

Impact des pesticides sur la Longueur et le taux d'érosion des télomères chez l'huître creuse : biomarqueur potentiel d'état de santé et de survie (TELOMER)

Farida Akcha¹, Romuald Le Roux¹, Nathalie Tapie², Hélène Budzinski², Jérémy Roy³, Manuella Rabiller³, Virginie François³, Frédérique Courant⁴

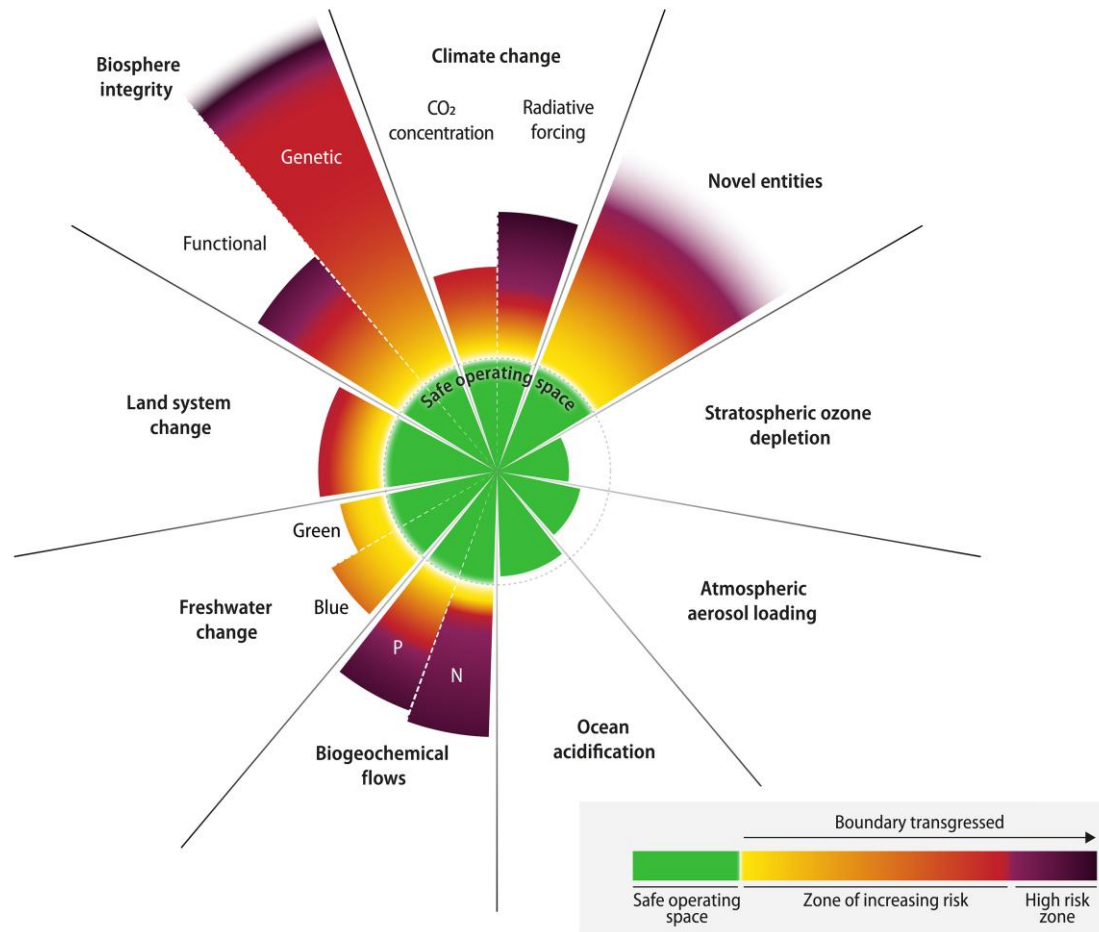
¹Ifremer Centre Atlantique, Unité CCEM, Nantes.

²UMR EPOC, Equipe LPTC, CNRS, Université de Bordeaux, Talence.

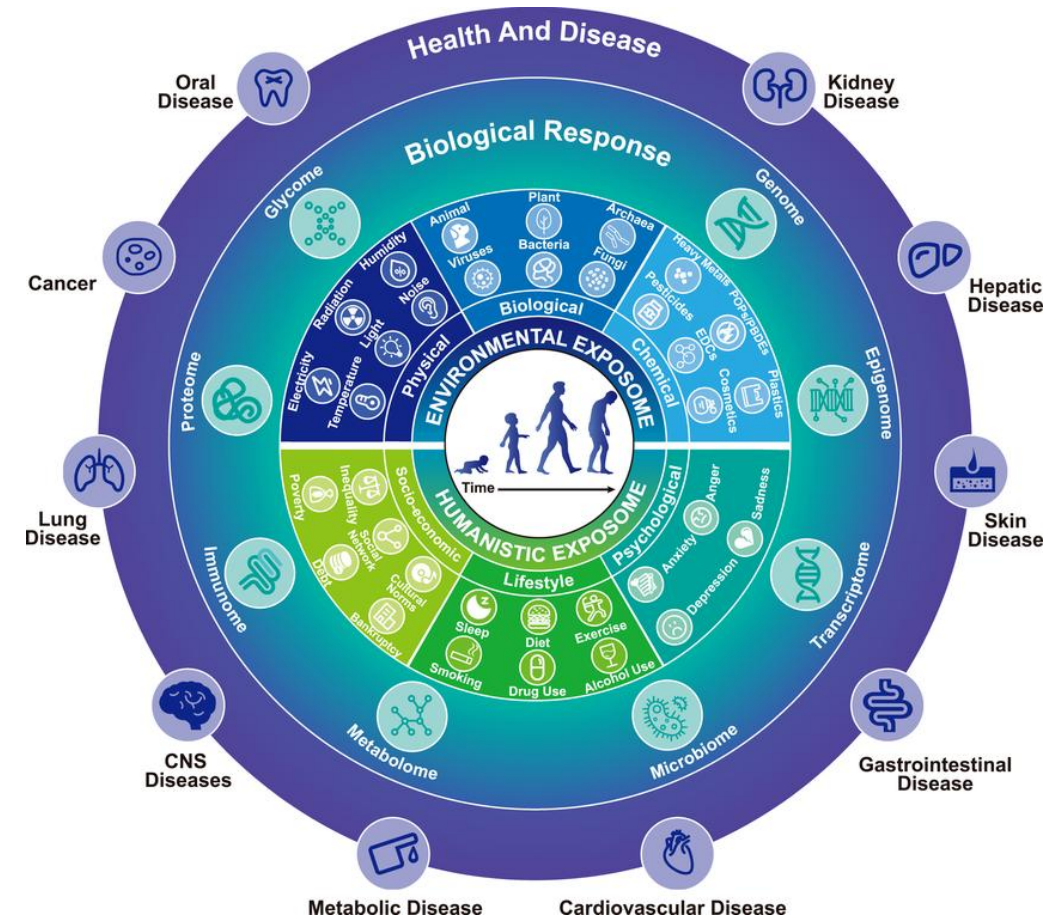
³Ifremer Centre Atlantique, Unité EMMA, Plateforme expérimentale Mollusques Marins, Bouin.

⁴UMR HydroSciences Montpellier, IRD, CNRS, Université de Montpellier.

La pollution chimique affecte la santé de l'homme et de l'environnement mieux caractériser l'exposome chimique est un enjeu majeur



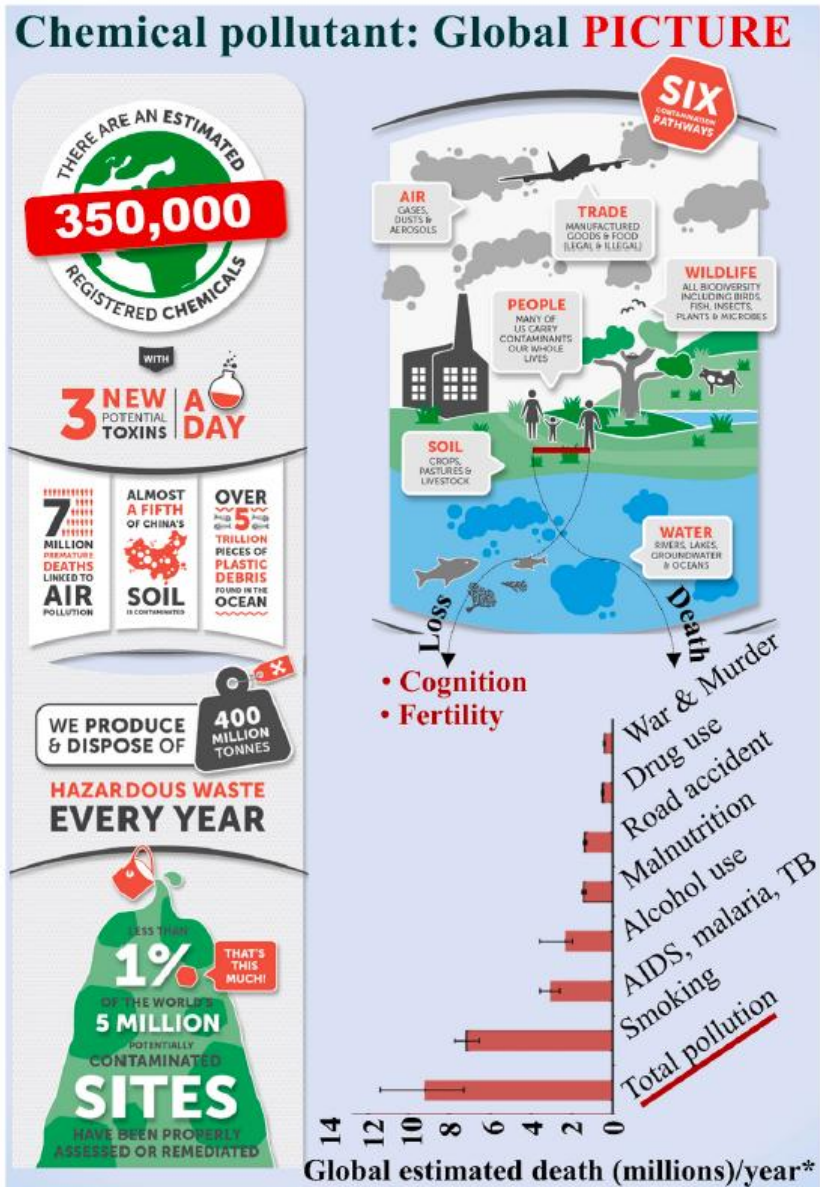
Richardson et al. (2023). Earth beyond six of nine planetary boundaries. *Sci. Adv.* 9, eadh2458; Persson et al. (2022). Outside the Safe Operating Space of the Planetary Boundary for Novel Entities. *Environ. Sci. Technol.* 2022, 56, 3, 1510–1521



Wei et al. (2022). Charting the landscape of the environmental exposome, *iMeta.* 2022;1:e50.



La pollution chimique affecte la santé de l'homme et de l'environnement mieux caractériser l'exposome chimique est un enjeu majeur



Review article

Chemical pollution: A growing peril and potential catastrophic risk to humanity

Ravi Naidu^{a,b,*}, Bhabananda Biswas^{b,c,1,2}, Ian R. Willett^d, Julian Cribb^e,
Brajesh Kumar Singh^f, C. Paul Nathanail^g, Frederic Coulon^h, Kirk T. Sempleⁱ, Kevin C. Jones^j,
Adam Barclay^b, Robert John Aitken^{j,k}

Environmental Science & Technology

pubs.acs.org/est

Viewpoint

Anthropogenic Chemicals As Underestimated Drivers of Biodiversity Loss: Scientific and Societal Implications

Ksenia Groh,^{*} Colette vom Berg, Kristin Schirmer, and Ahmed Tlili

Cite This: *Environ. Sci. Technol.* 2022, 56, 707–710

Read Online

ACCESS |

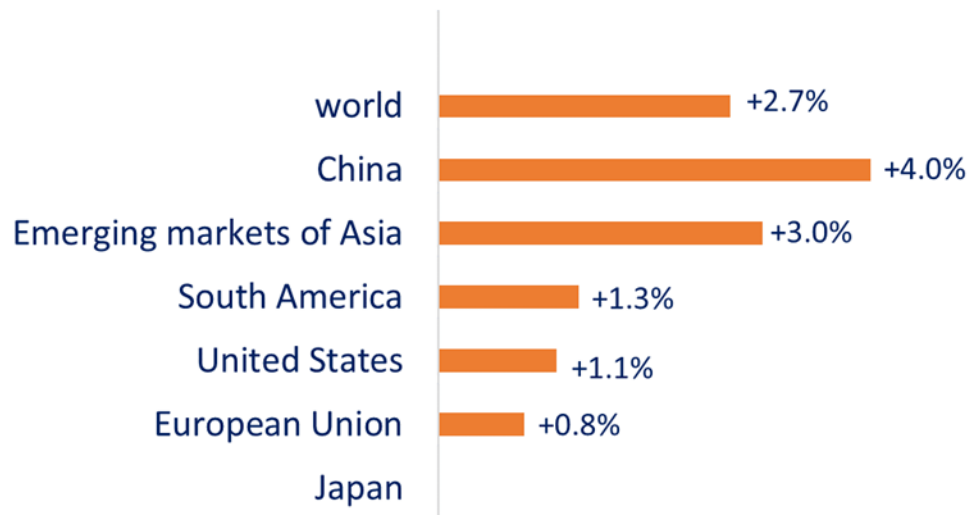
Metrics & More

Article Recommendations

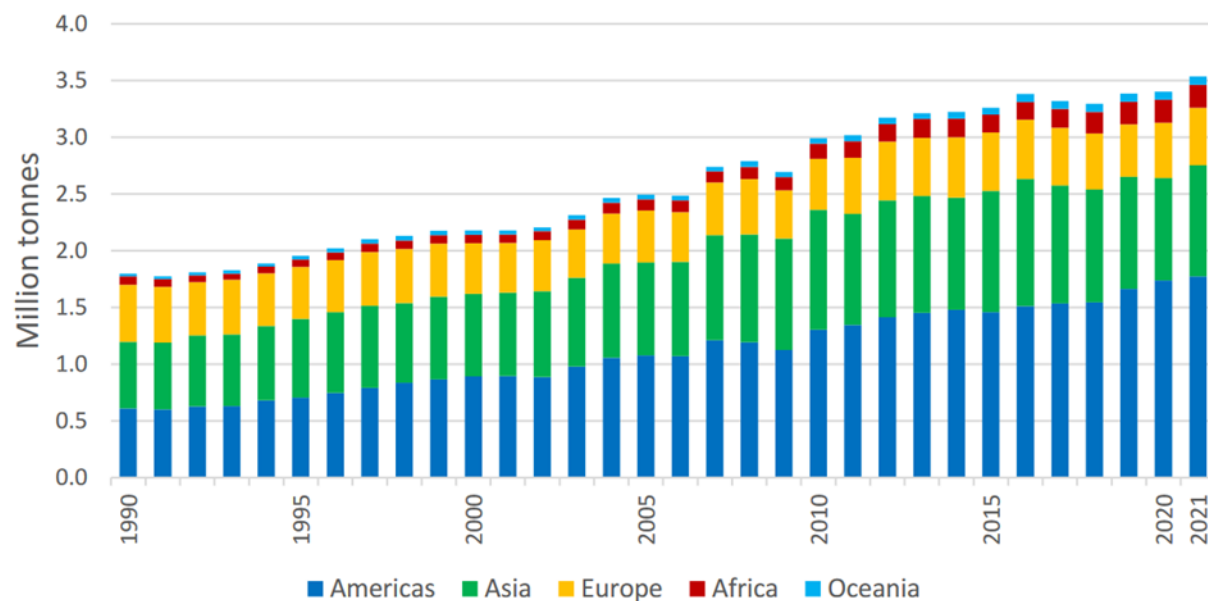


Une production en substances chimiques toujours en hausse

Outlook for chemical production 2024
(excluding pharmaceuticals)

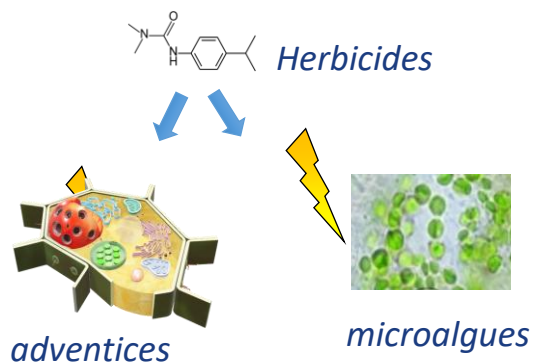


Total pesticide uses by Region (FAO, 2023)

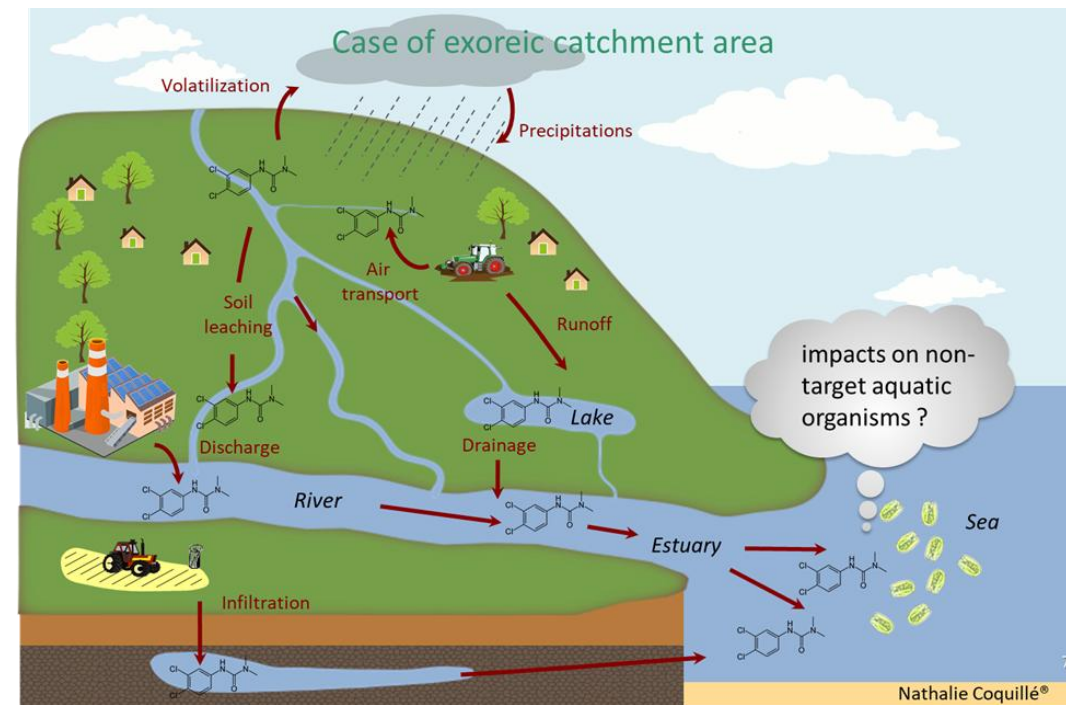


La présence de pesticides est particulièrement préoccupante

- ❑ Nombreuses voies de transfert du site d'application jusqu'au eaux côtières (Belles et al., 2019, Dogan et Karpuzcu 2023)
- ❑ Exposition d'espèces dites non cibles (Munaron et al., 2023), plus grande sensibilité pour les algues et les invertébrés (Cruzeiro et al., 2018)
- ❑ Conçus pour avoir une action biologique: e. g. insecticides/CNS, herbicides/PSII

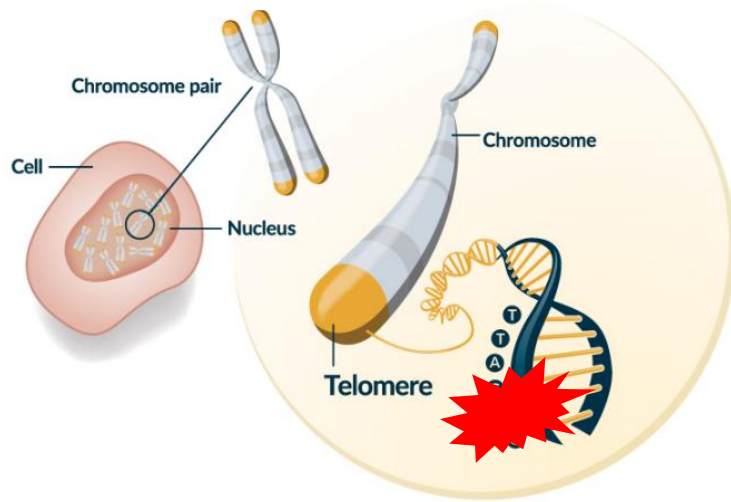


- ❑ Effets aigus, chroniques, multi- et trans-générationnels chez l'huître creuse (Sol Dourdin, 2023, 2024, Akcha et al., 2016, 2021, Bachere et al., 2016, Barranger et al., 2014, 2015, Rondon et al., 2017,...)



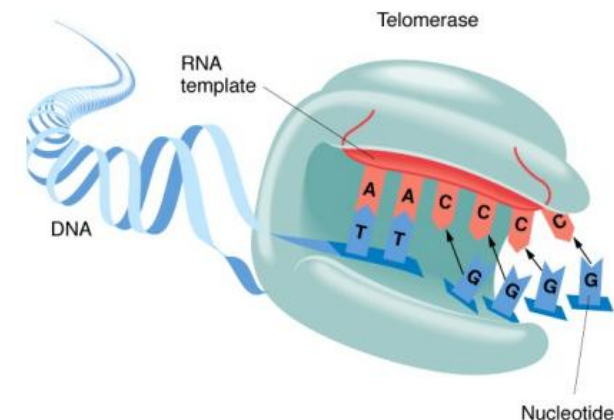
POCIS
(Polar organic Chemical
integrative sampler), log kow 1-4
(Wang et al., 2020)

Intérêt à étudier l'impact des pesticides sur la dynamique des télomères



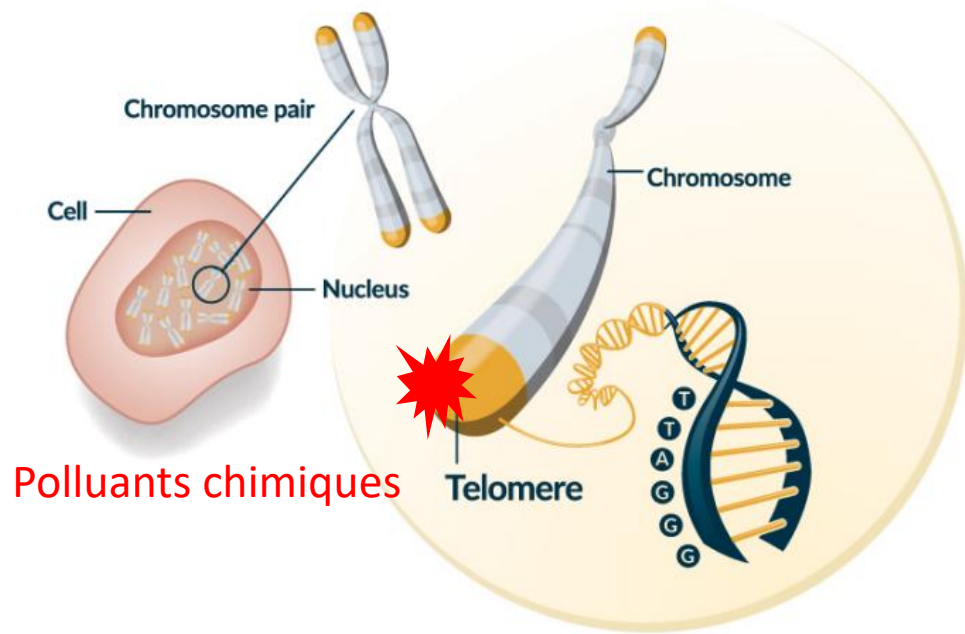
- Telomeres: sequences hexameriques non codantes répétées en tandem (TTAGGG) (→ 15 kb homme, > 30 autres espèces vertébrés)
- Rôle clef dans le maintien de la stabilité du génome: protection de la sequence codante située à l'extrémité des chromosomes (Soman et al., 2022, Lu and Liu, 2024)

Problème de replication des extrémités: à chaque cycle cellulaire, une portion de la sequence télomérique n'est pas repliquée et sa longueur diminue avec l'âge



- La télomérase peut restaurer la longueur des télomères (LT). Uniquement dans les cellules germinales et embryonnaires chez l'homme (Cong et al., 2002) vs tout au long du cycle de vie chez d'autres espèces (Anchelin et al., 2011, Hatakeyama et al., 2016)

Intérêt à étudier l'impact des pesticides sur la dynamique des télomères



- ❑ Séquence télomérique sensible au stress oxydant (riche en guanine) (Von Zglinicki, 2002, Fouquerel et al., 2019)
- ❑ Différents effets sur la LT (élongation, diminution, absence d'effet) en fonction des polluants et des organismes étudiés (Samet and Wages, 2017, Moller et al, 2018, Molbert et al., 2021, Carugno et al., 2021)

La mesure de la longueur des télomères est proposée comme :

- Un **biomarqueur du vieillissement** (Zhu et al., 2019)
- Un **biomarqueur d'exposition cumulée au stress** (Verma et al., 2022, Jiang et al., 2022)
- Un **indicateur pronostique du risque de développement de maladies en fin de vie** (Zhu et al., 2019)

Le **taux d'érosion des télomères** est proposée comme :

- Un **biomarqueur de longévité**: correlations entre le taux de raccourcissement des telomeres et la durée de vie (Whittemore, 2019, Dobson et al., 2022)
- Un **régulateur/mediateur intégratif "the Pace-of-Life Strategies"** (Giraudeau et al., 2019, Marasco et al., 2021)

*Applications plus récentes en ecotoxicologie
(Salmon et al., 2016, Louzon et al., 2019, Molbert et al., 2021,
Colominas-Ciuró et al., 2024)*

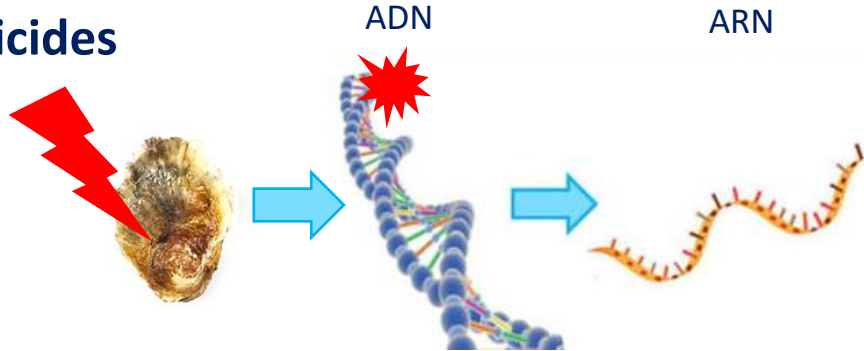
Questions scientifiques adressées par le projet TELOMER

- L'exposition à des mélanges de **pesticides** a-t-elle un **impact** sur la longueur et le taux d'érosion des **télomères** de l'**huître creuse** ?
- L'impact sur les télomères (longueur, activité télomérase, taux d'érosion) et l'intégrité du génome dans son ensemble (lésions génotoxiques, méthylation globale) s'accompagne-t-il de **perturbations au niveau moléculaire, biochimique et physiologique (approche multi-omiques, biomarqueurs de génotoxicité, biomarqueurs enzymatiques, croissance, survie)** ?
- Les données obtenues sur le **xeno-metabolome** permettent-elles une meilleure mesure du **niveau d'exposition** aux **pesticides hydrophiles** non bioaccumulables ?



Budget: 78 k€

Pesticides



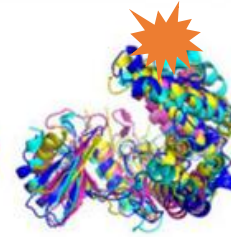
Génomique

- Lésions ADN
- Dynamique des télomères
- Méthylation globale

Transcriptomique

PHIBIE*

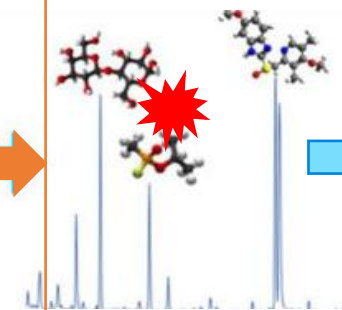
Protéines



Protéomique*



Métabolites



Métabolomique

Croissance, reproduction, survie



Physiologie

→ Volet *In situ*: transplantation à La Coupelasse,
(Suivi de la contamination par les pesticides)

→ Volet expérimental: exposition contrôlée à
un mélange de pesticides (données terrain)

Chimie analytique:

Autres polluants
chimiques d'intérêt

Toxicologie *in vitro*:

Étude de la toxicité
des pesticides détectés
en Baie de Bourgneuf



* ImPact de la contamination chimique
sur le protéome de l'Huitre creuse :
cas de la Baie de Bourgneuf »

pour la toute première fois chez l'huître,
approche multi-omiques pour la
compréhension de l'impact des pesticides
sur le génome, le protéome et le
métabolome en lien avec la croissance, la
survie

Organisation du projet

Tâche 1: Mise au point chez l'huître creuse des protocoles de mesure

- Extraction d'ADN de haut poids moléculaire (différents tissus congelés)
 - Protocole de mesure de la LT absolue et relative par qPCR
 - Protocole de mesure du gène TERT par RT-qPCR
 - Mesure de l'activité télomerase (kit TeloTAGGG Telomerase PCR ELISAPLUS)
- Application différents tissus congelés, différents âges (LT, télomerase)

→ Tâche 2: Transplantation *in situ* de jeune naissain dans la baie de Bourgneuf

→ Tâche 3: Exposition à un mélange réaliste de pesticides en conditions contrôlées

→ Réponse EC2CO (mai 2022) → Démarrage en Octobre 2022

→ Infection du naissain par *Haplosporidium costale* → décalage du volet *In situ* (fin mars 2023) (Tâche 2)

→ Arrêt brutal de la thèse Ifremer sur le sujet après 1,5 ans de contrat → reprise de tous les développements méthodologiques (Tâche 1)

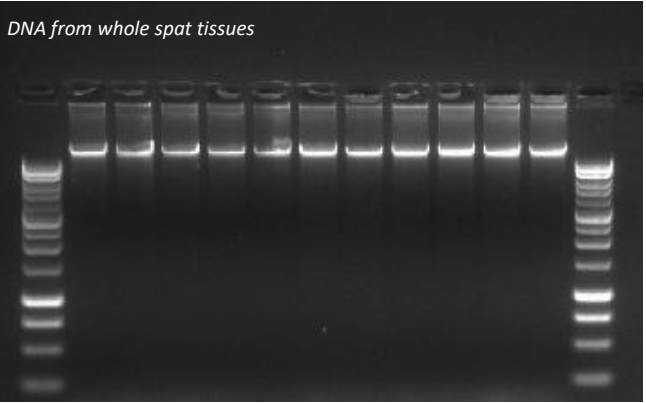
Tâche 1: Mise au point chez l'huître creuse des protocoles de mesure (dynamique télomères)

Ecotoxicology and Environmental Safety

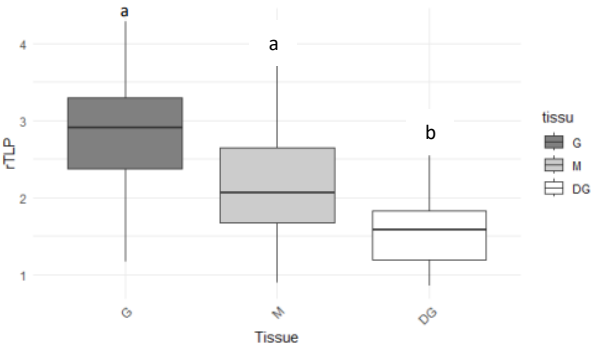
Methodological advances for studying oyster telomere dynamics in an ecotoxicological context

--Manuscript Draft--

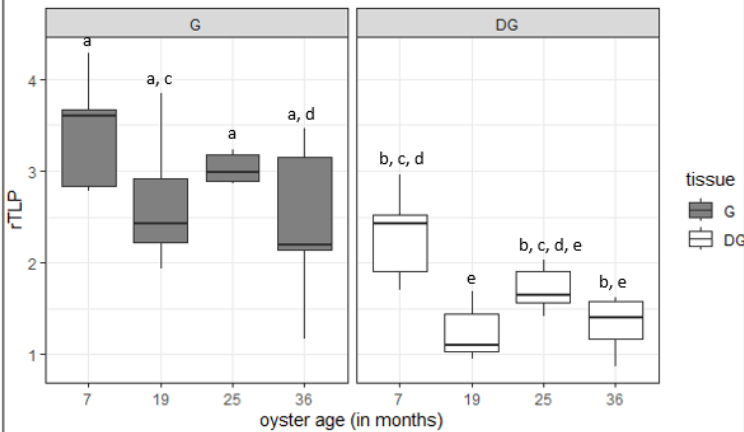
Manuscript Number:	EES-25-2347
Article Type:	Research Article
Section/Category:	Ecotoxicology
Keywords:	DNA extraction; telomere; telomerase; oyster; qPCR; ecotoxicology
Corresponding Author:	Farida Akcha Ifremer Centre Atlantique FRANCE
First Author:	Farida Akcha
Order of Authors:	Farida Akcha Romuald Le Roux, Technician Coraline Roman, Master Degree Frederique Courant, PhD



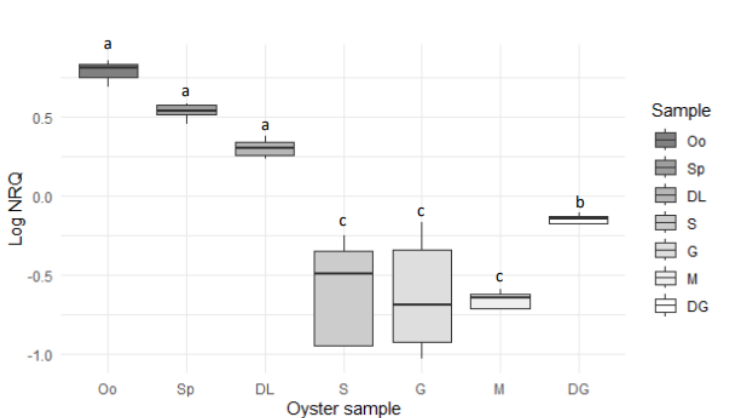
Extraction of HMW DNA is a technical issue in mollusks (nucleases, mucopolysaccharides, polyphenols) (Adema et al., 2021)



As in scallops, TL is shorter in the DG than in G (Eastabrooks, 2009). Higher ROS production in DG due to metabolism of both endogenous and exogenous compounds (Zhang et al., 2022) ?. higher cell turnover ? Level of telomerase activity ?



In DG, TL is longer at 7 month old compared to 19 and 36 month old.



Higher TERT gene expression levels in gametes and D larvae compared to spat and adult oyster tissues. No telomerase activity detected in adult oyster tissues,



DNA

Tâche 2: Transplantation *in situ* de jeune naissain dans la baie de Bourgneuf

Quels sont les drivers de la dynamique des télomères chez *C. gigas* ?

Y a-t-il un rôle pour la contamination chimique ?

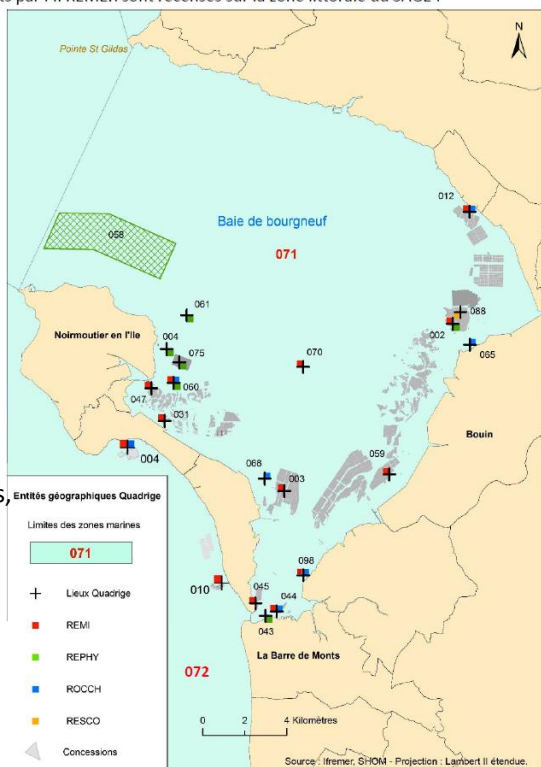
Tranplantation à La Coupelasse pdt 12 mois (mars 2023-mars 2024)

Plusieurs réseaux de suivi conduits par l'IFREMER sont recensés sur la zone littorale du SAGE :

- le réseau **REMI** (13 points) : contrôle microbiologique (bactéries *E. Coli*)
- le réseau **REPHY** (7 points) : observation et surveillance du phytoplancton et des toxines qu'il peut produire (appelées phycotoxines)
- le réseau **ROCCH** (7 points) : observation de la contamination chimique
- le réseau **RESCO** (1 point) : observations conchylicoles (suivi de la croissance et de la mortalité des huîtres)

EMERGENT'SEA: pesticides, biocides, biocides antisalissure (antifouling), pharmaceutiques, métaux, POP (mollusques+ech passifs)

ECOSCOPA Réseau d Observations Conchylicoles: croissance, mortalité, température, salinité



Conservation d'un lot « témoin » à la station expérimentale de Bouin (eau de mer filtrée, passée sur colonne de charbon)



Echantillonnage à T0, T3, T6, T9 et T12 mois après transplantation
(huîtres de 7, 10, 13, 16, 19 mois d'âge)

Tâche 2: Transplantation *in situ* de jeune naissain dans la baie de Bourgneuf

Quels sont les drivers de la dynamique des télomères chez *C. gigas* ?
Analyse multivariée (données des deux lots expérimentaux)

abiotiques

- Température ✓
- Salinité ✓
- Cycle des marées ✓
- Nourriture (proxy: lipides, acides gras) ✓
- Contamination chimique des huitres (métaux , PBDE, OCs,..) ✓
- Concentrations en pesticides dans l'eau (POCIS) ✓

biotiques

- Dommages à l'ADN: cassures ADN ✓, **LT & expression gène télomérase → en cours, fin juin 2025**
- **Approches multi-omiques (transcriptomique, protéomique, métabolomique) → fin d'année 2025**
- Réponses biomarqueurs enzymatiques (AChE, CAT, GST) ✓
- Peroxydation lipidique (MDA) ✓
- Etat reproductif et lésions tissulaires (histologie) ✓
- Croissance ✓
- Survie ✓

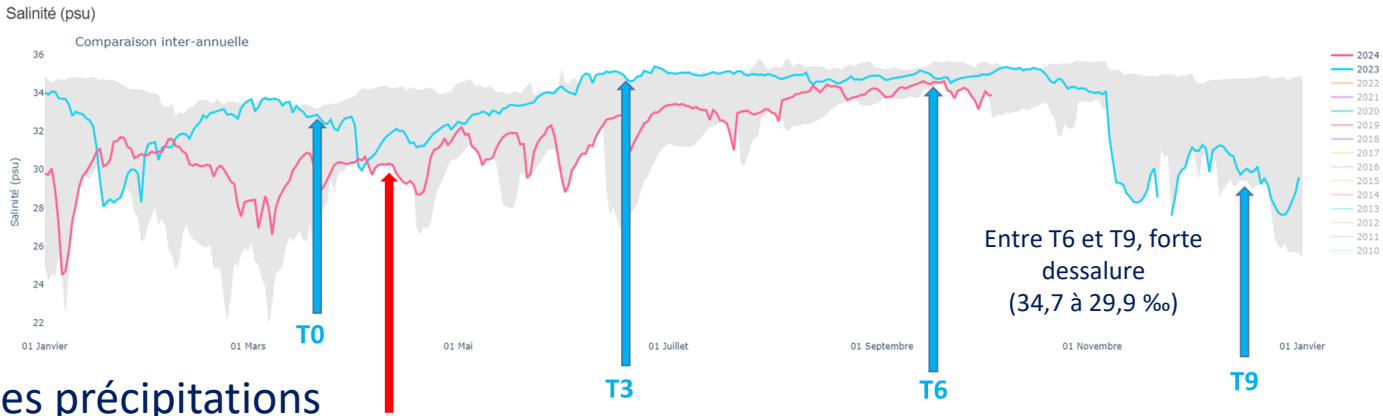
Volet *In situ*



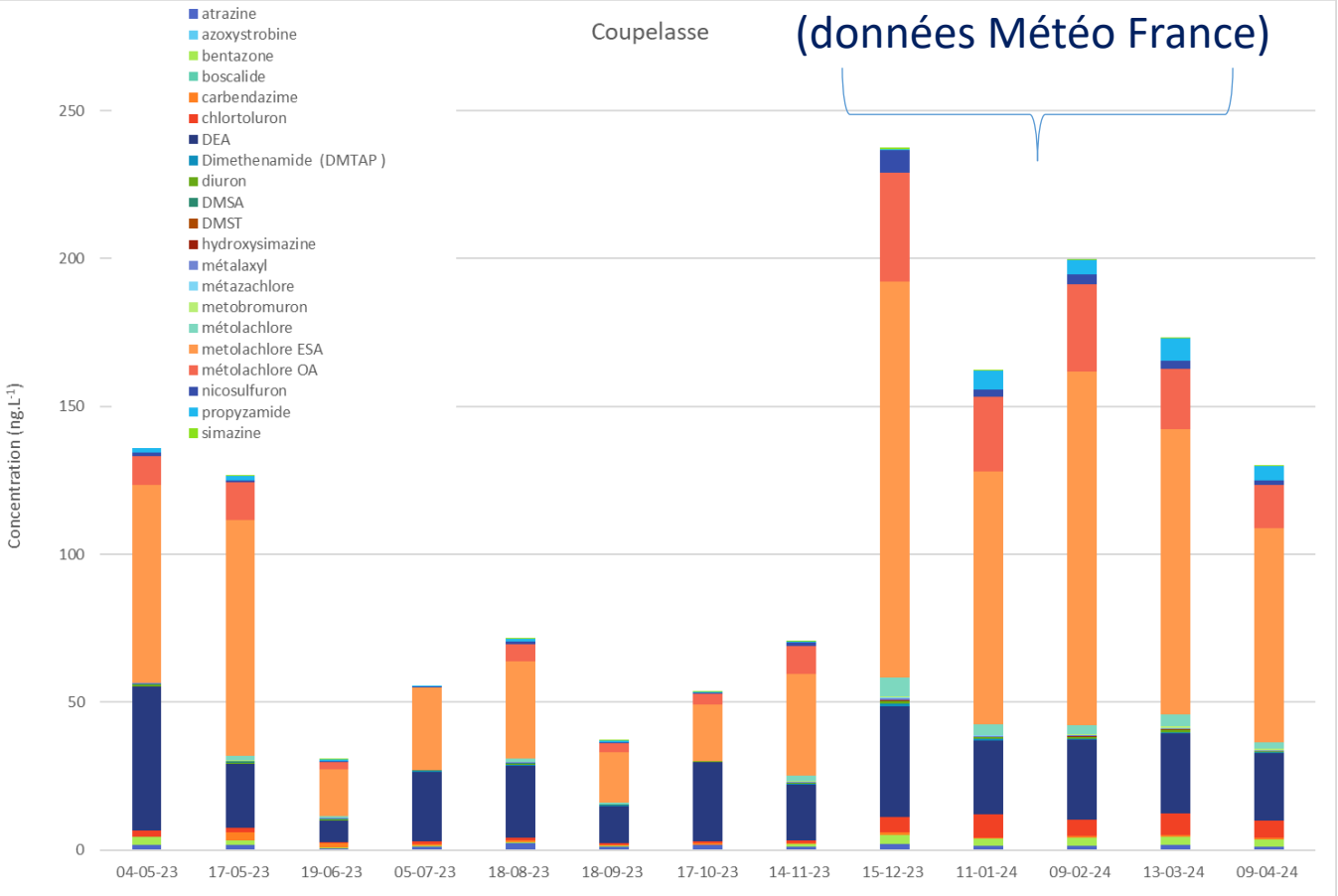
Volet In situ

- ❑ Les facteurs environnementaux peuvent expliqués les apports de contaminants chimiques dans le milieu, e.g les pesticides
- ❑ Deux groupes d'animaux exposés à des niveaux différents de contaminants chimiques

Apports pesticides dans le milieu



Fortes précipitations
(données Météo France)



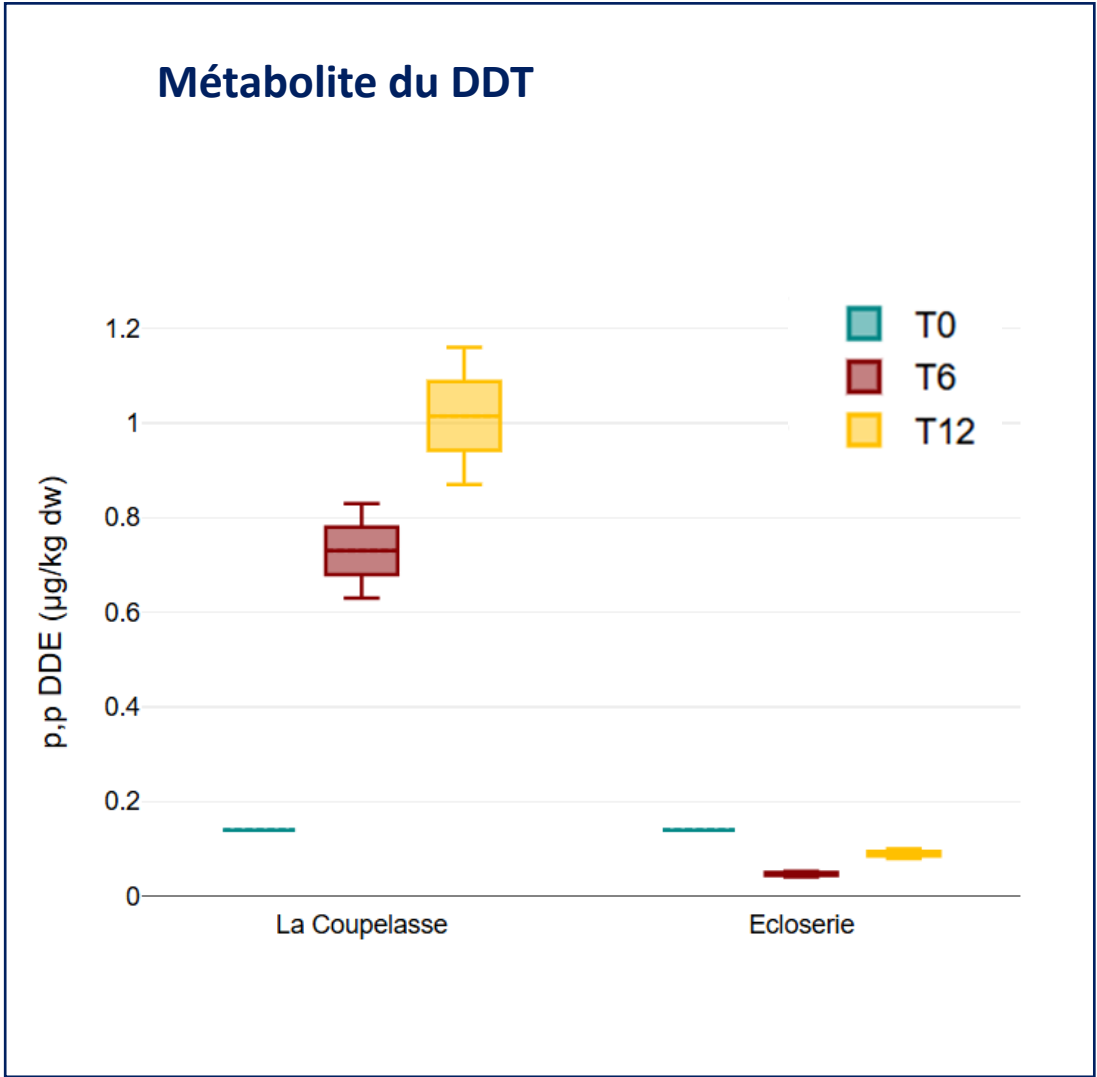
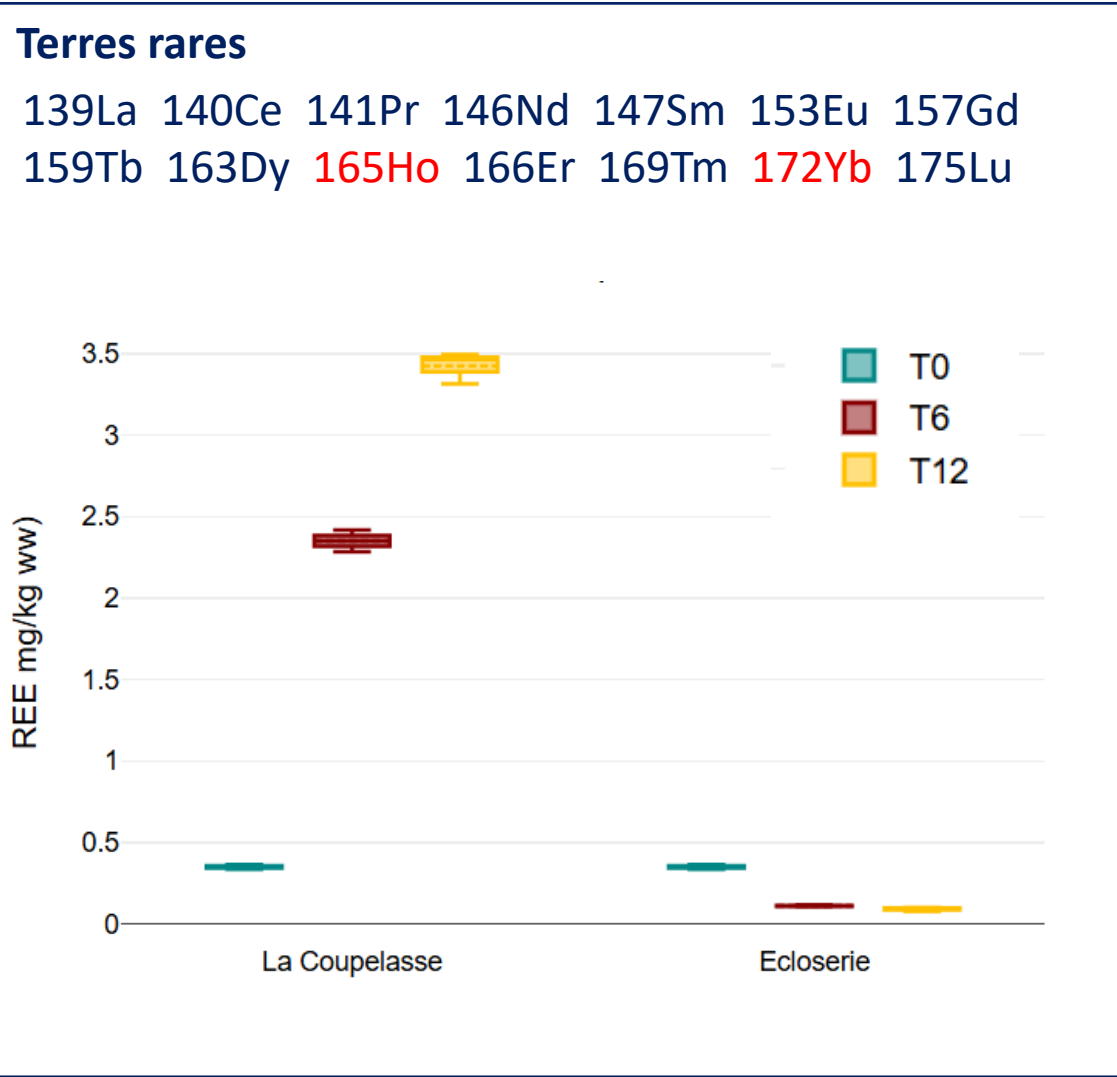
ngL ⁻¹	Atrazine + DEA	Chlortoluron	Diuron	Metolachlore + résidus
La Coupelasse	39.3	4.9	1.2	177.0
Ecloserie	0.2	0.2	0.1	31.9
Abattement %	-99.6	-96.0	-94.0	-82.0

ngL ⁻¹	La Coupelasse	Ecloserie
Concentration totale (POCIS)	28.4-260.7	6.9-62.1
Glyphosate	0.0-68.2	-
AMPA	0.0-15.2	-

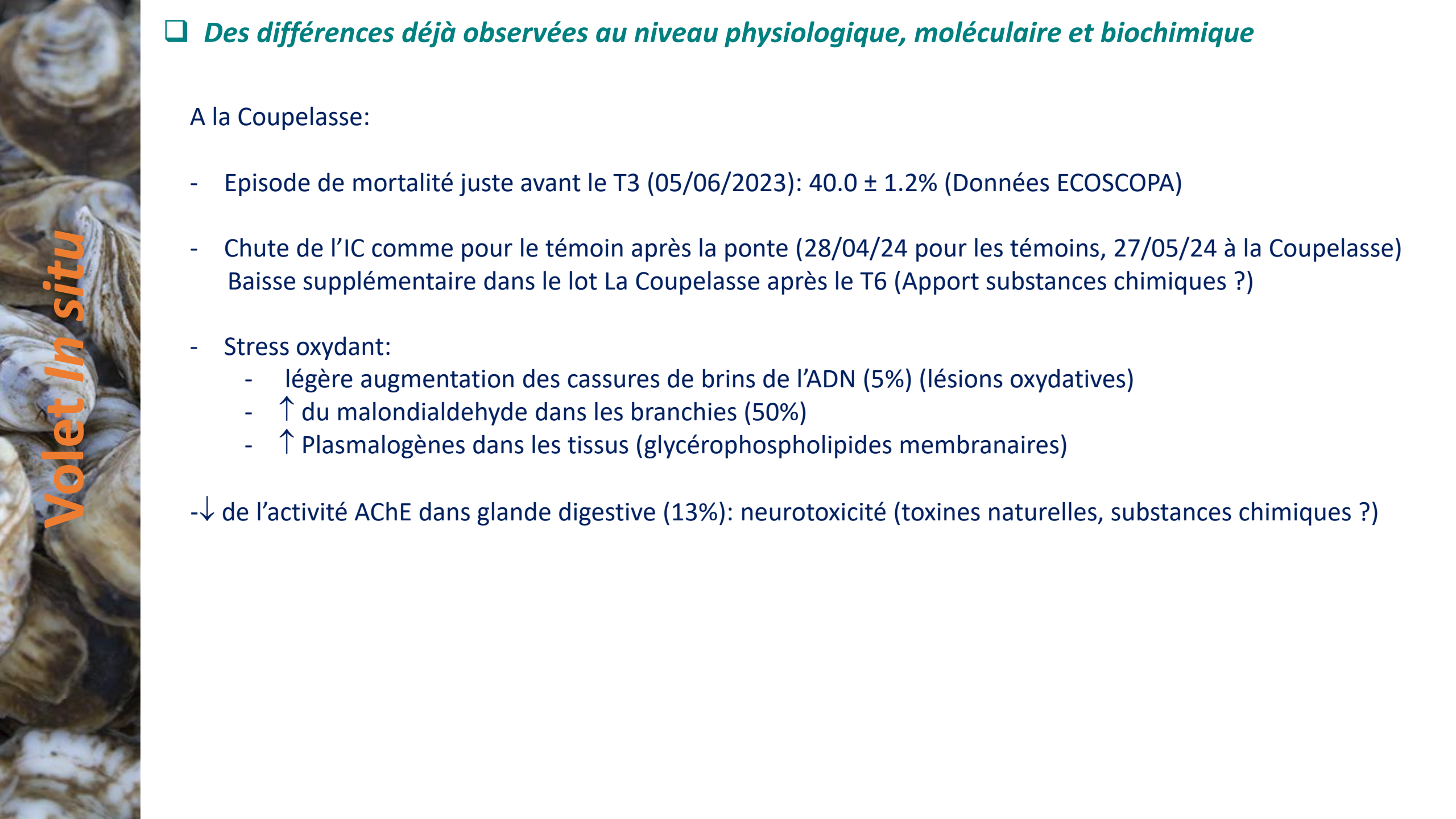


Volet In situ

❑ Deux groupes d'animaux exposés à des niveaux différents de contaminants chimiques



Sources plus ou moins récentes de PCDD, PCB (NDL, non coplanaires), PCDF, DDT, PBDE 209, ETM, terres rares à La Coupelasse (analyses PFAS à venir)



□ Des différences déjà observées au niveau physiologique, moléculaire et biochimique

A la Coupelasse:

- Episode de mortalité juste avant le T3 (05/06/2023): $40.0 \pm 1.2\%$ (Données ECOSCOPA)
- Chute de l'IC comme pour le témoin après la ponte (28/04/24 pour les témoins, 27/05/24 à la Coupelasse)
Baisse supplémentaire dans le lot La Coupelasse après le T6 (Apport substances chimiques ?)
- Stress oxydant:
 - légère augmentation des cassures de brins de l'ADN (5%) (lésions oxydatives)
 - ↑ du malondialdéhyde dans les branchies (50%)
 - ↑ Plasmalogènes dans les tissus (glycérophospholipides membranaires)
- ↓ de l'activité AChE dans glande digestive (13%): neurotoxicité (toxines naturelles, substances chimiques ?)



Tâche 3: Exposition à un mélange réaliste de pesticides en conditions contrôlées

❑ Constitution du mélange (/Données POCIS La Coupelasse)

	conc max La Coupelasse ng/L	Conc x10 (ngL)	Conc x 50 (ngL)
atrazine	2.30	23.00	115.00
diuron	1.20	12.00	60.00
métolachlore	6.27	62.73	313.65
AMPA (acide aminométhylphosphonique)	15.20	152.00	760.00
chlorotoluron	7.72	77.20	386.00
carbendazime	3.00	30.00	150.00
bentazone	3.10	31.00	155.00
propyzamide	7.50	75.00	375.00
4,4'-DDE	1.00	10.00	50.00
2,4'-DDE	1.00	10.00	50.00
DIELDRIN	10.00	100.00	500.00
atrazine déséthyl (DEA)	48.50	485.00	2425.00
métolachlore ESA	133.98	1339.81	6699.06
métolachlore OA	36.75	367.49	1837.45
glyphosate	68.20	682.00	3410.00
simazine	0.40	4.00	20.00
azoxystrobine	0.19	1.90	9.50
métazachlore	0.60	6.00	30.00
tebuconazole	0.17	1.70	8.50
Somme ngL	347.08	3470.83	17354.16
Somme µgL	0.35	3.47	17.35

Mêmes proportions relatives que celles mesurées à la Coupelasse pour les substances constitutives du mélange

Tâche 3: Exposition à un mélange réaliste de pesticides en conditions contrôlées

- ❑ Exposition semi-statique du 18 mars au 19 mai 2025 (70 j)
- ❑ Huitres (ASI 03-24) de 12 mois
- ❑ Te, 10X, 50X; 3 bacs en verre (35L, 0.5 L/ind) par condition
- ❑ Eau de mer filtrée (sable, colonne charbon), renouvellement/2j
- ❑ Contamination journalière
- ❑ Alimentation journalière (12 x 10⁶ cellules *S. marinoï*/ind)
- ❑ Salle thermostatée 18°C

Prélèvements: T0, T7, T21, T36 et T70j

- Croissance, survie
- LT, cassures de brins
- Biomarqueurs enzymatiques, MDA
- Omics (proteomique, metabolomique, Exp gènes)
- Microbiome (A. Bertucci)





❑ Nombreuses analyses et résultats à venir, dont ceux des analyses omics

❑ Poursuite de la valorisation:

- Une publication sur les données de terrain
- Une publication sur le volet expérimental

- 1 communication orale:

Akcha et al. Assessing the impact of chemical pollution on the telomere dynamics of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). PRIMO22, Nantes, 26-29 Mai 2024



Récentes publications chez l'huitre (écologie moléculaire): Dupoué et al. (2023, 2024), ANR-17-EURE-0015),