

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 1



Juillet 2008

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>I Introduction : élaboration du projet de recherche – choix des outils & objectifs principaux</i>	5
<i>II Choix du modèle biologique</i>	6
<i>III Choix des systèmes estuariens</i>	7
<i>IV Echantillonnage</i>	9
<i>V Contamination chimique des organismes : polluants organiques</i>	10
5.1 Contexte et objectifs	10
5.2 Matériels et méthodes (Analyses chimiques organiques)	11
Tissus	11
5.3. Résultats de contamination des flets issus de différents estuaires et discussion	14
5.4 Bibliographie	18
<i>VI Investigations biologiques sur le flet</i>	21
6.1 Distribution du sexe ratio, des tailles, et de traits biologiques liés à la fitness (indice de condition, croissance, fécondité)	21
6.1.1 Matériel et méthodes	21
6.1.2 Résultats et discussions	23
6.1.3 Conclusions	26
6.1.4 Bibliographie	27
6.2 Réponses moléculaires : expression de gènes	28
6.2.1 introduction sur le stress chimique et l'expression de gènes	28
6.2.2 Matériel et méthodes	29
6.2.3 Résultats et discussion	30
6.2.4 Bibliographie	33
6.3 Réponses cellulaires : génotoxicité	37
6.3.1 Problématique et objectif	37
6.3.2 Méthodologie : test des comètes	38
6.3.4 Résultats : test des comètes sur le flet	42
6.3.5 Discussion sur les tests des comètes	44
6.3.6 Dommages chromosomiques sur le flet	45
6.3.7 Bibliographie	46
<i>VII Discussion générale sur la réponse du flet au stress en milieu estuarien</i>	49

I Introduction : élaboration du projet de recherche – choix des outils & objectifs principaux

Ce premier rapport sur la convention d'étude « Réponses moléculaires et populationnelles d'un poisson estuarien, le flet *Platichthys flesus*, à la contamination par les pesticides : approches *in situ* et expérimentale » est orienté sur les réponses de ce poisson *in situ*.

Des explorations ont été menées sur le flet *Platichthys flesus*, poisson plat vivant à l'état juvénile en estuaires, dans le cadre d'une approche comparative entre l'estuaire de la Vilaine et d'autres estuaires du Golfe de Gascogne. Rappelons que l'estuaire de la Vilaine présente une contamination chimique où les pesticides sont dominants; les autres estuaires permettant d'établir le comparatif, présentent quant à eux un contraste marqué dans la typologie de la contamination:

Ster de Lesconil : milieu peu contaminé

Loire : contamination diffuse (cocktail polluant très diversifié)

Gironde : métaux lourds dominants & contamination diffuse.

Dans ce projet de recherche, la typologie des polluants des différents estuaires du Golfe de Gascogne a été diagnostiquée par le dosage des principaux contaminants (HAP, PCB, pesticides organo-chlorés), sur le foie et le muscle des poissons.

Les réponses **au niveau moléculaire** ont été quantifiées sur le flet, par l'évaluation des dommages à l'ADN (génotoxicité) mesurée sur les cellules sanguines, par l'expression de gènes impliqués dans la détoxification, la protection cellulaire et la production d'énergie. **Au niveau individuel**, les investigations ont été orientées sur l'estimation du taux de croissance des poissons et sur des paramètres liés à la biologie de la reproduction (fécondité relative).

L'approche multi-estuaire a été retenue dans ce projet pour mettre en évidence la fonctionnalité de nos différents marqueurs en relation avec l'intensité et la nature des cocktails polluants.

Les résultats obtenus par deux équipes (Laboratoire LPTC - Bordeaux et INRA-EFPA : Laboratoire des Sciences de l'Environnement - Vaulx en Velin) qui ont travaillé en collaboration avec le LEMAR sur cette étude seront intégrés dans ce rapport ; ils nous permettent en effet d'avoir une vision intégrée des réponses du poisson à la contamination chimique, en prenant en compte les charges en contaminants et la génotoxicité.

Des recherches sont menées au **niveau populationnel** sur la variabilité génétique de différents gènes candidats, dans les populations de poissons échantillonnées dans les estuaires, pour rechercher des modifications possibles dans les fréquences alléliques ou génotypiques, entre milieu de référence et milieux contaminés. Les investigations au niveau génétique et la recherche de possibles couplages entre les niveaux de contaminants, certains caractères phénotypiques quantitatifs liés à la performance individuelle et les variants génotypiques observés dans chaque système estuarien, sont en cours et feront l'objet du rapport 2 de cette convention entre l'IAV et le LEMAR.

II Choix du modèle biologique

Le flet est un poisson plat benthique euryhalin, commun sur les côtes européennes. La reproduction a lieu en mer à la sortie des estuaires, en janvier-février à nos latitudes. Les juvéniles sont recrutés en milieu estuarien, où ils vont séjourner 2 à 3 ans avant d'acquérir la maturation sexuelle et de partir en mer pour participer à leur tour à l'effort de reproduction (Fig. 1). De par sa distribution sur les fonds

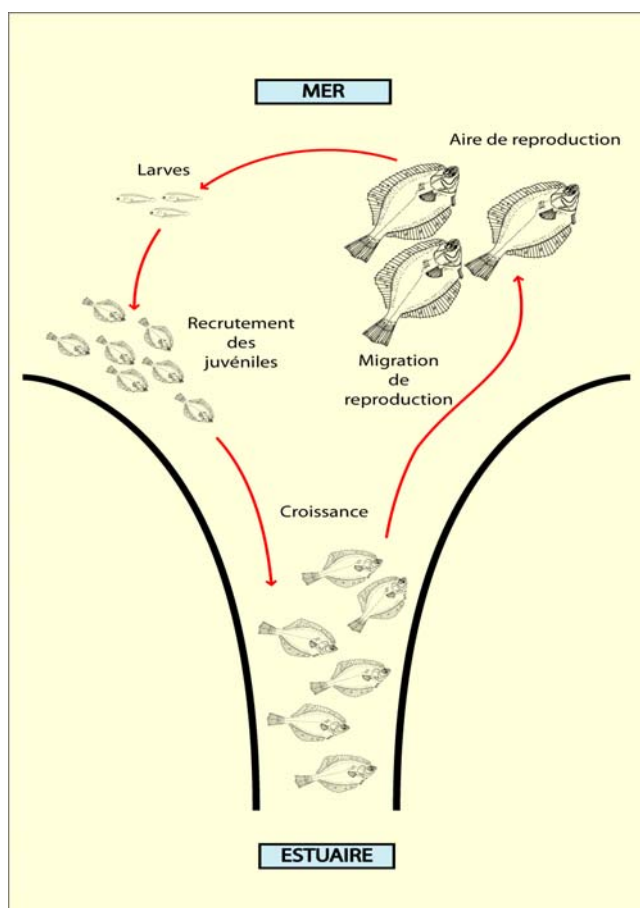


Figure 1. Cycle biologique du flet

meubles estuariens et son régime carnivore, le flet est généralement considéré comme un bon intégrateur du transfert des contaminants le long de la chaîne trophique. Cette espèce présente des charges en contaminants parfois très fortes et fait l'objet de nombreuses publications en tant qu'espèce sentinelle de la qualité des milieux estuariens en Europe.

III Choix des systèmes estuariens

Parallèlement au choix de la Vilaine, les autres estuaires ont été sélectionnés sur une unité biogéographique cohérente, le Golfe de Gascogne (Fig. 2). Ce choix permet de travailler sur des populations qui ont vraisemblablement une histoire évolutive à long terme très proche, particulièrement pour le modèle flet, espèce non manipulée (i.e. non soumise à des transferts d'individus entre les estuaires); ceci est un élément particulièrement facilitant quand on explore les réponses physiologiques et/ou génétiques des populations naturelles à la pression des contaminants chimiques (histoire beaucoup plus récente).

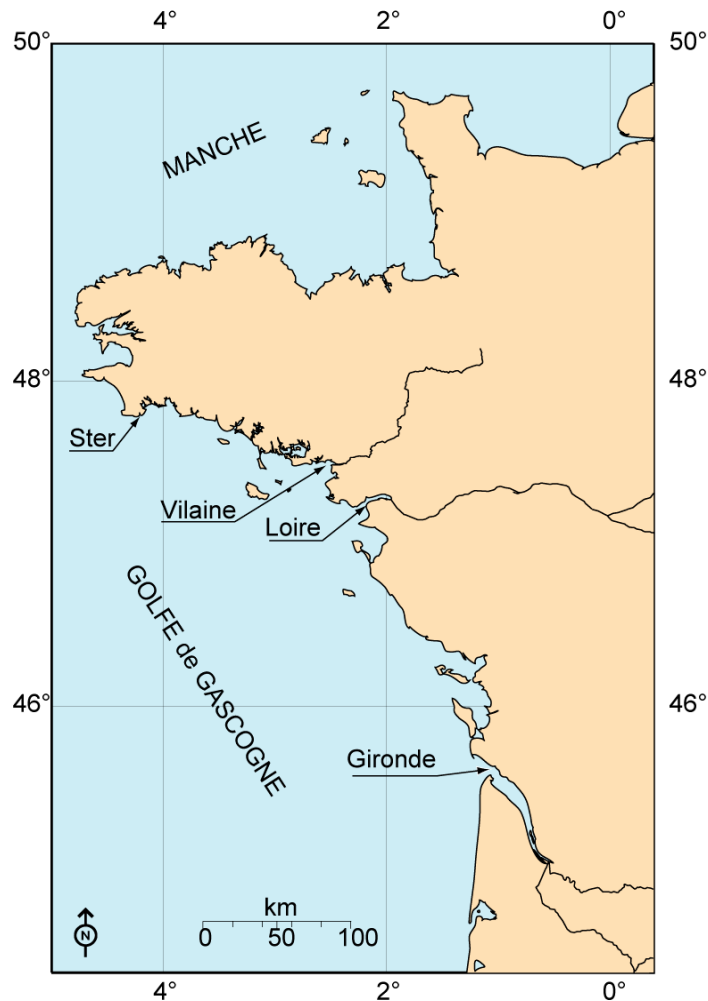


Figure 2. Les différents estuaires étudiés dans le projet

Estuaires contaminés (Vilaine, Loire, Gironde): sur ces systèmes présentant des contaminations chroniques, les flets ont pu être collectés à partir de populations naturelles autochtones.

Vilaine. Le bassin versant de la Vilaine s'étend sur un tiers de la Bretagne et subit essentiellement l'influence d'activités agricoles avec une prédominance de l'élevage bovin et hors-sol (porcs, volailles) et des cultures associées. Les eaux de la Vilaine sont donc en conséquence essentiellement contaminées par de forts niveaux de pesticides (Forget 1998, SAGE Vilaine, 2001), avec des pics de contamination surtout en saison estivale dépassant

communément les 2µg/l (Marchand, 2006). Depuis 1970, le cours naturel de la Vilaine a été modifié par la réalisation d'un barrage 12 km en amont de l'embouchure, permettant de retenir en amont un plan d'eau douce répondant aux besoins de consommation en eau potable. Cet aménagement a conduit à un envasement accéléré de l'estuaire, la réserve d'eau ne permettant plus d'exercer un effet de « chasse d'eau » et de freiner la sédimentation (Le Pimpec, 2004) ; l'ouverture du barrage peut être brutale en cas d'orage et peut conduire à des variations drastiques de la salinité en aval du barrage, les eaux de la Vilaine étant donc qualifiées de fortement modifiées par l'aménagement. L'eutrophisation chronique de ce système associée à une stratification possible des eaux peut conduire à des crises hypoxiques (Ménèsguen, 2001).

Loire. La Loire présente un bassin versant de 118.000 km², fortement urbanisé (11,5 millions d'habitants) et industrialisé (Port de St Nazaire, Montoir, Donge) et sur lequel est produit 50% de la production nationale céréalière (Migaud, 2006). Cette estuaire présente donc une contamination diffuse lourde, caractérisée par un mélange de métaux lourds, de HAPs, PCBs et pesticides (RNO, 2003). Une eutrophisation accompagnée d'événements hypoxiques modérés peuvent être observés sur cet estuaire (Ménèsguen, 2001).

Gironde. L'estuaire de la Gironde, plus grand estuaire européen, présente une contamination chronique lourde en métaux, particulièrement en cadmium, mais aussi en zinc et cuivre (Boutier et al, 1989). Des recherches récentes sur la contamination en PCB et PBDE de flets issus de différents estuaires français (Seine, Ster, Vilaine, Loire, Gironde) ont de plus souligné la forte contamination des flets issus de l'estuaire de la Gironde ; cette tendance étant largement confirmée sur l'anguille, autre espèce de poisson commune dans l'estuaire (Tapie, 2006).

Estuaire peu contaminé:

Ster de Lesconil. C'est un cours d'eau modeste (bassin versant de l'ordre de 100 km²), ne présentant apparemment pas de source de contamination chronique ; il reçoit peu d'effluents domestiques et agricoles et aucun rejet de type industriel. Les dosages de métaux (moules et flets) et de polluants organiques : HAP, PCB (moules) indiquent de faibles concentrations en contaminants dans les chairs (Marchand et al, 2003, 2004). Le Ster présentant une population naturelle de flet a donc été retenu comme site « témoin ».

Bibliographie

Boutier B., Chiffoleau J.F., Jouanneau J.M. & Latouche C. 1989. La contamination de la Gironde par le cadmium : origine, extension, importance. Rapport Scientifique et Technique Ifremer, pp. 1-14.

Forget J. 1998 Impact neurotoxique de contaminants (pesticides et métaux) sur un crustacé marin *Tigriopus brevicornis* (Müller). Caractérisation de la cholinestérase et application à la surveillance des effets des polluants sur l'environnement marin. Thèse de Doctorat. Université de Paris 6.

Le Pimpec C. 2004. Etude des masses d'eaux côtières et de transition fortement modifiées. Mémoire de D.E.S.S, Génie Littoral Portuaire et des Estuaires. Université de Caen.

- 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., 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.
- MENESGUEN A., 2001, L'eutrophisation des eaux marines et saumâtres en Europe, en particulier en France. Rapport IFREMER pour la Commission Européenne – DG.ENV.B1, 59p.
- Migaud G. 2006. Inventaire des ressources benthodémersales dans la masse d'eau de transition de la Loire. Mémoire de Master 2 Professionnel Hydrobiologie – Gestion des Milieux Aquatiques et des Ressources en Eau. Université Paul Verlaine de Metz.
- Réseau National d'Observation 2003. Surveillance du milieu marin. Travaux du Réseau National d'Observation de la qualité du milieu (eds. Ifremer), pp. 1-48.
- SAGE Vilaine 2001. Projet de schéma d'aménagement et de gestion des eaux de la Vilaine, Atlas. Institution d'Aménagement de la Vilaine, La Roche Bernard, France.
- Tapie N. 2006. Contamination des écosystèmes aquatiques par les PCB et PBDE : Application à l'estuaire de la Gironde. Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux I.

IV Echantillonnage

En écotoxicologie, le statut physiologique d'un animal et particulièrement son état de maturité sexuelle peut avoir une forte incidence sur son niveau de réponse physiologique au stress chimique ; ainsi, l'analyse de nombreux biomarqueurs sur les populations naturelles doit prendre en compte non seulement le sexe de l'animal, mais aussi une estimation de son niveau de maturation sexuelle déterminé macroscopiquement voire microscopiquement par une analyse histologique des gonades.

Notre stratégie d'échantillonnage a visé dans ce projet à prélever 35 à 40 individus par estuaire, à 2 périodes de l'année bien contrastées :
 en période de repos sexuel (juin-juillet pour le flet) ;
 en période de pleine maturité sexuelle (janvier pour le flet).

Prélèvements réalisés en 2005

Janvier (27/01/05 au 31/01/05) , Juin-Juillet (19/06/05 au 13/07/05)

- Prélèvements de 35 à 40 poissons / saison / estuaire sur les systèmes « contaminés » :
 Vilaine, Loire & Gironde.

Prélèvements de poissons

Vilaine : prélèvement réalisé en hiver sur le « Côte d'Aquitaine » (Navire du CNRS – INSU), dans la Baie de Vilaine (pas de flets adultes disponibles dans l'estuaire de la Vilaine) / prélèvement réalisé en été sur un bateau de pêche professionnel (Mr Triballier), avec un chalut à perche, dans la partie avale de l'estuaire

Loire et Gironde : prélèvements réalisés en hiver et été sur le « Côte d'Aquitaine », avec un chalut à panneaux, dans la partie avale des estuaires.

Prélèvements réalisés en 2006

Janvier (23/01/06 au 24/01/06), Juin 2006 (20/06/06)

- Prélèvements de 35 flets / saison sur le système de « référence » : le Ster de Lesconil.

Prélèvements de poissons

Par filet maillant, avec la collaboration d'un pêcheur professionnel (Mr Goyen).

Suite à une crise hypoxique, liée à une accumulation d'algues dans l'embouchure du Ster après une tempête automnale en 2004, des mortalités massives de poissons ont été observées et n'ont donc pas permis d'y réaliser des captures de flet en 2005. Nous avons donc dû retarder d'un an le prélèvement sur le Ster afin de retrouver un environnement pleinement restauré.

Protocole résumé des prélèvements

Les prélèvements de tissus ont été réalisés sur les sites de captures avec la participation de différentes équipes de ce projet. Les prélèvements ont été conditionnés en azote liquide, carboglace, glace or formol selon les tissus, et adressés aux différents partenaires pour analyses s'ils n'avaient pas la possibilité de participer directement aux prélèvements.

V Contamination chimique des organismes : polluants organiques

Equipe ayant collaboré à l'étude :

Institut des Sciences Moléculaires (ISM) – UMR 5255 CNRS

Laboratoire de Physico- et Toxicochimie de l'Environnement (LPTC), Université Bordeaux I

Responsable scientifique : Dr. Hélène Budzinski, Directeur de Recherches CNRS

5.1 Contexte et objectifs

Au cours des dernières décennies, la pollution chimique de l'environnement n'a cessé d'augmenter avec l'industrialisation et l'urbanisation croissantes. Par le biais des fleuves et des estuaires, une grande quantité de contaminants chimiques parvient aux océans et affecte notamment les zones côtières qui sont des zones d'intérêt économique fort (Baumard et al., 1999 ; Woodhead et al., 1999 ; OSPAR, 2000 ; Fu et al., 2003 ; Kowalewsha et al., 2003 ; Chen et White, 2004 ; Grabe et Barron, 2004 ; Danis et al., 2004). Ces systèmes aquatiques sont donc des vecteurs de pollution importants qui participent à la diffusion générale des divers types de pollution dont la pollution chimique organique. Parmi les polluants organiques majeurs de notre environnement on trouve les polluants organiques persistants (POPs) tels

que les polychlorobiphényles (PCB), les polybromodiphényléthers (PBDE) et les pesticides organo-chlorés (OCP) ainsi que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Ces polluants sont des contaminants ubiquistes de l'environnement estuarien et marin (Chang et al., 1998 ; Mc Cready et al., 2000 ; Matthiessen et Law, 2002 ; Viguri et al. 2002), d'une part à cause de leur stabilité importante et d'autre part à cause de la multiplicité de leur source (transports fluviaux, lessivage des sols, dépôts atmosphériques, rejets incontrôlés,...) (McElroy et al, 1989 ; Lang, 1992). Ils sont considérés comme des contaminants prioritaires des écosystèmes tant terrestres qu'aquatiques du fait de leur activité toxique vis à vis de la faune et de la flore et sont en conséquence nuisibles pour l'homme. La présence de retardateurs de flamme bromés et plus particulièrement les diphényl-éthers polybromés (PBDE), a été mise en évidence et devient de plus en plus préoccupante (Asplund et al., 1999 ; Sellström et al., 1999 ; de Wit, 2002). Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont notamment considérés comme particulièrement préoccupants du fait de leur activité mutagène et cancérogène vis-à-vis de la faune et de la flore (White, 1986; Belkin et al., 1994). Les HAP sont aussi inscrits sur la liste des substances dangereuses prioritaires de la Directive Cadre sur l'Eau (Directive 2000/60/CE) (au même titre d'ailleurs que les PBDE ou certains pesticides organo-chlorés).

Les polluants organiques persistants sont donc omniprésents dans l'environnement marin côtier et donc une source de stress majeur pour les populations naturelles. Il est important d'arriver à qualifier et caractériser cette pression et d'en qualifier les effets. Du fait de la dilution inhérente au milieu marin côtier et de sa variabilité il est relativement complexe de caractériser correctement les pressions chimiques. **L'objectif des travaux entrepris dans le cadre de ce projet était donc de caractériser la contamination des différents sites en se focalisant sur la contamination chimique de l'espèce choisie (flet) et en caractérisant la bioaccumulation des PCB, OCP et HAP.**

5.2 Matériels et méthodes (Analyses chimiques organiques)

Tout le matériel de stockage des échantillons et le matériel de laboratoire, en verre, a été soigneusement lavé (détergents et rinçage à l'eau ultra-pure) puis chauffé toute une nuit à 450°C (ce qui permet d'enlever toutes les traces organiques). Les solvants utilisés étaient de qualité HPLC. Les échantillons reçus ont été conservés au congélateur à -20°C pour les tissus (foies et muscles de poissons) et à -80°C pour les biles.

Tissus

Les tissus sont lyophilisés et broyés avant analyse. Les matrices avant analyse sont conservées à l'abri de la lumière après broyage dans des flacons en verre ambré. L'analyse est effectuée dans la semaine qui suit le broyage et la lyophilisation. Les HAP et PCB/OCP/PBDE ont été dosés dans les tissus.

HAP

Les échantillons (0.2 à 1g), avant extraction, sont supplémentés avec des étalons internes aromatiques perdeutérés (naphtalène d8, dibenzothiophène d8, phénanthrène d10, fluoranthène d10, chrysène d12, benzo(a)pyrène d12, benzo(e)pyrène d12, benzo(ghi)pérylène d12). Ils sont extraits par chauffage micro-ondes (30W, 10 minutes) en utilisant comme solvant extracteur le dichlorométhane (Mazéas, 2000 ; Estève, 2002 ; Perraudin, 2005). L'extrait organique est ensuite fractionné en fraction saturée et fraction aromatique (séparation sur micro-colonnes d'alumine/silice).

Les fractions aromatiques sont analysées directement par chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (CG/SM) en mode d'acquisition par sélection d'ions (ions moléculaires des composés quantifiés). La quantification est effectuée par étalonnage interne en utilisant les composés aromatiques perdeutérés. Un étalonnage des appareils est effectué en utilisant des solutions étalons de composés perdeutérés et des solutions étalons de composés natifs (SRM 2260 NIST, Gaithersburg, MD, USA). Les rendements d'extraction sont calculés pour chaque échantillon par rapport à deux composés perdeutérés (pyrène d10 et benzo(b)fluoranthène d12) rajoutés juste avant l'injection en GC/MS (étalons dits « seringue », Perraudin, 2005). Pour les composés de plus haut poids moléculaire ainsi que pour certains échantillons de foie une purification supplémentaire par Chromatographie en Phase Liquide Haute Performance (CLHP) sur phase amino-silane est parfois nécessaire (Budzinski et al., 1993). Des fractions correspondant aux différents degré d'aromaticité sont collectées et analysées comme les fractions aromatiques totales .

Les analyses sont effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse HP 6890 (Agilent Technologies, USA) équipé d'un injecteur splitless (délai de purge 1 min, débit de purge 60 mL/min, mode splitless pulsé). L'injecteur est maintenu à 270°C. Le programme de température du four est le suivant : 50°C (2 min) à 290°C (20 min) à 5°C/min. Le gaz vecteur est l'hélium à un débit constant de 1 mL/min. La colonne capillaire utilisée est une colonne HP5-MS (Agilent Technologies, USA) : 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm épaisseur de film. Le chromatographe en phase gazeuse est couplé à un spectromètre de masse MSD 5973 (impact électronique : 70 eV, voltage: 1800 V) opérant en mode de sélection d'ions (SIM) avec les ions moléculaires de chaque composé à doser à 1 scan/s. La température de l'interface est de 290°C.

Les HAP sont quantifiés par étalonnage interne par rapport à des HAP perdeutérés. Les facteurs de réponse des différents composés sont mesurés en injectant une solution étalon, SRM 2260, contenant les HAP à des concentrations certifiées (NIST, Washington, MD, USA) à laquelle ont été rajoutés les HAP perdeutérés utilisés comme étalons internes.

Des blancs de protocole sont réalisés pour chaque série d'expérimentations de façon à s'affranchir d'éventuelles contaminations. Les rendements calculés à partir des étalons « seringue » sont compris entre 60 et 80% pour l'ensemble des échantillons ce qui permet de valider les préparations d'échantillons.

Le protocole analytique développé et utilisé a été validé sur un échantillon commercial certifié en HAP, le SRM 2977 (Moule, *Perna perna*, Baie de Guanabara, Brésil), fourni par le NIST (National Institute of Standard and Technologies, Gaithersburg, MD, USA). Il y a un très bon recouvrement des valeurs expérimentales et des valeurs certifiées assurant la validation du protocole. On note de bons rendements allant de 85 % à 115 % selon les composés associés à une bonne reproductibilité puisque les écart-types sont dans la gamme des écart-types du SRM et inférieurs à 15 %.

Des échantillons supplémentés en HAP ont été préparés de façon très précise pour l'ensemble des HAP dosés. Une série de trois répliquats indépendants a été effectuée. Les rendements sont tout à fait corrects supérieurs à 80 % pour l'ensemble des composés. Les reproductibilités obtenues sont également correctes avec des écart-types inférieurs à 10 % pour l'ensemble des composés. Les limites de quantification pour les HAP sont comprises entre 5 et 0,1 ng/g selon les composés.

PCB/OCP (lindane)

Chaque échantillon (0,5 à 1 g) est extrait par chauffage micro-ondes (30W, 10 minutes) en utilisant comme solvant extracteur le dichlorométhane (Letellier, 1998 ; Thompson, 1999) ou par ASE (Accelerated Solvent Extraction) en utilisant également le

dichlorométhane (Tapie et al, 2008). Des étalons internes sont rajoutés à la matrice avant l'extraction pour pouvoir doser les composés recherchés par la méthode d'étalonnage interne. Ces étalons internes sont des PCB absents des milieux naturels (PCB 30, 103, 155, 198) et le DDT-d8.

L'extrait est ensuite reconcentré et repris dans l'iso-octane. Il subit une étape de purification sur colonne de silice acidifiée. L'éluat est récupéré, reconcentré et repris dans 90 µl d'isooctane. Un étalon de rendement (octachloronaphtalène) est ajouté en fin de manipulation afin de calculer le rendement d'extraction de chaque échantillon et de valider ainsi les mesures pour chaque échantillon. L'échantillon est ensuite analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons pour la quantification des PCB.

Des blancs de protocole sont effectués pour chaque série d'analyses et les concentrations calculées pour les composés tiennent compte des corrections par rapport aux blancs de protocole.

Les échantillons sont analysés par GC/ECD (chromatographe en phase gazeuse couplé à un détecteur à capture d'électrons) en utilisant un chromatographe en phase gazeuse HP 5890 (Hewlett Packard, USA) équipé d'un injecteur splitless (délai de purge 1 min, débit de purge 60 mL/min). L'injecteur est maintenu à 270°C. Le programme de température du four est le suivant : 50°C (2 min) à 290°C (20 min) à 5°C/min. Le gaz vecteur est l'hélium à un débit constant de 1 mL/min. La colonne capillaire utilisée est une HP5-MS (Agilent Technology, USA) : 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm épaisseur de film. Le chromatographe en phase gazeuse est couplé à un détecteur à capture d'électrons maintenu à 300°C.

Les facteurs de réponse des différents composés sont mesurés en injectant une solution étalon (SRM 2262, NIST, Gaithersburg, MD, USA), contenant les PCB à doser à laquelle sont rajoutés les étalons internes. Pour les pesticides on utilise le SRM 2261.

Le protocole analytique développé et utilisé a été validé sur un échantillon commercial certifié en PCB et OCP, le SRM 2977 (Moule, *Perna perna*, Baie de Guanabara, Brésil), fourni par le NIST (National Institute of Standard and Technologies, Gaithersburg, MD, USA) et un second échantillon commercial certifié en PBDE (WMF 01) fourni par Wellington Laboratories (Irigny, France). Il y a un très bon recouvrement des valeurs expérimentales et des valeurs certifiées assurant la validation du protocole. On note de bons rendements allant de 80 % à 120 % selon les composés associés à une bonne reproductibilité puisque les écart-types sont dans la gamme des écart-types des échantillons certifiés et inférieurs à 15 %.

Des échantillons supplémentés en PCB/OCP ont été préparés de façon très précise pour l'ensemble des composés dosés. Une série de trois répliqués indépendants a été effectuée. Les rendements sont tout à fait corrects supérieurs à 80 % pour l'ensemble des composés. Les reproductibilités obtenues sont également correctes avec des écart-types inférieurs à 10 % pour l'ensemble des composés. Les limites de quantification pour les composés sont de l'ordre de 0,1ng/g à 0,5 ng/g pour l'ensemble des composés.

Pour chaque échantillon un rendement d'extraction est calculé grâce à l'ajout de l'étalon de rendement (octachloronaphtalène ou OCN). Les rendements des analyses effectuées sont tous supérieurs à 70 %.

Afin de valider la quantification de chaque série d'analyse, un échantillon de référence interne au laboratoire a été mis en œuvre. Dans le cas de ce programme un échantillon a été fabriqué à partir de muscles d'anguille, lyophilisés et finement broyés de façon à être le plus homogène possible. Le suivi de cet échantillon de contrôle permet d'identifier une éventuelle dérive du protocole de quantification. Les concentrations doivent être constantes au cours du temps à la variabilité près du protocole de dosage estimée à 20 %.. La variabilité de cet échantillon de référence sur l'ensemble des séries d'analyse est inférieure à 20 % sur l'ensemble des analyses effectuées. On peut donc assurer une bonne robustesse des déterminations.

5.3. Résultats de contamination des flets issus de différents estuaires et discussion

Niveau de contamination des pools de 10 flets

Afin de caractériser les niveaux de contamination des différents estuaires étudiés (Vilaine, Gironde, Loire et Ster) des pools de muscles et de foies de flets (10 individus) ont été préparés. Ces échantillons ont été analysés afin de déterminer leurs teneurs en PCB, pesticides organo-chlorés et HAP. Dans les différents graphes des teneurs en contaminants organiques dans les pools de flets, les concentrations sont celles de la somme des composés suivis par classe de contaminants et les barres d'erreurs représentent la variabilité analytique maximale (15%). Les données manquantes pour le Ster en janvier 2006 sont dues à l'absence d'échantillons.

- Teneurs en PCB dans les flets

Les concentrations en PCB (congénères 50+28, 52, 101, 118, 15, 138 et 180) retrouvées dans les pools de muscles et de foies issus des différents estuaires sont représentées dans la Figure 3. Globalement, des deux organes analysés, le foie est l'organe le plus contaminé quelque soit l'estuaire considéré. Cette différence de niveau de contamination est classiquement observée chez de nombreux poissons, le foie étant un organe de détoxification, lieu de transit et de stockage des contaminants. De plus chez le flets, le foie présente classiquement une teneur lipidique plus importante que le muscle (respectivement 15 et 5% de lipides par gramme de matière sèche), ce qui explique l'affinité des PCB, particulièrement lipophiles, pour cet organe.

Si l'on s'intéresse maintenant à la différence de contamination entre les estuaires, **il apparaît que les flets de l'estuaire de la Gironde sont plus contaminés que les flets de la Loire, eux même plus contaminés que les flets de la Vilaine et du Ster.** Cette différence de contamination entre estuaires concorde avec les données préexistantes (Tapie, 2006). Le profil de contamination est dominé par le CB 153 (environ 40% des PCB totaux), le CB 138 (25% des PCB totaux) et le CB 180 (18% des PCB totaux). Ce type de profil de contamination est classiquement mis en évidence chez les poissons téléostéens (Monosson et al., 2003 ; Ferreira et al., 2004). Il n'apparaît pas d'effet clair de la saison sur les niveaux de contamination en PCB, même si l'on peut tout de même noter que la concentration en PCB est plus forte dans le foie des flets de la Gironde et de la Loire en juin qu'en janvier. Mais cette tendance ne se retrouve pas sur le muscle ou sur les autres estuaires.

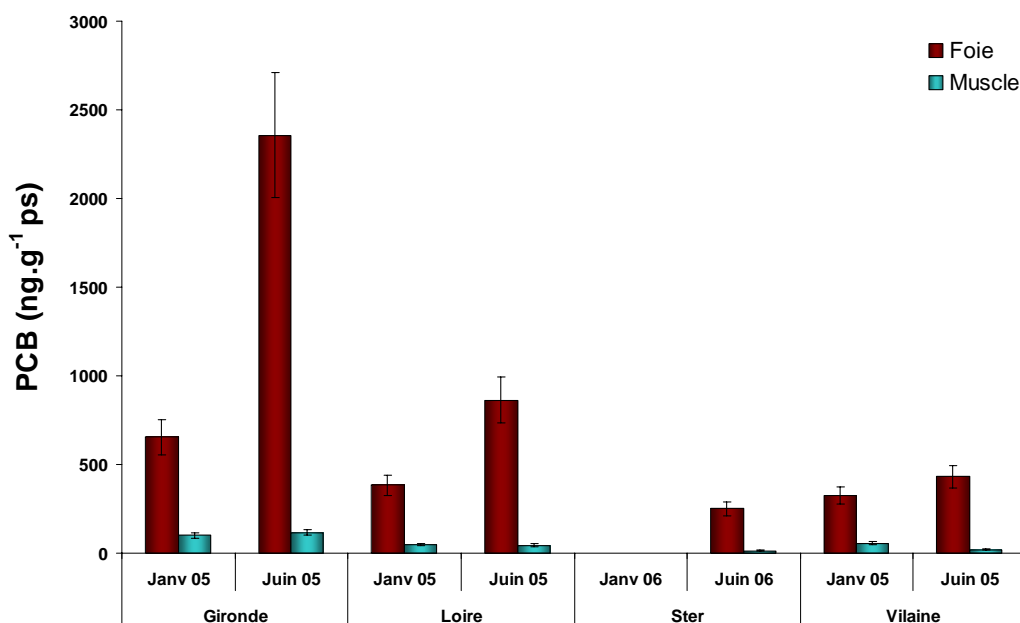


Figure 3 : Concentrations en PCB (ng.g^{-1} poids sec; somme des 7 PCB indicateurs) retrouvées dans les pools de muscle et de foie des filets issus des différents estuaires ciblés (les écart-types représentent la variabilité analytique maximale, soit 15%).

- Teneurs en pesticides organo-chlorés dans les filets

Les concentrations en lindane et en DDT et métabolites (2,4'-DDE, 4,4'-DDE, 2,4'-DDD, 4,4'-DDD, 2,4'-DDT et 4,4'-DDT) des pools de filets issus des différents estuaires étudiés sont présentées dans les Figures 4 et 5. Les niveaux de lindane retrouvés dans les pools de filets sont faibles (inférieurs à 10 ng.g^{-1} ps). Comme dans le cas des PCB et des PBDE, les pesticides organo-chlorés s'accumulent préférentiellement dans les organes les plus gras, ce qui explique la plus forte contamination du foie par rapport au muscle.

A la vue des résultats de contamination des pools de foie, **le Ster et plus particulièrement la Vilaine présentent des teneurs en lindane au mois de juin non négligeables ($2-8 \text{ ng.g}^{-1}$)**. Concernant le DDT et ses métabolites l'estuaire de la Gironde semble être le siège d'une contamination importante en juin, alors qu'en janvier le niveau de contamination est équivalent aux autres estuaires et compris entre 50 et 100 ng.g^{-1} .

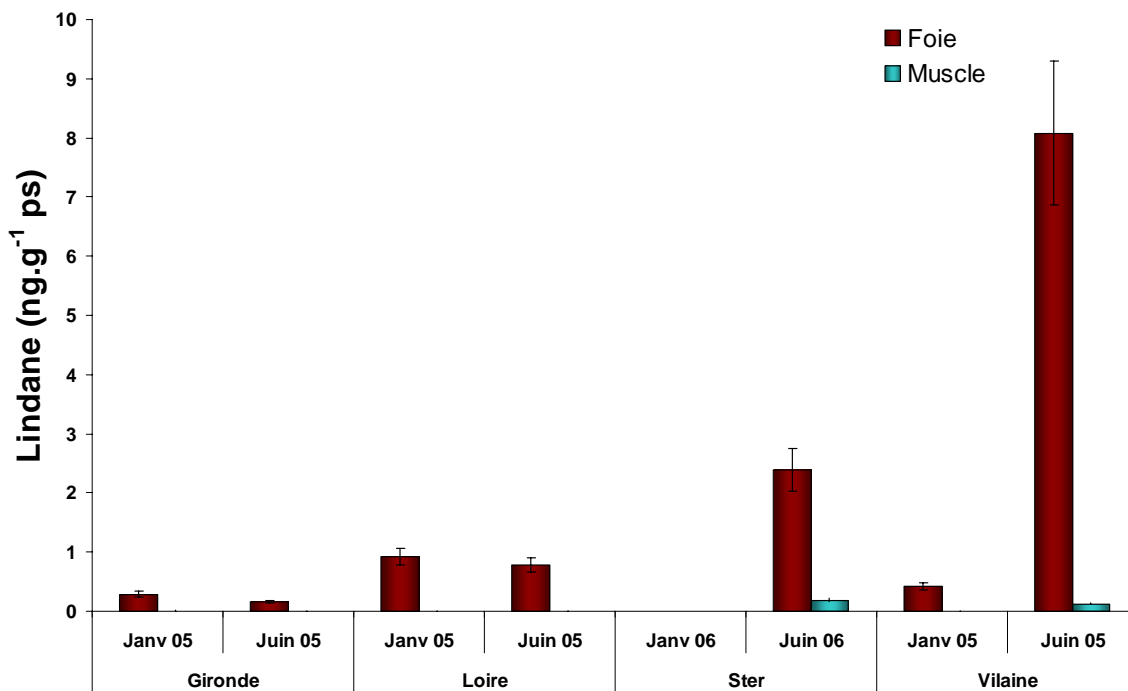


Figure 4 : Concentrations en lindane ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ poids sec) retrouvées dans les pools de muscle et de foie des flets issus des différents estuaires étudiés (les écart-types représentent la variabilité analytique, soit 15%).

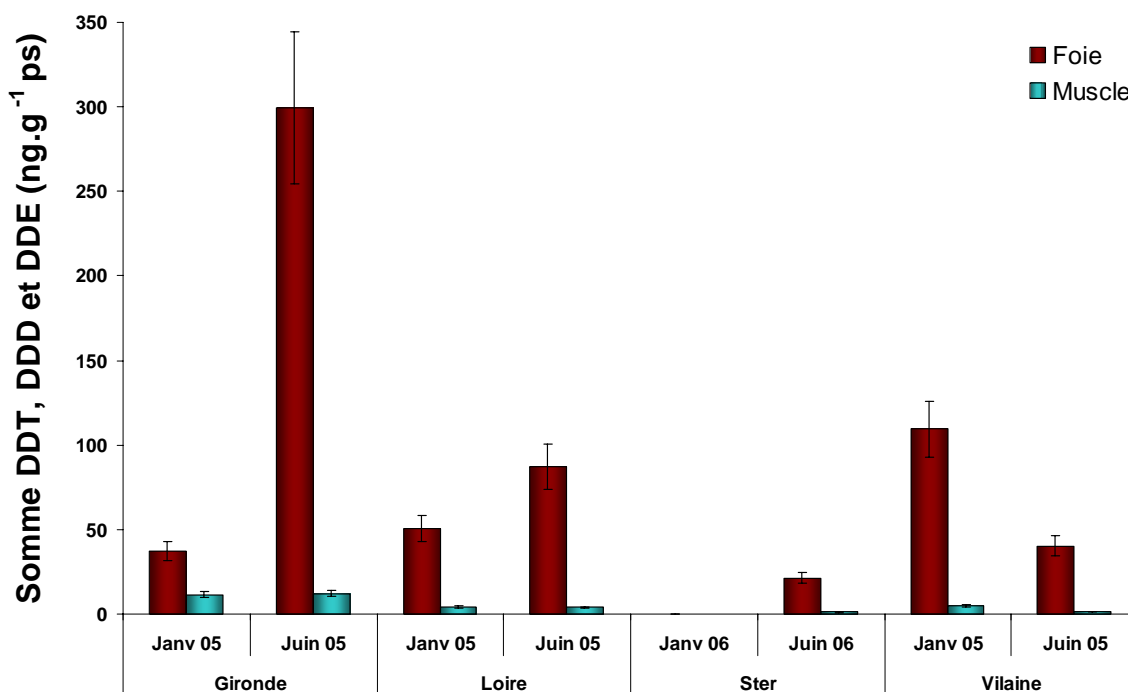


Figure 5 : Concentrations totales en DDT, DDE et DDD ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ poids sec) retrouvées dans les pools de muscle et de foie des flets issus des différents estuaires étudiés (les écart-types représentent la variabilité analytique, soit 15%).

- Teneurs en HAP dans les flets

Les concentrations en HAP (Phe, Ant, Fluo, Pyr, BaA, Triph + Chrys, BbF + BkF + BjF, BeP, BaP, Per, IP, DaA + DaC et BP) des pools de flets issus des différents estuaires étudiés sont présentées dans la Figure 6.

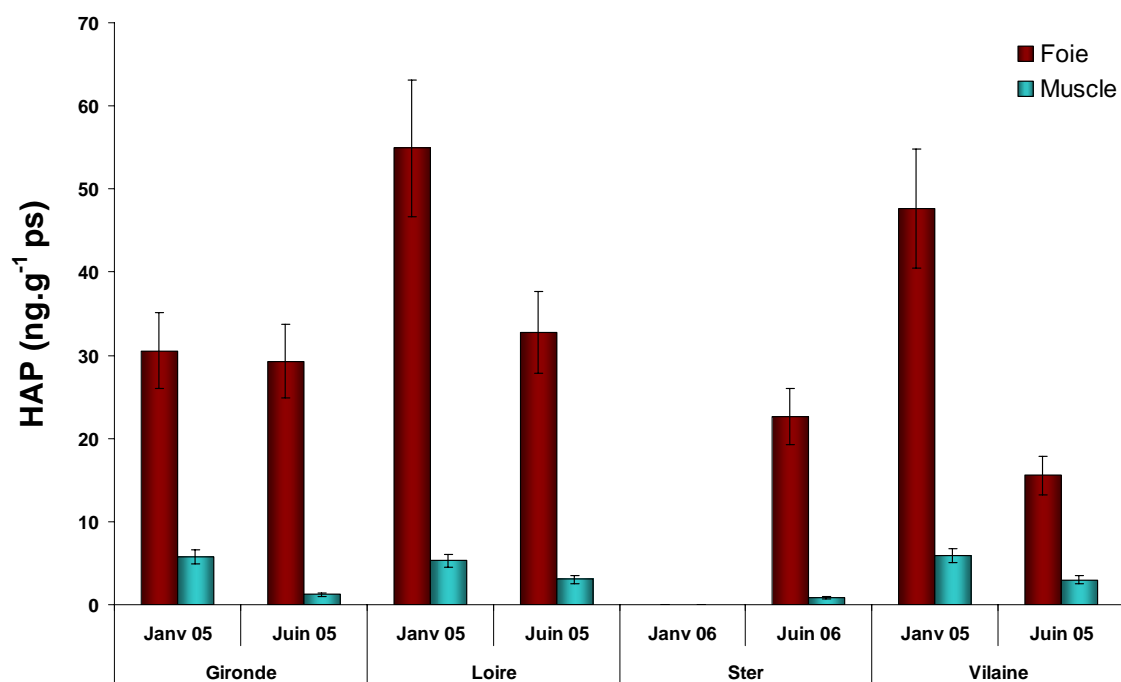


Figure 6 : Concentrations en HAP (ng.g⁻¹ poids sec) retrouvées dans les pools de muscle et de foie des flets issus des différents estuaires étudiés (les écart-types représentent la variabilité analytique, soit 15%).

Les niveaux de HAP totaux sur l'ensemble des estuaires et des saisons sont compris entre 15 et 55 ng.g⁻¹ ps dans le foie et entre 1 et 6 ng.g⁻¹ dans le muscle. Les teneurs déterminées dans le foie sont similaires à celle enregistrées dans les foies de flets (10-100 ng.g⁻¹ ps) et de soles (10-70 ng.g⁻¹) lors de captures antérieures le long de la côte atlantique (Mazéas, 2004) ou à celles mesurées chez des poissons capturés en Mer Méditerranée sur des sites éloignés de sources connues de HAP (Baumard, 1998). L'absence de bioaccumulation importante dans les flets sur l'ensemble des sites peut s'expliquer par la forte biotransformation des HAP chez les poissons. On peut donc penser que les niveaux de HAP tissulaires dans les flets des différents sites n'indiquent pas de manière significative une exposition forte aux HAP.

Les teneurs en composés individuels sont très faibles et généralement inférieures à 1 ng.g⁻¹ dans le muscle, à l'exception du phénanthrène pour la campagne hivernale et des benzofluoranthènes pour la campagne estivale (<3 ng.g⁻¹). Dans le foie, ces concentrations individuelles sont généralement inférieures à 5 ng.g⁻¹, à l'exception du phénanthrène et du pyrène, les deux composés prédominants (5-20 ng.g⁻¹), et du pérylène uniquement pour la campagne hivernale sur la Loire et la Vilaine. Compte tenu de ces teneurs, il n'est pas possible de discriminer différents niveaux de contamination entre les estuaires sur la base des HAP tissulaires. En revanche, la détermination des métabolites de HAP dans la bile a permis de mieux caractériser l'exposition des flets aux HAP capturés sur les différents estuaires (non exposé ici).

Comme observé pour les métabolites, les concentrations de HAP tissulaires semblent plus élevées en hiver qu'en été, même si cette tendance est faiblement marquée dans le foie de flets pour la Gironde. Il est intéressant de noter que cette tendance saisonnière pour les HAP est opposée à celle observée pour les autres contaminants organiques suivis où les teneurs obtenues en hiver sont plus faibles qu'en été, exception faite de la Vilaine. Bien qu'hydrophobes, les HAP sont peu accumulés dans les poissons en raison de leur rapide biotransformation. Cette différence de comportement saisonnier peut s'expliquer par l'importante métabolisation de ces composés, comparativement aux taux de biotransformation beaucoup plus faibles généralement observés pour les PCB, PBDE et OCP.

De façon générale on peut conclure que l'ensemble du littoral atlantique est impacté par des HAP très vraisemblablement véhiculés par lessivage des sols, transport atmosphérique puis dilution et diffusion vers le milieu marin côtier. On est confronté à une pollution diffuse chronique qui est la moins marquée pour le Ster et clairement détectée sur la Vilaine (hiver), la Gironde et la Loire.

5.4 Bibliographie

- Asplund L., M; Hornung, R. E. Peterson, K. Turesson, A. Bergman (1999). Levels of PBDEs in fish from the Great lakes and Baltic Sea; *Organohalogen Compounds*, 40, 351-354.
- Baumard P., Budzinski H., Garrigues P., Narbonne J.F., Burgeot T., Michel X., Bellocq J., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon (HAP) burden of mussels (*Mytilus* sp.) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. *Marine Environmental Research* 47 : 415-439.
- Baumard P., H. Budzinski, P. Garrigues (1998) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments and mussels of the western mediterranean sea. *Environ. Toxicol. Chem*, 17, 765-776.
- Belkin S., Stieber M., Tiehm A., Frimmel F.H., Abeliovich A., Ulitzur S., Werner P. (1994). Toxicity and genotoxicity enhancement during polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation. *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal*, 9, 303-309.
- Budzinski H., P. Garrigues, J. Bellocq, J. Connan (1993). Chromatographic fractionation of aromatic compounds from ancient and recent sediments for access to alkylated PAH distributions by GC/FID and GC/MS. *Quimica Analitica*, 12, 69-74.
- Chang S., V. S. Zdanowicz, R. A. Murchelano (1998) Associations between liver lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) and sediment chemical contaminants from north-east United State estuaries. *ICES Journal of Marine Science*, 55, 954-969.
- Chen G., White P. A., 2004. The mutagenic hazards of aquatic sediments : a review. *Mutat. Res.*, 567 : 151-225.
- Danis B., Wantier P., Dutrieux S., Flammang R., Dubois P., Warnau M. (2004) Contaminant levels in sediments and asteroids (*Asterias rubens* L., Echinodermata) from the Belgian coast and Scheldt estuary: polychlorinated biphenyls and heavy metals. *Science of the Total Environment* 333: 149– 165.

- Dévier M.H., S. Augagneur, H. Budzinski, K. Le Menach, P. Mora, J.F. Narbonne, P. Garrigues (2005) One-year monitoring survey of organic compounds (PAHs, PCBs, TBT), heavy metals and biomarkers in blue mussels from the Arcachon Bay, France. *J. Environ. Monit.*, 7, 224-240.
- Estève Williams (2002). Réactivité des HAP adsorbés sur des particules carbonées d'intérêt atmosphérique : Développements analytique, cinétique, mécanistique. Thèse d'université, Université Bordeaux I, n°2636.
- Ferreira M., Antunes P., Gil O., Vale C., Reis-Henriques MA. (2004) Organochlorine contaminants in flounder (*Platichthys flesus*) and mullet (*Mugil cephalus*) from Douro estuary, and their use as sentinel species for environmental monitoring. *Aquatic toxicology*, 69, 347-357
- Fu J., Mai B., Sheng G., Zhang G., Wang X., Peng P., Xiao X., Ran R., Cheng F., Peng X., Wang Z., Tang U. W. (2003) Persistent organic pollutants in environment of the Pearl River Delta, China: an overview. *Chemosphere* 52: 1411–1422.
- Grabe S. A., Barron J., 2004. Sediment contamination, by habitat, in the Tampa Bay estuarine system (1993–1999): PAHs, pesticides and PCBs. *Environmental Monitoring and Assessment* 91: 105–144..
- Koh C.-H., Khim J.S., Kannan K., Villeneuve D.L., Senthilkumar K., Giesy J.P., 2004. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), biphenyls (PCBs), and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and 2,3,7,8-TCDD equivalents (TEQs) in sediment from the Hyeongsan River, Korea. *Environmental Pollution* 132: 489–501.
- Kowalewska G., Konat-Stepowicz J., Wawrzyniak-Wydrowska B., Szymczak-Zyła M., 2003. Transfer of organic contaminants to the Baltic in the Odra Estuary. *Marine Pollution Bulletin* 46: 703–718.
- Letellier Muriel (1998). Extraction assistée par rayonnement micro-ondes de contaminants organiques dans l'environnement. Thèse d'université, Université Bordeaux I, n°1957.
- Matthiessen P., R. Law (2002) Contaminants and their effects on estuarine and coastal organisms in the United Kingdom in the late twentieth century. *Environmental pollution*, 120, 739-757.
- Mazéas Laurent (2000). Etude de l'origine et du devenir des hydrocarbures dans le milieu marin : approches moléculaires et isotopique- application aux pollutions pétrolières. Thèse d'université, Université Bordeaux I, n°2294.
- Mazéas O., Budzinski H. (2005). Solid phase extraction and purification for the quantification of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in fish bile. *Anal. Bioanal. Chem.*, 383, 985–990.
- Mazéas Olivier (2004). Evaluation de l'exposition des organismes aux HAP dans le milieu marin par le dosage des métabolites de HAP - Cas de la marée noire Erika. Thèse d'université, Université Bordeaux I, n°2945.

- McCready S., D. J. Slee, G. F. Birch, S. E. Taylor (2000) The distribution of PAHs in surficial sediments of Sydney Harbour, Australia. *Mar. Poll. Bull.*, 40, 999-1006.
- McElroy AE, Farrington JW, Teal JM. (1989). Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. Dans *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*. Varanasi U, ed. CRC, Boca Raton, FL, USA, 1-40.
- Monosson E., Ashley J. T. F., McElroy A. E., Woltering D., Elskus A. A. (2003) PCB congener distributions in muscle, liver and gonad of *Fundulus heteroclitus* from the lower Hudson River Estuary and Newark Bay. *Chemosphere*, 52, 777-787.
- OSPAR, 2000. Report of an assessment of trends in the concentration of certain metals, PAHs and other organic compounds in the tissues of various fish species and blue mussels. OSPAR Commission Ad Hoc working group on monitoring, 1998. <http://www.ospar.org/fr/html/qsr2000/qfc4.htm/>
- Perraudin Emilie (2005). Réactivité des HAP adsorbés sur des particules modèles d'intérêt atmosphérique : mesures cinétiques, développements analytiques et analyse des produits d'oxydation. Thèse d'université, Université Bordeaux I, n°2919.
- RNO 2006.- Surveillance du Milieu Marin. Travaux du RNO. Edition 2006. Ifremer et Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable. ISSN 1620-1124
- RNO 2000.- Surveillance du Milieu Marin. Travaux du RNO. Edition 2000. Ifremer et Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement. ISSN 1620-1124
- Rocher B., Le Goff J., Peluhet L., Briand M., Manduzio H., Gallois J., Devier M.H., Geffard O., Gricourt L., Augagneur S., Budzinski H., Pottier D., André V., Lebailly P., Cachot J. (2006) Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. *Aquatic Toxicology*, 79, 65-77.
- Ruddock P. J., D. J. Bird, D. V. McCalley (2002). Bile metabolites of PAHs in three species of fish from the severn estuary. *Ecotoxicology and environmental safety*, 51, 97-105.
- Sellström U., A. Kierkegaard, T. Alsberg, P. Jonsson, C. Wahlberg, C. De Witt (1999) Brominated flame retardants in sediments from European estuaries, the Baltic Sea and in sewage sludge. *Organohalogen Compounds*, 40, 383-386.
- Tapie Nathalie (2006). Contamination des écosystèmes aquatiques par les PCB et les PBDE : Application à l'estuaire de la Gironde. Thèse d'université, Université Bordeaux I, n°3325.
- Tapie N., H. Budzinski, K. Le Ménach (2008). Fast and efficient extraction methods for the analysis of persistent organohalogen pollutants in biological matrices. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008 (sous presse).
- Thompson Sara (1999a). Détermination des composés aromatiques et organochlorés dans l'environnement marin. Thèse d'université, Université Bordeaux I, n°2083.

- Thompson S, Budzinski H, Garrigues P. (1999b) Comparison of PCB and DDT distribution between water-column and sediment-dwelling bivalves in Arcachon Bay, France. *Mar Poll Bull*, 38, 8, 655-662.
- Varanasi U., Stein J. E., Nishimoto M. (1989). Biotransformation and disposition of PAH in fish. Dans *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*. Varanasi U, ed. CRC, Boca Raton, FL, USA, 93-150.
- Viguri J., J. Verde, A. Irabien (2002) Environmental assessment of PAHs in surface sediments of the Santander Bay, Northern Spain. *Chemosphere*, 48, 157-165.
- White K.L. (1986). An overview of immunotoxicology and carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Envir. Carcino. Revs.*, C4, 163-202.
- Woodhead R. J., Law R. J., Matthiessen P., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments around England and Wales, and their possible biological significance. *Marine Pollution Bulletin* 38: 773-790.

VI Investigations biologiques sur le flet

6.1 Distribution du sexe ratio, des tailles, et de traits biologiques liés à la fitness (indice de condition, croissance, fécondité)

6.1.1 Matériel et méthodes

Lors de chaque **prélèvement**, les différentes captures sont mesurées au mm. Un prélèvement de sang est alors réalisé dans la veine caudale. La cavité générale est alors ouverte et les poissons sont alors sexés macroscopiquement, éviscérés et pesés. Un prélèvement est alors réalisé sur la bile, le foie. Les gonades sont aussi pesées et fragmentées pour différentes analyses. Des prélèvements sur le muscle sont aussi réalisés. Au final, la boîte crânienne est ouverte et le prélèvement des otolithes est mené.

L'indice de condition reflète l'état d'embonpoint d'un individu, c'est-à-dire sa capacité à accumuler plus ou moins de réserves sous forme de protéines et/ou de glycogène dans les muscles, selon la formule $K = \text{poids du poisson éviscéré (g)} / (\text{longueur totale (mm)})^3$. Cet indice de condition varie naturellement en fonction du milieu dans lequel l'animal évolue (température, abondance de nourriture, etc.) ainsi qu'en fonction de son cycle de reproduction (Lambert & Dutil, 1997). Cet indice simple à mesurer peut cependant être considéré comme un indicateur de l'état général des organismes aquatiques et peut renseigner indirectement sur les coûts métaboliques induits par un stress polluant.

L'étude de la **croissance individuelle** du poisson est pertinente en écotoxicologie, elle permet en effet d'observer indirectement les effets d'un stress polluant sur une des composantes de la « fitness » des organismes et présente l'avantage d'intégrer l'histoire de vie des individus (Adams *et al.*, 1992). Les poissons, vertébrés poïkilothermes présentent une croissance discontinue rythmée par les saisons. Dans les régions tempérées à hivers marqués, ce rythme saisonnier est identifié dans certaines structures telles que les otolithes, par un dépôt de substances disposées en stries concentriques autour d'un point central : le noyau ou nucleus. L'analyse des otolithes de flets est relativement simple en lumière réfléchie sur la sagitta (le plus grand otolithe sur les trois disponibles chez les poissons). Le noyau central apparaît sous la forme d'une zone blanche (fortement calcifiée) et autour de lui alternent des bandes

concentriques étroites et sombres (plus faiblement calcifiées) élaborées pendant la période hivernale, et des bandes concentriques blanches et généralement plus larges correspondant à la croissance rapide de la période printemps-automne (Fig. 7). Les dépôts de matériaux clairs et sombres alternent donc en suivant le rythme des saisons et la croissance plus ou moins forte du poisson

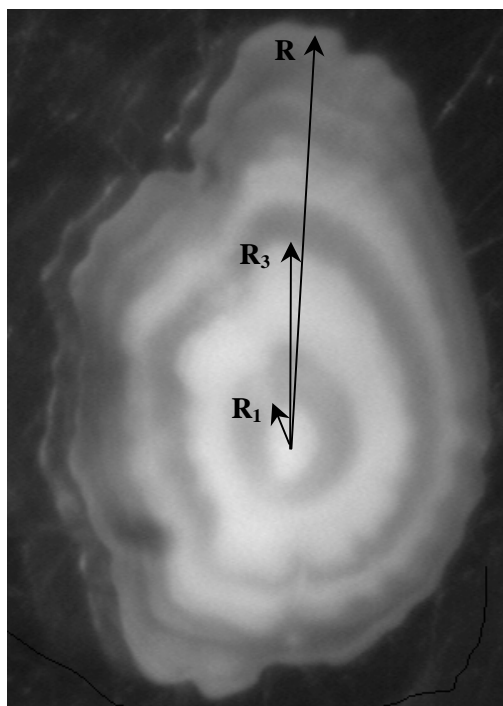


Figure 7, otolithe de flet de 5 ans, observé en lumière transmise

Différentes mesures ont ainsi été réalisées sur les otolithes à l'aide du logiciel de traitement d'image UTHSCA Image Tool (Wilcox *et al.*, 1997) et compte tenu de la relation linéaire qui existe entre la longueur totale du poisson (L_t) et le rayon total de l'otolithe (R) ($L_t = aR + b$, où a et b sont des constantes), il est possible d'estimer la taille qu'avait le poisson (L_i) au moment du dépôt de chacune des stries (R_i), et ainsi de reconstituer sa croissance aux différents moments de sa vie : $L_i = [(aR_i + b) / (aR + b)] \times L_t$ (Fig. 3). La croissance du flet est maximale durant ses deux premières années (Masson, 1987) ; aussi, le taux de croissance considéré dans ce projet (TC) a été estimé par rétro-calcul entre le début de son premier hiver (L_1) et le début de son deuxième hiver (L_3) selon la formule : $TC = L_3 - L_1$ (Fig. 3). L'âge des poissons a également été déterminé par la détermination du nombre d'hivers (comptage des bandes sombres).

La fécondité, c'est-à-dire le nombre d'ovocytes matures produit par une femelle, est une composante importante de la « fitness » des individus et son estimation moyenne au niveau d'une population peut potentiellement être un paramètre pertinent pour évaluer l'impact d'un stress sur les populations. La fécondité n'est cependant qu'une mesure du potentiel reproducteur de l'individu et non pas une mesure de reproduction effective qui prend en compte le réel succès reproducteur ; rappelons que notre étude est réalisée sur des individus échantillonnés dans le milieu naturel, ne permettant donc pas d'analyser la fertilité des femelles. La fécondité ne s'évaluant que sur des femelles sexuellement matures, ce paramètre ne peut être estimé qu'en pleine période de reproduction (pour le flet, en janvier/février sur les côtes atlantiques françaises). Les gonades entières des femelles échantillonnées sont pesées, un échantillon étant alors prélevé, pesé et placé plusieurs mois dans une préparation de Gilson

afin de dissocier le tissu ovarien et permettre la libération des ovocytes (Simpson, 1951). La quantité d'ovocytes et leur diamètre ont ensuite été calculés à partir de l'échantillon de gonades, à l'aide d'une caméra couplée à une loupe binoculaire et du logiciel de traitement d'image UTHSCA Image Tool (Wilcox *et al.*, 1997). Seuls les ovocytes matures (appartenant à la cohorte des ovocytes les plus gros) ont été considérés pour estimer le nombre d'œufs destinés à la ponte sur l'échantillon de gonade prélevé ; la fécondité absolue par femelle est alors estimée en prenant en compte le poids total des ovaires.

Les données de fécondité acquises lors de ce projet (échantillonnages de femelles mûres pour Ster, Vilaine, Loire et Gironde, en janvier 2005 et 2006) ont été complétées par des données de fécondité complémentaires acquises en janvier-février 2003 sur les flets du Ster, de la Loire et de la Gironde (Marchand *et al.*, 2004) ; l'objectif a été ici de produire des estimations plus robustes de la fécondité par estuaire.

6.1.2 Résultats et discussions

Evaluation du sexe ratio

Tableau 1. Proportions de flets femelles et mâles échantillonnés dans les estuaires.

Estuaire	Nb de poissons	% femelles	% mâles
<i>Ster - hiver</i>	28	57,14	42,86
<i>Ster - été</i>	30	43,33	56,67
<i>Vilaine - hiver</i>	35	57,14	42,86
<i>Vilaine - été</i>	30	63,33	36,67
<i>Loire - hiver</i>	35	57,14	42,86
<i>Loire - été</i>	30	76,67	23,33
<i>Gironde - hiver</i>	35	68,57	31,43
<i>Gironde - été</i>	30	60,00	40,00

On observe que les proportions femelles/mâles (Tableau 1) sont plus équilibrées pour l'estuaire témoin. Cette tendance est à considérer avec une certaine précaution au vu des effectifs relativement réduits des poissons capturés par estuaire et par saison. La proportion de femelles relativement plus forte par rapport à celle des mâles dans les milieux contaminés pourrait être aussi liée à un biais d'échantillonnage dans ces milieux vers les individus de plus grosses tailles (les femelles ont une longévité plus forte par rapport aux mâles et donc une taille moyenne supérieure) ; rappelons que les pêches sont effectuées au chalut dans les estuaires contaminées et fournissent donc un nombre de captures nettement plus élevé que celui observé pour le Ster, où la pêche est réalisée avec un filet maillant et où tous les individus pêchés sont prélevés.

Distribution de longueurs

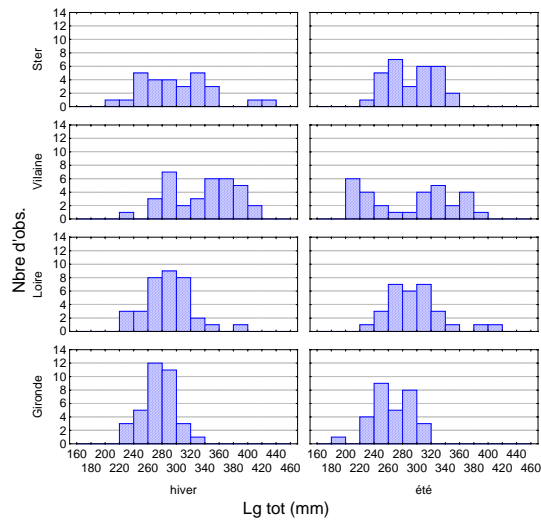


Figure 8. Distribution de fréquence de tailles des flets prélevés.

Tous les poissons capturés (sub-adultes/adultes) ont un âge compris entre 2 et 5 hivers sur les 4 estuaires, pour des tailles comprises entre 20 et 42 cm de longueur totale (Fig. 8). On remarque sur la Gironde des tailles relativement réduites entre 20 et 32 cm.

Indices de condition

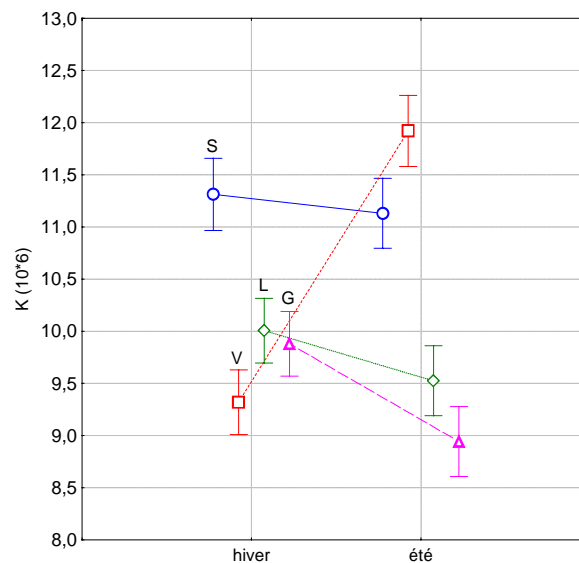


Figure 9. Moyenne et intervalle de confiance pour l'indice de condition du flet (S : Ster, V : Vilaine, L : Loire, G : Gironde).

L'indice de condition K reste significativement plus élevé pour la population du Ster relativement à ceux observés dans les systèmes les plus contaminés (Gironde et Loire), quelle que soit la saison considérée (Fig. 9). L'indice de condition pour les poissons de la Vilaine présente une tendance qui lui est propre ; K étant faible et cohérent avec celui des autres populations contaminées en hiver, et atteignant le niveau du Ster en été. **La forte variabilité de l'indice de condition en Vilaine et notamment sa faible valeur en hiver pourrait être liée à une allocation d'énergie particulièrement importante vers l'effort de reproduction**

pour cette population, qui maintiendrait en période de repos sexuel un niveau d'embonpoint identique à celui d'un système non contaminé.

Ces valeurs basses de K dans les populations les plus lourdement contaminées sont en accord avec nos résultats précédents obtenus sur le flet, dans différentes estuaires de la façade atlantique française (Seine, Loire, Gironde) relativement à l'estuaire du Ster (Marchand et al, 2003, 2004).

Taux de croissance

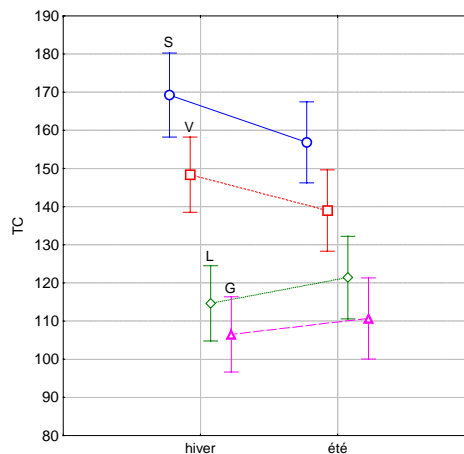


Figure 10. Moyenne et intervalle de confiance du taux de croissance entre l'hiver 1 et l'hiver 2 pour le flet (S : Ster, V : Vilaine, L : Loire, G : Gironde).

Les taux de croissance moyens observés pour le flet (Fig. 10) sont en accord avec nos résultats précédents (Marchand et al, 2003, 2004) ; **les croissance les plus fortes étant observées sur le Ster et la Vilaine (respectivement ≈ 165 et 145 mm/an), relativement aux estuaires les plus contaminés la Loire et la Gironde (respectivement ≈ 117 et 108 mm/an).**

Fécondité

Une estimation non linéaire de la relation entre la fécondité absolue (Y : en nombre d'œufs destinés à la ponte) et la longueur totale du flet (X en mm) a été menée par estuaire. La courbe de puissance permet de décrire un ajustement satisfaisant entre les données réelles et les données du modèle : $Y = a X^b$.

Tableau 2. Estimation de la fécondité absolue pour une femelle de flet (taille standard de 35 cm) dans les estuaires.

Estuaire	Estimation de : a	Estimation de : b	Estimation de la fécondité pour une femelle de 350 mm
Ster	29,6928	1,93556	2 493 718,90
Vilaine	0,174 e-8	5,76827	823 039,40
Loire	0,030532	3,03541	1 610 811,93
Girond e	7,34554	2,03106	1 079 390,45

Une estimation de la fécondité absolue pour une taille standard de 35 cm dans les différents estuaires (Tableau 2) met en évidence **une fécondité supérieure chez les femelles de l'estuaire témoin (2,5 millions d'œufs) relativement à celles observées dans les milieux contaminés (830.000 < fécondité < 1,6 millions d'œufs)**. Ce résultat est convergent avec les fécondités relatives réduites pour la Loire et La Gironde relativement au Ster, observées dans notre travail précédent (Marchand et al, 2004) ; cette étude ayant par ailleurs souligné la chute très forte de la fécondité relative pour l'estuaire très fortement pollué de la Seine.

6.1.3 Conclusions

La proportion de femelles pourrait être supérieure dans les estuaires contaminés relativement à l'estuaire témoin, cette tendance doit cependant être considérée avec précautions relativement aux biais possibles de l'échantillonnage ; elle devra être confirmée sur des effectifs plus importants. Les individus capturés dans les différents estuaires sont des poissons sub-adultes et adultes; de grosses différences d'âges et de tailles ne sont pas détectées dans les prélèvements.

Une diminution globale du taux de croissance, de l'indice de condition et de la fécondité dans les populations de flets provenant des estuaires contaminés (Vilaine, Loire, Gironde) est détectée par rapport à l'estuaire du Ster (estuaire de « référence »), cette tendance ayant été relevée dans nos travaux précédents (Marchand et al, 2003, 2004).; on remarque que la baisse de ces paramètres potentiellement liés à la fitness est généralement moins marquée pour la Vilaine relativement aux deux systèmes les plus lourdement impactés par le stress chimique : Loire et Gironde ; on remarque une exception notable pour la fécondité de la Vilaine qui est la plus faible du jeux de données.

Ces tendances mettent en évidence que les mécanismes de protection et/ou de détoxification probablement mis en place par les organismes impliquent des coûts énergétiques qui peuvent réduire de ce fait l'énergie disponible pour les autres fonctions mesurées (croissance, accumulation de réserves et reproduction). De tels « trade-offs » (ou compromis) énergétiques ont déjà été décrits dans la littérature (Gimeno et al, 1995 ; Van Straalen & Hoffman, 2000). Des signes de stress chimique associés à une diminution du taux de croissance des individus ont notamment été observés dans des populations de poissons estuariens d'Amérique du Nord (Weis & Weis, 1989). Des expérimentations effectués en milieux contrôlés ont également montré une réduction significative de la fécondité des poissons après exposition à des xénobiotiques (Johnson *et al.*, 1994 ; Weber, 1993).

Il faut cependant rester prudent face à l'existence de variables autres que la contamination entre les différents estuaires (telles que la température, la salinité, la turbidité, la surface du bassin versant, l'abondance en nourriture, etc.) qui peuvent moduler les réponses de organismes face au stress chimique et rendre ainsi difficile l'analyse fine des relations entre certains traits biologiques et le niveau de pollution chimique (Knaepkens *et al.*, 2002 ; Larno, 2004).

6.1.4 Bibliographie

- Adams S.M., Crumby W.D., Greeley M.S., Ryon M.G. & Schilling E.M. 1992. Relationships between physiological and fish population responses in a contaminated stream. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11 (11): 1549-1557.
- Gimeno S., Gerritsen A., Bowmer T. & Komen H. 1996. Feminization of male carp. *Nature* 384: 221-222
- Johnson L.L., Stein J.E., Collier T.K., Casillas E. & Varanasi U.V. 1994. Indicators of reproductive development in prespawning female Winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from urban and non-urban estuaries in the Northeast United States. *Science of the Total Environment* 141 : 241-260.
- Knaepkens G., Knapen D., Bervoets L., Hanfling B., Verheyen E. & Eens M. 2002. Genetic diversity and condition factor: a significant relationship in Flemish but not in German populations of the European bullhead (*Cottus gobio* L.). *Heredity* 89: 280-287.
- Lambert Y. & Dutil J.D. 1997. Can simple condition indices be used to monitor and quantify seasonal changes in the energy reserves of Atlantic cod (*Gadus morhua*)? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54 (1): 104-112.
- Larno V. 2004. Réponses génétiques et physiologiques de populations de chevaine (*Leuciscus cephalus*) à la contamination chimique dans le bassin du Rhône. Thèse de doctorat de l'Université Claude Bernard Lyon I.
- 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.
- Masson G. 1987. Biologie et écologie d'un poisson plat amphihaline, le Flet (*Platichthys flesus flesus*, Linné, 1758) dans l'environnement ligérien : distribution, démographie, place au sein des réseaux trophiques. Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale.
- Simpson A.C. 1951. The fecundity of the plaice. *Fish Investigation* 17 (5): 1-27.
- Van Straalen N.M. & Hoffman A.A. 2000. Review of Experimental Evidence for Physiological Costs of Tolerance to Toxicants. In: *Demography in Ecotoxicology* (eds. Kammenga & Laskowski), pp. 147-161.
- Weber D.N. 1993. Exposure to sublethal levels of waterborne lead alters reproductive-behaviour patterns in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Neurotoxicology* 14 (2-3): 347-358.
- Weis J.S. & Weis P. 1989. Tolerance and stress in a polluted environment. *BioScience* 39: 89-95.

Wilcox D., Dove B., McDavid D. & Greer D.B. 1997. UTHSCSA Image Tool IT Version 1.27. Department of dental diagnostic science. University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas. Available at : <http://ddsdx.uthscsa.edu/>.

6.2 Réponses moléculaires : expression de gènes

6.2.1 introduction sur le stress chimique et l'expression de gènes

L'approche toxico-génomique, utilisant les outils de la biologie moléculaire, est une approche récente en écotoxicologie ; elle met en œuvre des recherches sur les altérations par les contaminants des transferts d'informations génétiques intracellulaires à des niveaux subléthaux. Les modifications d'expression de gènes sont des composantes importantes de l'acclimatation et/ou de l'adaptation des organismes aux changements de l'environnement et précèdent généralement les manifestations d'importantes altérations fonctionnelles, donnant ainsi à l'étude des profils d'expression de gènes un énorme potentiel de détection précoce des altérations induites par les molécules toxiques (Schulte, 2001). Chez l'homme par exemple, des variations d'expression de gènes spécifiques sont associées à un certain nombre de pathologies (cancers, crises cardiaques, lymphomes, etc.) (Alizadeh *et al.*, 2000 ; Archacki *et al.*, 2003). Les développements récents de nouvelles technologies (banques soustractives, puces à ADN, PCR quantitative, etc.) ont ouvert ce champ d'investigation à l'écotoxicologie. L'application de ces technologies pour détecter de possibles facteurs de stress notamment dans les milieux aquatiques est en plein développement (Marchand *et al.*, 2008 ; Sheader *et al.*, 2004 ; Straub *et al.*, 2004 ; Williams *et al.*, 2003).

Dans ce chapitre, notre objectif principal est de rechercher, dans les estuaires contaminés relativement au milieu de référence, de possibles expressions différentielles (activation ou inhibition) d'un certain nombre de gènes candidats, au niveau du foie des poissons. Cinq gènes ont été retenus :

- 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).

Des altérations dans l'expression de ces gènes ont été mises en évidence chez des flets soumis à des contaminations expérimentales ou prélevés en estuaires contaminés (George *et al.*, 2004; Marchand *et al.*, 2006 ; Williams *et al.*, 2003). Nous souhaitons donc tester la validité de ces nouveaux outils moléculaires, pour explorer de possibles effets des contaminants sur les populations dans les milieux naturels.

Rappelons que le Cyt P450 1A est classiquement impliqué dans la biotransformation des polluants hydrophobes en composés hydrosolubles mais aussi dans une multitude de voies métaboliques endogènes importantes (Flammarion, 1997). Cette biotransformation est une conversion enzymatique de xénobiotiques qui les rend plus hydrosolubles afin de faciliter leur excrétion par l'organisme ; notons que cette réaction enzymatique peut également conduire à une activation des molécules, i.e. à une augmentation de la toxicité des molécules résultantes relativement à celle des molécules mères (Van der Oost *et al.*, 2003).

La Cyt C oxydase (Cox) et l'ATP synthase (ou ATPase) sont impliquées dans la production d'énergie au niveau cellulaire (Marchand *et al.*, 2006); la première étant la dernière

enzyme de la chaîne de transfert d'électrons de la membrane mitochondriale impliquée dans la respiration, la deuxième étant quant à elle l'ultime complexe de la chaîne respiratoire et catalysant la formation d'ATP.

La ferritine est une protéine majeure de la séquestration et de la régulation de l'homéostasie du fer dans la cellule. Le fer est un élément essentiel pour la cellule car il intervient dans de nombreuses réactions enzymatiques (synthèse d'ADN), transport d'oxygène (hémoglobine) et détoxification des xénobiotiques. Cette protéine pourrait jouer un rôle clé dans la protection des cellules vis à vis du stress oxydant et de l'hypoxie (Irace et al, 2005 ; Richardson, 2003).

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 chez les crustacés et les poissons (Horst et al, 2007 ; Marchand et al, 2006).

6.2.2 Matériel et méthodes

L'expression des gènes retenus a été évaluée sur le foie, organe assurant de nombreuses fonctions vitales (digestion, stockage des réserves énergétiques,..) et intervenant dans les mécanismes majeurs de détoxification des xénobiotiques.

Les ARN totaux présents dans le foie des individus échantillonnés en estuaire sont extraits au tampon guanidium. Un dosage au spectrophotomètre (260 nm) est ensuite réalisé pour vérifier leur qualité et quantité. 20 µg de ces ARN sont alors transformés en ADN complémentaire (ADNc) par une RT-PCR (Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction). Pour chaque individu, 1µg de ces ADNc est amplifié par PCR en présence d'amorces spécifiques au segment d'ADNc que l'on souhaite amplifier.

Les amorces pour le Cyt P450 ont été dessinées au LEMAR à partir de la séquence publiée sur le flet par Williams et al (2000) :

CYP450 Forward : GGCTTGGTGACCCTCAGTGA

CYP 450 Reverse : CGGCTATTAATGCGCAAAAAG

Les amorces pour les gènes Cyt C oxidase, ATPase et BHMT ont été dessinées suite à notre production de banque SSH sur le flet (Marchand et al, 2006).

Les amorces pour la Ferritine ont également été dessinées au LEMAR :

Ferritine Forward : AAGAAACCGGCTCGTGATGA

Ferritine Reverse : GAGGGTCGTTGTGCTTGGA

Suite à la PCR, une migration électrophorétique sur gel d'agarose (1,5%, Tampon TBE 0,5 X, plus 10µl de bromure d'éthidium) est effectuée sur les produits obtenus pour chaque gène étudié. Parallèlement, l'ARN ribosomal 18S est utilisé comme marqueur interne de la RT-PCR, dans les mêmes conditions d'amplification et de traitement pour tous les individus et gènes étudiés. Le gène codant pour le 18S, dont l'expression est très peu variable quel que soit l'individu considéré est considéré ici comme un « gène de ménage ».

Après migration, le gel est placé sous ultraviolet et visualisé par fluorescence. L'image obtenue est traitée par le logiciel Gene Profiler 4.03 (Scanalytics) qui permet de calculer un rapport entre la densité optique (DO) du gènes candidat / la DO du 18S. On obtient ainsi une expression relative de chaque gène.

6.2.3 Résultats et discussion

Cyt P450 1A

L'expression relative du Cyt P450 1A relativement à celle du 18S est ici considérée en prenant en compte le sexe (Fig. 11); il a été en effet classiquement observé chez les poissons un différentiel parfois marqué particulièrement en période de reproduction, entre l'expression de ce gène chez le mâle relativement à la femelle (Flammarion, 2000).

On remarque pour les femelles une expression du Cyt P450 relativement plus faible pour le Ster, par rapport aux estuaires contaminés quelle que soit la saison considérée (Fig.11) ; **le différentiel entre Ster versus milieux contaminés (surtout Vilaine et Gironde) est plus particulièrement détectable en été (i.e. en période de repos sexuel)**. Pour les mâles, le différentiel d'expression entre Ster et estuaires contaminés est aussi mieux exprimé en été, avec là encore les plus fortes valeurs observées pour la Vilaine et la Gironde (Fig.11).

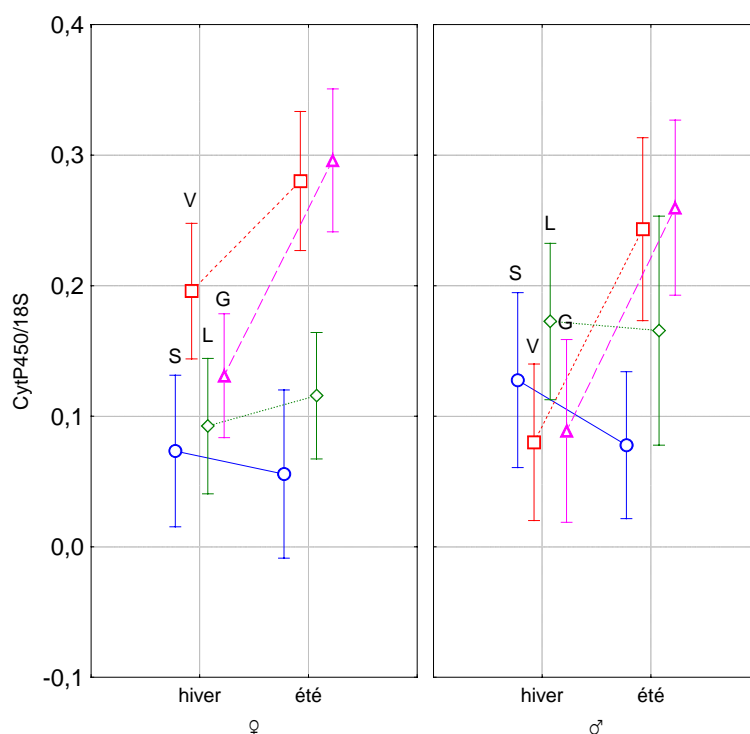


Figure 11. Expression relative du gène Cyt P450 dans le Ster (S), la Vilaine (V), la Loire (L) et la Gironde (G.).

Globalement, la surexpression relative du Cyt P450 1A observée ici dans les milieux contaminés relativement au milieu peu contaminé a été classiquement observée dans la littérature (George et al, 2004 ; Williams et al, 2003) ; une corrélation étant détectée entre l'élévation du niveau de transcription de ce gène et son produit final (ie l'activité enzymatique EROD). Au final la surexpression du Cyt P450 1A pourrait retraduire au niveau du foie, particulièrement en été (période de repos sexuel) une augmentation des activités de transformation de polluants d'origine organique.

Cytochrome C oxidase, ATPase

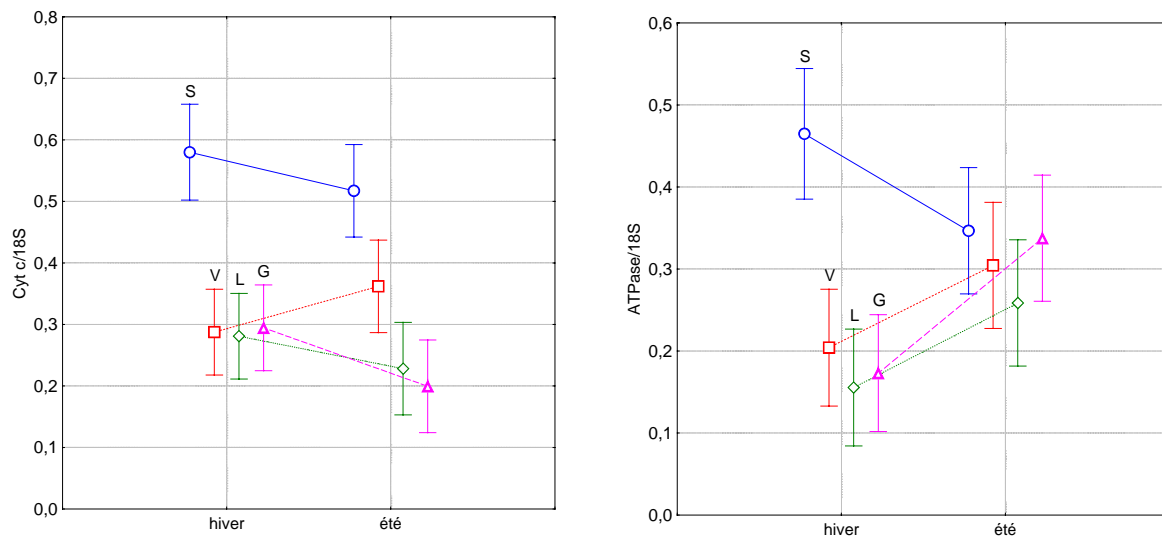


Figure 12. Expression relative des gènes Cyt P450 et ATPase dans le Ster (S), la Vilaine (V), la Loire (L) et la Gironde (G.).

On remarque sur la figure 12, que le niveau d'expression des deux gènes impliqués dans la production d'énergie (Cyt C & ATPase) est nettement plus élevé en hiver pour les individus de l'estuaire témoin par rapport aux individus des milieux contaminés. En été, l'expression Cyt C demeure plus faible pour les contaminés relativement au témoin, les niveaux d'expression de l'ATPase atteignant par contre des niveaux similaires pour les contaminés et les témoins (Fig. 12).

Le cytochrome c oxydase est une enzyme fondamentale pour la cellule, responsable de plus de 90% de la consommation d'oxygène par les organismes vivants (Xu et al, 2005). L'expression plus forte de ce gène en milieu peu contaminé, quelle que soit la saison, pourrait témoigner d'une meilleure capacité des poissons peu exposés à maintenir une forte production d'énergie au niveau cellulaire relativement aux individus subissant des contaminations chroniques.

L'expression de l'ATPase présente donc des réponses plus contrastées, les niveaux d'activités ATPase des poissons contaminés en été, étant similaire à ceux des témoins. Ce différentiel d'expression entre Cyt C et ATPase confirme une tendance déjà observée dans un comparatif précédent des réponses du flet en Ster/Vilaine (Marchand et al, 2006).

Ferritine

Les niveaux d'expression de la ferritine restent stables quelle que soit la saison pour l'estuaire témoin comme pour les estuaires de la Loire et de la Gironde (Fig.13). On remarque par contre une surexpression de ce gène en Vilaine, particulièrement significative en été.

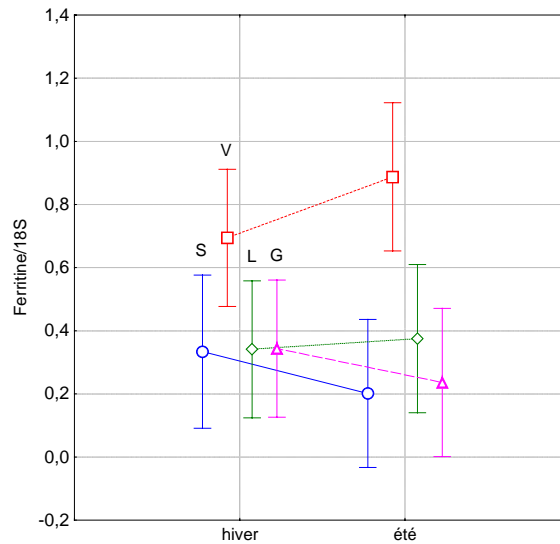


Figure 13. Expression relative de la Ferritine dans le Ster (S), la Vilaine (V), la Loire (L) et la Gironde (G.).

L'expression de la ferritine peut être fortement liée à la biosynthèse de l'hème (Scranzhoffer et al, 2006). Nous formulons l'hypothèse que la surexpression de la Ferritine en Vilaine pourrait être liée à une production accrue d'hémoglobine, conduisant à un apport supplémentaire d'oxygène au niveau des tissus ; ce mécanisme pourrait jouer un rôle essentiel dans la réponse du poisson au stress hypoxique. Précisons que l'estuaire de la Vilaine présente une eutrophisation importante qui peut s'accompagner d'évènements hypoxiques plus ou moins sévères (Ménèsquen, 2001) ; cette tendance à l'hypoxie étant relativement peu marquée dans les autres systèmes fluviaux de ce projet. Notons qu'une surexpression de la ferritine a été également décrite chez le flet d'un l'estuaire très pollué de la Tyne en Grande Bretagne (Williams et al, 2003).

BHMT

Les patterns dans l'expression de la BHMT sont assez complexes, avec peu de variabilité dans les expressions de ce gène pour le Ster et la Vilaine, au cours des 2 saisons. La Gironde et la Loire présentent les plus faibles valeurs en hiver et les plus fortes valeurs en été (Fig. 14).

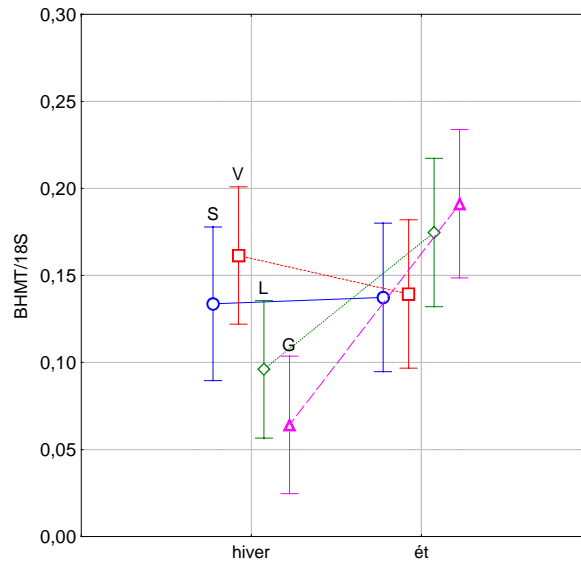


Figure 14. Expression relative de la BHMT dans le Ster (S), la Vilaine (V), la Loire (L) et la Gironde (G.).

Notons qu'une surexpression de la BHMT a été observée dans différentes populations de poissons soumises à une contamination chimique en contamination expérimentale, et en populations contaminées relativement à des populations témoins (Marchand et al, 2006 ; Straub et al, 2004) ; ce gène pourrait constituer dans l'avenir un bon candidat pour explorer les réponses du poisson au stress chimique. Les patterns d'expression de ce gène en milieu naturel nécessitent cependant des explorations complémentaires pour confirmer potentiellement son intérêt en écotoxicologie.

6.2.4 Bibliographie

- Abarnou A., Burgeot T., Chevreuil M., Leboulenger F., Loizeau V., Madoulet-Jaouen A., Minier C. (2000). Les contaminants organiques : quels risques pour le monde vivant ? Programme Scientifique Seine-Aval (eds Ifremer Brest). 35pp.
- Adams S.M., Crumby W.D., Greeley M.S., Ryon M.G. & Schilling E.M. 1992. Relationships between physiological and fish population responses in a contaminated stream. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11 (11): 1549-1557.
- Alizadeh A.A., Eisen M.B., Davis R.E., Ma C., Lossos I.S., Rosenwald A., Boldrick J.C., Sabet H., Tran T., Yu X., Powell J.I., Yang L., Marti G.E., Moore T., Hudson J.Jr, Lu L., Lewis D.B., Tibshirani R., Sherlock G., Chan W.C., Greiner T.C., Weisenburger D.D., Armitage J.O., Warnke R., Levy R., Wilson W., Grever M.R., Byrd J.C., Botstein B., Brown P.O. & Staudt L.M. 2000. Distinct Types of Diffuse Large B-Cell Lymphoma 252 Identified by Gene Expression Profiling. *Nature* 403: 503-511.
- Archacki S.R., Angheloiu G., Tian X-L., Tan F.L., DiPaola N., Shen G.Q., Moravec C., Ellis S., Topol E.J. & Wang Q. 2003. Identification of new genes differentially expressed in coronary artery disease by expression profiling. *Physiological Genomics* 15:65-74.

- Boutier B., Chiffolleau J.F., Jouanneau J.M., Latouche C. (1989). La contamination de la Gironde par le cadmium : origine, extension, importance. Rapport Scientifique et Technique Ifremer, 14pp.
- Broeg K., Zander S., Diamant A., Korting W., Krüner G., Paperna I., Westernhagen H.V. (1999). The use of fish metabolic, pathological and parasitological indices in pollution monitoring. *Helgoland Marine Research* 53 : 171-194.
- Cachot J., Chérel 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.
- Scranzhofer M., Schiffrer M., Cabrera J.A. (2006). Remodeling the regulation of iron metabolism during erythroid differentiation to ensure efficient heme biosynthesis. *Blood* 107 : 4159-4167.
- DIREN Bretagne . (2003). Qualité des eaux des estuaires bretons. <http://www.bretagne-environnement.org/estuaire/index.html>.
- Durou C. (2006). Recherche d'indicateurs de l'état physiologique de l'annélide polychète endogée *Nereis diversicolor* en relation avec la qualité du milieu. Ph D Thesis, Université de Nantes.
- Flammarion P. (1997). Mesure *in situ* de l'induction du cytochrome P450 1A chez les cyprinidés d'eau douce. Optimisation de l'interprétation. Ph D Thesis, Université de Metz.
- Forget J. (1998). Impact neurotoxique de contaminants (pesticides et métaux) sur un crustacé marin *Tigriopus brevicornis* (Müller). Caractérisation de la cholinestérase et application à la surveillance des effets des polluants sur l'environnement marin. Ph D Thesis, Université Paris VI.
- Gimeno L., Ferrando M.D., Sanchez S., Gimeno L.O., Andreu E. (1995). Pesticide effects on eel metabolism. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 31 : 153-157.
- George S., Gubbins M., MacIntosh A., Reynolds W., Sabine V., Scott A., Thain J. (2004). A comparison of pollutant biomarker responses with transcriptional responses in European flounders (*Platichthys flesus*) subjected to estuarine pollution. *Marine Environmental Research* 58 ; 571-575.
- Horst M.N., Walker A.N., Bush P., Wilson T., Chang E.S., Miller T., Larkin P. (2007). Pesticide induced alterations in gene expression in the lobster, *Homarus americanus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. D2 : 44-52.
- Irace C., Scorziello A., Maffettone C., Pignataro G., Matrone C., Adornetto A., Santamaria R., Annunziato L., Colonna A. (2005). Divergent modulation of iron regulatory proteins and ferritin biosynthesis by hypoxia/reoxygenation in neurons and glial cells. *Journal of Neurochemistry* 95(5) : 1321-1331.
- Johnson L.L., Stein J.E., Collier T.K., Casillas E. & Varanasi U.V. 1994. Indicators of reproductive development in prespawning female Winter flounder (*Pleuronectes*

- americanus*) from urban and non-urban estuaries in the Northeast United States. *Science of the Total Environment* 141 : 241-260.
- Knaepkens G., Knapen D., Bervoets L., Hanfling B., Verheyen E. & Eens M. 2002. Genetic diversity and condition factor: a significant relationship in Flemish but not in German populations of the European bullhead (*Cottus gobio* L.). *Heredity* 89: 280-287.
- Lambert Y. & Dutil J.D. 1997. Can simple condition indices be used to monitor and quantify seasonal changes in the energy reserves of Atlantic cod (*Gadus morhua*)? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54 (1): 104-112.
- Larno V. 2004. Réponses génétiques et physiologiques de populations de chevaine (*Leuciscus cephalus*) à la contamination chimique dans le bassin du Rhône. Thèse de doctorat de l'Université Claude Bernard Lyon I.
- Le Pimpec C. (2004). Etude des masses d'eau côtières et de transition fortement modifiées. Mémoire de DESS Génie Littoral Portuaire et des Estuaires. Université de Caen. 191pp.
- 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., Quiniou L., Riso R., Thébault M.T., Laroche J. (2004). Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aquat. Toxicol.* 70 : 327-343.
- Marchand, J., Tanguy, A., Charrier, G., Quiniou, L., Plee-Gautier, E., and Laroche, J. (2006). Molecular identification and expression of differentially regulated genes of the European flounder, *Platichthys flesus*, submitted to pesticides exposure. *Marine Biotechnology*, 8 :275-294.
- Marchand J., Tanguy A., Laroche J., Quiniou L., Moraga D. (2003). Responses of European flounder (*Platichthys flesus*) population to contamination in different estuaries from the East Atlantic Coast. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 260:273-284.
- 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. Lavoisier, Paris, 331-357.
- Ménesguen A. (2001). L'eutrophisation des eaux marines et saumâtres en Europe, en particulier en France. Rapport IFREMER DEL/EC/01.02. 59pp.
- Migaud G. (2006). Inventaire des ressources benthodémersales dans la masse d'eau de transition de la Loire. Mémoire de Master 2, Hydrobiologie. Université de Metz. 65pp.
- Minier C., Levy F., Rabel D., Bocquené G., Godefroy D., Burgeot T., Le Boulenger F. (2000). Flounder health status in the Seine Bay. A multibiomarker study. *Marine Environmental Research* 50: 69-73.
- Munsch C., Mosan K., Truquet I., Tronczynski J., (1997). Caractérisation chimique de la contamination organique dans l'estuaire de la Seine. Rapport Seine-Aval 1996, Agence de l'Eau Seine-Normandie, France.

- Pierron F., Beaudrimont M., Bossy A., Bourdineaud J.P., Brèthes D., Elie P., Massabuau J.C. (2007). Impairment of lipid storage by cadmium in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquat. Toxicol.*, 81 : 304-311.
- Richardson R. (2003). The role of hypoxia and nitrogen monoxide in the regulation of cellular iron metabolism. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 141 : 289-291.
- RNO (Réseau National d'Observation) (2003). Surveillance du milieu marin. Travaux du Réseau National d'Observation de la qualité du milieu (eds. Ifremer).
- RNO (2006). Bulletin du Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin. (eds. Ifremer).
- SAGE (Schéma d'aménagement et de gestion des eaux) Vilaine (1999). Projet de schéma d'aménagement et de gestion des eaux de la Vilaine, Atlas. Institution d'Aménagement de la Vilaine, La Roche Bernard.
- Samain J.F., McCombie H. Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Quae, Versailles. 379pp.
- Schulte P.M. 2001. Environmental adaptations as windows on molecular evolution. *Comparative Biochemistry and Physiology* 128B: 597-611.
- Shedden D.L., Gensberg K., Lyons B.P., Chipman J.K. (2004). Isolation of differentially expressed genes from European flounder by suppressive, subtractive hybridisation. *Marine Environmental Research* 58 : 553-557.
- Simpson A.C. 1951. The fecundity of the plaice. *Fish Investigation* 17 (5): 1-27.
- Straub P.F., Higham M.L., Tanguy A., Landau B.J., Phoel W.C., Hales L.S. & Thwing T.K.M. 2004. Suppression Subtractive Hybridization cDNA libraries to identify differentially expressed genes from contrasting fish habitats. *Marine Biotechnology* 6: 386-399.
- Tapie, N. (2006). Contamination des écosystèmes aquatiques par les PCB et PBDE : application à l'estuaire de la Gironde. Ph D thesis, Université de Bordeaux I. 276pp.
- Van Straalen N.M. & Hoffman A.A. 2000. Review of Experimental Evidence for Physiological Costs of Tolerance to Toxicants. In: *Demography in Ecotoxicology* (eds. Kammenga & Laskowski), pp. 147-161.
- Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 13: 57-149.
- Weber D.N. 1993. Exposure to sublethal levels of waterborne lead alters reproductive-behaviour patterns in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Neurotoxicology* 14 (2-3): 347-358.
- Williams T.D., Gensberg K., Minchin S.D. & Chipman J.K. 2003. A DNA expression array to detect toxic stress response in European flounder (*Platichthys flesus*). *Aquatic Toxicology* 65: 141-157.

- Weis J.S. & Weis P. 1989. Tolerance and stress in a polluted environment. *BioScience* 39: 89-95.
- Wilcox D., Dove B., McDavid D. & Greer D.B. 1997. UTHSCSA Image Tool IT Version 1.27. Department of dental diagnostic science. University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas. Available at : <http://ddsdx.uthscsa.edu/>.
- Williams T.D., Lee J.S., Sheader D.L., Chipman J.K. (2000). The cytochrome P450 1A gene (CYP1A) from European flounder (*Platichthys flesus*) , analysis of regulatory regions and development of a dual luciferase reporter gene system. *Marine Environmental Research* 50 : 1-6.
- Xu W., Charles I.G. & Moncada S. 2005. Nitric oxide: orchestrating hypoxia regulation through mitochondrial respiration and the endoplasmic reticulum stress response. *Cell Research* 15 (1): 63-65.

6.3 Réponses cellulaires : génotoxicité

Equipe ayant collaboré à l'étude :

INRA-EFPA, Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat, Laboratoire des Sciences de l'Environnement , Vaulx en Velin

Responsable scientifique : Alain Devaux, Ingénieur de recherche INRA

6.3.1 Problématique et objectif

Les polluants chimiques et en particulier les pesticides agissent à tous les niveaux d'organisation biologique, de la molécule à la cellule, du tissu à l'organe avant même d'avoir des effets visibles à des niveaux d'organisation supérieurs, c'est à dire la population, la communauté et l'écosystème dans sa globalité. Les délais de réponse et la signification écotoxicologique des paramètres mesurés dépendront du positionnement de ces derniers dans la hiérarchie biologique : les réponses mesurées par des biomarqueurs renseignent sur le mode d'action des contaminants et apparaissent rapidement après un stress chimique, mais ne permettent pas de prédire précisément les risques réellement encourus par la biocénose. Par contre, les réponses au niveau des populations ont une forte signification écotoxicologique mais ne témoignent que tardivement d'une atteinte sévère à l'intégrité de l'écosystème. Ainsi, bien que les dommages induits par les contaminants de l'environnement interviennent initialement aux niveaux moléculaire et cellulaire, les effets qui leur sont associés peuvent être visibles à des niveaux d'organisation biologique supérieurs, le pari étant d'essayer de les décrypter le long d'un continuum individu-population, en s'attachant dans un premier temps à l'étude de la transmission possible des effets d'une génération à l'autre.

Ces effets ultimes peuvent en partie être prédits sur la base des connaissances mécanistiques de la toxicité des produits chimiques, en particulier en ce qui concerne leur potentiel génotoxique. Ce type d'approche relève de l'écotoxicologie génétique définie comme l'étude des effets initiaux de xénobiotiques sur la structure et la fonctionnalité de l'ADN au sein d'un organisme et de leurs relations avec les effets observés à des niveaux d'organisation supérieurs. L'écotoxicologie génétique peut ainsi apporter une contribution importante au biomonitoring environnemental et à l'évaluation du risque écologique lié à la présence de composés chimiques toxiques. Durant la dernière décennie, un consensus

international est apparu sur la nécessité de traiter l'écotoxicologie génétique en essayant de relier les effets structuraux mesurés à l'échelle cellulaire et leur inscription au niveau populationnel (Attril et Depledge, 1997 ; Goksoyr *et al.*, 2003 ; Newman et Clements, 2008).

A l'échelle cellulaire, divers agents chimiques organiques et inorganiques ont la capacité d'interagir avec la molécule d'ADN et d'en modifier l'intégrité. Les dommages à l'ADN sont généralement classés en deux catégories : les lésions géniques (lésions fonctionnelles) induites par les agents mutagènes et les lésions chromosomiques (lésions structurales) induites par les agents clastogènes. Notons cependant que les agents clastogènes peuvent également agir comme des agents mutagènes et inversement. Les cassures simple et double brins de la molécule d'ADN constituent à ce titre un biomarqueur précoce et sensible d'une contamination du milieu naturel, utilisé avec succès chez diverses espèces, en particulier aquatiques. Ces dommages sont induits *via* divers mécanismes. En effet, les cassures reflètent la présence d'agents agissant directement sur la molécule d'ADN ou générateurs de toutes autres lésions structurales à l'origine de sites abasiques et alcali-labiles, candidates à la réparation et donc *in fine* génératrices de cassures. La fréquence élevée d'apparition de ce type de lésions combinée avec la sensibilité des diverses techniques de détection applicables à de nombreux types cellulaires d'invertébrés et vertébrés marins et dulçaquicoles, font de ces dommages primaires à l'ADN un outil adapté à l'évaluation du risque à priori et au biomonitoring environnemental (Winter *et al.*, 2004 ; Alink *et al.*, 2007 ; Barbee *et al.*, 2007). Les conséquences de ces dommages primaires peuvent être multiples comme l'initiation de la cancérogenèse et la génération d'effets héréditaires via des mutations sur les cellules germinales ou des phénomènes de mutagenèse (Würgler and Kramers, 1992). Des éléments essentiels à la pérennité des espèces peuvent ainsi être affectés comme le succès de la reproduction, la structure génétique et par conséquent la dynamique de population sous pression polluante (Newman et Clements, 2008).

Objectif de l'étude

Au sein du projet global visant à étudier les réponses de populations d'huître et de flet face à la pollution chimique dans différents estuaires de la façade atlantique, présentant un profil de contamination qualitativement et quantitativement contrasté, notre contribution visait :

1) à apporter des informations concernant l'impact génotoxique des pressions polluantes en place sur les organismes étudiés, approche justifiée par les éléments exposés précédemment,

2) à essayer de coupler ces informations avec des données concernant la variabilité génétique également analysée dans le projet (couplage phénotype-génotype) afin d'améliorer la compréhension des variations de performances entre individus conspécifiques, en recherchant les caractères possibles de résistance ou de sensibilité exprimés par ces variants génétiques.

6.3.2 Méthodologie : test des comètes

L'évaluation de l'impact génotoxique des polluants présents dans les estuaires étudiés a été réalisée en mesurant le niveau des dommages primaires à l'ADN exprimés en termes de cassures simple et double brins sur les cellules circulantes des organisme choisis (érythrocytes de flet et cellules de l'hémolymphe de l'huître). Deux approches étaient initialement prévues pour mesurer cet impact génotoxique : le test des comètes en conditions alcalines (Singh, 1988) et l'analyse de taille nucléaire en cytométrie selon Wang (1996). La mise en œuvre de

cette dernière technique sur les échantillons de flet et d'huître ayant posé des problèmes de calibration seule le test des comètes a été retenu.

Echantillonnage

Les flets ont été pêchés par chalutage. Les poissons ont été prélevés dans la mesure du possible en essayant d'équilibrer le sexe ratio afin de prendre en compte ultérieurement d'éventuelles différences entre mâles et femelles. Aussitôt les prélèvements sanguins et d'hémolymphe effectués, ces derniers sont placés au réfrigérateur à 4°C. Dès retour de la pêche, les échantillons sont envoyés au LSE (par Chronopost dans un délai de 24 heures), à l'état frais, dans une boîte de polystyrène, les prélèvements étant entourés de blocs réfrigérants. Afin de pouvoir planifier dans le temps l'analyse des dommages à l'ADN des échantillons suite à leur réception des essais préliminaires de congélation dans l'azote liquide ont été effectués en utilisant différents tampons de cryopréservation. Au bilan la congélation du sang de flet a été possible en utilisant un tampon citrate (Vindelov et al., 1983).

Prélèvement cellulaire

Le prélèvement sanguin sur flet est réalisé avec une aiguille héparinée au niveau l'artère caudale juste en dessous de la ligne latérale. Le sang prélevé est soigneusement transféré après avoir enlevé l'aiguille (pour ne pas entraîner d'altérations des cellules suite à la création d'une surpression) dans un tube eppendorf hépariné.

Analyse des dommages par le test des comètes

Le protocole de Singh *et al.* (1988) modifié par Devaux *et al.* (1997) a été choisi. Un témoin positif est réalisé pour s'assurer du bon déroulement de l'expérimentation en choisissant le méthylméthane sulfonate (MMS) comme un génotoxique modèle (exposition d'un pool de cellules à 2 mM de MMS pendant 30 minutes à 4°C).

La première étape est de disposer de lames de microscope (76 x 26 mm, Menzel Glaser) préalablement recouvertes d'une fine couche d'agarose NMP (point de fusion normal) à 0,8 %. Ensuite, il faut préparer les échantillons à analyser en réalisant une dilution adéquate pour une visualisation optimale et un comptage aisé (absence de chevauchement des nucléoïdes) lors de l'observation au microscope. Pour pouvoir réaliser l'essai des comètes, il faut disposer d'une suspension cellulaire avec une viabilité supérieure ou égale à 95 % pour avoir une information probante, la nécrose cellulaire conduisant également à une fragmentation de l'ADN. L'utilisation du test d'exclusion au bleu trypan a été mis en œuvre pour évaluer cette viabilité.

Les dilutions pour le sang de flet ont été effectuées dans du tampon citrate avec un facteur de dilution x950. On mélange 100 µL de la dilution avec 100 µL d'agarose bas point de fusion (LMP) 1 % (conservé à 37°C au bain marie) et 100 µL de cette préparation sont déposés sur une lame qui est recouverte d'une lamelle.

Les lames sont disposées pendant 5 minutes sur une plaque à 4°C pour assurer une parfaite polymérisation des gels. Après cette étape, les lamelles sont enlevées délicatement et une troisième et dernière couche d'agarose 90 µL d'agarose LMP à 0,5 % est déposée sur les lames et une lamelle ajoutée puis passage sur la plaque à 4°C pendant 5 minutes. Les lamelles sont retirées et les lames sont placées dans une cuvette pour réaliser la lyse cellulaire. Cette opération se déroule durant 1 heure sous lumière inactinique pour ne pas endommager

l'ADN. La solution de lyse est composée de Triton X-100, puissant détergent qui va permettre la perméabilisation des membranes plasmique et nucléaire. La présence de NaCl (2,5 M) va entraîner l'élimination du matériel extracellulaire, ainsi que des protéines. L'EDTA est un chélateur de cations divalents dont certains sont des cofacteurs nécessaires aux enzymes. Le DMSO est un antioxydant qui prévient la formation des radicaux libres de l'oxygène pouvant endommager l'ADN mis à nu. La solution de lyse est refroidie avant utilisation, pour maintenir la stabilité des gels d'agarose (Klaude *et al.*, 1996 ; Tice *et al.*, 2000). Une fois la lyse terminée, il ne reste plus que les nucléoïdes dans l'agarose et les lames sont déposées sur une feuille de papier filtre pour enlever le surplus de solution de lyse, puis placées dans la cuve d'électrophorèse. La cuve entourée de glace pour maintenir une température voisine de 4°C est alors remplie avec un tampon d'électrophorèse fortement alcalin (pH>13) et les lames vont rester immergées pendant 40 minutes, pour la phase de déroulement de l'ADN ou « unwinding ». Durant cette étape, un changement de conformation de l'ADN va s'opérer, avec passage d'une forme bicaténaire à monocaténaire par rupture des liaisons hydrogène, cette structure monocaténaire étant nécessaire à la visualisation des cassures simple brin. Lorsque le niveau de relaxation est suffisant, l'application d'un champ électrique va entraîner la migration de l'ADN chargé dans le gel d'agarose (Lee et Steinert, 2003). L'électrophorèse a une durée de 24 minutes avec un générateur basse tension délivrant une tension fixe de 0,7 V.cm⁻¹. L'ampérage est à ajuster à chaque électrophorèse aux alentours de 300 mA, car il varie en fonction du volume de tampon d'électrophorèse présent dans la cuve. Les lames sont alors neutralisées à l'aide d'un tampon Tris à pH neutre (2 lavages de 2 minutes) pour un réappariement partiel des brins d'ADN. Ce réappariement aléatoire permet d'obtenir des brins bicaténaires, nécessaires à la fixation du fluorochrome permettant le marquage des lames.

Les lames sont plongées dans de l'éthanol absolu pendant 10 minutes pour être déshydratées et ainsi assurer leur conservation sur le long terme. Les lames peuvent ainsi être conservées pendant plusieurs mois et cette déshydratation permet d'éviter toute contamination microbienne (Woods *et al.*, 1999). Pour le marquage, 50 µL de bromure d'éthidium (EtBr) sont déposés sur les préparations (20 mg.L⁻¹). Cent cellules sont analysées par lame. La formation du complexe ADN-EtBr, lorsque celui-ci est excité à une longueur d'onde spécifique, émet une lumière fluorescente dans le rouge-orange. Les lames sont analysées à l'aide d'un microscope à épifluorescence de type Axioskop (Zeiss) couplé à une caméra CCD. Ce dispositif est relié à un ordinateur et le logiciel d'analyse d'image pour l'acquisition et de traitement des données utilisé est Komet 4.0 (Kinetic Imaging Ltd, voir figure 15).

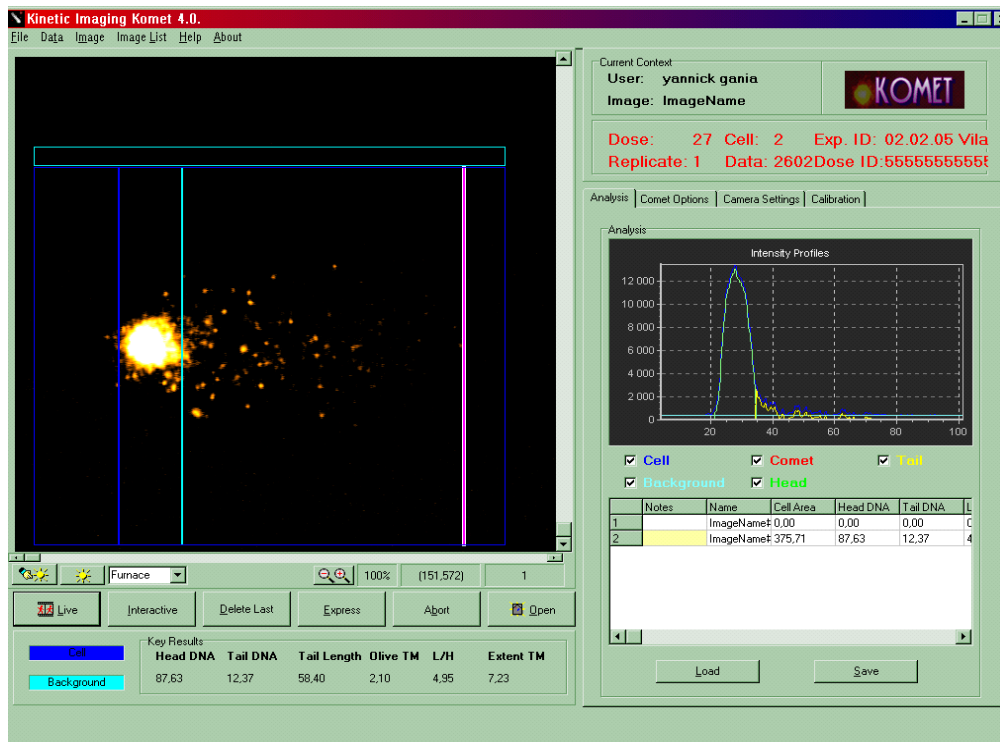


Figure 15 : Présentation de la fenêtre d'acquisition des données avec le logiciel Komet 4.0.

Nous avons dans un premier temps utilisé 5 paramètres descripteurs des dommages à l'ADN, accessibles dans le logiciel informatique Komet 4.0 à savoir : cell area, head DNA, tail DNA, tail length, tail extent moment, Olive tail moment. Après des comparaisons interparamètres, c'est le paramètre TEM moyen qui a été retenu pour l'analyse des différents résultats, car il apparaît le plus discriminant pour les types cellulaires étudiés. Ce paramètre ne présentant pas une distribution normale, les résultats sont analysés par le test non paramétrique Kruskal-Wallis de comparaison multiple au seuil 5%.

La figure 16 ci-après illustre les principales morphologies de comètes observées en fonction de 4 stades d'endommagement.

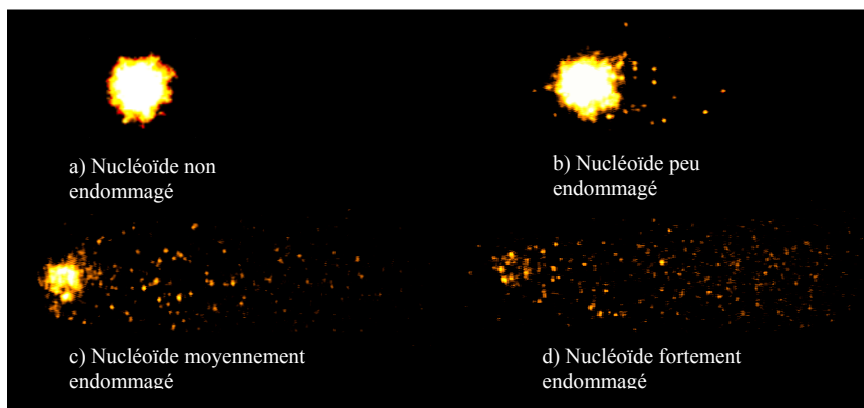


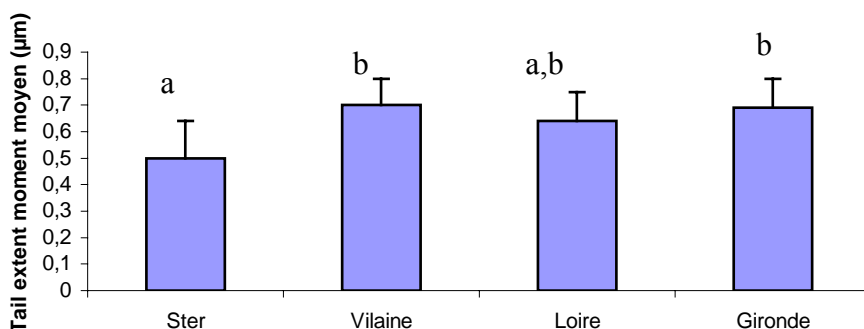
Figure 16 : Présentation des principaux types de dommages à l'ADN observés avec le test des comètes (nucléoïdes d'hématies de flet).

7.3.4 Résultats : test des comètes sur le flet

La figure 17A présente les résultats de janvier pour les flets. Seules les stations Vilaine et Gironde présentent un niveau moyen de dommages à l'ADN supérieur à la station de référence du Ster.

A l'opposé pour juin, les dommages à l'ADN sont significativement différents entre les stations de prélèvements (figure 17B). **La Vilaine apparaît ici comme la station où les flets présentent les valeurs les plus élevées de TEM et les poissons pêchés dans l'estuaire de la Loire montrent quant à eux un niveau de génotoxicité supérieur à ceux provenant de l'estuaire de la Gironde. Il est possible de classer les stations selon le gradient de réponse génotoxique suivant : Vilaine > Loire > Gironde > Ster.** Il est à noter que les valeurs de TEM moyen de la campagne de juin sont supérieures d'un facteur de 2 à 6 par rapport à celles de la première campagne d'échantillonnage.

A



B

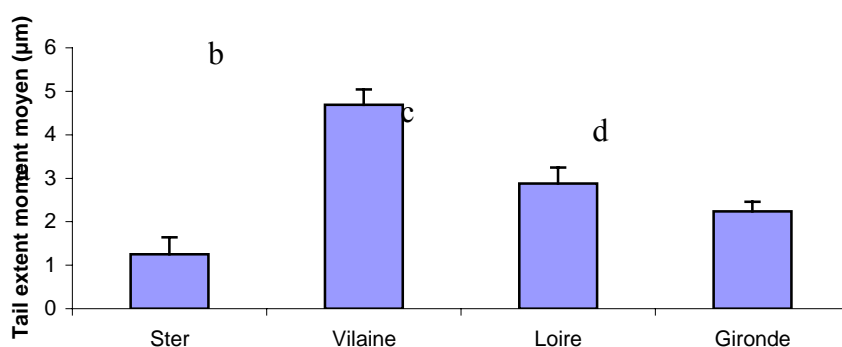
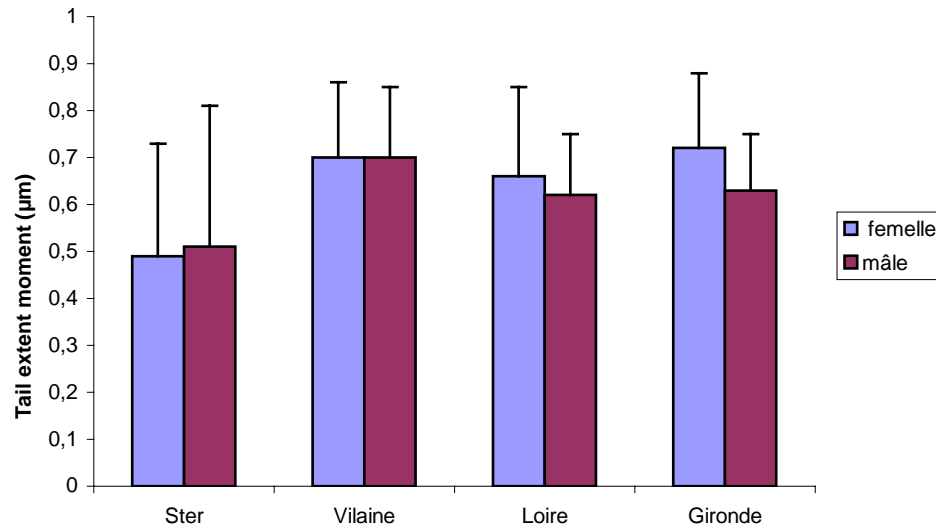


Figure 17 : Niveau de dommages à l'ADN dans les érythrocytes de flets en fonction de la station d'échantillonnage. A : janvier, B : juin. Les barres représentent l'intervalle de confiance de la moyenne à 5% et des lettres différentes signifient une différence significative entre stations au seuil 5%.

Un éventuel effet du sexe sur le niveau de génotoxicité a été étudié en comparant les valeurs de TEM entre mâles et femelles de flet. La figure 18 présente les résultats obtenus lors des deux campagnes de pêche (A et B). Il n'existe aucune différence significative entre les valeurs de TEM moyen en fonction du sexe du poisson pour les deux campagnes si l'on compare les deux sexes pour une même station d'échantillonnage.

A



B

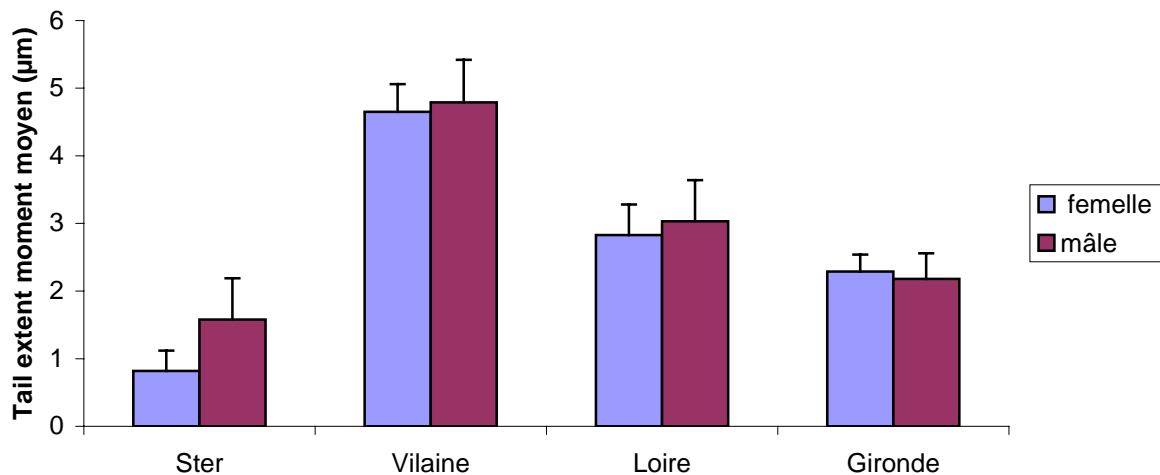


Figure 18 : Niveau de dommages de la molécule d'ADN dans les érythrocytes de flets en fonction du sexe et de la station d'échantillonnage. A : janvier, B : juin. Les barres représentent l'intervalle de confiance de la moyenne à 5%.

6.3.5 Discussion sur les tests des comètes

L'analyse des résultats obtenus lors de la première campagne de pêche en janvier, nous montre que pour le flet (en pleine période de reproduction), s'il existe des différences significatives inter-stations dans le niveau de dommages à l'ADN, celles-ci restent de faible amplitude. Concernant les résultats pour la deuxième campagne de pêche en juin, les flets de la Vilaine, de la Loire et de la Gironde, alors en période de repos sexuel, montrent des dommages à l'ADN significativement supérieurs à ceux de l'estuaire témoin, le Ster, de manière beaucoup plus marquée qu'en janvier (par exemple, on notera un facteur d'induction des dommages de 4 de la Vilaine par rapport au Ster en juin contre 1,4 seulement en janvier). **Au bilan, la Vilaine caractérisée par une pollution dominante en pesticides (Marchand, 2006) apparaît comme la station où l'impact génotoxique sur le flet est le plus fort.**

Les résultats des analyses chimiques (HAP, PCB et organochlorés) réalisées sur le muscle et le foie de flet ne permettent pas à priori d'expliquer les dommages génotoxiques marqués observés sur la Vilaine relativement aux autres estuaires ; la tendance générale du gradient de contamination des poissons étant la suivante : Gironde > Loire > Vilaine > Ster.

On constate une diminution des effets génotoxiques en période de reproduction et à l'inverse une augmentation de ces derniers en période de repos sexuel chez le flet, qui reste difficile à expliquer. Chez les poissons, l'influence des hormones comme les oestrogènes impliqués dans la reproduction, notamment sur les capacités de biotransformation des polluants tels que les HAP, a été bien décrite (Flammarion, 1997). Ces hormones ont la particularité d'inhiber l'activité de certaines enzymes de détoxification qui peuvent dans certaines conditions conduire à la formation de métabolites réactifs susceptibles d'endommager l'ADN. Dans ce cas, la période de reproduction peut conduire chez la femelle à une diminution du niveau de dommages à l'ADN. Dans notre étude, une autre hypothèse explicative est à rechercher, comme le confirme l'absence de différence mâles/femelles durant ou hors période de reproduction dans le niveau des dommages mesurés.

Pour le flet, une hypothèse pour expliquer la différence observée entre les valeurs de TEM moyen entre les deux campagnes de pêche peut être avancée. Les températures élevées de l'eau en estuaire relevées en été peuvent engendrer un stress physiologique par une diminution significative du taux d'oxygène dissous. Pour pallier cette diminution, les organismes s'adaptent en hyperventilant. Cette adaptation physiologique peut entraîner une exposition plus importante aux polluants présents dans le milieu. A l'inverse, en période hivernale, les eaux froides sont riches en oxygène dissous et les organismes ont une respiration « normale » et ont donc moins tendance à assimiler les molécules polluantes. **D'autre part, une diminution de la quantité en oxygène dissout dans la colonne d'eau peut avoir au final les mêmes conséquences qu'un stress polluant ou physique et in fine, engendrer des dommages à l'ADN chez le poisson (Liepelt et al., 1995). Cette hypothèse pourrait notamment s'appliquer au cas de La Vilaine, estuaire présentant périodiquement des crises hypoxiques plus ou moins marquées à la saison estivale, facilitées par une eutrophisation générale du système et une stratification possible eaux douces / eaux marines, liée notamment aux manipulations hydrauliques d'un barrage (Ménesguen, 2001).**

Le stress thermique lui-même, peut être à l'origine de dommages à l'ADN chez les poissons et les bivalves (Barsiené et al., 2006). Les prélèvements se sont déroulés sur le

bateau à des températures bien supérieures au cours de la deuxième campagne de pêche, ce qui pourrait expliquer des valeurs de TEM plus importantes dûes à une souffrance cellulaire.

6.3.6 Dommages chromosomiques sur le flet

Introduction et méthodologie

Un certain nombre d'agents mutagènes (hydrocarbures, certains PCB, certains pesticides et métaux lourds, etc.) peuvent créer des délétions au niveau de l'ADN (perte d'une ou plusieurs paires de bases), des cassures chromosomiques, des translocations de fragments d'ADN à d'autres chromosomes ainsi que la perte partielle ou totale d'un chromosome. Lorsque ces dommages chromosomiques ne sont pas réparés, la distribution du matériel génétique ne se fait pas de manière égale entre les deux cellules filles lors de la division cellulaire. Ces dommages restent alors fixés et sont transmis aux cellules descendantes. Lorsque ces dommages se produisent au niveau de cellules à « turnover » rapide comme c'est le cas des cellules sanguines nucléées (Mahajan & Dheer, 1983) utilisées dans cette étude, la variation de contenu en ADN dans les cellules peut être rapidement amplifiée. Cette variation dans le contenu en ADN des cellules (en comparaison avec un témoin ou groupe de référence) peut conduire au diagnostic de dommages à l'ADN et peut être détectée par la cytométrie en flux (Easton *et al.*, 1997). Les dommages à l'ADN mesurés par la cytométrie sont vraisemblablement plus intégrateurs dans le temps d'une réponse à la génotoxicité, par rapport aux cassures à l'ADN simple et double brin (Shugart, 1998) et fournissent probablement une vision complémentaire de ceux mesurés par le test comète qui permet quant à lui de quantifier de manière sensible et précoce l'expression génotoxique.

La cytométrie de flux, appliquée à l'évaluation des dommages chromosomiques est une technique relativement récente qui a notamment été mise en œuvre pour détecter des effets génotoxiques sur des populations de poissons, grenouilles, oiseaux et tortues (Bickham *et al.*, 1988; Custer *et al.*, 1994; Easton *et al.*, 1997 ; Lowcock *et al.*, 1997). Le sang de flet est prélevé sous héparine, puis congelé à -80°C dans un tampon citrate. Le protocole de cytométrie en flux utilisé dans cette étude (Vindelov & Christensen, 1990) consiste à mesurer les variations du contenu en ADN des noyaux des cellules sanguines de flets grâce à l'iodure de propidium, fluorochrome qui se fixe spécifiquement sur les acides nucléiques. Un coefficient de variation (CV), reflétant la variabilité du contenu en ADN (Bickham *et al.*, 1988), est calculé en utilisant le logiciel WinMDI 2.8. Plus les CV sont élevés, plus la variabilité dans le contenu en ADN des cellules sanguines est importante, et donc plus les dommages à l'ADN sont importants. La technique est suffisamment sensible pour distinguer des populations de cellules dont le contenu en ADN nucléaire diffère de 1 à 2% (Deaven, 1982).

Pour chaque échantillon de sang de flet analysé, un standard interne a été rajouté (un échantillon unique de sang de poulet aliquoté) pour pallier les déviations possibles de la machine au cours des manipulations. La cytométrie de flux nous a permis d'estimer les dommages chromosomiques sur différentes populations de flets de la façade atlantique française, et de mener avec succès dans le passé, des explorations sur les aptitudes de différents génotypes à maintenir l'intégrité de leur ADN (Marchand, 2006).

Résultats et discussion

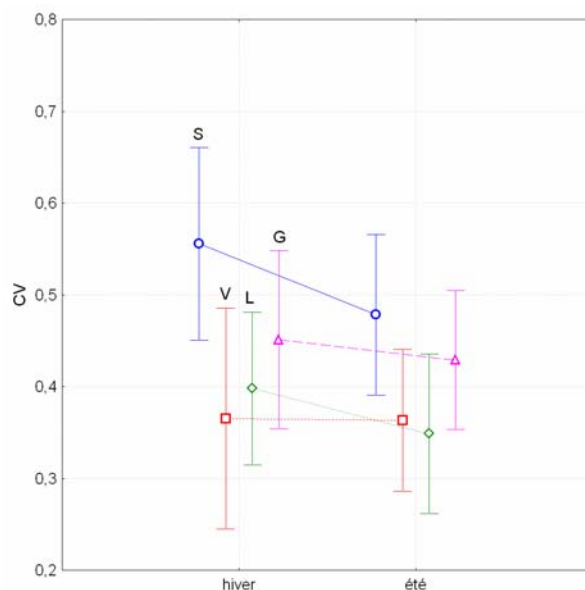


Figure 19. Mesure du coefficient de variation moyen ($CV = C_v \text{ flet} - C_v \text{ poulet}$) sur le contenu en ADN des hématies de flet dans le Ster (S), la Vilaine (V), la Loire (L) et la Gironde (G).

Les estimations de CV sur les échantillons de sang de flet (Figure 19) ne mettent pas en évidence de différences significatives de dommages chromosomiques entre les populations présentant un stress chimique (Vilaine, Loire, Gironde), quelle que soit la saison. On remarque de plus pour le Ster (système de référence), un niveau moyen de dommages à l'ADN supérieur à celui des estuaires contaminés, mais non statistiquement différent. Nous avons pu obtenir dans le passé des valeurs de CV moyens parfois supérieures dans le Ster relativement aux systèmes contaminés (Marchand et al, 2003) ; les individus issus de sites chroniquement contaminés ne présentant pas systématiquement dans la littérature une génotoxicité supérieure à celle des témoins (Mc Farland et al, 1999 ; Larno et al, 2001). Les CV obtenus ici sur le flet sont cependant très contrastés avec les résultats produits par le test comète, sur les mêmes populations ; ils mettent en évidence des mécanismes d'action visiblement très différents de l'action des polluants ou d'autres composantes environnementales sur la formation de cassures à l'ADN et sur les dommages chromosomiques. L'évaluation de la génotoxicité par la cytométrie en flux se révèle cependant une technique pertinente pour étudier la variabilité interindividuelle du signal génotoxique au sein d'une population naturelle (Marchand et al, 2004).

6.3.7 Bibliographie

ALINK G.M., QUIK J.T.K., PENDERS E.J.M., SPENKELINK A., ROTTVEEL S.G.P., MAAS J.L. et HOOGENBOEZEM W. (2007). Genotoxic effects in the eastern mudminnow (*Umbra pygmaea* L) after exposure to Rhine water, as assessed by use of the SCE and Comet assays: a comparison between 1978 and 2005. *Mutation Research*, **631**, 93-100.

ATTRILL M.J. & DEPLEDGE M.H., 1997. Community and population indicators of ecosystem health: targeting links between levels of biological organisation, *Aquatic Toxicology*, **38**, 183-197.

- BARBEE G.C. et al. (2008). *In situ* biomonitoring of PAH-contaminated sediments using juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, in press.
- Bickham J.W., Hanks B.G., Smolen M.J., Lamb T. & Gibbons J.W. 1988. Flow cytometric analysis of the effects of low-level radiation exposure on natural populations of slider turtles (*Pseudemys scripta*). *Archives of Environmental Contamination Toxicology* 17: 837-841.
- BARSIENE J., LEHTONEN K.K., KOEHLER A., BROEG K., VUORINEN, P.J., LANG, T., PEMPKOWIAK, J., SYVOKIENE, J., DEDONYTE, V., RYBAKOVAS, A., REPECKA, R., VUONTISJARVI, H. & KOPECKA, J., 2006. Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and mussel (*Mytilus edulis*) in the Klaipeda-Butinge area (Baltic sea), *Marine Pollution Bulletin*, 53, 422-436.
- Custer T.W., Bickham J.W., Lyne T.B., Lewis T., Ruedas L.A., Custer C.M. & Melancon M.J. 1994. Flow cytometry for monitoring contaminant exposure in black-crowned night-herons. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 27: 176-179.
- DEVAUX A., PESONEN M. & MONOD G., 1997, Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes, *Toxicology in vitro*, 11, 71-79.
- Deaven L.L. 1982. Application of flow cytometry to cytogenetic testing of environmental mutagens. In : *Cytogenetic Assays of Environmental Mutagens* (eds. Hsu T.), Allanheld, Montclair, NJ, pp. 325-351.
- Easton M.D.L., Kruzynski G.M., Solar I.I. & Dye H.M. 1997. Genetic toxicity of pulp mill effluent on juvenile chinook salmon (*Onchorhynchus tshawytscha*) using flow cytometry. *Water Sciences and Technics* 35 (2-3): 347-355.
- FLAMMARION P., 1997, Mesure in situ de l'induction du cytochrome P450 1A chez des cyprinidés d'eau douce. Optimisation de l'interprétation, Thèse en toxicologie de l'environnement, Université de Metz, Ecotoxicité, Biodiversité & Santé Environnementale, 107p.
- GOKSOYR A., ARUKWE A., LARSSON J., CARAJAVILLE M.P., HAUSER L., NILSEN B., LOWE D. et MATTHIESSEN P. (2003). Molecular/cellular processes and the impacts on reproduction. In: *Effects of pollution on fish, molecular effects and population responses* (eds. Lawrence A.J., Hemingway K.L.), Blackwell Sciences, pp. 179-220.
- KLAUDE M., ERIKSSON S., NYGREN J. & AHNSTROM G., 1996, The comet assay: mechanisms and technical considerations, *Mutation Research*, 363, 89-96.
- LACOSTE A., MALHAM S.K., GELEBART F., CUEFF A. & POULET S.A., 2002, Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*, *Developmental & Comparative Immunology*, 26, 1-9.
- Larno V., Laroche J., Launey S., Flammarion P. & Devaux A. 2001. Responses of chub (*Leuciscus cephalus*) populations to chemical stress, assessed by genetic markers, DNA damage and cytochrome P450 1A induction. *Ecotoxicology* 10: 145-158.

- LEE R.F. & STEINERT S., 2003, Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals, *Mutation Research*, 544, 43-64.
- LIEPELT A., KARBE L. & WESTENDORF, J., 1995, Induction of DNA strand breaks in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* under hypoxic and hyperoxic conditions. *Aquatic Toxicology*, 33, 177-181.
- Lowcock L.A., Sharbel T.F., Bonin J., Ouellet M., Rodrigue J., DesGranges J.L. 1997. Flow cytometric assay for in vivo genotoxic effects of pesticides in green frogs (*Rana clamitans*). *Aquatic Toxicology* 38: 241-255.
- Mahajan C.L. & Dheer T.R. 1983. Haematological and haematopoietic responses to starvation in an air-breathing fish *Channa punctatus* Bloch. *Journal of Fish Biology* 22: 111–123.
- 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., 2006, Réponses moléculaires, individuelles et populationnelles du flet (*Platichthys flesus*) à la pollution chimique. Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale, 147 p. + annexes.
- McFarland V.A., Inouye L.S., Lutz C.H., Jarvis A.S., Clarke J.U. & Mc Cant D.D. 1999. Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field-collected brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37: 236-241.
- MENESGUEN A., 2001, L'eutrophisation des eaux marines et saumâtres en Europe, en particulier en France. Rapport IFREMER pour la Commission Européenne – DG.ENV.B1, 59p.
- MITCHELMORE C.L. & CHIPMAN J.K., 1998a, DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring, *Mutation Research*, 399, 135-147.
- MITCHELMORE C.L., BIRMELIN C., LIVINGSTONE D.R. & CHIPMAN J.K., 1998b, Detection of DNA strand breaks in isolated mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells using the “comet” assay, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 41, 51-58.
- NACCI D.E., CAYULA S. & JACKIM E., 1996, Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay, *Aquatic Toxicology*, 35, 197-210.
- Shugart L.R. 1998. Structural damage to DNA in response to toxicant exposure. In : *Genetics and Ecotoxicology* (eds. Forbes V.E.), Taylor & Francis, pp. 151-167.
- SINGH N.P., MCCOY M.T., TICE R.R. & SCHNEIDER E.L., 1988, A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, 175, 184-191.

- STEINERT S.A., 1996, Contribution of apoptosis to observed DNA damage in mussel cells, *Marine Environmental Research*, 42 (1-4), 253-259.
- TICE R.R., AGURELL E., ANDERSON D., BURLINSON B., HARTMANN A., KOBAYASHI H., MIYAMAE Y., ROJAS E., RYU J.-C. & SASAKI Y.F., 2000, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 206-221.
- VINDELOV L.L., CHRISTENSEN I.J., KEIDING N., SPANG-THOMSEN M. & NISSEN N.I., 1983, Long-term storage of samples for flow cytometric DNA analysis, *Cytometry*, 3, 317-322.
- Vindelov L.L. & Christensen I.J. 1990. A review of techniques and results obtained in one laboratory by an integrated system of methods designed for routine clinical flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 11: 753-770.
- WANG J., HYUN K., LAMBORN K. & DEEN D.F., 1996, Measurement of radiation-induced damage in human glioma cells with flow cytometry, *Cancer Research*, 56, 154-157.
- WOODS J.A., O'LEARY K.A., MCCARTHY R.P. & O'BRIEN N.M., 1999, Preservation of comet assay slides: comparison with fresh slides, *Mutation Research*, 429, 181-187.
- WINTER M.J. et al. (2004). DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK. *Mutation Research*, 552, 163-175
- WURGLER F.E. & KRAMERS P.G. (1992). Environmental effects of genotoxins (ecogenotoxicology). *Mutagenesis*, 7, 321-327.

VII Discussion générale sur la réponse du flet au stress en milieu estuarien

Fonctionnalité de différents outils biologiques pour suivre les populations de poisson en milieu naturel

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.

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.

Ce projet contribue également à la validation de l'outil de mesure de la génotoxicité, particulièrement au niveau du test comète (estimations des dommages primaires à l'ADN), en tant que marqueur de stress sur un poisson en milieux estuariens.

Recommandations générales

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.

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) ; l'estuaire de la Vilaine, par son bassin versant à dominante agricole, est en ce sens un système particulièrement approprié pour devenir un site atelier majeur en Ecotoxicologie Aquatique.

Fonctionnement en réseau et perspectives sur la réponse du flet au stress en milieu estuarien

Ce projet a fonctionné et fonctionne dans le cadre d'une collaboration entre différentes équipes ;

- 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
- INRA-EFPA, LSE (Laboratoire des Sciences de l'Environnement, Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat), Vaulx en Velin.

Des recherches complémentaires ont également été conduites sur les mêmes échantillons de poisson en recherchant de possibles perturbations endocriniennes au niveau de la reproduction (LEMA : Laboratoire d'Ecotoxicologie des Milieux Aquatiques UPRESS-EA

3222; IFRMP 23, Le Havre), des effets neurotoxiques (IFREMER Laboratoire d'écotoxicologie, Nantes) et la pathologie du foie (Unité d'Anatomie Pathologique, UMR 703 INRA/ENVN, Nantes). L'ensemble de ces données est actuellement en cours de traitement statistique dans notre équipe LEMAR, pour explorer de manière intégrée les réponses des organismes et des populations au stress chimique.

Notre équipe a développé par ailleurs des marqueurs génétiques spécifiques sur le flet pour explorer le rôle fonctionnel de la diversité génétique au sein des populations naturelles, par la recherche de couplages génotypes-phénotypes. Les premières analyses sont encourageantes ; elles laissent voir que certains génotypes de flet ont des capacités différentielles ; i.e. les réponses physiologiques multi-critères en relation avec les génotypes mettent ainsi en évidence des génotoxicités et/ou contaminations et/ou lésions hépatiques différentielles entre certains génotypes. Cette démarche malgré sa pertinence est encore rare en Ecotoxicologie au niveau national et devrait être encouragée dans le futur.

Une nouvelle approche est en cours de développement par notre équipe LEMAR sur des juvéniles de flets (0+ : poissons de moins de un an) dans l'estuaire de la Vilaine; nous avons récolté dans l'estuaire de Juillet 2007 à décembre 2007, 30 à 40 flets par mois. Nous nous proposons de tester l'évolution de cette cohorte, en prenant en compte les réponses physiologiques et génétiques de ces poissons juvéniles, de l'été au début de l'hiver. Cette approche devrait nous permettre de mieux comprendre le stress potentiel subit par les juvéniles de poissons dans la Vilaine et donc le potentiel de cet estuaire en tant que zone de nurseries pour les espèces de poissons côtiers.