



Suivi de biomarqueurs sur la faune aquatique pour appréhender les effets d'une contamination chimique multiple, exemple en estuaire de Seine

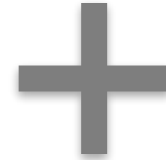


Benoit XUEREB



Place des biomarqueurs en surveillance environnementale

Estuaire de Seine = multi-contamination



Déploiement d'outils analytiques
Evaluation de la qualité des masses d'eaux
(DCE, DCSMM)

Place des biomarqueurs en surveillance environnementale

Estuaire de Seine = multi-contamination



Déploiement d'outils analytiques
Evaluation de la qualité des masses d'eaux
(DCE, DCSMM)



Statut Chimique



Listes



NQE



Niveaux



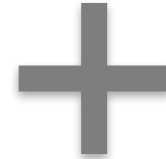
Statut Ecologique



Indices biocénotiques

Place des biomarqueurs en surveillance environnementale

Estuaire de Seine = multi-contamination



Déploiement d'outils analytiques
Evaluation de la qualité des masses d'eaux
(DCE, DCSMM)



Statut Chimique



Listes



NQE



Niveaux



Statut
Ecotoxicologique

*Bioaccumulation,
Biomarqueurs,
Bioessais*



Statut Ecologique



Indices biocénotiques

- **Complément essentiel**
- **Déploiement confronté à des verrous scientifiques**

Limites au déploiement

Définition de Référentiel(s)

- Quel est le niveau de base ?
- Quel est le seuil de significativité ? (ou comment intégrer les facteurs de confusion ?)
- Quel est le seuil d'effet ? (ou comment interpréter le niveau de gravité ?)

Valeur du biomarqueur

Approche par comparaison ponctuelle

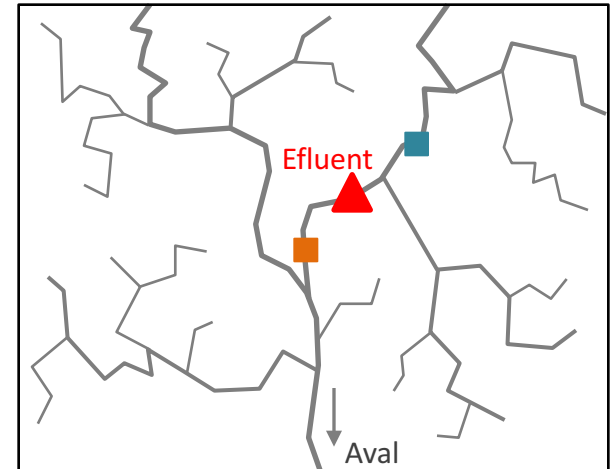


Référentiel



Station impactée

Représentation d'une portion de bassin versant



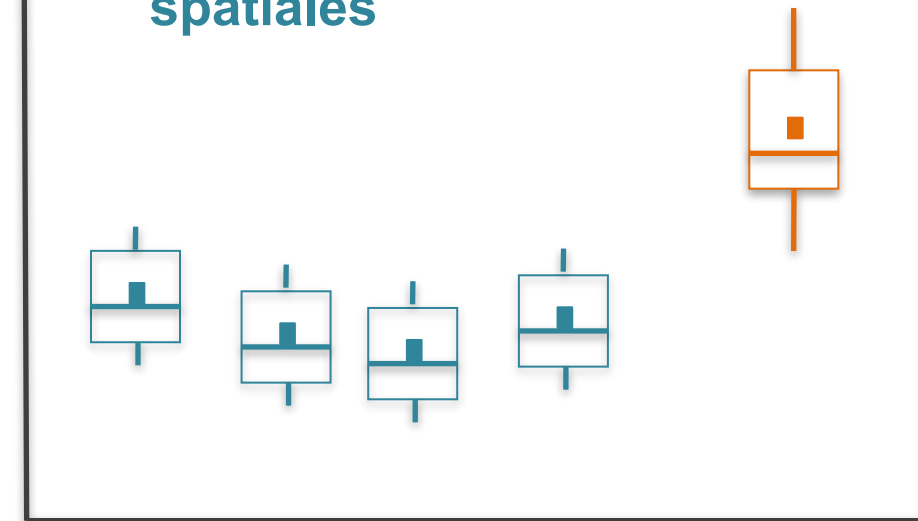
Limites au déploiement

Définition de Référentiel(s)

- Quel est le niveau de base ?
- Quel est le seuil de significativité ? (ou comment intégrer les facteurs de confusion ?)
- Quel est le seuil d'effet ? (ou comment interpréter le niveau de gravité ?)

Valeur du biomarqueur

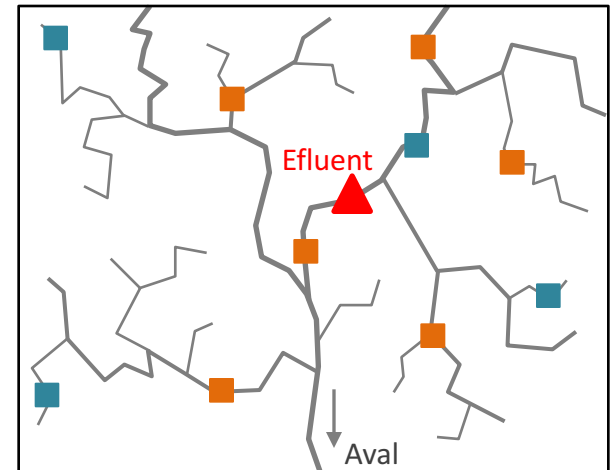
Construction d'une banque de données chronologiques et/ou spatiales



Référentiel

Station
impactée

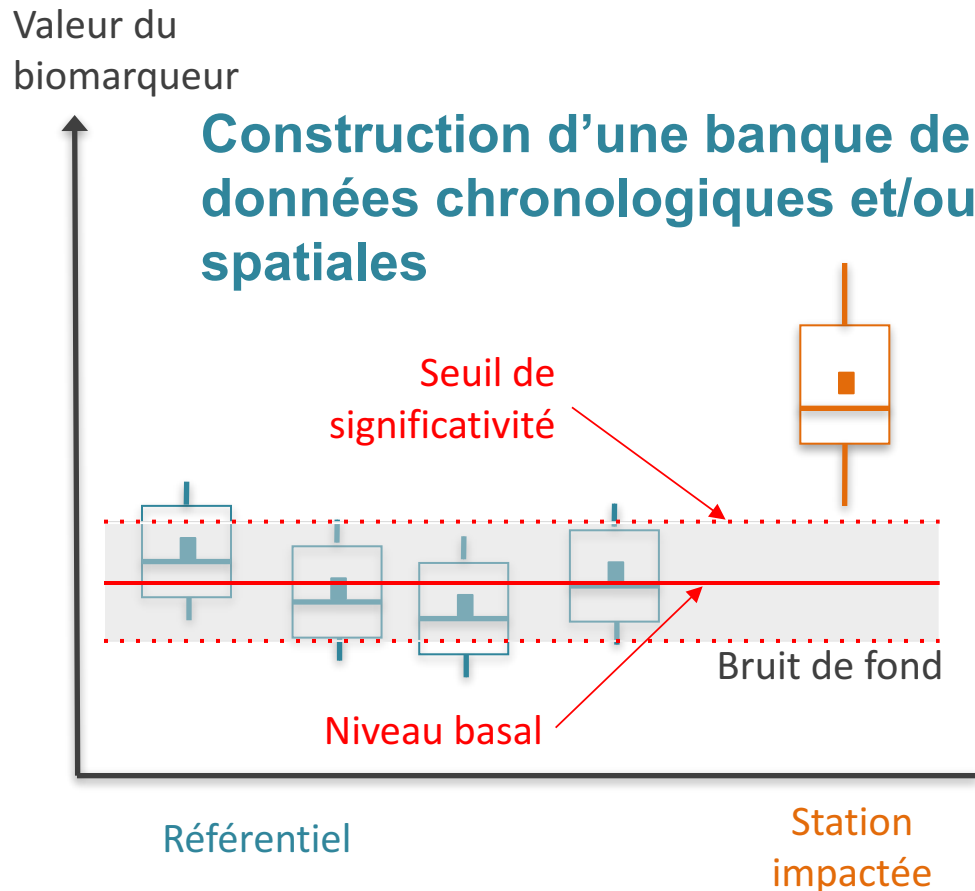
Représentation d'une portion de bassin versant



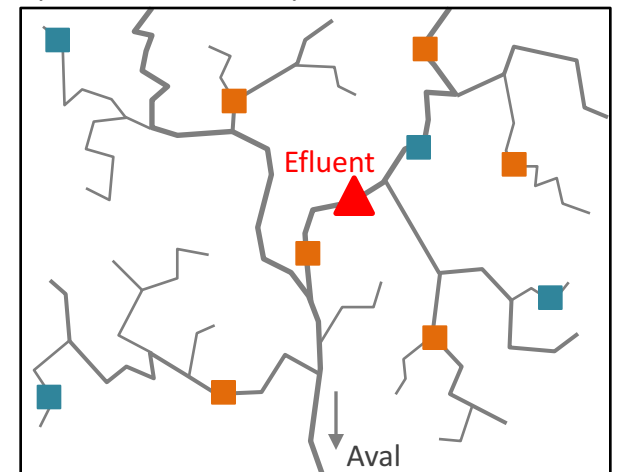
Limites au déploiement

Définition de Référentiel(s)

- Quel est le niveau de base ?
- Quel est le seuil de significativité ? (ou comment intégrer les facteurs de confusion ?)
- Quel est le seuil d'effet ? (ou comment interpréter le niveau de gravité ?)



Représentation d'une portion de bassin versant



Si pas de variabilité **OK**
Interprétable en approche large échelle

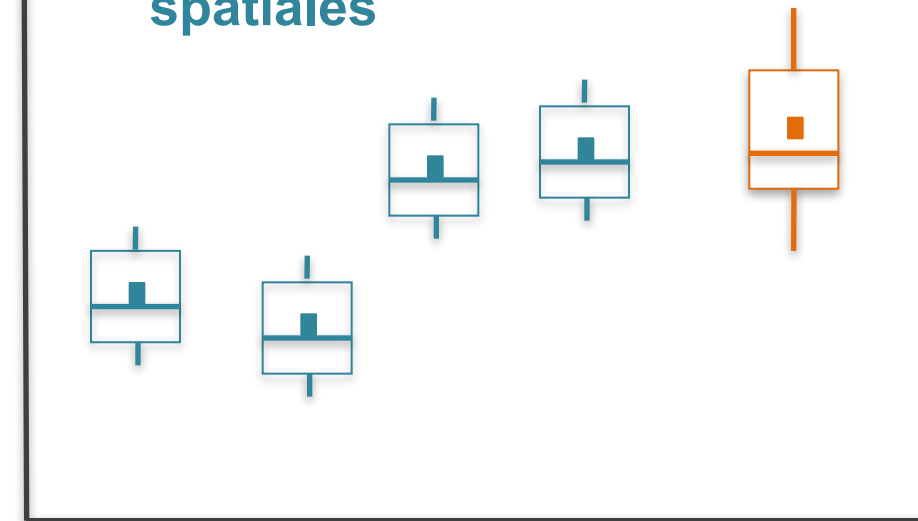
Limites au déploiement

Définition de Référentiel(s)

- Quel est le niveau de base ?
- Quel est le seuil de significativité ? (ou comment intégrer les facteurs de confusion ?)
- Quel est le seuil d'effet ? (ou comment interpréter le niveau de gravité ?)

Valeur du biomarqueur

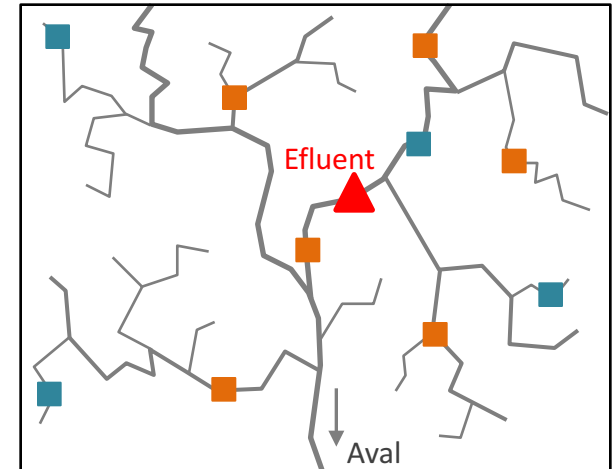
Construction d'une banque de données chronologiques et/ou spatiales



Référentiel

Station
impactée

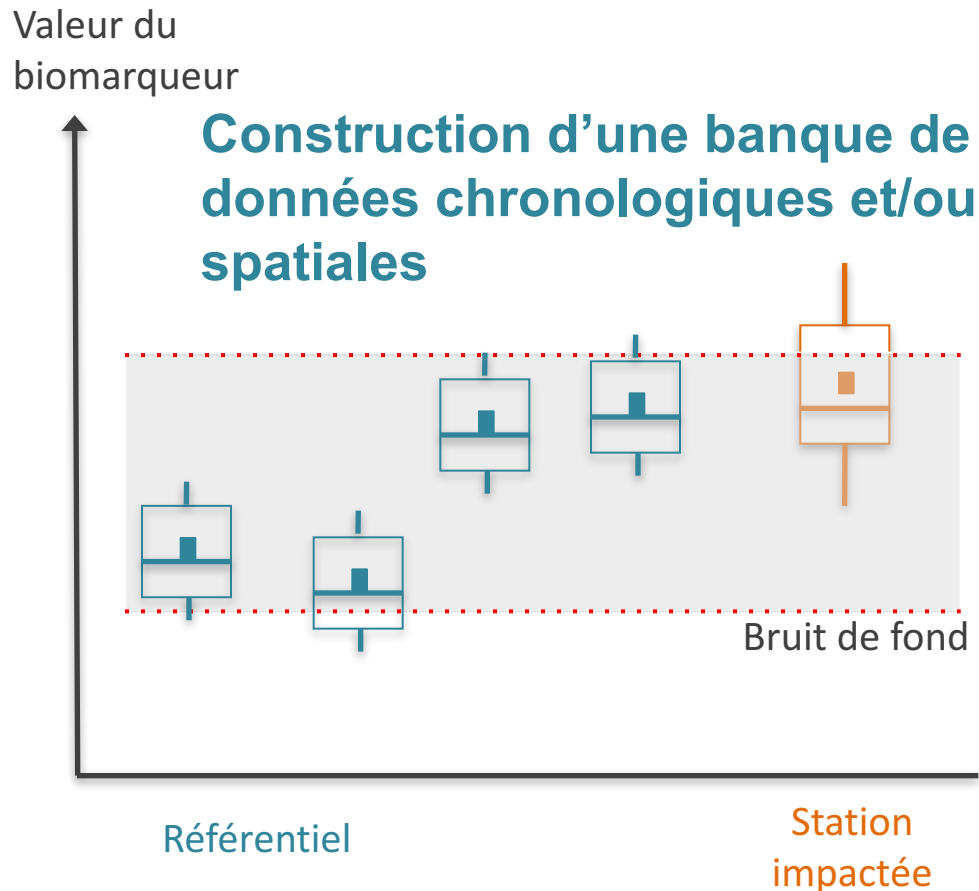
Représentation d'une portion de bassin versant



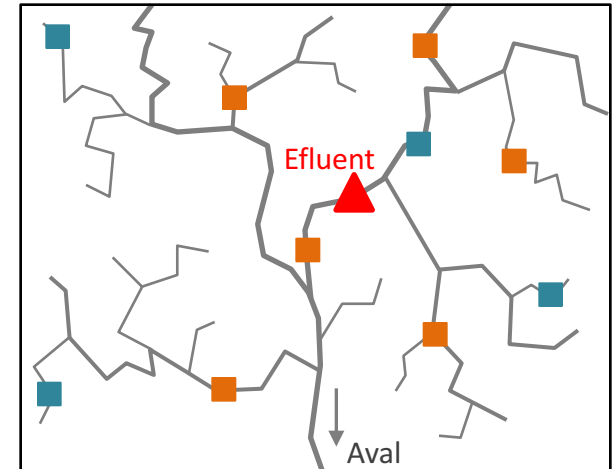
Limites au déploiement

Définition de Référentiel(s)

- Quel est le niveau de base ?
- Quel est le seuil de significativité ? (ou comment intégrer les facteurs de confusion ?)
- Quel est le seuil d'effet ? (ou comment interpréter le niveau de gravité ?)



Représentation d'une portion de bassin versant



Si trop de variabilité
inexplicable **OUT**

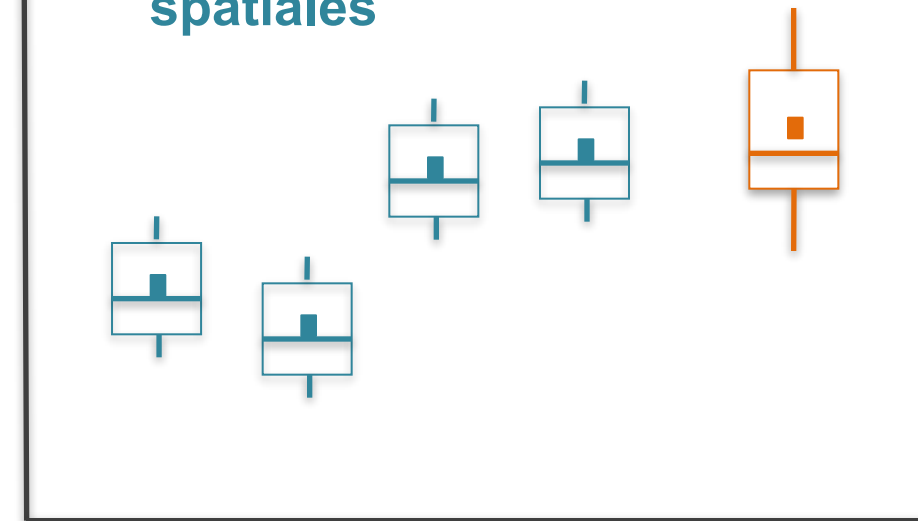
Limites au déploiement

Définition de Référentiel(s)

- Quel est le niveau de base ?
- Quel est le seuil de significativité ? (ou comment intégrer les facteurs de confusion ?)
- Quel est le seuil d'effet ? (ou comment interpréter le niveau de gravité ?)

Valeur du biomarqueur

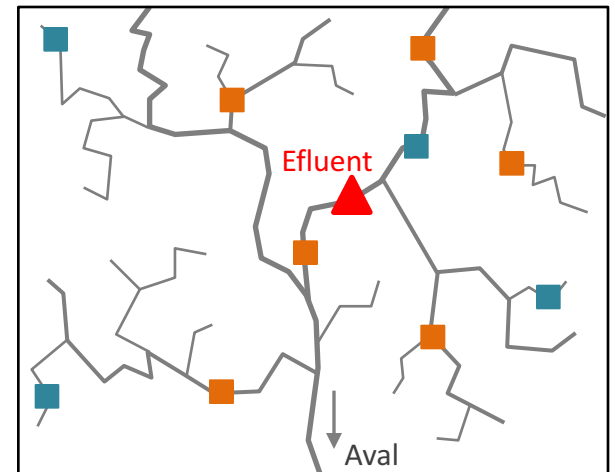
Construction d'une banque de données chronologiques et/ou spatiales



Référentiel

Station
impactée

Représentation d'une portion de bassin versant



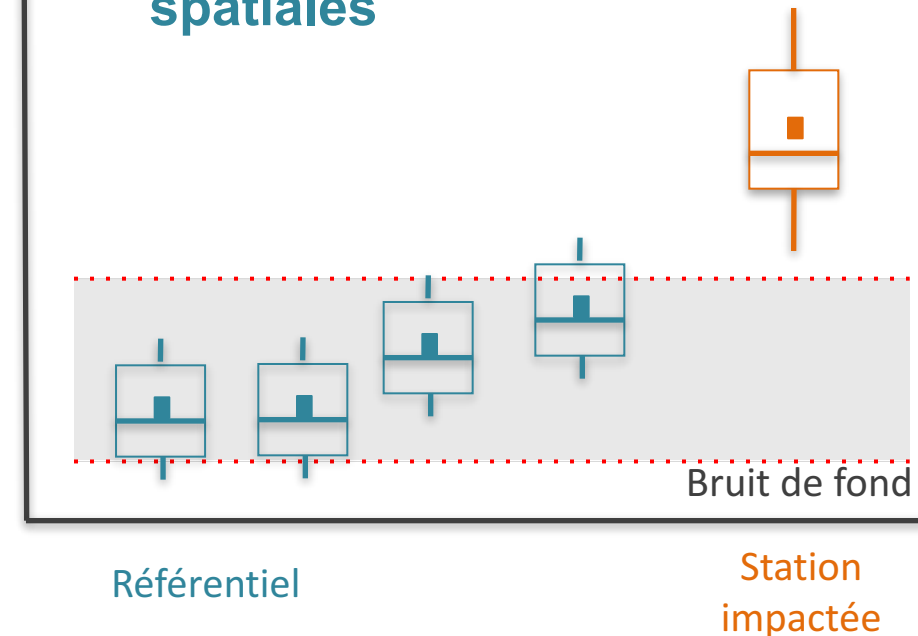
Limites au déploiement

Définition de Référentiel(s)

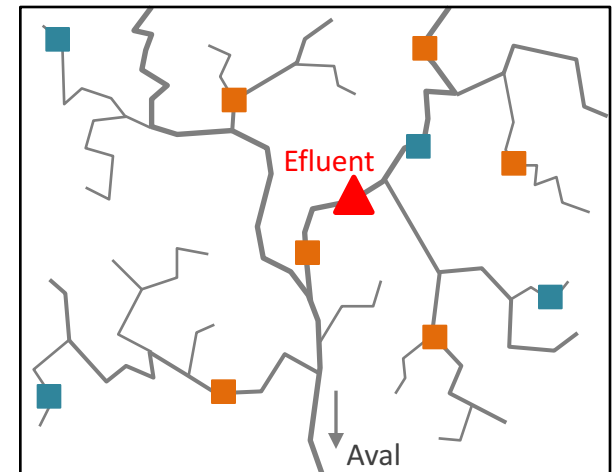
- Quel est le niveau de base ?
- Quel est le seuil de significativité ? (ou comment intégrer les facteurs de confusion ?)
- Quel est le seuil d'effet ? (ou comment interpréter le niveau de gravité ?)

Valeur du biomarqueur

Construction d'une banque de données chronologiques et/ou spatiales



Représentation d'une portion de bassin versant



Si possibilité d'identifier, intégrer et ou réduire les sources de variation **OK**

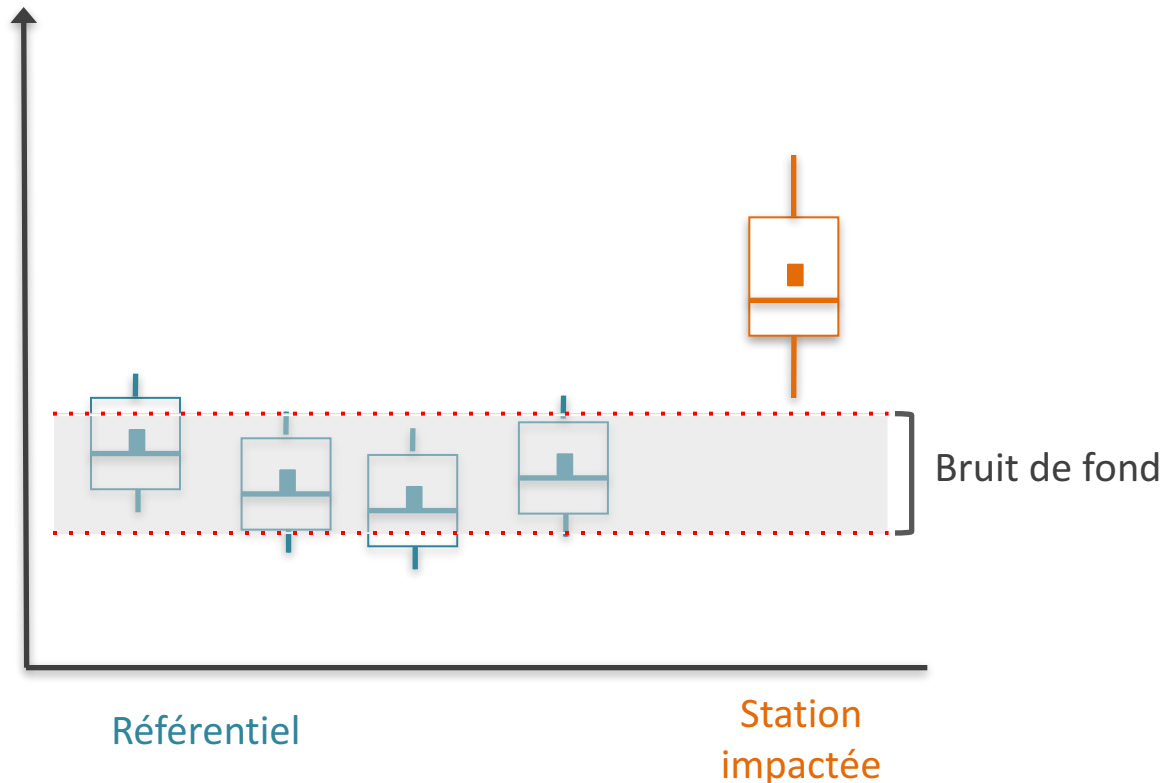
- Calibration des spécimens
- Encagement des organismes
- Modélisation des facteurs environnementaux

Limites au déploiement

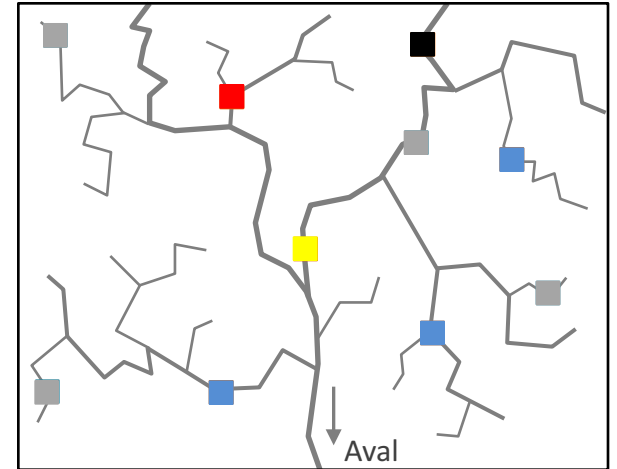
Définition de Référentiel(s)

- Quel est le niveau de base ?
- Quel est le seuil de significativité ? (ou comment intégrer les facteurs de confusion ?)
- **Quel est le seuil d'effet ?** (ou comment interpréter le niveau de gravité ?)

Valeur du biomarqueur



Représentation d'une portion de bassin versant

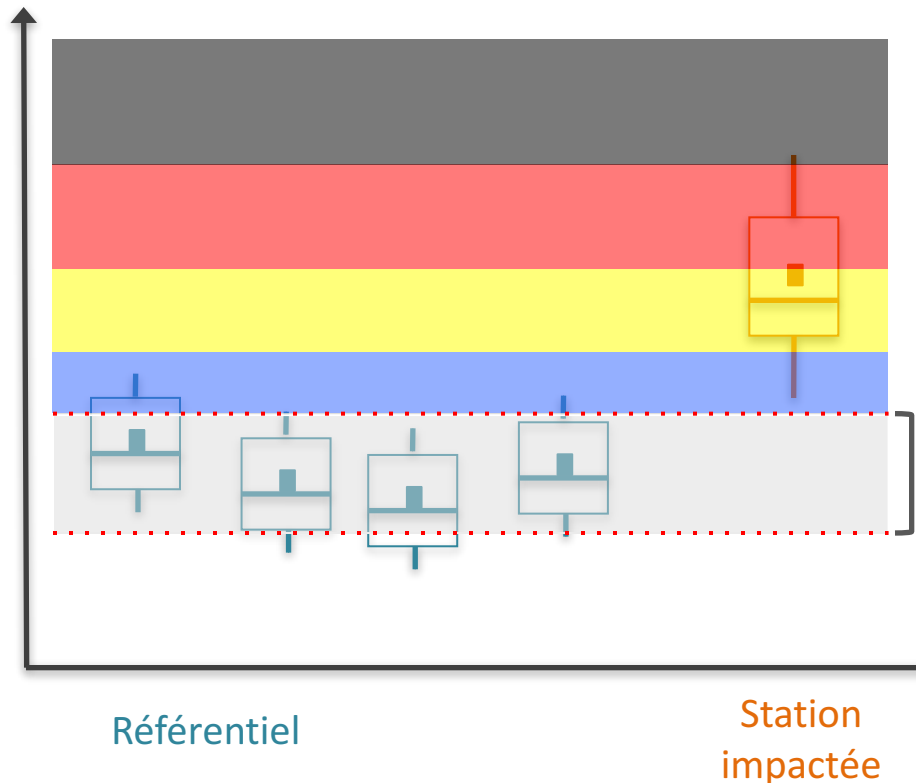


Limites au déploiement

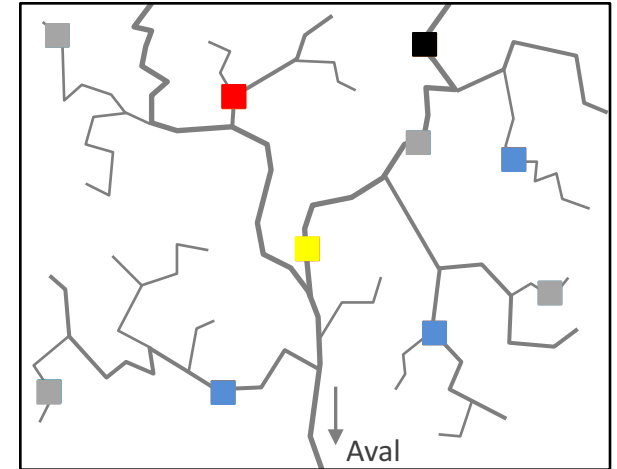
Définition de Référentiel(s)

- Quel est le niveau de base ?
- Quel est le seuil de significativité ? (ou comment intégrer les facteurs de confusion ?)
- **Quel est le seuil d'effet ?** (ou comment interpréter le niveau de gravité ?)

Valeur du biomarqueur



Représentation d'une portion de bassin versant



Sévère

Majeur

Modéré

Léger

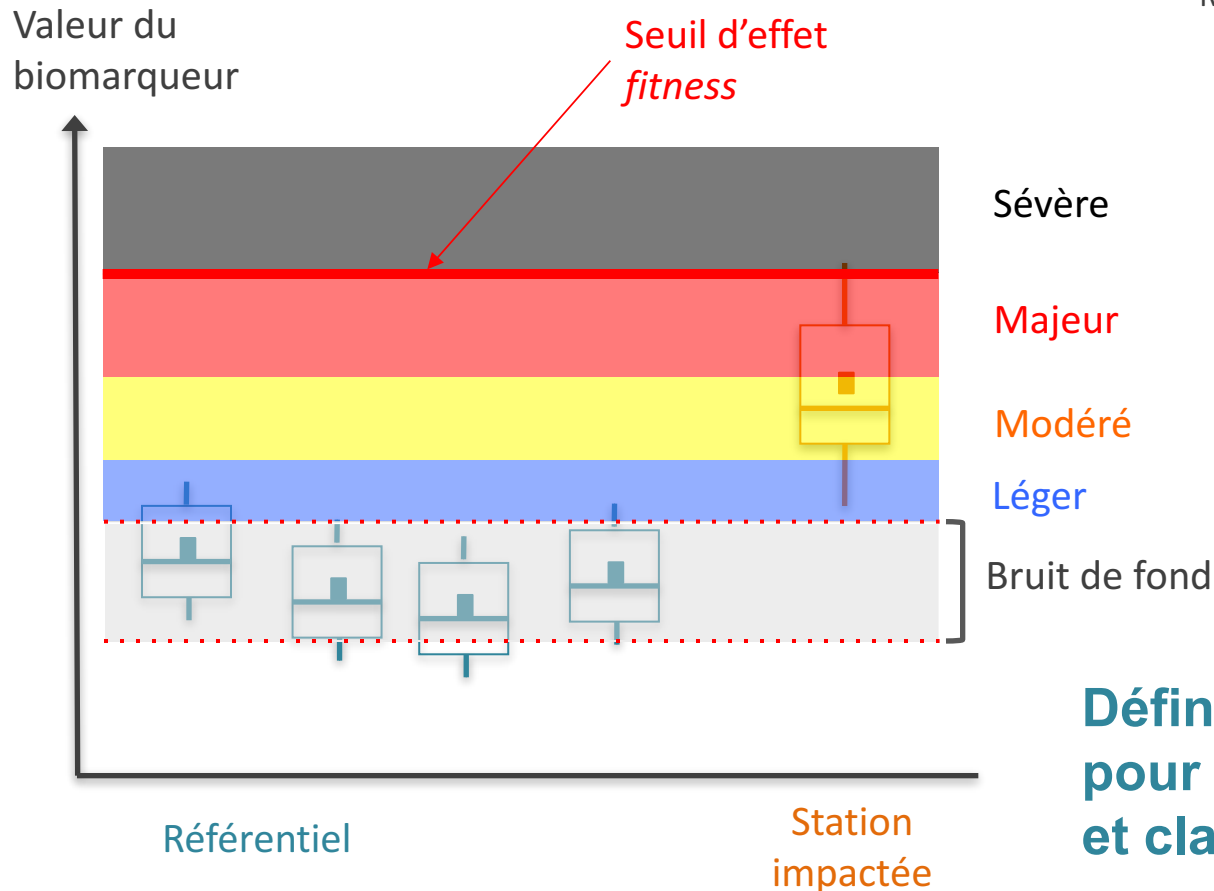
Bruit de fond

Définir une grille de lecture pour une interprétation simple et claire

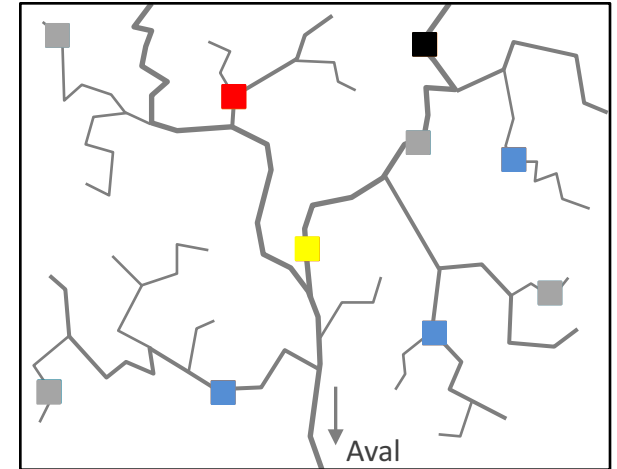
Limites au déploiement

Définition de Référentiel(s)

- Quel est le niveau de base ?
- Quel est le seuil de significativité ? (ou comment intégrer les facteurs de confusion ?)
- **Quel est le seuil d'effet ?** (ou comment interpréter le niveau de gravité ?)



Représentation d'une portion de bassin versant

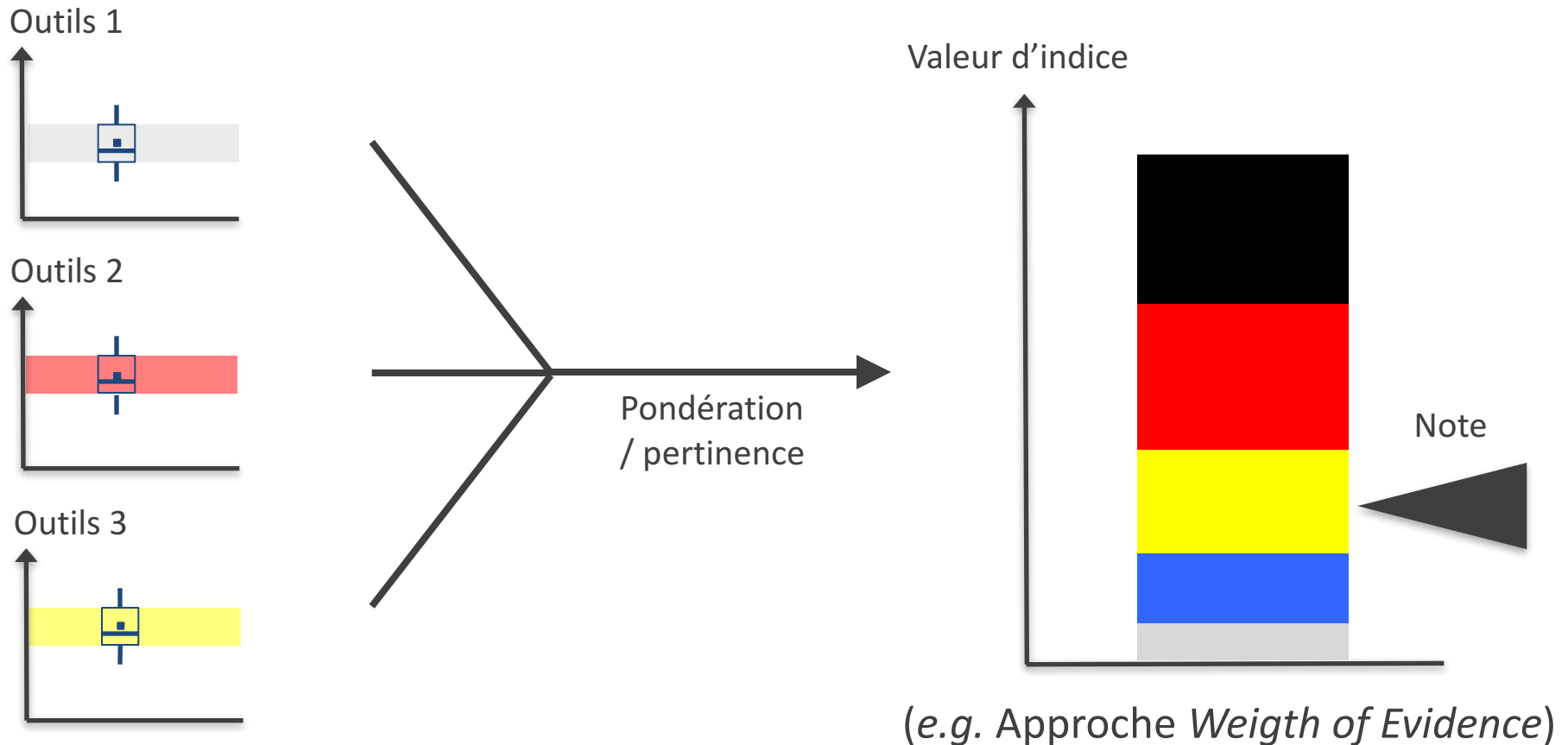


Définir une grille de lecture pour une interprétation simple et claire

Limites au déploiement

Intégration des réponses

Proposer un ou quelques **indices intégrateurs** pour une caractérisation de la qualité écotoxicologique globale



Projet B&B - Biomarqueurs et Biodiversité (2018-2019)



- Niveau de finalisation semble être atteint pour quelques approches biomarqueurs en eau douce (e.g. Irstea ou INERIS) et milieu marin (e.g. OSPAR)
- Qu'en est-il en Estuaire ?

Projet B&B - Biomarqueurs et Biodiversité

(2018-2019)

AGENCE FRANÇAISE
POUR LA BIODIVERSITÉ
ÉTABLISSEMENT PUBLIC DE L'ÉTAT



FONDATION ROYALTAINE
RECHERCHE EN ÉCOTOXICOLOGIE
Pour un monde sans pollution



- Niveau de finalisation semble être atteint pour quelques approches biomarqueurs en eau douce (e.g. Irstea ou INERIS) et milieu marin (e.g. OSPAR)
- Qu'en est-il en Estuaire ?

Projet ECOTONES – Effets de la contamination sur les organismes de l'estuaire de la Seine

(2015-2018)



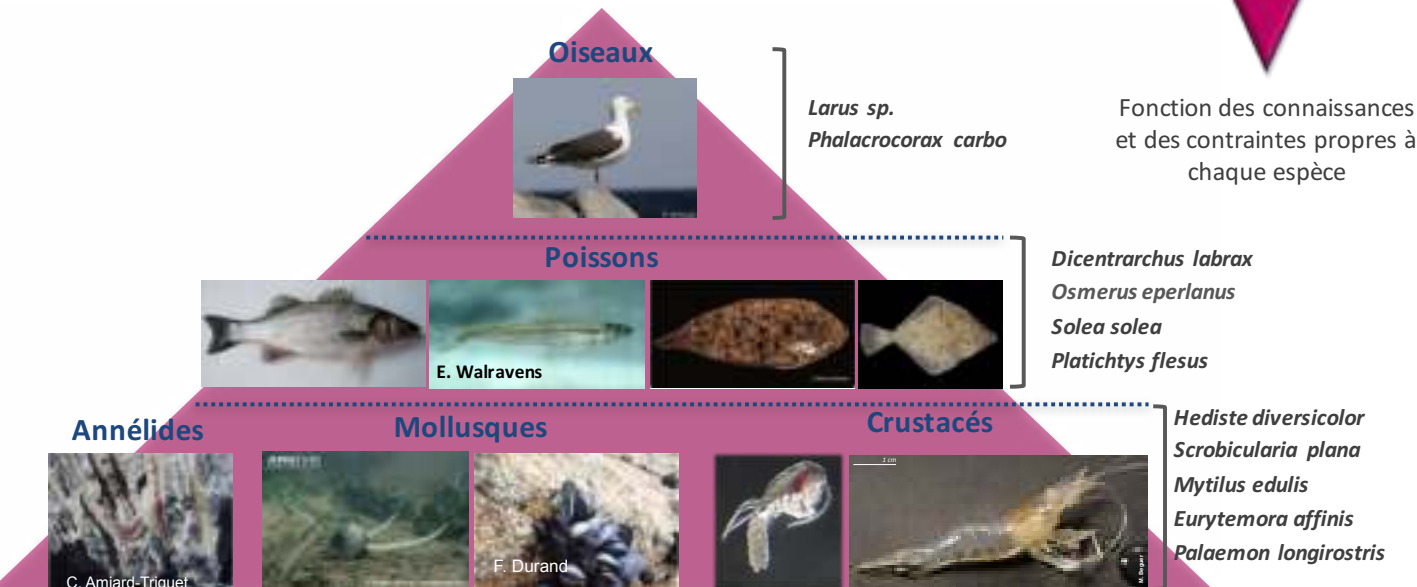
Projet ECOTONES (Programme SA V)

Initier une stratégie de **suivi des effets** de la contamination chimique sur la santé des organismes de l'estuaire

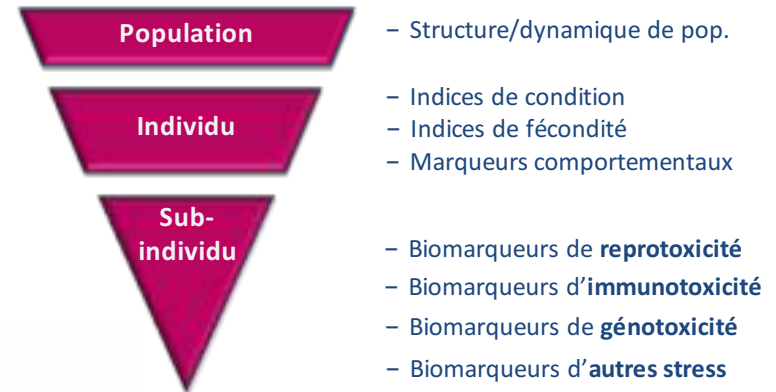
In fine: Proposer une **sélection d'outils** (couples indicateurs/espèces) **opérationnels**

Stratégie de biosurveillance passive (2015 - 2017)

- Approche multi-spécifique



- Approche multi-marqueurs



Fonction des connaissances et des contraintes propres à chaque espèce

Projet ECOTONES (Programme SA V)

	<i>H. diversicolor</i>			<i>S. plana</i>			<i>E. affinis</i>			<i>P. longirostris</i>			<i>M. edulis</i>			<i>D. labrax</i>			<i>P. flesus</i>			<i>S. solea</i>			<i>O. eperlanus</i>			
	2015	2016	2017	2015	2016	2017	2015	2016	2017	2015	2016	2017	2015	2016	2017	2015	2016	2017	2015	2016	2017	2015	2016	2017	2015	2016	2017	
Potentiels toxiques																												
(anti)-oestrogénique (test (anti)-Yes)	Anti	Anti	N.D	Anti	Anti	N.D						N.D	Anti	Anti	N.D				Anti	Anti	Anti	Anti	Anti	Anti			N.D	N.D
(anti)-androgénique (test (anti)-Yas)		Anti	N.D			N.D						N.D	Anti	Anti	N.D				Anti	Anti	Anti	Anti	Anti	Anti			N.D	N.D
Test SOS		?	N.D			N.D						N.D			N.D						N.D			N.D			N.D	N.D
Biomarqueurs de défense																												
Activité SOD																												
Activité GST																												
Activité catalase																												
Activité EROD																												
Biomarqueurs de dommages																												
Péroxydation lipidique (TBARS)																												
Activité AChE																												
Biomarqueurs d'immunotoxicité																												
Viabilité													N.D			N.D												
Numération													N.D			N.D	N.D	N.D										
Formule hémocytaire													N.D			N.D												
Phagocytose													N.D			N.D												
Bouffée oxydative																N.D												
Biomarqueurs de génotoxicité																												
Intégrité de l'AND (Comet)																												
Micronoyaux																												
Biomarqueurs de reproduction																												
Qualité des spermatozoïdes																												
Vitellogénine																												
Intersex																												
Biomarqueurs de condition																												
Glycogène																												
Lipides																												
ARN/ADN																												
Stabilité lysosomale																												
Histopathologies hépatiques																												
Indice de condition																												
Trais d'h...																												
Comportement																												
Indice de maturité sexuelle																												
Descripteurs populationnels																												
Densité / biomasse																												
Structure de stade de développement																												
Sexe-ratio																												

82 couples « réponse biologique/espèce »

... 21 sont ininterprétables,

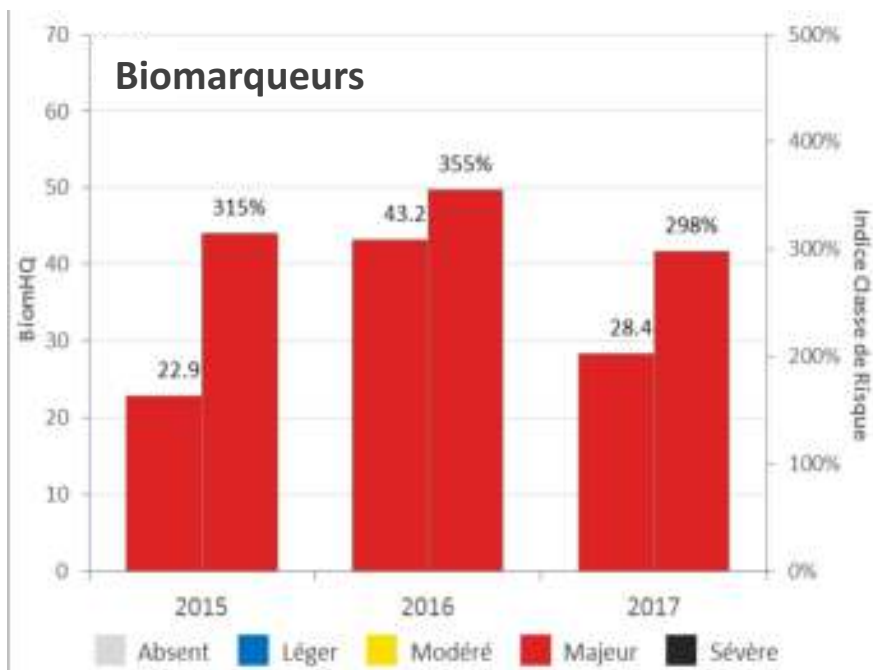
... 41 retranscrivent des signaux de perturbation

... 20 présentent un niveau "normal"

... seulement 10 disposent de valeurs de référence

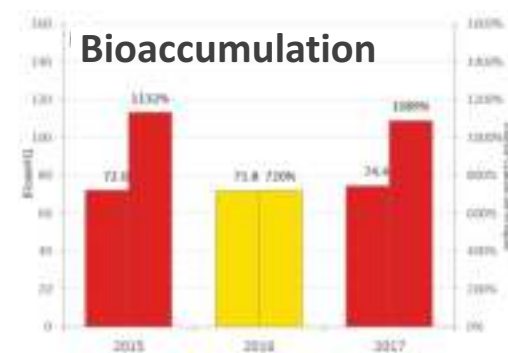
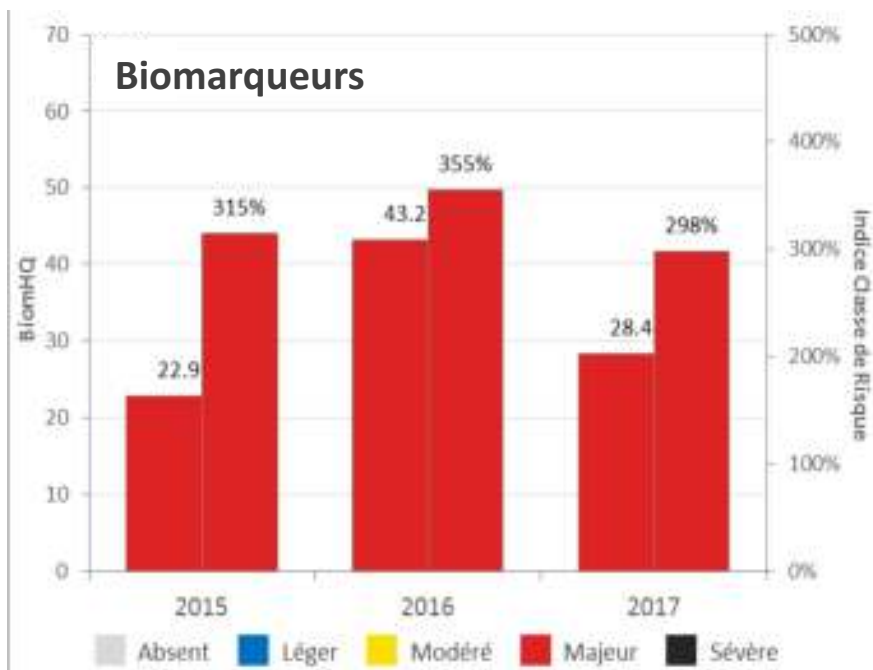
Intégration des réponses en *Weight of evidence* (Barjhoux et al., 2018)

Famille	Biomarqueurs.	Espèce	Sens de l'effet considéré	Weight	Classe de risque des Effets E(i)		
					2015	2016	2017
Stress oxydant	TBARS	<i>H. diversicolor</i>	Induc.	0.75	Sévère	Sévère	Léger
Stress oxydant	GST	<i>H. diversicolor</i>	Induc.	0.50	Absent	Absent	Absent
Stress oxydant	CAT	<i>H. diversicolor</i>	Induc.	0.50	Absent	Absent	Absent
Neurotoxicité	ACHé	<i>H. diversicolor</i>	Inhib.	0.75	Absent	Absent	Absent
Métabolisme énergétique	Lipides	<i>H. diversicolor</i>	Inhib.	1.20	Absent	Absent	Modéré
Métabolisme énergétique	Glycogène	<i>H. diversicolor</i>	Inhib.	1.20	Modéré	Majeur	Majeur
Effets populationnels	Densité	<i>H. diversicolor</i>	Inhib.	2.80	Modéré	Majeur	Majeur
Neurotoxicité	ACHé	<i>E. affinis</i>	Inhib.	0.75	Sévère	Sévère	Sévère
Métabolisme énergétique	Rapport ARN/ADN	<i>E. affinis</i>	Inhib.	1.20	Absent	Absent	Absent
Reproduction	Dommages ADN (spermatozoïdes)	<i>P. serratus</i>	Induc.	1.70	Sévère	Sévère	Sévère



Intégration des réponses en *Weight of evidence* (Barjhoux et al., 2018)

Famille	Biomarqueurs.	Espèce	Sens de l'effet considéré	Weight	Classe de risque des Effets E(i)		
					2015	2016	2017
Stress oxydant	TBARS	<i>H. diversicolor</i>	Induc.	0.75	Sévère	Sévère	Léger
Stress oxydant	GST	<i>H. diversicolor</i>	Induc.	0.50	Absent	Absent	Absent
Stress oxydant	CAT	<i>H. diversicolor</i>	Induc.	0.50	Absent	Absent	Absent
Neurotoxicité	AChE	<i>H. diversicolor</i>	Inhib.	0.75	Absent	Absent	Absent
Métabolisme énergétique	Lipides	<i>H. diversicolor</i>	Inhib.	1.20	Absent	Absent	Modéré
Métabolisme énergétique	Glycogène	<i>H. diversicolor</i>	Inhib.	1.20	Modéré	Majeur	Majeur
Effets populationnels	Densité	<i>H. diversicolor</i>	Inhib.	2.80	Modéré	Majeur	Majeur
Neurotoxicité	AChE	<i>E. affinis</i>	Inhib.	0.75	Sévère	Sévère	Sévère
Métabolisme énergétique	Rapport ARN/ADN	<i>E. affinis</i>	Inhib.	1.20	Absent	Absent	Absent
Reproduction	Dommages ADN (spermatozoïdes)	<i>P. serratus</i>	Induc.	1.70	Sévère	Sévère	Sévère



Intégration des réponses en *Weight of evidence* (Barjhoux et al., 2018)

Famille	Biomarqueurs.	Espèce	Sens de l'effet considéré	Weight	Classe de risque des Effets E(i)		
					2015	2016	2017
Stress oxydant	TBARS	<i>H. diversicolor</i>	Induc.	0.75	Sévère	Sévère	Léger
Stress oxydant	GST	<i>H. diversicolor</i>	Induc.	0.50	Absent	Absent	Absent
Stress oxydant	CAT	<i>H. diversicolor</i>	Induc.	0.50	Absent	Absent	Absent
Neurotoxicité	AChE	<i>H. diversicolor</i>	Inhib.	0.75	Absent	Absent	Absent
Métabolisme énergétique	Lipides	<i>H. diversicolor</i>	Inhib.	1.20	Absent	Absent	Modéré
Métabolisme énergétique	Glycogène	<i>H. diversicolor</i>	Inhib.	1.20	Modéré	Majeur	Majeur
Effets populationnels	Densité	<i>H. diversicolor</i>	Inhib.	2.80	Modéré	Majeur	Majeur
Neurotoxicité	AChE	<i>E. affinis</i>	Inhib.	0.75	Sévère	Sévère	Sévère
Métabolisme énergétique	Rapport ARN/ADN	<i>E. affinis</i>	Inhib.	1.20	Absent	Absent	Absent
Reproduction	Dommages ADN (spermatozoïdes)	<i>P. serratus</i>	Induc.	1.70	Sévère	Sévère	Sévère

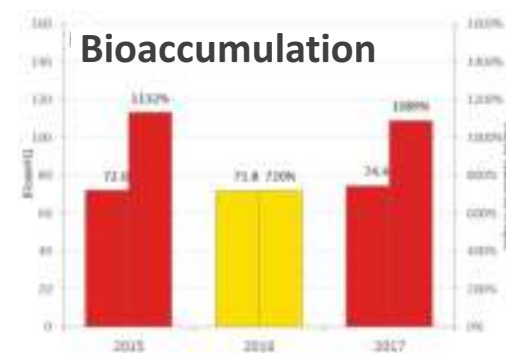
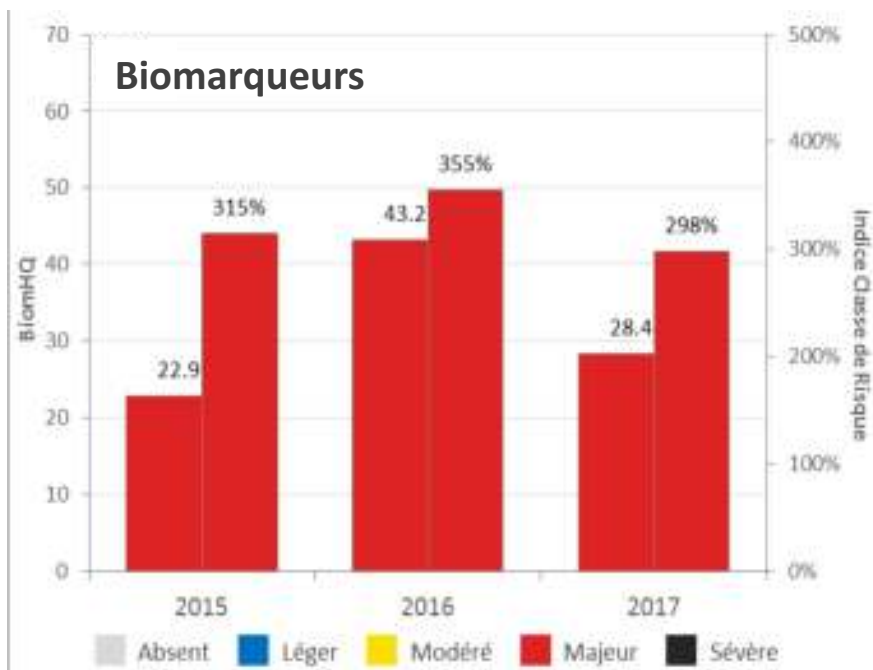
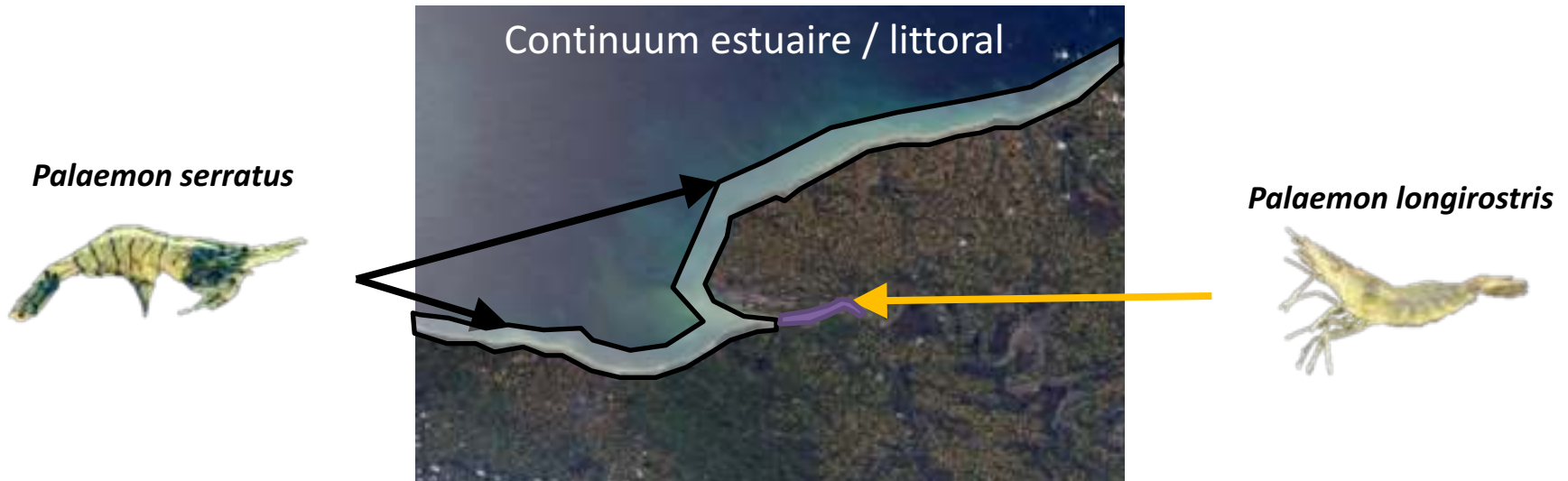


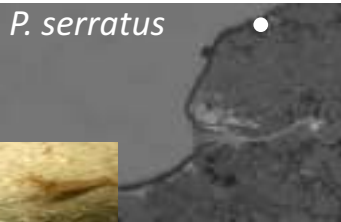
Illustration de la stratégie de construction d'un biomarqueur

Mesure de la qualité de l'ADN spermatique chez les crevettes du genre *Palaemon* en estuaire et baie de Seine (Thèse Alexandre ERRAUD)

- Optimisation méthodologique (robustesse, répétabilité)
- Caractérisation de la toxicodynamique (cinétique, rémanence, répercussion *fitness*)
- Interprétation *in situ* (variabilité naturelle, référentiels, déploiement)



Définition d'un référentiel

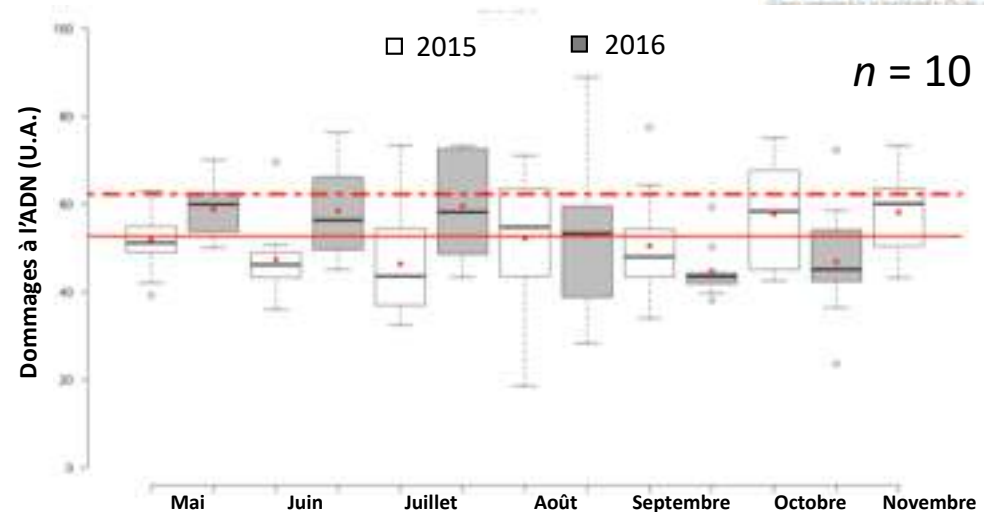


Chez l'espèce littorale...

- Suivi d'une station de référence (Yport)
- 7 mois de l'année (mai à novembre 2015 – 2016)

- Variabilité naturelle résiduelle
- Pas de corrélation avec l'âge, le stade de mue et la température

➔ Définition d'une distribution de référence avec un seuil maximal (IC 95%)

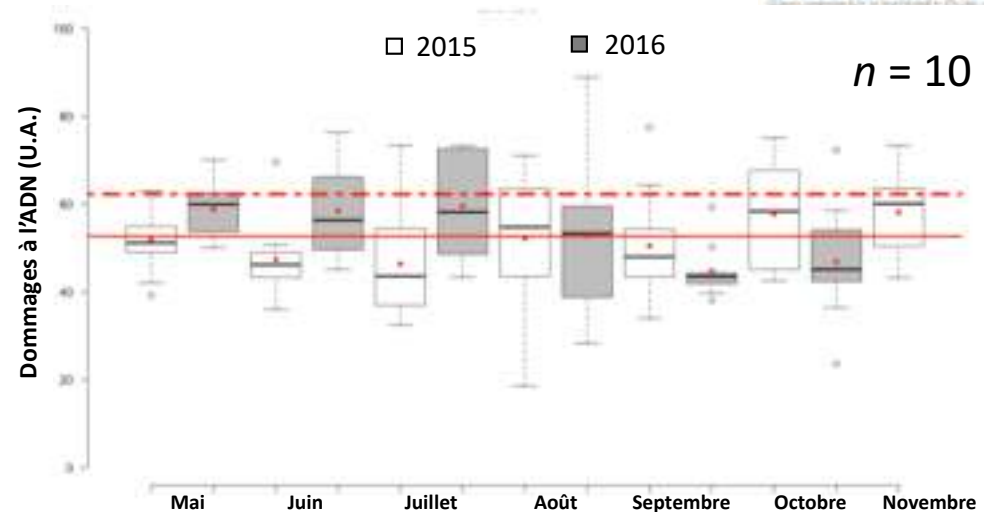


Définition d'un référentiel



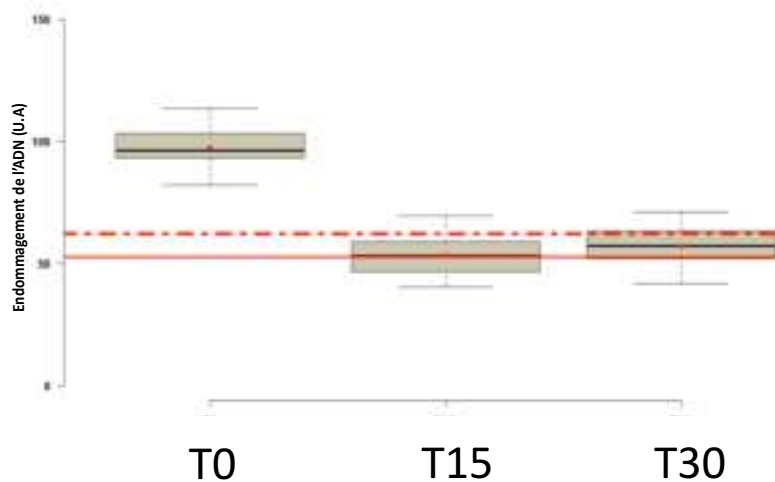
Chez l'espèce littorale...

- Suivi d'une station de référence (Yport)
- 7 mois de l'année (mai à novembre 2015 – 2016)



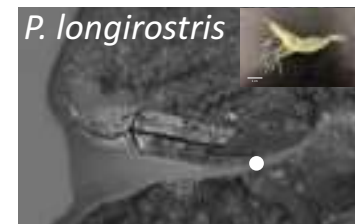
- Variabilité naturelle résiduelle
- Pas de corrélation avec l'âge, le stade de mue et la température

➔ Définition d'une distribution de référence avec un seuil maximal (IC 95%)



Pour l'espèce estuarienne...

- Suivi du retour au niveau basal en conditions saines

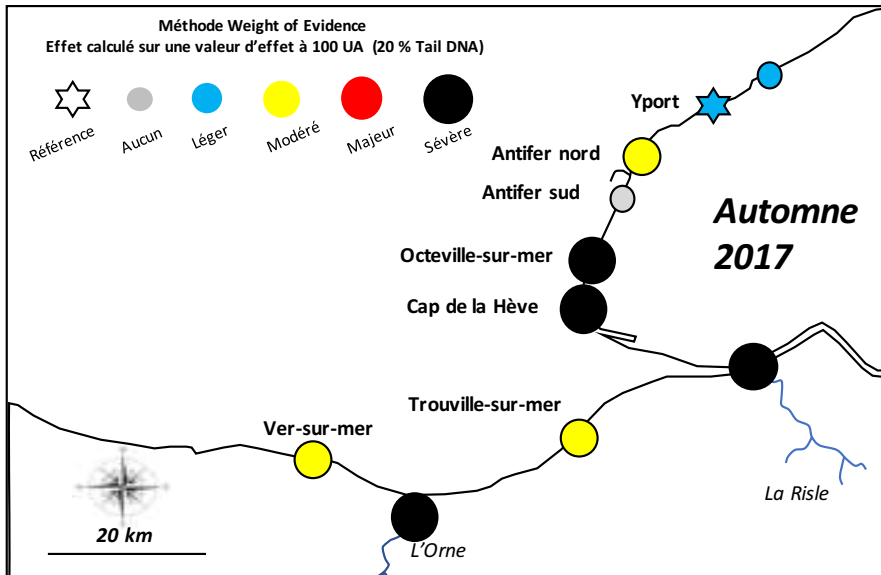
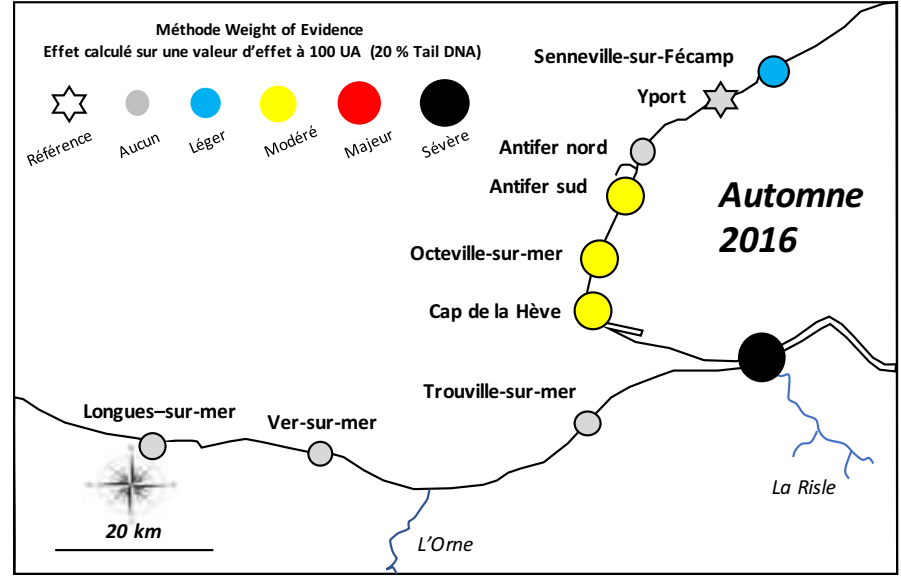
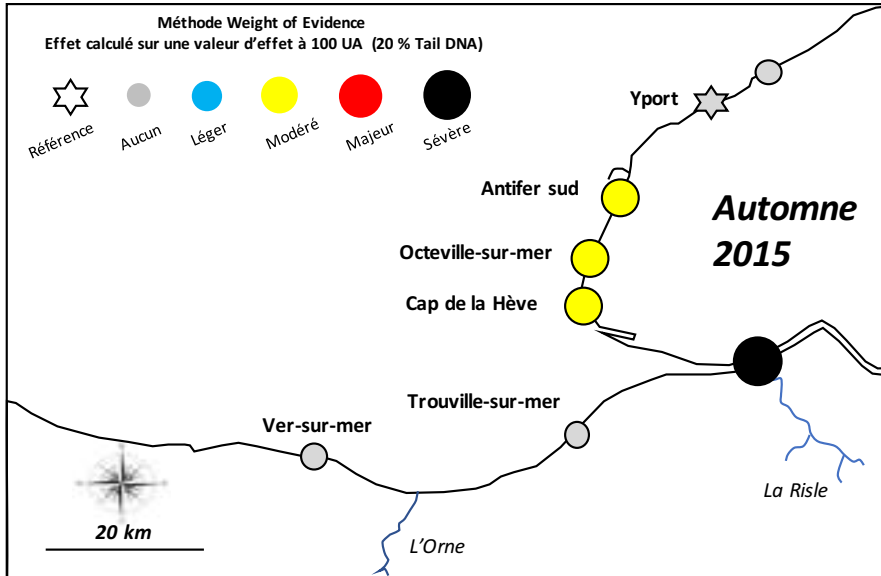


- Concordance avec la distribution de référence

➔ Valeur de référence inter-espèces

Illustration de la stratégie de construction d'un biomarqueur

Déploiement en surveillance le long du continuum estuaire/littoral



➔ Cartographie de la pression génotoxique le long du continuum estuaire / littorale de la Seine

➔ Intérêt d'intercomparer les espèces pour la surveillance des différentes masses d'eau



Capacité à diagnostiquer et comparer des masses d'eau très différentes sur une large échelle géographique

Nécessité de comparer/intercalibrer les réponses (bioaccumulation/biomarqueurs) entre les espèces

Projet SASHIMI - Surveillance active de l'impact de la pression chimique par des biomarqueurs (2018-2020)

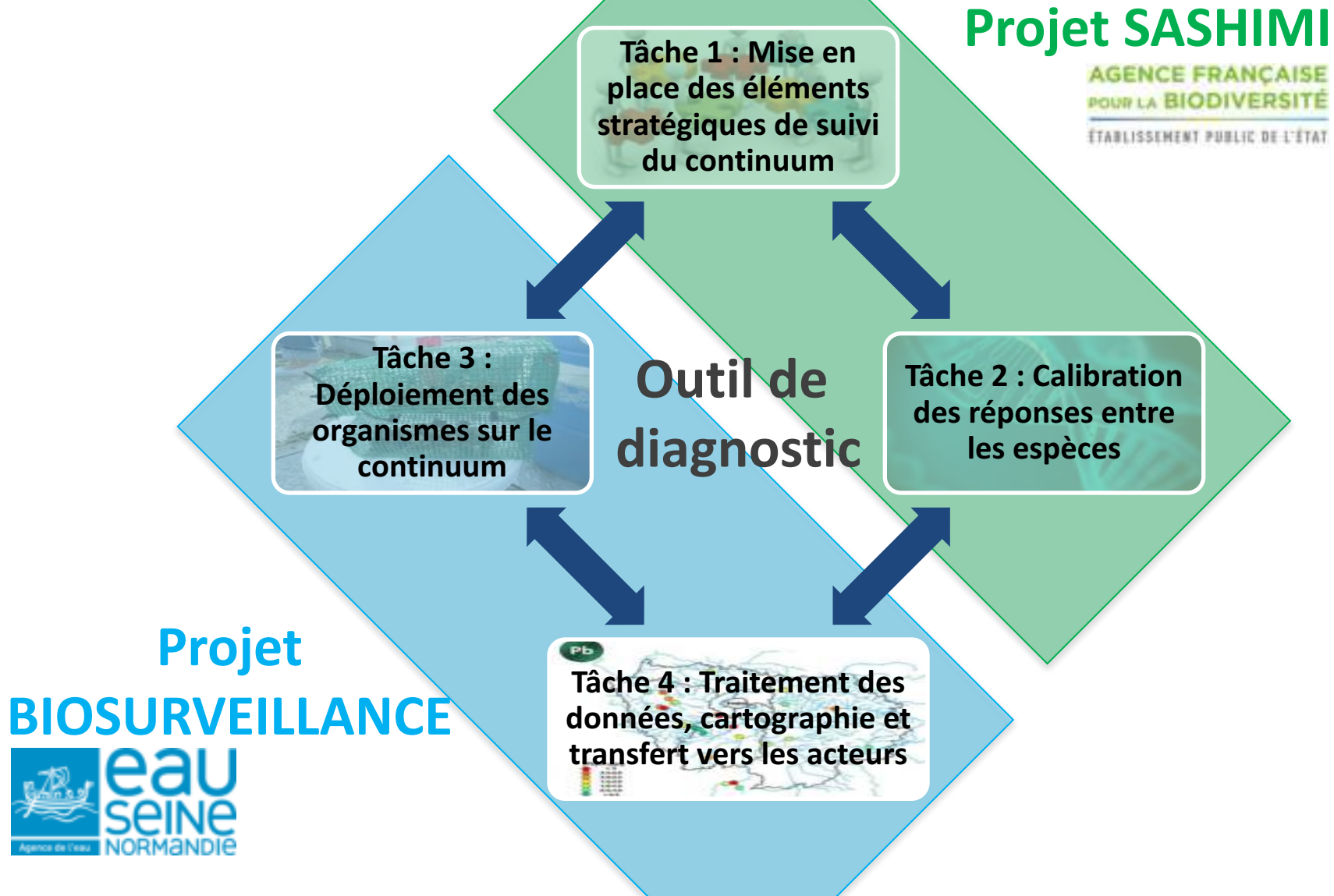


Projet BIOSURVEILLANCE - Proposition d'un pilote basé sur l'utilisation de biomarqueurs pour un appui à la surveillance de la qualité des masses d'eau du district Seine-Normandie (En cours d'évaluation)



Surveillance du continuum

L'articulation des projets



La stratégie...



- Couvrir différentes masses d'eaux : littorale, de transition, continentale (tête de bassin, grands systèmes)
- Considérer différents groupes zoologiques

- Mollusques : moule bleue, moule brune et dreissène



- Crustacés : crevette et gammare

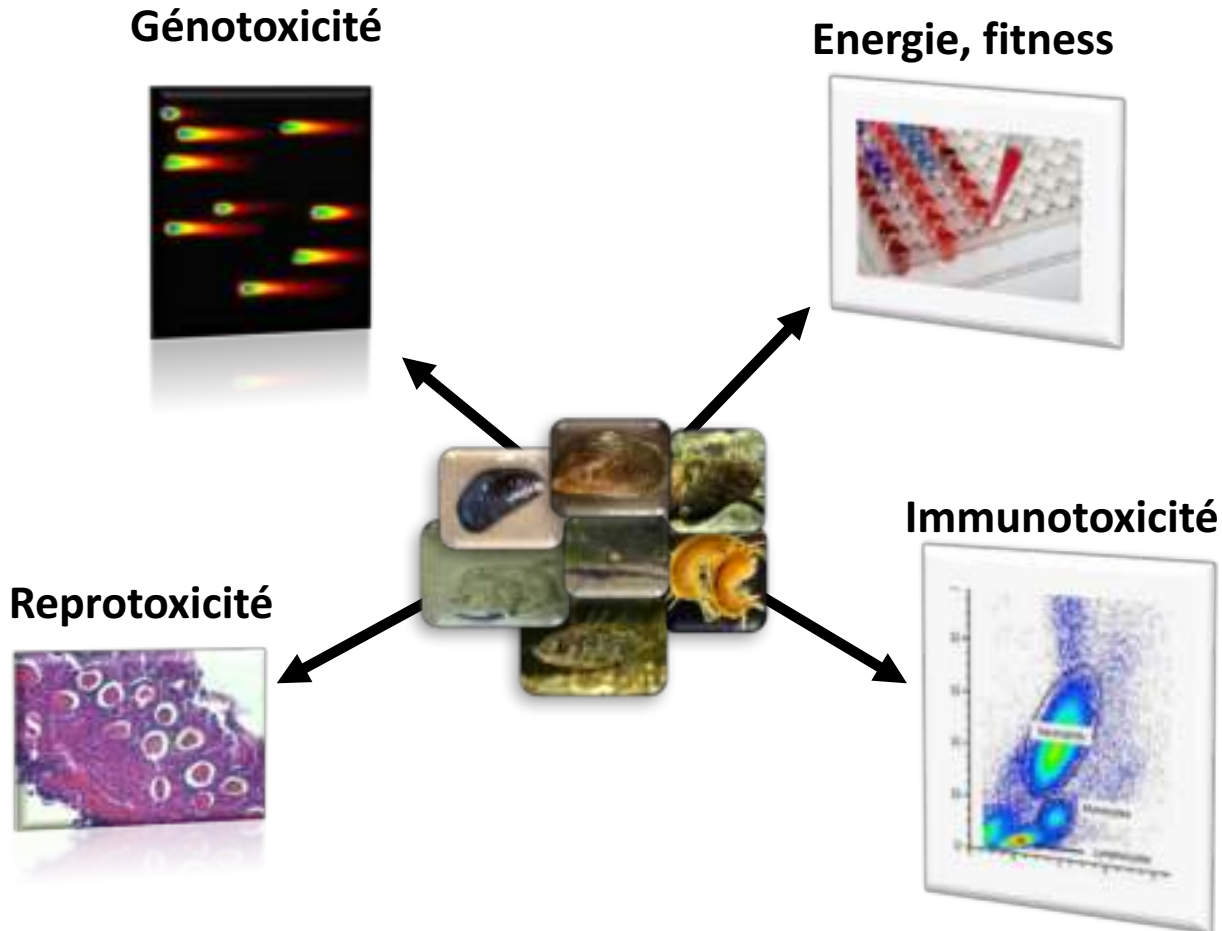


- Poissons : flet et épinoche



La stratégie (suite)...

- Considérer des réponses de toxicité applicables chez les différentes espèces



- Encagement des organismes

Conclusion

Peu d'outils opérationnels permettant une lecture claire de l'état écotoxicologique en estuaire



Promouvoir des actions de recherche orientées vers la caractérisation de valeurs de référence robustes pour quelques indicateurs d'intérêt



Optimiser les modèles d'intégration (*e.g.* WoE)



Promouvoir les campagnes de déploiement intra- et inter-estuaire

Intérêt de poursuivre la réflexion pour une évaluation intégrée le long du continuum



Merci pour votre attention



AGENCE FRANÇAISE
POUR LA BIODIVERSITÉ
ÉTABLISSEMENT PUBLIC DE L'ÉTAT



Principe calculatoire LOE Biomarqueurs

- Prérequis : pour chaque réponse (moyenne) d'un biomarqueur
 - ✓ Une valeur de référence
 - ✓ Un seuil de référence (Th) = borne les variations basales de la réponse (IC95%, valeur EAC)
 - ✓ Un seuil d'effet (calibration de la fonction de correction $Z(i)$) = seuil au-delà duquel un effet toxique est attendu et/ou des répercussions au niveau d'organisation supérieur sont probables (ex. : BAC)
- Etapes de calculs :
 - ✓ Réponse(i) et valeur de référence => RTR (rapport à la référence) => %VAR (% de variation par rapport à la réf.)
 - ✓ Calcul d'une valeur d'effet $E(i)$: %VAR/ Th (que si dans le sens écologiquement pertinent, sinon $E(i)=0$) corrigé par la fonction $Z(i)$

$$E(i) = \left| \frac{\%VAR(i)}{Th(i)} \right| \times Z(i)$$



$Z(i) = 0.2$ for $\left| \frac{\%VAR(i)}{Th(i)} \right| \leq 1$ i.e. réponse dans la gamme réf.
 $Z(i) = 0.5$ for $1 < \left| \frac{\%VAR(i)}{Th(i)} \right| \leq BAC$ réponse hors gamme-réf mais < seuil d'effet
 $Z(i) = 1$ for $\left| \frac{\%VAR(i)}{Th(i)} \right| > 1.5$ réponse > seuil d'effet

- ✓ Définition d'une classe de risque associée à la réponse de chaque biomarqueur :

$E(i) < 0.7$	→	Absent
$0.7 \leq E(i) < 1$	→	Slight
$1 \leq E(i) < 2$	→	Moderate
$2 \leq E(i) < 3$	→	Major
$3 \leq E(i)$	→	Severe

- ✓ Pondération de chaque effet $E(i)$ en vue de l'intégration :

$$E_w(i) = E(i) \times Weight(i)$$

Weight(i) en fonction du niveau d'organisation biologique :

AChE/TBARS → 0,75
 Reprotoxicité → 2,4
 Densité (Hediste) → 2,8
 Mortalité → 3

Principe calculatoire LOE Biomarqueurs

- ✓ Calcul du Quotient de Risque Biomarqueur : BiomHQ

$$\text{BiomHQ} = \frac{\sum_j E_w(j)_{1 \leq E(j) < 2}}{\sum_j \text{Weight}(j)_{1 \leq E(j) < 2}} + \sum_k E_w(k)_{E(k) \geq 2}$$

Moyenne pondérée des $E_w(i)$ classés « modéré »

Somme des $E_w(i)$ classés « majeur » à « sévère »

N.B. : pas de prise en compte des $E_w(i)$ classés 'absent' ou 'léger' (<1)

- ✓ Calcul de l'indice BiomHQ et détermination de la classe de risque associée à la LOE Biomarqueur

BiomHQ index =

$$\equiv (\% \text{param}_{E(i)='absent'} \times 0.7) + (\% \text{param}_{E(i)='slight'} \times 1) + (\% \text{param}_{E(i)='major'} \times 2) + (\% \text{param}_{E(i)='severe'} \times 8)$$

Pourcentages de réponses associées aux différentes classes de risque avec facteur de pondération croissant avec le risque.



<i>BiomHQ index = 70%</i>	➔	Absent
<i>70% < BiomHQ index ≤ 100%</i>	➔	Slight
<i>100% < BiomHQ index ≤ 200%</i>	➔	Moderate
<i>200% < BiomHQ index ≤ 400%</i>	➔	Major
<i>400% < BiomHQ index ≤ 800%</i>	➔	Severe

Biomarqueurs intégrés dans le cadre d'ECOTONES

Catégorie	Espèce	Biomarqueur	Abrév.	Valeur Réf.	Unité	Sens réponse	Seuil Th(i)	Seuil d'effet	Weight
Reproduction	P. serratus	Dommages ADN (Test comète) sur spermatozoïdes	CSptz	52.6	Unité arbitraire (AU)	Induction	17.3%	90.1%	1.70
Stress oxydant	H diversicolor	Substances réactives à l'acide thiobarbiturique	TBARS	0.68 (mars) 0.62 (juin/juil.)	nmol MDA /mg prot.	Induction	20.0% (mars) 22.0%(juin/juil.)	43.1% (mars) 47.3% (juin/juil.)	0.75
Stress oxydant	H diversicolor	Activité catalase	CAT	36.4 (mars) 41.4 (juin/juil.)	nmol/min /mg prot.	Induction	45.0% (mars) 39.7% (juin/juil.)	76.3% (mars) 67.2% (juin/juil.)	0.50
Stress oxydant	H diversicolor	Activité Glutathion-S-transférase	GST	76.1 (mars) 82.3 (juin/juil.)	nmol/min /mg prot.	Induction	27.2% (mars) 25.1% (juin/juil.)	55.6% (mars) 51.5% (juin/juil.)	0.50
Neurotoxicité	H diversicolor	Activité Acétylcholinestérase	AChE	36.9 (mars) 23.6 (juin/juil.)	nmol/min /mg prot.	Inhibition	-28.6% (mars) -44.7% (juin/juil.)	-51.4% (mars) -80.3% (juin/juil.)	0.75
Métabolisme énergétique	H diversicolor	Réserves lipides	Lip.	7.61 (mars) 8.48 (juin/juil.)	mg/g pf	Inhibition	-34.9% (mars) -31.3% (juin/juil.)	-66.7% (mars) -59.9% (juin/juil.)	1.20
Métabolisme énergétique	H diversicolor	Réserves glycogènes	Gly.	12.5 (mars) 18.9 (juin/juil.)	mg/g pf	Inhibition	-46.8% (mars) -30.9% (juin/juil.)	-69.6% (mars) -45.9% (juin/juil.)	1.20
Effets populationnels	H diversicolor	Densité	Dens.	2190 (mars) 3183 (juin/juil.)	Nb. indiv./ m ²	Inhibition	-46.8% (mars) -32.2% (juin/juil.)	-88.5% (mars) -60.9% (juin/juil.)	2.8
Neurotoxicité	E. affinis	Activité Acétylcholinestérase	AChE	398.5	nmol ACTC /min/mg prot.	Inhibition	-6.45%	-30.0%	0.75
Métabolisme énergétique	E. affinis	Rapport ARN/ADN	ARN/ADN	5.10	Sans unité (SU)	Inhibition	-62.0%	-92.9%	1.20