développée depuis quelques années, est l'utilisation d'indicateur biologique ou de biomarqueur. La notion de biomarqueur peut être définie comme « un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, et/ou physiologique, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à, au moins, une substance chimique à caractère polluant » (Lagadic et al., 1997). Elle apporte des informations complémentaires et donne une idée plus concrète, de l'état de perturbation des organismes contaminés.

Face à la variété et la complexité des polluants rejetés dans l'environnement, les organismes exposés peuvent s'adapter, résister et/ou répondre différemment à la présence de ces contaminants. Il est donc nécessaire actuellement de multiplier les organismes-tests et les indicateurs afin d'avoir une vue globale et réaliste de l'état de pollution des milieux.

Dans ce contexte, nos travaux de recherche visent au développement de biomarqueurs moléculaires intitulés « Sentinelle » et basés sur l'expression de protéines « Multidrug Resistance ». Ces protéines sont des pompes d'efflux membranaires impliquées dans les mécanismes de détoxification cellulaire. Elles expulsent vers le milieu extracellulaire les xénobiotiques et/ou leurs métabolites. De plus, elles reconnaissent de nombreux polluants de structure et de propriétés très variées. Trois protéines de phénotype MDR sont



principalement reconnues comme étant impliquées dans les mécanismes de résistance aux xénobiotiques : ABCB1-MDR1-P-gp, ABCC1-MRP1 et ABCG2-BCRP.

Pour ces travaux, nous avons choisi d'étudier la réponse de deux protéines MDR majeures :

(i) La P-gp, qui est la première protéine de phénotype MDR identifiée depuis de nombreuses années et dont l'expression a été démontrée chez un grand nombre d'organismes procaryotes et eucaryotes, de type animal ou végétal (Bamdad et al., 1999; Bamdad et al., 1997; Bard, 2000; Bottova et al., 2009; Camarès O, 2004; Dudler and Sidler, 1998; Geisler et al., 2005; Gerlach et al., 1986; Krogstad et al., 1992; Kurelec, 1992; Kurelec and Pivčević, 1989; Loncar et al., 2010; Vache et al., 2007; Vache et al., 2006; Zaja et al., 2007).

(ii) La deuxième protéine MDR étudiée lors de nos travaux est la « Breast Cancer Resistance Protein » (BCRP), appelée également la protéine ABCG2. Elle a été identifiée pour la première fois dans les cellules cancéreuses mammaires (Allikmets et al., 1998; Doyle et al., 1998). Son expression a été mise en évidence, principalement, dans différents tissus humains, tels que les testicules, l'intestin, le foie, les cellules souches hématopoïétiques, les glandes mammaires et la barrière hémato-encéphalique (Maliepaard et al., 2001; Natarajan et al., 2012; Robey et al., 2007).

La P-gp et la protéine ABCG2 sont des protéines de défense membranaire à l'échelle cellulaire dont l'expression basale permet une protection naturelle et continue de la cellule face aux xénobiotiques. Dans des conditions de contamination du milieu, leur expression devrait augmenter afin de renforcer la barrière de défense membranaire, en réponse à l'agression extérieure.

Le choix du développement de biomarqueur « Sentinelle » à partir des protéines MDR a été motivé suite aux travaux antérieurs de l'équipe. En effet, notre groupe de recherche s'intéresse depuis de nombreuses années au développement de biomarqueurs à partir de l'expression des protéines MDR, et notamment de la P-gp. Ces travaux, basés sur l'étude de l'expression du complexe « mdr/P-gp » chez un organisme modèle, la mouche du vinaigre (*Drosophila melanogaster*), en réponse à la pollution atmosphérique par les Hydrocarbures



Aromatiques Polycycliques (HAP) (Vache et al., 2007; Vache et al., 2006), ont mis en évidence une induction de type dose-dépendante de la P-gp chez la drosophile en réponse à une exposition aux HAP, en conditions contrôlées ou en milieu naturel, dans l'air (Vache et al., 2007; Vache et al., 2006).

De même, les travaux déjà été menés, au sein de notre équipe, sur l'étude de l'expression de la P-gp chez le protozoaire cilié d'eau douce, *Tetrahymena pyriformis*, en réponse à une pollution aquatique par les HAP (Bamdad et al., 1999; Bamdad et al., 1997), ont également montré une nette induction de type dose dépendante.

La réponse de la P-gp est (i) très rapide puisqu'elle apparaît après une très courte exposition aux xénobiotiques (de quelques secondes à quelques heures), (ii) sensible (gamme de concentrations allant de nM aux  $\mu$ M), et (iii) reproductible.

D'autres travaux de recherche ont également montré une augmentation du niveau d'expression des transporteurs MDR, notamment de la protéine P-gp dans des organismes aquatiques vivant dans des milieux contaminés (Einicker-Lamas et al., 2003; Kurelec, 1992). Une expression de la P-gp a été mise en évidence dans le foie et dans les cultures primaires d'hépatocytes de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Zaja et al., 2008a). Concernant la protéine ABCG2-like, une expression de ses transcrits a été retrouvée dans sept tissus de la truite arc en ciel (foie, rein, intestin proximal, intestin distal, gonades, branchies et cerveau) (Loncar et al., 2010).

La protéine ABCG2 et la protéine P-gp sont donc des protéines ubiquitaires et leur coexpression pourrait être exploitée pour le développement d'un biomarqueur chez le modèle poisson, en réponse à une pollution aquatique.

De fait, nous avons choisi de travailler sur le modèle poisson, et plus particulièrement sur la famille des Salmonidés. Ces poissons, en raison de leur régime alimentaire, sont situés au sommet des réseaux trophiques. Ils représentent donc des organismes intégrateurs de la qualité du milieu. Parmi la famille des Salmonidés, nous avons sélectionné l'espèce *Salmo trutta fario*, appelé plus communément la truite fario ou la truite commune. Cette espèce est présente dans la majorité des cours d'eau français.



Pour développer le biomarqueur Sentinelle, nous avons choisi plus particulièrement de travailler à partir du tissu sanguin de la truite fario, et notamment sur les globules rouges. En effet, les érythrocytes de poisson représentent un modèle très original qui pourraient être adapté au développement de biomarqueur de type Sentinelle pour les raisons suivantes :

(i) Le système sanguin représente un carrefour d'échanges et de transports d'une variété de substances physiologiques (oxygène, substances nutritives, hormones, etc.) mais également un lieu de passage et d'accumulation de xénobiotiques (médicaments, polluants).

(ii) Quel que soit le type de pollution (aiguë ou chronique), les différents polluants se retrouvent directement dans le sang et/ou s'accumulent dans les organes, les tissus et les cellules de l'organisme et sont progressivement libérés dans le système sanguin.

(iii) Les globules rouges de poisson sont des cellules nucléées et pourraient être adaptés au développement de biomarqueurs utilisant le principe de l'expression de type gène/protéine.

Il s'agit donc d'un modèle très original, non exploité dans le domaine de l'environnement et qui permettrait de contrôler de manière précoce, l'état de contamination du milieu, par un simple prélèvement de sang.

Dans ce contexte, nous avons envisagé de développer le biomarqueur Sentinelle à partir du niveau de coexpression de la protéine ABCG2-like et la P-gp, dans les globules rouges de truites issues de différents cours d'eau.

Pour développer le biomarqueur Sentinelle, nous avons procédé en plusieurs étapes :

(i) La première étape a consisté en l'analyse de l'expression des deux protéines MDR dans les culots secs des globules rouges de la truite fario en provenance de pisciculture.

(ii) La deuxième étape fut la mise au point des conditions de cultures primaires des érythrocytes de truite fario. Cette étape était indispensable, afin de pouvoir étudier les modalités d'expression des deux protéines MDR en conditions *in vitro*, suite à une exposition à un polluant modèle.



(iii) La troisième étape a consisté en l'étude des niveaux d'expression des deux protéines MDR dans les érythrocytes de truites fario, provenant de différentes rivières, afin de pouvoir valider l'utilisation du biomarqueur Sentinelle en milieu naturel.

(iv) La quatrième étape a concerné l'analyse de l'expression des deux protéines MDR chez différentes espèces de Salmonidés afin de rechercher une éventuelle variabilité interspécifique d'expression.

(v) La cinquième étape a été consacrée à l'étude de la comparaison du niveau d'expression des deux protéines MDR dans les globules de truites fario, provenant de deux piscicultures différentes, alimentées par des rivières présentant une qualité environnementale différente.

## **B. Mise en évidence de l'expression des protéines MDR dans les érythrocytes de truite**

Dans ce contexte, la première étape du développement du biomarqueur Sentinelle a donc consisté en la recherche de l'expression des deux protéines MDR dans les érythrocytes de la truite fario. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de western-blot sur des culots secs obtenus à partir de globules rouges de truite fario provenant de pisciculture, en utilisant l'anticorps anti-P-gp C219 (Calbiochem®, Merck Millipore). Ce dernier, a marqué clairement dans les globules rouges de truite fario, deux protéines MDR, l'une de 75 kDa et l'autre de 140 kDa. La protéine de 140 kDa a été identifiée comme étant la P-gp. En effet, l'expression d'une P-gp de 140-kDa a déjà été retrouvée dans des cultures d'hépatocytes d'*Oncorhynchus mykiss* (Sturm et al., 2001) et d'une lignée cellulaire d'hépatome de poissons (Zaja et al., 2007). De plus, nous avons utilisé comme contrôle positif dans nos expériences, un extrait de foie de la truite qui a également présenté une P-gp de poids moléculaire de 140 kDa. Par ailleurs, le poids moléculaire de la P-gp peut varier selon les espèces. A titre d'exemple, l'anticorps monoclonal anti-P-gp C219 (utilisé lors de nos expériences), reconnaît une P-gp de 170 kDa chez l'homme, de 140 kDa chez *Drosophila melanogaster* et également de 55 kDa dans la membrane hématoencéphalique des bovins (Beaulieu et al., 1995; Sarkadi et al., 2006; Vache et al., 2007; Vache et al., 2006). Chez le



protozoaire cilié d'eau douce, *Tetrahymena pyriformis*, un autre anticorps polyclonal anti-P-gp, l'anticorps Ab1 (Oncogène<sup>TM</sup>), reconnaît deux P-gp de 66 kDa et 96 kDa (Bamdad et al., 1999; Bamdad et al., 1997). Par conséquent, la deuxième protéine de 75-kDa, identifiée dans les globules rouges de la truite fario qui a été marquée par l'anticorps C219 lors de nos expériences, pourrait correspondre à une autre protéine MDR. En effet, cette protéine de 75 kDa pourrait correspondre à une protéine MDR appelée BCRP/ABCG2. Cette dernière a également été identifiée au niveau des cellules souches hématopoïétiques humaines et présente le même poids moléculaire de 75 kDa (Raaijmakers, 2007). De plus, les transcrits de la protéine ABCG2 ont également été identifiés dans différents tissus de la truite arc en ciel (foie, rein, intestin proximal, intestin distal, gonades, branchies et cerveau) (Loncar et al., 2010).

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé un alignement des séquences de la P-gp et de la protéine ABCG2 de la truite arc-en-ciel disponibles dans Genbank avec les épitopes "VQEALD" et "VQAALD" reconnue par l'anticorps C219 (Van Den Elsen et al., 1999), à l'aide du logiciel CLUSTALW. Les résultats de l'alignement ont montré que l'anticorps C219 reconnaît l'épitope « VQAALD » dans les deux protéines MDR. Ainsi, la protéine de 75-kDa, identifiée par l'anticorps C219 dans les globules rouges de la truite fario, a été nommée la protéine "ABCG2-like".

### **C. Mise au point de la culture *in vitro* des globules rouges**

Après la mise en évidence de l'expression de la protéine ABCG2-like et de la P-gp dans les érythrocytes de la truite fario, la deuxième étape du développement du biomarqueur consistait en l'étude des propriétés inductibles des protéines MDR d'intérêt par des xénobiotiques. Pour cette approche, il était nécessaire de travailler en conditions *in vitro*. Pour cela, nous avons donc défini, toutes les conditions nécessaires à la mise en culture *in vitro* des globules rouges de truite.

Pour cette mise au point des cultures primaires d'érythrocytes de truite, nous avons testé différentes concentrations cellulaires d'ensemencement (de 300 000 cellules par mL à 1 500 000 cellules par mL), différentes températures d'incubation (de 4°C à 37°C), différents milieux de cultures (IMDM, MEM et L-15), avec ou sans sérum de veau foetal, et avec ou sans agitation des cultures. Les trois milieux de cultures utilisés ont été choisis pour les



raisons suivantes : le milieu L-15 et le milieu MEM sont régulièrement utilisés pour la mise en culture des hépatocytes de truites arc-en-ciel (Fischer et al., 2011; Zaja et al., 2008a; Zaja et al., 2008b). Le milieu IMDM est, quant à lui, utilisé dans d'autres cultures cellulaires, et notamment de cellules de mammifères (Jochmans et al., 2012; Phuc et al., 2011).

Suite aux différentes expériences réalisées, les conditions optimales suivantes ont été retenues : une concentration cellulaire d'ensemencement de 1 000 000 de cellules par mL, dans le milieu L-15 supplémenté à 10% en sérum de veau, sous agitation de 45 rpm et dans une chambre thermostatée de 21°C. Dans ces conditions, les cultures primaires d'érythrocytes de truite fario pouvaient être maintenues pendant 7 jours.

Le développement des cultures primaires à partir d'érythrocytes de truite fario est totalement original et novateur et aucune donnée bibliographique ne décrit ce type d'étude chez les Salmonidés. Par ailleurs, le développement de cultures primaires des érythrocytes nucléés permet un champ d'application beaucoup plus large car il pourrait être adapté à d'autres modèles de poissons ou d'autres organismes possédant des globules rouges nucléés. De plus, ce modèle de culture pourrait être exploité pour des tests de cytotoxicité de divers types de polluants ou de médicaments.

#### **D. Modalités d'expression des protéines MDR en présence d'un polluant**

Le développement des cultures primaires d'érythrocytes de truite fario a permis par la suite de tester, dans des conditions contrôlées, l'action des xénobiotiques sur l'expression des deux protéines MDR retenues. Pour ces travaux nous avons choisi de tester l'action de différentes concentrations du Benzo[a]pyrène (B[a]P), un polluant modèle de propriété cytotoxique, génotoxique et cancérigène, appartenant à la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Des études antérieures de l'équipe avaient déjà montré une implication de B[a]P, et de plusieurs autres HAP, dans l'induction de l'expression de la P-gp, en réponse à une pollution aquatique ou atmosphérique (Bamdad et al., 1999; Bamdad et al., 1997; Vache et al., 2007; Vache et al., 2006). Nous avons donc commencé ces travaux par l'étude de l'impact du B[a]P sur les érythrocytes de la truite fario. Pour cela, la cinétique de croissance des érythrocytes de truite, suite à une exposition à des concentrations



croissantes de B[a]P (10, 20 et 30  $\mu$ M) a été suivie, pendant 24 heures. Aucune diminution du nombre d'érythrocytes et aucun signe apparent de toxicité n'ont été observés au cours de ces études. Ces résultats pourraient être en rapport avec l'action détoxificatrice des pompes MDR des globules rouges de truite fario. Des résultats similaires ont été déjà observés dans les cultures du cilié *Tetrahymena pyriformis* et dans des cultures cellulaires SL2 de *Drosophila melanogaster* (Bamdad et al., 1997; Vache et al., 2007). Pour vérifier cette hypothèse, l'activité des pompes MDR des érythrocytes de truite, en réponse au B[a]P, a donc été analysée au cours du temps, en utilisant la technique de cytométrie en flux (CMF). Le B[a]P est une molécule naturellement fluorescente sous UV. Son évolution temporelle dans les érythrocytes de truites peut donc être suivie par CMF. Les résultats obtenus ont montré, d'une part, que le B[a]P rentrait rapidement dans les érythrocytes de truite et que sa présence ne perturbait pas l'homogénéité des populations de cellules, durant l'expérience. D'autre part, l'étude de l'évolution intracellulaire du B[a]P, en présence ou absence du vérapamil ou de la cyclosporine, d'autres substrats cibles des pompes MDR, ont montré que les protéines MDR des érythrocytes de truites étaient bien actives et reconnaissaient ces différents substrats. En effet, les différentes expériences réalisées ont permis d'observer une intensité de fluorescence plus faible dans les érythrocytes de truites traitées conjointement avec le B[a]P et le vérapamil ou la cyclosporine, par rapport aux érythrocytes traités seulement avec le B[a]P seul. Ces résultats laissent supposer que les pompes MDR des érythrocytes de la truite fario ont une activité d'efflux plus rapide du B[a]P, en présence de substrats compétiteurs. En effet, chez d'autres organismes, le vérapamil est reconnue comme étant un substrat compétiteur pour la pompe P-gp alors que la cyclosporine est reconnue comme étant un inhibiteur (Bamdad et al., 1997; Holló et al., 1996; Sarkadi et al., 2006; Vache et al., 2006). Pour les pompes MDR des érythrocytes de truites, le vérapamil et la cyclosporine semblent se comporter comme un compétiteur.

Suite à ces expériences, nous avons analysé la modulation d'expression de la protéine ABCG2-like et de la P-gp après exposition des cultures primaires d'érythrocytes de truite fario, aux mêmes concentrations de B[a]P (10, 20 et 30  $\mu$ M).

Dans les cellules traitées par ces différentes concentrations de B[a]P en culture *in vitro*, une induction des deux protéines MDR est observée. Lors d'un traitement par de faibles concentrations de B[a]P (10 et 20  $\mu$ M), le taux d'expression des deux protéines MDR devient



trois fois supérieur aux témoins, respectivement après 24 et 3 heures d'exposition au polluant. Par contre, en présence de plus fortes concentrations de B[a]P (30  $\mu$ M), l'expression des deux protéines MDR évoluent différemment au cours des 24 heures de traitement. A trois heures, le taux d'expression de la P-gp est 1,2 fois plus important que celui de la protéine ABCG2-like, puis à six heures ce ratio s'inverse avec une expression plus importante pour ABCG2-like (1,6 fois par rapport à la P-gp). Puis à nouveau, le taux d'expression de la P-gp augmente de 1,8 fois par rapport à celui de la protéine ABCG2-like. Ces résultats laissent supposer que les deux protéines MDR jouent un rôle complémentaire et relais dans la protection des globules rouges de la truite fario contre une contamination par un polluant.

Des travaux antérieurs de l'équipe ont déjà montré le rôle de la protéine P-gp dans les mécanismes de défense cellulaire à l'encontre des HAP (Bamdad et al., 1999; Bamdad et al., 1997; Vache et al., 2007; Vache et al., 2006). Par contre, la mise en évidence de l'implication de la protéine ABCG2-like dans le mécanisme de défense contre les HAP est totalement originale. Ces résultats laissent supposer que les érythrocytes de truite en présence de faibles concentrations de B[a]P, répondent par une expression constante de la protéine ABCG2-like et de la P-gp. Par contre, en présence des concentrations plus fortes de B[a]P, c'est la P-gp qui prendrait le relais par une nette augmentation de son expression. Dans ces conditions, le niveau d'expression de la protéine ABCG2-like est toujours maintenu.

## **E. Test du biomarqueur « Sentinelle » en milieu naturel**

### **I. Etude de la réponse du biomarqueur « Sentinelle » au niveau de deux rivières de qualité différente**

Afin de tester la pertinence du biomarqueur Sentinelle, la troisième étape de développement, a consisté en l'étude des niveaux d'expression des deux protéines MDR dans les érythrocytes de truites fario provenant de différentes rivières du département Puy-de-Dôme. Dans ce but, une collaboration entre notre équipe et la Fédération Départementale pour la Pêche et la Protection du Milieu Aquatique du Puy de Dôme a été établie.

Dans ce contexte, des prélèvements sanguins sont réalisés (*in situ*) sur des truites fario capturées dans différents cours d'eau du département du Puy-de-Dôme, aussi bien en zone



très peu polluée qu'en zone contaminée. Les résultats obtenus pour le biomarqueur Sentinelle ont été comparés aux valeurs données par deux indices utilisés classiquement pour analyser la qualité des milieux aquatiques, l'Indice Poisson Rivière (IPR) et l'Indice de Population de Truite (IPT). Ces deux indices permettent de donner une information concernant la qualité du cours d'eau, globalement pour l'indice IPR, et plus spécifiquement pour les populations de truite concernant l'indice IPT.

Le biomarqueur Sentinelle a été testé tout d'abord dans deux zones de niveau de pollution contrastée, à partir de prélèvements sanguins de truites fario capturées dans la réserve de la Vallée de Chaudefour, qui représente un site pratiquement exempt de pollution, et dans la Couze Chambon à hauteur de Coudes, à un niveau où différentes pollutions (rejets domestiques, produits phytosanitaires et lessivages des routes) affectent la rivière (cf Figure 2 de la partie B du chapitre 2).

Au niveau du ruisseau de Chaudefour, seule la protéine ABCG2-like est présente dans les érythrocytes des truites fario analysés, alors que le taux d'expression de la P-gp est nul. Ces résultats montrent, que chez des truites fario vivant dans une rivière non contaminée, la seule protéine MDR exprimée est la protéine ABCG2-like. L'IPR calculé pour ce site, indique une qualité « médiocre » du cours d'eau, car toutes les espèces de poissons nécessaires à son calcul ne sont pas présentes. Les résultats du biomarqueur montrent que l'IPR, considéré de façon isolée, ne peut être représentatif de la qualité des milieux.

Au niveau de la Couze Chambon à Coudes, une coexpression de la protéine ABCG2-like et de la P-gp a été retrouvée, avec une augmentation significative de leur taux d'expression. Cette coexpression et cette augmentation indiquent que le mécanisme de défense cellulaire est mis en jeu afin de protéger l'organisme contre une contamination présente dans le cours d'eau. L'IPT (5) au niveau de Coudes indique une mauvaise qualité du milieu pour la truite fario, tandis que l'IPR (16) indique une bonne qualité du milieu dans la mesure où plusieurs espèces de poissons sont présentes et même si la qualité de l'eau est médiocre. Les résultats obtenus avec le biomarqueur Sentinelle sont en accord avec l'IPT, et apportent une information plus pertinente que l'IPR pour l'évaluation de la qualité de l'eau et du milieu en général.



## **II. Etude du biomarqueur « Sentinelle » à l'amont et à l'aval de sites contaminés**

Suite aux résultats obtenus sur des truites prélevées dans des zones de niveau de pollution contrastée, nous avons analysé la réponse du biomarqueur Sentinelle sur des truites fario prélevées en amont et en aval d'un site contaminé. Pour cela, deux sites ont été choisis. Le premier site est localisé sur la rivière « Dore » en amont et en aval de la décharge « Poyet » (cf Figure 7 de la partie B du chapitre 2). Le deuxième site est localisé sur le ruisseau « Grandrif » au niveau de la station d'épuration de « Chadernolles » (cf Figure 9 de la partie B du chapitre 2).

Au niveau de l'amont de la station « Poyet », une coexpression similaire des deux protéines a été retrouvée au niveau des globules rouges des truites fario, indiquant une contamination faible du cours d'eau au niveau de cette zone. A l'aval de la station « Poyet », le taux d'expression de la protéine ABCG2-like a été doublé par rapport à son niveau d'expression observé en amont du site, indiquant une sensible aggravation de l'état de contamination de cette rivière à ce niveau. En effet, cette décharge est à ciel ouvert et ne possède pas de système d'imperméabilisation vis-à-vis de la nappe phréatique. Cela entraîne, lors des pluies, le ruissellement des eaux dans la nappe et dans la rivière, engendrant ainsi une contamination du cours d'eau par les différents polluants présents au niveau de la décharge de « Poyet ». Au niveau de ce site, le biomarqueur Sentinelle donne une information complémentaire concernant le degré de contamination de la rivière par rapport aux valeurs données par les indices IPR et IPT. En effet, malgré la présence d'habitats plus favorables à la truite fario en aval de la décharge (IPT : 2), le biomarqueur Sentinelle indique une dégradation de la qualité de l'eau sur ce site.

Au niveau de l'amont de la station d'épuration de « Chadernolles », une coexpression similaire des deux protéines MDR a été retrouvée dans les globules rouges des truites fario, indiquant une contamination faible du cours d'eau au niveau de cette zone, ce qui est en accord avec les indices IPR et IPT mesurés pour ce site. A l'aval de la station, les taux d'expression de la protéine ABCG2-like et de la P-gp ont doublé par rapport à l'amont de la station. Ces résultats indiquent une augmentation de la contamination du ruisseau de Grandrif, en aval de la station d'épuration de « Chadernolles ». En effet, cette station, prévue pour traiter les effluents de 150 habitants, est régulièrement soumise à des effluents



plus importants, surtout en période estivale (période des prélèvements) en raison de la proximité du camping. Cette augmentation d'effluents à traiter est probablement à l'origine de l'augmentation du degré de pollution signalée par l'élévation des taux d'expression de la protéine ABCG2-like et de la P-gp. Concernant la station aval, l'IPR et l'IPT indiquent, tous deux, une bonne qualité du milieu (IPT : 1 et IPR : 4) alors que le biomarqueur Sentinelle indique une augmentation du degré de contamination de la rivière par rapport au site amont. Ces résultats confirment la sensibilité du biomarqueur et permet d'obtenir des informations sur le degré de la pollution du cours d'eau, alors que les indices actuellement utilisés déterminent une qualité du milieu par une estimation de la population de poissons et des caractéristiques typologiques.

### **III. Etude de la réponse du biomarqueur le long du gradient amont/aval d'une rivière**

Nous avons ensuite étudié l'expression des deux protéines MDR sur le gradient amont/aval d'une rivière, la Couze Pavin (cf Figure 3 de la partie B du chapitre 2). Pour cela, plusieurs prélèvements sanguins ont été effectués sur des truites provenant de différents sites, situés de l'amont vers l'aval de cette rivière.

Les résultats montrent une coexpression des deux protéines MDR sur les différents sites de prélèvements, indiquant une contamination générale du cours d'eau. Cependant, une augmentation significative de l'expression de la protéine ABCG2-like au niveau du site aval du cours d'eau indique une augmentation du degré de contamination dans la partie aval de la « Couze Pavin ». Concernant la P-gp, son expression évolue également le long du gradient amont-aval de la rivière. Une augmentation significative de l'expression de la P-gp est observée sur le site de Chidrac, indiquant un problème de contamination plus importante dans cette zone. En effet, cette zone est soumise à une pollution due aux rejets d'une station d'épuration et de vidange direct d'égouts dans la rivière. Les indices IPR et IPT calculés le long de ce gradient indiquent une bonne qualité du milieu de manière globale et pour la population de truites. Le biomarqueur Sentinelle indique, quant à lui, des degrés de contamination différents du cours d'eau avec un problème de pollution plus important à Chidrac. Ces résultats montrent également la plus grande sensibilité du biomarqueur Sentinelle, qui répond directement au degré de la pollution de l'eau du site analysé.



Les résultats des études menées sur les truites fario issues des cours d'eau naturels ont donc montré la capacité du biomarqueur Sentinelle à identifier différents degrés de contamination d'un cours d'eau en relation directe avec son environnement. De plus, les informations fournies par le biomarqueur Sentinelle sont plus intégratives et plus représentatives de la qualité globale de l'écosystème aquatique que celles fournies, par exemple, par le calcul des indices IPR et IPT. L'utilisation de ce biomarqueur pourrait ainsi compléter utilement les outils actuellement disponibles pour la surveillance de l'état écologique des cours d'eau.

## **F. Variabilité interspécifique et saisonnière de l'expression des protéines MDR**

La quatrième étape pour le développement du biomarqueur Sentinelle a été l'étude de l'expression de la protéine ABCG2-like et de la P-gp, dans les érythrocytes de trois espèces de Salmonidés, provenant d'une même pisciculture, afin de rechercher une éventuelle variabilité interspécifique d'expression de ces deux protéines. Les trois espèces de Salmonidés étudiés ont été la truite fario, la truite arc-en-ciel et l'omble chevalier. Elles ont été choisies car elles se rencontrent à la fois dans les écosystèmes aquatiques naturels de la région et dans les piscicultures. Les trois espèces de Salmonidés étudiées proviennent de la pisciculture fédérale « La Villetour » de Besse, qui est alimentée par la Couze Pavin. Les érythrocytes des trois espèces de Salmonidés étudiés coexpriment les deux protéines MDR, et le niveau d'expression entre les trois espèces n'est pas significativement différent. Ces résultats laissent supposer qu'il n'y a pas de variabilité interspécifique entre ces trois espèces de Salmonidés élevées dans une même pisciculture.

Suite à ces résultats, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la variabilité saisonnière de l'expression des deux protéines MDR chez une espèce de salmonidés en particulier, la truite fario. Pour cela, nous avons analysé l'expression des deux protéines MDR dans les globules rouges de truites fario provenant d'une même pisciculture, au cours d'une période de 10 mois.

Les résultats obtenus montrent une expression continue et sensiblement constante de la protéine ABCG2-like et de la P-gp au cours de la période d'étude. Cela indique que le taux d'expression des deux protéines MDR ne semble pas significativement influencé par les saisons.



## **G. Test du biomarqueur « Sentinelle » en pisciculture**

Le dernier volet de cette étude concerne la comparaison du niveau d'expression des deux protéines MDR dans les globules de truites fario provenant de deux piscicultures présentant une qualité environnementale différentes, afin de tester l'utilisation du biomarqueur Sentinelle dans les piscicultures.

Les deux piscicultures choisies sont alimentées par deux rivières provenant de deux bassins versants différents. La pisciculture « La Villetour », localisé à Besse et Saint-Anastaise, est située en tête de bassin versant de la Couze Pavin, où les seuls rejets dans le milieu aquatique sont liés aux épandages agricoles riches en matières organiques (cf Figure 4 du chapitre 3). Tous les rejets domestiques sont captés et aboutissent à la station d'épuration située en aval de la pisciculture. Aucune station de suivi de la qualité de l'eau n'est située en amont de l'établissement piscicole, mais la qualité de l'eau peut être qualifiée de bonne à très bonne sur la plupart des paramètres généralement analysés. La pisciculture « Le moulin de Pagnat », située à Saint Saturnin, est alimentée principalement par la Veyre (cf Figure 4 du chapitre 3), dont la qualité de l'eau est dégradée par la mauvaise qualité des deux affluents dont le ruisseau de Tau qui parcourt le hameau de Chadrat qui ne possède pas de station d'épuration et donc qui rejette toutes ses eaux domestiques dans ce ruisseau.

La comparaison du taux d'expression chez les truites fario de la protéine ABCG2-like et de la P-gp montre des valeurs plus faibles pour la pisciculture de « La Villetour » (Couze Pavin) que ceux obtenus pour la pisciculture de St-Saturnin. Cette différence d'expression peut s'expliquer par la qualité altérée des eaux de la Veyre et du Tau alimentant la pisciculture de Saint-Saturnin. En effet, les poissons étant soumis à l'altération de l'eau par les rejets domestiques, les taux d'expression de la protéine ABCG2-like et de la P-gp augmentent afin de créer une véritable barrière de défense de l'organisme à l'échelle cellulaire. Ces résultats permettent de mettre en évidence l'intérêt de l'utilisation du biomarqueur sur des érythrocytes de truite fario provenant de pisciculture. Actuellement, seuls des paramètres physico-chimiques et quelques polluants et métaux lourds sont analysés pour déterminer la qualité de l'eau des piscicultures. Le biomarqueur Sentinelle pourrait ainsi devenir un nouvel outil pour la détermination de la qualité du cours d'eau alimentant les piscicultures.



## H. Intérêts et limites du biomarqueur « Sentinelle » proposé

Lors des expériences réalisées en condition *in vitro* et en milieu naturel, nous avons observé une réponse relais des deux protéines MDR lors d'une contamination par un xénobiotique. En effet, ces deux protéines MDR sont exprimées différemment selon le degré de contamination des cours d'eau. Lorsque la protéine ABCG2-like est seule à être exprimée, le niveau de contamination de la rivière est faible, voire quasiment nulle. L'expression de la seule protéine ABCG2-like serait donc suffisante pour protéger les cellules contre l'agression éventuelle de xénobiotiques. C'est pour cette raison que nous avons nommé la protéine ABCG2-like des érythrocytes de truites fario la protéine de « garde ». Par contre, lorsque la P-gp est coexprimée avec la protéine ABCG2-like, la rivière présente une contamination plus importante. Dans ces conditions, les globules rouges de truites fario augmenteraient leur ligne de défense à l'encontre des xénobiotiques par une coexpression des deux protéines MDR. Plus le degré de la pollution de l'eau est important, plus la quantité de P-gp exprimée dans les érythrocytes de truite serait grande. C'est pourquoi nous avons nommé la P-gp des érythrocytes de truite fario, la protéine de « défense ». Le principe du biomarqueur Sentinelle est donc basé sur les niveaux d'expression de la protéine de garde et de la protéine de défense qui reflètent le degré de contamination de la rivière. Ce nouvel outil de détection de la pollution aquatique, utilisé en complément avec les indices biologiques déjà existants doit permettre une meilleure évaluation de la qualité des cours d'eaux et une information plus précoce concernant la contamination éventuelle par un xénobiotique.

Dans la littérature, deux classifications répertorient les biomarqueurs selon l'importance de l'exposition et le degré d'intoxication des individus. Le biomarqueur Sentinelle peut être classé dans le rang des biomarqueurs de susceptibilité selon la classification de Lagadic (1997). En effet, ce dernier indique une capacité innée ou acquise de l'organisme à répondre à un stress induit par une exposition à un xénobiotique. Et, selon la classification de De Lafontaine (2000), le biomarqueur Sentinelle est un biomarqueur de défense, puisqu'il permet aux organismes de lutter et de survivre en présence de polluants.

Pour évaluer la pertinence d'un biomarqueur, différents critères ou conditions doivent être remplis (Stegeman et al., 1992; Van Der Oost et al., 2003):



(i) Un des premiers critères est la sensibilité du biomarqueur aux xénobiotiques permettant ainsi son utilisation en tant que signal d'alarme précoce. Le biomarqueur Sentinelle répond à ce critère. En effet, il est sensible aux effets des xénobiotiques puisqu'il répond à de faibles concentrations de polluants dans l'eau et permet d'obtenir une réponse graduée selon le degré de la pollution rencontrée.

(ii) Le deuxième critère concerne la facilité d'utilisation du biomarqueur, ainsi que son moindre coût et sa réalisation selon des normes de qualité. Le biomarqueur Sentinelle répond à ces critères par un coût faible (environ 50 euros par analyse), et une utilisation facile sur le terrain, car une simple prise de sang suffit pour l'analyse.

(iii) Afin de discerner les variations naturelles du biomarqueur de celles liées à la présence de polluants dans le milieu, les données de base du biomarqueur doivent être connues. Ces données concernent les facteurs propres à l'individu, dépendant de l'espèce, du sexe, du poids, de l'âge... En ce qui concerne le biomarqueur Sentinelle, il a été développé principalement à partir d'une seule espèce de Salmonidés, la truite fario. L'échantillonnage, en provenance des piscicultures ou des rivières en zone naturelle, a toujours été réalisé à partir de truites mesurant entre 16 et 20 cm afin de travailler sur une population homogène en taille et en poids et en même classe d'âge. Par contre au cours de ces expériences, le facteur sexe n'a pas été pris en compte. En effet, le biomarqueur sentinelle a été développé indifféremment, à partir des truites mâles et femelles, afin d'éviter sur certains sites de prélever des truites géniteurs et surtout, de permettre une reproduction naturelle de la population. Dans nos conditions expérimentales, les réponses du biomarqueur Sentinelle étaient cohérentes, quelque soit le sexe de la truite fario utilisée. Ceci peut suggérer que le facteur sexe n'aurait pas un impact sur la réponse du test Sentinelle.

(iv) Un autre critère concerne les facteurs de confusion, c'est-à-dire ceux pouvant présenter une association avec le facteur de risque examiné et pouvant influencer le résultat. Ces facteurs de confusion peuvent être représentés par des facteurs extrinsèques qui peuvent engendrer des variations de réponses chez les organismes. Ces facteurs sont les saisons, la durée et le taux d'exposition ainsi que l'interaction avec les autres espèces vivantes dans le milieu. Afin de déterminer l'influence du facteur saison sur la réponse du



biomarqueur Sentinelle, une analyse de l'expression des deux protéines MDR a été réalisée sur dix mois sur des poissons de pisciculture. Cette étude a montré une expression stable et continue des deux protéines MDR, révélant ainsi une absence mesurable de variabilité saisonnière.

(v) De même que la connaissance des relations entre la réponse du biomarqueur et l'exposition aux polluants doit être acquise. La signification toxicologique, c'est-à-dire les relations entre sa réponse et l'impact à long terme sur l'organisme, doit être établie. Concernant ces aspects, les expériences réalisées en conditions *in vitro* nous ont permis de mettre en évidence une réponse dose-dépendante des deux protéines MDR. En outre, une réponse relais des deux protéines MDR a été détectée en relation directe avec la concentration de polluant modèle testé. Enfin, l'utilisation des cellules sanguines comme support de l'étude des activités MDR permet d'évaluer le degré de contamination du milieu extérieur, puisque le sang est le lieu de passage et d'accumulation des xénobiotiques (médicaments, polluants).

**En conclusion**, nos travaux de recherche ont permis la mise au point d'un biomarqueur Sentinelle à partir du niveau d'expression de deux protéines MDR majeures, la protéine ABCG2-like et la P-gp, dans les globules rouges de truite fario en réponse à une pollution aquatique. Ce biomarqueur est basé sur la réponse relais des deux protéines MDR dans la mise en œuvre du mécanisme de défense cellulaire à l'encontre des xénobiotiques. Par l'analyse de la combinaison des réponses des deux protéines MDR, le biomarqueur Sentinelle est capable d'évaluer les différents degrés de contamination d'un cours d'eau en relation direct avec son environnement. Par ailleurs, les informations apportées par ce nouvel outil sont plus intégratives et plus précoces que celles fournies par les indices biologiques utilisés actuellement, tels que l'Indice Poisson Rivière. De plus, l'originalité de ce test réside dans l'utilisation des globules rouges (milieu sanguin) comme support de l'étude et son application par une simple prise de sang chez le poisson.

Ces travaux s'inscrivent dans le cadre d'un projet de valorisation qui s'est concrétisé par le dépôt d'un brevet et le projet de création d'une entreprise de prestations de services en environnement. A l'heure actuelle, le test Sentinelle est développé à partir de la technique



de western-blot. Il s'agit d'une technique assez délicate comprenant de nombreuses étapes et relativement coûteuse, donc très peu rentable pour une entreprise. C'est pourquoi, nous souhaiterions poursuivre le développement du biomarqueur Sentinelle sous forme de test plus rapide, tels que le test Elisa ou Luminex®. En effet, ces deux techniques, basées sur l'immunodétection, permettent de tester plusieurs échantillons en une même manipulation, avec des quantités de réactifs et d'échantillons plus faibles, générant ainsi un gain en temps. Or, d'après nos résultats, l'anticorps C219, que nous utilisons, reconnaît à la fois la protéine ABCG2-like et la protéine P-gp. Cette double reconnaissance est un avantage en technique de western-blot, puisque les protéines sont visualisées sur une membrane, mais pour les tests Elisa et Luminex®, cela représente un inconvénient, car nous ne pourrions pas discriminer dans l'échantillon l'expression de chaque protéine. Pour pallier à ce problème, il faudrait réaliser des anticorps à façon pour chaque protéine MDR. Dans ce contexte, la réalisation du clonage des deux protéines MDR de la truite fario est à envisager. Une autre technique pour le développement d'un test plus rapide et moins coûteux est la PCR quantitative. Dans la mesure où l'expression des protéines ABCG2-like et de la P-gp a déjà été vérifiée et validée dans les érythrocytes de truite, leurs transcrits pourraient également être exploités. Ce test serait basé sur l'expression génique des deux protéines MDR et la quantification de leurs transcrits (Loncar et al., 2010; Zaja et al., 2008b). Des expériences préliminaires ont permis la mise au point des amorces permettant la détection des transcrits de la protéine ABCG2-like et de la P-gp dans les érythrocytes de la truite fario. Ces premiers résultats sont prometteurs et permettront sans doute la mise au point d'une technique de quantification basée sur la PCR en temps réel. A titre d'exemple, les premiers résultats basés sur les échantillons provenant de la Vallée de Chaudesfour ont confirmé l'absence d'expression de la protéine P-gp dans les érythrocytes de truite fario provenant d'une rivière non contaminée. Par contre, dans ces échantillons, les transcrits ABCG2 sont bien présents. De même, sur d'autres échantillons sanguins de truite fario provenant d'un site contaminé, l'expression des transcrits de l'ABCG2 et de MDR1/ABCB1 a bien été retrouvée. Le développement de la technique de PCR quantitative est donc une bonne opportunité pour développer un test rapide et robuste. De plus, ce type de test est facilement normalisable, ce qui serait un réel avantage pour le développement biomarqueur Sentinelle. Enfin, l'entreprise pourrait réaliser des biomarqueurs sur d'autres modèles en réponse à une pollution atmosphérique et édaphique. En effet, les protéines MDR sont ubiquitaires et



présentes depuis les bactéries jusqu'à l'Homme (Allikmets et al., 1998; Bamdad et al., 1999; Bamdad et al., 1997; Bard, 2000; Bottova et al., 2009; Camarès O, 2004; Doyle and Ross, 2003; Dudler and Sidler, 1998; Geisler et al., 2005; Gerlach et al., 1986; Krogstad et al., 1992; Kurelec, 1992; Kurelec and Pivčević, 1989; Loncar et al., 2010; Maliepaard et al., 2001; Natarajan et al., 2012; Robey et al., 2007; Vache et al., 2007; Vache et al., 2006; Zaja et al., 2007). Des résultats antérieurs de l'équipe obtenus sur les protéines MDR de la drosophile permettent d'entrevoir la possibilité de développer un indicateur de ce type pour la pollution atmosphérique. Concernant la contamination des sols, des expériences sur le ver de terre pourraient être envisagées. En effet, les vers de terre représentent la première biomasse animale des terres émergées et, par leurs activités, jouent un rôle essentiel au niveau de la structuration des sols. De plus, les vers de terre ont la capacité d'accumuler différents types de polluants tels que les métaux lourds, les hydrocarbures aromatiques polycycliques entre autres (Ribera and Saint-Denis, 1999). Ces organismes pourraient représenter un excellent modèle pour développer un biomarqueur Sentinelle en réponse à la pollution édaphique.



## **Références bibliographiques**



- AAPPMA.du.Breuchin.et.de.la.Haute.Lanterne. Reproduction. <http://www.aappma-breuchin-lanterne.com/reproduction.html> Dernière consultation le 08-08-2012
- Aarab, N (2004). Les Biomarqueurs chez les poissons et les bivalves. Thèse de l'Université Bordeaux 1.
- Agence.de.l'eau.Adour.Garonne (2010). Le SDAGE en quelques mots. Rapport
- Agence.de.l'eau.Loire.Bretagne (2009). Schéma Directeur d'Aménagement et de Gestion des Eaux Rapport
- Agences.de.l'eau (2003). Système d'évaluation de la qualité de l'eau des cours d'eau Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable et Agence de l'eau. Rapport
- Allen, J.D., Brinkhuis, R.F., Wijnholds, J., and Schinkel, A.H. (1999). The Mouse Bcrp1/Mxr/Abcp Gene. *Cancer Research* 59, 4237-4241.
- Allikmets, R., Schriml, L.M., Hutchinson, A., Romano-Spica, V., and Dean, M. (1998). A Human Placenta-specific ATP-Binding Cassette Gene (ABCP) on Chromosome 4q22 That Is Involved in Multidrug Resistance. *Cancer Research* 58, 5337-5339.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., and Rainbow, P.S. (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76, 160-202.
- Amiard, J.C., Caquet, T., and Lagadic, L. (1998). Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement. In *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*, L. Lagadic, T. Caquet, J.C. Amiard, and F. Ramade, eds. (Paris), pp. XXI-XXXI.
- Amiard-Triquet, C., and Amiard, J.C. (2008). Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques, Tec & Doc edn.
- Atkinson, A.J., Colburn, W.A., DeGruttola, V.G., DeMets, D.L., Downing, G.J., Hoth, D.F., Oates, J.A., Peck, C.C., Schooley, R.T., Spilker, B.A., *et al.* (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69, 89-95.
- Baglinière, J.L. (1991). La truite commune (*Salmo trutta* L.), son origine, son aire de repartition, ses intérêts économiques et scientifiques. In *La truite Biologie et Ecologie*, J.L. Baglinière, and G. Maise, eds.
- Baglinière, J.L., and Maise, G. (1991). Biologie de la truite commune (*Salmo trutta* L.) dans les rivières françaises. In *La truite Biologie et Ecologie*, J.L. Baglinière, and G. Maise, eds.
- Bai, W., Zhang, Z., Tian, W., He, X., Ma, Y., Zhao, Y., and Chai, Z. (2010). Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: a physicochemical study of toxicity mechanism. *Journal of Nanoparticle Research* 12, 1645-1654.
- Bamdad, M., Brousseau, P., and Denizeau, F. (1999). Identification of a multidrug resistance-like system in *Tetrahymena pyriformis*: evidence for a new detoxication mechanism in freshwater ciliates. *FEBS Lett* 456, 389-393.
- Bamdad, M., Reader, S., Grolière, C.A., Bohatier, J., and Denizeau, F. (1997). Uptake and efflux of polycyclic aromatic hydrocarbons by "*Tetrahymena pyriformis*" : Evidence for a resistance mechanism. *Cytometry* 28, 170-175.



- Bard, S.M. (2000). Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat Toxicol* 48, 357-389.
- Beaulieu, E., Demeule, M., Pouliot, J.F., Averill-Bates, D.A., Murphy, G.F., and Beliveau, R. (1995). P-glycoprotein of blood brain barrier: cross-reactivity of Mab C219 with a 190 kDa protein in bovine and rat isolated brain capillaries. *Biochim Biophys Acta* 1233, 27-32.
- Blondel, J. (1979). *Biogéographie et écologie*, Collection d'écologie edn (Paris).
- Bocquene, G., Galgani, F., Burgeot, T., Le Dean, L., and Truquet, P. (1993). Acetylcholinesterase levels in marine organisms along french coasts. *Marine Pollution Bulletin* 26, 101-106.
- Bottova, I., Hehl, A.B., Stefanic, S., Fabrias, G., Casas, J., Schraner, E., Pieters, J., and Sonda, S. (2009). Host cell P-glycoprotein is essential for cholesterol uptake and replication of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 284, 17438-17448.
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., and Viarengo, A. (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of the Total Environment* 247, 295-311.
- Calviac, D. (2001). *Pêche à la mouche en eau vive de la truite fario (Salmo trutta)*. Thèse de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.
- Camarès O, D.F., Bamdad M (2004). *Tetrahymena pyriformis* partial mdr1 gene for putative P-glycoprotein. EMBL Nucleotide sequence Database.
- Celander, M.C. (2011). Cocktail effects on biomarker responses in fish. *Aquatic Toxicology* 105, 72-77.
- Chambers, T.C., Zheng, B., and Kuo, J.F. (1992). Regulation by phorbol ester and protein kinase C inhibitors, and by a protein phosphatase inhibitor (okadaic acid), of P-glycoprotein phosphorylation and relationship to drug accumulation in multidrug-resistant human KB cells. *Molecular Pharmacology* 41, 1008-1015.
- Chambre.d'Agriculture.du.Puy-de-Dôme. Les SAGE dans le Puy de Dôme. [http://www.chambre-agri63.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=100&Itemid=4](http://www.chambre-agri63.com/index.php?option=com_content&view=article&id=100&Itemid=4) Dernière consultation le 08-08-2012
- Chen, Y., Pant, A.C., and Simon, S.M. (2001). P-glycoprotein does not reduce substrate concentration from the extracellular leaflet of the plasma membrane in living cells. *Cancer Res* 61, 7763-7769.
- Convention.Genève (2009). A Big Step Forward towards a DDT-Free World. <http://chm.pops.int/Convention/Pressrelease/COP4Geneva6May2009/tabid/539/language/en-US/Default.aspx> Dernière consultation le 08-08-2012
- Cristaldi, M, Ieradi, L.A., Mascanzoni, D., and Mattei, T. (1991). Environmental impact of the Chernobyl accident: mutagenesis in bank voles from Sweden.
- Danø, K. (1973). Active outward transport of daunomycin in resistant ehrlich ascites tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 323, 466-483.
- DCE.2000/60/CE (2000). Directive Cadre sur l'Eau DCE 2000/60/CE.



- De Lafontaine, Y., Gagné, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P., and Chan, H.M. (2000). Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology* 50, 51-71.
- Dean, M., and Annilo, T. (2005). Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6, 123-142.
- Depledge, M.H. (1994). The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In *Nondestructive biomarkers in vertebrates*, M.C. Fossi, and C. Leonzio, eds. (Boca Raton: Lewis Publisher), pp. 261-285.
- Directive.2008/105/CE (2008). Directive Européenne 2008/105/CE.
- DIREN (2008a). Profil Environnemental Auvergne, Tome 1. Direction Régional de l'Environnement Auvergne Ministère de l'Ecologie, de l'Energie du Développement Durable et de l'Aménagement du Territoire.
- DIREN (2008b). Profil Environnemental Auvergne, Tome 2. Direction Régional de l'Environnement Auvergne Ministère de l'Ecologie, de l'Energie du Développement Durable et de l'Aménagement du Territoire.
- Doyle, L.A., and Ross, D.D. (2003). Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 22, 7340-7358.
- Doyle, L.A., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K., and Ross, D.D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 15665-15670.
- DREAL.Auvergne. PAGE GENERALE SUR LES RESEAUX QUALITE <http://www.eauenauvergne.fr/supquali.html> Dernière consultation le 08-08-2012
- Dudler, R., and Sidler, M. (1998). Arabidopsis MDR genes: molecular cloning and protein chemical aspects. *Methods Enzymol* 292, 162-173.
- Dutka, B.J. (1998). Foreword. In *Microscale testing in aquatic toxicology* P.G. Wells, K. Lee, and C. Blaise, eds., p. Boca Raton.
- Einicker-Lamas, M., Morales, M.M., Miranda, K., Garcia-Abreu, J., Oliveira, A.J.F., Silva, F.L.S., and Oliveira, M.M. (2003). P-glycoprotein-like protein contributes to cadmium resistance in *Euglena gracilis*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 173, 559-564.
- Eisenblätter, T., Hüwel, S., and Galla, H.-J. (2003). Characterisation of the brain multidrug resistance protein (BMDP/ABCG2/BCRP) expressed at the blood-brain barrier. *Brain Research* 971, 221-231.
- Eufemia, N.A., and Epel, D. (2000). Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein, in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stresses. *Aquatic Toxicology* 49, 89-100.
- Fischer, S., Loncar, J., Zaja, R., Schnell, S., Schirmer, K., Smital, T., and Luckenbach, T. (2011). Constitutive mRNA expression and protein activity levels of nine ABC efflux transporters in seven permanent cell lines derived from different tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 101, 438-446.



- Flammarion, P., Devaux, A., and Garric, J. (2000). Marqueurs biochimiques de pollution dans les écosystèmes aquatiques continentaux. Exemples d'utilisation et perspectives pour le gestionnaire. *Bulletin Français de la Pêche et Pisciculture* 357/358, 209-226.
- Geisler, M., Blakeslee, J.J., Bouchard, R., Lee, O.R., Vincenzetti, V., Bandyopadhyay, A., Titapiwatanakun, B., Peer, W.A., Bailly, A., Richards, E.L., *et al.* (2005). Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J* 44, 179-194.
- Gerlach, J.H., Endicott, J.A., Juranka, P.F., Henderson, G., Sarangi, F., Deuchars, K.L., and Ling, V. (1986). Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature* 324, 485-489.
- Gourlay, C. (2004). Biodisponibilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les écosystèmes aquatiques: influence de la matière organique naturelle et anthropique. Thèse de l'Ecole National du Génie Rural, des Eaux et Forêts.
- Havelková, M., Tomáš Randák, T., Jana Blahová, J., Iveta Slatinská, I., and Zdeňka Svobodová, Z. (2008). Biochemical markers for the assessment of aquatic environment contamination. *Interdiscip Toxicol* 1, 169-181.
- Hemmer, M.J., Courtney, L.A., and Ortego, L.S. (1995). Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in teleost tissues using mammalian polyclonal and monoclonal antibodies. *J Exp Zool*, 272, 69-77.
- Holland Toomey, B., and Epel, D. (1993). Multixenobiotic Resistance in *Urechis caupo* Embryos: Protection from Environmental Toxins. *Biological Bulletin* 185, 355-364.
- Holló, Z., Homolya, L., Hegedüs, T., and Sarkadi, B. (1996). Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells. *FEBS Letters* 383, 99-104.
- Hung, K.W.Y., Suen, M.F.K., Chen, Y.F., Cai, H.B., Mo, Z.X., and Yung, K.K.L. (2012). Detection of water toxicity using cytochrome P450 transgenic zebrafish as live biosensor: For polychlorinated biphenyls toxicity. *Biosensors and Bioelectronics* 31, 548-553.
- Hyde, S.C., Emsley, P., Hartshorn, M.J., Mimmack, M.M., Gileadi, U., Pearce, S.R., Gallagher, M.P., Gill, D.R., Hubbard, R.E., and Higgins, C.F. (1990). Structural model of ATP-binding proteing associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346, 362-365.
- INERIS (2006). Fiche Technique Benzoapyrene.
- Jochmans, D., Leyssen, P., and Neyts, J. (2012). A novel method for high-throughput screening to quantify antiviral activity against viruses that induce limited CPE. *Journal of Virological Methods* 183, 176-179.
- Jönsson, M.E., Gao, K., Olsson, J.A., Goldstone, J.V., and Brandt, I. (2010). Induction patterns of new CYP1 genes in environmentally exposed rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 98, 311-321.
- Juliano, R.L., and Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 455, 152-162.



- Kane, A., Salierno, J., and Brewer, S. (2005). Fish models in behavioral toxicology: Automated techniques, updates and perspectives. In *Methods in Aquatic toxicology*, G. Ostrander, ed. (Boca Raton, FL: Lewis Publishers ), pp. 559-590.
- Katata, G., Ota, M., Terada, H., Chino, M., and Nagai, H. (2012). Atmospheric discharge and dispersion of radionuclides during the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant accident. Part I: Source term estimation and local-scale atmospheric dispersion in early phase of the accident. *Journal of Environmental Radioactivity* *109*, 103-113.
- Keith, L.H., and Teillard, W.A. (1979). Priority pollutants. I-a: perspective view. *Environ Sci Technol* *13*, 416-423.
- Klimecki, W.T., Futscher, B.W., Grogan, T.M., and Dalton, W.S. (1994). P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. *Blood* *83*, 2451-2458.
- Krogstad, D.J., Gluzman, I.Y., Herwaldt, B.L., Schlesinger, P.H., and Wellems, T.E. (1992). Energy dependence of chloroquine accumulation and chloroquine efflux in *Plasmodium falciparum*. *Biochem Pharmacol* *43*, 57-62.
- Kurelec, B. (1992). The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Crit Rev Toxicol* *22*, 23-43.
- Kurelec, B., and Pivčević, B. (1989). Distinct glutathione-dependent enzyme activities and a verapamil-sensitive binding of xenobiotics in a fresh-water mussel *Anodonta cygnea*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *164*, 934-940.
- Lagadic, L., Caquet, T., and Amiard, J.C. (1997). Biomarqueurs en Ecotoxicologie: principes et définitions. *Des biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux*.
- LEMA (2006). Loi sur l'eau et les milieux aquatiques n° 2006-1772 du 30 décembre 2006.
- Leslie, E.M., Deeley, R.G., and Cole, S.P.C. (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology* *204*, 216-237.
- Litman, T., Druley, T.E., Stein, W.D., and Bates, S.E. (2001). From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cellular and Molecular Life Sciences* *58*, 931-959.
- Loncar, J., Popovic, M., Zaja, R., and Smital, T. (2010). Gene expression analysis of the ABC efflux transporters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative biochemistry and physiology Toxicology & pharmacology : CBP* *151*, 209-215.
- Maliepaard, M., Scheffer, G.L., Faneyte, I.F., van Gastelen, M.A., Pijnenborg, A.C.L.M., Schinkel, A.H., van de Vijver, M.J., Scheper, R.J., and Schellens, J.H.M. (2001). Subcellular Localization and Distribution of the Breast Cancer Resistance Protein Transporter in Normal Human Tissues. *Cancer Research* *61*, 3458-3464.
- Margoshes, M., and Vallee, B.L. (1957). A CADMIUM PROTEIN FROM EQUINE KIDNEY CORTEX. *Journal of the American Chemical Society* *79*, 4813-4814.
- McElroy, A.E., Farrington, J.W., and Teal, J.M. (1989). Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the



- aquatic environment. In *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, U. Varanasi, ed. (Florida: CRC Press, Boca Raton, ), p. 139.
- Mellado, W and Horwitz, S.B. (1987). Phosphorylation of the multidrug resistance associated glycoprotein. *Biochemistry*, 26, 6900-6904.
- Menzie, C.A., Potocki, B.B., and Santodonato, J. (1992). Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environmental Science & Technology* 26, 1278-1284.
- Minier, C., and Moore, M.N. (1996). Rhodamine B accumulation and MXR protein expression in mussel blood cells: effects of exposure to vincristine. *MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES* 142, 165-173.
- Minier, C., Moore, M.N., Galgani, F., and Claisse, D. (2006). Multixenobiotic resistance protein expression in *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* and *Crassostrea gigas* from the French coasts. *MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES* 322, 143-154.
- Ministère.des.Pêches.et.des.Océans.du.Canada (2004). Prélèvements sanguins sur des poissons à nageoires. Rapport
- Moutou, F., and Joseph-Enriquez, B. (1991). [Wild animals, sentinels of the pollution of the natural environment?]. *Rev Sci, Tech*
- Narbonne, J.F. (1998). Historique-Fondements biologiques de l'utilisation de biomarqueurs en écotoxicologie. In *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*, L. Lagadic, T. Caquet, J.C. Amiard, and F. Ramade, eds. (Paris), pp. 1-7.
- Natarajan, K., Xie, Y., Baer, M.R., and Ross, D.D. (2012). Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochemical Pharmacology* 83, 1084-1103.
- Neff, J. (1979). *Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. Sources, fates and biological affects* (England: Applied Science publishers Ltd. Ripples road, Barking, Essex).
- Oberdorff, T., Pont, D., Hugueny, B., and Chessel, D. (2001). A probabilistic model characterizing fish assemblages of French rivers: a framework for environmental assessment. *Freshwater Biology* 46, 399-415.
- Oberdorff, T., Pont, D., Hugueny, B., and Porcher, J.-P. (2002). Development and validation of a fish-based index for the assessment of 'river health' in France. *Freshwater Biology* 47, 1720-1734.
- OMS (2006). WHO gives indoor use of DDT a clean bill of health for controlling malaria. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2006/pr50/en/index.html> Dernière consultation le 08-08-2012
- ONEMA (2006). L'indice Poisson Rivière.
- Pain, S., and Parant, M. (2003). Multixenobiotic defense mechanism (MDMX) in bivalves. *Compte Rendu Biologie* 326, 659-672.
- Pampanin, D.M., Viarengo, A., Garrigues, P., and Andersen, O.K. (2006). Background for the BEEP Stavanger workshops: Biological effects on marine organisms in two common, large, laboratory experiments and in a field study: Comparison of the value (sensitivity, specificity, etc.) of core and new biomarkers. *Aquatic Toxicology* 78, *Supplement*, S1-S4.



- Payne, J.F., Mathieu, A., Melvin, W., and Fancey, L.L. (1996). Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin* 32, 225-231.
- Phuc, P., Nhung, T., Loan, D., Chung, D., and Ngoc, P. (2011). Differentiating of banked human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into insulin-secreting cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 47, 54-63.
- Phyt'Eauvergne (2011). Qualité des Eaux en Auvergne - Synthèse des résultats du réseau de surveillance régional de la qualité des eaux vis-à-vis des pesticides. Rapport
- Quadros, M., and Marr, L. (2010). Environmental and human health risks of aerosolized silver nanoparticles. *Journal of the Air and Waste management Association* 60, 770-781.
- Raaijmakers, M.H. (2007). ATP-binding-cassette transporters in hematopoietic stem cells and their utility as therapeutical targets in acute and chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 21, 2094-2102.
- Ramade, F. (2007). Causes et importance de la pollution dans l'écosphère. In *Introduction à l'écotoxicologie Fondements et applications*, pp. 13-37.
- REACH (2006). Règlement N°1907/2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH).
- Ribera, D., and Saint-Denis, M. (1999). Le ver *Eisenia fetida*: intérêts et perspectives en écotoxicologie terrestre. *Bull Soc Zoo* 124, 411-420.
- Richard, A. (1999). Gestion piscicole - Interventions sur les populations de poissons, repeuplement des cours d'eau salmonicoles, Mise au point edn.
- Robey, R., Polgar, O., Deeken, J., To, K., and Bates, S. (2007). ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer and Metastasis Reviews* 26, 39-57.
- Roesijadi, G. (1994). Metallothionein induction as a measure of response to metal exposure in aquatic animals. *Environ Health Perspect* 102, 91-95.
- Sarkadi, B., Homolya, L., Szakacs, G., and Varadi, A. (2006). Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol Rev* 86, 1179-1236.
- Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, A., and Sarker, S. (2006). Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology* 15, 333-340.
- Shapiro, A.B., and Ling, V. (1997). Extraction of Hoechst 33342 from the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane by P-glycoprotein. *Eur J Biochem* 250, 122-129.
- Shuilleabhain, S.N., Davoren, M., Mothersill, C., Sheehan, D., Hartl, M.G., Kilemade, M., O'Brien N, M., O'Halloran, J., Van Pelt, F.N., and Lyng, F.M. (2005). Identification of a multixenobiotic resistance mechanism in primary cultured epidermal cells from *Oncorhynchus mykiss* and the effects of environmental complex mixtures on its activity. *Aquat Toxicol* 73, 115-127.
- Smital, T., Luckenbach, T., Sauerborn, R., Hamdoun, A.M., Vega, R.L., and Epel, D. (2004). Emerging contaminants--pesticides, PPCPs, microbial degradation products and natural



- substances as inhibitors of multixenobiotic defense in aquatic organisms. *Mutat Res* 552, 101-117.
- Smital, T., Sauerborn, R., and Hackenberger, B.K. (2003). Inducibility of the P-glycoprotein transport activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* and the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology* 65, 443-465.
- Stegeman, J.J., Brouwer, M., Di Giulio, R.T., Förlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., and Van Veld, P.A. (1992). Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure effect. In *Biomarkers Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*, R.J. Huggett, R.A. Kimerle, P.M.J. Mehrle, and H.L. Bergman, eds. (Lewis), pp. 253-336.
- Stieger, B., and Meier, P.J. (1998). Bile acid and xenobiotic transporters in liver. *Current Opinion in Cell Biology* 10, 462-467.
- Sturm, A., Ziemann, C., Hirsch-Ernst, K.I., and Segner, H. (2001). Expression and functional activity of P-glycoprotein in cultured hepatocytes from *Oncorhynchus mykiss*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281, R1119-1126.
- Vache, C., Camares, O., Cardoso-Ferreira, M.C., Dastugue, B., Creveaux, I., Vaury, C., and Bamdad, M. (2007). A potential genomic biomarker for the detection of polycyclic aromatic hydrocarbon pollutants: multidrug resistance gene 49 in *Drosophila melanogaster*. *Environ Toxicol Chem* 26, 1418-1424.
- Vache, C., Camares, O., De Graeve, F., Dastugue, B., Meiniel, A., Vaury, C., Pellier, S., Leoz-Garziandia, E., and Bamdad, M. (2006). *Drosophila melanogaster* p-glycoprotein: a membrane detoxification system toward polycyclic aromatic hydrocarbon pollutants. *Environ Toxicol Chem* 25, 572-580.
- Valdehita, A., Fernandez-Cruz, M.L., Torrent, F., Sericano, J.L., and Navas, J.M. (2012). Differences in the induction of cyp1A and related genes in cultured rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Additional considerations for the use of EROD activity as a biomarker. *J Fish Biol* 81, 270-287.
- Van Den Elsen, J.M., Kuntz, D.A., Hoedemaeker, F.J., and Rose, D.R. (1999). Antibody C219 recognizes an alpha-helical epitope on P-glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 13679-13684.
- Van Der Oost, R., Beyer, J., and Vermeulen, N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149.
- Van Montfoort, J.E., Hagenbuch, B., Groothuis, G.M.M., Koepsell, H., Meier, P.J., and Meijer, D.K. (2003). Drug uptake systems in liver and kidney. *Curr Drug, Metab* 27, 185-211.
- Vasak, M. (2005). Advances in metallothionein structure and functions. *J. Trace Elem Med Biol*
- Velamakanni, S., Wei, S.L., Janvilisri, T., and van Veen, H.W. (2007). ABCG transporters: structure, substrate specificities and physiological roles : a brief overview. *J Bioenerg Biomembr* 39, 465-471.



- Verneaux, J. (1973). Cours d'eau de Franche-Comté (Massif du Jura), Recherches écologiques sur le réseau hydrographique du Doubs, Essai de biotypologie. Thèse de l'Université de Besançon.
- Vindimian, E., Namour, P., Migeon, B., and Garric, J. (1991). *In situ* pollution induced cytochrome P450 activity of freshwater fish : barbel (*Barbus barbus*), chub (*Leuciscus cephalus*) and nase (*Chondrostoma nasus*). *Aquatic Toxicology* 21, 255-266.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1, 945-951.
- Wikipédia.en.français. Engrais.  
[http://fr.wikipedia.org/wiki/Engrais#Consommation\\_mondiale](http://fr.wikipedia.org/wiki/Engrais#Consommation_mondiale) Dernière consultation le 08-08-2012
- Wise Sr, J.P., Goodale, B.C., Wise, S.S., Craig, G.A., Pongan, A.F., Walter, R.B., Thompson, W.D., Ng, A.-K., Aboueissa, A.-M., Mitani, H., *et al.* (2010). Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. *Aquatic Toxicology* 97, 34-41.
- World.Nuclear.Association. World Nuclear Power Reactors & Uranium Requirements.  
<http://www.world-nuclear.org/info/reactors.html> Dernière consultation le 08-08-2012
- Zaja, R., Caminada, D., Loncar, J., Fent, K., and Smital, T. (2008a). Development and characterization of P-glycoprotein 1 (Pgp1, ABCB1)-mediated doxorubicin-resistant PLHC-1 hepatoma fish cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology* 227, 207-218.
- Zaja, R., Klobucar, R.S., and Smital, T. (2007). Detection and functional characterization of Pgp1 (ABCB1) and MRP3 (ABCC3) efflux transporters in the PLHC-1 fish hepatoma cell line. *Aquatic Toxicology* 81, 365-376.
- Zaja, R., Munic, V., and Smital, T. (2008b). Cloning and mRNA expression analysis of an ABCG2 (BCRP) efflux transporter in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and primary hepatocytes. *Marine Environmental Research* 66, 77-79.



## **Développement de biomarqueur Sentinelle en réponse à la pollution aquatique à partir de l'expression de protéines de phénotype**

### **« Multidrug Resistance » dans les érythrocytes de la truite *Salmo trutta fario***

La pollution croissante des milieux aquatiques nécessite la mise au point de nouvelles technologies permettant d'optimiser la surveillance de la qualité de l'eau. Dans ce contexte, nous avons développé un biomarqueur de susceptibilité du degré de la pollution globale des milieux aquatiques intitulé « Sentinelle ». Le principe du biomarqueur Sentinelle est basé sur le niveau de coexpression de deux protéines « Multidrug Resistance » (MDR), la protéine ABCG2-like et la P-gp, dans les érythrocytes de la truite *Salmo trutta fario*. Le biomarqueur sentinelle a été validé en conditions *in vitro* grâce au développement des cultures primaires d'érythrocytes de truite. Après l'exposition des globules rouges de truites à des concentrations croissantes d'un polluant modèle, le Benzo-a-pyrène, l'expression de la protéine ABCG2-like et de la P-gp augmente d'une manière dose dépendante. Le biomarqueur Sentinelle a ensuite été validé en milieu naturel sur des truites fario en provenance de différents cours d'eau d'Auvergne. En milieu naturel, les deux protéines MDR sont exprimées différemment dans les érythrocytes de truites fario selon le degré de contamination du cours d'eau. En effet, dans une rivière où la pollution est faible voire nulle, seule la protéine ABCG2-like est exprimée, alors que dans une rivière présentant une contamination plus importante, la P-gp et l'ABCG2-like sont toutes les deux coexprimées par une réponse de type relais. Les expériences menées en conditions *in vitro* et en milieu naturel, laissent supposer que la protéine ABCG2-like assure une fonction de garde alors que la P-gp assurerait une fonction de protection défensive. En conséquence, selon le niveau d'expression de la protéine de garde et de la protéine de défense, le degré de contamination de la rivière pourrait être évalué. L'intérêt de l'utilisation du biomarqueur Sentinelle a aussi été validé sur des Salmonidés en provenance de pisciculture. Ce nouvel outil biologique apporte des informations plus intégratives et plus précoces sur la qualité des milieux aquatiques, informations essentielles pour une meilleure gestion des ressources en eau.

**Mots clés :** protéines « Multidrug Resistance »; *Salmonidae* ; *Salmo trutta fario* ; Erythrocytes ; pollution aquatique ; Biomarqueur sentinelle

### **Sentinel biomarker development from the Multidrug Resistance proteins expression in *Salmo trutta fario* erythrocytes in response to aquatic pollution**

Increasing aquatic pollution requires the development of new technologies for to optimize the monitoring of water quality. In this context, we have developed a "biomarker of susceptibility" designating the degree of global pollution in aquatic medium, entitled "Sentinel". The Sentinel biomarker is based on the co-expression level of two major "Multidrug resistance" (MDR) proteins, such as ABCG2-like protein and P-gp, in erythrocytes of brown trout's in response to aquatic pollution. After developing a primary erythrocyte culture, the Sentinel biomarker was validated in a controlled medium. Trout erythrocytes exposure to increasing concentrations of Benzo-a-pyrene, a model pollutant, induced an increase expression of ABCG2-like protein and P-gp by a dose-dependent response. The Sentinel biomarker was then developed in a natural environment, using the erythrocytes of brown trout collected from the various rivers located in the Auvergne region of France. In the natural environment, both MDR proteins are differentially expressed in the erythrocytes of brown trout depending on the degree of contamination of rivers. Indeed, wild brown trout erythrocytes in an uncontaminated river, expressed only the ABCG2-like protein, whereas, in a river presenting a higher contamination, P-gp and ABCG2-like were both coexpressed with a relay response. Experiments *in vitro* conditions and natural environment, suggest that ABCG2-like protein acts as a vanguard protective protein, in complement to P-gp which acts as a "defensive" protective protein. Consequently, according to the expression level of the vanguard and defense proteins, the degree of contamination of the river could be evaluated. The use advantage of the Sentinel biomarker has also been validated on *Salmonidae* erythrocytes form farmed fish. This new tool provides biological information more early and integrative on the quality of aquatic environments. These informations are essential for better management of water resources

**Key words:** Multidrug Resistance proteins; *Salmonidae* ; *Salmo trutta fario* ; Erythrocytes ; aquatic pollution ; Sentinel Biomarker