



HAL
open science

Indices Biologiques de Diagnostic Précoce en Santé Humaine et en Ecologie : Aspects Neuroendocriniens, Cytotoxiques et Génotoxiques

Xavier Moreau

► **To cite this version:**

Xavier Moreau. Indices Biologiques de Diagnostic Précoce en Santé Humaine et en Ecologie : Aspects Neuroendocriniens, Cytotoxiques et Génotoxiques. Neurobiologie. AMU - Aix Marseille Université, 2008. tel-01773120

HAL Id: tel-01773120

<https://hal.science/tel-01773120>

Submitted on 27 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

HABILITATION A DIRIGER LES RECHERCHES

Présentée par

Dr Xavier Moreau

Maître de Conférences à l'Université de Provence
Aix-Marseille I
68^{ème} section CNU

*Indices Biologiques de Diagnostic Précoce en Santé
Humaine et en Ecologie : Aspects Neuroendocriniens,
Cytotoxiques et Génotoxiques*

Discipline : Neurobiologie & Ecophysiologie

2 juin 2008

Jury :

F. LEBOULENGER Professeur, Le Havre, Rapporteur
P. BARTHÉLÉMY Professeur, Bordeaux II, Rapporteur
J.P. ROLL Professeur, Aix-Marseille I, Rapporteur
A. BOTTA Professeur Aix-Marseille II
L. GAUTHIER MCF HDR, ENSAT Toulouse
A. NIEOULLON Professeur, Aix-Marseille II
T. TATONI Professeur, Aix-Marseille III
A. THIÉRY Professeur Aix-Marseille I

Université de Provence, Aix-Marseille I

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT

➤ BILAN QUANTITATIF	11
➤ LISTE DES TRAVAUX DE RECHERCHE	13
➤ SYNTHÈSE DES ACTIVITÉS DE RECHERCHE	20
➤ THÉMATIQUE ACTUELLE	66
➤ PROJETS DE RECHERCHE	96
➤ SYNTHÈSE DES ACTIVITÉS D'ENCADREMENT	112
➤ RECONNAISSANCE AU NIVEAU INTERNATIONAL	123

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT

MOTS CLES : Biomarqueurs, Environnement, Invertébrés aquatiques, Santé humaine, Système nerveux

➤ BILAN QUANTITATIF

Ce bilan prend en compte les **travaux scientifiques** de 1993 à 2008, ainsi que les **activités d'encadrement** d'octobre 2001 à octobre 2007.

• Mémoires et thèse	4
• Contrats	2
• Publications internationales rang A <i>dont Impact Factor > 1</i>	19 15
• Publications dans des revues internationales de rang B (à comité de lecture)	1
• Chapitres d'ouvrages	2
• Communications scientifiques dans des congrès internationaux	15 (<i>dont 2 orales</i>)
• Communications scientifiques dans des congrès nationaux	8 (<i>dont 1 orale</i>)
↳ Co-direction de Thèse	1
✓ <i>Publications de rang A :</i>	2
✓ <i>Communications :</i>	4
↳ Co-Encadrement Master Recherche (M2R)	1
✓ <i>Publications de rang A :</i>	1
✓ <i>Communications :</i>	1
• Collaboration impliquant des Doctorants	3
✓ <i>Publications de rang A :</i>	3
✓ <i>Communications :</i>	3
• Collaboration impliquant des Masters 2 Recherche (M2R)	1
✓ <i>Publications de rang A :</i>	2
✓ <i>Communications :</i>	3

LISTE DES TRAVAUX DE RECHERCHE

• Publications Internationales de rang A	13
• Publications de rang B	15
• Communications orales et affichées	16
• Contrats	19
• Mémoires et thèse	19

ACTIVITES DE RECHERCHE
LISTE DES TRAVAUX DE RECHERCHE

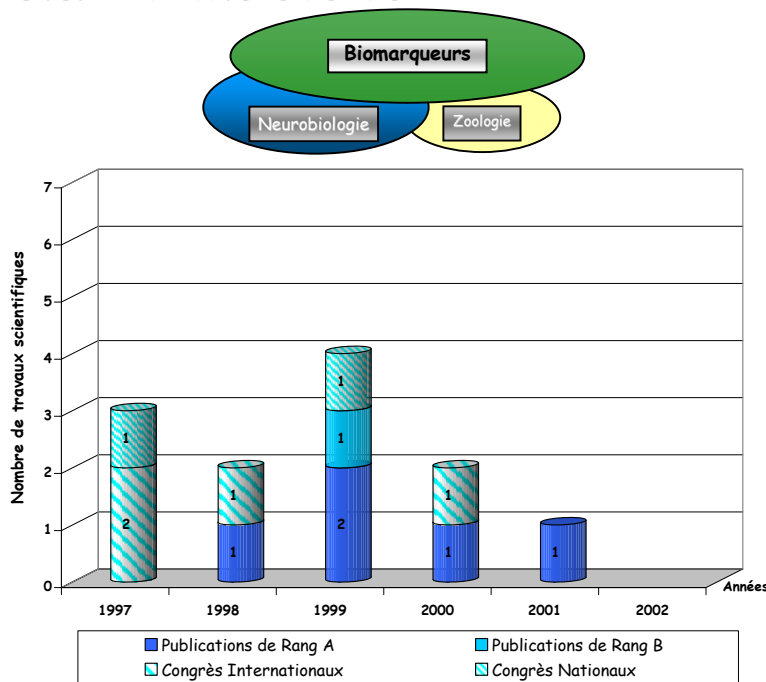


Figure 1
Bilan des travaux scientifiques du Doctorat (obtenu le 13/07/2000)

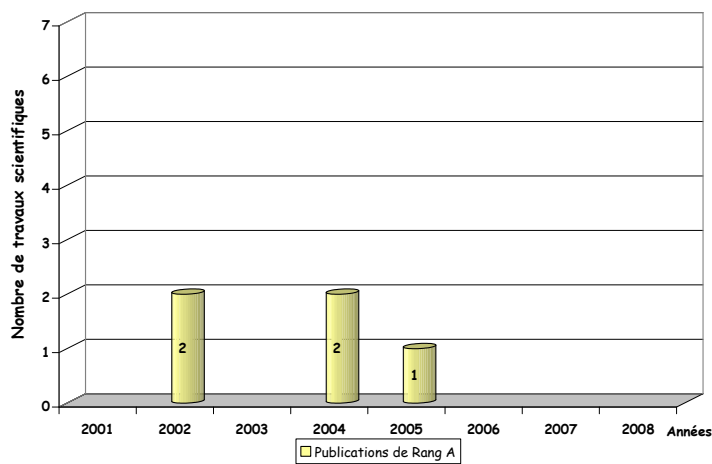


Figure 2
Bilan des travaux menés en collaboration avec des chercheurs de l'équipe : introduction à la biologie des invertébrés aquatiques

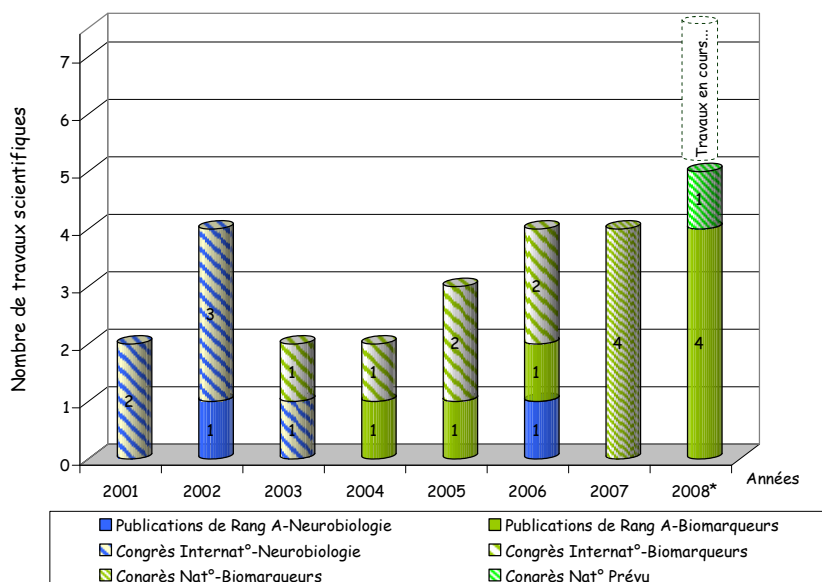


Figure 3
Bilan des travaux scientifiques : Neurobiologie des invertébrés aquatiques (bleu) et Thématique Biomarqueurs (vert) dont toutes les publications sont classées Quartile 1 en Sciences Environnementales.

* Pour 2008 Liste prévisionnelle non exhaustive

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT

LISTE DES TRAVAUX DE RECHERCHE

PUBLICATIONS INTERNATIONALES DE RANG A

(Ordre chronologique)

Les noms en **italique gras** dans la liste correspondent aux étudiants pour lesquels j'ai encadré des travaux de recherche.

- (1) **Moreau X**, Azorin JM, Maurel M, Jeanningros R. (1998) Increase in red blood cell triiodothyronine uptake in unipolar major depressed patients compared to healthy volunteers. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 22: 293-310.
- (2) Kulikov A, **Moreau X**, Jeanningros R. (1999) Effects of experimental hypothyroidism on 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} receptors, 5-HT uptake sites and tryptophan hydroxylase activity in mature rat brain. *Neuroendocrinology*, 69: 453-459.
- (3) **Moreau X**, Lejeune P-J, Jeanningros R. (1999) Kinetics of red blood cell T3 uptake in hypothyroidism with or without hormonal replacement, in the rat. *Journal of Endocrinological Investigation*, 22: 257-261.
- (4) **Moreau X**, Azorin JM, Lejeune PJ, Jeanningros R. (2000) Red blood cell triiodothyronine uptake in unipolar major depression: effect of a chronic antidepressant treatment. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 24: 23-35.
- (5) **Moreau X**, Jeanningros R, Mazzola-Pomietto P. (2001) Chronic effects of triiodothyronine in combination with imipramine on 5-HT transporter, 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in adult rat brain. *Neuropsychopharmacology*, 24: 652-662.
- (6) Casanova B, De Jong L, **Moreau X**. (2002) Carapace and mandibles ontogeny in the Decapoda Dendrobranchiata, Euphausiacea and Mysidacea (Crustacea): a phylogenetic interest. *Canadian Journal of Zoology*, 80: 296-306.
- (7) De Jong L, **Moreau X**, Barthélémy R-M, Casanova JP. (2002) Relevant role of the labrum associated with the mandibles in the *Lophogaster typicus* digestive function. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 82: 219-227.
- (8) **Moreau X**, **Benzid D**, De Jong L, Barthélémy RM, Casanova JP. (2002) Evidence for the presence of serotonin in Mysidacea (Crustacea, Peracarida) as revealed by fluorescence immunohistochemistry. *Cell and Tissue Research*, 310: 359-371.

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT

LISTE DES TRAVAUX DE RECHERCHE

- (9) De Jong L, Jean S, **Moreau X.** (2004) The digestive system of *Euphausia krohni* (Crustacea, Euphausiacea): functional morphology and phylogenetic relevance. *Cahiers de Biologie Marine*, 45: 71-82.
- (10) Jean S, De Jong L, **Moreau X.** (2004) Chaetognaths: a useful model for studying heat shock proteins. Effect of wound healing. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 312: 319-332.
- (11) Casanova J-P, **Moreau X.** (2004) A new *Spadella* (Chaetognatha) from shallow waters of Lanzarote (Canary Islands). Biogeographical remarks. *Cahiers de Biologie Marine*, 45: 373-379.
- (12) Léon V, Rabier J, Notonier R, Barthélémy RM, **Moreau X**, Bouraima-Madjebi S, Viano J, Pineau R. (2005) Effects of 3 Nickel salts on the element distribution in *Grevillea exul* var. *rubiginosa* seeds, a New Caledonian endemic Proteaceae. *Annals of Botany*, 95: 609-618.
- (13) Casanova J-P, **Moreau X.** (2005) *Calispadella alata* n.gen., n.sp., the first chaetognath recorded from a hydrothermal vent site (Mid-Atlantic Ridge) *Journal of Plankton Research*, 27: 221-225.
- (14) De Jong L, **Moreau X**, Jean S, Scher O, Thiéry A. (2006) Expression of the heat shock protein Hsp70 in chloride target cells of mayfly larvae from motorway retention pond: a biomarker of osmotic shock. *Sciences of the Total Environment*, 366: 164-173.
- (15) **Benzid D**, De Jong L, Chevaldonné P, Lejeusne C, **Moreau X.** (2006) Serotonin expression in the optic lobes of cavernicolous crustaceans during the light-dark transition phase: role of the *lamina ganglionaris*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 335: 74-81.
- (16) **Moreau X**, Saez G, Thiéry A, Clos-Faybesse O, Guiraudie-Capraz G, Bienboire-Frosini C, Martin C, De Jong L. (2008) ELISA detection of multixenobiotic resistance transporter induction in indigenous freshwater Chironomidae larvae (Diptera): A biomarker calibration step for in situ monitoring of xenobiotic exposure. *Environmental Pollution (sous presse)*.
- (17) **Aouadene A**, Di Giorgio C, Sarrazin L, **Moreau X**, De Jong L, Garcia F, Thiéry A, Botta A, De Méo M. (2008) Evaluation of the genotoxicity of river sediments from industrialized and unaffected areas using a battery of short-term bioassays. *Environmental and Molecular Mutagenesis (sous presse)*.

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT

LISTE DES TRAVAUX DE RECHERCHE

- (18) Saez G, De Jong L, **Moreau X**, Sarrazin L, Wafo E, Schembri T, Lagadec V, Diana C, Monod J-L, Thiéry A. (2008) Evaluation of pollutant exposure by chemical and biological markers in a Mediterranean French urban stream: a step for *in situ* calibration of multixenobiotic resistance transporter expression as biomarker in Chironomidae larvae. *Environmental Research* (sous presse).
- (19) De Jong L, **Moreau X**, Thiéry A, Godeau G, Grinstaff MW, Barthélémy P. (2008) Amphiphilic copolymer for intracellular delivery of xenobiotics: *in vivo* studies in a freshwater invertebrate, the Mesostominae flatworm. *Bioconjugate Chemistry*. (sous presse).

Chapitres d'ouvrage

- (20) Casanova JP, **Moreau X**. (2006) Chaetognatha, Spadellidae - *Calispadella alata*. In: *Handbook of deep-sea hydrothermal vent fauna*. (Desbruyères D, Segonzac M, Bright M, Eds), *Denisia*, 18: 486.
- (21) De Jong L, **Moreau X**, Thiéry A. (2008) Expression of heat shock proteins as biomarker tool in aquatic invertebrates: actual knowledge and ongoing developments for the early detection of environmental changes and ecological risks. In: "Heat-Shock Proteins: International Research". F. Columbus (Ed), Nova Science Publishers, Inc., New York (sous presse).

PUBLICATIONS DE RANG B

(Comité de lecture)

- (22) Jeanningros R, Kulikov A, **Moreau X** (1999) Antidépresseurs et hormones thyroïdiennes : évidence pour une cible d'action commune au niveau de la neurotransmission sérotoninergique. *L'Encéphale*, 25: 56-61.

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT

LISTE DES TRAVAUX DE RECHERCHE

COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES

(Ordre chronologique, suivie de la lettre C pour Communication)

- (1C) Kulikov A, **Moreau X**, Jeanningros R. (1997) Influences de dysthyroïdies expérimentales sur le système sérotoninergique cérébral chez le Rat. 3^{ème} Colloque de la Société des Neurosciences, Bordeaux, 25-28 mai. *Communication affichée*
- (2C) **Moreau X**, Azorin J-M, Jeanningros R. (1997) Triiodothyronine red blood cell uptake in major depressed patients before and during antidepressant treatment. *Biological Psychiatry*, 42: 252S. 6th World Congress of Biological Psychiatry, Nice, 22-27 juin. *Communication affichée*
- (3C) Kulikov A, **Moreau X**, Jeanningros R. (1997) Antidepressant and thyroid hormones: evidence for a common target at the level of serotonergic neurotransmission in adult rat brain. *Annales d'Endocrinologie*, 58: 1562. 8th Meeting of the European Neuroendocrine Association, Marseille, 11-13 septembre. *Communication affichée*
- (4C) Kulikov A, **Moreau X**, Jeanningros R. (1998) Thyroid hormone deficiency, antidepressant administration and vulnerability to stress. 25th Annual meeting of the European Thyroid Association, Athènes (Grèce), 30 mai-3 juin. *Communication affichée*
- (5C) **Moreau X**, Siret C, Kulikov A, Mazzola P, Jeanningros R. (1998) Modifications par les hormones thyroïdiennes des effets des antidépresseurs sur les entités 5-HT centrales. 4^{ème} Colloque de la Société des Neurosciences, Marseille, 25-28 mai. *Communication affichée*
- (6C) Mazzola-Pomietto P, **Moreau X**, Jeanningros R. (2000) Triiodothyronine modulates the chronic effect of imipramine on cortical 5-HT_{2A} receptors in adult Wistar rats. 30th Annual meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans (USA), 4-9 novembre. *Communication orale*
- (7C) **Moreau X**, De Jong L, Barthélémy RM, Casanova JP. (2001) Mise en évidence et localisation immuno-histo-chimique de la sérotonine (5-Hydroxytryptamine) chez *Hemimysis margalefi* (Crustacea, Peracarida, Mysidacea). 2^{ème} Rencontre du Club de Neurobiologie des Invertébrés, 27-28 mai, Toulouse. *Communication affichée*
- (8C) **Moreau X**, De Jong L, Barthélémy RM, Casanova JP. (2001) The serotonergic nervous system in Mysidacea (Crustacea): Phylogenetic interest. 5th Evolutionary Biology Meeting, 27-30 juin, Marseille. *Communication affichée*

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT

LISTE DES TRAVAUX DE RECHERCHE

- (9C) **Moreau X, Benzid D, De Jong L, Barthélémy RM, Casanova JP. (2002)** Phylogenetic interest of the serotonergic nervous system in Mysidacea (Crustacea, Peracarida) 6th ICSEB, 8-17 septembre, Patras (Grèce). *Communication orale*
- (10C) **Benzid D, Moreau X, De Jong L, Barthélémy RM, Casanova JP. (2002)** Evidence for the presence of serotonin in the nervous system of Euphausiacea (Crustacea, Eucarida). 6th ICSEB, 8-17 septembre, Patras (Grèce). *Communication affichée*
- (11C) **Moreau X, De Jong L, Barthélémy RM, Benzid D, Thiéry A. (2002)** The cerebral serotonergic nervous system in Branchiopods: focus on the visual system. 6th ICSEB, 8-17 septembre, Patras (Grèce). *Communication affichée*
- (12C) **Benzid D, Moreau X, De Jong L, Casanova JP. (2003)** Serotonin-like immunoreactive neurones in the visual system of Euphausiacea (Crustacea, Eucarida): a phylogenetic tool. 7th Evolutionary Biology Meeting, 25-27 juin, Marseille. *Communication affichée*
- (13C) **Jean S, De Jong L, Moreau X, Thiéry A. (2003)** HSPs expression in Branchiopods (Crustacea): biomarker of stress adaptation and witness of evolution. 7th Evolutionary Biology Meeting, 25-27 juin, Marseille. *Communication affichée*
- (14C) **Léon V, Rabier J, Notonier R, Moreau X, Barthélémy RM, Bouraima-Madjebi S, Viano J, Pineau R. (2004)** Effet du nickel sur les semences d'une Proteaceae endémique au maquis minier néo-calédonien. *Symposium on French research in the Pacific*, 24-27 août, Nouméa. *Communication affichée*
- (15C) **Moreau X, De Jong L, Jean S, Scher O, Thiéry A. (2005)** Diagnostic précoce & Evaluation des stress. Congrès International 'Biodiversité : Science et Gouvernance', UNESCO, 24-28 janvier, Paris. *Communication affichée*
- (16C) **Thiéry A, Moreau X, De Jong L. (2005)** La Biodiversité dormante : une biodiversité sous-estimée. Congrès International 'Biodiversité : Science et Gouvernance', UNESCO, 24-28 janvier, Paris. *Communication affichée*
- (17C) **Saez G, Schembri T, Moreau X, Lagadec V, Thiéry A, De Jong L. (2006)** Mises au point d'un biomarqueur d'exposition chronique aux métaux pour la surveillance de la qualité des eaux fluviales en région méditerranéenne. *Colloque Euro-méditerranéen de Biodiversité Environnementale, Ecologie, Ecophysiologie et Ecotoxicologie*, 7-10 décembre, Marseille. *Mésogée*, vol 62, p. 39. *Communication affichée*
- (18C) **Moreau X, Moreau L, Barthélémy P, Thiéry A, De Jong L. (2006)** In vivo delivery of amphiphilic copolymers in an aquatic invertebrate. *Advances in Supramolecular Assemblies with Nucleic Acids Workshop IECB*, 16-17 octobre, Bordeaux. *Communication affichée*

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT

LISTE DES TRAVAUX DE RECHERCHE

- (19C) **Moreau X**, De Jong L, Thiéry A. (2007) Biomarqueurs et Bioindicateurs Environnementaux. Conférence invitée. INSERM U869, 2-3 Mai, Bordeaux. *Communication orale*
- (20C) **Aouadene A**, Di Giorgio C, De Méo M, **Moreau X**, De Jong L, Sarrazin L, Thiéry A, Botta A. (2007) Etude de l'activité génotoxique de sédiments issus de la rivière la Cadière (Bouches du Rhône). 50^{ème} Congrès de l'Association Française de Limnologie, 16-17 novembre, Toulouse. *Communication affichée*
- (21C) De Jong L, **Moreau X**, Jean S, Scher O, Thiéry A. (2007) L'expression des protéines de choc thermique Hsp70 dans les cellules chloracogènes de larves d'éphémères d'un bassin de rétention autoroutier : un biomarqueur de choc osmotique. 50^{ème} Congrès de l'Association Française de Limnologie, 12-15 novembre, Toulouse. *Communication affichée*
- (22C) Saez G, De Jong L, **Moreau X**, Sarrazin L, Wafo E, Schembri T, Lagadec V, Diana C, Thiéry A. (2007) Les protéines du système de Résistance MultiXénobiotiques (MXR) chez les larves de Chironome : Approche *in situ* dans la calibration d'un biomarqueur potentiel pour l'évaluation de la qualité des eaux d'une rivière urbaine méditerranéenne. 50^{ème} Congrès de l'Association Française de Limnologie, 16-17 novembre, Toulouse. *Communication affichée*
- (23C) De Jong L, **Moreau X**, Thiéry A, Godeau G, Grinstaff MW, Barthélémy P. (2007) Synthesis of an amphiphilic copolymer and investigations as a carrier for *in vivo* delivery in an aquatic invertebrate: a promising approach for new medical and ecotoxicological tools. 4^{ème} Journée Scientifique 'Biologistes, Chimistes, Physiciens : aux frontières du vivant', 3 décembre, Marseille.

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT

LISTE DES TRAVAUX DE RECHERCHE

CONTRATS

Moreau X, Pellegrini M. 1992/1993. Contrat Université-A.N.V.A.R.-Industrie (n° J 93 06 045 UJJ), Faculté des Sciences de Luminy/Entreprise associée : GOEMAR S.A. Saint Malo.

Thiéry A, **Moreau X.** & De Jong L. **2006/2007.** Contrat de recherche - Autoroutes ESCOTA.

MEMOIRES ET THESE

Moreau X, 1993. Mise au point d'un procédé de production de β -1.3-glucane en vue de son utilisation dans les mécanismes de défense cellulaire. *Contrat Université-ANVAR-Industrie. Rapport, 34pp.*

Moreau X, 1995. Perturbations du transport membranaire érythrocytaire de l'hormone thyroïdienne T3 dans les troubles dépressifs.
Mémoire de D.E.A., Aix-Marseille I, II, III. 30 pp.

Moreau X, 2000. Neurobiologie des interactions entre fonction thyroïdienne et troubles dépressifs : approche périphérique, chez l'Homme, au niveau du transport de la T3, approche chez l'animal, au niveau de la neurotransmission sérotoninergique centrale.
Thèse d'Université, Université de la Méditerranée, Aix-Marseille II. 221pp.

Thiéry A, **Moreau X,** De Jong L. **2007.** Diagnostic écologique des écosystèmes lotiques du Var recevant des effluents d'une chaussée autoroutière ESCOTA A8: détermination d'un point initial avant l'élargissement à 2 x 3 voies Châteauneuf-le-Rouge/Saint Maximin. *Rapport, 43pp.*

➤ **SYNTHESE DES ACTIVITES DE RECHERCHE**

• Recherches Pré-Doctorales	22
• Recherches Doctorales	26
• Recherches Post-Doctorales	50
• Thématique actuelle	66
• Projets Scientifiques	96

ACTIVITES DE RECHERCHE

Ce mémoire est le résultat de 15 années de recherches et de deux reconversions thématiques majeures qui ont été guidées par des changements d'équipes de recherche.

*Que ce soit chez les Mammifères, les Crustacés ou encore les Insectes, la démarche expérimentale est restée centrée autour de la mise au point et de l'utilisation de **biomarqueurs comme outils de diagnostic**. Ainsi, les **systèmes sérotoninergiques** sont proposés en tant que biomarqueurs d'une pathologie en **santé humaine**, ou en tant qu'outil de diagnostic des atteintes écologiques avec une **ouverture vers les protéines de stress et les atteintes au patrimoine génétique d'organismes 'modèles'**. Cette démarche s'est enrichie au cours du temps par des mises au point de ces outils de diagnostic offrant des aspects à la fois qualitatifs et quantitatifs utilisables chez les animaux et les végétaux.*

ACTIVITES DE RECHERCHE
RECHERCHES PRE-DOCTORALES

● RECHERCHES PRE-DOCTORALES

✓ CONTRAT DE RECHERCHE A.N.V.A.R.-UNIVERSITE-INDUSTRIE

Entre l'année de Maîtrise et celle du D.E.A., j'ai participé à un **contrat de recherche ANVAR-Université-Industrie** (n° J 93 06 045 UJJ) d'Aide aux Jeunes pour l'Innovation Technologique (Entreprise associée : Société Goëmar SA, S^t Malo). Ce contrat a été effectué sur une durée de 10 mois (de septembre 1992 à juin 1993) au Laboratoire de Biologie Marine Fondamentale et Appliquée, Faculté des Sciences de Luminy, Aix-Marseille II sous la direction du Dr M. Pellegrini.

Le sujet concernait la mise au point d'un procédé de production de β -1,3-glucane ou paramylon en vue de son utilisation dans les mécanismes de défense cellulaire. L'objectif de ce stage était de rechercher, pour l'industrie cosmétique, une nouvelle source végétale de polysaccharide, le β -1,3-glucane, et d'en étudier les conditions de production et d'extraction.

Les Euglènes, un groupe de Protistes situé à l'interface du règne animal et du règne végétal, sont capables de synthétiser de façon importante le paramylon lorsque la nature de la source carbonée assimilable est modifiée. Une population d'*Euglena gracilis*, a été mise en culture en faisant varier la photopériode et les sources carbonées.

L'analyse des micrographies obtenues en microscopie électronique à transmission, a démontré que ces micro-organismes étaient capables de synthétiser de façon importante et d'accumuler le paramylon lorsqu'ils étaient cultivés en hétérotrophie et en thermopériodes. Les investigations que j'ai menées ont aussi permis de montrer qu'il était possible d'extraire jusqu'à 80% du paramylon en lysant les Euglènes dans un mélange méthanol/chloroforme (1v/2v) et de purifier ce mélange en hydrolysant les débris cellulaires par de l'acide chlorhydrique 1N sous ébullition.

Ces résultats ont montré que **les Euglènes représentaient une source très concurrentielle des algues brunes pour la production de β -1,3-glucane.**

ACTIVITES DE RECHERCHE
RECHERCHES PRE-DOCTORALES

✓ **DIPLÔME D'ÉTUDES APPROFONDIES**

Les travaux réalisés dans le cadre de mon DEA de Neurosciences (option Neurobiologie-Neurophysiologie) avaient pour sujet : "**Recherches de perturbations du transport membranaire de l'hormone thyroïdienne T3 dans les troubles dépressifs**". Ces activités de recherche ont été menées au sein de l'équipe dirigée par le Dr R. Jeanningros à l'Unité 38 de l'INSERM (Faculté de Médecine-Timone, Aix-Marseille II).

A l'époque, de nombreuses données, tant cliniques que pharmacologiques, montraient une interaction entre la fonction thyroïdienne et les troubles de l'humeur¹ poussant de nombreuses équipes de recherches dans le monde à trouver ou mettre au point des **indices biologiques** pouvant être utilisés comme **outils de diagnostic de la pathologie dépressive** ou comme **outils prédictif de l'issue d'un traitement antidépresseur**. Cependant, les interactions entre fonction thyroïdienne et pathologie dépressive restaient inexplicées du point de vue neurobiologique.

L'hypothèse d'une **déficience de la neurotransmission sérotoninergique centrale dans la dépression** faisait l'objet d'un consensus². Nous savions que la synthèse de **sérotonine** (5-hydroxytryptamine ou 5-HT) cérébrale était étroitement dépendante de son précurseur, le tryptophane (TRP), un acide aminé essentiel. Or, il avait été démontré dans l'équipe de R. Jeanningros que le système de transport membranaire du TRP au niveau des érythrocytes, le système T, était altéré chez des patients souffrant de troubles dépressifs. La triiodothyronine, ou hormone thyroïdienne T3, est en interaction étroite avec le TRP au niveau de ce système T. L'objectif de mon DEA était donc de **rechercher d'éventuelles perturbations de la cinétique du transport membranaire érythrocytaire de la T3 chez des patients hospitalisés pour dépression**.

¹ Joffe RT (1990) A perspective on the thyroid and depression. *Can. J. Psychiatr.*, **35**: 754-758. Joffe RT, Sokolov STH. (1994) Thyroid hormones, the brain, and affective disorders. *Crit. Rev. Neurobiol.*, **8**: 45-63.

² Maes M, Meltzer HY (1995) The serotonin hypothesis of major depression. In: Bloom FE, Kupfer DJ (eds): *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. New York, Raven Press Ltd, 933-944.

ACTIVITES DE RECHERCHE

RECHERCHES PRE-DOCTORALES

Protocole : 21 patients souffrant de troubles dépressifs (19 dépressions majeures, 1 trouble bipolaire dépressif et 1 trouble dysthymique) ont participé à l'étude. Ils ont été comparés à 21 volontaires sains, dépourvus de tout traitement médicamenteux. Pour tous les patients, une période de sevrage des médications psychotropes d'au moins 7 jours précédant les premières investigations biologiques a été respectée, à l'exception de faibles doses de benzodiazépines à visée hypnotique (équivalentes à 10 mg de diazépam). Nous avons mesuré les **paramètres cinétiques du transport membranaire érythrocytaire de la T3**, V_{max} ou vitesse initiale maximale de l'influx intra-érythrocytaire et le K_m ou constante de Michaelis-Menten, chez les patients **avant tout traitement antidépresseur (J_0)**. Ces paramètres cinétiques ont aussi été mesurés **après 7 jours de traitement (J_7)** puis à **l'issue d'un mois de traitement (J_{28})**. A ce terme, les patients ont été définis comme "répondeurs" au traitement lorsque leur score de dépression, évalué grâce à l'échelle d'Hamilton (version 1967, 26 items), était diminué d'au moins 50% par rapport à la valeur avant traitement. Dans le cas contraire, ils étaient définis comme "non-répondeurs". En parallèle, les paramètres cinétiques du transport membranaire érythrocytaire du TRP ont été déterminés chez 11 de ces patients.

Au cours de cette étude, nous avons montré que le V_{max} de l'influx intra-érythrocytaire de T3, qui reflète le nombre de transporteurs, et le K_m , qui est inversement proportionnel à l'affinité du transporteur pour la T3, étaient tous deux significativement augmentés chez les patients déprimés avant traitement par rapport aux témoins. Ces paramètres cinétiques étaient **significativement augmentés à J_0 chez les patients qui ont répondu au traitement** alors que ce n'était pas le cas chez ceux qui n'ont pas répondu. Ce résultat laisse suggérer que les **paramètres cinétiques du transport membranaire érythrocytaire de la T3** pourraient être **prédictifs d'une réponse favorable** au traitement antidépresseur. A l'issue d'un mois de traitement antidépresseur, le V_{max} des patients répondeurs convergait vers la valeur témoin. Par contre, aucun des patients non-répondeurs n'avait un V_{max} à J_{28} proche de la valeur témoin : les V_{max} se répartissaient en 2 sous-groupes, l'un au dessus et l'autre en dessous de cette valeur. En ce qui concerne la constante de Michaelis-Menten, chez les

ACTIVITES DE RECHERCHE

RECHERCHES PRE-DOCTORALES

patients répondeurs, les Km, à J₂₈ présentait une nette tendance à se normaliser, rejoignant des valeurs témoins alors que chez les non-répondeurs cette normalisation ne s'observait pas, les valeurs de Km restaient très dispersées. Par ailleurs, chez les patients déprimés avant traitement antidépresseur, une corrélation positive significative a été observée entre le Vmax de l'influx intra-érythrocytaire de la T3 et celui du TRP.

Ce travail préliminaire a permis de mettre en évidence des modifications du nombre de transporteurs érythrocytaires de la T3 ainsi que des modifications de son affinité pour l'hormone thyroïdienne chez des patients souffrant de troubles dépressifs non traités par antidépresseur. Même si les résultats devaient être confirmés en raison du faible nombre de patients, ils suggéraient que les **paramètres cinétiques du transport membranaire érythrocytaire de la T3 pouvaient être utilisés comme outils de diagnostic de la pathologie dépressive**. Ils ont confirmé une perturbation du transport érythrocytaire du TRP, qui semble être similaire à celle observées pour le transport de la T3. Ils ont aussi permis de montrer que **les altérations de la capacité de transport érythrocytaire de la T3 et du TRP disparaissaient avec un traitement antidépresseur efficace**. Ce travail a démontré l'**existence** d'une cible membranaire périphérique, où interagissent la T3 et le TRP, qui est le siège de modifications lors de troubles dépressifs. Ce type d'interactions cellulaires permettait donc de **rendre compte des liens observés en clinique** entre un dysfonctionnement thyroïdien et pathologie dépressive.

Le travail effectué au cours de ce stage m'a permis d'obtenir le **DEA de Neurosciences** avec la mention **assez bien** en juin 1995.

ACTIVITES DE RECHERCHE
RECHERCHES DOCTORALES

● RECHERCHES DOCTORALES

Les activités de recherche au cours de la préparation de mon doctorat ont été menées au sein de l'équipe dirigée par le Dr R. Jeanningros d'abord à l'Unité 38 de l'INSERM (Faculté de Médecine-Timone, Aix-Marseille II, Dir. J. Torresani) puis à l'Unité 501 de l'INSERM (Faculté de Médecine-Nord, Aix-Marseille II, Dir O. Bosler). Mes recherches ont été financées par une bourse de recherche de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille.

Ces recherches avaient pour objectif d'élucider les mécanismes biologiques qui sous-tendent les **interactions entre les troubles dépressifs, les systèmes sérotoninergiques et la fonction thyroïdienne**. Elles comportaient 2 volets. Le premier volet a consisté à rechercher des perturbations des paramètres cinétiques du transport membranaire érythrocytaire de la T3 chez des patients souffrant de troubles dépressifs majeurs unipolaires et suivre l'évolution de ces paramètres cinétiques au cours d'un traitement antidépresseur. Cette première partie faisait suite au travail que j'avais effectué au cours de mon stage de DEA l'année précédente. Le second volet avait pour but de mieux comprendre, par une approche expérimentale chez l'animal au niveau de la neurotransmission sérotoninergique cérébrale, ce que l'on observe chez les sujets souffrant de troubles dépressifs avant, au cours et après un traitement antidépresseur.

Mes recherches ont eu pour objectif de clarifier les **mécanismes neurobiologiques** qui sous-tendent les interactions entre la fonction thyroïdienne et la **pathologie dépressive**. Au travers de cette compréhension, il s'agissait de mettre en évidence des **indices de diagnostic biologique de troubles dépressifs** et de trouver des **marqueurs biologiques permettant de pronostiquer de façon précoce l'issue d'un traitement antidépresseur**. Elles comportaient deux axes d'investigations. Le premier concernait l'étude du transport membranaire érythrocytaire de l'hormone thyroïdienne active, la triiodothyronine (T3), chez l'Homme

ACTIVITES DE RECHERCHE
RECHERCHES DOCTORALES

souffrant de troubles dépressifs. Le second axe d'investigations, réalisées chez l'animal, concernait l'impact des hormones thyroïdiennes sur les effets d'un traitement antidépresseur chronique au niveau d'entités cellulaires concourant à la **neurotransmission sérotoninergique cérébrale**. Ces travaux ont donné lieu à **six publications (1-5, 20)** et à 6 communications (**1C-6C**).

Contexte des recherches :

De nombreuses observations cliniques attestaient des effets étiopathogéniques et thérapeutiques des hormones thyroïdiennes dans les troubles dépressifs. Cependant, les mécanismes neurobiologiques qui sous-tendaient ces interactions étaient encore mal compris.

ACTIVITES DE RECHERCHE
RECHERCHES DOCTORALES

1) Transport membranaire érythrocytaire de la T3 chez des patients déprimés : Outil de diagnostic ?

L'implication des systèmes sérotoninergiques centraux dans la physiopathologie et le traitement des troubles dépressifs est bien établie. La synthèse de **sérotonine (5-HT)** cérébrale dépend de la disponibilité plasmatique de son précurseur, le tryptophane (TRP). Or, au cours de mon travail de DEA, j'avais confirmé que le transport membranaire érythrocytaire du TRP était perturbé lors des troubles dépressifs. L'hormone thyroïdienne T3 étant en interaction étroite avec le TRP au niveau de ce système, j'ai recherché des **perturbations des paramètres cinétiques**, vitesse maximale (V_{max}) et constante de Michaelis-Menten (K_m), du **transport membranaire érythrocytaire de la T3 chez des patients hospitalisés pour dépression majeure unipolaire** avant traitement antidépresseur (J_0). L'évolution de ces paramètres cinétiques a été ensuite suivie au cours d'un traitement antidépresseur chronique, après une semaine de traitement (J_7) et à l'issue d'un mois de traitement (J_{28}).

J'ai confirmé les résultats que j'avais obtenus au cours de mon DEA sur un plus grand nombre de patients : les paramètres cinétiques de l'influx érythrocytaire de la T3, V_{max} et K_m , étaient significativement augmentés chez les patients déprimés non traités par rapport aux témoins. Ces résultats semblaient confirmer que les **paramètres cinétiques du transport membranaire érythrocytaire de la T3** pouvaient être **utilisés comme outils de diagnostic de la pathologie dépressive**. En comparant les paramètres cinétiques du transport membranaire érythrocytaire du TRP chez ces mêmes patients, j'ai confirmé que les valeurs de V_{max} de l'influx érythrocytaire du TRP étaient positivement corrélées à celles de V_{max} de l'influx érythrocytaire de T3. Il existait donc bien une interaction fonctionnelle entre ces deux transports au niveau de la membrane du globule rouge.

ACTIVITÉS DE RECHERCHE
RECHERCHES DOCTORALES

(1) **Moreau X**, Azorin JM, Maurel M, Jeanningros R. (1998) Increase in red blood cell triiodothyronine uptake in unipolar major depressed patients compared to healthy volunteers. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 22: 293-310.
(IF₂₀₀₆ 2.584)

ACTIVITES DE RECHERCHE
RECHERCHES DOCTORALES

Ensuite, **au cours d'un traitement antidépresseur**, j'ai déterminé les paramètres cinétiques après une semaine de traitement (J_7), à un moment où l'antidépresseur n'a pas encore prouvé son efficacité. Une **réactivité précoce** des paramètres cinétiques de l'influx intra-érythrocytaire de la T3 pouvait elle **prédire une réponse clinique ultérieure favorable du patient**, qui ne se manifeste généralement que 3 semaines plus tard (J_{28}) ? En fait, j'ai pu montrer que **des variations importantes du nombre de transporteurs érythrocytaires au cours de la 1^{ère} semaine pouvaient être prédictives d'une non-réponse au traitement** (Figure 4). En effet, le pourcentage de variation du V_{max} entre J_0 et J_7 , c'est-à-dire le V_{max} , s'est avéré être significativement plus élevé chez les non-répondeurs au traitement que chez les répondeurs. D'un point de vue physiologique, ces variations pourraient refléter des tentatives, infructueuses, de réajustement métabolique du système de transport en réponse au traitement pharmacologique.

Enfin, les paramètres cinétiques ont été déterminés à J_{28} et je les ai analysés en relation avec l'amélioration clinique des patients. Après quatre semaines de traitement antidépresseur, les **perturbations du transport de la T3 ne se corrigeaient que chez les patients cliniquement améliorés**. Les **perturbations de transport érythrocytaire de la T3**, qui ont été observées avant le traitement antidépresseur, n'étaient donc pas un épiphénomène de l'état dépressif. Elles étaient donc **étroitement liées à la symptomatologie dépressive**. L'altération du transport érythrocytaire de la T3 constatée après traitement chez les patients cliniquement non répondeurs signait probablement la persistance d'une situation métabolique perturbée au regard de la T3. Etant donné que les transports de la T3 et du TRP sont en interaction fonctionnelle étroite, les perturbations du transport de la T3, qui subsistent chez les patients non-répondeurs à l'issue du traitement, pourraient avoir des répercussions sur le transport du TRP, et par voie de conséquence sur la disponibilité plasmatique du TRP. Or, il a été montré que la disponibilité plasmatique du TRP est une condition indispensable au maintien de l'efficacité thérapeutique des antidépresseurs, en particulier ceux ayant un mode d'action sérotoninergique. Il se pourrait que ce soit aussi une condition préalable nécessaire à leur efficacité. Par ailleurs, les patients qui avaient répondu favorablement à l'antidépresseur avaient, à J_0 , un nombre de transporteurs plus élevé que les

ACTIVITES DE RECHERCHE
RECHERCHES DOCTORALES

témoins, alors que chez les non-répondeurs le nombre de transporteurs n'était pas différent de celui des témoins. La **réponse au traitement peut être pronostiquée dès J₀ sur la base du nombre de transporteurs érythrocytaires à la T3** (Figure 4).

L'ensemble de ces résultats plaidait en faveur de l'utilisation des **paramètres cinétiques du transport membranaire érythrocytaire de la T3 et du TRP comme un indicateur biologique** pouvant aider le clinicien dans le choix de l'antidépresseur à prescrire.

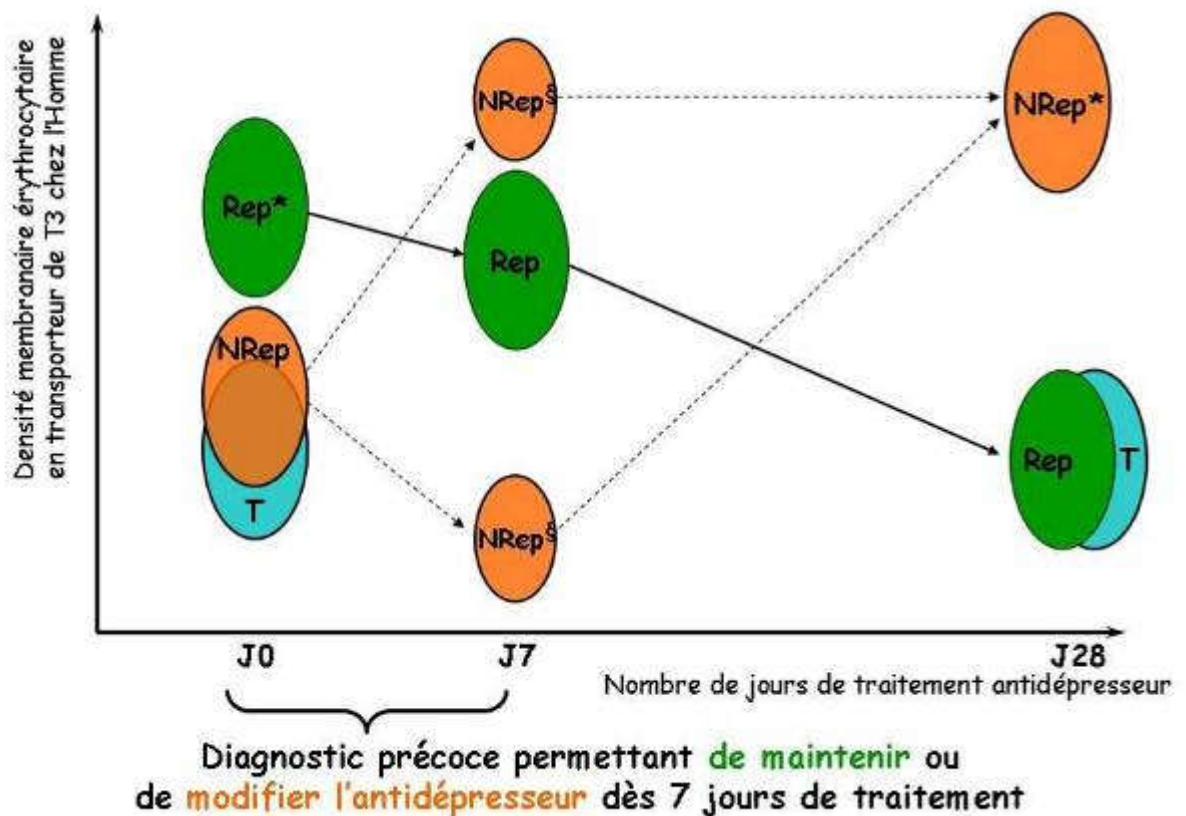


Figure 4 : Diagramme résumant les principaux résultats obtenus au cours de la 1^{ère} partie de mon doctorat concernant l'étude du transport membranaire érythrocytaire de la triiodothyronine chez des patients souffrant de troubles dépressifs majeurs unipolaires. NRep : Non-répondeurs au traitement antidépresseur. Rep : Répondeurs au traitement antidépresseur. * : significativement différent des témoins (T). ^s : significativement différent par rapport à J₀.

ACTIVITES DE RECHERCHE
RECHERCHES DOCTORALES

(4) Moreau X, Azorin JM, Lejeune PJ, Jeanningros R. (2000) Red blood cell triiodothyronine uptake in unipolar major depression: effect of a chronic antidepressant treatment. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 24: 23-35.
(IF₂₀₀₆ 2.584)

(2C) Moreau X, Azorin J-M, Jeanningros R, 1997. Triiodothyronine red blood cell uptake in major depressed patients before and during antidepressant treatment. *Biological Psychiatry*, 42: 252S. 6th World Congress of Biological Psychiatry, Nice, 22-27 juin.

ACTIVITES DE RECHERCHE
RECHERCHES DOCTORALES

2) Etude du transport membranaire érythrocytaire de la T3 lors de perturbations du statut thyroïdien

La **réactivité du système de transport érythrocytaire de la T3** a été examinée lors de **variations importantes des taux plasmatiques des hormones thyroïdiennes**. Le but de ce travail était donc d'**analyser les répercussions d'une hypothyroïdie et d'une hyperthyroïdie expérimentalement induites chez le Rat sur le système de transport de la T3**. Les résultats obtenus ont montré que la cinétique était augmentée chez les rats thyroïdectomisés, c'est à dire lors d'une hypothyroïdie sévère. Un rétablissement d'un état euthyroïdien par une supplémentation en T4 chez des rats thyroïdectomisés induisait une normalisation de la cinétique du transport de la T3. Lors d'une importante élévation des taux plasmatiques des hormones thyroïdiennes, la cinétique de transport était diminuée. Les globules rouges accroissent donc leur capacité à capter la T3 en augmentant le nombre de transporteurs membranaires accessibles lors d'une hypothyroïdie. Au contraire, ils réagissent à l'élévation importante des taux plasmatiques en hormones thyroïdiennes en diminuant leur capacité de capture. **Les modifications de l'influx érythrocytaire pourraient être considérées comme un mécanisme adaptatif compensatoire** des variations des taux hormonaux dans le plasma.

ACTIVITÉS DE RECHERCHE
RECHERCHES DOCTORALES

(3) **Moreau X**, Lejeune P-J, Jeanningros R. (1999) Kinetics of red blood cell T3 uptake in hypothyroidism with or without hormonal replacement, in the rat. *Journal of Endocrinological Investigation*, 22: 257-261.

(IF₂₀₀₆ 1.469)

ACTIVITES DE RECHERCHE
RECHERCHES DOCTORALES

Dans un second temps, j'ai cherché à savoir si, chez des patients présentant une hypothyroïdie primaire, les paramètres cinétiques du transport érythrocytaire de la T3 étaient augmentés, comme nous l'avions précédemment montré chez l'animal thyroïdectomisé.

J'ai également mesuré chez ces patients les paramètres cinétiques du transport érythrocytaire du TRP afin de rechercher d'éventuelles perturbations concomitantes de la cinétique de ce transport.

Les résultats ont montré que la vitesse initiale maximale de l'influx érythrocytaire de la T3, c'est-à-dire la densité des transporteurs érythrocytaire de T3, était significativement augmentée chez les patients hypothyroïdiens par rapport aux témoins. Par contre, si la densité des transporteurs du TRP n'avait pas varié chez les patients hypothyroïdiens, la constante de Michaelis-Menten était significativement diminuée chez les patients hypothyroïdiens. D'un point de vue physiologique, il a été suggéré que, chez l'Homme comme chez le Rat, les globules rouges s'adaptaient à la diminution des taux plasmatiques de T3 par une élévation de la densité des transporteurs de la T3. Les transporteurs membranaires pourraient être sollicités en quantité plus importante en réponse à une diminution des taux plasmatiques en hormones thyroïdiennes. Les globules rouges se comporteraient probablement comme un système tampon réglant l'approvisionnement des tissus cibles en T3. En ce qui concerne le système de transport érythrocytaire du TRP, une augmentation de l'affinité du système T pour le TRP a été observée chez les patients hypothyroïdiens. Ceci aurait donc des répercussions sur l'influx de TRP et donc indirectement sur sa disponibilité plasmatique. La disponibilité cérébrale du TRP, qui dépend exclusivement de sa disponibilité au niveau périphérique, pourrait être modifiée lors d'une hypothyroïdie et, par voie de conséquence, induire des perturbations de la neurotransmission sérotoninergique centrale.

Ainsi, de part leur interaction mutuelle au niveau de la membrane érythrocytaire, les **altérations des transports de la T3 et du TRP** pouvaient retentir sur leur **disponibilité systémique**, dont dépend l'**approvisionnement** des tissus cibles, et notamment du **cerveau**.

ACTIVITES DE RECHERCHE
RECHERCHES DOCTORALES

3) Impact d'une hypothyroïdie expérimentale sur la neurotransmission sérotoninergique cérébrale chez le Rat adulte

Les intrications entre dysthyroïdies et troubles de l'humeur étaient bien connues en clinique mais n'avaient pas encore reçu d'explications sur le plan biologique. Ainsi, malgré le peu de travaux disponibles dans la littérature concernant les effets des hormones thyroïdiennes sur la neurotransmission sérotoninergique centrale, un certain nombre de données biologiques (tests hormonaux à la prolactine et au cortisol après administration d'un agent sérotoninergique) et comportementales plaident en faveur d'**une diminution de l'activité 5-HT centrale lors d'une hypothyroïdie**. D'autres données indiquaient qu'une hypothyroïdie favorisait la symptomatologie dépressive en induisant des perturbations de la neurotransmission 5-HT. Avec les membres de l'équipe, nous avons analysé, chez le Rat adulte, les **répercussions d'une hypothyroïdie sévère sur plusieurs entités cellulaires concourant à la neurotransmission 5-HT cérébrale**, dans la mesure où elles sont le *siège d'altérations lors des troubles dépressifs*, et sont des *cibles privilégiées pour les antidépresseurs*.

Nous avons évalué les conséquences d'une hypothyroïdie primaire sur plusieurs entités cellulaires concourant à la neurotransmission sérotoninergique, et qui ont été examinées en parallèle chez le même animal. Nous avons utilisé des rats thyroïdectomisés puis nourris avec un régime carencé en iode pendant un mois. Nous les avons comparés à des rats opérés à blanc. Au niveau pré-synaptique, nous avons mesuré la **densité membranaire des autorécepteurs 5-HT1A et des transporteurs de la 5-HT somato-dendritiques**, ainsi que **l'activité de la tryptophane hydroxylase**, enzyme constituant l'étape limitante de la synthèse de 5-HT, au niveau des corps cellulaires et des terminaisons corticales et hippocampiques des neurones sérotoninergiques. Au niveau post-synaptique, nous avons mesuré la **densité membranaire des récepteurs 5-HT1A hippocampiques et celle des récepteurs 5-HT2A corticaux**.

ACTIVITES DE RECHERCHE
RECHERCHES DOCTORALES

Nous avons montré qu'une **hypothyroïdie sévère** (Rat thyroïdectomisé) s'accompagnait d'une nette **diminution de la densité membranaire des récepteurs 5-HT2A corticaux**. En revanche, le nombre des autres entités membranaires 5-HT pré- ou post-synaptiques étudiées, ainsi que l'activité de la tryptophane hydroxylase aux niveaux somato-dendritique et terminal, n'étaient pas modifiés. La diminution de la densité des récepteurs 5-HT2A corticaux que nous avons observée résultait d'un **effet délétère, causé par l'absence d'hormones thyroïdiennes, sur l'intégrité structurale des neurones**. Après traitement hormonal de substitution destiné à rétablir des taux corrects d'hormones thyroïdiennes circulantes chez les rats thyroïdectomisés, le nombre de récepteurs 5-HT2A corticaux s'était normalisé. Ce résultat démontrait que c'était bien l'*absence d'hormones thyroïdiennes qui était responsable de la diminution de leur nombre dans le cortex*. Ces données indiquaient que les hormones thyroïdiennes exerçaient un contrôle tonique sur la densité des récepteurs 5-HT2A corticaux. Nous avons également observé que l'induction d'un état hyperthyroïdien par administration de fortes doses de T4 n'avait pas affecté la densité des récepteurs 5-HT2A corticaux par rapport aux animaux normothyroïdiens, ni le nombre des autres entités membranaires 5-HT pré- ou post-synaptiques étudiées, ainsi que l'activité de la tryptophane hydroxylase.

Les données obtenues ont permis de mieux comprendre pourquoi 40% des patients souffrant d'une hypothyroïdie primaire présentent des troubles dépressifs associés et pourquoi ces symptômes disparaissent généralement avec l'amendement du trouble thyroïdien. En effet, les altérations de la neurotransmission sérotoninergique présentes chez les patients hypothyroïdiens, pourraient être sous-tendues, au moins partiellement, par une perte de récepteurs 5-HT2A corticaux.

ACTIVITES DE RECHERCHE
RECHERCHES DOCTORALES

(2) Kulikov A, **Moreau X**, Jeanningros R. (1999) Effects of experimental hypothyroidism on 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} receptors, 5-HT uptake sites and tryptophan hydroxylase activity in mature rat brain. *Neuroendocrinology*, 69: 453-459.

(IF₂₀₀₆ 2.68)

(1C) Kulikov A, **Moreau X**, Jeanningros R, 1997. Influences de dysthyroïdies expérimentales sur le système sérotoninergique cérébral chez le Rat. 3^{ème} Colloque de la Société des Neurosciences, Bordeaux, 25-28 mai

(4C) Kulikov A, **Moreau X**, Jeanningros R. 1998. Thyroid hormone deficiency, antidepressant administration and vulnerability to stress. 25th Annual meeting of the European Thyroid Association, Athènes (Grèce), 30 mai-3 juin.

ACTIVITES DE RECHERCHE
RECHERCHES DOCTORALES

4) Impact des hormones thyroïdiennes sur les effets d'un traitement antidépresseur au niveau de la neurotransmission sérotoninergique cérébrale

Les résultats des essais cliniques qui démontraient l'**efficacité thérapeutique de la T3**, et notamment sa capacité à accélérer l'apparition de la réponse clinique favorable à un traitement antidépresseur, avaient été obtenus en administrant la T3 à des doses faibles. C'est associée aux antidépresseurs tricycliques, et en particulier à l'imipramine, que la T3 a prouvé son efficacité en étant capable d'enclencher une réponse clinique favorable chez les patients résistants au traitement antidépresseur. De plus, la T3 s'avérait parfois capable de raccourcir le délai d'action de l'antidépresseur.

L'objectif de cette partie de mon doctorat était d'analyser, chez le Rat sain, les conséquences de l'administration de T3 à faible dose, administrée à dose équivalente à celle utilisée en clinique chez l'Homme, en association à l'imipramine pendant une et trois semaines, sur les effets engendrés par l'antidépresseur au niveau d'entités membranaires sérotoninergiques qui sont des cibles privilégiées pour les antidépresseurs. J'ai déterminé, en parallèle sur le même animal, la densité des transporteurs de la 5-HT mésencéphaliques et hypothalamiques, celle des récepteurs 5-HT_{1A} hippocampiques et celle des récepteurs 5-HT_{2A} corticaux. J'ai comparé les effets obtenus par un traitement par l'imipramine associée à la T3, pendant 7 et 21 jours, avec ceux produits par l'administration d'imipramine seule, ou de T3 seule.

J'ai mis en évidence que la **T3 potentialisait l'effet de l'imipramine** en amplifiant la diminution de la densité des récepteurs 5-HT_{2A} corticaux après 3 semaines de traitement. De plus, **elle accélérerait cet effet** en réduisant, dès 7 jours de traitement, la densité de ces récepteurs avec la même amplitude que celle qui était observée seulement après 21 jours de traitement avec l'imipramine seule. Cette association T3-imipramine supprimait l'augmentation de la densité des récepteurs 5-HT_{1A} hippocampiques qui était produite par

ACTIVITES DE RECHERCHE
RECHERCHES DOCTORALES

l'antidépresseur administré seul. En outre, j'ai montré qu'un traitement chronique avec la T3 administrée seule entraînait une diminution du nombre de transporteurs mésencéphaliques de la sérotonine, similaire à celle produite par l'imipramine seule. En revanche, quel que soit le traitement, le nombre de transporteurs n'était pas modifié au niveau des terminaisons hypothalamiques. Ces résultats ont montré que *la T3 était capable de moduler les effets des antidépresseurs au niveau de la neurotransmission 5-HT*. Son action sur la diminution de la densité des récepteurs 5-HT_{2A} corticaux induite par l'imipramine fournit des éléments de compréhension quant à ses **effets accélérateurs et potentialisateurs sur la réponse thérapeutique** observée chez les patients souffrant de troubles dépressifs.

ACTIVITES DE RECHERCHE
RECHERCHES DOCTORALES

(5) **Moreau X**, Jeanningros R, Mazzola-Pomietto P. (2001) Chronic effects of triiodothyronine in combination with imipramine on 5-HT transporter, 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in adult rat brain. *Neuropsychopharmacology*, 24: 652-662.

(IF₂₀₀₆ 5.889)

(20) Jeanningros R, Kulikov A, **Moreau X** (1999) Antidépresseurs et hormones thyroïdiennes : évidence pour une cible d'action commune au niveau de la neurotransmission sérotoninergique. *L'Encéphale*, 25: 56-61.

(3C) Kulikov A, **Moreau X**, Jeanningros R, 1997. Antidepressant and thyroid hormones: evidence for a common target at the level of serotonergic neurotransmission in adult rat brain. *Annales d'Endocrinologie*, 58: 1S62. 8th Meeting of the European Neuroendocrine Association, Marseille, 11-13 septembre.

(5C) **Moreau X**, Siret C, Kulikov A, Mazzola P, Jeanningros R. 1999. Modifications par les hormones thyroïdiennes des effets des antidépresseurs sur les entités 5-HT centrales. 4^{ème} Colloque de la Société des Neurosciences, Marseille, 25-28 mai.

ACTIVITES DE RECHERCHE

RECHERCHES DOCTORALES

5) Conséquences d'une privation d'iode sur les effets d'un traitement chronique avec l'imipramine administrée seule ou associée à la T3 au niveau des systèmes sérotoninergiques cérébraux chez le Rat adulte

La T3 a surtout prouvé son efficacité chez les patients résistants, où, associée à l'imipramine, elle permet d'enclencher une réponse clinique favorable^{1,2}. Or, ces patients présentent fréquemment une hypothyroïdie infraclinique, c'est-à-dire d'origine cérébrale avec un test TRH augmenté, les taux plasmatiques de T3, de T4 et de TSH étant normaux. Ces patients représentent 29% à 75% patients résistants selon l'étude considérée. De plus, la présence d'une **hypothyroïdie infraclinique** chez les patients déprimés constitue un **facteur de résistance aux antidépresseurs**³.

L'objectif de ce travail était d'**induire, chez l'animal, un état d'hypothyroïdie centrale modérée** de nature à simuler l'hypothyroïdie infraclinique rencontrée chez les patients résistants, et d'en **évaluer les répercussions sur la densité de certains récepteurs sérotoninergiques** à savoir les récepteurs 5-HT2A corticaux et les récepteurs 5-HT1A hippocampiques. Le second objectif était de déterminer si un **traitement de 3 semaines par l'imipramine** induisait, **chez les rats carencés en iode**, les mêmes effets au niveau des récepteurs 5-HT2A corticaux et des récepteurs 5-HT1A hippocampiques que chez les rats normaux. Le troisième objectif de cette étude était d'**évaluer, chez les rats carencés en iode, les conséquences de l'adjonction de T3 à faible dose** sur les effets engendrés par un traitement chronique à l'imipramine, au niveau de la densité des récepteurs 5-HT2A corticaux et des récepteurs 5-HT1A hippocampiques. Nous avons également comparé, sur ces récepteurs, les effets d'une **administration chronique de l'hormone seule**.

Les résultats obtenus ont mis en évidence que cet état d'hypothyroïdie centrale modérée ne modifiait pas la densité des récepteurs 5-HT2A corticaux et 5-HT1A hippocampiques. Par contre, après 3 semaines de traitement chronique avec l'imipramine, nous n'observions plus,

¹ Prange AJ, Wilson IC, Rabon AM, Lipton MA (1969) Enhancement of imipramine antidepressant activity by thyroid hormone. *Am. J. Psychiatr.*, **126**: 39-51.

² Aronson R, Offman HJ, Joffe RT, Naylor CD (1996) Triiodothyronine augmentation in the treatment of refractory depression. A meta-analysis. *Arch. Gen. Psychiatr.*, **53**: 842-848.

³ Maes M, Meltzer HY, Cosyns P, Suy E, Schotte C (1993) An evaluation of basal hypothalamic-pituitary-thyroid axis function in depression: results of a large-scaled and controlled study. *Psychoneuroendocrinology*, **18**: 607-620.

ACTIVITES DE RECHERCHE

RECHERCHES DOCTORALES

chez les rats présentant cet état d'hypothyroïdie centrale modérée, les variations du nombre des récepteurs 5-HT_{2A} corticaux et des récepteurs 5-HT_{1A} hippocampiques classiquement constatées chez les rats normaux.

Discussion

En conduisant ces expérimentations, nous voulions tenter de comprendre les mécanismes neurobiologiques qui sous-tendent les intrications fréquentes entre hypothyroïdie infraclinique et résistance aux antidépresseurs. Nous cherchions également à expliquer l'efficacité de la T₃, lorsqu'elle est associée à l'antidépresseur, dans le traitement des dépressions résistantes.

Après un régime carencé en iode de 5 semaines, seuls les taux plasmatiques de T₄ étaient diminués, les taux de T₃ restant inchangés. Les animaux étaient donc dans un état thyroïdien peu modifié en périphérie puisque la disponibilité plasmatique de l'hormone active, la T₃, était préservée, et par voie de conséquence, son approvisionnement aux tissus cibles. L'administration d'un régime carencé en iode durant une période brève n'a, en général, pas d'influence sur le statut thyroïdien¹. En effet, l'organisme possède la capacité de circonvier à une brève carence en iode par la libération des hormones thyroïdiennes qui sont stockées dans les cellules folliculaires de la glande thyroïde. Seule une privation prolongée d'iodure a des répercussions sur le statut thyroïdien. L'administration prolongée d'un régime déficient en iode conduit à une diminution de l'iodation de la thyroglobuline dans la glande et à une augmentation du rapport T₃/T₄². L'augmentation de ce rapport peut être la conséquence, soit de la seule réduction des taux de T₄, soit d'une diminution des taux de T₄ et de T₃, la diminution des concentrations en hormones étant alors plus importante pour la T₄ que pour la T₃¹. Les données ci-dessus suggèrent que la synthèse de T₃ comme l'activité de la 5'-D-I au niveau des organes périphériques sont augmentées afin de maintenir constants les taux plasmatiques de l'hormone active. Par ailleurs, chez les rats nourris avec un régime carencé en

¹ Joffe RT, Sokolov STH (1994) Thyroid hormones, the brain, and affective disorders. *Critical Reviews in Neurobiology*, 8: 45-63.

² Dratman MB (1993) Cerebral versus peripheral regulation and utilization of thyroid hormones. In: Joffe RT, Levitt AJ (eds): *The Thyroid Axis and Psychiatric Illness*. Washington, American Psychiatric Press Inc, pp. 3-94.

ACTIVITES DE RECHERCHE

RECHERCHES DOCTORALES

iode pendant cette même durée, les indices de l'activité thyroïdienne, comme la consommation basale d'oxygène, la réponse métabolique au froid et le maintien de la température corporelle lors d'un refroidissement de l'environnement, étaient normaux. De plus, dans notre étude, la croissance des animaux nourris avec un régime carencé en iode était identique à celle des animaux nourris avec un régime standard. L'ensemble de ces données indiquait que les rats carencés en iode pouvaient être considérés comme euthyroïdiens au niveau périphérique.

En revanche, les répercussions d'un régime carencé en iode ne sont pas du même ordre sur les concentrations des hormones thyroïdiennes dans le cerveau. Seuls 10 à 15% de la T3 cérébrale sont issus du compartiment sanguin et traversent la barrière hémato-encéphalique. De ce fait, la grande majorité de la T3 cérébrale résulte de la désiodation locale de la T4 qui, elle, provient en totalité du plasma¹. Aussi, les concentrations plasmatiques de T4 sont un bon indicateur de l'état thyroïdien du cerveau. Dans notre étude, les concentrations plasmatiques de T4 chez les rats carencés en iode étaient 2,6 fois plus faibles que celles des rats nourris avec le régime standard. De ce fait, on pouvait raisonnablement penser que l'approvisionnement cérébral en T4 était nettement diminué. Or, l'administration durant 8 semaines d'un régime déficient en iode chez de jeunes rates produit une diminution drastique des concentrations de T3 et de T4 dans le cortex et l'hippocampe². La réduction des taux de T4 était supérieure à 90%. Les effets de ce régime étaient moins importants sur les taux de T3, de l'ordre de 50%, et dépendaient de la structure cérébrale. Cependant, la durée, l'amplitude de la déficience en iode, ainsi que le sexe des animaux utilisés dans cette étude et dans la nôtre ne sont pas les mêmes. Nous avons utilisé des rats mâles. Il est bien connu que les rats mâles sont moins sensibles à une privation d'iode que les rats femelles. De plus, la privation imposée à nos animaux n'a duré que 5 semaines. Toutefois, le régime alimentaire que nous avons sélectionné contenait moins de 25 µg/kg d'iode tandis que celui utilisé par Campos-Barros et ses collaborateurs (1997)² en contenait 50 µg/kg.

L'ensemble de ces données laissait à penser que nos animaux carencés en iode étaient

¹ Dratman MB (1993) Cerebral versus peripheral regulation and utilization of thyroid hormones. In: Joffe RT, Levitt AJ (eds): *The Thyroid Axis and Psychiatric Illness*. Washington, American Psychiatric Press Inc, pp. 3-94.

² Campos-Barros A, Meinhold H, Walzog B, Behne D (1997) Effects of selenium and iodine deficiency on thyroid hormone concentrations in the central nervous system of the rat. *Eur. J. Endocrinol.*, **136**: 316-323.

ACTIVITES DE RECHERCHE
RECHERCHES DOCTORALES

déficitaires en T3 et en T4 au niveau cérébral et étaient donc dans un état d'hypothyroïdie centrale modérée proche de l'hypothyroïdie infraclinique présentée par les patients déprimés.

Nos résultats ont mis en évidence que la densité des récepteurs 5-HT_{2A} corticaux et celle des récepteurs 5-HT_{1A} hippocampiques étaient préservées chez les rats carencés en iode par rapport aux rats normaux. Nos précédentes données recueillies chez les rats thyroïdectomisés indiquaient que seule une déficience sévère en T3 et T4 induisait une perte de récepteurs 5-HT_{2A} (**publication 2** : Kulikov et al., 1999). Quant à l'absence de modification de la densité des récepteurs 5-HT_{1A} hippocampiques, elle n'était pas surprenante dans la mesure où nous avons précédemment observé qu'une hypothyroïdie sévère était sans effet sur leur nombre.

Alors que lors d'une carence en iode la densité de ces deux sous-types de récepteurs n'était pas modifiée à l'état basal, en revanche, les effets biologiques de l'imipramine sur ces entités étaient bloqués. Après 3 semaines de traitement chronique avec l'imipramine, nous n'observions plus, chez les rats carencés en iode, les variations du nombre des récepteurs 5-HT_{2A} corticaux et 5-HT_{1A} hippocampiques classiquement constatées chez les rats normaux. En effet, les données de la littérature ainsi que nos propres résultats (**publication 5** : Moreau et al., 2001), montraient que, chez les rats normaux, l'administration chronique d'imipramine entraîne une réduction de la densité membranaire des récepteurs 5-HT_{2A} corticaux et une augmentation de celle des récepteurs 5-HT_{1A} hippocampiques¹.

Les mécanismes qui sont responsables de l'absence de réactivité des récepteurs au traitement antidépresseur chronique sont encore inconnus. Chez les animaux normaux, donc euthyroïdiens, l'administration de désipramine, le métabolite de l'imipramine, active la conversion cérébrale de T4 en T3 en augmentant l'activité de la 5'-DII². Or, seuls 70 à 80% des récepteurs nucléaires à la T3 sont saturés dans les conditions physiologiques. Il est

¹ Maj J, Bijak M, Dziedzicka-Wasylewska M, Rogóz R, Rogóz Z, Skuza G. (1996) The effects of paroxetine given repeatedly on the 5-HT receptor subpopulations in the rat brain. *Psychopharmacology*, **127**: 73-82

² Campos-Barros A, Meinhold H, Walzog B, Behne D (1997) Effects of selenium and iodine deficiency on thyroid hormone concentrations in the central nervous system of the rat. *Eur. J. Endocrinol.*, **136**: 316-323.

ACTIVITES DE RECHERCHE

RECHERCHES DOCTORALES

possible que la T3 cérébrale ainsi produite enclenche, par sa liaison aux récepteurs nucléaires, une cascade d'événements moléculaires qui induise une modification des taux d'expression de certaines protéines impliquées dans le contrôle de la plasticité neuronale. D'ailleurs, l'administration chronique d'antidépresseur est capable d'induire une augmentation de l'expression génomique et protéique de facteurs de transcription et de croissance neuronale¹. Lors d'un état d'hypothyroïdie centrale, il se pourrait que l'antidépresseur ne puisse pas suffisamment augmenter les taux cérébraux de T3, ce qui empêcherait les cascades moléculaires déclenchées par l'hormone de se produire.

Nos résultats montraient que, chez les rats carencés en iode, même si à l'état basal le nombre des récepteurs n'était pas modifié, la perte de leur réactivité après un traitement antidépresseur chronique était révélatrice d'un dysfonctionnement à un niveau de la neurotransmission monoaminergique. Ces résultats sont susceptibles de fournir des éléments d'explication au fait que la présence d'une hypothyroïdie infraclinique chez les patients déprimés constitue un facteur de résistance aux antidépresseurs.

Nous avons également mis en évidence que, chez les rats carencés en iode, l'adjonction de T3 à l'imipramine administrée pendant 3 semaines permettait de restaurer la réduction du nombre des récepteurs 5-HT_{2A} corticaux observée classiquement après traitement avec l'imipramine seule chez les rats normaux (**publication 5 : Moreau et al., 2001**). Ces résultats indiquaient que, dans certaines conditions métaboliques pathologiques, la T3 avait un effet permissif sur l'action de l'imipramine au niveau de cette cible sérotoninergique. Cet effet de la T3 ne pouvait pas être dû à une action directe de l'hormone sur les récepteurs puisque l'administration chronique de T3 seule ne modifiait pas leur nombre, ce qui avait déjà été observé chez les rats euthyroïdiens (**publication 2 : Kulikov et al., 1999**). Il n'était pas non plus à mettre sur le compte d'une compensation de la modification du statut thyroïdien. D'une part, les doses de T3 administrées étaient très faibles et ne modifiaient pas les taux plasmatiques de l'hormone. D'autre part, chez les rats traités par l'association T3-imipramine, les taux plasmatiques de T4 étaient significativement diminués.

¹ Nibuya M, Morinobu S, Duman RS (1995) Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J. Neurosci.*, **15**: 7539-7547.

ACTIVITES DE RECHERCHE RECHERCHES DOCTORALES

Chez des patients présentant des troubles dépressifs associés à une hypothyroïdie primaire et supplémentés en T4, un traitement antidépresseur ne parvient pas à améliorer la symptomatologie dépressive, alors qu'associé à la T3 il s'avère efficace. Ce résultat indique que l'effet thérapeutique ne passe pas par la correction du statut thyroïdien grâce l'adjonction de T4.

Nos résultats indiquaient que l'association hormonale à l'antidépresseur n'avait pas rétabli l'augmentation du nombre des récepteurs 5-HT_{1A} hippocampiques observée chez les rats sains traités à l'imipramine seule. Il a été montré que l'administration chronique de désipramine, le métabolite de l'imipramine, induit au niveau de l'hippocampe une augmentation moins importante de l'activité de la 5'D-II que dans le cortex¹. De plus, malgré l'augmentation de l'activité de 5'D-II dans l'hippocampe, les concentrations de T3 sont diminuées². Après injection systémique de T3 radioactive, la concentration de l'hormone dans l'hippocampe augmente pour diminuer ensuite très rapidement. On peut penser que l'adjonction de T3 ne fut pas parvenue, au niveau hippocampique, à induire une augmentation suffisante de sa concentration pour permettre à l'effet biologique de l'antidépresseur de se produire chez les animaux carencés en iode.

L'ensemble de ces résultats suggère que les effets de la T3 sont dépendants et de la structure cérébrale et du sous-type de récepteur.

Comme la T3 est colocalisée avec la noradrénaline dans les corps cellulaires et les projections noradrénergiques, elle pourrait avoir un rôle de neuromodulateur dans la transmission cérébrale³. On peut donc envisager que la T3, puisse moduler les effets de l'imipramine sur les récepteurs 5-HT_{2A} corticaux par l'intermédiaire des systèmes noradrénergiques. Par exemple, il se peut que, chez les rats carencés en iode, une légère augmentation de la quantité de T3 au niveau du cortex, produite par libération neuronale de

¹ Campos-Barros A, Meinhold H, Stula M, Müller F, Köhler R, Eravci M, Putzien O, Baumgartner A (1994) The influence of desipramine on thyroid hormone metabolism in rat brain. *J. Pharm. Exp. Therap.*, **268**: 1143-1152.

² Campos-Barros A, Meinhold H, Köhler R, Müller F, Eravci M, Baumgartner A (1995) The effects of desipramine on thyroid hormone concentrations in rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **351**: 469-474.

³ Gordon JT, Kaminski DM, Rozanov CB, Dratman MB (1999) Evidence that 3,3',5-triiodothyronine is concentrated in and delivered from the locus coeruleus to its noradrenergic targets via anterograde axonal transport. *Neuroscience*, **93**: 943-954.

ACTIVITES DE RECHERCHE

RECHERCHES DOCTORALES

l'hormone, ait pu rétablir les cascades moléculaires permettant à l'effet de l'antidépresseur d'être restauré au niveau des récepteurs 5-HT_{2A}. Les concentrations de T₃ étant moins diminuées dans le cortex que dans l'hippocampe à l'issue d'un régime carencé en iode, il est possible que la quantité de l'hormone n'ait pas été suffisamment augmentée dans l'hippocampe pour rétablir l'effet de l'imipramine sur les récepteurs 5-HT_{1A}.

Aronson et ses collaborateurs (1996)¹ ont rapporté que, chez les patients déprimés résistants aux antidépresseurs, l'adjonction de T₃ à très faible dose à l'antidépresseur est capable d'enclencher une réponse thérapeutique favorable. Par ailleurs, environ 52% des patients résistants aux antidépresseurs présentent une hypothyroïdie infraclinique. L'action permissive de la T₃ sur la diminution de la densité des récepteurs 5-HT_{2A} sous imipramine que l'on observe chez les rats présentant une hypothyroïdie centrale modérée, constitue une piste pour la compréhension des mécanismes qui sous-tendent l'effet permissif de la T₃ à enclencher une réponse thérapeutique dans les dépressions réfractaires.

Nos résultats ont montré que, chez les rats présentant cet état d'hypothyroïdie centrale modérée, même si à l'état basal le nombre des récepteurs n'était pas modifié, la perte de leur réactivité après un traitement antidépresseur chronique était révélatrice d'un dysfonctionnement à un niveau de la neurotransmission monoaminergique. Ils sont susceptibles de fournir des éléments d'explication au fait que la présence d'une hypothyroïdie infraclinique chez les patients déprimés constitue un facteur de résistance aux antidépresseurs. Ces résultats expliqueraient le fait qu'une hypothyroïdie infraclinique constitue un facteur de résistance aux antidépresseurs.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une communication orale au 30^{ème} congrès de la Société des Neurosciences américaine.

(6C) Mazzola-Pomietto P, Moreau X, Jeanningros R. 2000. Triiodothyronine modulates the chronic effect of imipramine on cortical 5-HT_{2A} receptors in adult Wistar rats. 30th Annual meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans (USA), 4-9 novembre.

¹ Aronson R, Offman HJ, Joffe RT, Naylor CD (1996) Triiodothyronine augmentation in the treatment of refractory depression. A meta-analysis. *Arch. Gen. Psychiatr.*, **53**: 842-848.

ACTIVITES DE RECHERCHE
RECHERCHES DOCTORALES

En conclusion, l'ensemble des données que j'ai recueillies au niveau central chez l'animal a permis de mettre en évidence l'existence d'une **influence neuromodulatrice des hormones thyroïdiennes sur les systèmes sérotoninergiques**. Ces résultats ont apporté des éléments de compréhension sur le plan neurobiologique quant aux effets étiopathogéniques et thérapeutiques de la T3 dans les troubles dépressifs. Mon travail réalisé chez le patient souffrant de troubles dépressifs a permis de montrer que les paramètres cinétiques du transport érythrocytaire de la T3 pouvaient servir d'**indicateur biologique** prédictif de l'issue d'un traitement antidépresseur.

Au cours de ces années de recherches Doctorales, j'ai pu utiliser des techniques de biologie cellulaire : cinétiques enzymatiques, liaisons par radioligands ("Binding"), Chromatographie Liquide à Haute Pression (HPLC) ; des techniques de biologie moléculaire : hybridation *in situ*, Northern blot, PCR et RT-PCR.

Ces années m'ont permis d'acquérir de nombreuses connaissances dans les domaines de la neurobiologie, la neurophysiologie et la neuroendocrinologie.

L'ensemble de ces travaux m'a permis d'obtenir mon Doctorat avec la mention "**Très Honorable**", le 13 Juillet 2000. L'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé de Marseille ne desservant plus les félicitations, le Président de Jury, M le Professeur A. NIEUOULON, a tenu à me donner oralement les **félicitations du jury**.

ACTIVITES DE RECHERCHE
RECHERCHES POST-DOCTORALES

• RECHERCHES POST-DOCTORALES

Les systèmes sérotoninergiques chez les invertébrés : cas des crustacés

A la suite de mon doctorat, j'ai été accueilli en **stage post-doctoral** au sein de l'Equipe d'Accueil 2022 "Biodiversité" (Université de Provence, Aix-Marseille I) dans l'équipe de Biologie animale (Plancton) à partir d'octobre 2000. Un des axes de recherche du laboratoire concernait "*les stratégies écophysiologiques de la nutrition chez les crustacés*".

Eu égard aux connaissances et aux compétences que j'ai pu acquérir sur les **systèmes sérotoninergiques** pendant mon Doctorat, j'ai pu initier une **nouvelle thématique de recherche** concernant la **neurobiologie et la physiologie du système nerveux** de crustacés, et en particulier des **mysidacés**, des **euphausiacés** et des **branchiopodes**, qui étaient étudiés dans le laboratoire. Les recherches que j'ai proposées avaient pour **objectif la cartographie des systèmes sérotoninergiques** chez les crustacés **mysidacés** et **euphausiacés**. En parallèle, afin de parfaire mes connaissances sur la zoologie des invertébrés et de mieux comprendre la biologie de ces invertébrés, j'ai collaboré avec les enseignants-chercheurs du laboratoire à plusieurs études¹ (6, 7, 9, 11, 13 ; cf Figure 2).

Cadre des Recherches :

Comme chez les vertébrés, **chez les invertébrés**, la **sérotonine** est un **neuromodulateur** impliqué dans de **nombreux processus biologiques**. De nombreux travaux ont révélé sa présence chez de nombreuses espèces de crustacés, en particulier chez les Malacostracés Décapodes. Chez ces crustacés, cette monoamine joue un rôle important dans la régulation du

¹ Les numéros renvoient à la liste des travaux en page 13

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT
RECHERCHES POST-DOCTORALES

rythme cardiaque, de la transmission neuro-musculaire, de la pression osmotique, de la libération d'hormones (hormone hyperglycémiant) ainsi que dans la régulation de nombreuses fonctions telles que la mécanoréception, la dispersion des pigments, la mue, la reproduction et la digestion. Enfin, elle participe également à la modulation de certains comportements comme le comportement alimentaire, l'agressivité, l'échappement, la posture. La sérotonine y a été localisée au niveau du cerveau, des pédoncules oculaires (rétine, glande du sinus, medullae), des organes péricardiaques, des ganglions stomatogastriques ainsi que dans la chaîne nerveuse.

Les deux seules études qui avaient été réalisées chez les Mysidacés^{1,2} n'avaient pu mettre en évidence la présence de sérotonine. Dans la première, les auteurs ont utilisé la technique d'histo-fluorescence dite de Falck-Hillarp. Cette technique, qui n'est plus utilisée, permettait de visualiser les neuromédiateurs monoaminergiques en rendant les noyaux indolamine (sérotonine) et cathécholamine (noradrénaline, dopamine) fluorescents. Dans la seconde étude, bien que les auteurs aient utilisé une technique immuno-histo-chimique, ils n'ont pu révéler la présence de sérotonine dans les lobes olfactifs, la seule structure mentionnée dans leur publication. Bien que ces auteurs aient soupçonné son existence chez les Euphausiacés, ils ne sont pas parvenus à la démontrer.

L'objectif de mon travail a consisté à mettre en évidence la présence de sérotonine chez une espèce de **Mysidacea**, le *Mysida Leptomysis lingvura* qui faisait déjà l'objet de recherches au sein du laboratoire. Les spécimens ont été pêchés en Méditerranée dans la lagune du Brusq (Six-Fours les Plages, Var, France) et ramenés soit vivants soit fixés dans du tampon phosphate contenant 4% de paraformaldéhyde.

Dans un premier temps et afin de rechercher cette monoamine, j'ai mis au point un protocole immuno-histo-chimique avec révélation d'un anticorps anti-sérotonine par un anticorps couplé à la peroxydase de Raifort sur des spécimens entiers fixés. Cependant, la

¹ Aramant R, Elofsson R. 1976. Monoaminergic neurons in the nervous system of crustaceans. *Cell. Tissue Res.*, **170**:231-251.

² Johansson KUI, Hallberg E. 1992. The organization of the olfactory lobes in Euphausiacea and Mysidacea (Crustacea, Malacostraca). *Zoomorphology*, **112**:81-89.

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT
RECHERCHES POST-DOCTORALES

présence d'un bruit de fond important n'a pas permis de détection spécifique. J'ai poursuivi la mise au point en travaillant sur des **coupes de spécimens congelés vivants**, en utilisant une solution de **pargyline** (un inhibiteur des monoamines oxydases, enzymes de dégradation de la 5-HT) jusqu'aux étapes d'incubation et en révélant l'anticorps anti-sérotonine par un anticorps couplé à un **fluorophore**. Cette mise au point fut concluante et mes résultats montrèrent **pour la première fois la présence de sérotonine chez cette espèce de Mysidacés, *Leptomysis lingvura***. J'ai observé sous microscope à épifluorescence la présence de ce neuromédiateur ubiquiste dans les structures nerveuse du système visuel (*lamina ganglionaris* et *medullae*), le ganglion cérébral et la chaîne nerveuse.

Les **résultats préliminaires de cette nouvelle thématique** ont été présentés lors de deux congrès.

(7C) **Moreau X, De Jong L, Barthélémy RM, Casanova JP. 2001.** Mise en évidence et localisation immuno-histo-chimique de la sérotonine (5-Hydroxytryptamine) chez *Hemimysis margalefi* (Crustacea, Peracarida, Mysidacea). 2^{ème} Rencontre du Club de Neurobiologie des Invertébrés, 27-28 mai, Toulouse.

(8C) **Moreau X, De Jong L, Barthélémy RM, Casanova JP. 2001.** The serotonergic nervous system in Mysidacea (Crustacea): Phylogenetic interest. 5th Evolutionary Biology Meeting, 27-30 juin, Marseille.

En **septembre 2001**, à la suite de mon stage post-doctoral et grâce aux résultats encourageants que j'avais obtenus durant cette année, j'ai été recruté sur un poste d'**Attaché Temporaire à l'Enseignement et à la Recherche (ATER)** à mi-temps. Les avancées réalisées sur cette thématique ont permis l'accueil d'une **doctorante, M^{lle} Dalila BENZID, en octobre 2001**.

En arrivant dans l'équipe, elle a été placée sous la direction du Pr JP Casanova qui m'a confié la responsabilité de son **encadrement pour la partie "Neurobiologie-Neurophysiologie"**. Par la suite cet encadrement a été officialisé par le Conseil scientifique de l'Université de Provence qui m'a donné, en date du **12 mars 2004, la co-direction de ce doctorat**.

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT

RECHERCHES POST-DOCTORALES

La thématique que j'avais initiée a été poursuivie dans le cadre de la thèse de D. Benzid. Ces recherches ont consisté à mettre en évidence la **présence de sérotonine** chez d'**autres espèces** de **Mysidacea**, un *Mysida* (*Hemimysis margalefi*) et un Lophogastrida (*Lophogaster typicus*) qui faisaient déjà l'objet d'études au sein du laboratoire.

Les spécimens d'*Hemimysis margalefi*, espèce cavernicole, avaient été pêchés dans la grotte de Jarre, située sur un îlot entre Marseille et Cassis (Bouches du Rhône, France), par le Dr P Chevaldonné (station marine d'Endoume, Aix-Marseille II) avec qui nous collaborions. Nous avons récolté les spécimens de *Lophogaster typicus* au large de calanques de Marseille dans le canyon de Cassidaigne. Les spécimens avaient été ramenés soit vivants soit fixés dans du tampon phosphate contenant 4% de paraformaldéhyde.

Les observations d'immuno-histo-chimie à fluorescence montrèrent pour la première fois la **présence de sérotonine chez ces espèces de Mysidacés**. Comme chez le *Mysida*, *Leptomysis lingvura*, nous avons observé la présence de ce neuromédiateur ubiquiste dans les structures nerveuse du système visuel (*lamina ganglionaris* et *medullae*), le ganglion cérébral et la chaîne nerveuse.

Après avoir rassemblé toutes les données obtenues, nous avons montré que la distribution du neuromodulateur était similaire chez les trois espèces, cependant avec quelques différences. En ce qui concerne les pédoncules oculaires, les quatre neuropiles, c'est-à-dire la *lamina ganglionaris*, les *medullae* interne, externe et *terminalis*, contenaient des corps cellulaires et des prolongements sérotoninergiques. Cependant, alors que la sérotonine était présente dans les cellules adjacentes aux cellules rétiniennes, au niveau du bouclier de pigments réflecteurs, chez *Hemimysis margalefi* et *Leptomysis lingvura*, elle n'y était pas détectée chez *Lophogaster typicus*. Au niveau du ganglion cérébral, des corps cellulaires sérotoninergiques ont été observés dans la partie antérieure du protocérébron ainsi que dans des fibres qui traversent le corps central. Dans le deutocérébron, nous avons observé la présence de sérotonine dans les lobes olfactifs et les lobes paracentraux. Nous avons également pu montrer la présence de neurones géants, adjacents aux lobes olfactifs et innervant ces lobes.

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT
RECHERCHES POST-DOCTORALES

(8) Moreau X, Benzid D, De Jong L, Barthélémy RM, Casanova JP. (2002) Evidence for the presence of serotonin in Mysidacea (Crustacea, Peracarida) as revealed by fluorescence immunohistochemistry. *Cell and Tissue Research*, 310: 359-371.

(IF₂₀₀₆ 2.580)

(9C) Moreau X, Benzid D, De Jong L, Barthélémy RM, Casanova JP. 2002. Phylogenetic interest of the serotonergic nervous system in Mysidacea (Crustacea, Peracarida) 6th International Congress of Systematic and Evolutionary Biology, 8-17septembre, Patras (Grèce).

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT
RECHERCHES POST-DOCTORALES

Après avoir étudié l'aspect neuro-anatomique des systèmes sérotoninergiques chez les **Mysidacés**, nous avons recentré nos recherches sur un aspect plus fonctionnel. En effet, nous avons cherché à comprendre l'**implication de la sérotonine dans la transmission du message visuel dans les yeux (rétine et pédoncules oculaires) au cours des phases de transition lumière-obscurité**. En effet, outre le fait que les yeux sont le siège de la réception du stimulus visuel et l'organe générant les messages nerveux visuels, ils participeraient également à la régulation des adaptations des fonctions métaboliques aux conditions environnementales. Ces fonctions métaboliques régulées sont, entre autres, la glycémie, les concentrations osmotiques et ioniques, **l'adaptation à la lumière et aux couleurs de l'environnement**, et peut être, **le maintien du rythme circadien et de celui des déplacements tidaux**¹.

Ces expérimentations ont été effectuées chez l'espèce lagunaire *L. lingvura* et chez l'espèce cavernicole *H. margalefi*, en collaboration avec le Dr P. Chevaldonné et C. Lesjeune, doctorant (UMR DIMAR, Station Marine d'Endoume) qui étudient la biologie et l'écologie de cette espèce. Le but de l'expérience était de **déterminer s'il existe des différences dans le schéma d'expression des structures sérotoninergiques lors d'une exposition à la lumière ou lors d'un maintien à l'obscurité du mysidacé cavernicole, *H. margalefi*, ainsi que lors des transitions entre les deux phases**, et de comparer la réactivité de chacune des structures vis-à-vis de ces expositions. Le schéma d'expression sérotoninergique observé chez *H. margalefi* a été **comparé à celui observé chez *L. lingvura*, espèce soumise aux cycles nycthémeraux de lumière**. Les spécimens des deux espèces ont été capturés puis maintenus en aquarium au laboratoire. Pour chaque espèce, deux lots d'une trentaine d'individus ont ensuite été séparés de façon aléatoire. Pour étudier la phase de transition "obscurité vers lumière", les spécimens ont été gardés une nuit à l'obscurité. Un prélèvement a été réalisé puis fixé à la fin de la phase obscure avant exposition à la lumière artificielle d'un néon ($150 \mu\text{moles de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Puis les individus ont été prélevés de façon aléatoire puis fixés après 30 min, 1 h, 2 h et 3 h d'exposition à la lumière.

¹ Cooke IM, Sullivan RE., 1982. Neurobiology: Structure and Function. *The Biology of Crustacea*, 3: 206-290.
Indices Biologiques de Diagnostic Précoce en Santé Humaine et en Ecologie : Aspects Neuroendocriniens, Cytotoxiques et Génotoxiques

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT

RECHERCHES DOCTORALES

Pour étudier la phase de transition "lumière vers obscurité", après une exposition de 3 heures à la lumière, les animaux ont été séparés de façon aléatoire en quatre groupes puis plongés dans l'obscurité. Les animaux ont été fixés après 30 min, 1 heure, 2 heures et 3 heures passées à l'obscurité. Nous avons ensuite localisé les éléments nerveux du système visuel exprimant la sérotonine sur les sections congelées (20 μ m) des animaux.

Lors de l'étude de la phase de transition "obscurité vers lumière", nous avons pu observer que toutes les structures nerveuses des yeux de l'espèce cavernicole, *H. margalefi*, exprimaient la sérotonine lorsque les animaux étaient dans la phase lumineuse. En revanche, seuls la *medulla terminalis* et l'organe X l'exprimaient à l'obscurité. Comme précédemment, lors de l'étude de la phase de transition "lumière vers obscurité", nous avons remarqué que toutes les structures exprimaient la sérotonine lorsque les animaux étaient dans la phase lumineuse ; les éléments rétiniens exprimaient la sérotonine seulement pendant les 30 premières minutes après la transition "lumière vers obscurité".

Nous avons pu observer une **réactivité particulière de la lamina ganglionaris lors des transitions de phase chez *H. margalefi***. Au cours de l'étude de la transition "obscurité vers lumière", aucune immunoréactivité sérotoninergique n'a été observée dans la *lamina ganglionaris* après un maintien d'une nuit à l'obscurité. Par contre, des corps cellulaires et des fibres sérotoninergiques apparaissaient dès 30 minutes d'exposition à la lumière. Après 1 heure d'exposition à la lumière, le nombre d'éléments exprimant la 5-HT augmentait. Puis, il diminuait après 2 heures d'exposition à la lumière jusqu'à la limite de détection 3 heures après le passage à l'obscurité. Au cours de l'étude de la transition "lumière vers obscurité", la *lamina ganglionaris* n'exprimait pratiquement pas la sérotonine après une exposition de 3 heures à la lumière. Après avoir été maintenue 30 minutes à l'obscurité, la *lamina ganglionaris* d'*H. margalefi* n'exprimait pas la sérotonine. En revanche, et contrairement à ce qui a pu être observé lors de la transition "obscurité vers lumière", une immunoréactivité sérotoninergique y apparaissait seulement une heure après le passage à l'obscurité. Puis, l'immunoréactivité sérotoninergique s'intensifiait deux heures après le passage à l'obscurité.

Chez *Leptomysis lingvura*, l'espèce lagunaire, nous n'avons pas observé de sérotonine dans

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT
RECHERCHES POST-DOCTORALES

la *lamina ganglionaris* après une nuit à l'obscurité. Elle apparaît après 30 minutes d'exposition à la lumière, est observable pendant 2 heures, puis disparaît après 3 heures d'exposition à la lumière. Contrairement à ce que nous avons observé chez *H. margalefi*, lors de la transition "lumière vers obscurité", la *lamina ganglionaris* de *L. lingvura* présentait le même schéma d'expression que lors de la transition "obscurité vers lumière".

Ces derniers résultats montrent ainsi un rôle fondamental des neurones sérotoninergiques localisés dans la *lamina ganglionaris* durant les phases de transition "lumière-obscurité" chez les Mysidacés, particulièrement chez l'espèce cavernicole *H. margalefi*. Le schéma d'expression sérotoninergique observé au niveau de la *lamina ganglionaris* est à relier aux migrations journalières de cette espèce cavernicole. En effet, les essaims d'*Hemimysis* effectuent des migrations circadiennes entre l'intérieur et l'extérieur de grottes sous-marines. Durant la journée, la grotte abrite une population importante d'*Hemimysis* ; chaque nuit, ces Mysidacés font l'objet de migrations horizontales qui sont homologues aux migrations circadiennes verticales du zooplancton et sont liées aux fluctuations des intensités lumineuses du soleil et de la lune. Durant la journée, la population d'*Hemimysis* se confine dans la partie la plus sombre de la grotte, constituant des essaims très denses qui migrent progressivement et lentement vers la sortie. Ces animaux ne sortent de la grotte qu'au crépuscule lorsque l'intensité de la lumière solaire devient plus faible que celle de la lune. A la fin de la nuit, la population rejoint rapidement la grotte environ une demi-heure avant le lever du jour alors que le jour commence à peine à se lever. Ainsi, nos résultats montraient que le **schéma d'expression de la sérotonine au niveau de la *lamina ganglionaris* suivait étroitement le schéma migratoire de cette espèce cavernicole**. Chez *H. margalefi*, il est probable que la *lamina ganglionaris* soit impliquée dans la **détection des phases de transition "obscurité-lumière" et "lumière-obscurité"**. Il semble que l'expression sérotoninergique dans la *lamina ganglionaris* agisse en tant que signal de départ pour la migration lors de la transition entre ces deux phases. Le schéma d'expression sérotoninergique de la *lamina ganglionaris* permet de souligner une fonction possible de ce neuropile comme **horloge rythmique de photo-réception**, et particulièrement pour l'espèce faisant l'objet de migrations circadiennes.

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT
RECHERCHES POST-DOCTORALES

(15) **Benzid D**, De Jong L, Chevaldonné P, Lejeusne C, **Moreau X**. (2006). Serotonin expression in the optic lobes of cavernicolous crustaceans during the light-dark transition phase: role of the *lamina ganglionaris*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 335: 74-81.

(IF₂₀₀₆ 1.919)

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT
RECHERCHES POST-DOCTORALES

Après avoir cartographié une grande partie du **système sérotoninergique** chez les Mysidacés, nous avons poursuivi cette thématique chez les **Euphausiacés**. Bien que ce groupe de crustacés soit essentiel dans le réseau trophique marin et que ce soit un groupe important du point de vue phylogénétique, puisque les relations phylétiques avec les Mysidacés étaient encore discutées¹, ce **neuromédiateur n'avait pas été mis en évidence chez les Euphausiacés**. J'ai donc participé, avec D. Benzid, à la cartographie du système sérotoninergique de quatre espèces d'Euphausiacés *Stylocheiron abbreviatum*, *Stylocheiron longicorne*, *Nematocelis megalops* et *Euphausia krohni*. Les spécimens ont été récoltés au large des calanques de Marseille dans le canyon de Cassidaigne puis rapportés soit vivants soit fixés dans du tampon phosphate salin contenant 4% de paraformaldéhyde. Après congélation dans l'azote liquide, ils ont été conservés à -30°C jusqu'aux expérimentations immuno-histochimiques. Au niveau des pédoncules oculaires, la sérotonine a été localisée dans toutes les structures nerveuses à savoir la rétine, la *lamina ganglionaris*, les trois *medullae*, de l'organe X et la glande du sinus ainsi qu'au niveau du photophore. Après avoir localisé et comparé la distribution des neurones sérotoninergiques dans le système visuel, nous avons aussi cartographié une partie du **système sérotoninergique des Euphausiacés** au niveau du **ganglion cérébral** ainsi que de la **chaîne nerveuse**. Nous avons localisé la sérotonine dans le protocérébron et le deutocérébron au niveau du groupement de soma antéro-médians, du pont protocérébral, du corps central, des lobes paracentraux, des lobes olfactifs, de la commissure deutocérébrale, du tractus olfacto-globulaire. Nous l'avons également localisée au niveau du collier péri-œsophagien, du ganglion stomatogastrique et au niveau de chaque ganglion thoracique et abdominal de la chaîne nerveuse.

Ces résultats ont été présentés lors de deux congrès internationaux.

(10C) **Benzid D, Moreau X, De Jong L, Barthelemy RM, Casanova JP. 2002.** Evidence for the presence of serotonin in the nervous system of Euphausiacea (Crustacea, Eucarida). 6th ICSEB, 8-17 septembre, Patras (Grèce).

(12C) **Benzid D, Moreau X, De Jong L, Casanova JP. 2003.** Serotonin-like immunoreactive neurones in the visual system of Euphausiacea (Crustacea, Eucarida): a phylogenetic tool. 7th Evolutionary Biology Meeting, 25-27 juin, Marseille.

¹ Jarman SN, Nicol S, Elliot NG, Mc Minn A, 2000. 28S rDNA evolution in the Eumalacostraca and the phylogenetic position of Krill. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 17: 26-36.

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT
RECHERCHES POST-DOCTORALES

A coté des deux groupes de Malacostracés que sont les Mysidacés et les Euphausiacés, nous avons également étudié le système sérotoninergique chez des **espèces de la sous-classe des Branchiopodes**. En effet, de précédents travaux^{1,2,3} ont montré, notamment grâce à l'étude de la chaîne nerveuse ventrale des Branchiopodes, que des neurones individuellement identifiables sont des caractères utiles pour les comparaisons phylogénétiques. Leurs travaux ont montré tout **l'intérêt de l'utilisation des cellules nerveuses comme marqueurs phylogénétiques**.

En ce qui concerne plus particulièrement les yeux des Crustacés, ceux des Décapodes suivent le même mécanisme de développement que celui décrit chez *Triops longicaudatus*⁴. Ils présentent au niveau de l'ommatidie un arrangement similaire de la zone de prolifération, qui donne naissance à la rétine, à la *lamina ganglionaris* et à la *medulla externe*, et de la zone de transition qui est une zone de tissu indifférencié. L'arrangement de la zone de prolifération, les types de cellules nerveuses au niveau de cette zone, ainsi que le processus morphogénétique qui forme l'ommatidie, semblent être identiques pour les Malacostracés et les Branchiopodes. Malgré les différentes formes de rhabdomes et le nombre de cellules présentes chez les Crustacés, on peut trouver des espèces avec des cellules rétiniennes et cristalliniennes aux caractéristiques presque identiques à celles décrites dans toutes les lignées de Crustacés ayant des yeux composés, dont les Branchiopodes et les Malacostracés. Il a été proposé que ce modèle représente un dispositif conservé des yeux composés des Crustacés et des Insectes, à partir duquel toutes les autres formes ont évolué⁵. Ainsi, l'intérêt phylogénétique de l'étude topographique des neurones sérotoninergiques est avéré. En effet, ces neurones existent en petit nombre et sont individuellement identifiables.

¹ Harzsch S, Waloszek D, 2001. Serotonin-immunoreactive neurons in the ventral nerve cord of Crustacea: a character to study aspects of arthropod phylogeny. *Arth. Struct. Dev.*, 29: 307-322.

² Hay-Schmidt A, 2000. The evolution of the serotonergic nervous system. *Proc. Soc. Lond.*, 267B: 1071-1079.

³ Nilsson DE., Osorio D, 1998. Homology and parallelism in arthropod sensory processing. In: Fortey RA and Thomas RH (Eds.). *Arthropod Relationships. Systematics Association, Special Volume Series*, 55: 333-347.

⁴ Harzsch S, Waloszek D, 2001. Neurogenesis in the developing visual system of the branchiopod crustacean *Triops longicaudatus* (Le Conte, 1846): corresponding patterns of compound-eye formation in Crustacea and Insecta? *Dev. Genes. Evol.*, 211: 37-43.

⁵ Melzer RR, Diersch R, Nicastro D, Smola U, 1997. Compound eye evolution: highly conserved retinula and cone cell patterns indicate a common origin of the insect and crustacean ommatidium. *Naturwissenschaften*, 84: 542-544.

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT
RECHERCHES POST-DOCTORALES

De plus, la **sérotonine** est un neurotransmetteur que l'on peut qualifier d'**ancestral** et que l'on retrouve dans tout le règne animal. Ceci impliquerait une origine ancienne des réseaux neuronaux exprimant ce neurotransmetteur. D'après Fujii & Takeda (1988)¹, les neurones sérotoninergiques du système nerveux central des Invertébrés ont une tendance à s'agréger et, finalement, à se centraliser suivant la progression phylogénétique des espèces. De plus, les cellules sérotoninergiques ne sont généralement pas très caractérisées chez les espèces de classe inférieure, mais le deviennent graduellement chez les espèces de classe phylogénétiquement supérieure. Par conséquent, chez les Invertébrés, la **localisation anatomique des neurones sérotoninergiques** et leur mise en place au cours du développement pourraient être considérées comme des **marqueurs** permettant une meilleure compréhension des relations phylogénétiques au sein des Branchiopodes.

Mis à part quelques espèces marines, les Branchiopodes comptent essentiellement des espèces dulçaquicoles. Beaucoup de ces dernières sont inféodées aux eaux douces temporaires^{2,3}. Le caractère astatique de ces biotopes (hypoxie-anoxie, variation de température, assèchement) implique l'existence d'adaptations tout à fait particulières de la part de ces organismes dont on pouvait supposer qu'elles étaient sous-tendues par des ajustements physiologiques, faisant intervenir des neuromodulateurs. En effet, quand les conditions environnementales se dégradent, notamment lors de l'assèchement de leur biotope, ils pondent des œufs dits de durée qui sont capables de résister enfouis dans le sédiment asséché ; on parle d'œufs de diapause. Lorsque les conditions environnementales redeviennent favorables, ces œufs peuvent alors éclore.

Ainsi, en parallèle du travail mené chez les Euphausiacés, nous avons entrepris la **cartographie du système visuel sérotoninergique des Branchiopodes**, en collaboration avec le Pr. Alain Thiéry, spécialiste reconnu de ce groupe de crustacés³.

¹ Fujii K, Takeda N, 1988. Phylogenetic detection of serotonin immunoreactive cells in the central nervous system of invertebrate. *Comp. Biochem. Physiol.*, **89C** (2): 233-239.

² Thiéry A, 1985. Ponte et ultrastructure de l'œuf chez *Triops granarius* Lucas (Crustacea, Notostraca) : adaptation à l'assèchement de l'habitat. *Vert. Internat. Verein. Limnol.*, **22**: 3024-3028.

³ Thiéry A, 1996. Ordres des Anostracés, Notostracés, Spinicaudata et Laevicaudata. In: P.P. Grassé, Masson (Ed.), Paris, *Traité de zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie*, **VII**: 287-351.

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT
RECHERCHES POST-DOCTORALES

Peu après avoir commencé ce travail, une étude était publiée¹. Elle précisait la distribution et la position anatomique des neurones sérotoninergiques au niveau de la chaîne nerveuse ventrale chez *Triops longicaudatus*. En tant que co-directeur du travail de thèse de D. Benzid, j'ai donc décidé d'orienter nos recherches sur le **système sérotoninergique visuel et cérébral chez d'autres espèces** de Branchiopodes.

Nous avons alors étudié quelques spécimens marins ubiquistes de la zone néritique comme les cladocères *Evadne nordmanni* Lovén, 1836, *Evadne spinifera* P. E. Müller, 1867 et *Podon* sp., Lilljeborg, 1853 (aff. *intermedius* Lilljeborg, 1853) mais surtout des spécimens dulçaquicoles caractéristiques d'écosystèmes temporaires : *Imnadia yeyetta* Hertzog, 1935 et *Cyzicus tetracerus* (Krynicky, 1830) (Spinicaudata), *Lepidurus apus* (Linné, 1758) et *Triops cancriformis* (Bosc, 1801) (Notostraca), *Linderiella massaliensis* Thiéry & Champeau, 1988 et *Branchipus schaefferi* Fischer, 1834 (Anostraca).

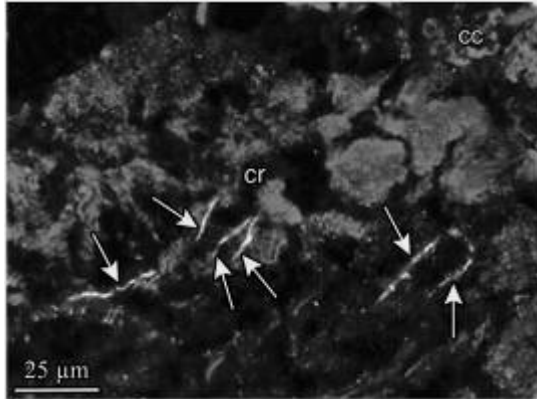
Les spécimens marins ont été récoltés en surface au niveau du canyon de Cassidaigne au large des calanques de Marseille. Les spécimens ont été fixés *in situ* dans du tampon phosphate salin contenant 4% de paraformaldéhyde. Les spécimens dulçaquicoles ont été prélevés dans des mares temporaires de Provence près de Brignoles (Var, France). Ils ont été soit rapportés vivants au laboratoire soit fixés dans du tampon phosphate contenant 1% de paraformaldéhyde. Puis, ils ont été congelés dans l'azote liquide et conservés à -30°C jusqu'aux expérimentations immuno-histo-chimiques.

Les observations réalisées ont montré une expression de la **sérotonine** au niveau des **cellules rétiniennes** chez les espèces possédant des yeux pédonculés, les Anostraca *Linderiella massaliensis* et *Branchipus schaefferi* alors que le neuromédiateur n'y est pas exprimé chez les espèces à yeux sessiles. Par contre, quelque soit l'espèce considérée,

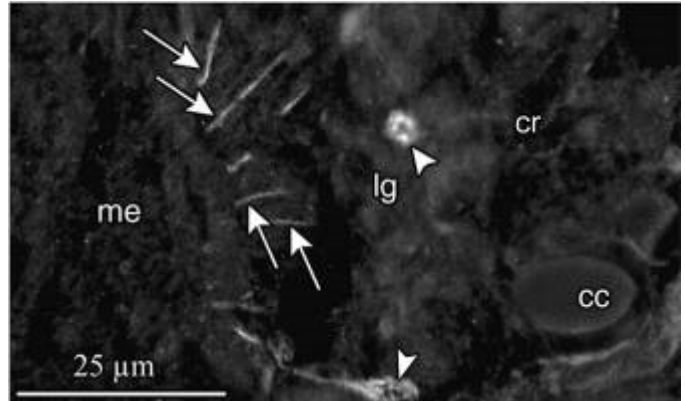
¹ Harzsch S, Waloszek D, 2001. Serotonin-immunoreactive neurons in the ventral nerve cord of Crustacea: a character to study aspects of arthropod phylogeny. *Arth. Struct. Dev.*, **29**: 307-322.

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT
RECHERCHES POST-DOCTORALES

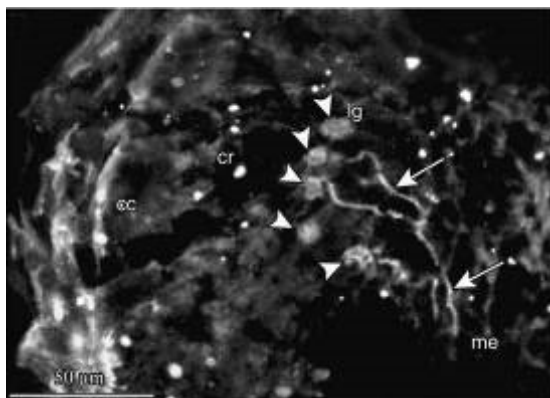
nous avons pu observer des neurones sérotoninergiques dans les deux neuropiles, à savoir la *lamina ganglionaris* et la *medulla externe*.



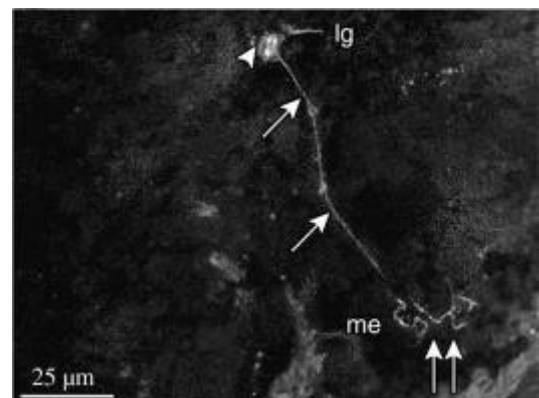
Éléments sérotoninergiques au niveau de la rétine chez *Linderiella massaliensis*. Cônes cristallins (cc), cellules rétinienne (cr).



Éléments sérotoninergiques au niveau des yeux de *Lepidurus apus*. Cônes cristallins (cc), cellules rétinienne (cr), lamina ganglionaris (lg), medulla externe (me). Notez l'absence de 5HT dans la rétine.



Neurones sérotoninergiques reliant la lamina ganglionaris (lg) et la medulla externe (me) chez *Cyzicus tetracerus*. Cônes cristallins (cc), cellules rétinienne (cr).



Neurone sérotoninergique reliant la lamina ganglionaris (lg) et la medulla externe (me) chez *Triops cancriformis*.

Une partie de ce travail, que nous poursuivons encore aujourd'hui, a été présentée en 2002 au 6^{ème} Congrès International de Systématique et Evolution Biologique (photos ci-dessus extraites de ce poster).

(11C) Moreau X, De Jong L, Barthélémy RM, Benzid D, Thiéry A. 2002. The cerebral serotonergic nervous system in Branchiopods: focus on the visual system. 6th ICSEB, 8-17 septembre, Patras (Grèce).

ACTIVITES DE RECHERCHE
RECHERCHES POST-DOCTORALES

ZOOLOGIE

Mon intégration en tant que neurophysiologiste de formation dans l'EA "Biodiversité" a été facilitée par des collaborations avec plusieurs enseignants-chercheurs sur des travaux consacrés à la biologie des invertébrés qui leur servaient de modèle d'étude.

Le premier travail concernait l'étude de l'ontogénie de la carapace et des mandibules chez les décapodes Dendrobranchiata, les euphausiacés et les mysidacés. Dans cette étude, nous avons mis en évidence le rôle fondamental joué par les segments antennaire et mandibulaire dans le plan d'organisation du corps chez les Malacostracés. Ces résultats ont été publiés dans *Canadian Journal of Zoology* (6).

Le deuxième travail avait pour objectif de cerner le régime alimentaire et de mieux comprendre la fonction digestive chez le Lophogastrida *Lophogaster typicus* (Mysidacea) par des observations au microscope électronique à balayage des mandibules et du labre, l'analyse des contenus stomacaux. Au niveau du labre, nous avons mis en évidence par des observations au microscope électronique à transmission, deux types d'acini impliqués dans l'enrobage et la digestion de la nourriture. En outre, nous avons montré l'existence de terminaisons neuronales et de cellules endocriniennes associées aux unités glandulaires. Ces résultats ont été publiés dans *Journal of Marine Biology Association of the United Kingdom* (7).

Plus tard, j'ai pu approfondir mes connaissances sur la zoologie des Euphausiacés. Lors de ce travail, nous avons étudié la structure et l'ultrastructure du labre, de l'estomac, de l'intestin et de l'hépatopancréas de l'euphausiacé, *Euphausia krohni*. Nous avons montré que le système digestif des euphausiacés possédait des caractères primitifs, qui existent chez les malacostracés inférieurs (Lophogastrida), mais aussi des caractères évolués que l'on retrouve chez les malacostracés supérieurs (Decapoda). Ces résultats ont été publiés dans les *Cahiers de Biologie Marine* (9).

ACTIVITES DE RECHERCHE
RECHERCHES POST-DOCTORALES

J'ai eu également l'honneur de collaborer avec le Pr JP Casanova pour la description de deux espèces nouvelles de Chætognathes. Ces descriptions ont fait chacune l'objet d'une publication. La première espèce concernait une nouvelle spadelle des Iles Canaries, *Spadella nunezi* (*Cahiers de Biologie Marine*, **11**), et la seconde concernait une nouvelle espèce d'un nouveau genre provenant d'une source hydrothermale, *Callispadella alata* (*Journal of plankton Research*, **13**).

ACTIVITES DE RECHERCHE
THEMATIQUE ACTUELLE

Thématique Actuelle

INDICES BIOLOGIQUES DE DIAGNOSTICS PRECOCES ENVIRONNEMENTAUX

➤ Introduction	68
➤ Les signaux neuroendocriniens	72
➤ Les protéines de stress (Hsp70, MTs, MXR)	76
➤ Génotoxicité	87
➤ Nano-biotechnologies	91

ACTIVITES DE RECHERCHE
THEMATIQUE ACTUELLE

● THEMATIQUE ACTUELLE

INDICES BIOLOGIQUES DE DIAGNOSTIC PRECOCES ENVIRONNEMENTAUX

Au début de l'année 2003, suite à de profonds remaniements au sein des équipes de recherche travaillant dans le secteur de la Biodiversité à l'Université de Provence et afin de préparer le contrat quadriennal 2004-2007, j'ai été amené à **réorienter mes recherches**. Tout en poursuivant la cartographie des systèmes sérotoninergiques chez certains les crustacés Branchiopodes, Mysidacés et Euphausiacés (co-encadrement de la thèse de D. Benzid), une **nouvelle thématique axée sur l'étude de l'impact de perturbations environnementales, d'origine anthropique et naturelle, sur certaines fonctions biologiques d'invertébrés dulçaquicoles** a été initiée sous l'impulsion du Pr A. Thiéry avec la création de l'ER "Biodiversité & Environnement". En effet, de très nombreux travaux ont déjà été menés pour appréhender les effets d'exposition à des polluants les invertébrés marins, s'agissant des invertébrés d'eau douce, il reste encore beaucoup à faire pour expliquer les effets de ces perturbations environnementales sur la physiologie de ces animaux constituant les premiers maillons de la chaîne alimentaire. Pourtant, une multitude de données montrent qu'il existe de nombreuses anomalies tant sur le plan de la reproduction¹, de la croissance², du dimorphisme sexuel, de la morphologie, etc.... Ainsi, en collaboration avec le Dr L. De Jong et le Pr. A. Thiéry, nous étudions les effets de ces contaminations en nous intéressant aux **biomarqueurs de pollution chez les invertébrés aquatiques d'eau douce**. Pour le plan quadriennal 2004-2007, notre équipe s'est donc recentrée autour du projet "**Biodiversité et Environnement**" (PPF Président n° 20043015).

¹Ketata et al. (2007) Endocrine-related reproductive effects in molluscs, *Comp. Biochem. Physiol.*, doi: 10.1016/j.cbpc.2007.11.007. Rodríguez et al. (2007) Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: A review. *Comp. Biochem. Physiol.*, 146A: 661-671.

² Burger A. (2008) Assessment and management of risk to wildlife from cadmium. *Sci. Total Environ.*, 389: 37-45.
Indices Biologiques de Diagnostic Précoce en Santé Humaine et en Ecologie : Aspects Neuroendocriniens, Cytotoxiques et Génotoxiques

ACTIVITES DE RECHERCHE
THEMATIQUE ACTUELLE

Cette orientation thématique et les travaux réalisés ont permis l'intégration de notre jeune équipe, intitulée désormais "Biomarqueurs & Bioindicateurs Environnementaux", au sein du département 2 de l'UMR-CNRS 6116 IMEP (**Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléoécologie**) à compter du 1^{er} janvier 2008 (<http://www.imep-cnrs.com>) pour le contrat quadriennal 2008-2011.

Introduction

Parmi les nombreuses façons d'évaluer les effets de modifications de la qualité des eaux douces et de leurs sédiments, il est possible d'utiliser trois types de méthodes (Figure 5) :

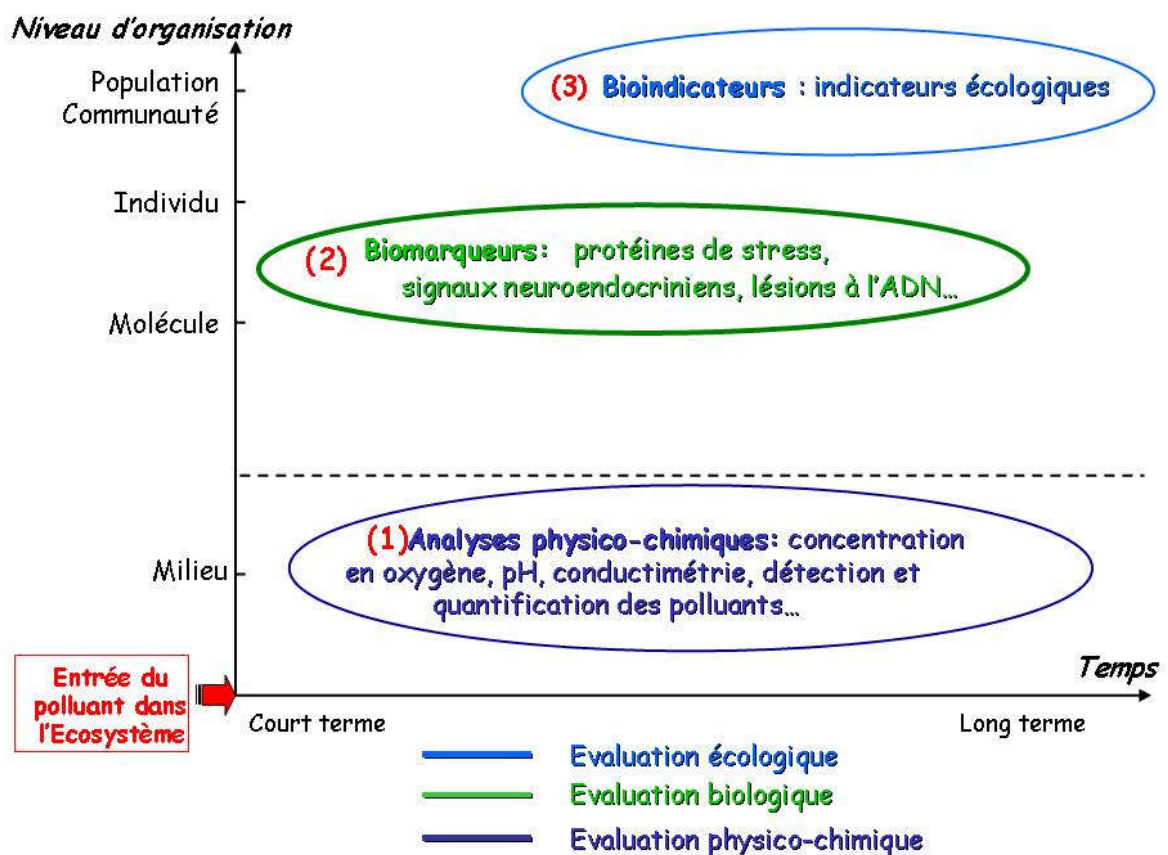


Figure 5 : Schéma synoptique montrant les différents niveaux d'organisation de l'écosystème et quelques moyens d'études pour évaluer la qualité du milieu et leur pertinence en fonction du temps d'exposition aux xénobiotiques. (1) analyses physico-chimiques, (2) biomarqueurs et (3) bioindicateurs.

(1) des analyses physico-chimiques classiques qui identifient les polluants et certaines modifications abiotiques ;

ACTIVITES DE RECHERCHE
THEMATIQUE ACTUELLE

(2) l'utilisation de **biomarqueurs** qui, en rivière, n'en n'est qu'à ces débuts. Cette dernière méthode consiste à détecter des *changements observables et/ou mesurables au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental chez des organismes, qui révèlent une exposition présente ou passée à un ou plusieurs contaminants*¹. Les biomarqueurs sont des **outils de mesure précoce d'un effet réel, in situ, des polluants combinés aux facteurs environnementaux naturels** :

(3) une étude biocénotique qui analyse les effets des polluants sur la structure des communautés présentes en utilisant des indices biologiques (du type IBGN : Indice Biologique Global Normalisé, par exemple).

La thématique que nous avons retenue est une **approche multimarqueurs des effets des perturbations et stress chez des organismes modèles, animaux et végétaux**, permettant de répondre aux problèmes liés aux effets des modifications naturelles ou anthropiques de l'environnement. Cette thématique s'inscrit dans le cadre général des recherches menées dans le domaine de l'Environnement par les différentes unités de recherche de l'Université de Provence. La compréhension des mécanismes de réaction de structures cibles (molécules, cellules, tissus, organismes...) doit servir à la mise au point de méthodes de "biomarquage", permettant de quantifier les effets et les dommages occasionnés aux organismes vivant dans les écosystèmes exposés à des modifications de leur environnement. Ainsi, nous recherchons des **biomarqueurs** des altérations résultant de l'exposition d'invertébrés dulçaquicoles à diverses modifications environnementales. Ces **perturbations de l'environnement** peuvent être d'**origine anthropique** comme une contamination aux polychlorobiphényles (PCBs), aux métaux, aux polluants organiques, aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), aux pesticides,... ou d'**origine naturelle** comme une anoxie ou un assèchement des habitats d'eau douce, des modifications thermiques. Définis à l'origine par le comité **Biological Markers of the National Council (NCR)** en 1987, les biomarqueurs sont des *indicateurs signalant des évènements survenus dans un système biologique suite à une exposition à un produit chimique.*

¹ Lagadic L, Caquet T, Amiard JC. (1997) Biomarqueurs en écotoxicologie: principes et définitions. In: Lagadic, L., Caquet T, Amiard JC, Ramade F (Eds). *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux*. Paris, Masson, 1-9.
Indices Biologiques de Diagnostic Précoce en Santé Humaine et en Ecologie : Aspects Neuroendocriniens, Cytotoxiques et Génotoxiques

ACTIVITES DE RECHERCHE

THEMATIQUE ACTUELLE

Considérant la définition du NRC, il existe trois catégories de biomarqueurs : les biomarqueurs d'exposition à un toxique, les biomarqueurs d'effet et les biomarqueurs de susceptibilité même si cette "classification" est sujette à débat^{1,2}. Un biomarqueur est utile car, d'après Chapman & Guerra (2005)³ la principale préoccupation des 'Environnementalistes' peut être résumée ainsi : "caractériser la pollution, évaluer cette pollution et fournir des indices décisionnels permettant de contrecarrer la pollution affectant l'environnement dans lequel nous vivons". Ainsi, les voies métaboliques et la réactivité de certains constituants au sein des tissus vivants et des cellules, qui permettent aux invertébrés aquatiques de persister même lorsque les conditions de vie deviennent extrêmes, peuvent être considérées comme des biomarqueurs afin de caractériser soit la condition d'exposition elle-même soit l'impact engendré par l'élément stressant. Ainsi, les recherches développées par notre équipe et qui sont menées sur les individus au niveau tissulaire, cellulaire et moléculaire permettent de détecter des effets soit précoces soit à doses faibles, et de préciser l'action de la perturbation environnementale.

La figure 6 ci-dessous résume les thématiques proposées par l'ER "Biodiversité et Environnement" en mars 2004 pour le contrat quadriennal 2004-2007 et poursuivies actuellement dans l'équipe "Biomarqueurs & Bioindicateurs Environnementaux de l'UMR-CNRS 6116 IMEP pour le contrat quadriennal actuel 2008-2011.

Au niveau de l'organisme, les biomarqueurs (ou indices biologiques) étudiés sont : les **signaux neuroendocriniens**, les **protéines de stress** (*protéines de choc thermique ou Hsp, métallothionéines, systèmes de Résistance Multixénobiotiques,...*), les **lésions à l'ADN** (*cassures de brins, apparitions de micronoyaux,...*). **Ces recherches impliquent une bonne connaissance de la biologie et de la physiologie des organismes retenus ou supports de biomarqueurs, basée sur une recherche fondamentale moderne.** Les invertébrés retenus sont en outre des bioindicateurs, l'idée générale étant de mettre en exergue des relations entre les indices précoces (Biomarqueurs) et les indices biocénétiques (Bioindicateurs).

¹ Shlenk, D. (1999). Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Mar. Pollut. Bull.*, **39**: 48-53.

² Hyne, R.V. & Maher, W.A. (2003) Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotox. Environ. Safe.*, **54**: 366-374.

³ Chapman PM, Guerra LM. (2005) The "so what?" factor. *Mar. Pollut. Bull.*, **50**: 1457-1458.

ACTIVITES DE RECHERCHE
THEMATIQUE ACTUELLE

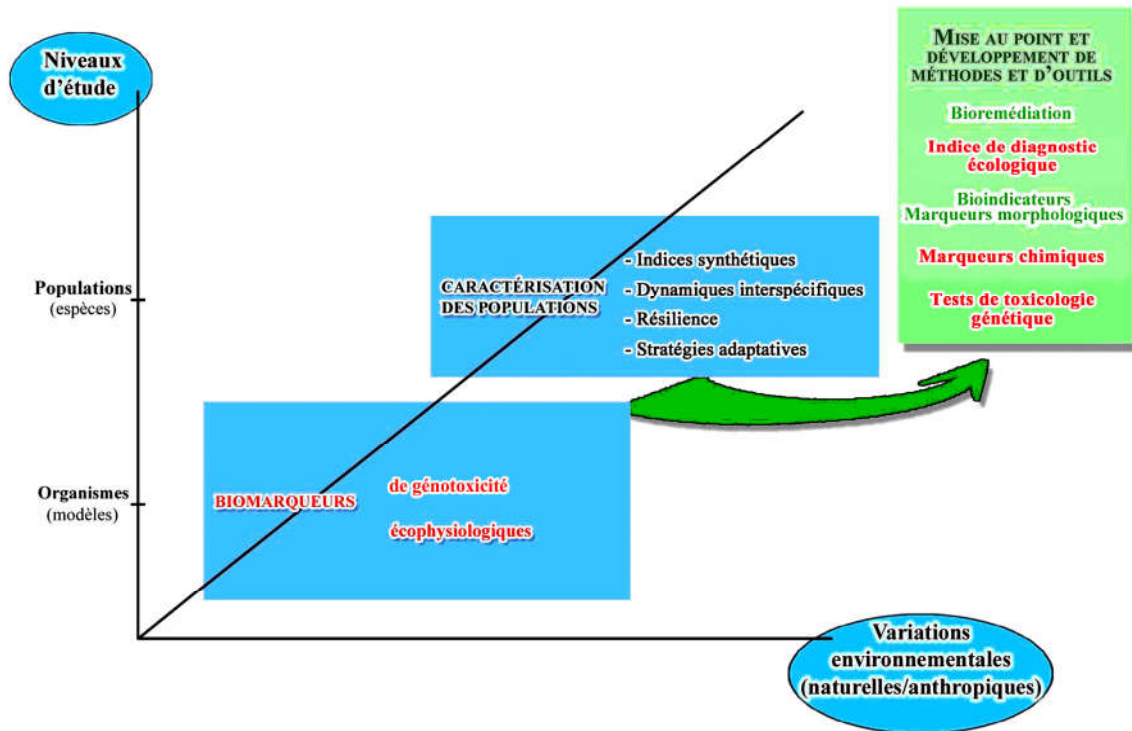


Figure 6 : Thématiques développées par l'ER 'Biodiversité et Environnement' de l'Université de Provence. Les thématiques pour lesquelles je m'investis actuellement sont indiquées **en rouge**.

Nos recherches pluridisciplinaires menées au sein de l'ER "Biodiversité & Environnement" au cours du contrat quadriennal dernier ont permis de mettre en place des collaborations directes et indirectes avec d'autres équipes françaises et internationales (Figure 7).

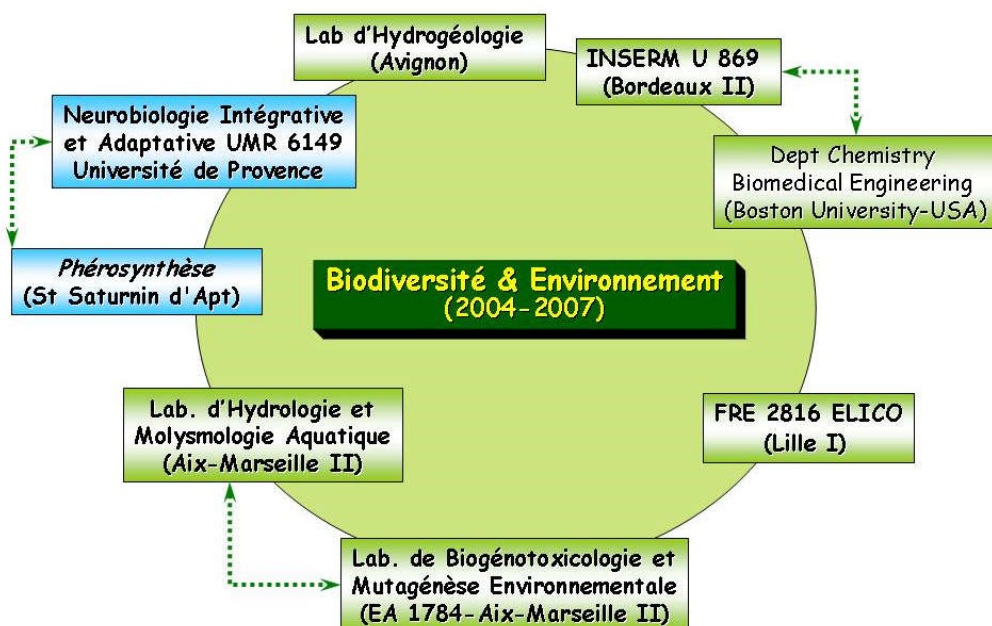


Figure 7 : Collaborations développées entre l'ER 'Biodiversité et Environnement' avec d'autres équipes de recherches au plan national et international dans lesquelles je suis partie prenante. Ces collaborations sont toujours d'actualité pour le contrat quadriennal 2008-2011.

ACTIVITES DE RECHERCHE

THEMATIQUE ACTUELLE

LES SIGNAUX NEUROENDOCRINIENS



Les données fondamentales et les mises au point techniques obtenues lors de l'étude des systèmes monoaminergiques ont servi de base pour l'étude des signaux neuroendocriniens en temps que biomarqueurs de stress consécutifs aux perturbations environnementales.

L'impact de contaminants organiques et inorganiques chez les invertébrés est de plus en plus évalué en étudiant des fonctions biologiques qui sont sous le contrôle d'hormones¹. Cependant, si le système endocrinien tient une place importante, les régulations sous le contrôle du système nerveux ne doivent pas être négligées. Chez les crustacés, les systèmes monoaminergiques, et en particulier sérotoninergique, sont impliqués dans la régulation de la libération d'hormones, comme l'hormone de dispersion des pigments (RDPH), l'hormone de mue (MIH) ou encore l'hormone hyperglycémiant (CHH). On sait également que, chez les invertébrés aquatiques, les **systèmes sérotoninergiques**, noradrénergiques et GABAergiques sont des **cibles pour de nombreux contaminants environnementaux**². Ainsi, on sait que les PCBs diminuent la recapture de la sérotonine, de la dopamine et du GABA dans les synaptosomes, qu'ils inhibent la synthèse de dopamine et qu'ils entraînent une augmentation de la quantité du métabolite de la sérotonine, l'acide 5-hydroxy-indole acétique (5-HIAA). De nombreuses investigations ont montré que ces **systèmes neuroendocriniens** semblent être des **indicateurs biologiques de choix de contaminations organique et inorganique de l'environnement**^{3,4,5}. L'approche morpho-fonctionnelle que nous avons proposée concerne **l'étude des systèmes monoaminergiques**. Des arthropodes d'eau douce, que l'on pourrait

¹ Fingerman M, Jackson NC, Nagabhushanam R. (1998) Hormonally-regulated functions in crustaceans as biomarkers of environmental pollution. *Comp. Biochem. Physiol.*, **120C**: 343-350.

² Navqi SM, Vaishnavi C. (1993) Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide to non-target animals. *Comp. Biochem. Physiol.*, **105C**: 347-361.

³ Reddy PS, Tuberty SR, Fingerman M. (1997) Effects of cadmium and mercury on ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **37**: 62-65.

⁴ Rodríguez EM, López Greco LS, Fingerman M. (2000) Inhibition of ovarian growth by cadmium in the fiddler crab, *Uca pugilator* (Decapoda, Ocypodidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **46**: 202-206.

⁵ Tsai CL, Jang TH, Wang LH. (1995) Effects of mercury on serotonin concentration in the brain of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Neurosci. Lett.*, **184**: 208-211.

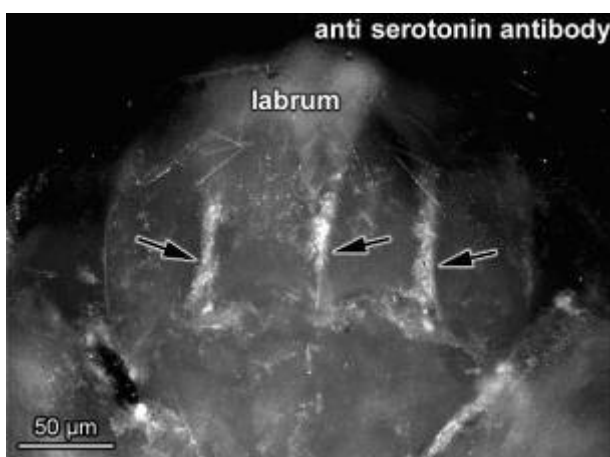
ACTIVITES DE RECHERCHE

THEMATIQUE ACTUELLE

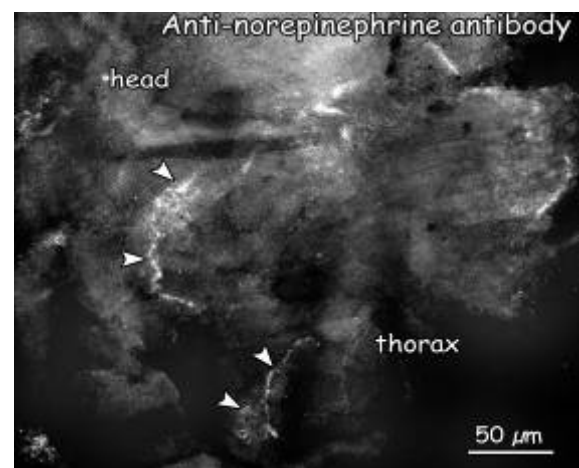
qualifier de "sentinelles", ont été retenus comme **organismes cibles**. Il s'agissait de larves d'Ephéméroptères, d'Hétéroptères et de Diptères pour l'étude des mares autoroutières, et de certaines espèces de Branchiopodes pour l'étude des mares temporaires naturelles et des rizières.

Ainsi, nous avons recherché et localisé la **sérotonine** et la **noradrénaline**, un autre neuromédiateur monoaminergique, chez des larves d'insectes aquatiques, à savoir *Cloeon dipterum* (Ephemeroptera, Baetidae) et *Chaoborus sp.* (Diptère) présents dans les mares autoroutières, où sont collectées les eaux de pluie et de lessivage de la chaussée, et des mares temporaires témoins. Afin de réaliser un suivi de l'expression de ces deux neuromédiateurs dans les deux types d'écosystèmes. Les animaux ont été prélevés tous les mois et ont été fixés directement sur le lieu de prélèvement dans du tampon phosphate contenant du PFA 1%. Nous avons ensuite comparé la distribution des neurones sérotoninergiques et noradrénergiques, par immuno-histo-chimie à fluorescence *in toto* chez les animaux chez les larves provenant des mares autoroutières par rapport à celles provenant des mares temporaires témoins.

Dans un premier temps, nous avons **mis en évidence la présence des deux neuromédiateurs**, la sérotonine et la noradrénaline, chez les deux types de larves de *Cloeon dipterum*, de *Chaoborus sp.*



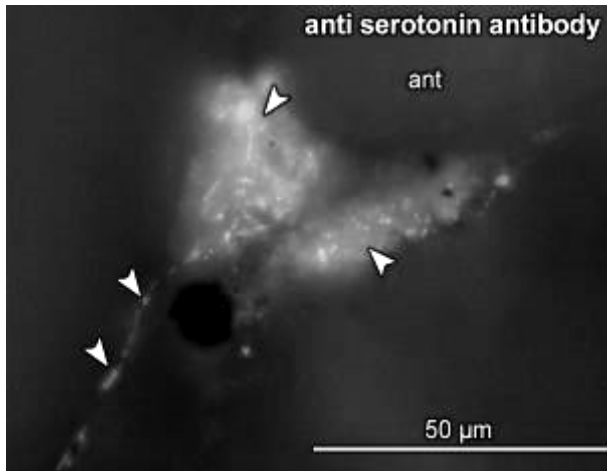
Expression de **sérotonine** au niveau du labre chez la larve aquatique *Cloeon dipterum* prélevée dans un bassin autoroutier (photo non publiée).



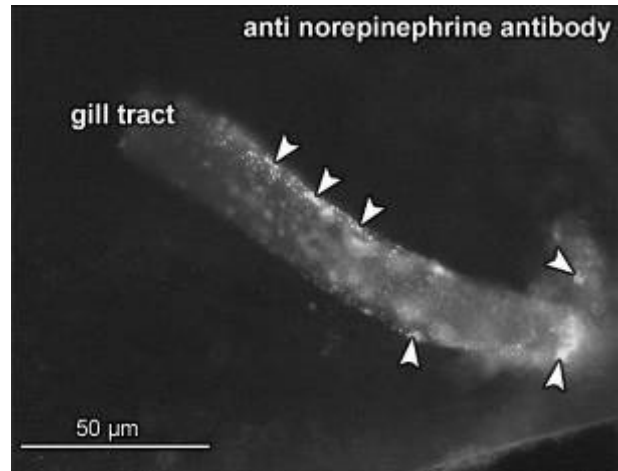
Expression de **noradrénaline** au niveau de la partie antérieure du thorax chez la larve aquatique *Cloeon dipterum* prélevée dans un bassin autoroutier (photo non publiée).

ACTIVITES DE RECHERCHE

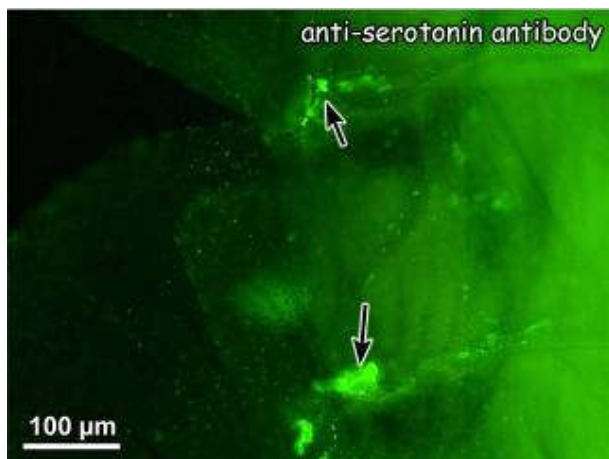
THEMATIQUE ACTUELLE



Bouton nerveux terminal **sérotoninergique** à la base d'une antenne chez la larve aquatique *Cloeon dipterum* prélevée dans un bassin autoroutier (photo non publiée).

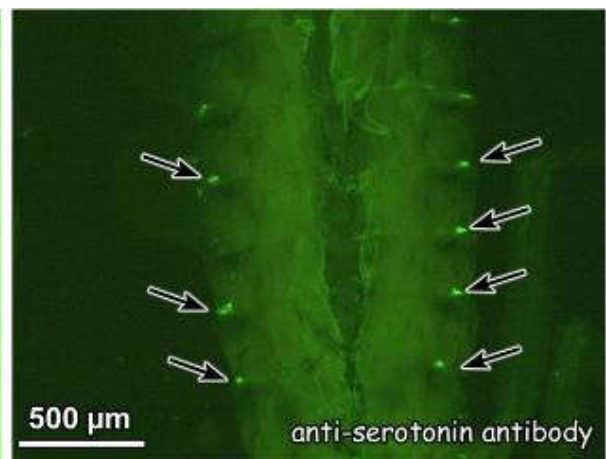


Expression de **noradrénaline** au niveau du système trachéolaire chez la larve aquatique *Cloeon dipterum* prélevée dans une mare temporaire de Camargue (photo non publiée).



(photo non publiée)

Expression de **sérotonine** au niveau des insertions branchiales chez la larve aquatique *Cloeon dipterum* prélevée dans un bassin autoroutier



(photo extraite du poster 15C)

En comparant la distribution des neurones sérotoninergiques, nous avons remarqué, par exemple, que les terminaisons nerveuses situées à la base des antennes, celles situées à l'insertion des branchies le long de l'abdomen ainsi que les alvéoles branchiales présentent une **forte immunoréactivité sérotoninergique chez les larves de *C. dipterum*** prélevées dans un **bassin autoroutier lors d'une forte augmentation de la conductivité** résultant du salage de la chaussée en hiver. En absence de pic de conductivité, c'est-à-dire pendant les autres saisons, nous n'avons pas observé cette intense expression de sérotonine chez *C. dipterum*. En revanche, chez des larves prélevées dans une mare temporaire voisine

ACTIVITES DE RECHERCHE

THEMATIQUE ACTUELLE

qui présente une conductivité faible et constante lorsqu'elle est en eau, nous n'avons observé pas d'immunoréactivité sérotoninergique au niveau des insertions branchiales. De plus, les terminaisons nerveuses à la base des antennes n'expriment que très faiblement la sérotonine.

Les **deux neuromédiateurs** étant impliqués dans la régulation de l'équilibre osmotique chez divers invertébrés¹, ils pourraient permettre la résistance de ces organismes dans des conditions environnementales défavorables. Nos travaux suggèrent un **rôle de biomarqueur de choc osmotique pour la sérotonine**.

Le travail concernant la distribution des neurones monoaminergiques, aujourd'hui encore en cours, permettra de compléter les résultats obtenus avec les Heat Shock Proteins (Hsp70, voir chapitre suivant "Les protéines de stress") afin de réaliser une **approche "multi-biomarqueurs"**.

Ces résultats encourageants obtenus chez des larves de l'éphémère *Cloeon dipterum* ont été en partie présentés au congrès international de l'UNESCO à Paris en janvier 2005.

(15C) Moreau X, De Jong L, Jean S, Scher O, Thiéry A. 2005. Diagnostic précoce & Evaluation des stress. Congrès 'Biodiversité : Science et Gouvernance', UNESCO, 24-28 janvier, Paris. Communication affichée

¹ Fingerman M, Jackson NC, Nagabhusanam R. (1998) Hormonally-regulated functions in crustaceans as biomarkers of environmental pollution. *Comp. Biochem. Physiol.*, **120C**: 343-350.

ACTIVITES DE RECHERCHE

THEMATIQUE ACTUELLE

LES PROTEINES DE STRESS

Les Protéines de choc thermique (Hsps)

Pour le contrat quadriennal 2004-2007, nous avons souhaité développer **une approche "multimarqueurs" pour appréhender les effets des perturbations et stress chez des organismes modèles**. Un axe de recherche, débuté en 2003, de cette thématique concernait l'étude des effets de perturbations naturelles de l'environnement sur l'expression de protéines de stress, les **protéines de choc thermique** (Heat Shock Proteins ou Hsps) chez les invertébrés aquatiques. Avec le Dr S. Jean, accueillie comme post-doctorante puis recrutée comme ATER dans l'équipe, nous avons proposé une **approche originale, l'analyse qualitative par immuno-histo-chimie de la distribution des protéines Hsp70 chez des invertébrés aquatiques à la suite de 3 types de stress** : un stress environnemental d'origine naturelle (assèchement de l'habitat), un stress environnemental d'origine anthropique (bassin autoroutier recevant les eaux de ruissellement de la chaussée) et un stress expérimental (lésion tissulaire).

Les protéines Hsps, famille de protéines chaperons très conservées au cours de l'évolution, jouent un rôle prépondérant dans le métabolisme cellulaire. Elles interviennent notamment en facilitant la réparation et l'élimination des protéines endommagées et, ainsi, permettent de limiter les phénomènes d'agrégation. **La plupart des protéines Hsps sont induites en réponse à une multitude de stress environnementaux**. En effet, la réponse Hsp est particulièrement sensible aux perturbations environnementales, faisant des protéines de stress des candidats potentiels en tant qu'**indicateurs biologiques de modifications naturelles ou anthropiques du milieu**¹.



Nous avons recherché la présence de protéines Hsp70 chez *Lepidurus apus*, un crustacé Branchiopode Notostracé inféodé aux mares temporaires ainsi que chez *Simocephalus vetulus* (Cladocera, Daphniidae). Nous nous sommes focalisés sur les protéines Hsp70 car leur séquence en acides aminés est l'une des plus conservées au cours de l'évolution et parce qu'elles interviennent dans la protection de

¹ Hyne RV, Maher WA. 2003. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicol. Environ. Safe.*, **54**: 366-374.

ACTIVITES DE RECHERCHE

THEMATIQUE ACTUELLE

nombreuses autres protéines cellulaires. En tant qu'habitats astatiques, ces mares temporaires de la région méditerranéenne offrent selon la période de l'année des conditions de vie 'optimales' et des conditions 'défavorables' lors de ***l'assèchement progressif de la mare***. Les espèces inféodées à ces milieux sont confrontées à des situations de ***stress extrêmes*** durant cette dernière période¹.

Les prélèvements des spécimens de *L. apus* et de *Simocephalus sp.* ont été réalisés dans une mare temporaire du Var près de Brignoles peu après sa mise en eau à l'automne puis de façon régulière jusqu'à son assèchement. Les animaux ont été fixés immédiatement sur le terrain puis ont été congelés. La mise en évidence de protéines Hsp70 a été réalisée sur des coupes congelées par immuno-histo-chimie à l'aide d'anticorps anti-Hsp70 couplés à des anticorps porteurs de fluorochromes.

Les résultats indiquaient que, chez *L. apus*, ***les protéines HSP70 sont exprimées au niveau des cæca digestifs et de l'épithélium intestinal uniquement lorsque les conditions abiotiques deviennent particulièrement drastiques***. Ceci permettrait d'expliquer, du moins en partie, le fait que ces crustacés soient capables de survivre pendant une longue période lors de l'augmentation importante de la température de l'eau, qui s'accompagne aussi d'une forte diminution de la teneur en oxygène dissout, et ce jusqu'à l'assèchement total de leur habitat. Des travaux expérimentaux sont actuellement en cours afin de savoir si une diminution de la teneur en O₂ dissout seule peut induire l'expression des Hsps au niveau de ces structures digestives.

Une partie de ces travaux a été présentée sous forme de communication affichée lors du 7th Evolutionary Biology Meeting à Marseille en 2003.

(13C) Jean S, De Jong L, **Moreau X**, Thiéry A. 2003. Hsps expression in Branchiopods (Crustacea): biomarker of stress adaptation and witness of evolution. 7th Evolutionary Biology Meeting, 25-27 juin, Marseille.

¹ Thiéry A. (1996) Ordres des Anostracés, Notostracés, Spinicaudata et Laevicaudata. In: Grassé PP (Eds), Masson, Paris, *Traité de zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie*, VII, 287-351.

ACTIVITES DE RECHERCHE

THEMATIQUE ACTUELLE

En parallèle des travaux menés chez les crustacés des mares temporaires, nous avons étudié l'expression des protéines de stress Hsp70 chez des invertébrés aquatiques soumis à un **stress d'origine anthropique**. L'objectif de ces recherches était d'*analyser la réactivité des Hsp70 chez des animaux vivant dans des bassins de rétention autoroutiers recueillant les eaux de la chaussée*.



Nous avons choisi comme **animal modèle les larves aquatiques d'un insecte des plus communs** en Europe de l'ouest : *Cloëon dipterum* (L. 1761)

(Ephemeroptera, Baetidae). En effet, depuis les années 1970, cet organisme est utilisé comme **bioindicateur** dans de nombreuses études toxicologiques



réalisées dans ses habitats dulçaquicoles naturels (mares, étangs, rivières,...). Les larves jouent un rôle important puisqu'elles sont les

principaux consommateurs primaires et qu'elles sont impliquées dans la transformation et le cycle des nutriments dans les écosystèmes d'eau douce. Cependant, bien que cet organisme soit largement utilisé comme bioindicateur, la recherche de modifications biologiques au niveau cellulaire et tissulaire chez les larves de *C. dipterum* a été quelque peu négligée. Comme pour l'étude du schéma d'expression de la sérotonine et de la noradrénaline, nous avons choisi une **approche qualitative qui permettrait de mettre en évidence les tissus "répondeurs" à un stress d'origine anthropique**. Les spécimens de *C. dipterum* ont été collectés dans 2 mares temporaires qui ont été sélectionnées pour leur conductivité similaire mais des paramètres physico-chimiques variant différemment.

Les 2 types de mares, temporaire et autoroutière, sont des habitats astatiques dont les paramètres abiotiques (température, concentrations ioniques, pH et taux d'oxygène dissous) varient de façon importante au cours des saisons. Par conséquent, les animaux vivants dans ces milieux ont développé des stratégies pour survivre à de telles conditions parfois extrêmes. Parmi ces stratégies, les protéines de choc thermique (Hsps) jouent un rôle important en étant induites lors d'un stress pour empêcher la dénaturation des protéines

ACTIVITES DE RECHERCHE

THEMATIQUE ACTUELLE

intracellulaires^{1,2}.

Nous avons choisi d'analyser le **schéma d'expression des Hsp70** parce qu'il a été montré que ces protéines pouvaient être **considérées comme biomarqueur de stress environnementaux**. De plus, ces protéines ubiquitaires, mises en évidence chez tous les organismes chez lesquels elles ont été recherchées, sont très conservées au cours de l'évolution. Nous avons donc proposé cette approche qualitative, qui soit applicable à des organismes de (très) petite taille, dans le cadre du *concept des biomarqueurs* pour caractériser à la fois une situation d'exposition et les effets biologiques au niveau de tissus/cellules cibles induits par des stress environnementaux.

Nous avons choisi d'étudier les effets d'un stress osmotique. Deux types de stress osmotique ont été retenus :

(i) un stress naturel, chez des larves vivant dans une mare temporaire soumise à un cycle d'assèchement périodique (notamment en été),

(ii) un stress d'origine anthropique chez des larves vivant dans une mare semi-permanente n'ayant pas subi d'assèchement estival mais ayant reçu un apport important de sel (NaCl) résultant du salage de la chaussée autoroutière en hiver.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec un doctorant, O Scher (Bourse ANRT CIFRE n° 609/2001 - Autoroutes du Sud de la France, Dir. Pr A. Thiéry).

¹ Jean S, De Jong L, Moreau X. 2004. Chaetognaths: a useful model for studying heat shock proteins. Effect of wound healing. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **312**: 319-332

² Freeman ML, Borrelli MJ, Meredith MJ, Lepock JR. 1999. On the path to the heat shock response: Destabilization and formation of partially folded protein intermediates, a consequence of protein thiol modifications. *Free Radic Biol Med*, **26**: 737-745.

ACTIVITES DE RECHERCHE
THEMATIQUE ACTUELLE

(14) De Jong L, **Moreau X**, Jean S, Scher O, Thiéry A. (2006). Expression of the heat shock protein Hsp70 in chloride target cells of mayfly larvae from motorway retention pond: a biomarker of osmotic shock. *Science of the Total Environment*, 366: 164-173.

(IF₂₀₀₆: 2.359)

(21C) De Jong L, **Moreau X**, Jean S, Scher O, Thiéry A. 2007. L'expression des protéines de choc thermique Hsp70 dans les cellules chloracogènes de larves d'éphémères d'un bassin de rétention autoroutier : un biomarqueur de choc osmotique. 50^{ème} Congrès de l'Association Française de Limnologie, 12-15 novembre, Toulouse. *Communication affichée*

ACTIVITES DE RECHERCHE
THEMATIQUE ACTUELLE

Dans cette étape de transition entre les deux thématiques, nous avons réalisé des mises au point pour la détection *in toto* des Hsp70 chez le chaetognathe *Spadella cephaloptera*, espèce subissant des stress naturels dans les milieux paraliques. Les chaetognathes présentent un très grand intérêt comme modèle d'étude dans la mesure où ces organismes sont particulièrement sensibles aux modifications environnementales. En effet, certaines espèces caractérisent les masses d'eau qu'elles occupent, de manière plus évidente que les données physico-chimiques¹. De plus, les espèces benthiques comme *S. cephaloptera* peuvent être élevées en aquarium tout au long de l'année et se prêtent donc à l'expérimentation. Ces organismes ont également la capacité de survivre à de graves blessures et cicatrisent aisément. Ainsi, dans le cadre d'une approche expérimentale, nous avons étudié les **répercussions d'un stress tissulaire sur l'expression des protéines Hsp70** chez ces invertébrés aquatiques. Ainsi, **après une section de la partie postérieure de l'animal en dessous des vésicules séminales**, nous avons observé une expression de Hsp70 fonction du temps dans les tissus au niveau de la blessure mais aussi dans les muscles et l'épiderme adjacent ainsi que dans certaines régions du système nerveux. Cinq jours après la section de la queue, nous avons observé une forte induction des Hsp70 lors de la reformation des vésicules séminales.

Les chaetognathes étant des invertébrés exclusivement marins, nous n'avons retenu ce modèle d'étude pour les thématiques proposées au contrat quadriennal 2008-2011 dans l'UMR-CNRS 6116 IMEP.

Ces travaux ont été publiés en 2004.

(10) Jean S, De Jong L, **Moreau X. 2004.** Chaetognaths: a useful model for studying heat shock proteins. Effect of wound healing. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **312**: 319-332.

(IF₂₀₀₆: 1.919)

¹ Furnestin ML. 1957. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*. **21**: 1-356.

ACTIVITES DE RECHERCHE
THEMATIQUE ACTUELLE

Les métallothionéines

Les substances chimiques provenant de l'activité humaine s'accumulent dans les eaux résiduaires. Elles sont d'origine urbaine et/ou industrielle et une quantité importante de ces rejets est traitée par les stations d'épuration (STEP). Toutefois, malgré une prise de conscience se traduisant par une mise aux normes des STEP, souvent sous-dimensionnées, une partie des molécules organiques et inorganiques ne peut être complètement éliminée et se retrouve dans l'environnement aquatique, principalement adsorbée aux sédiments (effet mémoire du substrat). De ce fait, une importante diversité de ces molécules, dont certaines sont nocives pour les organismes vivants, peut engendrer des problèmes environnementaux. Dans les Bouches de Rhône, les multiples rejets industriels et domestiques entraînent une contamination chronique, parfois même aiguë, des rivières avec un impact certain sur les



écosystèmes aquatiques. La rivière "la Cadière", qui traverse les communes des Pennes-Mirabeau, Marignane, Saint-Victoret et Vitrolles, est connue pour la qualité médiocre de ses eaux. Elle constitue un milieu fragile et exposé dans la mesure où elle traverse des zones industrielles et très urbanisées avant de se jeter dans un étang lagunaire mitoyen de l'étang de Berre : l'étang de Bolmon, qui devient de fait le réceptacle de la pollution de la Cadière. Cette rivière et l'étang de Bolmon constituent des milieux fragiles qu'il faut étroitement surveiller. Ils font d'ailleurs l'objet d'un contrat de rivière, dans le cadre du projet SAGE ARC PROVENCAL, dont les principaux enjeux sont la protection des milieux et la dépollution (dans lequel intervient l'équipe EC2M du département 2 de l'IMEP)

Dans l'approche "**multimarqueurs**" pour appréhender les effets des perturbations et stress chez des organismes modèles, nous avons débuté depuis peu l'étude des **métallothionéines (MTs)**, des protéines riches en cystéine capables de fixer différents ions métalliques. En effet, les MTs sont connues comme étant de bons indicateurs d'exposition métallique. Parmi les pollutions chroniques les plus fréquentes de nos rivières, les métaux sont particulièrement préoccupants, eu égard à leur rémanence, leur bioaccumulation et leur

ACTIVITES DE RECHERCHE

THEMATIQUE ACTUELLE

toxicité. Depuis le début des années 1990, il est connu que les larves aquatiques d'insectes peuvent accumuler les métaux traces. Ces larves faisant partie du régime alimentaire des poissons, la bioamplification des métaux le long de la chaîne trophique peut présenter des risques pour l'Homme. Dans un souci de biosurveillance, nos travaux s'inscrivent dans une "calibration" de biomarqueurs mesurés chez les invertébrés aquatiques d'eau douce pour une utilisation *in situ*. Cette **calibration** nécessite (1) la mise au point d'une **technique de mesure simple et fiable**, (2) la connaissance et la prise en compte de **facteurs abiotiques et biotiques** pouvant influencer la réponse biomarqueur. Toutefois, il n'existe *aucun protocole simple permettant l'utilisation en rivière des MTs en tant que biomarqueurs*.

Afin de mettre au point un protocole simple utilisable en routine sur le terrain et qui soit applicable aux rivières méditerranéennes urbanisées, nous avons d'abord recherché par immuno-histo-chimie la présence des MTs chez des **larves de Chironomes**, des bioindicateurs prélevés à la sortie d'une STEP sur la Cadière.

Nos premiers résultats ont permis de montrer que ces protéines de stress s'exprimaient au niveau de la zone apicale des cellules intestinales et ce dans la partie médiane du tube digestif.

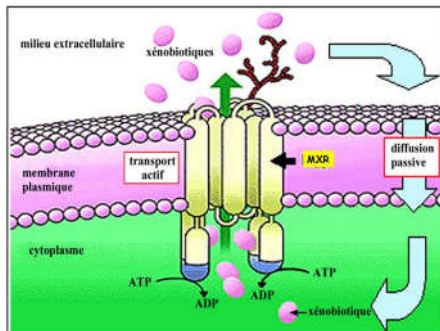
Ces premiers résultats ont été présentés sous forme de communication affichée.

(17C) Saez G, Schembri T, **Moreau X**, Lagadec V, Thiéry A, De Jong L. 2006. Mises au point d'un biomarqueur d'exposition chronique aux métaux pour la surveillance de la qualité des eaux fluviales en région méditerranéenne. Colloque *Euro-méditerranéen de Biodiversité Environnementale, Ecologie, Ecophysiologie et Ecotoxicologie*, 7-10 décembre, Marseille. *Mésogée*, vol 62, p. 39.

Nous poursuivons à l'heure actuelle cet axe de recherche par la mise au point d'une quantification de ces MTs par un dosage ELISA chez les organismes vivants dans les écosystèmes aquatiques que nous étudions. Les travaux à venir et les directions envisagées seront développés plus loin dans le chapitre "Projets Scientifiques".

ACTIVITES DE RECHERCHE
THEMATIQUE ACTUELLE

Les Systèmes de Résistance Multixénobiotiques (MXR)



Le système de Résistance MultiXénobiotique (**système MXR**) est un système de défense cellulaire qui, part l'intermédiaire d'une pompe membranaire ATP-dépendante, du type *P-glycoprotéine* (P-gp), expulse les xénobiotiques à l'extérieur de la cellule¹. Ce système étant peu spécifique, la variété de substrats pouvant s'y lier est importante. Il

s'agit d'une première ligne de défense contre les xénobiotiques évitant ainsi l'accumulation dans la cellule de ces agents potentiellement toxiques. Ce type de transporteur protéique, déjà décrit chez une de nombreux organismes aquatiques, peut s'exprimer dans différents tissus. Il s'agit de protéines analogues à celles découvertes chez l'Homme qui constituent le *système de Résistance MultiDrogue* (système MDR) permettant aux cellules cancéreuses de résister aux drogues thérapeutiques. Les protéines du système MXR sont constitutives, c'est à dire qu'elles présentent un niveau de base spécifique chez les organismes qui les expriment. Suite à une exposition aux xénobiotiques, leur caractère rapidement inductible (augmentation de leur concentration cellulaire), en fait de bons candidats en tant que biomarqueurs. Ceci devrait permettre leur utilisation dans des programmes de surveillance ou «Biomonitoring» de la qualité de l'écosystème.

En collaboration avec des chercheurs de l'équipe et de l'UMR 6149 (Université de Provence), nous avons mis au point une méthode de quantification par **ELISA de la densité membranaire des MXR chez les larves de chironomes**. Cette méthode permet d'évaluer les effets de modifications des conditions environnementales sur ce 1^{er} système de défense cellulaire **de manière simple et sensible**. En effet, une fixation des organismes directement sur le lieu de prélèvement permet de s'affranchir de nombreuses contraintes liées aux études sur les organismes vivants. Ainsi, la méthode permet de traiter plusieurs prélèvements biologiques récoltés simultanément. Dès lors, il devient possible d'effectuer un suivi longitudinal d'un cours d'eau sur une période donnée. De plus, elle facilite grandement le tri des animaux sous la loupe binoculaire et permet une réduction du délai expérimental par

¹ Eufemia NA, 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. *Aquat. Toxicol.*, **49**, 89-100.
Indices Biologiques de Diagnostic Précoce en Santé Humaine et en Ecologie : Aspects Neuroendocriniens, Cytotoxiques et Génotoxiques

ACTIVITES DE RECHERCHE

THEMATIQUE ACTUELLE

rapport aux méthodes actuellement utilisées dans le domaine des biomarqueurs comme outil de diagnostic écologique (Western blot, méthodes fonctionnelles ou utilisant la microscopie, dosages d'activités enzymatiques,...). Par ailleurs, cette méthode présente aussi l'avantage d'étudier soit l'organisme entier soit uniquement l'organe cible, ici dans le cas des larves de Chironome, le tube digestif. Ce travail, publié dans *Environmental Pollution* (quartile 1 en Sciences Environnementales), constituait la **première étape de la calibration de ce biomarqueur** en vue d'une utilisation future en routine sur le terrain dans des programmes de surveillance de la qualité de l'écosystème.

(16) Moreau X, Saez G, Thiéry A, Clos-Faybesse O, Guiraudie-Capraz G, Bienboire-Frosini C, Martin C, De Jong L. (2008). Development of an ELISA assay for the detection of Multixenobiotic Resistance transporter induction in indigenous freshwater Chironomidae larvae (Diptera): a step in the calibration of a biomarker for monitoring xenobiotic exposures in the field. *Environmental Pollution* (sous presse).

(IF₂₀₀₆ 2.769)

ACTIVITES DE RECHERCHE

THEMATIQUE ACTUELLE

Une fois cette technique opérationnelle, nous avons montré, en collaboration avec une équipe de l'EA 1784, le Laboratoire d'Hydrologie & Molysmologie Aquatique (Faculté de Pharmacie, Aix-Marseille II), que la **densité membranaire des protéines du système MXR** chez les larves de Chironomes prélevées dans la rivière urbaine méditerranéenne, La Cadière, **était corrélée avec les concentrations de 10 des 16 HAPs considérés comme prioritaires** par la *United States Environmental Protection Agency*. En effet, nous avons montré une **induction des protéines du système MXR avec l'augmentation de la quantité de HAPs contenus dans les sédiments** que nous avons analysés. Par contre, nous n'avons pas mis en évidence de relation entre la densité membranaire de ces protéines et les taux de PCBs dans les sédiments de la rivière.

Ces résultats, acceptés pour publication dans *Environmental Research*, constituent la **deuxième étape de la calibration de ce biomarqueur**.

(18) Saez G, De Jong L, **Moreau X**, Sarrazin L, Wafo E, Schembri T, Lagadec V, Diana C, Monod J-L, Thiéry A. Evaluation of pollutant exposure by chemical and biological markers in a Mediterranean French urban stream: a step for *in situ* calibration of multixenobiotic resistance transporter expression as biomarker in Chironomidae larvae. *Environmental Research* (sous presse).

(IF₂₀₀₆ 2.556)

Une partie de ces travaux a aussi été présentée au 50^{ème} Congrès de l'Association Française de Limnologie en novembre 2007.

(22C) Saez G, De Jong L, **Moreau X**, Sarrazin L, Wafo E, Schembri T, Lagadec V, Diana C, Thiéry A. 2007. Les protéines du système de Résistance MultiXénobiotiques (MXR) chez les larves de Chironome : Approche *in situ* dans la calibration d'un biomarqueur potentiel pour l'évaluation de la qualité des eaux d'une rivière urbaine méditerranéenne. 50^{ème} Congrès de l'Association Française de Limnologie, 16-17 novembre, Toulouse.

Les expérimentations pour réaliser la prochaine étape de calibration seront développées dans le chapitre "*Projets Scientifiques*".

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT
THEMATIQUE ACTUELLE

GENOTOXICITE

Cet axe de recherche réalisé grâce à des collaborations avec d'autres équipes de recherche s'intègre directement dans notre démarche "multibiomarqueurs" pour la mise au point d'outils de diagnostic écotoxicologiques précoces répondant à la complexité de la pollution multifactorielle aiguë et chronique en milieu aquatique urbanisé. La figure 8 ci-dessous résume les interactions entre notre équipe et deux équipes de l'EA 1784 : le Laboratoire d'Hydrologie & de Molysmologie Aquatique (agrément du Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, Resp. F. Garcia) et le Laboratoire de Biogénotoxicologie & Mutagenèse Environnementale (Dir. Pr A. Botta), Faculté de Pharmacie, Aix-Marseille II.

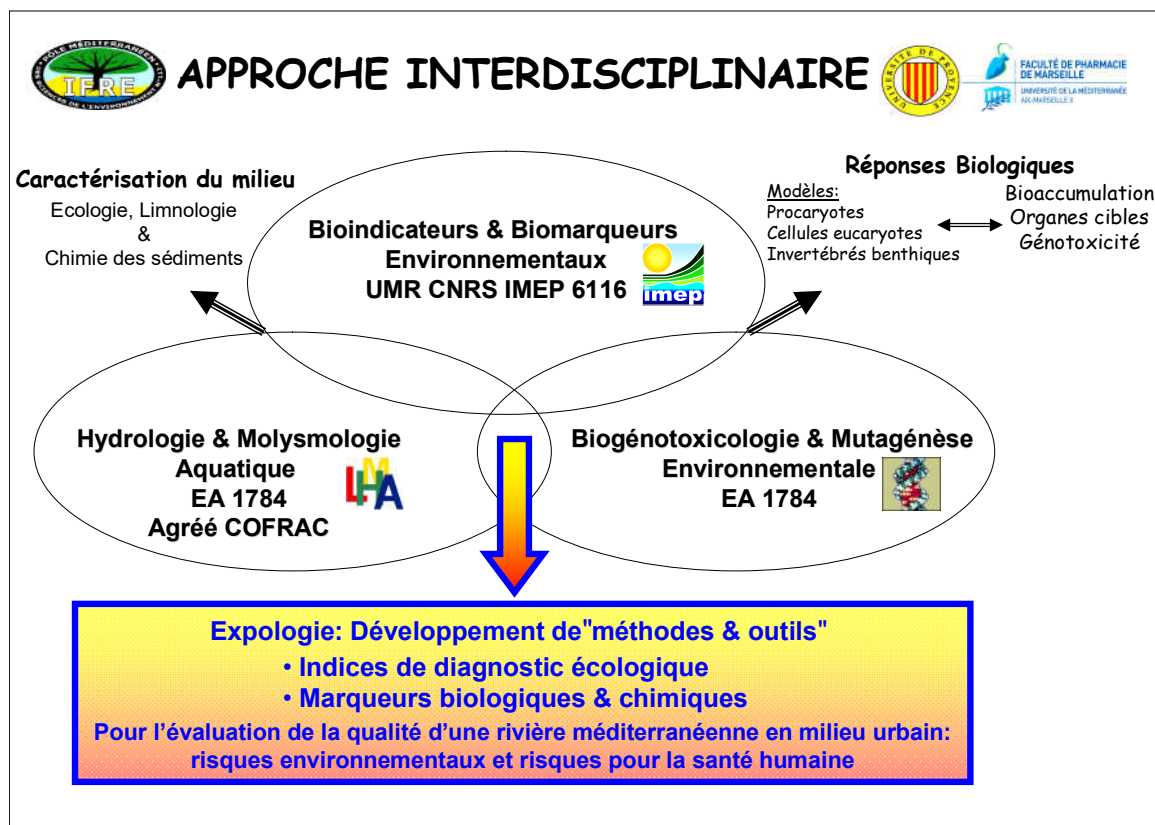


Figure 8 : Schéma synoptique illustrant les interactions entre les champs disciplinaires des trois équipes partenaires appartenant à la Fédération "ECOREV" pour la mise au point de marqueurs de génotoxicité.

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT
THEMATIQUE ACTUELLE

Dans le cadre d'un **Master 2R (Assia AOUADENE)**, que j'ai co-dirigé avec C. DI GIORGIO (EA 1784, Lab. de Biogénotoxicologie & Mutagenèse Environnementale), nous avons mutualisé et associé les compétences de nos deux équipes pour le **développement de méthodes et d'outils associant des marqueurs chimiques et des marqueurs biologiques afin d'évaluer le niveau de contamination des sédiments de la Cadière**. Les résultats de terrain obtenus l'année précédente dans le cadre d'un master 2R 'Sciences de l'Environnement Terrestre' (G. Saez, co-direction Pr A. Thiéry et L. De Jong) ont permis de définir le cadre de ces recherches. Au cours de ce stage, notre objectif était d'étudier la **mutagénicité de prélèvements des sédiments au moyen de 3 tests complémentaires de génotoxicité**. Ce stage a comme finalité l'application à l'évaluation du risque génotoxique chez l'Homme.

Ainsi, au cours de cette étude, la génotoxicité des sédiments de quatre sites de prélèvements sur "La Cadière" situés en zone urbaine et sur son affluent, Le Raumartin, ainsi que sur une rivière située en zone non urbanisée, dans le massif de la Sainte Victoire, a été étudiée par trois tests de toxicologie génétique (le **test d'Ames** avec deux souches bactériennes de *Salmonella typhimurium*, le **test de numération des micronoyaux** et le **test des comètes** sur cellules ovariennes de hamster chinois - CHO).

Cette étude a permis de retrouver la présence de HAPs dans les sédiments de la Cadière, confirmant les résultats obtenus l'année précédente (voir chapitre plus haut, "*Les Systèmes de Résistance Multixénobiotiques*"). Les résultats des tests de toxicologie génétique ont montré que les **sédiments avaient un pouvoir génotoxique, mutagène et clastogène et/ou aneugène** sur les cellules procaryotes et eucaryotes. L'ensemble de ces résultats nous a amené à conclure à la complémentarité des trois tests utilisés : (i) Le test d'Ames est un test capable de détecter des mutations géniques chez des bactéries. De plus, avec sa combinaison de souches, il peut différencier l'activité mutagène des nitro-arènes, des amines aromatiques et des HAPs. Il peut donc apporter une information sur l'origine de la pollution. (ii) Le test de numération des micronoyaux détecte des mutations chromosomiques chez des cellules eucaryotes, première étape de la cancérogenèse chez l'Homme. Il traduit donc un risque

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT
THEMATIQUE ACTUELLE

cancérogène pour l'Homme, mais aussi pour les espèces animales exposées *in situ*. (iii) Le test des comètes, par sa capacité à détecter les lésions primaires directes (sans mélange métabolisant) et les sites incomplets de réparation de l'ADN (avec mélange métabolisant), apporte une information sur le rôle du stress oxydatif dans la génotoxicité globale des sédiments. Au niveau de la Cadière, **l'activité mutagène est fortement liée à la présence de dérivés aromatiques nitrés** (nitro-HAPs, nitro-arènes) connus pour être 100 à 1000 fois plus mutagènes que les HAPs. Au niveau des sédiments prélevés en zone rurale, au pied de la Montagne S^{te} Victoire, une activité mutagène due à la présence d'amines aromatiques ainsi qu'une activité clastogène ont été détectées. Ces activités peuvent être expliquées par la présence de produits de dégradation de pesticides utilisés dans les exploitations agricoles proches de cette zone. Les tests de mutagenèse ont permis de compléter avantagement les analyses physico-chimiques car ils permettent d'évaluer un risque génotoxique global.

Il faut aussi souligner que l'évaluation de la génotoxicité globale a clairement montré que d'autres substances que les HAPs, qui pourraient être des nitro-arènes mais restant à être identifier, jouent un rôle prépondérant dans la toxicité chronique des sédiments de la Cadière.

Ces résultats ont été présentés au 50^{ème} Congrès de l'Association Française de Limnologie le novembre 2007 (20C) et ont été acceptés pour publication dans Environmental and Molecular Mutagenesis (17).

Cette génotoxicité avérée des sédiments pourrait également se traduire par une réponse biologique *in situ* au niveau des invertébrés aquatiques. Cette hypothèse sera développée dans le chapitre suivant "Projets scientifiques".

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT
THEMATIQUE ACTUELLE

(17) **Aouadene A**, Di Giorgio C, Sarrazin L, **Moreau X**, De Jong L, Garcia F, Thiéry A, Botta A, De Méo M. (2008) Evaluation of the genotoxicity of river sediments from industrialized and unaffected areas using a battery of short-term bioassays. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. (sous presse).

(IF₂₀₀₆ 2.653)

(20C) **Aouadene A**, Di Giorgio C, De Méo M, **Moreau X**, De Jong L, Sarrazin L, Thiéry A, Botta A. 2007. Etude de l'activité génotoxique de sédiments issus de la rivière la Cadière (Bouches du Rhône). 50^{ème} Congrès de l'Association Française de Limnologie, 16-17 novembre, Toulouse.

ACTIVITES DE RECHERCHE
THEMATIQUE ACTUELLE

NANO-BIOTECHNOLOGIES : Utilisation de vecteurs nucléo-amphiphiles dans la détection de polluants bioaccumulés

Ce projet de recherches a été initié, là aussi, grâce à l'association des compétences et des connaissances de trois équipes : deux équipes de chimistes, une dirigée par le Pr P. Barthélémy (équipe Chimie des ARN : Aptamères, Sonde et Transport, INSERM 869, Dir J.-J. Toulmé, Université P. Segalen, Bordeaux II), une par le Dr M. Camplo (Chimie médicinale, chimie des nucléosides, UMR CNRS 6114, Aix-Marseille II) et notre équipe. Pour ce projet, une demande d'ACI "Jeunes Chercheurs" (*Amphiphiles dérivés d'oligonucléotides modifiés pour le transport d'acides nucléiques*) a été déposée auprès de l'Agence Nationale de la Recherche en 2005 puis cette demande a été renouvelée comme Projet Blanc dans la catégorie "Nanosciences et Nano-Biotechnologies" auprès de l'Agence Nationale de la Recherche en 2007.

L'objectif premier de ce projet était d'**utiliser des constructions vectorielles artificielles** mises au point par l'équipe du Pr P. Barthélémy **pour transférer des molécules biologiques** (protéines, gènes...) avec une application dans le domaine médical.

En effet, au cours de la dernière décennie, de nombreuses difficultés ont été surmontées dans le domaine des biotechnologies impliquant la manipulation génétique. Ainsi, l'utilisation des acides nucléiques en tant que médicament n'apparaît plus comme utopique. La **thérapie génique**, qui fait intervenir le transport d'acides nucléiques naturels ou synthétiques, constitue une approche thérapeutique porteuse d'un formidable espoir dans le traitement d'une multitude de maladies héréditaires et non-héréditaires (cancers, VIH,...). La capacité d'ajouter, de remplacer ou d'enlever des gènes spécifiques pourrait fournir un nombre illimité d'opportunités, mais aujourd'hui, le transport et la délivrance de gènes restent un objectif difficile à atteindre. A côté des vecteurs viraux difficiles à maîtriser, le **développement de structures artificielles** occupe une place de choix dans la **recherche de nouveaux agents de transfection**. Cette approche basée sur des structures de type amphiphiles cationiques,

ACTIVITES DE RECHERCHE

THEMATIQUE ACTUELLE

polymères linéaires, dendrimères, et micro/nanosphères capables de condenser et de transporter des acides nucléiques (ADN, ODN antisens, ARN, ARN interférence, siRNA) au travers des membranes, pourrait offrir une solution au problème du transport de matériel génétique. Cependant, les complexes formés sont peu utilisés *in vivo* en raison de leur toxicité et de la formation d'agrégats volumineux qui pénètrent difficilement les cellules. D'une façon générale, ces agrégats se trouvent confrontés aux problématiques impliquant les étapes de complexation transporteur-acide nucléique, l'endocytose, le relargage au niveau de l'endosome, la pénétration nucléaire, l'expression mais également la toxicité. En outre, peu de ces transporteurs sont capables de véhiculer les siRNA.

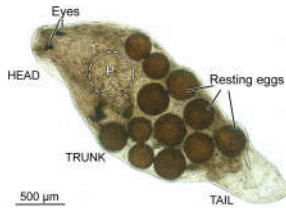
Le projet proposé dans le cadre de ces recherches vise à améliorer la complexation, le transport, et le relargage des acides nucléiques grâce à l'utilisation de vecteurs, considérés non toxiques, constitués d'amphiphiles porteurs d'information à séquence, charge et lipophilie modulables. Nos collègues chimistes ont donc proposé **d'élaborer des nouveaux transporteurs nucléo-amphiphiles, puis d'évaluer leur efficacité de transfection.** Ces amphiphiles possèderaient à la fois l'information moléculaire des acides nucléiques et les caractéristiques de compartimentation des lipides.

Les **possibilités d'application** de ces outils sont nombreuses et intéressent **à la fois la médecine et l'écotoxicologie.** En effet, ce concept offre un avenir très intéressant dans le domaine environnemental. Avec mes collègues, le Dr L. de Jong et le Pr A. Thiéry, nous avons imaginé utiliser ces copolymères nucléo-amphiphiles comme détecteurs de contaminants bioaccumulés par les organismes (cf "*Projets scientifiques*"). Mais avant d'atteindre ce but, il était indispensable de vérifier l'internalisation et la stabilité des vecteurs nucléo-amphiphiles chez l'organisme vivant. Les travaux de transfection avaient jusqu'alors été menés sur cultures cellulaires et nous avons proposé au Pr P. Barthélémy d'étudier les capacités de **transfection de molécules à l'aide des copolymères nucléo-amphiphiles *in vivo* chez des organismes modèles.** Ceci permettait également de vérifier **l'absence de toxicité de ces nano-composés chez l'organisme vivant.** Ainsi, avant de transférer des séquences nucléotidiques parfois volumineuses, nous avons proposé de coupler les vecteurs à une petite molécule facilement repérable chez ces organismes, la **rhodamine B.** La **rhodamine B** est aussi

ACTIVITES DE RECHERCHE

THEMATIQUE ACTUELLE

un xénobiotique transporté par le copolymère et sert également de traceur. Le choix de l'organisme modèle s'est naturellement porté sur un **invertébré aquatique**, un **plathelminthe**



de la famille des Mesostominae, qui est de petite taille, transparent, avec un plan d'organisation simple, facilement maintenu en vie au laboratoire et dont la biologie était connue par le Pr A. Thiéry. Ces plathelminthes, prélevés dans une mare temporaire du Var (Brignoles),

ont été mis en contact avec une solution aqueuse contenant les copolymères couplés à la rhodamine B pendant des temps variables et à des températures différentes. Or, la rhodamine B, utilisée ici comme xénobiotique, est un substrat des pompes membranaires du système MXR, qui existe chez tous les invertébrés chez lesquels il a été recherché. Dans cette étude, nous avons montré l'existence des protéines du système MXR chez ce plathelminthe par ELISA et par une méthode fonctionnelle en utilisant du vérapamil, un inhibiteur de ces pompes (Figure 9). En présence de vérapamil, la rhodamine B n'est pas expulsée et reste séquestrée dans les cellules de l'animal (Figure 9b).

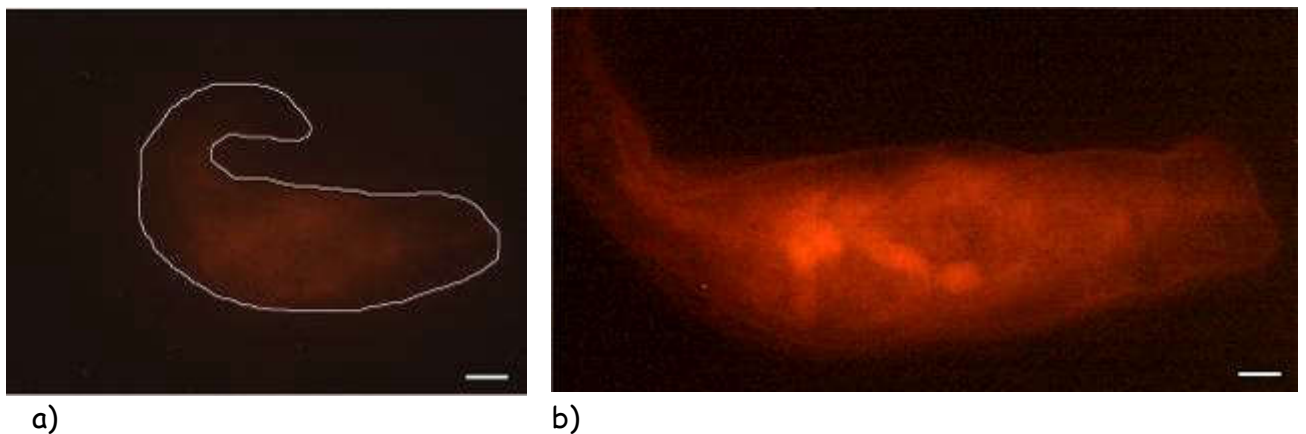


Figure 9 : Accumulation de rhodamine B seule chez les plathelminthes vivants en absence (a) ou en présence (b) de vérapamil, un inhibiteur des systèmes MXR. En présence de vérapamil, la rhodamine B n'est pas expulsée et reste séquestrée dans les cellules de l'animal. Barres = 200 µm.

Lors des incubations des plathelminthes vivants avec la solution aqueuse contenant les copolymères couplés à la rhodamine B, nous avons montré que leur incorporation, observée au microscope à épifluorescence, a été effective en absence de vérapamil. En effet, nous avons observé leur présence dans les cellules de l'épiderme, du pharynx ainsi que dans les cellules des œufs (Figure 10). Au niveau des cellules épidermiques, nous avons montré que

ACTIVITES DE RECHERCHE
THEMATIQUE ACTUELLE

l'accumulation des copolymères se faisait préférentiellement dans des organites appelés rhabdites (Figure 10a).

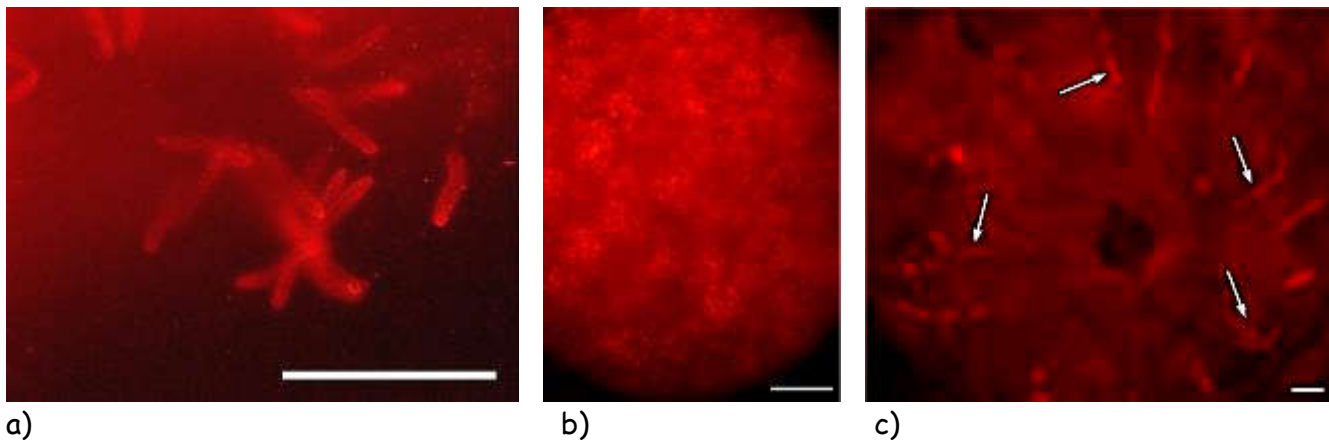


Figure 10 : Incorporation et accumulation *in vivo* de copolymères nucléo-amphiphiles couplés à la rhodamine B chez les plathelminthes, au niveau des rhabdites dans les cellules épidermiques (a), des cellules des oeufs (b) et des cellules du pharynx (c). barres = 50 μ m.

Ces copolymères amphiphiles contiennent des motifs cholestérol et de ce fait, ne présentent apparemment pas de toxicité pour les organismes. Ceci est confirmé par nos expériences en conditions contrôlées puisque tous les vers plats ont survécu aux incubations avec les copolymères.

Nos résultats ont montré que les copolymères amphiphiles permettaient l'internalisation et le stockage d'un xénobiotique, ici la rhodamine B, qui aurait été expulsé par le système de défense MXR s'il n'avait pas été couplé au vecteur. Ce résultat est important dans la mesure où ce système MXR est analogue au système de résistance multidrogues (MDR) impliqué dans le rejet des médicaments anticancéreux et donc dans la résistance aux traitements dans certains cancers.

Même si l'appel à proposition (ACI "Jeunes chercheurs") que nous avons proposé en 2005 n'a pas été retenu, nos équipes ont poursuivi cette collaboration et nous avons pu présenter ces résultats sous forme de deux communications affichées (**18C**, **23C**). De plus, l'ensemble de ces travaux viennent d'être acceptés pour publication dans la revue internationale "Bioconjugate Chemistry" (**19**).

Dans la partie "Projets Scientifiques", je développerai cet axe d'investigations pour préciser la façon dont ces **copolymères amphiphiles pourraient être utilisés comme outils de diagnostic écotoxicologique** dans la détection de polluants bioaccumulés.

(19) De Jong L, **Moreau X**, Thiéry A, Godeau G, Grinstaff MW, Barthélémy P. (2008)
Amphiphilic copolymer for intracellular delivery of xenobiotics: *in vivo* studies in a
freshwater invertebrate, the Mesostominae flatworm. *Bioconjugate Chemistry*. (*sous
presse*).

(IF₂₀₀₆ 3.842)

ACTIVITES DE RECHERCHE

➤ Projets scientifiques

Introduction	97
Les signaux neuroendocriniens	99
Les protéines de stress	100
Génotoxicité	103
Nano-biotechnologies	106
Etudes transversales associant les chercheurs de biologie animale et de biologie végétale	110

ACTIVITES DE RECHERCHE
PROJETS SCIENTIFIQUES

INTRODUCTION

Mes projets de recherche s'inscrivent dans le cadre des thématiques retenues par l'UMR 6116 IMEP 'Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléoécologie' (Aix-Marseille Université) à laquelle je suis intégré depuis le 1^{er} janvier 2008.

Dans le cadre de l'approche "**multibiomarqueurs**" que notre équipe a proposé pour le contrat quadriennal 2008/2011 et dans le cadre de recherches à plus long terme, il s'agira de:

↳ **développer des biomarqueurs de neurotoxicité** sensibles à certains pesticides ou xénobiotiques qualifiés de "perturbateurs endocriniens", à côté des biomarqueurs déjà connus bien que non calibrés tels que l'activité de l'acétylcholine estérase (AChE). Parce que de plus en plus de produits pharmaceutiques se retrouvent dans l'environnement et que nombre d'entre eux exercent leurs effets sur le système nerveux, je souhaite étudier leurs effets sur les **systèmes monoaminergiques, et notamment sérotoninergiques**, chez les invertébrés vivant dans les rivières urbaines méditerranéennes.

↳ **continuer les travaux sur les protéines de stress** en tant que biomarqueurs avec en priorité, poursuivre la calibration de l'utilisation des protéines du système MXR comme biomarqueur suite à une exposition aux HAPs chez les invertébrés de rivière méditerranéenne. Je souhaite poursuivre aussi ma collaboration dans la mise au point et la calibration de l'utilisation des métallothionéines et des Hsp comme biomarqueur. Ces travaux s'effectueront en collaboration avec des collègues de l'équipe mais également avec les chimistes du Laboratoire d'Hydrologie et Molysmologie Aquatique (EA 1784).

ACTIVITES DE RECHERCHE

PROJETS SCIENTIFIQUES

↳ de renforcer la collaboration avec le Laboratoire de Biogénotoxicologie & Mutagenèse Environnementale du Pr A. Botta (EA 1784) pour la **mise au point de biomarqueurs de génotoxicité chez les invertébrés aquatiques d'eau douce** que nous étudions. Ceci permettrait de mettre en place des organismes "sentinelles" détecteurs d'effets génotoxiques. La détection d'une base mutée sur l'ADN, la 8-oxo-d-guanosine, a d'ores et déjà été retenue pour les premières investigations qui sont prévues au cours de ce premier semestre 2008 avec des étudiants en stage (L3). D'autre part, j'envisage également de mettre au point la quantification d'une protéine, la p53, que l'on appelle la '*protéine gardienne du génome*', chez des invertébrés aquatiques vivant dans les rivières urbaines méditerranéennes. A terme, notre projet est d'**élaborer une méthode simple, fiable et sensible que l'on pourrait normaliser** (AFNOR ?) comme outil de diagnostic précoce d'effet(s) génotoxique(s).

↳ de **poursuivre les travaux concernant les copolymères amphiphiles** synthétisés par l'Equipe CAST (Chimie des ARN ; Aptamères, Sonde et Transport) de l'Unité INSERM U869 (Resp. Pr Philippe Barthélémy) pour produire des **détecteurs de polluants bioaccumulés** chez des organismes vivants.

↳ **renforcer les études transversales** associant les chercheurs de biologie animale et végétale de l'équipe sur une problématique commune : l'évaluation des effets des perturbations et stress chez des organismes indicateurs ; nous travaillerons sur le même milieu pour mettre au point à la fois des biomarqueurs chez les végétaux et sur les animaux. Le projet repose sur la constatation que les biomarqueurs que nous avons retenus existent à la fois chez les végétaux et chez les animaux. D'ailleurs, même la sérotonine et le GABA, qui sont des neuromédiateurs chez les animaux, existent chez les végétaux.

↳ **renforcer et développer des collaborations** avec des équipes françaises et étrangères.

ACTIVITES DE RECHERCHE
PROJETS SCIENTIFIQUES

LES SIGNAUX NEURO-ENDOCRINIENS (30%)

Le propre d'un biomarqueur cellulaire, comme les protéines de stress, est d'être induit suite à l'exposition à un ou plusieurs xénobiotiques. Cependant, tous les organismes présentent un niveau de base de ces protéines puisqu'elles interviennent dans le fonctionnement cellulaire. Ce niveau de base peut varier au sein de la même espèce, en particulier si la population a été exposée ou non à une pollution. De ce fait, les **pollutions chroniques peuvent influencer et modifier les capacités de réponse d'un organisme**. Un des aspects de cette réponse est sans nul doute **sous le contrôle du système nerveux**. Parmi les nombreux neuromédiateurs, les monoamines, et notamment la sérotonine, pourraient s'avérer être de bonnes candidates. En effet, chez les invertébrés, les systèmes monoaminergiques étant impliqués dans la régulation de la libération de nombreuses hormones, ils constituent des cibles pour de nombreux contaminants environnementaux. De nombreuses investigations ont montré que ces **systèmes neuroendocriniens** semblent être des **indicateurs biologiques de choix de contaminations organique et inorganique de l'environnement**¹²³⁴.

L'axe thématique initié dans le cadre de l'étude de biomarqueurs (Hsp70) chez les invertébrés aquatiques issus des bassins de rétention autoroutiers s'étendra à la recherche d'éventuelles **perturbations des systèmes sérotoninergiques** en relation avec les **altérations des écosystèmes aquatiques continentaux** (pollutions métalliques et organiques résultant du lessivage des chaussées autoroutières) chez certains invertébrés aquatiques comme par exemple des crustacés, des larves d'insectes ou des mollusques d'eau douce. De plus, comme je l'ai déjà mentionné dans le chapitre précédent, on s'aperçoit depuis peu que de nombreux produits pharmaceutiques (hormones, antidépresseurs, antibiotiques, paracétamol,...) se retrouvent dans l'environnement et plus particulièrement dans le milieu aquatique. Il serait donc intéressant d'étudier les effets de ces médicaments sur la faune des écosystèmes

¹ Fingerman M, Jackson NC, Nagabhushanam R. (1998) Hormonally-regulated functions in crustaceans as biomarkers of environmental pollution. *Comp. Biochem. Physiol.*, **120C**: 343-350.

² Hormonally active agents in the Environment. (1999) Committee on the hormonally active agents in the environment, Board on Environmental Studies and Toxicology

³ Mariussen E, Fonnum F. (2001) The effect of polychlorinated biphenyls on the high affinity uptake of the neurotransmitters, dopamine, serotonin, glutamate and GABA, into rat brain synaptosomes. *Toxicology*, **159**: 11-21.

⁴ Khan IA, Thomas P. (2006) PCB congener-specific disruption of reproductive neuroendocrine function in Atlantic croaker. *Mar. Environ. Res.*, **62**: 25-28

ACTIVITES DE RECHERCHE
PROJETS SCIENTIFIQUES

touchés par ces contaminations d'un nouveau type. Aussi, j'envisage de **quantifier par ELISA** d'éventuelles **variations de la concentration en sérotonine** chez certains crustacés (gammares) ou chez les larves aquatiques d'insectes (larves de chironomes) prélevés dans la rivière la Cadière et de tester les relations possibles entre ces effets et les teneurs en médicaments mesurés dans les sédiments et/ou l'eau de la rivière. J'envisage également de quantifier d'éventuelles variations de l'activité de certaines enzymes du système nerveux comme de la **tryptophane-hydroxylase**, enzyme hautement spécifique responsable de la **biosynthèse de la sérotonine** à partir du tryptophane, un acide aminé essentiel, dans le système nerveux de ces invertébrés aquatiques. De possibles variations dans ces paramètres neuronaux pourraient se révéler être d'excellents outils de diagnostic écologique.

Par ailleurs, dans le cadre de l'approche "biomarqueurs" de neurotoxicité que nous développons, nous débutons une collaboration avec le Dr C. Cuoc (département 1 de l'UMR 6116 IMEP) Ce travail se fera dans le cadre d'un doctorat (M^{lle} Mireya Mendoza, co-directeurs C. Cuoc & M. Pagano) en partenariat avec l'IRD qui a pour objectif d'analyser l'**impact de toxines d'origine naturelle produites par des cyanobactéries sur des copépodes dulçaquicoles**. Ma participation à ce travail consistera au **dosage de l'activité de l'AcHe** chez des copépodes exposés à ces toxines qui semblent être à l'origine d'une désorganisation dans la structure des cellules musculaires.

LES PROTEINES DE STRESS (20%)

Je poursuivrai, en collaboration avec mes collègues de l'équipe, le travail de **calibration de l'utilisation des systèmes de Résistance MultiXénobiotiques (MXR) comme biomarqueur de pollution en rivière méditerranéenne**. Nous avons pour objectif à court terme de :

↳ de **caractériser les niveaux de base** de l'expression de cette protéine de stress, qui constitue la première ligne de défense cellulaire contre les xénobiotiques, chez les larves de chironomes prélevés dans la Cadière. La densité membranaire des MXR sera déterminée par la méthode ELISA que nous avons mise au point.

ACTIVITES DE RECHERCHE
PROJETS SCIENTIFIQUES

↳ d'**analyser les variations saisonnières** de l'expression des systèmes MXR chez les larves de chironomes. A ce titre, nous accueillerons une étudiante en **Master 2 Recherche** (Sciences de l'Environnement Terrestre, spécialité BIOECO) dans l'équipe début janvier 2008.

↳ A plus long terme, nous voulons **poursuivre la mise au point de la quantification des MTs par ELISA chez les larves de Chironomes** provenant de la Cadière et la **calibration** en tant que biomarqueurs de pollution. En effet, nous avons montré que certains métaux, notamment l'arsenic, dépassent leur premier seuil de toxicité dans quelques stations de prélèvement^{1,2}. En collaboration avec mes collègues de l'équipe, j'envisage également la **calibration** en tant que **biomarqueur des protéines Hsp70 chez larves de Chironomes**, qui pourrait se révéler un biomarqueur intéressant, bien que ces protéines ne semblent pas spécifiques d'un contaminant ou d'une famille de polluants. Cependant, certains travaux réalisés chez les mollusques bivalves marins indiquent une induction des Hsps en réponse à l'exposition aux PCBs. Pour tous ces biomarqueurs, il sera intéressant de vérifier leur réactivité chez d'autres sous-familles de larves de Chironomidae (*Chironominae*, *Diamesinae* et *Orthocladiinae* par exemple) voire chez d'autres invertébrés aquatiques (crustacés, mollusques,...). Ces travaux pourraient nous renseigner sur les mécanismes de régulation qui sous-tendent les capacités de résistance et de survie de ces organismes dans les milieux pollués (organismes polluo-résistants) et par rapport aux organismes qualifiés de polluo-sensibles.

↳ Dans le cadre de deux projets de recherche, Seine-Aval 2007 ("*Fonctionnement de l'écosystème estuarien dans la zone de gradient de salinité : approche multidisciplinaire à*

¹ Saez G., 2006. Réponses biologiques précoces à une pollution multifactorielle en rivière urbaine méditerranéenne : mise au point de biomarqueurs chez les larves de Chironomidae (Insectes, Diptères). Rapport de Master 2R Sciences de l'Environnement Terrestre.

² Saez G, Schembri T, Moreau X, Lagadec V, Thiéry A, De Jong L. 2006. Mises au point d'un biomarqueur d'exposition chronique aux métaux pour la surveillance de la qualité des eaux fluviales en région méditerranéenne. Colloque Euro-méditerranéen de Biodiversité Environnementale, Ecologie, Ecophysiologie et Ecotoxicologie, 7-10 décembre, Marseille. *Mésogée*, vol 62, p. 39.

ACTIVITES DE RECHERCHE
PROJETS SCIENTIFIQUES

travers le développement et la validation d'indicateurs") et le projet d'ANR **MUSIGLAS** ("Multidisciplinary and mUltiscale Study of the Impact of GLobal changes on Aquatic ecoSystems" que nous avons déposé en 2007), qui visent à comprendre les effets des forçages hydroclimatiques et les impacts anthropiques sur le réseau trophique pélagique de l'estuaire de la Seine, nous avons proposé de **localiser et de quantifier les protéines de stress Hsp70 utilisées comme biomarqueurs de choc osmotique et thermique** chez des copépodes issus de l'estuaire de la Seine.

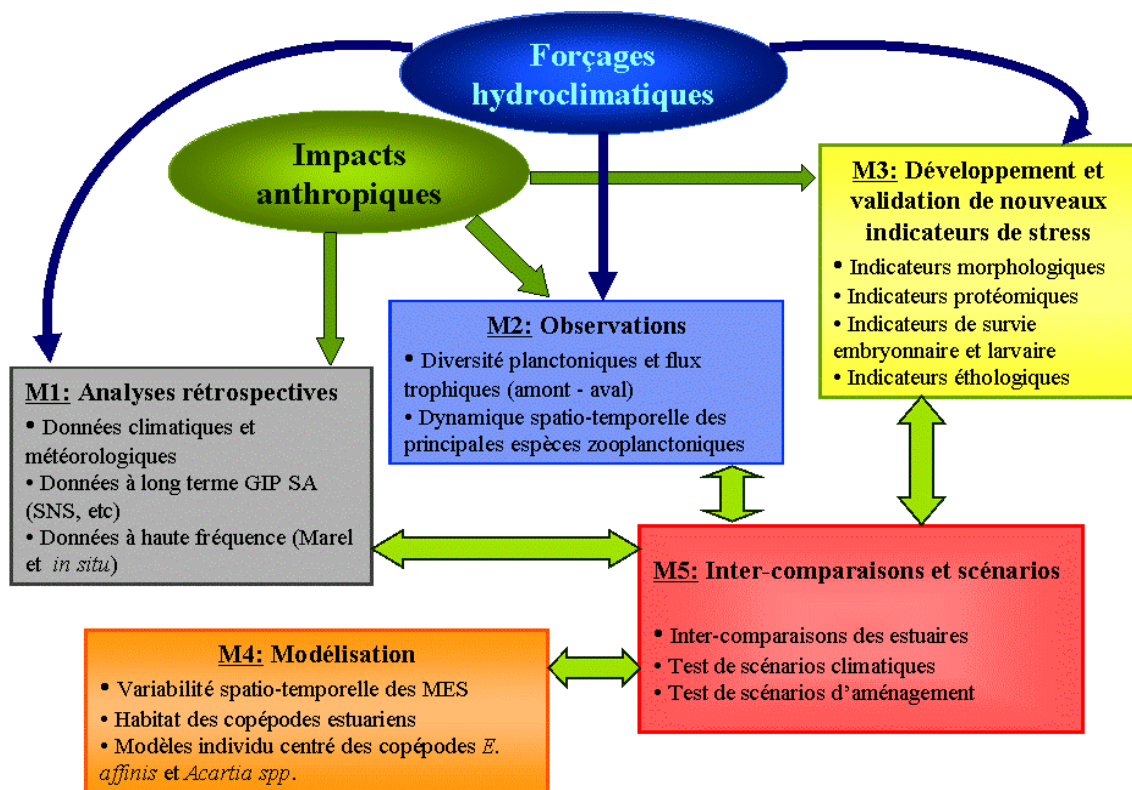


Figure 11 : Diagramme synoptique montrant les thématiques d'études envisagées dans le projet ANR MUSIGLAS et le Projet SEINE-AVAL. Le projet ANR MUSIGLAS n'a pas été retenu en 2007, mais des collaborations entre notre équipe et en 2008.

Ces projets s'articulent autour de 5 modules en interaction regroupant 5 équipes françaises (FRE 2816 ELICO, ECOLAB UMR 5247, EA 3222 LEMA, UMR 6116 IMEP, UMR 7093 LOV) et 2 équipes étrangères (Zoological Institute/Russian Academy of Sciences, St Petersburg, Russie et Stazione Zoologica "Anton Dohrn", Naples, Italie) sous la direction

ACTIVITES DE RECHERCHE
PROJETS SCIENTIFIQUES

de S. Souissi (FRE 2816 ELICO, Lille I). Notre contribution se situe au niveau de l'**objectif M3** dans la figure 11 ci-dessus sous la *responsabilité du Dr C. Cuoc du département 1 de l'UMR 6116 IMEP*. Même si nous n'envisageons pas de déposer de projet ANR cette année, des contacts ont d'ores et déjà été pris pour collaborer avec certaines équipes participantes.

GENOTOXICITE (30%)

Les résultats que nous avons obtenus lors du travail de Master 2 Recherche d'**A. Aouadene** (2006/2007), que j'ai co-dirigé, nous conduisent à initier un travail plus complet sur le site de la Cadière en proposant une nouvelle étude interdisciplinaire se plaçant dans la problématique de l'**expologie**, à savoir **la mise en place d'outils précoces (biomarqueurs) pour la caractérisation d'une exposition toxique dans le cadre de la prévention des risques pour l'Environnement et pour la Santé Humaine**.

L'**originalité de la démarche** est d'appréhender l'impact de pollutions multifactorielles chroniques à plusieurs niveaux biologiques : subcellulaire, cellulaire et organisme (Figure 12).

Les milieux retenus pour cette étude sont fortement anthropisés (rivières urbaines méditerranéennes) et montrent des teneurs certaines en polluants persistants dont l'action mutagène n'est plus à démontrer. Parmi ces polluants, les HAPs tel que le Benzo(a)pyrène (BaP), classé cancérigène, les PCBs ou les éléments métalliques se retrouvent dans les eaux et les sédiments. Les concentrations mesurées dans les sédiments ne dépassent pas toujours les seuils critiques de toxicité, cependant, les organismes benthiques sont exposés à un mélange de ces contaminants et l'exposition dure et persiste depuis longtemps. Actuellement, les effets mutagènes d'une telle pollution chronique ne sont pas connus sur la faune de la rivière, les prédictions sur la structure des peuplements aquatiques ne le sont pas non plus, de même que les conséquences sur la santé humaine bien que les activités de baignades et de pêche soient effectives sur cette rivière.

ACTIVITES DE RECHERCHE
PROJETS SCIENTIFIQUES

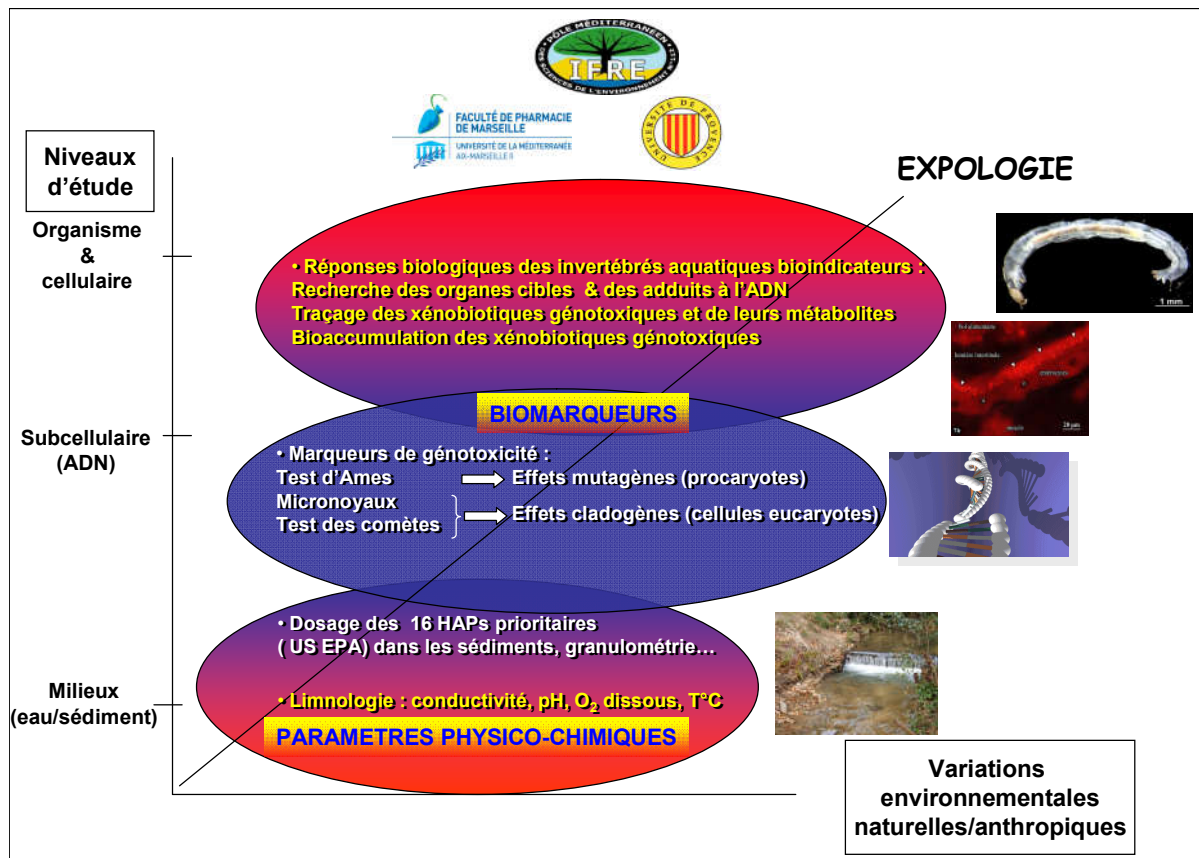


Figure 12 : Niveaux d'études de la démarche expérimentale interdisciplinaire proposée dans la problématique de l'expologie.

Le but du projet est d'étudier de façon plus précise le risque génotoxique présent dans les sédiments de la Cadière, en complétant les analyses physico-chimiques et les tests d'action génotoxique utilisés au cours du travail de Master 2 Recherche d'A. Aouadene. Outre un perfectionnement des approches expérimentales menées précédemment, l'équipe "Biogénotoxicologie & Mutagenèse Environnementale" EA 1784 assurera le développement de nouvelles techniques permettant de détecter les lésions de l'ADN *in situ* sur les espèces indigènes de la rivière : détection des cassures simple-brin sur les cellules prélevées chez diverses espèces planctoniques ou benthiques de la rivière.

Notre équipe sera impliquée dans la mise au point de biomarqueurs de génotoxicité chez les invertébrés aquatiques benthiques. Ces invertébrés sont à la base des chaînes trophiques et sont directement exposés à la pollution aquatique. Le long de la chaîne trophique, les

ACTIVITES DE RECHERCHE
PROJETS SCIENTIFIQUES

xénobiotiques s'accumulent dans les organismes conduisant ainsi au phénomène de bioamplification, particulièrement préoccupant pour la santé humaine. De plus, des mutations du code génétique pourraient à long terme modifier les organisations de structure des populations et mettre en danger l'équilibre de l'écosystème. De plus, par leur cycle biologique, certaines espèces à larves aquatiques et adultes aériens (Insectes en particulier) contribuent à une redistribution de la pollution aquatique dans l'écosystème terrestre (transferts inter-écosystèmes). Les biomarqueurs de génotoxicité sont des outils incontournables car ils montrent des perturbations précoces au niveau des organismes avant les atteintes aux niveaux populationnel et communautaire.

Les invertébrés aquatiques retenus pour l'étude seront choisis parmi les bioindicateurs les plus représentatifs de la qualité du milieu et vivant en association étroite avec le sédiment, matrice connue pour accumuler les xénobiotiques.

Trois principaux objectifs ont été retenus :

- (1) Recherche des organes cibles & des adduits à l'ADN,**
- (2) Traçage des xénobiotiques génotoxiques et de leurs métabolites,**
- (3) Evaluation de la bioaccumulation des xénobiotiques génotoxiques.**

Les principales méthodes utilisées pour la détection des xénobiotiques et des adduits à l'ADN seront, pour l'aspect qualitatif, l'**immuno-histo-chimie en fluorescence**, et pour l'aspect quantitatif, les **dosages ELISA**. Les prélèvements de sédiments et de matériels biologiques seront réalisés de manière synchrone. Un de mes objectifs est de **rechercher un nucléotide révélant la présence d'un adduit à l'ADN, la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG)**. A l'heure actuelle, la 8-oxodG est un des principaux adduits à l'ADN, lié au stress oxydatif, qui a été caractérisé. Sa présence au niveau de l'ADN provoque des erreurs de lecture et contribue à la genèse de mutations (inversions des nucléotidiques GC-TA). La 8-oxodG est une lésion à l'ADN ubiquitaire générée par les espèces réactives de l'oxygène, comme $\cdot\text{OH}$, mais peut aussi résulter d'une exposition aux HAPs. Ces derniers contaminants (ou leurs métabolites) seront également recherchés et quantifiés à la fois dans

ACTIVITES DE RECHERCHE
PROJETS SCIENTIFIQUES

les organismes et dans les sédiments.

D'autre part, j'envisage de **rechercher la présence de la protéine p53 et de la quantifier**, un facteur de transcription activant de nombreux gènes en réponse à un stress cellulaire. Cette protéine p53, communément appelée "**la gardienne du génome**", n'est pas nécessaire au fonctionnement de la cellule en l'absence de stress. En revanche, **lors de lésions de l'ADN, d'altérations de la division cellulaire ou du métabolisme, la p53 est très fortement induite**. La p53 active ensuite, soit la transcription de nombreux gènes conduisant à l'arrêt de la division cellulaire puis à la réparation de l'ADN ou des anomalies permettant ainsi la reprise de la division cellulaire, soit la mort de la cellule par apoptose si les réparations n'ont pas lieu permettant ainsi l'élimination de cette cellule endommagée.

Les résultats de ces études devraient permettre de qualifier et quantifier le risque de toxicité à long terme des cours d'eaux de la région en donnant une indication sur leur potentiel génotoxique et sur leur action *in situ*.

NANO-BIOTECHNOLOGIES : Utilisation de vecteurs amphiphiles dans la détection de polluants bioaccumulés (20%)

Comme je l'ai mentionné dans le chapitre précédent (cf page 92), nous avons imaginé **utiliser les copolymères amphiphiles** synthétisés par l'Equipe CAST (Chimie des ARN ; Aptamères, Sonde et Transport) de l'Unité INSERM U869 (Resp. Pr Philippe Barthélémy) pour **produire des détecteurs de polluants bioaccumulés par des organismes vivants**. A l'heure actuelle, nos collègues de l'unité 869 INSERM mettent au point des systèmes de transport couplés à des nano-particules facilement détectables appelés "Quantum Dots" (QDs). Ces QDs sont des cristaux semi-conducteurs de quelques nanomètres de diamètre et constitués en partie de cadmium, ils ont la propriété d'arrêter les électrons et donc peuvent être visualisables en microscopie électronique à transmission. De plus, en fonction du

ACTIVITES DE RECHERCHE
PROJETS SCIENTIFIQUES

protocole utilisé pour leur fabrication, ils ont la propriété d'émettre une fluorescence spécifique quand ils sont exposés à un faisceau lumineux de longueur d'onde particulière.

Le projet de recherche (projet ANR intitulé : "QDs-nucleoamphiphiles miRNA nano sensors"), auquel nous avons répondu en 2007 (Resp. Pr P. Barthélémy), vise à **développer une technologie basée sur des nano-particules, Quantum Dots-bio-senseurs**, pour la visualisation et le suivi de microARNs en temps réel à l'intérieur des cellules vivantes. La stratégie de ce travail repose sur la fonctionnalisation et la vectorisation des QDs à l'aide de nucléoamphiphiles et/ou oligonucléotides amphiphiles non toxiques. Ce projet pourrait conduire à une meilleure connaissance du trafic intracellulaire des ARNs. Un des objectifs envisagés est de cibler les miARNs et ainsi disposer d'outils très sensibles et très spécifiques pour le diagnostic de cancers. Le projet ANR n'a pas été retenu en 2007 mais sera soumis à nouveau en 2008.

Dans ce cadre, l'élaboration, la synthèse et l'évaluation de nouveaux oligonucléotides amphiphiles conjugués à des nano-particules QDs pour la détection, localisation et quantification de ces cibles miARNs est proposée. Le projet s'articulera principalement autour de :

- (1) la fonctionnalisation/bio-conjugaison des QDs avec des nucléoamphiphiles et/ou des oligonucléotides amphiphiles,
- (2) la délivrance dans la cellule de l'hybride ainsi formé. Les QDs nano-senseurs développés dans ce travail contribueront également à une meilleure compréhension du rôle des miARNs *in vivo*.

Volet 1 : Evaluation de la toxicité des Quantum Dots-bio-senseurs

Comme je l'ai mentionné plus haut (*Projets sur les signaux neuroendocriniens*), depuis quelques années, il a été montré que de nombreux produits pharmaceutiques sont rejetés dans

ACTIVITES DE RECHERCHE
PROJETS SCIENTIFIQUES

l'environnement et se retrouvent dans le milieu aquatique. Pour répondre à l'avenir prometteur des nanomatériaux, leur innocuité médicale, écologique et environnementale doit être évaluée. Par conséquent, si ces nano-senseurs sont utilisés dans le domaine médical, il est indispensable d'évaluer leurs effets sur l'environnement. L'objectif plus particulier de mon travail et de mes collègues de l'équipe "Biomarqueurs & Bioindicateurs Environnementaux" sera d'évaluer l'impact des **QDs-nucleoamphiphiles nano-senseurs sur l'environnement**, et en particulier, leur absorption, leur distribution ainsi que leur toxicité aiguë et chronique chez des invertébrés aquatiques. Pour cela, nous développerons trois axes complémentaires (Figure 13) : (A) Etablissement des courbes dose-réponse de toxicité aiguë et chronique ; (B) Suivi de l'absorption et de la distribution des oligonucléotides amphiphiles conjugués aux nanoparticules QDs en fonction du temps d'exposition grâce à des analyses en microscopie (épifluorescence, confocale et microanalyse X) ; (C) Evaluation de la cytotoxicité et de la possible interférence des QDs avec les processus cellulaires dans la cellule ou l'organisme vivant (études concernant les métallothionéines par exemple).

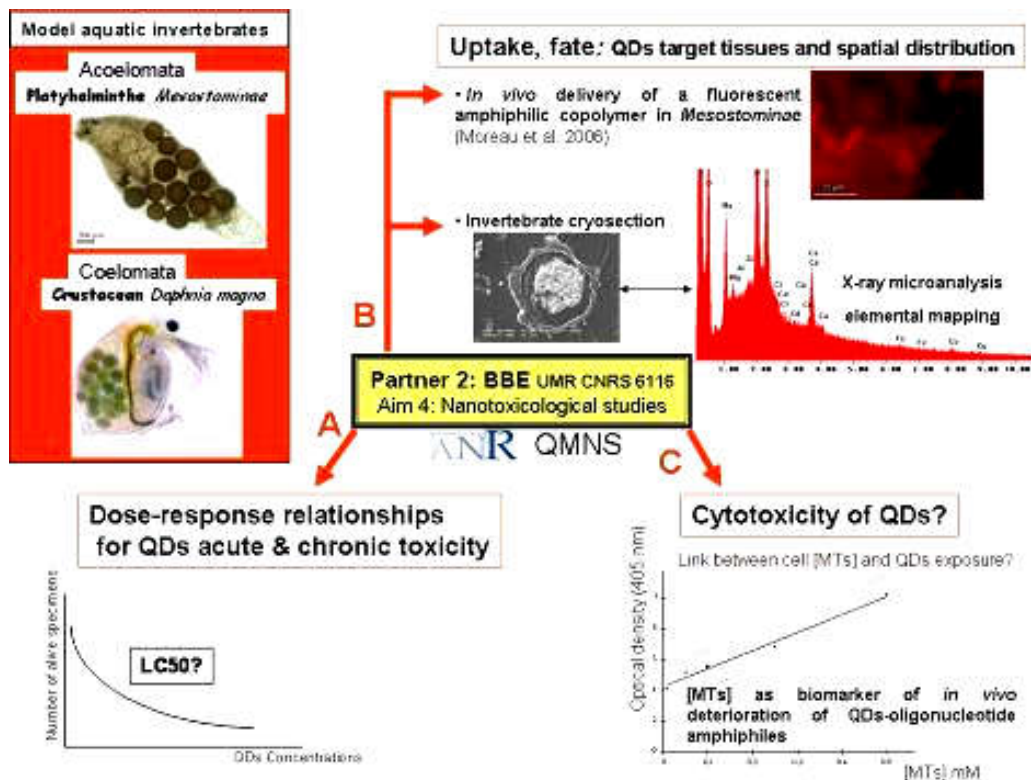


Figure 13 : Diagramme synoptique des projets en collaboration avec l'Equipe CAST de l'Unité INSERM U869.

ACTIVITES DE RECHERCHE
PROJETS SCIENTIFIQUES

C'est pourquoi en étudiant leur absorption, leur devenir et leur éventuelle toxicité chez des invertébrés aquatiques, nous espérons vérifier la stabilité *in vivo* de ces nanomatériaux qui est indispensable pour permettre leur utilisation médicale chez l'Homme.

Volet 2 : Biodétection de polluants

Les investigations que nous projetons visent à développer des systèmes où les copolymères amphiphiles, synthétisés par l'Equipe CAST de l'Unité INSERM U869, seraient couplés à un nano-système facilement détectable et à des systèmes réactifs à la présence d'un contaminant ou d'une famille de contaminants, et ce, dès les étapes d'absorption ou de distribution du xénobiotique dans l'organisme. De tels systèmes, que l'on pourrait appeler des "nano-senseurs", permettraient de véhiculer le "signal d'alarme aux polluants" dans l'ensemble d'un organisme vivant. Tant que l'organisme n'est pas exposé au(x) polluant(s), ce système resterait "silencieux" et ne deviendrait détectable que lors d'une contamination de l'organisme révélant ainsi celle de l'écosystème environnant. Les premières étapes de notre projet ayant consisté en la synthèse des copolymères, par l'équipe du Pr Barthélémy, et à la vérification de leur absorption et leur accumulation *in vivo* chez un organisme simple, par notre équipe, nous avons pour objectif de faire pénétrer ce type de nano-senseurs, synthétisé par l'équipe du Pr P. Barthélémy, chez un invertébré aquatique et de transposer l'animal dans un écosystème pour effectuer une biosurveillance du milieu. Ces nano-senseurs utiliseront la technologie basée sur les quantum dots comme **système de révélation de type "switch ON/OFF" pour les contaminants bioaccumulés** comme il a été montré pour les "maltose sensors"¹. Les QDs seraient associés à une molécule bloquant la fluorescence (phénomène de "quenching") qui serait libérée ou clivée en présence polluant(s) dans la cellule rendant la nano-particule fluorescente et donc détectable. Ceci permettrait de signaler l'absorption de contaminant(s). Par conséquent, cette technologie serait d'une grande utilité

¹ Medintz I. L. et al. (2003). *Nature Mater.* 2: 630.

ACTIVITES DE RECHERCHE

PROJETS SCIENTIFIQUES

comme outil de diagnostic de polluants bioaccumulés et serait d'une aide précieuse dans la biosurveillance et le biomonitoring des écosystèmes aquatiques.

ETUDES TRANSVERSALES ASSOCIANT LES CHERCHEURS DE BIOLOGIE ANIMALE

ET DE BIOLOGIE VEGETALE

Dans le but de renforcer les études transversales associant les chercheurs de biologie animale et végétale de l'équipe "Biomarqueurs & Bioindicateurs Environnementaux de l'UMR 6116 IMEP sur une problématique commune, nous allons poursuivre et développer les travaux concernant l'évaluation des effets des perturbations et stress chez des organismes indicateurs végétaux. Ainsi, les études entreprises qui ont été publiés en 2005 (**12, 14C**)¹ seront élargies chez les végétaux étudiés par mes collègues botanistes. Nous prévoyons **d'étudier les mêmes biomarqueurs et de développer des outils de diagnostic écologique semblables à ceux des invertébrés aquatiques.** En effet, le site de la Cadière offre également la possibilité de travailler sur de nombreuses espèces végétales soumises aux stress de type urbain il en est de même pour les sites autoroutiers et les mares temporaires de la région méditerranéenne. Nous analyserons la distribution de médiateurs chimiques, **sérotonine et GABA, et leur implication dans la régulation des stress chez les plantes méditerranéennes.** En effet, la présence de sérotonine et de GABA est connue depuis les années 1950 chez les végétaux, mais le rôle de ces neuromédiateurs animaux dans l'adaptation aux perturbations de l'environnement reste encore à explorer. Par exemple, on sait que la sérotonine est impliquée dans la floraison, la morphogénèse, la croissance des racines mais aussi dans la régénération du feuillage. On sait depuis peu qu'elle joue un rôle protecteur contre le stress oxydatif notamment chez *Hypericum perforatum*, une plante qui

¹ Léon V, Rabier J, Notonier R, Barthélémy RM, **Moreau X**, Bouraima-Madjebi S, Viano J, Pineau R. (2005). Effects of 3 Nickel salts on the element distribution in *Grevillea exul* var. *rubiginosa* seeds, a New Caledonian endemic Proteaceae. *Annals of Botany*, **95**: 609-618.

Léon V, Rabier J, Notonier R, **Moreau X**, Barthélémy RM, Bouraima-Madjebi S, Viano J, Pineau R. 2004. Effet du nickel sur les semences d'une Proteaceae endémique au maquis minier néo-calédonien. *Symposium on French research in the Pacific*, 24-27 août, Nouméa. *Communication affichée*

ACTIVITES DE RECHERCHE
PROJETS SCIENTIFIQUES

est déjà étudiée par mes collègues botanistes. Comme la sérotonine, le GABA interviendrait dans la réponse de la plante (communication intercellulaire, régulation du pH intracellulaire) à de nombreux stress environnementaux (variations de salinité, protection contre le stress oxydatif, "attaques" par les insectes, exposition aux UV, sécheresse, basses température...).

L'analyse de la distribution et la quantification de la sérotonine et/ou du GABA dans la plante pourront se faire également chez une espèce voisine, *hypericum hyssopifolium*, espèce rare des zones humides méditerranéennes, et ce, en relation avec les diverses contraintes rencontrées sous notre climat. A côté des investigations concernant les médiateurs chimiques où ma participation sera plus conséquente, l'ensemble des enseignants-chercheurs de l'équipe "Biomarqueurs & Bioindicateurs Environnementaux" envisagent de **rechercher** et de **calibrer** les **protéines du système MXR**, les **phytochélatines** (=métallothionéines de type III) ainsi que **certaines lésions à l'ADN** en tant que biomarqueurs et outils de diagnostic précoce de perturbations environnementales chez les plantes. L'ensemble de ces recherches devrait ainsi permettre de **renforcer les collaborations** avec les équipes de l'EA 1784 pour les études de génotoxicité chez les plantes.

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT

➤ **SYNTHESE DES ACTIVITES D'ENCADREMENTS**

- Encadrement de Doctorants 113
- Encadrement d'Etudiants en Master 2 Recherche 116
- Collaborations à des travaux impliquant des étudiants 119

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT
SYNTHESE DES ACTIVITES D'ENCADREMENT

Encadrement de Doctorants

↪ **Co-direction de Doctorat**

Dalila BENZID

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT

SYNTHESE DES ACTIVITES D'ENCADREMENT

ENCADREMENT DE DOCTORANTS

Le conseil Scientifique de l'Université de Provence m'a donné la co-direction de la thèse de M^{lle} Dalila BENZID en sa séance du 12 mars 2004, confirmant ainsi l'encadrement pour la partie "Neurobiologie" de la thèse dès l'arrivée dans l'équipe de M^{lle} Benzid.

Dalila Benzid a soutenu son doctorat le 24 octobre 2006. Elle a obtenu la mention la mention "Très honorable avec les félicitations" devant le Jury composé de :

Pr G. CHAMANTIER, Dr JC SORBE, Pr JP CASANOVA & Dr X MOREAU

Sujet : Comparaisons anatomiques des systèmes sérotoninergiques chez les Crustacés Branchiopodes, Mysidacés et Euphausiacés. Détail des systèmes visuels et aspect morpho-fonctionnel.

BILAN en terme de diffusion scientifique :

↳ J'ai cosigné avec M^{lle} Benzid deux publications dans des revues internationales de rang A et dont les Facteurs d'Impact sont supérieurs à 1,5.

(8) Moreau X, Benzid D, De Jong L, Barthélémy RM, Casanova JP. (2002) Evidence for the presence of serotonin in Mysidacea (Crustacea, Peracarida) as revealed by fluorescence immunohistochemistry. *Cell and Tissue Research*, 310: 359-371.

(IF₂₀₀₆ 2.580)

(15) Benzid D, De Jong L, Chevaldonné P, Lejeusne C, Moreau X. (2006). Serotonin expression in the optic lobes of cavernicolous crustaceans during the light-dark transition phase: role of the lamina ganglionaris. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 335: 74-81.

(IF₂₀₀₆ 1.916)

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT

SYNTHESE DES ACTIVITES D'ENCADREMENT

ENCADREMENT DE DOCTORANTS

↳ J'ai également cosigné avec M^{lle} Benzid **quatre communications dans des congrès internationaux :**

(9C) **Moreau X, Benzid D, De Jong L, Barthélémy RM, Casanova JP. 2002.** Phylogenetic interest of the serotonergic nervous system in Mysidacea (Crustacea, Peracarida) 6th ICSEB, 8-17 septembre, Patras (Grèce). *Communication orale*

(10C) **Benzid D, Moreau X, De Jong L, Barthélémy RM, Casanova JP. 2002.** Evidence for the presence of serotonin in the nervous system of Euphausiacea (Crustacea, Eucarida). 6th ICSEB, 8-17 septembre, Patras (Grèce). *Communication affichée*

(11C) **Moreau X, De Jong L, Barthélémy RM, Benzid D, Thiéry A. 2002.** The cerebral serotonergic nervous system in Branchiopods: focus on the visual system. 6th ICSEB, 8-17 septembre, Patras (Grèce). *Communication affichée*

(12C) **Benzid D, Moreau X, De Jong L, Casanova JP. 2003.** Serotonin-like immunoreactive neurones in the visual system of Euphausiacea (Crustacea, Eucarida): a phylogenetic tool. 7th Evolutionary Biology Meeting, 25-27 juin, Marseille. *Communication affichée*

Le travail de M^{elle} D. Benzid a également été reconnu par l'AFDDU (Association Française des Femmes Diplômées d'Université) qui lui a octroyé une bourse de recherche en 2002.

D'autre part, M^{lle} D. Benzid est à l'heure actuelle Attachée Temporaire pour l'Enseignement et la Recherche dans l'UPR-CNRS 9034 Evolution Génomes Spéciation, au sein de l'Equipe Génome Développement et Evolution à l'Université Paris 7.

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT
SYNTHESE DES ACTIVITES D'ENCADREMENT

ENCADREMENT DE MASTER 2R

Encadrement d'Etudiants en Master 2 Recherche

↪ **Co-direction de Master 2 Recherche**

Assia AOUADENE

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT

SYNTHESE DES ACTIVITES D'ENCADREMENT

ENCADREMENT DE MASTER 2R

Dans notre démarche "multibiomarqueurs", nous avons initié une collaboration avec deux équipes de l'EA 1784, le Laboratoire d'Hydrologie & de Molysmologie Aquatique (agrément du Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, Resp. F. Garcia) et le Laboratoire de Biogénotoxicologie & Mutagenèse Environnementale (Dir. Pr A. Botta), *Faculté de Pharmacie, Aix-Marseille II*) pour la mise au point d'outils de diagnostic écotoxicologiques précoces répondant à la complexité de la pollution multifactorielle aiguë et chronique en milieu aquatique urbanisé. Dans le cadre de ce projet, nous avons accueilli M^{lle} Assia Aouadene en stage de Master 2 Recherche, Mention PATHOLOGIE HUMAINE, Spécialité ENVIRONNEMENT Et SANTE, Option : Processus Pathologiques liés aux déséquilibres de l'Environnement pour l'année universitaire 2006-2007.

Avec le Dr Carole Di Giorgio de l'EA 1784, j'ai co-dirigé ce stage, dont le sujet était "l'ETUDE DE L'ACTIVITE GENOTOXIQUE DE SEDIMENTS ISSUS DE LA RIVIERE LA CADIERE (Bouches du Rhône)".

BILAN en terme de diffusion scientifique :

↳ J'ai cosigné avec M^{lle} Aouadene une publication dans une revue internationale de rang A, Quartile 1 en Sciences Environnementales (15^e/144 revues).

(17) Aouadene A, Di Giorgio C, Sarrazin L, Moreau X, De Jong L, Garcia F, Thiéry A, Botta A, De Méo M. (2008) Evaluation of the genotoxicity of river sediments in an industrial site of Southern France by the *Salmonella* mutagenicity test, the micronucleus assay and the alkaline comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. *Acceptée avec revisions* (IF₂₀₀₆ 2.653)

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT

SYNTHESE DES ACTIVITES D'ENCADREMENT

ENCADREMENT DE MASTER 2R

↳ J'ai également cosigné avec M^{lle} Aouadene **une communication affichée lors du 50^{ème} congrès de l'Association Française de Limnologie :**

(20C) **Aouadene A, Di Giorgio C, De Méo M, Moreau X, De Jong L, Sarrazin L, Thiéry A, Botta A. 2007. Etude de l'activité génotoxique de sédiments issus de la rivière la Cadière (Bouches du Rhône). 50^{ème} Congrès de l'Association Française de Limnologie, 16-17 novembre, Toulouse.**

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT
COLLABORATIONS IMPLIQUANT DES ETUDIANTS

Collaborations à des travaux impliquant des étudiants

Collaboration impliquant des Doctorants

↳ O. Scher (bourse CIFRE contrat ANRT 609/2001)

Directeur : Pr. A. Thiéry, Thèse soutenue le 09/12/2005

Ecole Doctorale "Sciences de l'Environnement" (Aix-Marseille I)

Publication :

(14) De Jong L, **Moreau X**, Jean S, Scher O, Thiéry A. (2006). Expression of the heat shock protein Hsp70 in chloride target cells of mayfly larvae from motorway retention pond: a biomarker of osmotic shock. *Sciences of the Total Environment*, 366: 164-173.

(IF₂₀₀₆ 2.359) Quartile 1 en Sciences Environnementales

Congrès :

(15C) **Moreau X**, De Jong L, Jean S, Scher O, Thiéry A. 2005. Diagnostic précoce & Evaluation des stress. Congrès international 'Biodiversité : Science et Gouvernance', UNESCO, 24-28 janvier, Paris.

(21C) De Jong L, **Moreau X**, Jean S, Scher O, Thiéry A. 2007. L'expression des protéines de choc thermique Hsp70 dans les cellules chloracogènes de larves d'éphémères d'un bassin de rétention autoroutier : un biomarqueur de choc osmotique. 50^{ème} Congrès de l'Association Française de Limnologie, 12-15 novembre, Toulouse.

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT
COLLABORATIONS IMPLIQUANT DES ETUDIANTS

↳ C. Bienboire-Frosini

Directeur : Pr. C. Ronin

Ecole Doctorale "Sciences de la Vie" (Aix-Marseille II)

Publication :

(16) **Moreau X**, Saez G, Thiéry A, Clos-Faybesse O, Guiraudie-Capraz G, Bienboire-Frosini C, Martin C, De Jong L. (2007). Development of an ELISA assay for the detection of Multixenobiotic Resistance transporter induction in indigenous freshwater Chironomidae larvae (Diptera): a step in the calibration of a biomarker for monitoring xenobiotic exposures in the field. *Environmental Pollution (sous presse)*.

(IF₂₀₀₆ 2.769) **Quartile 1 en Sciences Environnementales** (13^e/144 revues)

↳ C. Lejeusne

Directeur : Dr. P. Chevaldonné

Ecole Doctorale "Sciences de l'Environnement" (Aix-Marseille II)

Publication :

(15) Benzid D, De Jong L, Chevaldonné P, Lejeusne C, **Moreau X**. (2006). Serotonin expression in the optic lobes of cavernicolous crustaceans during the light-dark transition phase: role of the *lamina ganglionaris*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 335: 74-81.

(IF₂₀₀₆ 1.919)

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT
COLLABORATIONS IMPLIQUANT DES ETUDIANTS

Collaboration impliquant des Masters 2 Recherche (M2R)

↳ **G. Saez**

Co-Directeurs : Pr. A. Thiéry & Dr L. De Jong-Moreau,

Master 'Sciences de l'Environnement Terrestre', spécialité 'Biodiversité & Ecologie Continentale' (BIOECO) soutenu et obtenu en juin 2006 avec mention Bien

Classement : 3^{ème}

Ecole Doctorale "Sciences de l'Environnement" (Aix-Marseille I)

Lors du stage de Master 2R, j'ai montré à M^{lle} Saez les différentes techniques utilisées lors des mises au point réalisées pour utiliser la **densité membranaire des protéines du système de Résistance Multixénobiotiques (MXR)** chez les larves de Chironomes (Diptères) comme **biomarqueur** de pollution.

Publications :

(16) **Moreau X, Saez G, Thiéry A, Clos-Faybesse O, Guiraudie-Capraz G, Bienboire-Frosini C, Martin C, De Jong L. (2007).** Development of an ELISA assay for the detection of Multixenobiotic Resistance transporter induction in indigenous freshwater Chironomidae larvae (Diptera): a step in the calibration of a biomarker for monitoring xenobiotic exposures in the field. *Environmental Pollution (sous presse)*. Quartile 1 en Sciences Environnementales (13^è/144 revues)

(IF₂₀₀₆ 2.769)

(18) **Saez G, De Jong L, Moreau X, Sarrazin L, Wafo E, Schembri T, Lagadec V, Diana C, Monod J-L, Thiéry A. (2008).** Evaluation of pollutant exposure by chemical and biological markers in a Mediterranean French urban stream: a step for *in situ* calibration of multixenobiotic resistance transporter expression as biomarker in Chironomidae larvae. *Environmental Research (sous presse)* Quartile 1 en Sciences Environnementales (22^è/144 revues)

(IF₂₀₀₆ 2.556)

ACTIVITES DE RECHERCHE & D'ENCADREMENT
COLLABORATIONS IMPLIQUANT DES ETUDIANTS

Congrès :

(18C) Saez G, Schembri T, **Moreau X**, Lagadec V, Thiéry A, De Jong L, **2006**. Mises au point d'un biomarqueur d'exposition chronique aux métaux pour la surveillance de la qualité des eaux fluviales en région méditerranéenne. Colloque *Euro-méditerranéen de Biodiversité Environnementale, Ecologie, Ecophysiologie et Ecotoxicologie*, 7-10 décembre, Marseille. *Mésogée*, vol 62, p. 39. *Communication affichée*

(21C) Saez G, De Jong L, **Moreau X**, Sarrazin L, Wafo E, Schembri T, Lagadec V, Diana C, Thiéry A, **2007**. Les protéines du système de Résistance MultiXénobiotiques (MXR) chez les larves de Chironome : Approche *in situ* dans la calibration d'un biomarqueur potentiel pour l'évaluation de la qualité des eaux d'une rivière urbaine méditerranéenne. 50^{ème} Congrès de l'Association Française de Limnologie, 16-17 novembre, Toulouse. *Communication affichée*

ACTIVITES DE RECHERCHE

RECONNAISSANCE AU NIVEAU INTERNATIONAL

Depuis 2004 :

Eu égard aux résultats de mes activités de recherche publiés dans des revues internationales de rang A, j'ai été sollicité comme **Critique et Référé** d'articles concernant la neurobiologie et la neuroendocrinologie des crustacés dans *Comparative Biochemistry and Physiology*