

*Convention d'étude 2007 - 2010
IAV - UBO (LEMAR)*

**Réponses moléculaires et populationnelles d'un poisson estuarien,
le flet *Platichthys flesus*, à la contamination par les pesticides :
approches *in situ* et expérimentale**

Rapport 2



Décembre 2009

Jean LAROCHE (Professeur)
Louis QUINIOU (Ingénieur de recherche)
Estérine EVRARD (Doctorante)

Université de Bretagne Occidentale
LEMAR, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, UMR CNRS 6539
Institut Universitaire Européen de la Mer, Technopôle Brest – Iroise
29280 Plouzané



I Introduction	5
II Evaluation des effets de la neurotoxicité par mesure de l'activité AChE	5
2.1 Introduction	5
2.2 Matériel et méthode	6
2.3 Résultats.....	6
2.4 Discussion.....	7
2.6 Bibliographie	8
III Etude histopathologique	9
3.1 Objectifs.....	9
3.2 Matériels et méthodes	9
3.3 Résultats.....	10
3.4 Discussion.....	12
3.5 Références bibliographiques.....	14
IV Perturbations endocriniennes et biologie de la reproduction des flets	14
4.1 Problématique et objectifs principaux	14
4.2 Matériels et Méthodes.....	15
4.3 Résultats.....	16
4.4 Conclusions.....	21
4.5 Références bibliographiques.....	22
V Vision intégrée sur les charges en contaminants et sur les réponses physiologiques du flet dans les différents estuaires	23
5.1 Rappels sur l'ensemble des variables de l'analyse et méthodologie	23
5.2 Résultats.....	25
5.3 Conclusions	28
5.4 Bibliographie	29
VI Recherches de couplages au sein de chaque estuaire entre phénotypes et génotypes: variabilité inter-individuelle dans les réponses du flet	29
6.1 Variables de l'analyse & méthodologies	29
6.2 Résumé des résultats et discussion	30
6.3 Bibliographie	31
VII Implications pratiques	31
VIII Recommandations	33

I Introduction

Ce rapport 2 de la convention de recherche entre l'IAV et le Laboratoire LEMAR : « Réponses moléculaires et populationnelles d'un poisson estuarien, le flet *Platichthys flesus*, à la contamination par les pesticides : approches *in situ* et expérimentale » présente des investigations complémentaires qui ont été menées en collaboration avec d'autres partenaires du LEMAR :

- sur de possibles effets neurotoxiques (IFREMER : Nantes)
- sur la pathologie (ISM-LPTC Université de Bordeaux & Unité d'Anatomo-Pathologie : INRA/ENV Nantes).
- sur les perturbations endocriniennes (LEMA : Université du Havre).

Dans ce rapport 2, les investigations des laboratoires partenaires qui viennent d'être cités seront présentées sur la Vilaine et sur les autres systèmes estuariens suivis sur la façade Atlantique (Ster, Loire, Gironde).

Nous présenterons ensuite :

- une version intégrée des signaux chimiques et physiologiques détectés sur le flet, développée par notre équipe (LEMAR), sur les différents systèmes estuariens.
- une synthèse de nos résultats sur une recherche de couplages entre la variabilité génétique et les réponses phénotypiques du flet en milieux stressés.

Des implications pratiques de nos recherches dans le cadre de cette approche multi-estuaire et des recommandations permettront de clore ce rapport 2.

II Evaluation des effets de la neurotoxicité par mesure de l'activité AChE

Equipe ayant collaboré à l'étude :

IFREMER, Laboratoire d'Ecotoxicologie, Nantes

Responsable scientifique : Dr. Thierry Burgeot

2.1 Introduction

Les cholinestérases catalysent l'hydrolyse des cholines esters. L'acétylcholinestérase (AChE) est un biomarqueur de neurotoxicité très sensible et il a été étudié sur un large spectre d'espèces de vertébrés et d'invertébrés (Payne et al., 1996). L'inhibition de l'AChE est étudiée comme un indicateur d'exposition aux pesticides (Bocquené et al., 1990) mais son application peut être élargie aux effets d'autres contaminants chimiques tels que les métaux, les hydrocarbures (Payne et al., 1996, Bocquené, 1996, Guilhermino et al., 1998,).

L'objectif de cette recherche était ici d'étudier les variations spatiales et temporelles de l'activité AChE dans les muscles de flet *Platichthys flesus*. L'influence des facteurs biotiques

et abiotiques a été étudiée en périodes de reproduction et de repos sexuel, sur trois populations de flets vivants dans trois estuaires contaminés: Vilaine, Gironde, Loire et un estuaire témoin : Ster.

2.2 Matériel et méthode

Echantillonnage :

30 individus ont été collectés en janvier et Juin-Juillet 2005 dans chaque estuaire (Vilaine, Loire, Gironde) et en janvier-juin 2006 dans le Ster, puis sexés et mesurés.

Analyse biochimique AChE :

30 individus par site ont été disséqués et les muscles ont été stockés dans l'azote liquide à – 180 °C. 100 à 200 mg de muscle ont été homogénéisés (1 :4 poids /volume) dans un tampon phosphate (Ph 7 : 0,1% Triton X-100). L'homogénat a été centrifugé à 10 000g à 4°C pendant 20 minutes. Le surnageant S9 a été analysé suivant la méthode décrite par Bocquené & Galgani (1998).

Traitement statistique :

Les moyennes et écart types de l'activité AChE ont été calculés par station pour chaque sexe et chaque classe de taille. Une analyse ANOVA a été réalisée en considérant un de Krsukal-Wallis.

2.3 Résultats

378 échantillons ont été collectés sur les quatre estuaires. Ces échantillons ont été prélevés durant la période de « repos sexuel » c'est-à-dire en juin, juillet et pendant la période « gamétogenèse », en janvier . Parmi les poissons pêchés le ratio mâles/femelles démontre une majorité de femelles avec 73%.

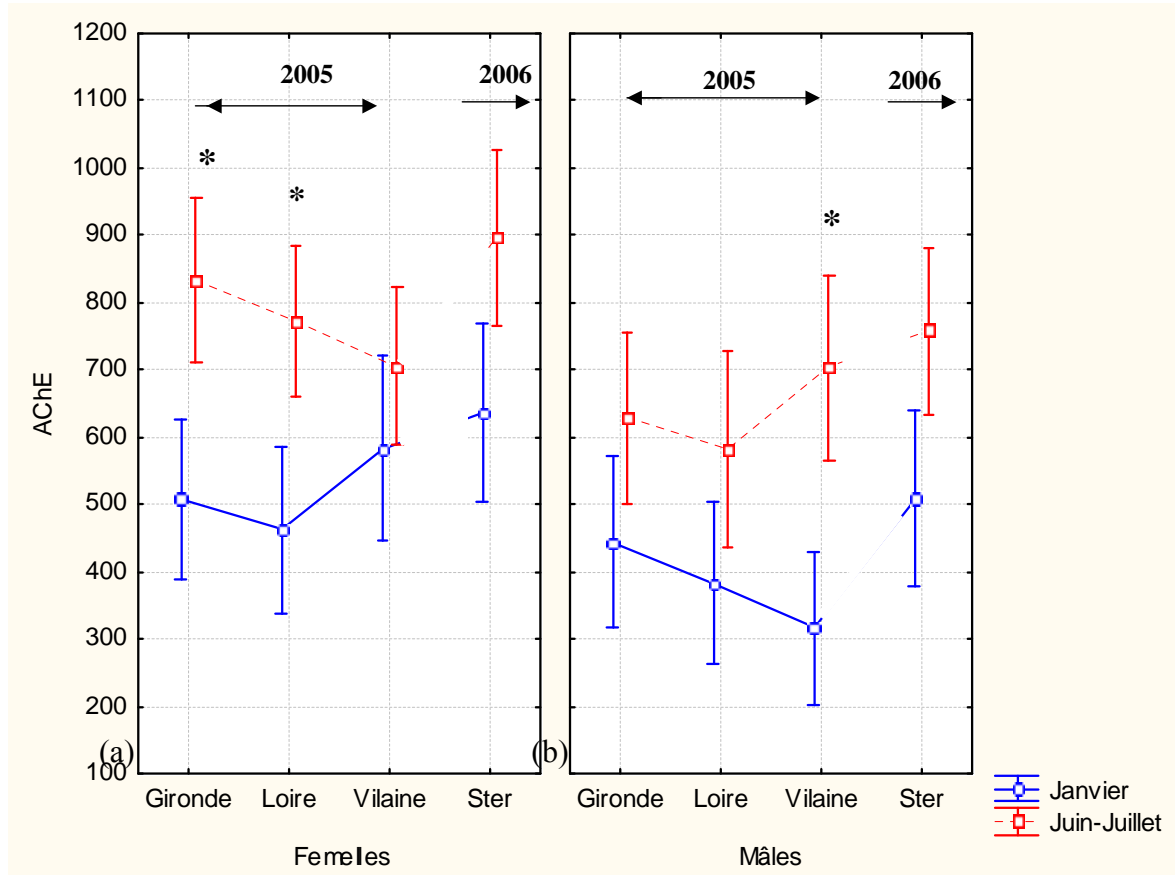
Variations spatiales et temporelles de l'activité AChE suivant le sexe , la période (hiver-été) et le site:

Une comparaison des activités AChE suivant le sexe et la période d'échantillonnage met en évidence une inhibition significative ($p < 0.005$) de l'AChE en période hivernale (janvier) relativement à la période estivale (juin-juillet), chez les mâles comme chez les femelles (Fig 1). Le sexe ratio obtenu par l'échantillonnage est défavorable pour les mâles qui ne représentent que 27% des individus collectés.

Cette différence , entre les saisons, est observable en 2005 chez les femelles et les mâles (fig. 1). L'activité AChE est naturellement plus élevée en été (juin) sans discrimination de sexe. Des différences significatives sont identifiées chez les femelles entre l'hiver et l'été ($p > 0.001$) pour les sites de la Gironde et de la Loire en 2005 (Fig 1a) et en estuaire de la Vilaine chez les mâles (Fig. 1). C'est dans l'estuaire de la Vilaine et pour les poissons mâles, que l'inhibition de l'AChE en hiver (Janvier 2005) est la plus significative ($p < 0.001$).

Sur le plan spatial, il ne résulte pas de différence significative des activités AChE étudiées pendant le même mois et entre les sites Loire, Gironde et Vilaine. Cependant une comparaison de l'AChE suivant le sexe et les sites permet de discerner des tendances avec une plus forte inhibition saisonnière de l'AChE chez les mâles en Vilaine et pendant le mois de Janvier (fig. 1) par rapport à Juin-Juillet. Chez les femelles, c'est en été (Juin-Juillet 2005) que l'inhibition de l'AChE est la plus élevée et toujours en Vilaine. Le site de la Vilaine marque ainsi une tendance avec une plus forte inhibition en hiver chez les mâles et en été chez les femelles.

Figure 1 : Comparaison des moyennes \pm écarts types ($n=30$) des activités enzymatiques AChE mesurées sur des flets mâles et femelles échantillonnés sur chacun des estuaires de la



Loire, la Gironde, et la Vilaine en 2005 et dans le Ster en 2006.

Les mesures d'AChE sur le site du Ster, à priori le moins contaminé, ne mettent pas en évidence de différence significative entre mâles et femelles, si ce n'est une tendance confirmant des activités AChE naturellement plus basses en hiver. Sur le plan spatial bien qu'échantillonné en 2006 et non en 2005 comme les autres estuaires, le site du Ster montre une tendance illustrant une plus faible inhibition que les autres estuaires Gironde, Loire et Vilaine. Ce résultat est néanmoins à interpréter avec discernement car il existe également des variabilités inter annuelles. La comparaison entre 2005 et 2006 peut introduire un biais bien que la variation saisonnière semble la plus prépondérante.

2.4 Discussion

Une étude des variations spatiales et temporelles de l'activité AChE chez les flets prélevés dans quatre estuaires en hiver et été 2005-2006 montre clairement une plus forte inhibition de l'AChE ($p < 0.0001$) chez les mâles entre Juin et Janvier 2005 dans l'estuaire de Vilaine (Fig1b). Chez les femelles une inhibition significative ($p < 0.001$) est observée sur les estuaires de la Gironde et de la Loire (fig 1a). Une inhibition de l'activité AChE lorsque les températures sont plus faibles et pendant la gamétogenèse est donc confirmée en janvier chez le flet. En effet, la température du milieu (Bocquené et Galgani, 1998) est le paramètre environnemental le plus déterminant pour l'activité AChE. Sur la plupart des espèces, des variations saisonnières montrent les activités AChE les plus fortes en fin d'été et les plus

faibles en période hivernal (Kirby et al., 2000). Le niveau d'activité physiologique, étroitement corrélé à l'activité AChE, constitue un facteur d'explication lié à la température. L'inhibition de l'AChE entre Juin et Janvier est la plus marquée chez les mâles de la Vilaine (fig1b) alors qu'elle est non significative chez les femelles (Fig1a) sur ce même site. Ce résultat est renforcé par les travaux de Kopecka & Pempkowiak (2008), ayant démontré une plus grande inhibition de l'activité AChE chez les flets mâles en mer Baltique.

Le sexe et la température apparaissent comme des éléments prépondérants pour différencier les variations spatiales de l'activité AChE entre les trois estuaires de la Gironde, de la Loire et de la Vilaine. D'après les données trimestrielles du RNO (2004), l'estuaire de la Vilaine est moins contaminé que les sites de la Gironde (contamination mesurée à la côte sur la moule et/ou l'huître creuse). En revanche, la baie de Vilaine fait partie des sites les moins contaminés par les métaux et par les polluants organiques pris en compte dans le RNO. Un suivi des flux de pesticides réalisé d'avril à juillet 2007 a néanmoins démontré la présence de pesticides dans la partie Nord de l'estuaire de Vilaine (Farcy et al., 2008). Il apparaît donc important d'expliquer pourquoi les mâles de la Vilaine présentent la tendance d'une plus forte inhibition de l'AChE en Hiver. Les mélanges de populations de flets entre la Vilaine et la Loire décrits par Masson (1987) n'expliquent pas dans ce cas les variations saisonnières mesurées chez les mâles de Vilaine et non en Loire. Un profil de contamination différent entre les deux estuaires pourrait expliquer ce phénomène.

2.5 Conclusion

La mesure de l'activité enzymatique AChE sur les différentes populations de flets vivant dans les estuaires de Loire, Vilaine et Gironde ne permet pas d'identifier une différence significative entre populations pendant la période de repos sexuel, en juin-juillet ou bien pendant la période de gamétogenèse en janvier.

Le croisement d'informations entre saison et sexe permet d'identifier des tendances intéressantes. Une analyse des activités AChE sur l'ensemble des estuaires à partir d'une combinaison sexe et mois, montre une tendance saisonnière avec une plus grande inhibition de l'AChE chez les mâles en Vilaine pendant l'hiver et une plus forte inhibition de l'AChE des femelles en Loire et Gironde pendant l'hiver. La comparaison des réponses AChE entre mâles et femelles suivant l'hiver et l'été permet de discriminer les trois estuaires de la Gironde, de la Loire et de la Vilaine.

2.6 Bibliographie

- Bocquené G., Galgani F., Truquet P., 1990. Characterization and assay conditions for the use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Mar. Environ. Res.* 75-89
- Bocquené G., 1996. L'acétylcholinestérase, marqueur de neurotoxicité. Application à la surveillance des effets biologiques des polluants chez les organismes marins. Thèse de doctorat, Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
- Bocquené G., Galgani F., 1998. Biological effects of contaminants : Cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds, *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, N°22.

- Farcy E., Burgeot T., Ménard D., Casellas C., Caquet T., 2008. Biological effects of pesticides in mussels collected in the Vilaine Bay. Oral communication. GFP (Groupe français des pesticides) congrès in Brest May 2008.
- Guilhermino L., Barros B., Silva M.C., Soares A.M.V.M., 1998. Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned? *Biomarkers*. 157-163.
- Kirby M.F., Morris S., Hurst M.R., Kirby S.J., Neall P., Tylor T., Fagg A., 2000. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in the UK Estuaries. *Mar. Poll. Bull.* 780-791.
- Kopecka J. & Pempkowiak J., 2008. Temporal and spatial variations of selected biomarker activities in flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Baltic proper. *Ecotoxicology and Environmental safety*. In press.
- Payne J.F., Mathieu A., Melvin W. & Fancey L.L., 1996. Acetylcholinesterase; an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and paper mill in Newfoundland. *Mar. Pollut. Bull.* 225-231.
- Masson G., 1987. Biologie et écologie d'un poisson plat amphihaline, le flet dans l'environnement ligérien : distribution, démographie, place au sein des réseaux trophiques. Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Brest.
- RNO 2004.- Surveillance du Milieu Marin. Travaux du RNO. Edition 2004. Ifremer et Ministère de l'Écologie et du Développement Durable.

III Etude histopathologique

Equipes ayant collaboré à l'étude :

Responsables scientifiques : J. Cachot¹, (Pr) et Y. Cherel², (Pr)

1. ISM-LPTC, UMR 5255, Université Bordeaux 1

2. UMR 703 INRA ENVN, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes

3.1 Objectifs

Ce travail avait pour but d'étudier l'ampleur et la distribution spatio-temporelle des atteintes hépatiques inflammatoires, pré-tumorales et tumorales chez le flet européen *Platichthys flesus* (L.) au niveau de quatre estuaires de la façade atlantique française.

3.2 Matériels et méthodes

Pour chacun des quatre estuaires étudiés, 58 à 60 flets ont été soumis à un examen histopathologique approfondi et systématique de l'hépatopancréas. L'organe a été prélevé et fixé immédiatement dans du formaldéhyde à 4%. Après déshydratation, une pièce de tissu de 1 cm² a été incluse dans un bloc de paraffine et débitée en coupes minces de 5 µm d'épaisseur. Les coupes ont ensuite été colorées à l'hématoxyline éosine safran puis examinées sous microscope photonique. L'ensemble des lésions observées a été noté : ces

lésions étaient de nature inflammatoire (agrégats mélanomacrophagiques et infiltrations mononuclées), cellulaires et/ou pré-tumorales (foyers de cellules altérées de type acidophile, basophile ou vacuolisé) ou tumorales (adénome hépatocellulaire ou pancréatique)..

3.3 Résultats

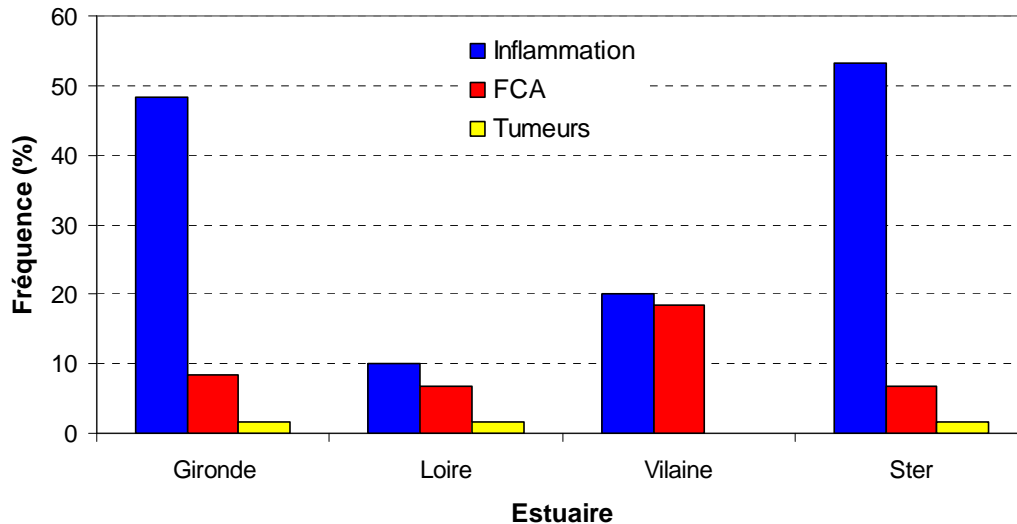


Figure 2 : Fréquence des lésions hépatiques inflammatoires, pré-tumorales (FCA) et tumorales chez les flets collectés au niveau de 4 estuaires français de la façade atlantique. 58 à 60 poissons ont été examinés par estuaire.

Les inflammations hépto-pancréatiques sont plus fréquentes et généralement plus sévères chez les flets collectés dans l'estuaire de la Gironde (48,3%) et du Ster (53,3%) (Figure 2). Ces inflammations sont exclusivement d'origine parasitaire pour les flets du Ster avec la présence quasi systématique de nématodes dans le tissu pancréatique. Un grand nombre de flets de Gironde présente des lésions inflammatoires chroniques sévères dont l'origine peut être infectieuse ou toxique, plus nombreuses et sévères en été. Ces inflammations se traduisent par des hépatites ou pancréatites subaiguës ou chroniques extensives.

Les lésions tumorales et pré-tumorales ont été observées exclusivement dans le parenchyme hépatique. Les lésions tumorales sont rares puisqu'elles ne concernent que 1,3% de l'ensemble des poissons échantillonnés. Ces lésions correspondent exclusivement à des tumeurs bénignes de type adénome ou nodules d'hyperplasie. Les lésions cellulaires qui sont souvent considérées comme pouvant être pré-tumorales sont nettement mieux représentées puisqu'elles concernent 10,1% des flets échantillonnés. Ce sont pour la plupart des foyers des foyers acidophiles (56%) ou des foyers de vacuolisation cellulaire (40%) et dans une moindre mesure des foyers de cellules claires (4%). La fréquence de ces lésions varie sensiblement selon le site de prélèvement, elle est élevée en Vilaine (18,3%) et plus modérée sur les trois autres estuaires échantillonnés (6,7 à 8,3%).

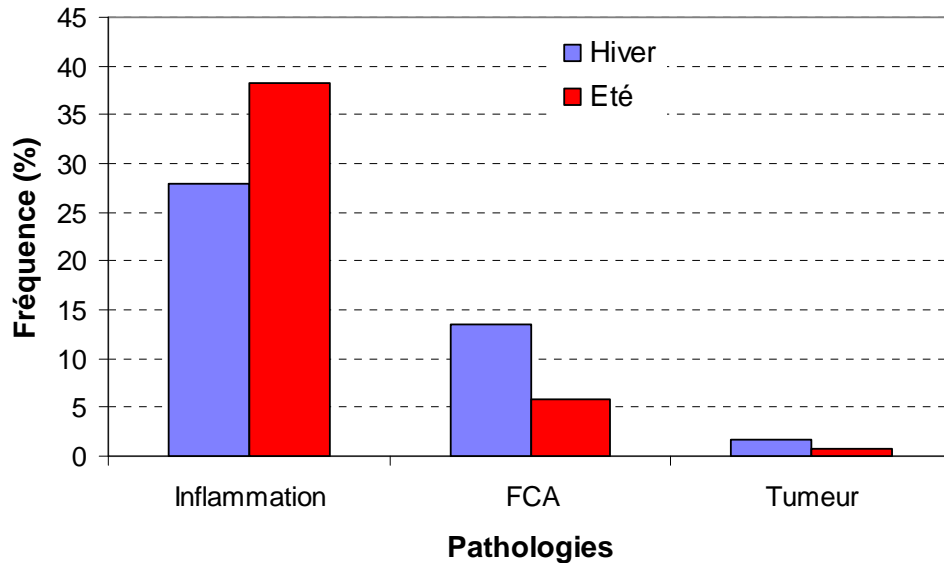


Figure 3 : Variations de la fréquence des lésions hépatiques inflammatoires, pré-tumorales (FCA) et tumorales chez les flets en fonction de la saison de pêche. 118 et 120 poissons pêchés respectivement en hiver et en été ont été examinés.

Les fréquences des lésions hépatiques varient sensiblement selon la saison de pêche (Figure 3). On observe ainsi une fréquence supérieure (+37%) et également une sévérité supérieure des inflammations hépatiques en période estivale par rapport à la période hivernale (Figure 3). En revanche, les lésions hépatiques pré-tumorales et tumorales sont nettement moins fréquentes et les variations observées entre hiver et été peuvent être associées aux fluctuations d'échantillonnage.

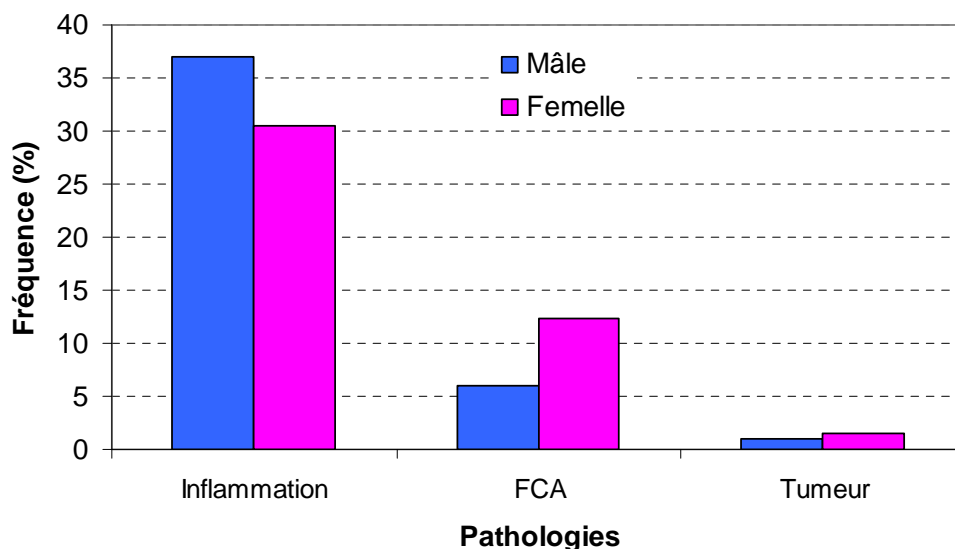


Figure 4 : Variations de la fréquence des lésions hépatiques inflammatoires, pré-tumorales (FCA) et tumorales en fonction du sexe des flets pêchés. Cent mâles et 138 femelles ont été analysés.

Les fréquences des lésions hépatiques varient également en fonction du sexe du poisson (Figure 4). Les lésions inflammatoires sont légèrement moins bien représentées chez les femelles que chez les mâles (-17,7%) tandis que les lésions pré-tumorales et tumorales sont clairement plus fréquentes chez les femelles que chez les mâles (+ 105,3% et + 44,9% respectivement).

Il faut néanmoins relativiser ces variations spatio-temporelles car la distribution des mâles et des femelles n'est pas tout à fait homogène selon la zone géographique et selon la saison. Les femelles sont globalement mieux représentées que les mâles dans notre échantillonnage (sexe ratio M/F = 0,73). Ce déséquilibre est plus marqué en faveur des femelles en été (M/F = 0,64) qu'en hiver (M/F = 0,82). Il est très marqué en Loire (M/F = 0,58) plus modérément en Gironde et en Vilaine (M/F = 0,85 et 0,76 respectivement) et pas du tout dans le Ster (M/F = 1).

3.4 Discussion

Les données obtenues font apparaître une relative uniformité de la fréquence des lésions hépatiques tumorales et pré-tumorales (FCA) dans les populations de flet de Gironde, Loire et Ster (8,4 à 10%) et une fréquence légèrement plus importante en Vilaine (18,3%) notamment en période hivernale. Ces lésions correspondent pour l'essentiel à des lésions pré-néoplasiques (89%) et plus rarement à des adénomes hépatocellulaires ou des nodules d'hyperplasie (11%). Aucune tumeur maligne de type cholangiocarcinome ou hépatocarcinome n'a été observée. Les fréquences de FCA mesurées dans la présente étude (6,7 à 18,3%) apparaissent sensiblement plus élevées que celles mesurées précédemment en estuaire de Seine (3,7 %) (Cachot et al., 1998). Il faut néanmoins préciser que dans cette dernière étude les foyers de vacuolisation cellulaire n'avaient pas été pris en compte dans le calcul des fréquences de FCA. Ces foyers de vacuolisation représentant environ 40% de l'ensemble des lésions pré-néoplasiques, on peut donc considérer que les valeurs obtenues sur les estuaires du Ster, Gironde et Loire sont du même ordre de grandeur que celles obtenues en estuaire de Seine. La fréquence de FCA sur la Vilaine est près de 2 fois plus importante que celle mesurée en Seine. Pour ce qui concerne les tumeurs (adénomes), les fréquences sont sensiblement identiques en Seine (1,4%) et sur le Ster, la Gironde et la Loire (1,7%). La plus forte fréquence des atteintes hépatiques tumorales et pré-tumorales chez les femelles n'est pas en soit une surprise car ceci a déjà été documenté en Seine (Cachot et al., 1998) et en mer du Nord (Koehler, 2004).

Par rapport aux études menées sur d'autres côtes ou estuaires européens (Tableau 1), les valeurs obtenues se situent plutôt dans la fourchette haute des fréquences de lésions pré-néoplasiques. La fréquence de FCA pour les flets de Vilaine est comparable aux valeurs mesurées dans l'estuaire du Mersey (Lyons et al., 2004) ou à la sortie du canal de la mer du Nord sur les côtes néerlandaises (Vethaak et Wester, 1996). Les fréquences d'adénome hépatocellulaire chez les flets des côtes françaises sont du même ordre de grandeur que celles mesurées en mer du Nord le long des côtes néerlandaises (Vethaak et Wester, 1996). Enfin, les tumeurs hépatiques malignes sont rarement observées chez le flet quel que soit le site d'étude considéré. Ce type de lésion ne concernait que 0,1% des 14526 flets pêchés entre 1987 et 1989 sur les côtes néerlandaises (Vethaak et Wester, 1996).

Concernant les lésions hépatiques inflammatoires, des fréquences allant de 10 à 53,3% ont été mesurées dans notre étude. Les flets du Ster et de Gironde sont plus particulièrement atteints. Les premiers par des inflammations d'origine parasitaire et les seconds par des inflammations d'origine parasitaire ou toxique. Des fréquences sensiblement plus faibles allant de 2,9 à 31,4% ont été documentées chez les flets des côtes néerlandaises (Vethaak et Wester, 1996).

Tableau 1 : Tumeurs et foyers d'altérations cellulaires (FCA) hépatiques sporadiques chez le flet européen.

Espèces	Sites échantillonnés	FCA (%)	Tumeurs (%)	Etiologie suspectée	Auteurs
<i>Platichthys flesus</i>	côtes Néerlandaises	0-28,6	0-3,4	pollution (HAP)	Vethaak & Wester, 1996
<i>Platichthys flesus</i>	Baie de Seine	3,7	1,4	pollution (HAP)	Cachot, 1998
<i>Platichthys flesus</i>	Mer Baltique	0,6	0,9	-	Bogovski et al., 1999
<i>Platichthys flesus</i>	Estuaire Mersey (RU)	3,4	0	Pollution (HAP)	Simpson et al., 2000
<i>Platichthys flesus</i>	Estuaire Dee (RU)	2,6	1,3	-	Simpson et al., 2000
<i>Platichthys flesus</i>	Estuaire Alde (RU)	8	0	-	Lyons et al., 2004
<i>Platichthys flesus</i>	Estuaire Southampton (RU)	2,3	0	-	Lyons et al., 2004
<i>Platichthys flesus</i>	Estuaire de la Tamise (RU)	16	0	Pollution (HAP)	Lyons et al., 2004
<i>Platichthys flesus</i>	Estuaire Forth (RU)	9,1	0	-	Lyons et al., 2004
<i>Platichthys flesus</i>	Estuaire Clyde (RU)	4	0	-	Lyons et al., 2004
<i>Platichthys flesus</i>	Estuaire Tyne (RU)	12,2	0	Pollution (HAP)	Lyons et al., 2004
<i>Platichthys flesus</i>	Estuaire Mersey (RU)	20,3	0	Pollution (HAP)	Lyons et al., 2004
<i>Platichthys flesus</i>	Estuaire du Ster	6,7	1,7	-	cette étude
<i>Platichthys flesus</i>	Estuaire de Vilaine	18,3	0	-	cette étude
<i>Platichthys flesus</i>	Estuaire de Gironde	8,3	1,7	-	cette étude
<i>Platichthys flesus</i>	Estuaires de la Loire	6,7	1,7	-	cette étude

3.5 Références bibliographiques

- Bogovski S., Lang T., Mellergaard S., 1999. Histopathological examinations of liver nodules in flounder (*Platichthys flesus* L.), from the Baltic Sea. *ICES Journal of Marine Science*, 56 : 148-151.
- Cachot J., 1998. Caractérisation et analyse de la mutagenèse du gène suppresseur de tumeur p53 chez le flet, *Platichthys flesus* (L.). Thèse d'Université, Aix-Marseille 2, 12 janvier 1998.
- Koehler A., 2004. The gender-specific risk to liver toxicity and cancer of flounder (*Platichthys flesus* L.) at the German Wadden Sea coast. *Aquatic Toxicology*, 70 : 257-276.
- Lyons B.P., Stentiford G.D., Green M., Bignell J., Bateman K., Feist S.W., Goodsir F., Reynolds W.J., Thain J.E., 2004. DNA adduct analysis and histopathological biomarkers in European Flounder (*Platichthys flesus*) sampled from UK estuaries. *Mutation Research*, 552 : 177-186.
- Simpson M.G., Parry M., Kleinkauf A., Swarbreck D., Walker P., Leah R.T., 2000. Pathology of the liver, kidney and gonad of flounder (*Platichthys flesus*) from the UK estuary impacted by endocrine disrupting chemicals. *Marine Environmental Research*, 50 : 283-287.
- Vethaak A. D., Wester P.W., 1996. Disease of flounder *Platichthys flesus* in Dutch coastal and estuarine waters, with particular reference to environmental stress factors. II Liver histopathology. *Diseases of Aquatic Organisms*, 26 : 99-116.

IV Perturbations endocriniennes et biologie de la reproduction des flets

Equipe ayant collaboré à l'étude :

Responsable scientifique : Christophe Minier (Pr)

LEMA; UPRESS-EA 3222; IFRMP 23, Université du Havre

4.1 Problématique et objectifs principaux

La reproduction, le développement et le comportement des individus sont régulés par le système endocrinien des organismes vivants. Celui-ci fait intervenir un nombre important de molécules appelées hormones ayant des structures et des modes d'action complexes. Or, beaucoup de composés utilisés par l'industrie, l'agriculture ou les consommateurs sont suspectés de pouvoir interagir avec le système endocrinien et ainsi de déréguler les processus physiologiques tels que le développement, la croissance et la reproduction. Certains travaux ont mis en évidence, chez l'homme et la faune sauvage, des effets tels que des cancers, des altérations des fonctions neurologiques ou reproductrices (Colborn *et al.*, 1993 ; Toppari *et al.*, 1996). Ces composés sont dénommés « perturbateurs endocriniens » (PE).

Le flet européen (*Platichthys flesus*) apparaît particulièrement affecté par la présence de PE dans les grands estuaires européens. Des effets touchant surtout la reproduction ont été décrits. Ainsi la présence d'individus intersexués, c'est-à-dire présentant des gonades

différenciant à la fois des cellules mâles et femelles ont été rapportés dans les estuaires de la Seine (Minier *et al.*, 2000) du Mersey et du Tyne (Allen *et al.*, 1999, Kleinkauf *et al.*, 2004). De même, la production anormale de vitellogénine par les individus mâles a pu être dosée chez une très grande proportion de flet de la Mer du Nord et des îles Britanniques (Vethaak *et al.*, 2004 ; Minier *et Amara*, 2008).

Dans ce contexte, le présent projet s'est fixé deux objectifs principaux : (1) mesurer l'impact éventuel de PE sur les populations de flets de la façade atlantique et (2) de déterminer la nature des composés actifs en présence. La recherche d'effets manifestes, et facilement attribuables à des PE, s'est orientée vers les mesures de taux de vitellogénine plasmatiques ainsi qu'à la recherche de perturbation de la gamétogénèse. La stratégie d'identification des PE en présence consiste à mettre à profit la capacité des PE à engendrer une réponse via le récepteur à l'œstradiol. En effet, les principaux effets identifiés conduisent à fortement soupçonner la présence de xéno-oestrogènes susceptibles d'altérer les mécanismes physiologiques via une interaction xénobiotique – récepteur hormonal (Tyler *et al.*, 1998). Cette étude a donc consisté en des mesures réalisées *in vitro* de l'activité des composés excrétés dans la bile des poissons sur des cellules de levure exprimant le récepteur humain à l'œstradiol (test YES, Routledge *et Sumpter*, 1996) Les composés associés à ces mesures ont alors été identifiés parmi les échantillons positifs.

4.2 Matériels et Méthodes

Préparation des échantillons

Les flets, *Platichthys flesus*, ont été capturés par chalutage ou à l'aide de filets maillants. Après anesthésie, les poissons ont été mesurés et pesés. Des échantillons de sang ont été prélevés à partir de la veine caudale à l'aide d'une seringue hypodermique puis centrifugés à 5000 rpm pendant 5 min à 4°C. Les plasmas ont alors été conservés à -80°C jusqu'à analyse. Des échantillons de liquide biliaire ont été collectés et immédiatement congelés puis conservés à -80°C. Les gonades ont été disséquées, pesées et conservées dans du formol à 4% et pH 7,4 pour l'analyse histologique. L'indice gonadosomatique (GSI), révélateur du potentiel reproducteur des poissons, a été calculé par le rapport: (poids des gonades / (poids corporel total - poids des gonades)) x 100.

HPLC en phase inverse: Une méthode HPLC en phase inverse a été utilisée pour fractionner les biles de flets. Les échantillons ont été séparés sur un système HPLC (Waters Ltd system) comprenant une pompe, un échantillonneur automatique, un système de détection spectrophotométrique (Model 996, Waters Ltd) et un analyseur en scintillation (Packard 500TR). Des standards d'œstradiol (E2), d'éthynyl-œstradiol (EE2), d'estrone (E1), de nonyl-phénol (NP), de 6- α -hydroxy estradiol, de β -estriol, de 16- α -hydroxy estrone et de bisphénol-A ont été utilisés. Des aliquotes de 100 μ L ont été injectés dans la colonne Novapak C18 (particules de 5 μ m; 250 x 4,6 mm; Waters Ltd). Les solvants de la phase mobile étaient de l'eau acidifiée avec de l'acide acétique à 0,2% (A) et de l'acétonitrile (B) dans une proportion initiale (A:B) de 69:31. La séparation a été réalisée à température ambiante sous un débit de 1 mL/min avec un gradient de solvants programmé de la façon suivante : 0 minute (69:31); 35 minutes (65:35); 50 minutes (0:100); 80 minutes (0:100). Les fractions ont été recueillies chaque minute et analysées par le test YES.

Afin de déconjuguer les composés biotransformés présents dans la bile des flets, les échantillons ont été préalablement incubés dans un mélange enzymatique (glucuronidase à 1 mU/ μ L, sulfatase à 2,5 mU/ μ L et glucosidase à 1.6 mU/ μ L) pendant 12 h à 37°C, pH 6,5 puis acidifiés avec de l'acide acétique à 2 μ L/mL.

Analyse de l'activité oestrogénique par système rapporteur (test YES)

L'activité oestrogénique liée aux composés présents a été déterminée par le test YES (yeast estrogen screen). Ce bioessai a été validé pour la détection d'un large panel d'agonistes du récepteur à l'oestradiol tels que le 17β -œstradiol (E2), l'estrone, l'éthinyl-œstradiol et des xénoestrogènes (alkylphenols et bisphenol A) (Routledge et Sumpter, 1996 ; 1997). Le gène du récepteur humain à l'oestradiol (hER) a été intégré dans le génome de la levure de même qu'un vecteur d'expression contenant l'élément de réponse aux estrogènes (ERE) qui contrôle la synthèse du gène rapporteur Lac-Z (codant pour une β -galactosidase). L'activation du récepteur hER par l'interaction avec un ligand engendre la liaison du complexe avec l'ERE et en conséquence la production de β -galactosidase. L'enzyme est alors sécrétée dans le milieu et métabolise le substrat jaune (le chlorophénol β -D-galactopyranoside; CPRG), en un composé rouge qui peut être mesuré par son absorbance à 540 nm.

Les extraits ainsi que les blancs ont été dilués en cascade, ajoutés dans une microplaque et laissés quelques minutes à température ambiante pour que l'éthanol s'évapore. Une gamme de concentrations d'E2 a été utilisée comme control positif. Les levures et le milieu de culture contenant le CRPG ont été ajoutés dans les puits et la plaque mise à incuber pendant 3 à 5 jours. L'absorbance de chacun des échantillons a été mesurée, corrigée par rapport aux témoins et comparée à la courbe étalon (entre 10 pM et 1 nM d'E2). L'oestrogénicité mesurée a ainsi été exprimée en équivalent oestradiol (E2Eq). En accord avec les mesures publiées, la valeur moyenne effective (CE50) pour l'E2 était d'environ 100 pM (Routledge and Sumpter, 1996, 1997; Beresford et al. 2000; Rajapakse et al. 2002; Silva et al. 2002; Peck et al. 2004).. L'oestrogénicité totale de chaque échantillon a alors été rapportée par unité de volume d'échantillon.

Quantification de la vitellogénine plasmatique

La quantification des concentrations de vitellogénine plasmatique a été réalisée en utilisant un protocole immunochimique (ELISA) validé dans le cadre du programme d'assurance-qualité BEQUALM (avec obtention d'un « statement of performance » pour le laboratoire, Bequalm, 2005). Les échantillons ont été fixés sur les parois des puits de microplaques puis incubés dans une solution contenant un anticorps polyclonal anti-vitellogénine (Biosense) pendant une heure à 37°C. Après lavage, les anticorps liés à la vitellogénine ont été révélés par incubation dans une solution contenant des anticorps anti-lapin couplés à la peroxydase puis dans une solution contenant du o-phenyl-enediamine (OPD). Le développement de couleur jaune a alors été mesuré par spectrophotométrie à 490 nm.

Analyse histologique

Des échantillons de gonade ont été déshydratés par des bains successifs d'alcool puis imprégnés de paraffine (56C Shandon). Les tissus ont alors été inclus dans la paraffine puis sectionnés à 5 μ m. Les sections ont été fixées sur lames histologiques puis déshydratées, colorées par un mélange éosine/hématoxiline et montées avec de l'Histomount. Les stades gamétogénétiques des flets ont été déterminés après observation microscopique.

4.3 Résultats

Développement gonadique et gamétogénèse

La croissance des gonades et la gamétogénèse sont deux composantes d'un phénomène cyclique annuel qui permet, finalement, la génération de gamètes par les géniteurs. Bien que régulés de façon différente, chacun est important pour le succès reproducteur des individus. Ces deux phénomènes ont été étudiés dans le cadre de l'étude. L'indice gonado-somatique (IGS) traduit l'importance du développement gonadique et la part allouée pour la

reproduction lors du développement du poisson. Les résultats, exposés dans la figure 5 montrent les variations de l'IGS observées selon les sites de résidence des flets. En hiver, les valeurs de cet indice sont comprises entre 0,8 et 2% pour plus de 80% des mâles quelque soit l'estuaire considéré. Aucune différence significative n'est donc détectée entre les IGS moyens obtenus sur les mâles des différents estuaires lors de la maturité sexuelle en janvier. A l'inverse, les données montrent que les femelles de l'estuaire de la vilaine ont des ovaires particulièrement développées en février, représentant, en moyenne, 40% du poids corporel. Plusieurs individus ont des ovaires dont le poids est majoritairement composé par cet organe (jusqu'à 59%). En estuaire de Loire et de Gironde, les flets femelles ont des IGS compris entre 20 et 25 % tandis qu'ils ne sont que de 12,4% en estuaire du Ster.

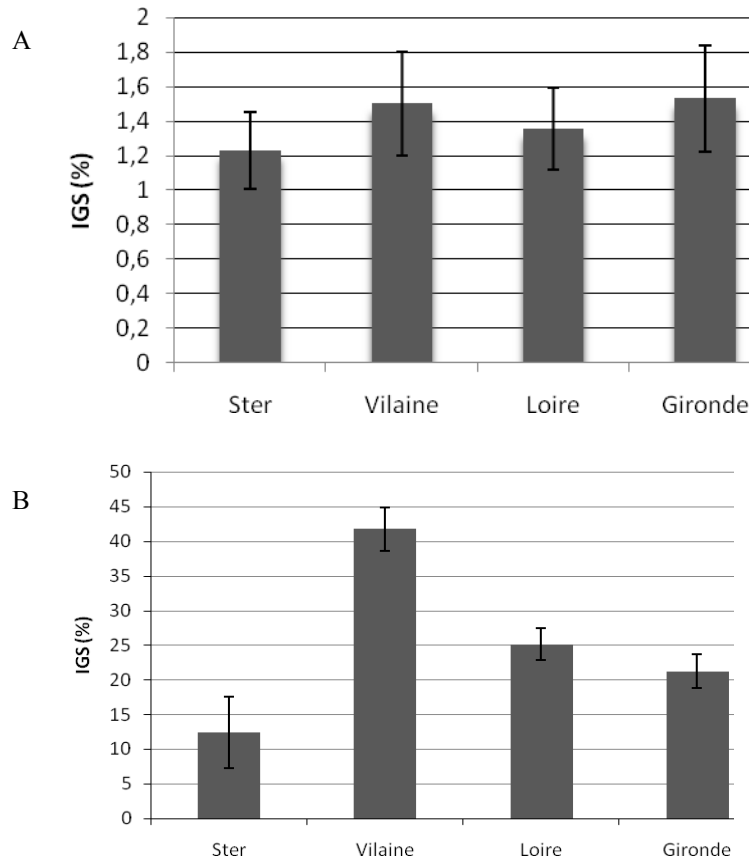


Figure 5 : Indices gonado-somatiques (exprimé en % du poids corporel) lors de la maturité sexuelle en janvier des flets mâles (A) et femelles (B) de différents estuaires de la façade atlantique en janvier. Les bares représentent les intervalles de confiance à 95%.

L'analyse histologique des gonades a permis d'observer les différents stades de la gamétogénèse des flets prélevés. Conformément aux données acquises par ailleurs (Landriau, 2003), les mâles sont matures en février et présentent l'ensemble de leurs cystes remplis de spermatozoïdes à cette période. Seuls quelques individus ont déjà, partiellement, émis leur sperme. Aucune différence manifeste ne peut donc être visualisée concernant les flets mâles des différents estuaires. Les femelles prélevées à la même période présentent, aussi, très majoritairement des gonades matures remplis d'ovocytes secondaires. Cependant, près de la moitié des individus du Ster ne présentent que des ovocytes primaires et n'ont pas, à l'évidence, engagé de cycle gamétogénétique au cours de l'année écoulée. Ces individus correspondent à de jeunes individus dans leur seconde année. Ce sont donc des poissons immatures ne s'étant encore jamais reproduit. Les femelles de la Vilaine sont plus matures que les flets des autres estuaires car elles présentent majoritairement des ovocytes hydratés,

alors que ceux-ci sont rares dans les ovaires des poissons de la Loire ou de la Gironde. En conséquence, les indices de maturité sexuelle des flets femelles de la Vilaine prélevées en février sont significativement supérieures aux autres (Figure 6).

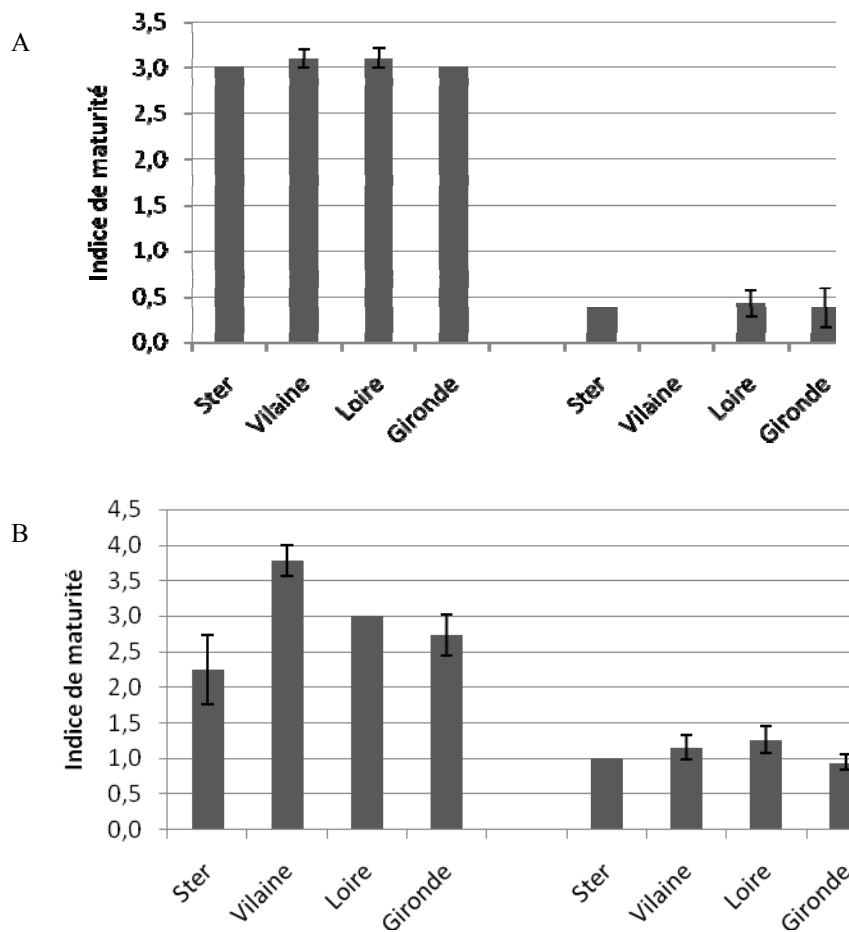


Figure 6 : Indices de maturité sexuelle des flets mâles (A) et femelles (B) de différents estuaires de la façade atlantique en janvier et juin. Les barres représentent les intervalles de confiance à 95%.

En juin, un nouveau cycle de reproduction s'engage. Chez les mâles, seuls des spermatogonies sont présentes avec, parfois, du sperme résiduel pour l'ensemble des flets des différents estuaires. Les flets de l'estuaire de la Vilaine semblent moins précoces que les poissons des autres estuaires car les coupes histologiques ne révèlent que très peu de spermatogonies dans des tissus essentiellement conjonctifs. Chez les femelles, les ovaires contiennent très majoritairement des ovocytes primaires au stade périnucléolaire. Cependant, certains individus de la Loire et de la Vilaine sont plus précoces et comportent déjà des ovocytes avec inclusions péricytoplasmiques.

Taux de vitellogénine plasmatique

La vitellogénine est une protéine synthétisée par le foie et qui est émise dans le sang afin de s'accumuler dans les ovocytes. Elle est ainsi principalement synthétisée, après stimulation par le 17- β œstradiol, lors de la maturation des ovocytes secondaires. Les taux de vitellogénine dosés chez les femelles (figure 7) traduisent donc les niveaux de maturité des ovaires lors des deux périodes d'échantillonnage. En accord avec les observations histologiques, les taux sont faibles chez les femelles en été. Inversement, elles sont fortes à l'approche de la maturité. Les

flets femelles du Ster, dont beaucoup sont immatures en hiver, ont des taux moyens faibles : seuls les poissons matures ont des taux significatif et comparables aux concentrations observées pour les autres estuaires. Cependant, les flets femelles prélevés en hiver en estuaire de Vilaine présentent des taux de vitellogénine plasmatique les plus élevés.

La présence de vitellogénine chez les poissons mâles est indicatrice de perturbations de la signalisation hormonale par des composés œstrogéniques. Des taux très faibles sont observés en estuaire du Ster (de l'ordre de 1 µg/mL quelque soit la saison), tandis que des valeurs très supérieures (6 à 23 fois selon les échantillons) ont été mesurées dans le plasma des flets mâles des autres estuaires. Les taux les plus élevés ont été observés chez des individus de l'estuaire de la Loire en hiver (jusqu'à 125 µg/mL chez un individu). En été, des concentrations significativement plus élevés ont été mesurés en estuaire de la Vilaine par rapport aux autres estuaires (15 µg/mL en moyenne).

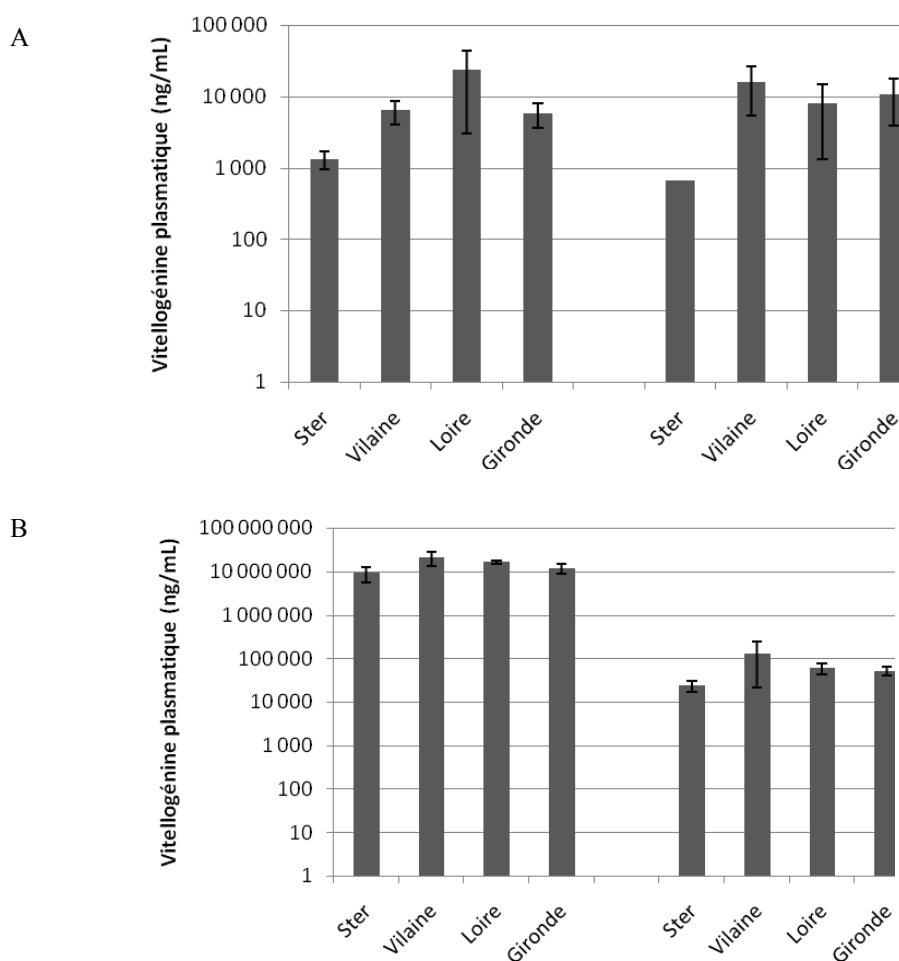


Figure 7 : Concentrations plasmatiques en vitellogénine des flets mâles (A) et femelles (B) de différents estuaires de la façade atlantique en janvier et juin. Les barres représentent les intervalles de confiance à 95%.



Excrétion de composés œstrogéniques dans la bile

La présence de composés susceptibles d'interagir avec le récepteur humain à l'œstradiol et d'induire une transcription via l'élément de réponse aux estrogènes (ERE) a été mesurée à l'aide du test YES. Les résultats concernant les biles de flets prélevés dans quatre estuaires en janvier et juin 2005 sont présentés dans la figure 8. Ils indiquent que ces composés sont

largement présents chez les individus femelles. L'identification des composés actifs (sur les quelques individus analysés) révèle que ces composés sont essentiellement des estrogènes naturels (Figure 9). En effet, les fractions actives correspondent à l'estrone et l'œstradiol. Une assez grande dispersion des résultats peut être remarquée chez les différents individus. Celle-ci est le reflet de l'état de maturité sexuelle des femelles. Tout comme pour la vitellogénine, les niveaux sont les plus faibles chez les flets de l'estuaire du Ster tandis qu'ils sont les plus élevés chez les flets de la Vilaine et tout particulièrement chez les femelles dont les ovaires contiennent beaucoup d'ovocytes secondaires hydratés.

L'activité mesurée dans les bile des individus mâles est généralement extrêmement faible, de l'ordre de 0,02 à 0,1 ng E2Eq/mL (figure 8). Ces niveaux sont caractéristiques du sexe mâle chez ces poissons. Cependant, les activités estrogéniques de la bile des flets prélevés en estuaires de Vilaine, Loire et Gironde sont significativement supérieures à celles mesurées au niveau du Ster. La Vilaine se distingue par la concentration moyenne la plus forte en hiver et les individus dont les valeurs sont les plus fortes en été (jusqu'à 0,2 ng E2Eq/mL).

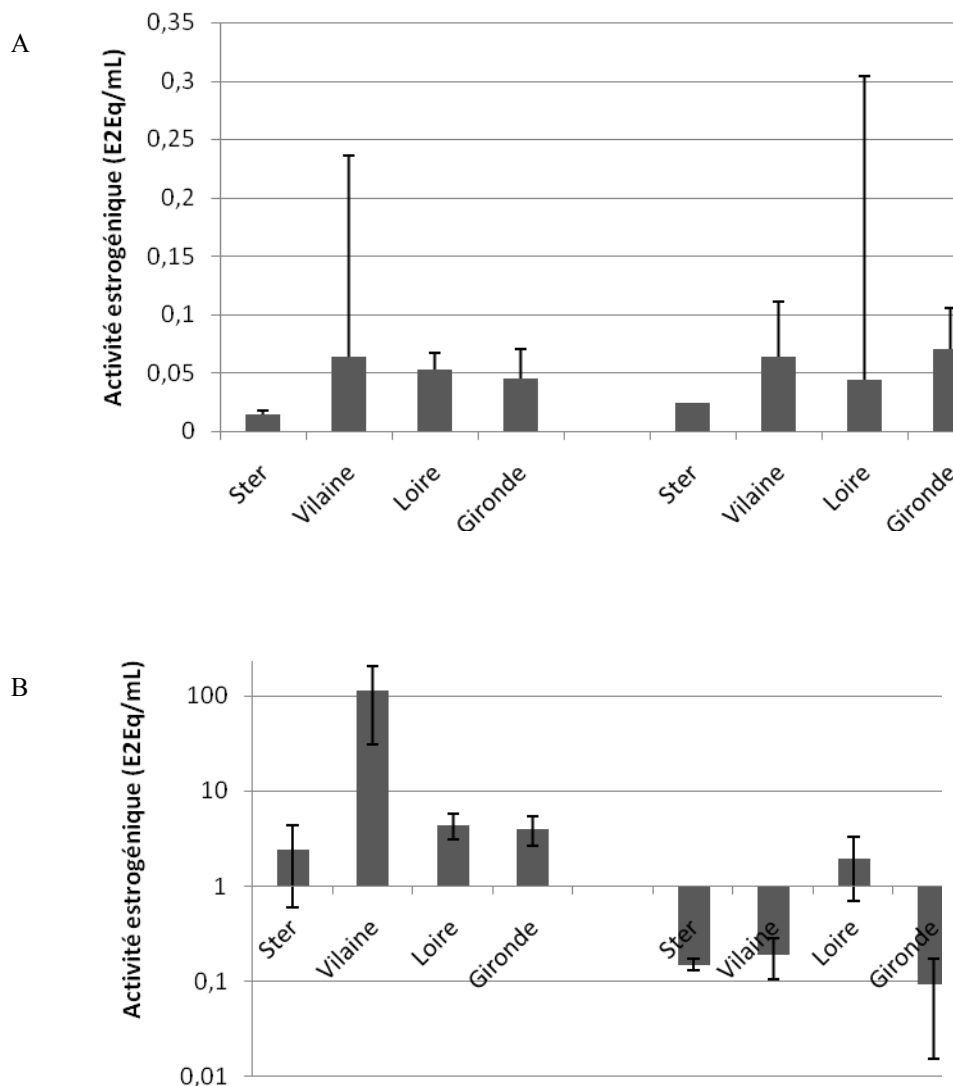


Figure 8 : Concentrations en composés œstrogéniques excrétés dans la bile des flets mâles (A) et femelles (B) de différents estuaires de la façade atlantique en janvier et juin. Les barres représentent les intervalles de confiance à 95%.

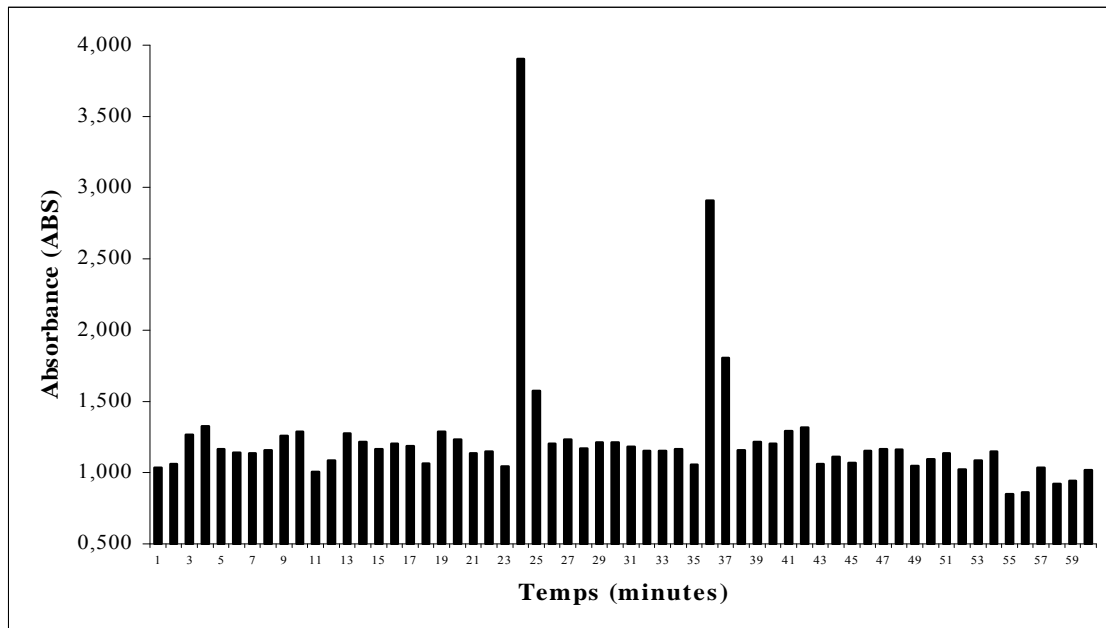


Figure 9 : Profil d'activité oestrogénique d'un échantillon de bile de flet femelle prélevé en estuaire de Loire, saponifié puis fractionné par HPLC en phase inverse. Les deux pics indiquent la présence de composés actifs, vraisemblablement l'œstradiol et l'estrone, respectivement.

4.4 Conclusions

Cette étude avait pour but d'étudier différents paramètres indicateurs du déroulement du cycle de reproduction des flets de différents estuaires. Elle combine différents indicateurs biochimiques, cytologiques et biométriques afin de pouvoir apprécier quelques aspects des processus annuels ainsi que leur combinaison et donc leurs interactions mutuelles.

D'une façon très générale, les résultats indiquent que la reproduction des flets des différents estuaires étudiés est peu perturbée. Aucun poisson intersexué n'a été observé. De même, très peu d'atrésies, de nécroses ou de foyers inflammatoires étaient présents dans les coupes histologiques. La gamétogénèse semble donc se dérouler normalement et permettre une reproduction des poissons dans les différents estuaires.

Cependant, une perturbation des systèmes de signalisation hormonale est présente dans les estuaires de la Vilaine, de la Loire et de la Gironde. Celle-ci est attestée par la mesure de concentrations élevées de vitellogénine dans le plasma des flets mâles échantillonnés. Cette protéine est en effet indicatrice de la présence de xéno-œstrogènes perturbant le système hormonal mâle (Sumpter et al., 1995). Les concentrations mesurées sont comprises entre 5000 et 20 000 ng/mL dans les estuaires de la Vilaine, de la Loire et de la Gironde alors qu'elle n'est, en moyenne, que de l'ordre de 1000 ng/mL dans le plasma des flets du Ster. Les valeurs des trois estuaires importants de la façade atlantiques sont comparables à ceux du port d'Amsterdam (Vathaak, 2002) ou de la Tamise (Matthiessen et al., 1998, Allen et al., 1999) bien qu'inférieurs à ceux de la Seine (Gallien-Landriau, 2003).

L'un des faits remarquables de cette étude est la singularité du site de la Vilaine et des flets étudiés par rapports à leurs congénères des autres estuaires. Bien que le niveau moyen de vitellogénine mesuré chez les mâles ne soit pas significativement différent de celui des flets des autres sites, elle est malgré tout supérieure aux autres en été. De plus, des concentrations 10 fois plus fortes que pour les autres estuaires ont été mesurées dans le plasma des femelles de la Vilaine en juin. Cette saison correspond à des niveaux endogènes d'œstradiol très faibles et n'est pas associée avec une vitellogénèse active qui n'intervient, normalement, qu'en fin de cycle. Ainsi, une contamination par des xéno-œstrogènes est manifeste chez les flets de l'estuaire de la Vilaine, et ceci à un moment particulièrement important puisqu'il correspond au début du cycle reproducteur. En relation avec ces contaminations, un retard de développement des gonades mâles a été constaté à cette époque. L'observation histologique des gonades révèle des tissus essentiellement conjonctifs et très peu de spermatogonies. Inversement, une précocité marquée de la maturation des ovaires en été, et en hiver, a été observée chez les flets de la Vilaine. Cette maturation va à l'encontre du gradient sud-nord associé à la température des eaux susceptible de permettre une maturation plus précoce au sud. Enfin, la masse très importante des gonades observée chez les femelles de l'estuaire de Vilaine semble inhabituelle et très supérieure aux indices rapportés dans différentes études (Allen et al., 1999 ; Gallien-Landriau, 2003 ; Marchand et al., 2004). Bien que ces valeurs élevées peuvent être le reflet d'une population d'âge et de taille supérieures aux autres échantillons, elle pourrait aussi traduire une dérégulation du développement.

4.5 Références bibliographiques

- Allen, Y., A.P. Scott, P. Matthiessen, S. Haworth, J.E. Thain and S. Feist. 1999. Survey of estrogenic activity in United Kingdom estuarine and coastal waters and its effects on gonadal development of the flounder *Platichthys flesus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 1790–1800.
- COLBORN T., VOM SAAL F.A. & SOTO A.M. (1993). DEVELOPMENTAL EFFECTS OF ENDOCRINE-DISRUPTING CHEMICALS IN WILDLIFE AND HUMANS. *ENVIRON HEALTH PERSPECT.* 101 : 378-384.
- Gallien-Landriau I. 2003. Etude de l'altération fonctionnelle du système reproducteur par les perturbateurs endocriniens. Caractérisation des effets, identification des xéno-estrogènes impliqués et conséquences sur les populations de poissons en estuaire et Baie de Seine. PhD thesis, university of Le Havre. Le Havre, France, 151 pp.
- Kleinkauf, A., A. P. Scott, C. Stewart, M.G. Simpson and R.T. Leah. 2004. Abnormally elevated VTG concentrations in flounder (*Platichthys flesus*) from the Mersey Estuary (UK) - a continuing problem. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 58: 356–364.
- Marchand J., L. Quiniou, R. Riso, M.-T. Thebaut and J. Laroche 2004. Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aquatic Toxicol* 70: 327–343.
- Minier, C., F. Levy, D. Rabel, G. Bocquene, D. Godefroy, T. Burgeot, and F. Le Boulenger. 2000. Flounder health status in the Seine Bay. A multibiomarker study. *Mar. Environ. Res.* 50: 373-377.

- Minier, C., Amara R. 2008. From pollution to altered fish physiological performance; the case of flatfish in the Seine estuary. In Amiard-Triquet *A comprehensive methodology for the assessment of the health status of estuarine ecosystems*. Taylor and Francis. Sous presse.
- ROUTLEDGE, E.J., AND SUMPTER, J.P. (1996). ESTROGENIC ACTIVITY OF SURFACTANTS AND SOME OF THEIR DEGRADATION PRODUCTS ASSESSED USING A RECOMBINANT YEAST SCREEN. *ENVIRON. TOXICOL. CHEM.* 15, 241-248.
- TOPPARI J., LARSEN J.C., CHRISTIANSEN P, GIWERCMAN A, GRANDJEAN P, *ET AL.* (1996). MALE REPRODUCTION HEALTH AND ENVIRONMENTAL XENOESTROGENS. *ENVIRON. HEALTH PERSPECT.* 104 : 741-803.
- Tyler, C.R., Jobling, S. and Sumpter, J.P. 1998. Endocrine disruption in wildlife : a critical review of the evidence. *Critical Review of Toxicology.* 28:319-361.
- Vethaak, A.D., J. Lahr, S.M. Schrap, A.C. Belfroid, G.B.J. Rijs, A. Gerritsen, J. de Boer, A.S. Bulder, G.C.M. Grinwis, R.V. Kuiper, J. Legler, T.A.J. Murk, W. Peijnenburg, H.J.M. Verhaar and P. de Voogt. 2005. An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere.* 59: 511–524.

V Vision intégrée sur les charges en contaminants et sur les réponses physiologiques du flet dans les différents estuaires

Approche développée par le LEMAR
Responsable scientifique : Jean Laroche (Pr)

5.1 Rappels sur l'ensemble des variables de l'analyse et méthodologie

Notre objectif est ici de développer une vision intégrée des signaux détectés sur le flet (niveaux de contamination chimique, réponses physiologiques, variabilité génétique) sur l'ensemble des systèmes estuariens analysés (Vilaine, Ster, Loire, Gironde), pour dégager les principales tendances de la réponse de ce poisson plat vis à vis de la contamination chimique sur le Golfe de Gascogne. Nous avons ainsi calculé, pour les différentes variables quantitatives mesurées sur les poissons, les moyennes par estuaire, par sexe et par saison.

Nous allons tout d'abord préciser à nouveau la nature de l'ensemble des variables mise en jeux :

Charges en contaminants

- les contaminants organiques dosés dans le muscle (m) et dans le foie (f) des poissons sont de différentes natures :

les HAP potentiellement métabolisables par le poisson, la molécule la plus commune étant le pyrène qui peut se métaboliser en 1-hydroxy-pyrène;

les PCB et PBDE composés peu métabolisables, bioaccumulables au sein des organismes.

- les contaminants métalliques ont été dosés dans le foie des poissons : cadmium (Cd), plomb (Pb) et cuivre (Cu).

Réponses physiologiques, dommages cellulaires, neurotoxicité et variabilité génétique

- le taux de croissance (**TC**) des poissons entre leur premier et deuxième hiver et leur **âge** ont été estimés par l'analyse des otolithes (concrétions calcifiées au niveau de la tête présentant des anneaux de croissance liés aux saisons).
- l'indice de condition (**K**) est un rapport (poids du poisson / (longueur totale)³) qui reflète un état d'embonpoint de l'individu et notamment son aptitude à maintenir des réserves.
- les dommages cellulaires ont été quantifiés au niveau des cellules sanguines, par l'évaluation de la génotoxicité, en quantifiant (1) les dommages primaires à l'ADN (quantité de cassures à l'ADN estimée par le **test comète**) et (2) les dommages chromosomiques évalués par un coefficient de variation de la quantité d'ADN détectée dans les cellules (**CV**).
- les effets possibles de perturbations endocriniennes induites par les xénobiotiques ont été mesurés par le dosage dans le plasma de la **vitellogénine** (élément essentiel de la maturation des ovaires qui est donc fortement présent chez les femelles en période de reproduction, des concentrations anormalement fortes pour les femelles en période de repos sexuel peuvent être des indicateurs de perturbations endocriniennes; la présence de vitellogénine chez les mâles traduit une perturbation endocrinienne) et aussi par le test **YES** (permettant de quantifier dans la bile des composés oestrogéniques).
- l'acétylcholinestérase (**AchE**) est une activité enzymatique mesurée sur le muscle, considérée comme un biomarqueur de neurotoxicité très sensible; l'inhibition de l'AchE est étudiée comme un indicateur d'exposition aux pesticides, voire aux métaux et aux hydrocarbures.
- l'hétérozygotie individuelle (**H**) est une mesure de la diversité génétique estimée par poisson; elle a été calculée ici en considérant ici 6 marqueurs génétiques de type allozyme (MPI, PGM, PGI, IDH, AAT1, AAT2). Notons que parmi ces gènes, quatre systèmes enzymatiques participent activement à la production d'énergie au niveau de la cellule (métabolisme basal, pré-glycolyse et glycolyse, cycle de krebs) : la phosphoglucomutase (PGM), la glucose phosphate isomérase (PGI), la mannose phosphate isomérase (MPI), l'isocitrate déshydrogénase (IDH).

Réponses moléculaires : expression de gènes

Nous avons recherché ici dans les estuaires contaminés relativement au milieu de référence, de possibles expressions différentielles (activation ou inhibition) de différents gènes, au niveau du foie de poisson :

- Cytochrome P450 1A (Cyt P450),
- Cytochrome c oxidase sous-unité II (Cyt C oxidase)
- ATP synthase Fo sous-unité 6 (ATPase)
- Ferritine
- BHMT (bétaine homocystéine méthyltransférase).

Le **Cyt P450 1A** est classiquement impliqué dans la biotransformation des polluants en composés hydrosolubles, afin de faciliter leur excrétion par l'organisme ; cette réaction enzymatique peut conduire à une activation des molécules, i.e. à une augmentation de la toxicité des molécules résultantes relativement à celle des molécules mères ; ce phénomène étant particulièrement évoqué lors de la métabolisation notamment de certains PAH.

La Cyt C oxydase (**Cyt C**) et l'ATP synthase (ou **ATPase**) sont impliquées dans la production d'énergie au niveau cellulaire.

La **ferritine** est une protéine majeure de la séquestration et de la régulation de l'homéostasie du fer dans la cellule. Cette protéine pourrait jouer un rôle clé dans la protection des cellules vis à vis du stress oxydant et de l'hypoxie.

La **BHMT** joue un rôle important dans le métabolisme des acides aminés et pourrait potentiellement agir comme un enzyme de détoxification vis à vis de certains pesticides.

Une analyse en composantes principales (ACP) a été menée sur ce jeux de données quantitatives pour dégager les grandes tendances dans les relations entre les différents paramètres chimiques et physiologiques et génétiques; la représentation graphique sera menée en deux temps, dans les plans des axes factoriels (axe 1 – axe 2, puis axe 2 – axe 3) qui extraient l'essentiel de la variance de la matrice de données.

5.2 Résultats

Nous avons retenu dans l'ACP, les trois premiers axes factoriels qui extraient respectivement: 34,9%, 17,5% et 14,2% de la variance de la matrice de données, soit au total 66,6% de la variance. Le cercle de corrélation présente la distribution des variables sur le plan factoriel 1-2; on observe sur la partie gauche du diagramme (Fig. 10) les plus fortes concentrations en polluants organiques détectées dans le foie (PCB f, PBDE f), dans le muscle (PCB m, PBDE m, HAP m, Pyr m) et en contaminants métalliques dans le foie (Pb, Cu), corrélées avec la variable âge; la partie droite du diagramme est quant à elle essentiellement caractérisée par des valeurs fortes d'expression de gènes impliqués dans la production d'énergie (Cyt C et ATPase) et par un taux de croissance fort entre le premier et le deuxième hiver (TC) et un indice de condition fort (K). On remarque dans la partie haute du diagramme, des contaminations soutenues en polluants organiques (HAP f, Pyr f) et en Cu dans le foie, des activités oetrogéniques fortes dans la bile (YES), une hétérozygotie multilocus H (marqueurs allozymes) forte, en opposition avec la partie basse du diagramme principalement caractérisée par des contaminations fortes en PCB et en cadmium (Cd) dans le foie.

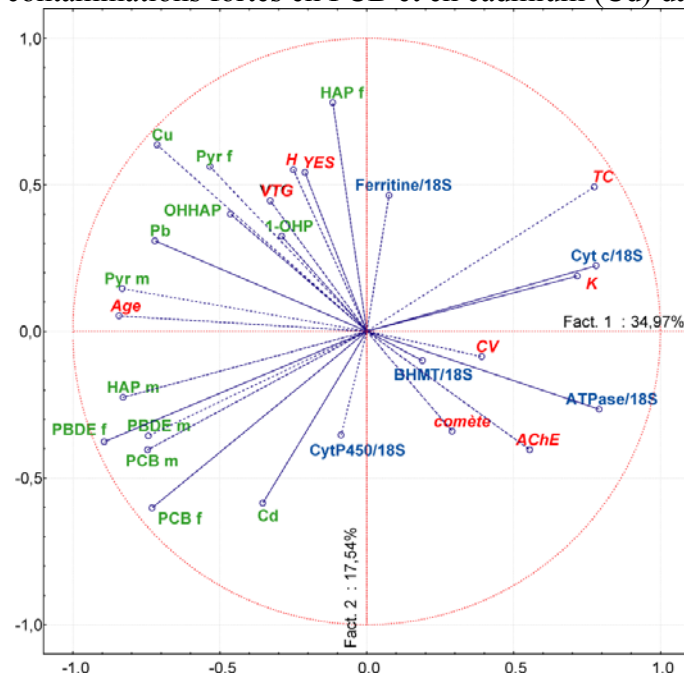


Figure 10 : Niveaux de contamination dans les chairs, réponses physiologiques et variabilité génétique du flet (ACP: cercle des corrélations, plan factoriel 1-2).

Contaminants: HAP, Pyr (pyrène), 1-OHP (1-hydroxy-pyrène), OH HAP (métabolites des HAP), dans le foie (f) ou dans le muscle (m) + métaux dans le foie (Cu, Cd, Pb).

TC (taux de croissance), comète (cassures de l'ADN), CV (dommages chromosomiques), AChE (acétylcholinestérase), k (indice de condition), VTG (vitellogénine dans le sérum), YES (activité oestrogénique dans la bile), expression de différents gènes relativement à un gène de ménage (Cyt C/18S, ATPase/18S, BHMT/18S; Cyt P450/18S; Ferritine/18S).

H: hétérozygotie multi-locus estimée sur les allozymes.

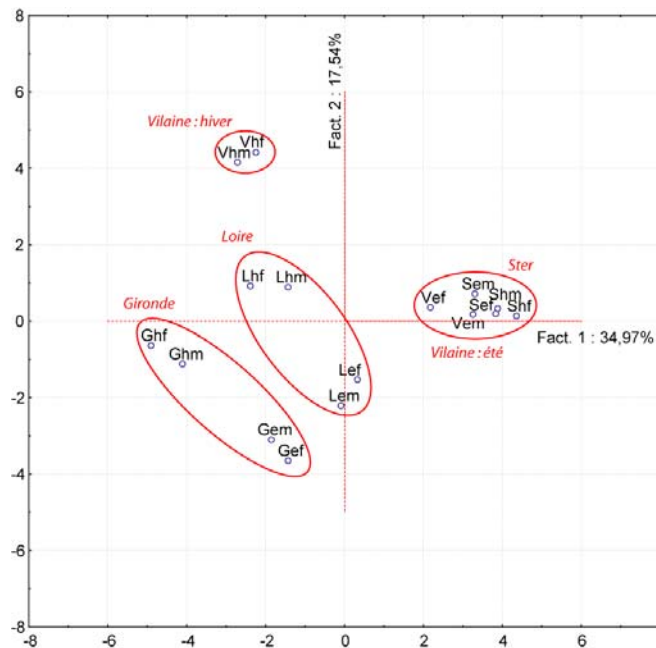


Figure 11: Distribution des populations échantillonnées (ACP: distribution des individus, plan factoriel 1-2).

S, V, L, G: abréviations pour Ster, Vilaine, Loire, Gironde.

h, e: abréviations pour hiver, été.

(Lhf: individus de Loire, prélevés en hiver, femelles)

La distribution des populations dans le plan factoriel 1-2 (Figure 11) met clairement en évidence un gradient de contamination croissante de la droite (Ster + Vilaine en été: poissons peu contaminés à croissance rapide, à indice de condition fort et à métabolisme énergétique actif) vers la gauche (Loire, Gironde, Vilaine en hiver: poissons moins performants). Globalement le gradient de contamination, de la droite vers la gauche, se traduit par une augmentation des niveaux de PCB, HAP et de métaux, particulièrement pour la Loire et la Gironde. Les poissons de Vilaine échantillonnés en hiver (partie haute du plan factoriel) présentent quant à eux une contamination plus spécifiquement orientée vers les HAP, une variabilité génétique plus forte et des signaux VTG et YES indiquant une possible perturbation endocrinienne.

Sur le cercle de corrélation présenté dans le plan factoriel 2-3 (Figure 12); on remarque dans la partie haute du diagramme, des valeurs fortes pour le niveau de dommage chromosomique (CV), pour l'expression du gène (Cyt C), associées à des teneurs élevées en PCB et PBDE dans le muscle, et en plomb dans le foie.

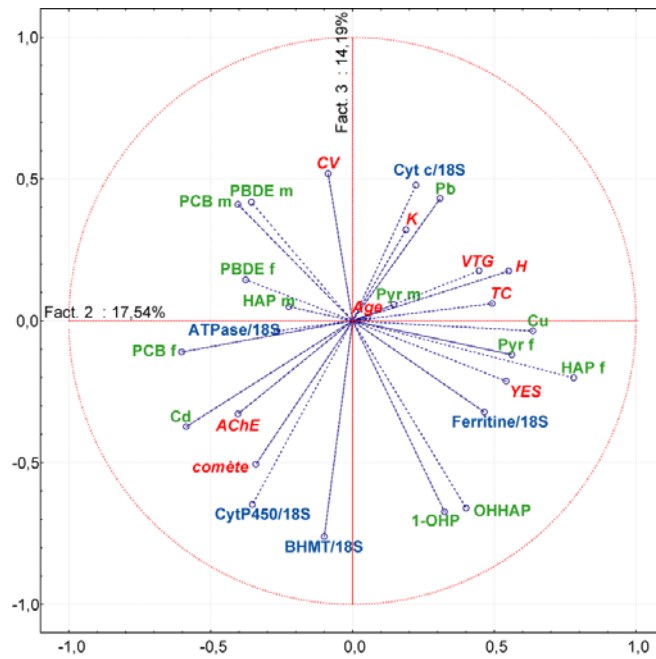


Figure 12 : Niveaux de contamination dans les chairs, réponses physiologiques et variabilité génétique du flet (ACP: cercle des corrélations, plan factoriel 2-3).

Contaminants: HAP, Pyr (pyrène), 1-OHP (1-hydroxy-pyrène), OH HAP (métabolites des HAP), dans le foie (f) ou dans le muscle (m) + métaux dans le foie (Cu, Cd, Pb).

TC (taux de croissance), comète (cassures de l'ADN), CV (dommages chromosomiques), AChE (acétylcholinestérase), k (indice de condition), VTG (vitellogénine dans le sérum), YES (activité oestrogénique dans la bile), expression de différents gènes relativement à un gène de ménage (Cyt C/18S, ATPase/18S, BHMT/18S; Cyt P450/18S; Ferritine/18S).

H: hétérozygotie multi-locus estimée sur les allozymes.

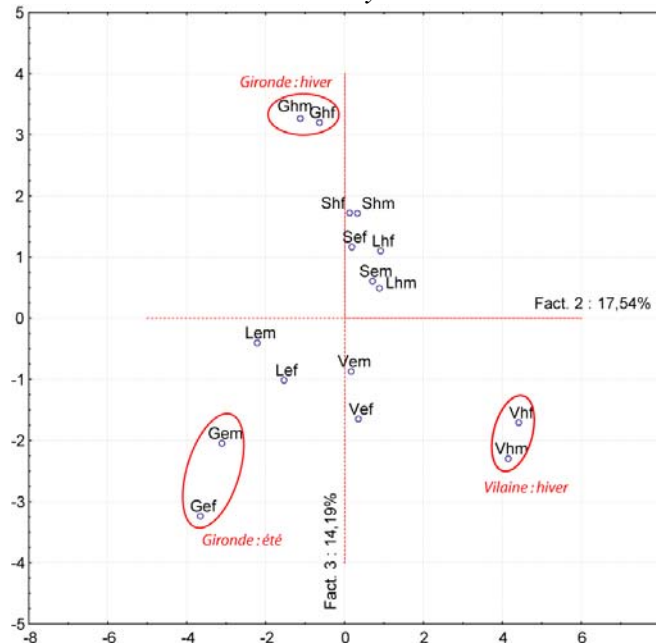


Figure 13: Distribution des populations échantillonnées (ACP: distribution des individus, plan factoriel 2-3).

S, V, L, G: abréviations pour Ster, Vilaine, Loire, Gironde.

h, e: abréviations pour hiver, été.

(Lhf: individus de Loire, prélevés en hiver, femelles)

On observe par contre, en opposition dans la partie basse du diagramme (Fig. 12), des valeurs élevées pour les cassures de l'ADN (test comète), l'expression des gènes Cyt P450 et BHMT et les niveaux de métabolites des HAP.

La distribution des individus dans le plan factoriel 2-3 (Figure 13) met en évidence sur l'axe 3, l'opposition entre les prélèvements de Gironde en hiver (position haute sur le diagramme) relativement aux prélèvements de Gironde en été et Vilaine en hiver (position basse sur le diagramme) soit en fait un gradient de contamination croissante en HAP du haut vers le bas, Nous formulons ici l'hypothèse que l'exposition à des niveaux accrus de PAH puisse alors se traduire en une augmentation de la capacité de biotransformation de ces molécules, notamment par une activation du système P450; les métabolites des HAP pouvant entraîner des effets génotoxiques, particulièrement au niveau de dommages primaires à l'ADN (i.e des cassures de l'ADN estimées par le test comète).

5.3 Conclusions

L'analyse des tendances moyennes de la charge en contaminants et des réponses physiologiques quantitatives du flet décrites par ACP (par estuaire, par saison et par sexe) nous a permis de décrire globalement les grandes tendances observées dans les différents systèmes estuariens du Golfe de Gascogne, plus ou moins contaminés par les polluants.

Il en ressort que les niveaux faibles des contaminants détectés dans les flets du Ster, considéré dans cette étude comme à priori un estuaire « de référence », ainsi que les réponses physiologiques différentielles des poissons de ce système relativement aux estuaires plus contaminés, valident donc le choix de notre système témoin.

On observe dans les milieux estuariens contaminés une variation saisonnière qui peut être importante dans les charges en contaminants estimées dans les chairs, particulièrement au niveau de la Gironde et de la Vilaine; ces variations pouvant être liées (1) à une biodisponibilité variable des polluants en liaison avec des facteurs saisonniers, et/ou (2) aux modulations de l'activité métabolique de l'animal liées à la saison, à son statut physiologique (mature, immature); ces deux points pouvant modifier les capacités de métabolisation de certaines molécules comme les HAP, voire de bioaccumulation des contaminants persistants comme les PCB.

On remarque dans cette étude qu'un début de lien a été appréhendé entre l'exposition des flets aux HAP (estimée par le niveau des métabolites des HAP dosés dans la bile), l'activité de biotransformation mesurée par l'expression du gène Cyt P450 et la génotoxicité exprimée par le test Comète; la recherche de tels couplages est d'un intérêt majeur en écotoxicologie (Lehtonen et al, 2006; WGBEC, 2006). Notons que les deux travaux précédents suggèrent également d'intégrer la pathologie du foie des poissons, comme biomarqueur pertinent pour explorer la pathogénicité de différentes molécules toxiques. Précisons que notre travail sur le flet, a conduit aussi à identifier des lésions inflammatoires chroniques et sévères chez de nombreux flets, d'origine infectieuse ou toxique, dans l'estuaire de la Gironde en été, et un fort taux de lésions hépatiques pré-tumorales, en Vilaine essentiellement en hiver; ces deux estuaires étant par ailleurs potentiellement impactés au moins de manière saisonnière, par les HAP. De nouveaux développements sont donc à mener pour compléter les recherches de liens entre charges en contaminants, réponses physiologiques et pathogénicité chez le flet; des explorations complémentaires seront menées dans cette direction au chapitre suivant.

5.4 Bibliographie

Lehtonen KK, Schiedek D, Köler A, Laing T, Vuorinen PJ, Förlin L, Barsiené J, Pempkowiak J, Gerken J (2006). The BEEP project in the Baltic Sea : Overview of results and outline for a regional biological effects monitoring strategy. *Marine Pollution Bulletin* 53 : 508-522.

WGBEC (Working group on biological effects of contaminants) (2006). ICES Marine habitat committee, ICES CM 2006/MHC: 04, Copenhagen. <http://www.ices.dk>

VI Recherches de couplages au sein de chaque estuaire entre phénotypes et génotypes: variabilité inter-individuelle dans les réponses du flet

Approche développée par le LEMAR
Responsable scientifique : Jean Laroche (Pr)

6.1 Variables de l'analyse & méthodologies

Les réponses des poissons ont ici analysées individuellement au sein de chaque population, en recherchant par des analyses multivariées des liaisons possibles entre : (1) les différents paramètres quantitatifs étudiés précédemment (phénotypes : charges en contaminants, réponses physiologiques, ..), et (2) la variabilité génétique associée à chaque individu (génotypes : caractérisation d'un individu par la nature des deux allèles observés pour un gène donné).

Des couplages de type phénotypes-génotypes ont été menés dans le passé sur des populations de flets de la façade atlantique française ; ils ont permis de détecter de possibles résistances différentielles à la contamination chimique, associées à certains génotypes pour différents locus de type allozyme et de type ADN (Marchand et al, 2003, 2004 ; Marchand, 2006). Nous avons donc typé génétiquement chaque poisson prélevé et mené ainsi des couplages phénotypes-génotypes par estuaire et par saison.

Nous avons étudié ici la variabilité de différents gènes :

- des gènes impliqués dans le métabolisme général et la production d'énergie au niveau cellulaire : la phosphoglucomutase (PGM), la glucose phosphate isomérase (PGI), la mannose phosphate isomérase (MPI), l'isocitrate déshydrogénase (IDH).
- d'autres gènes ont aussi été retenus : la *bétaine homocystéine méthyltransférase* (BHMT), la *prostaglandine D synthase* (PGDS), et p53, à partir de travaux précédents sur le flet (Marchand, 2006 ; Cachot et al, 2000) ; les deux premiers gènes étant impliqués directement ou indirectement dans la détoxification; p53 étant impliqué dans les processus de contrôle de la prolifération cellulaire et dans le maintien de l'intégrité du génome.

Nous avons aussi pris en compte dans ce jeux de données des informations sur la pathologie du foie ; en effet sur chaque poisson analysé, un diagnostic a été réalisé à partir de

coupes histologiques pour déterminer l'éventuelle présence d'une inflammation hépatopancréatique, de lésion de type pré-tumorales (FCA : foyers de cellules altérées) ou tumorales.

6.2 Résumé des résultats et discussion

La recherche de couplages génotypes-phénotypes sur le flet nous a permis de réaliser une première exploration sur les liens possibles entre les charges en contaminants, les réponses physiologiques au niveau moléculaire comme au niveau de l'organisme, et enfin les dommages liés à la génotoxicité et à la pathogénicité.

L'approche multi-estuaire se révèle riche en informations car elle nous permet de comparer les réponses des génotypes dans des environnements contrastés, allant d'un système modérément contaminé : le Ster, vers des systèmes à contaminations complexes : Vilaine, Loire et Gironde ; les deux derniers estuaires pouvant présenter, selon la saison, des niveaux importants de contamination métallique et organique dans les poissons.

Le troisième élément fondamental de notre approche est la comparaison des réponses des organismes à deux saisons contrastées, en période de ponte hivernale, et en période de repos sexuel en été ; le statut physiologique de l'animal est ainsi pris en compte (son état de maturation sexuelle, son activité métabolique liée à la saison,...), ainsi que la biodisponibilité des contaminants de l'environnement qui peut être très variable selon les saisons.

Dans cette approche génotypes-phénotypes, nous avons mis en évidence l'importance de la variabilité génétique interindividuelle pour mieux comprendre les réponses différentielles d'organismes appartenant à une même population exposée à un stress chimique chronique.

Des résultats pertinents ont été obtenus pour trois gènes, PGM (production d'énergie au niveau cellulaire), p53 (régulation de la division cellulaire), BHMT (métabolisme général et rôle potentiel dans la biotransformation des xénobiotiques).

Ces couplages génotypes-phénotypes ont permis de dégager :

- **des capacités différentielles des certains génotypes à maintenir l'intégrité de leur ADN (pour les gènes : PGM, BHMT, p53),**
- **des charges en contaminants contrastées selon les génotypes (pour les gènes : PGM, BHMT, p53),**
- **des susceptibilités différentielles manifestées par les génotypes vis à vis du développement de pathologies hépatiques, telles que des inflammations ou des lésions pré-tumorales et tumorales (principalement pour le gène p53).**

Lors de travaux antérieurs, nous avons émis des hypothèses sur de possibles pressions de sélections exercées par les cocktails polluants sur différents génotypes du flet (relativement à PGM, BHMT et p53), dans les estuaires contaminés de la façade atlantique française (Marchand et al, 2004, Marchand 2006) ; ces premiers couplages génotypes-phénotypes ayant surtout mis en évidence des capacités différentiels de certains génotypes à maintenir l'intégrité de leur ADN, en lien avec l'augmentation de fréquence de différents allèles dans les milieux contaminés. Notre nouvelle approche développée dans ce programme, en intégrant les outils génétiques, les charges en contaminants et d'autres biomarqueurs notamment de génotoxicité et de pathologie, renforce donc notre perception sur la variabilité interindividuelle dans la réponse au stress, sujet fondamental encore peu abordé dans le domaine de l'écotoxicologie (Marchand et al, 2008) ; les résultats pertinents obtenus par ces

couplages génotypes-phénotypes démontrent clairement le potentiel des outils de la génétique dans le cadre du monitoring de l'impact du stress chimique sur les milieux naturels.

6.3 Bibliographie

- Cachot J., Cherel Y., Galgani F. & Vincent F. 2000. Evidence of p53 mutation in an early stage of liver cancer in European flounder, *Platichthys flesus* (L.). *Mutation Research* 464: 279-287.
- Marchand J. (2006). Réponses moléculaires, individuelles et populationnelles du flet (*Platichthys flesus*) à la pollution chimique. Ph D thesis. Université de Bretagne Occidentale.
- Marchand J., Denis F., Laroche J. 2008. Modifications de la variabilité génétique et de l'expression des gènes.. In : Amiard J.C., Amiard-Triquet C. *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques*. Tec & Doc Lavoisier, Paris, 331-351.
- Marchand J., Quiniou L., Riso R., Thebaut M-T. & Laroche J. 2004. Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aquatic Toxicology* 70: 327-343.
- Marchand J., Tanguy A., Laroche J., Quiniou L. & Moraga D. 2003. Responses of European flounder *Platichthys flesus* populations to contamination in different estuaries along the Atlantic coast of France. *Marine Ecology Progress Series* 260: 273-284.

VII Implications pratiques

Ce projet multi-estuaire a fonctionné dans le cadre d'un groupement de recherche : GDR IMOPHYS (Intégration de réponses moléculaires et physiologiques aux contaminants chimiques en milieu côtier) qui a facilité les interactions entre six équipes de recherche :

- LEMAR (Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin) UMR CNRS 6539, Plouzané
- LPTC (Laboratoire de Physico- et Toxicochimie de l'Environnement) UMR CNRS 5255, Bordeaux
- LEMA (Laboratoire d'écotoxicologie des Milieux Aquatiques) UPRESS-EA 3222; IFRMP 23, Le Havre
- INRA-EFPA, LSE (Laboratoire des Sciences de l'Environnement, Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat), Vaulx en Velin
- IFREMER Laboratoire d'écotoxicologie, Nantes
- Unité d'Anatomie Pathologique, UMR 703 INRA/ENVN, Nantes.

Les objectifs de ce projet étaient clairement en adéquation avec l'orientation du GDR IMOPHYS ; ils visaient à explorer de manière intégrée les réponses des organismes et des populations au stress chimique en incluant :

- le transfert des contaminants vers les organismes
- les réponses au niveau moléculaire (expression de gènes candidats)
- la mesure de la génotoxicité et de la neurotoxicité

- les réponses au niveau des traits de vie (croissance, fécondité) et les perturbations endocriniennes
- l'analyse du possible rôle fonctionnel de la diversité génétique au sein des populations naturelles, par la recherche de couplages génotypes-phénotypes.

Cette démarche intégrée, de par la diversité des outils employés, est encore relativement rare en Ecotoxicologie au niveau national; elle a été pratiquée avec succès dans ce programme multi-estuaire sur le flet.

Au niveau national, la recherche sur les milieux estuariens a été très focalisée sur l'estuaire de la Seine ; système très étudié depuis plusieurs décennies et présentant des contaminations lourdes. Aussi, ce projet multi-estuaire permet d'étendre nos connaissances sur l'impact des contaminants sur des organismes marins, dans des estuaires encore relativement peu étudiés du Golfe de Gascogne (Vilaine, Loire, Gironde, Ster de Lesconil).

Le transfert des contaminants vers les organismes a été mené sur des pools d'organismes, mais aussi de manière individuelle sur le modèle poisson; la taille du flet permettant de mettre en œuvre sur le même individu une batterie de dosages sur les contaminants organiques et métalliques. Les analyses individuelles de HAP, PCB, PBDE et OCP menées sur 253 poissons ont permis de définir une typologie de la contamination de la façade atlantique française en termes de niveau moyen et de distribution (et ce pour les différents estuaires étudiés) en relation avec l'espèce étudiée (flet). Ces données de plus acquises de façon individuelle permettent de documenter la variabilité individuelle, ce qui permettra à terme d'établir non seulement une valeur de référence moyenne mais aussi une gamme de variation naturelle et de mieux mettre ainsi en évidence d'éventuelles contaminations (en tenant compte de cette variabilité). Ces données pourront être transmises à IFREMER de façon à rentrer dans des bases de données et servir à la communauté scientifique.

Cette approche sur le transfert des contaminants a permis aussi de valider la présence dans le Golfe de Gascogne d'un estuaire pouvant être considéré comme un système témoin (le Ster de Lesconil), présentant des niveaux de contamination faibles. Cette identification est particulièrement importante pour de futurs travaux en écotoxicologie dans la Golfe de Gascogne.

Les explorations des réponses moléculaires (expression de gènes) ont été menées, pour le flet, au niveau de différents gènes candidats testés dans des contextes environnementaux contrastés au niveau de la contamination chimique. Des expressions différentielles ont été observées pour certains gènes en liaison avec la nature et/ou l'intensité du stress ; ces gènes sont impliqués dans des fonctions variées (métabolisme énergétique, détoxification, protection-reconformation des protéines...) et pourront devenir dans un futur proche de nouveaux outils pour le monitoring de l'impact des contaminants sur les organismes estuariens. D'un point de vue plus fondamental, des explorations complémentaires sur le niveau d'expression de ces gènes dans les milieux naturels *versus* en contaminations expérimentales, permettront d'explorer de manière plus fine les réponses moléculaires au stress chimique.

Ce projet multi-estuaire contribue également à la validation:

- (1) des outils pour mesurer la génotoxicité, particulièrement au niveau du test comète (estimations des dommages primaires à l'ADN), en tant que marqueur de stress sur le flet en milieux estuariens ;

- (2) de l'activité AChE sur des flets étudiés dans différents estuaires français, dans l'objectif d'une application au sein d'un programme intégré chimie biologie de l'OSPAR, intitulé CEMP (Coordinated environmental monitoring programme).

Dans le contexte du Golfe de Gascogne, certains traits de vie chez le flet ont été mis en liaison avec le stress chimique en milieu estuarien ; ainsi le taux de croissance des poissons à l'état juvénile (entre le premier et le deuxième hiver) et la fécondité relative pourront être intégrés dans de futurs travaux en monitoring environnemental.

Les explorations sur les perturbateurs endocriniens sur le flet ont permis de détecter des effets significatifs sur les estuaires contaminés. Notons qu'une demande a été effectuée auprès de l'OSPAR pour intégrer les mesures de vitellogénine dans le programme de surveillance CEMP. Le LEMA a participé au programme d'assurance-qualité BEQUALM afin de valider les mesures par ELISA.

Les lésions hépatiques significatives détectées dans cette approche multi-estuaire devraient contribuer à la création et à l'alimentation d'une base de données épidémiologiques sur les pathologies tumorales et infectieuses externes et internes chez le flet sur les côtes françaises.

Les couplages génotypes-phénotypes sont encore rares en Ecotoxicologie. Nous démontrons dans cette étude la pertinence de cette approche sur le modèle flet, pour identifier des génotypes présentant des phénotypes contrastés. L'objectif est ici de détecter des résistances ou des sensibilités différentielles au stress chimique, exprimées par différents génotypes au sein d'une population.

Chez le flet, les réponses physiologiques multi-critères en relation avec les génotypes ont mis en évidence des génotoxicités et/ou contaminations et/ou lésions hépatiques différentielles entre certains génotypes.

Ces recherches devront être encouragées dans le futur :

- (1) fondamentalement pour explorer les mécanismes de transfert des contaminants dans les organismes et mieux comprendre leurs effets ;
- (2) pratiquement pour diagnostiquer si les phénomènes sélectifs qui agissent sur les populations en milieu naturel ne conduisent pas à maintenir dans les systèmes contaminés les individus les plus aptes à bioaccumuler les xénobiotiques, avec les conséquences que l'on peut imaginer pour l'homme en tant que prédateur au sommet de la chaîne trophique.

VIII Recommandations

Les milieux estuariens sont des réceptacles naturels vis à vis des multiples rejets et des contaminations diffuses liés aux actions anthropiques ; ils présentent par ailleurs une importance capitale en tant que zone de nurserie pour les juvéniles de poissons marins d'intérêt halieutique et en tant que zones d'élevage privilégiées pour les bivalves marins. Nous pensons que les estuaires sont donc des sites pertinents pour développer une recherche cognitive et appliquée dans le domaine de l'écotoxicologie aquatique ; cette démarche nous paraît essentielle pour contribuer au monitoring et à la préservation de ces écosystèmes côtiers.

Le suivi de la bioaccumulation et de la transformation biotique des contaminants chimiques doit être maintenu dans le futur, conjointement avec l'étude de leurs effets

biologiques (réponses moléculaires et processus physiologiques) sur les populations naturelles, en ciblant des organismes de différents niveaux trophiques.

Parallèlement à ces transferts de contaminants dans les organismes, il serait aussi probablement très pertinent d'intégrer des mesures de composition isotopique ($^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ et $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) dans les tissus, de façon à explorer les régimes trophiques des animaux étudiés et ainsi progresser dans la compréhension des différences de niveaux de contamination dans les tissus.

Des perturbations endocriniennes significatives ont été détectées dans les estuaires contaminés de ce programme, au niveau de l'induction de la vitellogénèse chez les poissons mâles; elles ne représentent cependant qu'une petite partie des interactions potentielles entre les xénobiotiques et le système endocrinien. Rappelons que les actions des perturbateurs endocriniens débutent dès les premiers stades de développement, les effets s'échelonnent pendant la vie entière et peuvent conduire à une perte de fitness ; de nombreuses autres altérations du système endocrinien par les contaminants devraient être explorées dans un futur proche.

La définition de sites ateliers naturels communs aux équipes de recherche nous paraît essentielle afin de favoriser au maximum l'intégration des différentes approches sur des individus communs (bioaccumulation, réponses moléculaires, physiologiques, variabilité génétique).

Ce projet multi-estuaire met en évidence que les données histo-pathologiques sur le flet peuvent être riches en informations quand elles sont couplées avec les teneurs en contaminants et avec différents biomarqueurs. Les études pathologiques sur les poissons en populations naturelles sont encore marginales au niveau national ; elles devraient être étendues à l'ensemble des grands estuaires français et comparées avec des données européennes. De manière plus générale, les travaux histo-pathologiques devraient être encouragés en écotoxicologie, la détection de lésions sur différents tissus pouvant être analysée en relation avec les performances immunitaires détectées au niveau notamment des cellules circulantes.

Dans une démarche d'Ecotoxicologie Evolutive, il serait particulièrement pertinent d'explorer les pressions sélectives potentielles exercées sur les populations naturelles, par les stress multiples en milieux estuariens (polluants, hypoxie, température...).

L'estuaire de la Vilaine est un système particulièrement original qui induit un stress chimique probablement assez limité sur la population de flet ; nous avons émis l'hypothèse d'un stress de nature hypoxique, prépondérant dans ce système. La résultante de ces stress se traduit par un impact non négligeable sur les poissons adultes en Vilaine (perturbations endocriniennes, inflammations hépatiques,..). Nous proposons en conséquence de rechercher l'impact possible du stress sur des poissons juvéniles de Vilaine, au cours de leur phase d'imprégnation dans le système, pour explorer les capacités d'accueil de cet estuaire en tant que zone de nurserie.

Nous allons développer cette approche en suivant de possibles modifications de la variabilité génétique associée à différents gènes candidats (potentiellement impliqués dans la réponse au stress) pour une cohorte de flets au cours du temps, du recrutement de l'animal en estuaire de Vilaine, jusqu'à un âge d'environ 8 mois. Ce travail a été mené et sera exposé dans le rapport 3.

Considérons une population naturelle exposée à une contamination soutenue, en relation plus ou moins forte avec les populations voisines par un flux de gènes lié à la migration/reproduction. Ce flux de gènes doit être mesuré en utilisant notamment des marqueurs neutres ; s'il est fort, il peut conduire à une recolonisation rapide des milieux stressés et/ou à un ralentissement de la vitesse d'adaptation potentielle de la population contaminée. Il nous paraît donc important de connaître la structure génétique des populations naturelles pour estimer leur niveau d'interaction et ainsi mieux explorer les possibles pressions sélectives locales s'exerçant sur ces populations.

Face aux changements climatiques, les espèces présentant une phase juvénile en milieux peu profonds comme les estuaires, vont être soumises à un stress additionnel lié au réchauffement des eaux. Les travaux explorant la synergie entre les effets du réchauffement et ceux de la pollution sur les organismes estuariens devraient être encouragés ; des approches multi-disciplinaires impliquant des écotoxicologistes, physiologistes, biologistes des populations permettraient de tester le potentiel de résistance au stress multiple de différentes populations naturelles, par des expérimentations en laboratoire.