

# Développement de méthodes peu invasives pour la mesure de biomarqueurs sur les amphibiens

Autor(en): **Cattin, Loïc / Boualit, Laurent / Guillet, Brigitte**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**

Band (Jahr): **101 (2022)**

PDF erstellt am: **22.06.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-1003692>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

# Développement de méthodes peu invasives pour la mesure de biomarqueurs sur les amphibiens

Loïc CATTIN<sup>1</sup>, Laurent BOUALIT<sup>1</sup>, Brigitte GUILLET<sup>2</sup>, Nathalie CHÈVRE<sup>1</sup>

CATTIN L., BOUALIT L., GUILLET B. & CHÈVRE N., 2022. Développement de méthodes peu invasives pour la mesure de biomarqueurs sur les amphibiens. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 101 : 17-30.

## Résumé

La biodiversité mondiale décline à un rythme sans précédent. Parmi les vertébrés, ce sont les amphibiens qui sont les plus menacés. L'une des causes principales est leur exposition à des contaminants d'origine humaine. Différents biomarqueurs sont utilisés pour étudier les effets de telles expositions, mais ils nécessitent un prélèvement invasif de tissus ou de fluides sur les organismes étudiés. Toutefois, des études récentes ont mesuré l'activité de biomarqueurs enzymatiques dans des échantillons de salive de lézards (*Podarcis muralis*). Cette méthode peu invasive suit les principes des 3R qui visent à réduire, affiner et remplacer l'utilisation des animaux dans la science. Dans la présente étude, nous avons utilisé des échantillons de salive et de foie de *Xenopus laevis* pour mesurer trois biomarqueurs enzymatiques (EROD, GST, AChE). Tous les biomarqueurs ont été détectés dans les échantillons de foie, alors que seuls l'EROD et la GST l'ont été dans les échantillons de salive. Chez le *X. laevis*, des différences d'activité de GST dans le foie ont été trouvées entre mâles et femelles ainsi qu'une corrélation positive entre l'activité de la GST dans le foie et la taille des individus. Notre étude propose deux nouveaux protocoles peu invasifs pour la mesure de l'EROD et de la GST sur les amphibiens.

**Mots clés:** amphibiens, biomarqueurs, écotoxicologie, pesticides, salive.

CATTIN L., BOUALIT L., GUILLET B. & CHÈVRE N., 2022. Development of minimally invasive methods for measuring biomarkers in amphibians. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 101 : 17-30.

## Abstract

Worldwide biodiversity is declining at an unprecedented rate with amphibians being the most threatened vertebrate group. A major cause of their decline is the exposure to human related contaminants. Different biomarkers can be used to study the effects of such exposures, but they usually require invasive sampling of tissues or fluids from the organisms that leads to the death of the animal. Recent studies were able to show variations in biomarkers activity in the saliva of the lizard *Podarcis muralis* after they were exposed to pesticides. This minimally invasive method follows the 3Rs principles which aims to reduce, to refine and to replace animal use in science. In the present study, we used *Xenopus laevis* saliva and liver to measure three enzymatic biomarkers (EROD, GST, AChE). All biomarkers were detected in liver samples, whereas only EROD and GST were found in saliva samples. Biomarkers activity differences in the liver were found between sex and a significant correlation was found between the body size and the basal GST activity. This study proposes two new protocols to measure EROD and GST activity amphibians through minimally invasive way.

**Keywords:** amphibians, biomarkers, ecotoxicology, pesticides, saliva.

<sup>1</sup> IDYST, Faculty of Geosciences and Environment, University of Lausanne, 1015 Lausanne, Switzerland

<sup>2</sup> Centre de Ressources Biologiques Xenopes, Université de Rennes 1, 35042 Rennes, France.

Author for correspondence: loiccattin@hotmail.com



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AChE	Acétylcholinestérase	HAPs	hydrocarbures aromatiques polycycliques
ATCi	Acetylthiocholine iodide	PCBs	biphényles polychlorés
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene	SAB	Sérum albumin bovine
CYP450	Cytochrome P450	TPM	Tours par minute
DTNB	Dithiobisnitrobenzoate	<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
EROD	Ethoxyrésorufine-O-dééthylase	7-ER	7-Ethoxyrésorufine
GST	Glutathione-S-transférase		

## INTRODUCTION

La biodiversité mondiale est confrontée à sa sixième extinction de masse (WAKE & VREDENBURG 2008, CEBALLOS *et al.* 2020). Actuellement, 41 % des espèces d'amphibiens sont à risque, faisant de ceux-ci le taxon de vertébré le plus menacé (MONASTERSKY 2014). Les principaux facteurs les affectant sont la perte d'habitat, les utilisations commerciales, les espèces exotiques envahissantes, le changement climatique, les maladies infectieuses et les polluants (BLAUSTEIN & KIESECKER 2002, COLLINS & CRUMP 2009, SPARLING *et al.* 2010).

La sensibilité des amphibiens aux polluants a été nettement moins étudiée que celle d'autres vertébrés. Cependant un effort de recherche et de publications en écotoxicologie des amphibiens a été fait depuis le début des années 2000 (SPARLING *et al.* 2010). En effet, en raison de leur cycle de vie aquatique et terrestre, les amphibiens peuvent être exposés à un large éventail de polluants tels que les pesticides, les métaux lourds, les produits pharmaceutiques et les engrais (BISHOP *et al.* 1999, KIESECKER 2002, BAKER *et al.* 2013, SÄFHOLM 2014, ZOCHE *et al.* 2014, HILL *et al.* 2021). Les effets négatifs qui en résultent peuvent varier en fonction du stade de vie de l'individu. Ils peuvent se traduire par des déformations physiques, une augmentation de la sensibilité aux parasites et aux maladies ou encore, par une moins bonne capacité reproductive (KIESECKER 2002, HAYES *et al.* 2002, REGNAULT *et al.* 2018, SIEVERS *et al.* 2019). Il est donc important d'avoir des méthodes sensibles qui permettent d'évaluer la toxicité des polluants sur les amphibiens.

Parmi les outils à disposition des écotoxicologues, les biomarqueurs permettent d'évaluer un stress chimique en laboratoire ou sur le terrain. Les biomarqueurs peuvent être définis comme « des changements biochimiques, physiologiques et histologiques ainsi que des aberrations dans les organismes pour estimer soit l'exposition aux produits chimiques, soit les effets qui en résultent » (HUGGETT & ROBERT 2018). En écotoxicologie, les biomarqueurs moléculaires sont couramment mesurés sur des organes ou des fluides, ce qui nécessite l'euthanasie des individus étudiés (GAUTHIER *et al.* 2004, YOLOGLU & OZMEN 2015, JACOBO *et al.* 2019). En 2017, des chercheurs ont échantillonné de la salive de lézards des murailles (*Podarcis muralis*) se trouvant dans des vignes (MINGO *et al.* 2017). La première population a été échantillonnée alors que le vignoble n'avait pas été traité et la seconde après l'application de pesticides. En analysant la salive des deux populations, ils ont mesuré une différence d'activité de certains biomarqueurs. Cette approche permet d'échantillonner de la salive directement sur le terrain et de faire un suivi de la qualité environnementale du milieu. Elle suit les principes des 3R qui visent à réduire, affiner et remplacer l'utilisation des animaux dans la science (RUSSELL &

BURCH 1959). Aussi, en utilisant la salive d'individus vivants, les échantillons peuvent être collectés sur plusieurs jours consécutifs, ce qui n'est pas possible en utilisant des organes. Les biomarqueurs peuvent donc être mesurés avant, pendant et après une exposition à des polluants. Dans cette étude, nous avons utilisé des échantillons de salive de *Xenopus laevis* et développé des protocoles pour mesurer trois biomarqueurs enzymatiques: la glutathion-S-transférase (GST), l'éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) et l'acétylcholinestérase (AChE). L'activité des biomarqueurs dans la salive a ensuite été comparée à celle se trouvant dans le foie, un organe classiquement utilisé pour ce type de test.

Plus spécifiquement, l'EROD mesure l'activité d'une sous-famille de cytochromes P450, les CYP1A. Il s'agit de protéines contenant un hème qui peut métaboliser des xénobiotiques et des molécules endogènes (BERNHARDT 1995, WHYTE *et al.* 2000). Ils interviennent dans la phase I de la détoxification de l'organisme en ajoutant des groupes polaires aux polluants augmentant ainsi leur solubilité et favorisant leur évacuation de l'organisme (ANDERSSON & FÖRLIN 1992, GOKSØYR 1995). Ils sont principalement présents dans le foie, les reins et les branchies mais aussi dans de nombreux autres tissus (WHYTE *et al.* 2000). Chez les organismes aquatiques, l'induction du CYP1A est particulièrement sensible aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), aux biphényles polychlorés (PCBs) et aux dioxines (GAUTHIER *et al.*, 2004). La GST est une enzyme principalement impliquée dans la phase II de la détoxification. Elle peut agir sur les métabolites produits au cours de la phase I, y compris ceux produits par les CYP450 (GEORGE 1994, GREULICH *et al.* 2002). Elle catalyse l'attachement nucléophile du glutathion (GSH) aux molécules qui présentent un atome de carbone, d'azote ou de soufre électrophile (HAYES *et al.* 2005). La GST est sensible aux HAPs et aux PCBs (GREULICH *et al.* 2002). Enfin, l'AChE est une enzyme qui joue un rôle dans le système nerveux des vertébrés et des invertébrés en régulant l'acétylcholine (ACh), un neurotransmetteur impliqué dans la mémoire et l'activité musculaire (COLOMBO *et al.* 2005, HASSELMO 2006). Certains xénobiotiques peuvent inhiber l'activité régulatrice de l'AChE et induire une surstimulation du système nerveux par l'ACh. Ceci peut amener à des troubles du comportement, des contractions musculaires voire le décès de l'individu concerné (SANDAHL *et al.* 2005, HUA *et al.* 2013). Certains produits phytosanitaires sont conçus pour inhiber l'AChE des insectes ravageurs, tel le chlorpyrifos, un organophosphate. Mais de nombreux organismes non ciblés peuvent également être affectés dans l'environnement. L'AChE est spécifiquement sensible aux pesticides organophosphorés, aux carbamates et à certains métaux (KEY & FULTON 2002, FRASCO *et al.* 2005).

L'EROD, la GST et l'AChE ont beaucoup été étudiés chez les poissons, mais il existe peu d'études chez les amphibiens. Dans cette étude, nous avons proposé des protocoles pour mesurer ces biomarqueurs chez *X. laevis*, une espèce de laboratoire. De plus, nous avons cherché à développer des méthodes peu invasives pour mesurer ces biomarqueurs. Pour cela, nous avons mesuré l'activité des biomarqueurs dans la salive *X. laevis* et comparé les résultats avec des mesures dans le foie. Le foie a été choisi car c'est un organe essentiel pour la détoxification dans lequel les trois biomarqueurs ont déjà été mesurés (GAUTHIER *et al.* 2004, EZEMONYE & TONGO 2010, HEDGE *et al.* 2014). Nous nous sommes demandé i) si les activités de l'EROD, de la GST et de l'AChE peuvent être mesurées dans la salive de *X. laevis* ii) si l'activité des biomarqueurs dans la salive est corrélée à l'activité dans le foie et enfin iii) si le sexe, la taille, le poids et l'âge de l'individu influencent l'activité basale des biomarqueurs moléculaires dans le foie.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

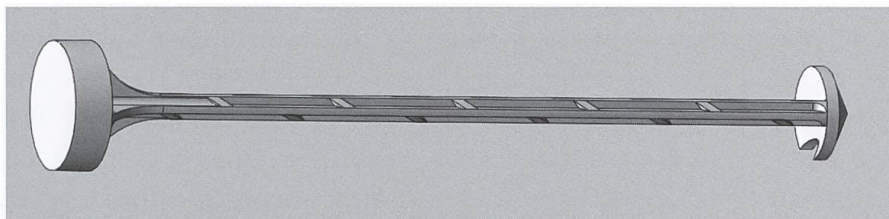
### Espèce étudiée et échantillonnage

*X. laevis* (Daudin 1802) est une espèce d'anoures d'Afrique sub-saharienne couramment utilisée par les scientifiques comme organisme modèle (KAY & PENG 1992). Les échantillons de foie et de salive utilisés pour mesurer les biomarqueurs ont été prélevés au Centre de Ressources Biologiques de l'Université de Rennes. Une restructuration de leurs locaux était en cours et avait mené à l'euthanasie de plusieurs individus malsains et âgés. C'était donc une bonne occasion de prélever des tissus afin d'optimiser nos méthodes de mesure avec un aspect éthique. Les *X. laevis* ont été maintenus dans des conditions de laboratoire à 21 °C avec un rythme lumineux de 12 h/12 h. Uniquement aquatiques, ils ont été élevés dans une eau avec un pH de 7,5, une salinité de 1005 et une dureté TH de 10. Ils ont été anesthésiés, puis euthanasiés en appliquant une surdose de benzocaïne suivie d'une ablation de la tête. Des écouvillons buccaux ont été utilisés pour collecter la salive pendant une dizaine de secondes dans la bouche entre l'anesthésie et l'euthanasie. Les échantillons de salive et de foie ont été conservés à -80 °C jusqu'à leur utilisation. Au total, 18 échantillons de foie et de salive ont été utilisés pour optimiser les protocoles et 87 ont été utilisés pour la mesure finale. Le nombre d'échantillons disponibles était moins élevé chez les mâles que chez les femelles. Sur les 87 échantillons, neuf cotons-tiges contenaient du sang car ils ont été prélevés après démédulation. Quatre échantillons ont aussi échoué à la quantification des protéines. Seul un biomarqueur était mesurable par écouvillon afin de pouvoir faire des réplicats. Le nombre final d'échantillons pour chaque biomarqueur était de 25 (GST), 28 (EROD) et 21 (AChE).

### Préparation des échantillons

Les écouvillons ont été décongelés sur glace le jour de l'expérience. Les cotons ont été retirés des écouvillons avec des lames à usage unique et mis dans des tubes de 1,5 ml. 200 µl de tampon de broyage ont été ajoutés à chaque échantillon pour éviter la dégradation des protéines. Le tampon de broyage était préparé avec de l'eau distillée dans lequel était ajouté du Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et NAH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,1 M, pH 7,8) ainsi que 1 % d'inhibiteur de protéase (Halt™ n° 78425). Trois cycles de broyage ont été réalisés sur chaque échantillon. Ils ont été broyés à 7 500 tours par minute pendant 45 secondes à l'aide de 10 billes de céramique et ont été conservés sur la glace pendant 3 minutes entre chaque tour pour refroidir. Après le broyage des échantillons, l'homogénat restait absorbé par le coton. Pour pallier ce problème, nous avons fabriqué des pressoirs en résine à l'aide d'une imprimante 3D. Ils ont permis de presser le coton dans les tubes et de récupérer un maximum de liquide (figure 1).

Les échantillons ont ensuite été centrifugés pendant 10 minutes à 10 000 tours par minute à 4 °C (MINGO *et al.* 2017). Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube et conservé sur glace. Les échantillons ont ensuite été mesurés dans des plaques 96 puits. Nous avons pu faire trois réplicats pour la GST et l'AChE en utilisant 20 µl d'échantillon par puits et deux réplicats pour l'EROD, car le protocole nécessite 30 µl par puits. Les échantillons de foie ont été décongelés sur glace le jour de l'expérience et rincés avec une solution de KCl à 150 mM pour éliminer les protéines et les fluides externes (AFNOR 2007). 200 mg d'échantillons ont été récupérés et mis dans 1 ml de tampon de broyage identique à celui utilisé pour la salive. La procédure de broyage était similaire à celle de la salive mais avec trois billes en acier supplé-



**Figure 1.** Pressoir à coton en silicone.

mentaires. Les échantillons ont été centrifugés deux fois pendant 10 minutes à 10 000 tours par minute à 4 °C. Le surnageant a été récupéré entre chaque centrifugation afin de réduire la viscosité des échantillons. Le produit final a été utilisé dans l'heure pour la mesure des biomarqueurs (NOURY 2016).

### Dosage des protéines

Afin d'évaluer la concentration en protéine totale des échantillons nous avons effectué une courbe d'étalonnage de sérum d'albumine bovine (SAB) dilué dans un tampon PBS (0,1 M, pH 7,8). Les concentrations suivantes de SAB en µg/ml ont été utilisées pour la salive et le foie respectivement: [0; 12,5; 25; 37,5; 50; 62,5; 75; 100] et [0; 100; 125; 150; 175; 200; 225; 250].

Les échantillons de salive ont été dilués à 1/2 et les échantillons de foie à 1/100. Une plaque de 96 puits a été remplie avec 250 µl de réactif Bradford (Bradford reagent, Supleco®, distribué par Merck, Suisse) et 5 µl d'échantillon ou de gamme SAB dans chaque puits. La mesure des protéines a été effectuée à l'aide d'un lecteur de plaques multi-puits Tecan Spark utilisant l'application Spark control V2.3.

### Mesure des biomarqueurs

L'activité des biomarqueurs dans la salive et le foie a été mesurée selon des protocoles développés par NOURY (2016). Les protocoles de l'EROD et de la GST ont été optimisés pour être utilisés sur des tissus musculaires, du foie ou des branchies. Le protocole de l'AChE a été développé pour les espèces de *Gammarus* et adapté du protocole d'ELLMAN *et al.* (1961). L'activité du biomarqueur était mesurée dans chaque puits en mesurant la fluorescence (EROD) ou en utilisant le changement d'absorbance (GST/AChE) sur une période donnée. Trois contrôles négatifs pour l'EROD et huit contrôles positifs et négatifs pour la GST et l'AChE ont été effectués.

#### Mesure de l'EROD

L'activité de l'EROD a été mesurée selon le protocole suivant (figure 2). Une solution de 7-ER (2,67 µM) a été utilisée comme substrat pour le CYP1A. Une solution de NADPH (10 mM) a été préparée dans de l'eau milliQ et diluée avec un tampon phosphate (0,1 M, pH 7,8) afin d'obtenir une solution de 2,5 mM. Une fois ajouté, le NADPH catalyse la réaction entre le 7-ER et le CYP1A. De la résorufine commerciale a été utilisée pour faire une gamme d'étalonnage. Elle a été diluée dans un tampon phosphate (0,1 M, pH 7,8) aux concentrations suivantes: [0; 0,0015; 0,0025; 0,005; 0,0075; 0,01; 0,015; 0,018]. De plus, un contrôle négatif avec du tampon phosphate (0,1 M, pH 7,8) a été effectué dans chaque gamme. La

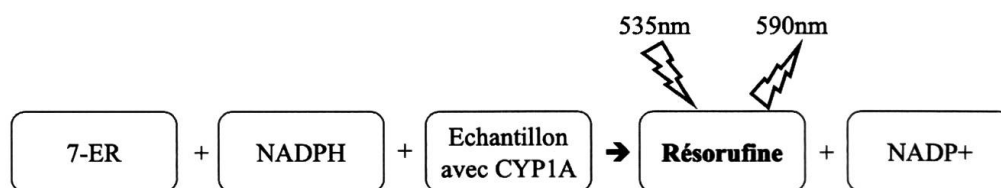
fluorescence de la résorufine dans chaque puits a été mesurée avec une longueur d'onde d'excitation et de bande passante de 535 nm/10 nm et une longueur d'onde d'émission et de bande passante de 590 nm/20 nm avec des intervalles de 1 minute pendant 30 minutes. La fluorescence a souvent diminué pendant les cinq premières minutes, certainement en raison d'une homogénéisation incomplète des substances dans les puits. Après cinq minutes, une augmentation constante de la fluorescence a généralement été observée. Par conséquent, les résultats des cinq premières minutes ont été retirés de l'analyse. Les échantillons, la gamme de résorufine et les contrôles négatifs ont été préparés dans des plaques de 96 puits (tableau 1).

#### Mesure de la GST

L'activité de la GST a été mesurée selon le protocole suivant (figure 3). La GSH a été diluée dans un tampon phosphate (0,1 M, pH 6,5) pour obtenir une solution de 0,0022 M. Le CDNB a été dilué dans de l'éthanol pour obtenir une solution de 0,038 M et a servi de substrat. La GSH et le CDNB ont été respectivement mélangés dans un rapport de 94,4/5,6 (V/V). Une fois l'échantillon ajouté, la GST déclenche la réaction entre le CDNB et la GSH. L'absorbance du produit conjugué a été mesurée à 340 nm avec des intervalles cinétiques de 30 secondes pendant 6,5 minutes. De la GST commerciale (21,9 U/mL) a été utilisée afin d'effectuer des contrôles positifs. Elle a été diluée dans un tampon phosphate (pH 6,5 0,1 M) pour obtenir une solution de 1,9 U/mL. Les échantillons, les contrôles positifs et négatifs ont été préparés dans des plaques de 96 puits (tableau 2).

#### Mesure de l'ACHé

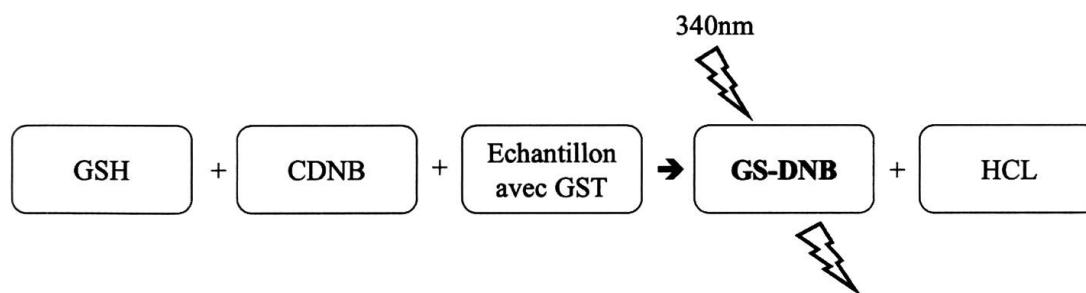
L'activité de l'ACHé a été mesurée selon le protocole suivant (figure 4). De l'ATCi a été dilué dans de l'eau milliQ pour obtenir une solution à 0,076 M. Du DTNB a été préparé dans un tampon phosphate (0,1 M, pH 7,8) pour obtenir une solution à 0,0076 M. Une fois mélangée dans les puits avec l'ACHé contenu dans l'échantillon, l'ATCi est clivée et forme de la thiocholine et de l'acétate. Ensuite, le DTNB réagit avec la thiocholine et forme de l'acide 5-thio-



**Figure 2.** Réaction chimique de l'EROD - Schéma de la réaction chimique effectuée pour la mesure de l'EROD.

**Tableau 1.** Préparation des plaques à 96 puits pour la mesure de l'EROD.

	Échantillon [µl]	Gamme de résorufine [µl]
Tampon (pH 7,8 0,1 M)	-	170
Mélange 7-ER	150	-
Gamme de résorufine	-	30
Échantillon (CYP1A)	30	-
NADPH	20	-

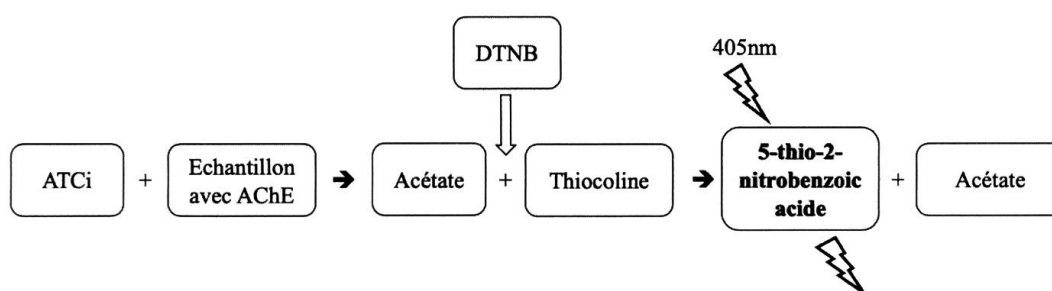


**Figure 3.** Réaction chimique de la GST - Schéma de la réaction chimique effectuée pour la mesure de la GST.

**Tableau 2.** Préparation des plaques à 96 puits pour la mesure de la GST.

	Échantillon [ $\mu$ l]	Contrôle + [ $\mu$ l]	Contrôle - [ $\mu$ l]
Tampon (pH 6.5)	150	150	150
Échantillon (GST)	20	-	-
GST commerciale 1,9 U/mL	-	20	-
Tampon (pH 6,5)	-	-	20
Mélange (GSH/CDNB)	180	180	180

2-nitrobenzoïque dont l'absorbance est mesurée à 405 nm avec des intervalles cinétiques de 30 secondes pendant 6,5 minutes. De l'AChE commerciale à 0,95 U/mL a été utilisée afin de réaliser des contrôles positifs. Les échantillons, les contrôles positifs et négatifs ont été préparés dans des plaques de 96 puits (tableau 3). L'ATCi a été mise en dernier en commençant par les puits de contrôle.



**Figure 4.** Réaction chimique de l'AChE - Schéma de la réaction chimique effectuée pour la mesure de l'AChE.

**Tableau 3.** Préparation des plaques à 96 puits pour la mesure de l'AChE.

	Échantillon [ $\mu$ l]	Contrôle + [ $\mu$ l]	Contrôle - [ $\mu$ l]
Tampon (pH 7,8)	330	330	330
Échantillon (AChE)	20	-	-
AChE commerciale 0,95 U/mL	-	20	-
Tampon (pH 7,8)	-	-	20
DTNB	20	20	20
ATCi	10	10	10



## Analyse des données

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec R (R CORE TEAM 2021). Nous avons utilisé la moyenne de l'activité des biomarqueurs des réplicats pour chaque écouvillon. Pour s'assurer que le signal mesuré correspondait aux biomarqueurs, nous avons appliqué la formule conventionnelle de limite de détection basée sur la ligne de calibration (OIV 2000). Le risque de conserver des échantillons contenant uniquement du bruit de fond, soit un signal non lié aux biomarqueurs, était de 0,13 %. Les valeurs aberrantes ont été identifiées comme des valeurs étant 3 fois supérieures ou inférieures à l'écart interquartile et supprimées pour les analyses statistiques. La normalité des valeurs d'activité des différents biomarqueurs a été testée par un test de Shapiro. Comme les valeurs de l'activité des biomarqueurs n'étaient pas toutes distribuées normalement, nous avons utilisé des tests non-paramétriques.

Un test de Wilcoxon a été utilisé pour comparer les différences d'activité des biomarqueurs entre les mâles et les femelles. Le test de corrélation de Kendall a ensuite été utilisée pour tester la relation entre l'activité de la salive et du foie. Le test de corrélation de Kendall a également été utilisé pour tester la relation entre l'activité mesurée dans le foie, la taille, le poids et l'âge. Finalement, un T-test a été utilisé pour comparer la taille et le poids des femelles et des mâles. Le niveau de significativité des analyses statistiques a été fixé à  $p < 0,05$ .

## RÉSULTATS

### Activité des biomarqueurs

La GST et l'EROD ont pu être mesurées dans la salive et dans le foie alors que l'AChE a été détectée uniquement dans le foie. Le taux de détection de la GST et de l'EROD dans la salive était proche de celui du foie (tableau 4).

L'activité des biomarqueurs dans le foie était plus basse que celle de la salive avec notamment une activité basale de l'EROD dans le foie proche de zéro mais pas nulle (figure 5).

### Corrélation entre foie et salive

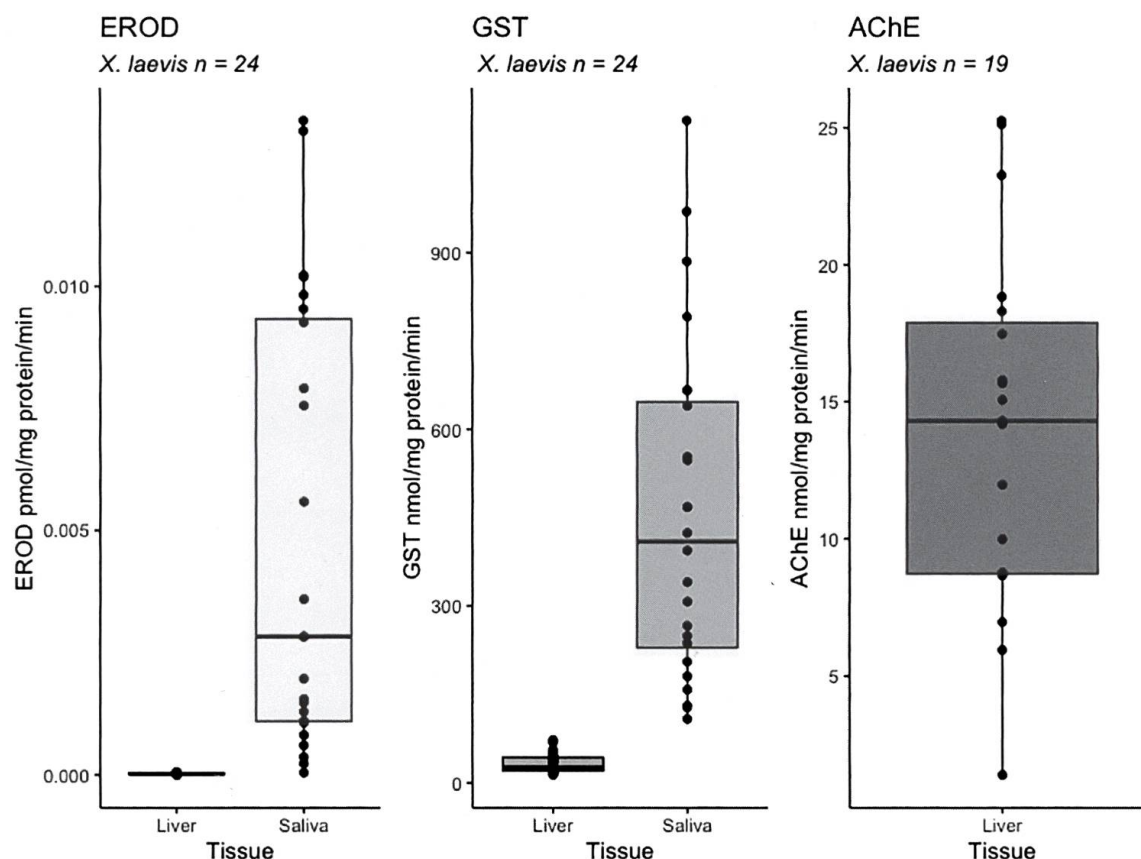
Aucune corrélation significative d'activité de l'EROD ( $\tau = 0,25$ ,  $R^2 = 0,064$ ,  $p = 0,087$ ) ou de la GST ( $\tau = 0$ ,  $R^2 = 0$ ,  $p = 1$ ) n'a été trouvée entre la salive et le foie. L'analyse n'a pas été faite pour l'AChE car aucune activité n'a été détectée dans la salive.

### Influence du sexe et de la taille sur l'activité des biomarqueurs dans le foie

Le poids était colinéaire avec la taille et l'âge était biaisé par le manque d'hétérogénéité de nos échantillons, nous avons décidé de retirer ces deux paramètres de notre analyse et de garder uniquement le sexe et la taille. Le sexe et la taille n'ont pas eu d'effets sur l'activité mesurée

**Tableau 4.** Taux de détection des biomarqueurs dans les échantillons de salive et de foie par rapport au nombre total d'échantillons.

<i>X. Laevis</i>			
Biomarqueurs	N°	Salive (%)	Foie (%)
GST	25	96	100
EROD	28	92,85	92,85
AChE	21	0	90,47



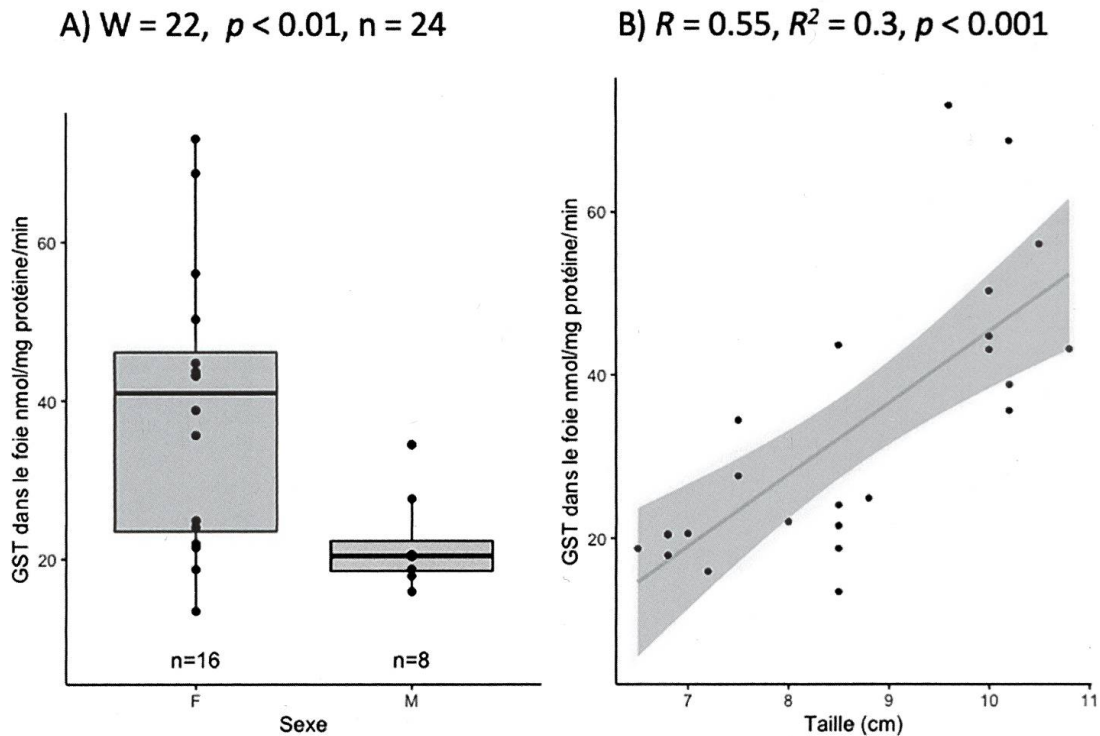
**Figure 5.** Boxplot de l'activité des biomarqueurs - Boxplot de la mesure des trois biomarqueurs. Le nombre d'échantillons dans lesquels une activité a pu être mesurée est décrit en haut à gauche de chaque graphique. Chaque point représente l'activité d'un échantillon.

de l'EROD et l'AChE. En revanche, la médiane de l'activité basale de la GST dans le foie des femelles est significativement plus élevée que chez les mâles ( $p = 0,0087$ ) et positivement corrélée avec la taille ( $p = 0,00014$ ). Par conséquent, plus un *X. laevis* est grand, plus l'activité de la GST dans son foie est élevée (figure 6).

## DISCUSSION

### Biomarqueurs chez *X. laevis*

Nous avons cherché à mesurer l'activité de l'EROD, la GST et l'AChE dans le foie et la salive de *X. laevis*. L'activité de l'EROD et de la GST ont pu être mesurées dans le foie et la salive. Le taux de détection élevé obtenu dans la salive démontre que la sensibilité de ces nouveaux protocoles est proche des méthodes conventionnelles. L'activité de la GST et de l'EROD dans la salive était plus élevée que dans le foie. Néanmoins, ces activités ne sont pas directement comparables. En effet, l'activité enzymatique est divisée par le nombre de protéines mesurées dans l'échantillon. Cette quantité varie selon le type d'échantillon utilisé et les différents protocoles. L'AChE a été mesurée avec succès dans le foie. D'après nos résultats cependant, l'AChE n'est pas un biomarqueur mesurable dans la salive de *X. laevis* avec le protocole que nous avons développé. À noter qu'elle a été détectée dans de la salive de reptiles et d'humains (NG *et al.* 2009, MINGO *et al.* 2017, CHEN *et*



**Figure 6.** GST et paramètres morphologiques - **A)** Test de Wilcoxon entre l'activité des biomarqueurs dans le foie des femelles à gauche et des mâles à droite. **B)** Corrélation de Kendall des activités des biomarqueurs dans le foie par rapport à la taille.  $R$  correspond au coefficient de corrélation ( $t$ ),  $R^2$  au coefficient de détermination et  $p$  à la valeur- $p$ .

*al.* 2019). Il est donc possible que cette absence de détection soit due à la méthode utilisée avec notamment le fait que la salive a été prélevée après l'anesthésie.

Concernant l'EROD et la GST, nous pourrions émettre l'hypothèse qu'elles sont mesurables dans la salive car elles pourraient métaboliser certains xénobiotiques dans la bouche. Cela avait été démontré pour l'EROD chez les rats (JAHN *et al.* 1998). À l'inverse, l'AChE joue un rôle au niveau des jonctions neuromusculaires et des synapses chimiques dans le cerveau. Il se pourrait qu'elle n'ait pas de rôle spécifique dans la bouche et qu'elle ne soit présente qu'en faible quantité dans la salive, expliquant ainsi la difficulté de la mesurer (MINGO *et al.* 2017). Il est possible que la surdose de benzocaïne ait eu un effet sur le débit salivaire ainsi que sur l'activité des biomarqueurs car elle agit sur la membrane neuronale. De plus, nous tenons à rappeler que l'utilisation d'individus réformés a pu influencer l'activité des biomarqueurs en comparaison à une population d'individus sains.

### Corrélation entre foie et salive

Aucune corrélation significative n'a été trouvée entre l'activité dans le foie et la salive. Si une corrélation avait été confirmée, la salive aurait pu être utilisée pour suivre les activités enzymatiques ayant lieu dans le foie tout en évitant la mort de l'individu. Toutefois, nos analyses ont été effectuées sur des individus non exposés. Dans une prochaine étape, il serait intéressant d'analyser la corrélation entre la salive et le foie après une exposition à des polluants. En effet, nous ne mesurons dans cette étude que le niveau basal.

## Dimorphisme sexuel et traits morphologiques

Nous avons trouvé un dimorphisme sexuel chez *X. laevis* avec les femelles adultes étant généralement plus grandes et d'une masse plus importante que les mâles (weight  $p < 0,001$  ; size  $p < 0,001$ ). Nous avons aussi trouvé que la taille avait un effet sur l'activité basale de la GST dans le foie. De ce fait, l'écologie de l'espèce est importante à prendre en compte lors de la mesure de biomarqueurs afin de pouvoir corriger d'éventuelles biais. Le dimorphisme sexuel étant très présent chez les anoues il est indispensable de veiller à homogénéiser l'échantillonnage afin que les deux sexes soient représentés de manière égale (KUPFER 2007).

Ceci nous amène à réfléchir sur le choix de l'espèce. Bien que *X. laevis* soit une espèce appréciée en laboratoire, elle détient certaines particularités relativement rares comparé au reste des anoues. Elle est par exemple uniquement aquatique. Est-ce que cette espèce est donc un choix judicieux pour des tests de contact avec des polluants ou faudrait-il se concentrer sur des espèces ayant un mode de vie proche des anoues indigènes que l'on souhaite étudier ? Une autre particularité est que cette espèce n'a pas de langue. Il pourrait être intéressant de comparer la quantité de salive sécrétée par *X. laevis* avec celle sécrétée par d'autres espèces. L'un des principaux avantages des méthodes présentées dans cet article réside dans le fait que l'utilisation de la salive permet d'étudier des espèces sur le terrain de manière peu invasive. Idéalement, les protocoles développés en laboratoire devraient donc être effectués sur des espèces aux caractéristiques proches de celles que l'on souhaite étudier dans l'environnement.

## Limites de l'utilisation de la salive

Le foie a l'avantage de donner une plus grande quantité de matière sur laquelle travailler que la salive. Cela permet de mesurer plusieurs biomarqueurs tout en effectuant plusieurs réplicats, ce qui est essentiel pour voir la variabilité entre les mesures. Inversement, les cotons-tiges recueillent une quantité de salive limitante pour les mesures enzymatiques. De plus, les échantillons de salive sont en contact avec des éléments externes tels que la nourriture et l'eau, ce qui n'est pas le cas avec des échantillons de sang. Il est donc possible que les mesures puissent être affectées par des corps externes.

## CONCLUSION

Nous avons réussi, pour la première fois à notre connaissance, à mesurer des biomarqueurs enzymatiques dans de la salive d'amphibien. Selon les questions de recherche, nous pouvons affirmer que i) la GST et l'EROD ont pu être mesurés dans la salive mais pas l'AChE ii) aucune corrélation n'a été trouvée dans l'activité des biomarqueurs entre le foie et la salive iii) la médiane de l'activité basale de la GST dans le foie était plus élevée chez les femelles que chez les mâles et qu'elle était corrélée positivement avec la taille des individus.

D'autres biomarqueurs devraient être étudiés dans la salive tels que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la lactate déshydrogénase (LDH). Le développement de nouveaux protocoles permettrait d'utiliser les biomarqueurs les plus adaptés en fonction du type de polluant étudié. De plus, des individus exposés devraient également être étudiés. Comparer des amphibiens exposés et non exposés pourrait montrer s'il y a un changement d'activité des biomarqueurs dans la salive après une exposition aux polluants. Si c'est le cas, la salive pourrait être utilisée en laboratoire ainsi que sur le terrain pour suivre la qualité environnementale des

milieux où se trouvent des amphibiens. En conclusion, les écouvillons buccaux permettent de mesurer certains biomarqueurs enzymatiques tout en suivant les principes des 3R. Ils présentent aussi des avantages par rapport aux protocoles conventionnels. Ces méthodes sont donc à explorer et à développer car elles ouvrent de nouvelles possibilités pour les études écotoxicologiques sur les amphibiens.

## REMERCIEMENTS

Nos remerciements vont à Floriane Tisserand pour ses connaissances précieuses dans l'élaboration des protocoles ainsi qu'à Laetitia Monbaron, Micaela Faria et Elodie Melo de Almeida pour leur aide en laboratoire. Finalement, merci à Aurélien Ballu pour le développement des pressoirs en silicone.

## BIBLIOGRAPHIE

- ALFORD R. A. & RICHARDS S. J., 1999. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annual review of Ecology and Systematics*, 30(1): 133-165.
- ANDERSSON T. & FÖRLIN L., 1992. Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish. *Aquatic Toxicology*, 24(1-2): 1-19.
- ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION, 2007. *Mesurages biochimiques et physiologiques sur poisson. Partie 2: Dosage de l'éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD)*. Saint-Denis: AFNOR
- BAKER N. J., BANCROFT B. A., & GARCIA T. S., 2013. A meta-analysis of the effects of pesticides and fertilizers on survival and growth of amphibians. *Science of the total environment*, 449: 150-156.
- BERNHARDT R., 1995. Cytochrome P450: structure, function, and generation of reactive oxygen species. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology* 127: 137-221.
- BISHOP C. A., MAHONY N. A., STRUGER J. N. G. P., Ng P. & Pettit, K. E., 1999. Anuran development, density and diversity in relation to agricultural activity in the Holland River watershed, Ontario, Canada (1990–1992). *Environmental Monitoring and Assessment*, 57(1): 21-43.
- BLAUSTEIN A. R. & KIESECKER J. M., 2002. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology letters* 5(4): 597-608.
- CHEN L., DIAO J., ZHANG W., ZHANG L., WANG Z., LI Y. & ZHOU, Z., 2019. Effects of beta-cypermethrin and myclobutanil on some enzymes and changes of biomarkers between internal tissues and saliva in reptiles (*Eremias argus*). *Chemosphere* 216: 69-74.
- CEBALLOS G., EHRLICH P. R. & RAVEN P. H., 2020. Vertebrates on the brink as indicators of biological annihilation and the sixth mass extinction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117(24): 13596-13602.
- COLLINS J. P., CRUMP M. L. & LOVEJOY III, T. E., 2009. *Extinction in our times: global amphibian decline*. Oxford University Press.
- COLOMBO A., ORSI F. & BONFANTI P., 2005. Exposure to the organophosphorus pesticide chlorpyrifos inhibits acetylcholinesterase activity and affects muscular integrity in *Xenopus laevis* larvae. *Chemosphere* 61(11): 1665-1671.
- ELLMAN G. L., COURTNEY K. D., ANDRES JR V. & FEATHERSTONE R. M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology* 7(2) 88-95.
- EZEMONYE, L., & TONGO, I., 2010. Sublethal effects of endosulfan and diazinon pesticides on glutathione-S-transferase (GST) in various tissues of adult amphibians (*Bufo regularis*). *Chemosphere*, 81(2): 214-217.
- FRASCO M. F., FOURNIER D., CARVALHO F. & GUILHERMINO L., 2005. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers* 10(5): 360-375.
- GAUTHIER L., TARDY E., MOUCHET F. & MARTY J., 2004. Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus assay) and detoxifying activity (EROD induction) in the River Dadou (France), using the amphibian *Xenopus laevis*. *Science of the total environment* 323(1-3): 47-61.

- GEORGE S. G., 1994. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. *Aquatic toxicology* 4: 37-85.
- GOKSØYR A., 1995. Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. *Archives of toxicology. Supplement*. 17: 80-95. doi: 10.1007/978-3-642-79451-3\_7.
- GRAVATO C. & SANTOS M. A., 2002. Juvenile sea bass liver P450, EROD induction, and erythrocytic genotoxic responses to PAH and PAH-like compounds. *Ecotoxicology and Environmental safety* 51(2): 115-127.
- GREULICH K., HOQUE E. & PFLUGMACHER S., 2002. Uptake, metabolism, and effects on detoxication enzymes of isoproturon in spawn and tadpoles of amphibians. *Ecotoxicology and environmental safety* 52(3): 256-266.
- HAYES T., HASTON K., TSUI M., HOANG A., HAEFFELE C. & VONK, A., 2002. Feminization of male frogs in the wild. *Nature* 419(6910): 895-896.
- HAYES J. D., FLANAGAN J. U. & JOWSEY I. R., 2005. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45: 51-88.
- HASSELMO M. E., 2006. The role of acetylcholine in learning and memory. *Current opinion in neurobiology* 16(6): 710-715.
- HILL D., CRESSWELL T., BENNETT W. & LANCTÔT C., 2021. Fate and sublethal effects of metals during amphibian metamorphosis: A systematic review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 52(23): 4266-4283.
- HUA J., COTHRAN R., STOLER A. & RELYEA R., 2013. Cross-tolerance in amphibians: Wood frog mortality when exposed to three insecticides with a common mode of action. *Environmental toxicology and chemistry* 32(4): 932-936.
- HUGGETT, Robert J. *Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. CRC Press, 2018.
- International organization of vine and wine (OIV), 2000. Recueil international des methodes d'analyses - OIV Estimation de la limite de détection et de quantification. <https://www.oiv.int/public/medias/2750/oiv-ma-as1-10fr.pdf>
- JAHN F., PLANZ N., DANZ M. & MÜLLER D., 1998. Influence of 2-acetylaminofluorene (2-AAF) on biotransformation and lipid peroxidation in salivary glands and liver from male rats. *Experimental and Toxicological Pathology* 50(4-6): 465-471.
- KAY B. K. & PENG H. B., 1992. *Xenopus laevis: practical uses in cell and molecular biology*. Academic press.
- KEY P. B. & FULTON M. H., 2002. Characterization of cholinesterase activity in tissues of the grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 72(3): 186-192.
- KIESECKER J. M., 2002. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(15): 9900-9904.
- KUPFER A., 2007. Sexual size dimorphism in amphibians: an overview. *Sex, size and gender roles: evolutionary studies of sexual size dimorphism* 5, 50-60.
- JACOBO L. R., WILLARD B., WALLACE S. J. & LANGLOIS V. S., 2019. Cytochrome P450 1A transcript is a suitable biomarker of both exposure and response to diluted bitumen in developing frog embryos. *Environmental Pollution* 246: 501-508.
- MAY, R. M., 2010. Ecological science and tomorrow's world. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365(1537): 41-47.
- MCCALLUM M.L., 2007. Amphibian decline or extinction? Current declines dwarf background extinction rate. *Journal of Herpetology* 41: 483-491.
- NG V., KOH D., WEE A. & CHIA S. E., 2009. Salivary acetylcholinesterase as a biomarker for organophosphate exposure. *Occupational Medicine* 59(2): 120-122.
- MINGO V., LÖTTTERS S. & WÄGNER N., 2017. The use of buccal swabs as a minimal-invasive method for detecting effects of pesticide exposure on enzymatic activity in common wall lizards. *Environmental Pollution* 220: 53-62.
- MINGO V., LEEB C., FAHL A. K., LÖTTTERS S., BRÜHL C. & WÄGNER N., 2019. Validating buccal swabbing as a minimal-invasive method to detect pesticide exposure in squamate reptiles. *Chemosphere* 229: 529-537.
- MONASTERSKY R., 2014. Biodiversity: Life – a status report. *Nature News* 516(7530): 158.
- NOURY, 2016. Mode opératoire/protocole. Dosage en microplaque de l'activité enzymatique AChE du gammare. Irstea.
- NOURY, 2016. Mode opératoire/protocole. Dosage en microplaque de l'activité enzymatique Glutathion S-Transférase (GST). Irstea.

- NOURY, 2016. Mode opératoire/protocole. Dosage de l'activité Ethoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) sur microplaques. Irstea.
- R CORE TEAM, 2021. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- REGNAULT C., USAL M., VEYRENC S., COUTURIER K., BATANDIER C., BULTEAU A. L., ... & REYNAUD S., 2018. Unexpected metabolic disorders induced by endocrine disruptors in *Xenopus tropicalis* provide new lead for understanding amphibian decline. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(19): E4416-E4425.
- RUSSELL W., MOY S. & BURCH R.L., 1959. *The principles of humane experimental technique*. Methuen & Co. London. 230 p.
- SANDAHL J. F., BALDWIN D. H., JENKINS J. J. & SCHOLZ N. L., 2005. Comparative thresholds for acetylcholinesterase inhibition and behavioral impairment in coho salmon exposed to chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 24(1): 136-145.
- SÄFHOLM M., RIBBENSTEDT A., FICK J. & BERG C., 2014. Risks of hormonally active pharmaceuticals to amphibians: a growing concern regarding progestagens. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369(1656): 20130577.
- SIEVERS M., HALE R., PARRIS K. M., MELVIN S. D., LANCTOT C. M. & SWEARER S. E., 2019. Contaminant-induced behavioural changes in amphibians: A meta-analysis. *Science of the Total Environment* 693: 133570.
- SPARLING D. W., LINDER G., BISHOP C. A. & KREST S., 2010. *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. CRC Press.
- WAKE D. B. & VREDENBURG V. T., 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (Supplement 1): 11466-11473.
- WHYTE J. J., JUNG R. E., SCHMITT C. J. & TILLITT D. E., 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical reviews in toxicology* 30(4): 347-570.
- YOLOGLU E. & OZMEN M., 2015. Low concentrations of metal mixture exposures have adverse effects on selected biomarkers of *Xenopus laevis* tadpoles. *Aquatic toxicology* 168: 19-27.
- ZOCHE J. J., DA SILVA L. A., DAMIANI A. P., MENDONÇA R. Á., PERES P. B., DOS SANTOS C. E. I., ... & PINHO R. A., 2014. Heavy-metal content and oxidative damage in *Hypsiobas faber*: the impact of coal-mining pollutants on amphibians. *Archives of environmental contamination and toxicology* 66(1): 69-77.