

Mise en place des biomarqueurs d'effets sur le métabolisme digestif et sur le cycle reproducteur de la dreissène.

Frédéric Palais, Sandrine Pain-Devin, Guillaume Jubeaux, Odile Dedourge-Geffard, Alain Geffard*

Université de Reims Champagne Ardenne, Unité de Recherche Vignes et Vins de Champagne EA 2069, Laboratoire d'Eco-toxicologie – alain.geffard@univ-reims.fr

1. Introduction

Les biomarqueurs utilisés classiquement sont, dans la plupart des cas, des réponses de fonctions biologiques directement impliquées dans la gestion par l'organisme de la contamination et de ses effets. Ces biomarqueurs sont généralement de bons indicateurs de l'exposition des organismes à la contamination et sont considérés comme des réponses relativement précoces. Cependant, la difficulté qui subsiste à l'heure actuelle est la compréhension des conséquences possibles de la réponse de ces biomarqueurs pour le maintien des organismes vivants eux-mêmes ainsi que pour le maintien de leurs populations. Dans ce contexte, l'objectif de cette tâche est d'étudier des caractères biologiques différents, qui vont refléter une réponse plus globale de l'organisme et qui sont supposés mieux rendre compte des effets de la contamination sur les organismes et potentiellement, sur les populations (Amiard et Amiard-Triquet, 2008).

Les réponses biologiques en question sont recherchées au niveau de la physiologie des grandes fonctions des organismes et nous avons focalisé notre intérêt sur la fonction digestive, directement associée au métabolisme énergétique, et sur la fonction de reproduction.

Le métabolisme digestif constitue un processus clé dans le sens où il conditionne l'approvisionnement de l'organisme en énergie, énergie qui est consommée pour le maintien de l'organisme, sa croissance et sa reproduction. En ce sens, une perturbation du métabolisme digestif affectera directement l'assimilation des nutriments et donc indirectement la quantité et/ou la qualité de l'énergie indispensable à la réalisation des autres grandes fonctions biologiques (Dedourge et al., 2008). Les travaux présentés ici se focalisent sur l'activité de certaines enzymes digestives impliquées dans les processus de digestion chez la dreissène. Différentes études ont mis en évidence une inhibition des activités d'enzymes digestives lors d'expositions d'organismes aquatiques à des contaminants organiques (De Coen et Janssen, 1998 ; Golovanova et al, 1999 ; Simon et al, 1999) ou métalliques (Yan et al, 1996 ; Kuz'mina et al, 2002). Avant d'étudier l'effet de contaminations sur la réponse de ces enzymes, nos travaux sont actuellement focalisés sur leur caractérisation et sur la mise au point des protocoles de dosages des activités enzymatiques à partir de deux structures anatomiques impliquées dans la digestion chez la dreissène.

La reproduction constitue également un processus primordial parce qu'il conditionne la production de nouveaux individus qui participeront au maintien des populations. Les effets de la contamination peuvent être perçus au niveau de l'intégrité des gonades et au niveau de leur fonctionnement et en conséquence, au niveau du cycle reproducteur dans son ensemble. Dans les deux cas, les perturbations sont observables au niveau de chaque individu et peuvent être révélatrices d'atteintes futures au niveau populationnel ; en effet des altérations de la fonction de reproduction mettent directement en cause le maintien et le renouvellement des populations naturelles (Binelli et al., 2004 ; Mantecca et al., 2006).

La mise au point des protocoles de dosages des enzymes digestives et l'apprentissage des techniques histologiques associées à l'étude du cycle reproducteur de la dreissène constituent le cœur de cette tâche et sont partie intégrante de la première année de doctorat de M. Frédéric Palais (début en novembre 2007). Dans ce rapport, seuls les travaux concernant le métabolisme digestif seront présentés, dans la mesure où les travaux d'étude de la gonade n'ont pas encore débuté (programmés au printemps 2008).

2. Anatomie et physiologie digestive de la dreissène : choix des organes d'étude

Une étude bibliographique a été menée afin d'affiner la connaissance et la compréhension des processus de digestion chez les bivalves en général et chez la dreissène en particulier (Morton, 1969a et 1969b).

Chez ces organismes la digestion fait intervenir deux processus :

- un processus de trituration associé à des phénomènes de digestion extracellulaire, réalisé au niveau de l'estomac et du sac du stylet cristallin, le stylet cristallin étant une sorte de tige qui assure la trituration par rotation et friction contre le bouclier gastrique (Figure 1). Sur le plan enzymatique, ce processus fait essentiellement intervenir des carbohydrases.
- un processus de digestion intracellulaire et d'absorption qui se déroule au niveau des diverticules de la glande digestive (Figure 1). Sur le plan enzymatique, ce processus fait intervenir principalement des lipases et protéases.

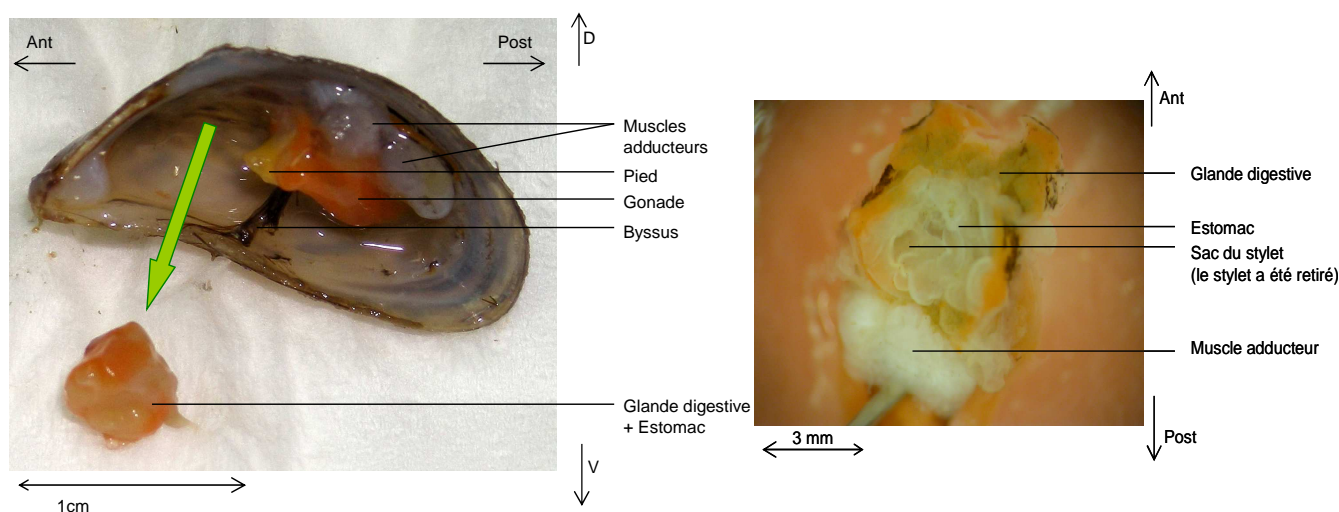


Figure 1 : Organisation interne de la dreissène après dissection, valve droite, après élimination du manteau et des branchies et extraction de la glande digestive (à gauche) et vue dorsale du système digestif après dissection (à droite).

Au regard des informations collectées, ainsi qu'à la suite de différents essais de dissection des différents organes impliqués dans la digestion, le choix s'est orienté vers l'étude de la glande digestive et du stylet cristallin. Outre sa position clé dans les processus de digestion, la glande digestive présente la particularité d'accumuler les contaminants et est le siège de nombreux processus de détoxification de ces contaminants. Elle représente par conséquent un organe cible à étudier. Le stylet cristallin, moins couramment étudié que la glande digestive en écotoxicologie, est toutefois apparu très intéressant. Sur le plan pratique, le stylet est une structure rigide aisément identifiable à l'œil nu et par conséquent, est une structure facile à prélever sur les organismes. De par sa fonction de digestion des glucides complexes, il présente en outre une position clé dans le métabolisme digestif. Enfin, il présente un cycle de fonctionnement alternant des phases de dissolution de sa structure permettant la sécrétion d'enzymes en période de repos de l'animal, et des phases de reconstruction. Ainsi, outre son intérêt par rapport au mécanisme de digestion, son état peut également donner des indications sur l'état physiologique de l'organisme. Enfin, il présente une spécificité enzymatique différente de la glande digestive et la mutualisation des résultats provenant des deux organes permettra de mieux cerner la réponse globale du métabolisme digestif.

3. Caractérisation enzymatique et protocoles de dosages

L'étude enzymatique s'est focalisée dans un premier temps sur les carbohydrases agissant principalement au niveau du stylet cristallin. Ces enzymes jouent un rôle prépondérant dans la digestion des particules détritiques filtrées par la dreissène et concernent notamment la digestion d'amidon (amylase) et de cellulose (cellulase). La mise au point des protocoles de dosage de ces enzymes est actuellement en cours de réalisation (Doctorat de Mr Frédéric Palais, Université de Reims et M2R de Mr Guillaume Jubeaux, M2R Ecotoxicologie et Biodiversité, Université Paul Verlaine, Metz). Les méthodes de Bernfeld (1955), ainsi que de Nelson (1944) et Somogyi (1952) sont testées. Ces méthodes sont basées sur le dosage colorimétrique des sucres réducteurs générés par l'activité des carbohydrases en présence d'amidon (amylase) ou de carboxyméthyl-cellulose (cellulase). Les essais actuellement en cours de réalisation afin de caractériser ces activités ont permis de déterminer les valeurs de pH et de température optimales dans le cas de l'amylase. Ainsi, le pH optimum se situe à 6,6 pour le dosage de l'amylase dans la glande digestive comme dans le stylet cristallin (Figure 2). En revanche, la température optimale diffère pour les deux organes, avec une valeur de 31°C pour la glande digestive et une valeur de 22°C pour le stylet (Figure 3). Les travaux se poursuivent pour préciser également la durée d'incubation ainsi que la concentration en substrat optimales et les mêmes tests seront effectués pour la cellulase.

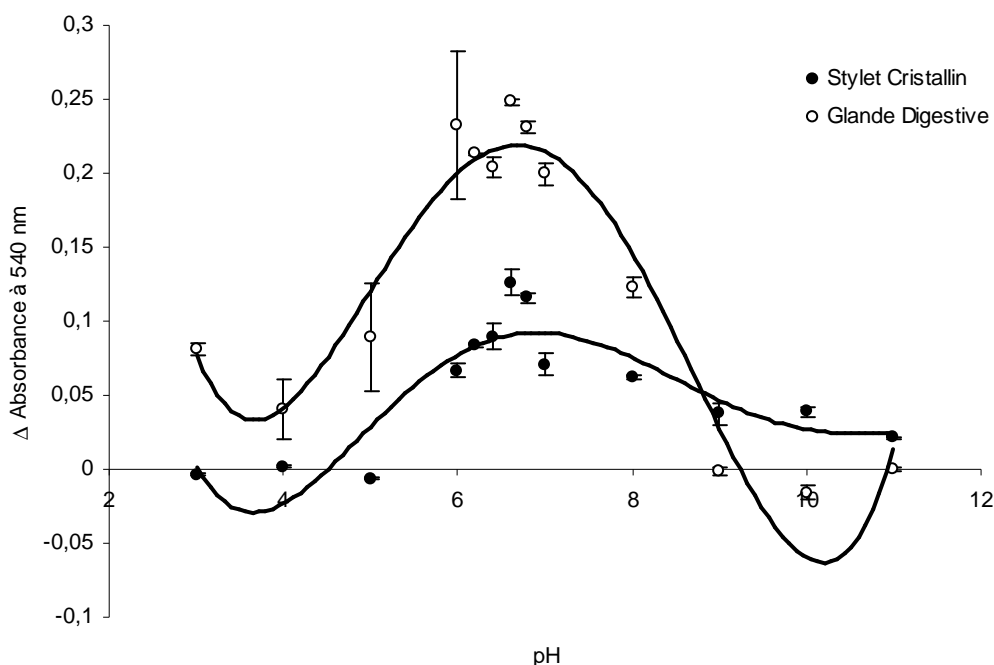


Figure 2 : Evolution de Δ Absorbance à 540 nm (blanc retranché) en fonction du pH lors du dosage de l'amylase.

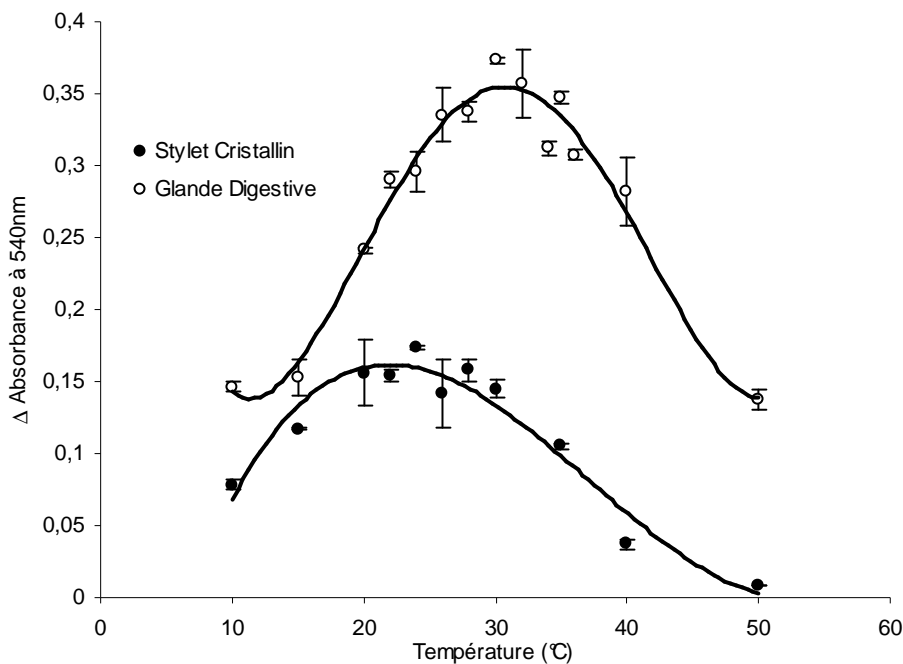


Figure 3 : Evolution de Δ Absorbance à 540 nm (blanc retranché) en fonction de la température lors du dosage de l'amylase.

4. Perspectives

La tâche 2b est orientée vers le développement des enzymes digestives en tant que marqueurs d'effets sur le métabolisme digestif et l'application de techniques histologiques afin d'étudier le cycle reproducteur de la dreissène. L'évolution de cette tâche en 2008 consistera, dans un premier temps, à poursuivre les efforts engagés dans la mise au point des méthodes de dosages des activités enzymatiques (amylase et cellulase). Il est ensuite envisagé d'étudier la réponse de ces activités enzymatiques lors d'exposition de dreissènes, d'une part en conditions contrôlées en parallèle à l'étude des cinétiques de bioaccumulation prévues dans la tâche 2a (Cemagref, Antony), et d'autre part en situation de terrain en exploitant le matériel biologique qui a été conservé dans ce but à l'issue de l'expérimentation dans le bassin de l'Orge (tâche 2c). La mesure des activités enzymatiques sera également réalisée lors des futures campagnes de terrain prévues en 2c et l'ensemble des résultats permettra de valider l'intérêt de cette approche. Enfin, l'apprentissage des techniques d'histologie sera envisagé en début d'année afin d'être opérationnel pour utiliser ces techniques lors des campagnes de terrain (tâche 2c).

5. Bibliographie

- Amiard J.C. et Amiard-Triquet C. (2008). Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp 375.
- Bernfeld P. (1955). Alpha- and beta-amylases. Colowick S.P. et Kaplan N. Eds. *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, 149-158.
- Binelli A., Bacchetta R., Mantecca P., Ricciardi F., Provini A. et Vailati G. (2004). DDT in zebra mussels from Lake Maggiore (N. Italy): level of contamination and endocrine disruptions, *Aquatic Toxicology*, **69**:175-188.
- De Coen WM. et Janssen CR. (1998). The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing, I. The digestive physiology of daphnids exposed to toxic stress. *Hydrobiologia*, **367**:199-209.

- Dedourge O., Geffard A. et Amiard C. (2008). Origine des perturbations du métabolisme énergétique. Amiard J.C. et Amiard-Triquet C Coord. *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques*. Lavoisier Tec & Doc, Paris, 241-271.
- Golovanova IL., Kuz'mina VV., Gobzhel'ian TE., Pavlov DF. et Chuika GM. (1999). *In vitro* effects of cadmium and DDVP (dichlorvos) on intestinal carbohydrase and protease activities in freshwater teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, **122**:21-25.
- Kuz'mina VV., Golovanova IL. et Kovalenko E. (2002) Separate and combined effects of cadmium, temperature, and pH on digestive enzymes in three freshwater teleosts, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **69**:302-308.
- Mantecca P., Vailati G. et Bacchetta R. (2006). Histological changes and Micronucleus induction in the Zebra mussel *Dreissena polymorpha* after Paraquat exposure, *Histology and Histopathology*, **21**:829-840.
- Morton B. (1969a). Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* Pall. I. General anatomy and morphology. *Proceedings of the Malacological society of London*, 38:301-321.
- Morton B. (1969b). Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* Pall. II. Correlations of the rhythms of adductor activity, feeding, digestion and excretion. *Proceedings of the Malacological society of London*, 38:401-414.
- Nelson N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose, *Journal of Biological Chemistry*, **153**:375-380.
- Simon LM., László K., Kotormán M., Vértesi A., Bagi K. et Nemcsók J. (1999). Effects of synthetic pyrethroids and methidation on activities of some digestive enzymes in carp (*Cyprinus carpio* L.), *Journal of Environmental Science and Health*, **34B**:819-828.
- Somogyi M. (1952). Notes on sugar determination, *Journal of Biological Chemistry*, **195**:19-23.
- Yan T., Teo LH. et Sin YM. (1996). Effects of metals on α -amylase activity in the digestive gland of the green mussel, *Perna viridis* L, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **56**:677-682.