

# THÈSE

PRÉSENTÉE A

**L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1**

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET ENVIRONNEMENTS

Par Iris BARJHOUX

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Géochimie et Écotoxicologie

**Étude de la biodisponibilité et de la toxicité de polluants  
chimiques à risque dans les sédiments aquatiques vis-à-vis des  
premiers stades de développement d'un poisson modèle,  
*Oryzias latipes***

Directeurs de thèse : Pr Jérôme CACHOT & Pr Magalie BAUDRIMONT

**UMR 5805 EPOC – OASU**

Équipe Physico- et Toxic-Chimie de l'environnement (LPTC), Université Bordeaux 1, Talence  
& Équipe Écotoxicologie Aquatique (EA), Station Marine d'Arcachon, Université Bordeaux 1, Arcachon

Soutenue le : 19 décembre 2011

Devant la commission d'examen formée de :

M. COUSIN, Xavier  
Mme GARRIC, Jeanne  
M. BURGEOT, Thierry  
Mme JEAN, Séverine  
Mme. BUDZINSKI, Hélène  
Mme BAUDRIMONT, Magalie  
M. CACHOT, Jérôme

CR HDR, INRA  
DR, CEMAGREF  
CR HDR Ifremer  
MCU, Université de Toulouse  
DR CNRS, Université de Bordeaux 1  
PU, Université de Bordeaux 1  
PU, Université de Bordeaux 1

Rapporteur  
Rapporteur  
Examinateur  
Examinatrice  
Examinatrice  
Directeur de thèse  
Directeur de thèse



## Résumé

Les sédiments agissent comme de véritables puits pour certains polluants organiques persistants et métaux représentant ainsi une source de contamination secondaire pour les milieux aquatiques. Dans ce contexte, un test embryo-larvaire utilisant le Medaka japonais (*Oryzias latipes*) a été développé afin d'évaluer la toxicité des polluants fixés aux particules sédimentaires. Le bioessai consiste à maintenir les embryons de Medaka en contact direct avec le sédiment durant tout leur développement embryonnaire puis à évaluer les effets létaux et sublétaux induits au niveau phénotypique et moléculaire chez les embryons et larves exposés. Tout d'abord, le bioessai a été utilisé en vue de caractériser la toxicité et les modes d'action de substances organiques et métalliques pures. Le pyrène et son dérivé, le méthylpyrène, se sont avérés fortement tératogènes avec un spectre de malformations rappelant le syndrome de la maladie du sac bleu. L'étude du profil d'expression génique a révélé la perturbation de certains processus cellulaires notamment la voie AhR, le métabolisme mitochondrial et la voie de signalétique et de métabolisation des rétinoïdes. Le cuivre et le cadmium ont induit de nombreuses malformations squelettiques et cardio-vasculaires, des dommages à l'ADN ainsi que l'altération de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial, la régulation du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. Enfin, le bioessai a été appliqué à l'évaluation du potentiel toxique de sédiments naturels du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon. L'ensemble des sédiments testés a montré un large spectre d'effets tératogènes et seuls quelques-uns ont conduit à des effets létaux. Par ailleurs, l'expression plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial, la voie AhR, le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et la détoxification des métaux a été modifiée lors de l'exposition à certains sédiments contaminés de la zone d'étude.

*Mots-clés*: sédiment, test de toxicité embryo-larvaire poisson, Medaka japonais, HAP, métaux, expression génique, tératogénicité.



## Abstract

Aquatic sediments act as real sink for numerous anthropogenic chemicals such as persistent organic pollutants and heavy metals and represent a secondary contamination source. In this context, a fish embryo-larval assay was developed using the Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) as test organism to evaluate the toxicity of particle-bound contaminants. In this aim, fish embryos are kept in direct contact to sediment during their whole embryonic development. A panel of acute and sub-lethal responses is studied at both phenotypical and molecular levels. This test was first applied to the characterization of the toxic effects and modes of action of organic and metallic single compounds. Pyrene and its alkylated derivative, methylpyrene, revealed a high teratogenic potency with developmental deformities similar to the blue sac disease syndrome. Gene expressions analysis using qRT-PCR method highlighted an alteration of several cellular processes including the AhR pathway, the mitochondrial metabolism and the retinoids signaling and metabolism pathways. Copper and cadmium mainly induced numerous skeletal and cardiovascular injuries, DNA damage as well as modifications of gene expression involved in mitochondrial metabolism, DNA damage repair and cell cycle regulation. Finally, the Medaka embryo-larval assay was performed to analyze the toxic potency of natural sediments from the Lot-Garonne system and the Arcachon bay. All tested sediments showed a wide range of teratogenic effects but only few of them revealed to be acutely toxic. Moreover, the expression of several genes involved in mitochondrial metabolism, AhR pathway, cell cycle arrest, DNA repair and heavy metals detoxication proved to be modified in the presence of some contaminated sediments from the studied areas.

*Keywords:* sediment, fish embryo-larval toxicity assay, Japanese Medaka, PAH, heavy metals, gene expression, teratogenicity.



## Remerciements

Avant de rentrer dans le vif du sujet et de vous conter les aventures de mes amis Medaka, je tiens à adresser mes sincères remerciements à l'ensemble des personnes qui sont intervenues, directement ou plus indirectement, dans la réalisation de ces travaux de thèse.

Je commence très officiellement par remercier la région Aquitaine pour son soutien financier qui a permis de mener à bien ce travail. Je remercie également le GIP Seine-Aval impliqué dans le projet TOXSEINE qui a également participé financièrement à l'achat de matériel et à la mise en place de l'élevage de Medaka. J'adresse mes sincères remerciements au GIS-AMAGEN pour les nombreux conseils qu'il nous a prodigué concernant l'élevage de nos petits protégés ainsi que pour les tout aussi nombreux envois d'embryons qui nous ont permis de réaliser une partie des présents travaux. Je suis également très reconnaissante à toutes les équipes de l'UMR EPOC pour leur participation à certaines analyses effectuées dans le cadre de cette thèse.

Je remercie très sincèrement l'ensemble des membres du jury qui ont accepté de juger ce travail de thèse. J'ai eu l'occasion de faire connaissance avec certains d'entre vous, pour d'autres, la rencontre aura lieu le jour de la soutenance. Quoiqu'il en soit, je vous suis à chacun très reconnaissante d'avoir pris sur votre précieux temps pour évaluer ces travaux.

J'adresse de très sincères, très grands et très nombreux remerciements à mes deux directeurs de thèse qui m'ont accompagnée tant professionnellement que personnellement durant les trois années que j'ai passé auprès d'eux. Jérôme et Magalie, j'ai tout simplement adoré travailler à vos côtés pendant tout ce temps. Proposez-moi un second mandat, et je signe immédiatement ! En plus de vos qualités scientifiques, j'ai énormément apprécié vos qualités humaines. Je vous suis très reconnaissante de n'avoir cessé de croire en moi durant cette période. Vos encouragements et votre soutien infailible m'ont permis de traverser les moments les plus difficiles : à défaut de croire en moi, je vous ai fait confiance lorsque vous me disiez que j'allais y arriver. Force est de constater que, encore une fois, vous aviez raison ! Merci à toi, Magalie, pour ton sourire permanent, ta disponibilité, les discussions partagées autour d'un repas de midi ou auprès d'un appareil de mesure caractériel, ta gentillesse et le précieux temps que tu m'as accordé durant cette thèse. Merci à toi, Jérôme, pour ta bonne humeur quasi imperturbable, l'intérêt que tu as porté à mon épanouissement tant personnel que professionnel et l'écoute dont tu as fait preuve durant toute cette thèse. Ce fut un plaisir de partager avec toi l'excitation et l'émerveillement (!! ) de découvrir une larve cyclope ou un gros œdème...

Je souhaite également remercier Héléne Budzinski de m'avoir accueillie au LPTC dès le Master 2. Héléne, je te suis également très reconnaissante de m'avoir ouvert les portes de l'équipe Aqua et de m'avoir permis d'être formée à l'analyse chimique des HAP. Grâce à toi, j'ai pu surmonter ma peur et dompter ces bêtes curieuses que sont les GC-MS, Lyophilisateurs, RapidVap et autres engins étranges qui peuplent vos labos. Je te remercie également de m'avoir ouvert les yeux sur ce qu'il se passait « au-dessus de ma tête » et de m'avoir ainsi permis de comprendre un peu mieux ce qu'était la vie et le fonctionnement d'un laboratoire. Je pense (et j'espère !) avoir appris de nombreuses choses à ton contact, sur les HAP bien sûr, mais pas que ! Je souhaite également adresser mes sincères remerciements à Karyn pour son investissement et sa patience lors de ma formation à l'analyse des HAP et dans la mise en œuvre d'une partie des analyses chimiques de ce travail. Enfin, je tiens à remercier très sincèrement l'ensemble des « chimistes », permanents, contractuels, stagiaires etc... pour leur accueil et leur aide lors de chacun de mes passages parmi vous. Je vous remercie notamment de ne pas avoir soupiré en m'expliquant pour la énième fois quelle était la bonne fiche à remplir, qui était le responsable à prévenir et où était son bureau... Parmi les chimistes, j'adresse des remerciements tout particuliers aux thésards dont j'ai eu la chance de croiser la route. Les anciens : Marion-Justine, Alexia, Fred, Mathieu and co ; les futurs-anciens : Coralie, Ninette, Anguelito, Amélie ; les nouveaux : Matthieu, Perrine, Caroline, Hoi... Merci à tous pour les moments que nous avons partagés au labo, en pause café, en congrès ou en happy hours ! Coco et MJ, j'ai découvert en vous des personnes surprenantes. Derrière vos sourires pleins de douceur se cache une force impressionnante pour surmonter les embûches qui se dressent sur votre chemin. Pour cela, je vous admire. Je garderai en mémoire toutes les longues discussions, les voyages en Italie et en Espagne, les verres partagés à la débauche, les fous rires... Pour tous ces bons moments passés ensemble, pour votre gentillesse et votre amitié, je vous adore.

Au cours de cette thèse, j'ai eu la chance d'avoir une autre famille d'accueil : la station marine d'Arcachon. Rendre visite aux Arcachonnais implique un réveil aux aurores et de prendre un train souvent bruyant. Malgré ces désagréments, une fois qu'on y est, on ne veut plus en partir et cela n'est pas dû aux locaux mais bien aux personnes qui s'y trouvent ! Je remercie donc l'ensemble du personnel de la station pour l'accueil chaleureux qu'il m'a réservé à chacune de mes visites. J'ai eu un grand plaisir à partager avec vous tous ces déjeuners animés dont vous avez le secret. Je remercie notamment Régine et Véro de m'avoir enseigné l'art et la manière d'apprivoiser les analyseurs de métaux qui hantent les locaux de la station. Je ne peux évoquer la station marine sans adresser un IMMENSE merci à mon papa et ma maman PCR : Patrice et Cerise. Grâce à vous deux, je peux maintenant dire : « La PCR : veni, vidi, vici ! ». Patrice, je ne sais pas comment tu as réalisé cet exploit mais tu as réussi à m'apprendre, me faire comprendre et, mieux que cela, me faire aimer la PCR ! Cerise, je te remercie du fond du cœur de ne jamais avoir soufflé, râlé ou pesté pour les nombreuses fois où j'ai débarqué dans ton bureau avec un « Ceriiiiiiiiise ! J'ai un problèèèèèèème ! ». Merci à vous deux pour votre patience, vos qualités scientifiques et votre bonne humeur qui ont rendu si agréable chacun de mes périodes biomoléculaires. Je me souviendrai longtemps de la découverte de la belle région de Decazeville à vos côtés ! Je remercie également tous les thésards et stagiaires qui m'ont aidé à trouver le matériel ou mon chemin dans le dédale de la station. Un merci tout particulier à Adeline pour m'avoir démontré qu'on pouvait avoir un tapis de souris à l'effigie de son organisme modèle sans être complètement tarée (jalouse, moi ? oui, peut-être un peu : il n'y a pas de club spécial pour les adorateurs du Medaka !), à Audrey pour ses blagues (belges bien sûr !) et à Bijou pour m'avoir montré qu'il y a des gens qui ont encore plus la tête dans le pâté que moi dans le train du matin !

Bien évidemment, durant presque quatre ans, mon QG fut la Tox. Qu'il est difficile de trouver les mots pour remercier chacun comme il le mérite ! Tant pis, je me lance et tenterai de ne pas être trop longue... Tout d'abord, merci à Béné de m'avoir fait intégrer l'équipe dès le Master 2 malgré un bras cassé et un parcours atypique. Je te remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir guidée jusqu'à la thèse. Je me souviendrai de ton rire communicatif et de tes innombrables efforts pour m'apprendre à être synthétique ! Je crois qu'il me reste encore à apprendre de toi de ce côté... Je remercie Michèle pour le « bizutage » auquel j'ai eu droit en arrivant et qui a eu le mérite de combler en un temps record les lacunes que j'avais en termes de travail à la paillasse. Lorsque tu es partie pour prendre ta retraite bien méritée, je me suis demandée comment on allait s'en sortir au labo sans toi... Heureusement super Krikri était là ! Toujours un truc ou une astuce à sortir de la manche, reine du système D, tu m'auras maintes fois sorti du pétrin en m'apportant des solutions ou des idées parfois dignes de MacGiver... Pour tout ça et bien d'autres choses, merci !

J'adresse mes sincères remerciements à Blandine et Jean-François pour toutes les discussions partagées dans la salle café. Jean-François, je te remercie tout particulièrement pour la patience et la tolérance dont tu as fait preuve face à ma lenteur à comprendre tes blagues. En presque quatre ans, j'aurais tout de même progressé ! Merci également à tous les stagiaires qui se sont succédés durant ces années d'avoir participé à la réalisation de ce travail et/ou d'avoir apporté leur bonne humeur au labo !

A mon arrivée, j'ai été accueillie dans le bureau par une bretonne et un normand (dur !). La bretonne a eu pitié de moi, petite gringalette estropiée, et m'a prise sous son aile. Grâce à toi, AL, j'ai découvert le monde de la thèse, ses joies et ses peines. Pour cela et pour les nombreux délires et pétages de câble et surtout ta hot-line du thésard en détresse, MERCI ! Le normand m'a initié au test MELA et a partagé bon nombre de ses connaissances sur le sujet avec moi. Je me souviendrai longtemps des innombrables (et le mot est faible) pauses café-cloppes que nous avons partagées, bien souvent alimentées de discussions animées... (Je tiens également à remercier la machine à café qui a survécu à la fois à Ludo et à moi...) Moi aussi, en regardant dans le rétro, je suis contente d'avoir signée ! Après votre départ, le bureau a semblé bien vide... Heureusement, du beau monde est venu le repeupler. Merci à Floranne d'avoir apporté un peu de sang neuf, partagé mes délires devant des vidéos kitchissimes et de m'avoir fait découvrir le meilleur anti-dépresseur du monde : la bamba triste ! Je garderai en mémoire nos longs débats qui se terminaient enfin lorsqu'on se rendait compte qu'on disait la même chose... C'est beau la communication ! Thank you Huong for numerous sweets, gifts and stories you brought back from Viet-Nam and shared with us. Thank you also for showing me how wrirting is easy (you're amazing!) and for never believing I'm crazy whereas Floranne said so! Je tiens également à remercier très sincèrement Lucette et super Nananik d'avoir apporté un peu de douceur (et de chocolat !) dans ce monde de brutes. Anaik, merci d'avoir toujours été d'un calme olympien même dans les situations de crises notables et d'avoir tenté de me communiquer ta « zen attitude ». Cela dit, je pense qu'il me faut



encore quelques séances... Merci à Laure pour son soutien, son amitié et sa solidarité pour les pauses-café et les petits creux de l'après-midi. Je te remercie également d'avoir partagé les ballades dominicales avec nous. Tu y es bien entendu toujours la bienvenue ! Merci à vous toutes pour tous les rires, coups de gueule, histoires, potins et godets que nous avons partagés ensemble. To be continued...

Je garderais également longtemps en mémoire les moments que nous passions réunis, toute la Tox entassée dans la laverie à boire quelque chose de chaud lors des froides journées d'hiver, le chauffage à fond et la chaleur humaine faisant le reste...

Pour finir, je tiens à remercier du fond du cœur mes proches et ma famille qui m'ont soutenue et encouragée sans interruption durant cette thèse. Malgré l'éloignement géographique, je vous ai senti très proches, juste derrière moi, durant tout ce temps. Je remercie mes parents qui m'ont accompagnée sans relâche pendant ces longues études, quels que soient mes choix. MPVP, votre amour et votre confiance inconditionnels m'ont permis d'avancer vers ce que je voulais faire, sans peur, et il est certain que sans vous, ce manuscrit n'existerait pas. Je remercie également Loïc pour son courage et sa motivation sans faille à me supporter dans tous mes états. Merci à toi pour ta constance, ton aide et ton soutien qui m'ont permis de me consacrer entièrement à cette thèse. Merci d'avoir cru en moi et de toujours avoir eu sur toi une petite cuillère pour me ramasser dans les moments difficiles. Enfin, je tiens à remercier Fangio pour m'avoir aidée à relativiser parfois en me montrant que l'important dans la vie c'est d'avoir une gamelle d'eau, une gamelle de bouffe, un coin chaud pour dormir et... beaucoup de câlins ! Merci à toi, d'avoir fait le clown pour me redonner le sourire et merci aussi de m'avoir laissé quelques articles non machouillés pour rédiger cette thèse !

Il me manque des mots, du temps et de la place pour remercier tout le monde comme il se doit. J'ai probablement oublié des noms dans la précipitation. Ne m'en veuillez pas : les lignes ne sont peut être pas gravées sur le papier mais elles le sont dans mon cœur. Cette thèse fut un travail d'équipe tant au labo que de retour à la maison. Je dois avouer que j'ai eu une chance insolente d'avoir été entourée comme je l'ai été. Grâce à cela je peux dire : « La thèse c'est dur, mais ça peut aussi être fun ! »

Merci à tous et bonne lecture !



# Sommaire

RESUME .....	I
ABSTRACT .....	III
REMERCIEMENTS.....	V
SOMMAIRE .....	IX
TABLE DES FIGURES .....	XV
TABLE DES TABLEAUX .....	XIX
LISTE DES ABREVIATIONS.....	XXIII
INTRODUCTION GENERALE .....	1
<b>CHAPITRE 1. CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>7</b>
1. CADRE REGLEMENTAIRE ET CAS DU COMPARTIMENT SEDIMENTAIRE .....	9
1.1. <i>La Directive Cadre Eau : le milieu aquatique au cœur des préoccupations européennes</i> .....	9
1.2. <i>La Règlementation REACH : « Pas de données, pas de marché »</i> .....	11
1.3. <i>Le compartiment sédimentaire : un réservoir à polluants</i> .....	12
2. CONTAMINATION DE L'ENVIRONNEMENT AQUITAINE .....	14
2.1. <i>Cas du continuum Lot-Garonne-Gironde</i> .....	16
2.2. <i>Cas du Bassin d'Arcachon</i> .....	22
3. CHOIX DES SUBSTANCES TESTEES ET DES SITES DE PRELEVEMENTS .....	29
3.1. <i>Sélection des substances modèles, des concentrations cibles testées et des sites de prélèvements pour la problématique « contamination métallique »</i> .....	29
3.1.1. Choix des composés modèles et des concentrations cibles.....	29
3.1.2. Choix des sites de prélèvements.....	31
3.2. <i>Sélection des substances modèles, des concentrations cibles testées et des sites de prélèvements pour la problématique « contamination organique – HAP »</i> .....	31
3.2.1. Choix des composés modèles et des concentrations cibles.....	31
3.2.2. Choix des sites de prélèvements.....	34
3.3. <i>Sélection des sites de référence potentiels</i> .....	36
4. SOURCE, DEVENIR ET BIODISPONIBILITE DES PRINCIPAUX CONTAMINANTS .....	37
4.1. <i>Les éléments traces métalliques</i> .....	39
4.1.1. Source et caractéristiques .....	39
4.1.2. Spéciation et biodisponibilité .....	39
4.2. <i>Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques</i> .....	42
4.2.1. Sources et caractéristiques .....	42
4.2.2. Accumulation dans les sédiments et biodisponibilité .....	44
5. LES TESTS EMBRYO-LARVAIRES DE TOXICITE.....	46
5.1. <i>Intérêt des stades précoces de développement poisson en écotoxicologie : pertinence écologique, sensibilité et acceptabilité éthique</i> .....	46
5.2. <i>Les tests embryo-larvaires poisson normalisés</i> .....	48
5.3. <i>Applications et perspectives des SPD de poisson pour l'évaluation du risque environnemental et la recherche scientifique</i> .....	50
5.4. <i>Le modèle biologique Medaka japonais (Oryzias latipes)</i> .....	52
5.4.1. Généralités – classification et données écologiques .....	52
5.4.2. Les grandes étapes du développement embryonnaire.....	53
5.4.3. Utilisation du Medaka japonais en tant qu'organisme modèle .....	55
<b>CHAPITRE 2. BASES METHODOLOGIQUES .....</b>	<b>59</b>
1. PRELEVEMENT ET TRAITEMENT DES SEDIMENTS .....	61
1.1. <i>Sédiments de référence</i> .....	61
1.2. <i>Sédiments natifs testés</i> .....	62
2. CARACTERISATION GENERALE DES SEDIMENTS COLLECTES .....	63
2.1. <i>Granulométrie et Carbone organique particulaire</i> .....	63

2.2. Ammonium et Sulfures .....	63
3. DOPAGE DES SEDIMENTS .....	63
3.1. Dopage en substances hydrophobes .....	64
3.2. Dopage en éléments métalliques .....	64
4. ANALYSE DES CONTAMINANTS DANS LES SEDIMENTS, PHASE AQUEUSE ET LES TISSUS) .....	66
4.1. Dosage des HAP.....	66
4.1.1. Préparation des échantillons et protocole d'extraction .....	67
4.1.2. Dosage des HAP par GC/MS .....	70
4.2. Dosage des Métaux .....	71
4.2.1. Dosage des métaux .....	71
4.2.2. Préparation des échantillons et minéralisation .....	71
4.2.3. Dosage des éléments métalliques par spectrométrie d'absorption atomique à flamme .....	72
4.2.4. Dosage du cadmium par spectrométrie d'absorption atomique à four graphite .....	73
5. PRODUCTION D'EMBRYONS DE MEDAKA JAPONAIS .....	74
5.1. Élevage et maintien du stock de géniteurs .....	74
5.2. Reproduction assistée et collecte des embryons .....	74
6. DEROULEMENT DU TEST EMBRYO-LARVAIRE MEDAKA (MELA) .....	76
6.1. Conditions d'exposition .....	76
6.2. Suivi de l'oxygène dissous.....	78
6.3. Suivi des paramètres phénotypiques.....	81
6.3.1. Viabilité, taux d'éclosion et durée du développement .....	81
6.3.2. Rythme cardiaque .....	83
6.3.3. Malformations.....	83
6.4. Évaluation des dommages à l'ADN par le test Comète .....	85
6.4.1. Dissociation cellulaire.....	87
6.4.2. Le Test Comète.....	87
6.4.3. Lecture des lames.....	89
7. ANALYSES BIOMOLECULAIRES .....	89
7.1. Dosage des métallothionéines (MT).....	91
7.1.1. Protocole d'extraction et de purification des MT.....	91
7.1.2. Dosage du mercure par spectrométrie d'absorption atomique sans flamme.....	93
7.2. Analyses de l'expression de gènes cibles .....	94
7.2.1. Extraction des ARN totaux.....	94
7.2.2. Rétro-transcription (RT) .....	95
7.2.3. Design et contrôle de la qualité des amorces .....	97
7.2.4. PCR quantitative en temps réel (qPCR) .....	98
8. TRAITEMENT ET ANALYSE STATISTIQUES DES RESULTATS.....	103

### CHAPITRE 3. ANALYSE DES EFFETS TOXIQUES DU CUIVRE ET DU CADMIUM SUR LE DEVELOPPEMENT DU MEDAKA JAPONAIS ..... 105

1. GENERALITES SUR LA TOXICITE DES ELEMENTS TRACES METALLIQUES CHEZ LES ORGANISMES AQUATIQUES .....	107
1.1. Transfert des éléments métalliques aux organismes aquatiques.....	107
1.1.1. Généralités .....	107
1.1.2. Les voies d'assimilation du Cu et du Cd.....	109
1.1.3. Bioaccumulation dans l'organisme.....	112
1.2. Effets toxiques des éléments métalliques chez les organismes aquatiques .....	113
1.2.1. Effets sur la survie, la croissance et le développement.....	113
1.2.2. Perturbations de l'ionorégulation .....	116
1.2.3. Génération de stress oxydant .....	117
1.2.4. Génotoxicité.....	119
1.2.5. Quelques effets sur le comportement .....	121
2. SELECTION DU SEDIMENT DE REFERENCE.....	122
2.1. Protocole expérimental .....	123
2.1.1. Conditions d'exposition.....	123
2.1.2. Paramètres suivis .....	123
2.2. Caractérisation physico-chimique des sédiments.....	124
2.2.1. Granulométrie.....	124
2.2.2. Teneurs en ammonium, sulfures et carbone organique particulaire .....	126
2.2.3. Teneurs en micropolluants dans les sédiments .....	127
2.3. Résultats du test MELA.....	128
2.3.1. Toxicité aigüe .....	128
2.3.2. Tératogénicité & autres effets sublétaux .....	128
2.3.3. Génotoxicité (test comète) .....	133

2.4.	<i>Discussion et choix de la matrice de référence</i> .....	133
3.	ÉVALUATION DE L'EMBRYOTOXICITE DU CUIVRE ET DU CADMIUM PAR LE MELA.....	136
3.1.	<i>Protocole expérimental</i> .....	136
3.1.1.	Conditions d'exposition.....	136
3.1.2.	Paramètres suivis.....	137
3.2.	<i>Concentrations en éléments métalliques dans le sédiment</i> .....	138
3.3.	<i>Résultats du test MELA</i> .....	139
3.3.1.	Toxicité aigüe.....	139
3.3.2.	Tératogénicité & autres effets sublétaux.....	139
3.3.3.	Génotoxicité du cuivre et du cadmium (Test comète).....	143
3.4.	<i>Discussion</i> .....	145
3.4.1.	Dopage du sédiment.....	145
3.4.2.	Impact du Cu et du Cd sur le taux de survie et le développement général.....	146
3.4.3.	Tératogénicité du Cu et du Cd.....	147
3.4.4.	Pouvoir génotoxique du Cu et du Cd.....	149
3.4.5.	Proposition de LOEC dans le sédiment pour le Cu et le Cd.....	150
4.	ANALYSE CROISEE DES EFFETS EMBRYOTOXIQUES ET DES REPONSES BIOMOLECULAIRES APRES EXPOSITION AU CADMIUM	152
4.1.	<i>Choix des gènes étudiés</i> .....	153
4.2.	<i>Protocole expérimental</i> .....	154
4.2.1.	Conditions d'exposition.....	154
4.2.2.	Paramètres suivis et prélèvements.....	155
4.3.	<i>Concentrations en métaux lourds dans le sédiment et l'ERS</i> .....	156
4.4.	<i>Bioaccumulation du cadmium chez les embryons et larves</i> .....	157
4.5.	<i>Toxicité et modification du profil d'expression génique</i> .....	159
4.5.1.	Toxicité aigüe.....	159
4.5.2.	Tératogénicité & autres effets sublétaux.....	159
4.5.3.	Dosage des métallothionéines.....	162
4.5.4.	Altération du profil d'expression génique.....	162
4.6.	<i>Discussion</i> .....	164
4.6.1.	Suivi de la contamination en Cd dans le sédiment et la phase aqueuse.....	165
4.6.2.	Toxicité aigüe et impact sur le développement général.....	165
4.6.3.	Bioaccumulation en Cd chez les embryons et larves de Medaka.....	165
4.6.4.	Tératogénicité et altération du rythme cardiaque.....	166
4.6.5.	Réponse des métallothionéines (MT).....	167
4.6.6.	Réponses des mécanismes pro-apoptotiques et de réparations de l'ADN chez les embryons.....	167
4.6.7.	Impact sur le métabolisme mitochondrial larvaire.....	168
4.6.8.	Activation de la voie Wnt-1.....	169

## CHAPITRE 4. ANALYSE DES EFFETS TOXIQUES DU PYRENE ET DU METHYLPYRENE SUR LE DEVELOPPEMENT DU MEDAKA JAPONAIS..... 171

1.	GENERALITES SUR LA TOXICITE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES CHEZ LES ORGANISMES AQUATIQUES	173
1.1.	<i>Transfert des HAP aux organismes aquatiques</i> .....	173
1.1.1.	Absorption et bioaccumulation des HAP.....	173
1.1.2.	Distribution dans l'organisme.....	176
1.1.3.	Les mécanismes de métabolisation (biotransformation).....	178
1.2.	<i>Effets toxiques des HAP chez les organismes aquatiques</i> .....	181
1.2.1.	Embryotoxicité & tératogénicité des HAP.....	182
1.2.2.	Cardiotoxicité.....	185
1.2.3.	Mécanisme de toxicité AhR-dépendant (dioxine-like).....	187
1.2.4.	Effets narcotiques des HAP (AhR-indépendante).....	191
1.2.5.	Impact sur le métabolisme de la vitamine A.....	192
1.2.6.	Génotoxicité et oncogénèse.....	196
2.	ÉVALUATION DE L'EMBRYOTOXICITE DU PYRENE ET DU METHYLPYRENE PAR LE MELA.....	198
2.1.	<i>Protocole expérimental</i> .....	199
2.1.1.	Conditions d'exposition.....	199
2.1.2.	Paramètres suivis.....	199
2.2.	<i>Concentrations en HAP dans le sédiment</i> .....	200
2.3.	<i>Résultats du test MELA</i> .....	201
2.3.1.	Toxicité aigüe.....	201
2.3.2.	Tératogénicité & autres effets sublétaux.....	203
2.4.	<i>Discussion</i> .....	208
2.4.1.	Concentrations en Pyr et en MePyr dans le sédiment.....	208
2.4.2.	Estimation de la concentration en HAP dans la colonne d'eau et toxicité aigüe.....	210

2.4.3. Tératogénicité du Pyr et du MePyr .....	211
3. ANALYSE CROISEE DES EFFETS EMBRYOTOXIQUES ET DES REPONSES BIOMOLECULAIRES APRES EXPOSITION AU PYRENE ET AU METHYLPYRENE.....	213
3.1. <i>Choix des gènes étudiés</i> .....	214
3.2. <i>Protocole expérimental</i> .....	215
3.2.1. Conditions d'exposition.....	215
3.2.2. Paramètres suivis et prélèvements .....	216
3.3. <i>Concentrations en HAP dans le sédiment et l'ERS</i> .....	217
3.4. <i>Toxicité et modification du profil d'expression génique</i> .....	217
3.4.1. Toxicité aiguë .....	217
3.4.2. Tératogénicité & autres effets sublétaux .....	219
3.4.3. Génotoxicité (test comète) .....	224
3.4.4. Altération du profil d'expression génique .....	224
3.5. <i>Discussion</i> .....	226
3.5.1. Toxicité aiguë du Pyr et du MePyr.....	227
3.5.2. Tératogénicité et impact des HAP sur la croissance des individus exposés .....	228
3.5.3. Analyse du profil d'expression génique.....	230
3.5.4. Conclusion sur les expositions au Pyr et au MePyr et proposition de LOEC dans le sédiment .....	232

## CHAPITRE 5. CARACTERISATION DE LA TOXICITE DE SEDIMENTS NATURELS ISSUS DE DIFFERENTS ECOSYSTEMES AQUITAINS SUR LE DEVELOPPEMENT DU MEDAKA JAPONAIS ..... 233

1. RAPPEL DES DIFFERENTS SITES DE PRELEVEMENTS DES SEDIMENTS ETUDIES.....	235
1.1. <i>Sites du système fluvial Lot-Garonne</i> .....	235
1.2. <i>Sites sur le Bassin d'Arcachon</i> .....	237
2. ÉVALUATION DE L'EMBRYOTOXICITE DES SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE ET DU BASSIN D'ARCACHON.....	237
2.1. <i>Protocole expérimental</i> .....	239
2.1.1. Conditions d'exposition.....	239
2.1.2. Paramètres suivis .....	239
2.2. <i>Caractérisation physico-chimique des sédiments</i> .....	240
2.2.1. Granulométrie et carbone organique.....	240
2.2.2. Concentration en HAP .....	243
2.2.3. Concentration en éléments métalliques .....	243
2.2.4. Suivi de l'oxygène dissous .....	247
2.3. <i>Résultats du test MELA</i> .....	247
2.3.1. Toxicité aiguë .....	247
2.3.2. Tératogénicité & autres effets sublétaux .....	250
2.4. <i>Génotoxicité (test comète)</i> .....	256
2.5. <i>Synthèse des principaux résultats</i> .....	257
3. ANALYSE CROISEE DES EFFETS EMBRYOTOXIQUES ET DES REPONSES BIOMOLECULAIRES APRES EXPOSITION AUX SEDIMENTS NATURELS DU SYSTEME LOT-GARONNE ET DU BASSIN D'ARCACHON .....	260
3.1. <i>Choix des gènes étudiés</i> .....	260
3.2. <i>Protocole expérimental</i> .....	261
3.2.1. Conditions d'exposition.....	261
3.2.2. Paramètres suivis et prélèvements .....	262
3.3. <i>Concentrations en principaux contaminants dans les sédiments et l'ERS</i> .....	263
3.4. <i>Suivi de l'oxygène dissous</i> .....	263
3.5. <i>Bioaccumulation en HAP et en métaux chez les embryons et larves</i> .....	263
3.6. <i>Toxicité et modification du profil d'expression génique</i> .....	263
3.6.1. Toxicité aiguë .....	263
3.6.2. Tératogénicité & autres effets sublétaux .....	263
3.6.3. Altération du profil d'expression génique .....	268
3.7. <i>Synthèse des principaux résultats</i> .....	269
4. DISCUSSION.....	270
4.1. <i>Réponses biomoléculaires et embryotoxicité induites par les sédiments du Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon</i> .....	271
4.2. <i>Evaluation de la toxicité de sédiments naturels : résultats du test MELA et approche TEC/PEC</i> ....	274
4.3. <i>Quel(s) lien(s) entre les réponses biologiques et la contamination chimique des sédiments ?</i> .....	276

## CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES..... 281

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... 291

## ANNEXES ..... 309

<b>ANNEXE 1.....</b>	<b>311</b>
<b>ANNEXE 2.....</b>	<b>321</b>
<b>ANNEXE 3.....</b>	<b>329</b>
<b>ANNEXE 4.....</b>	<b>343</b>
<b>ANNEXE 5.....</b>	<b>347</b>
<b>ANNEXE 6.....</b>	<b>351</b>





# Table des Figures

## CHAPITRE 1. CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

FIGURE 1.1. OCCUPATION DES SOLS DE LA REGION AQUITAINE EN 2006.....	15
FIGURE 1.2. RESEAU HYDROGRAPHIQUE SIMPLIFIE DE LA GIRONDE .....	17
FIGURE 1.3. ÉVOLUTION DE LA BIOACCUMULATION EN Cd, Pb ET Hg CHEZ LES HUITRES CREUSES DE L'ESTUAIRE DE LA GIRONDE .....	19
FIGURE 1.4. ÉVOLUTION DES CONCENTRATIONS EN Cd DISSOUS (A) ET PARTICULAIRE (B) LE LONG DU CONTINUUM LOT-GARONNE-GIRONDE, D'APRES BLANC ET AL. (1999). .....	21
FIGURE 1.5. RESEAU HYDROGRAPHIQUE DU BASSIN D'ARCACHON .....	23
FIGURE 1.6. ÉVOLUTION DE LA BIOACCUMULATION EN Cu CHEZ LES HUITRES DU SITE DE COMPRIAN (A) ET DES JACQUETS (B) SELON LE RAPPORT IFREMER DE 2008. ....	25
FIGURE 1.7. ÉVOLUTION DE LA BIOACCUMULATION EN HAP CHEZ LES HUITRES DU BASSIN D'ARCACHON SUR LES SITES DU CAP FERRET, DES JACQUETS ET DE COMPRIAN. ....	28
FIGURE 1.8. SITES D'ECHANTILLONNAGE SUR LE CONTINUUM LOT-GARONNE .....	32
FIGURE 1.9. SITES D'ECHANTILLONNAGE SUR LE BASSIN D'ARCACHON (PROJET ASCOBAR 2008-2009) .....	35
FIGURE 1.10. CONCENTRATIONS EN HAP (NG/G P.S.) MESUREES DANS LES SEDIMENTS DU BASSIN D'ARCACHON (PROJET ASCOBAR 2008-2009).....	35
FIGURE 1.11. SITES D'ECHANTILLONNAGE DES SEDIMENTS DE REFERENCE POTENTIELS.....	38
FIGURE 1.12. STRUCTURE CHIMIQUE DES 16 HAP PRIORITAIRES DE L'US-EPA. ....	43
FIGURE 1.13. STADES DE DEVELOPPEMENT, DUREES DES TESTS NORMALISES POISSONS ET STATUTS DE PROTECTION, SELON EMBRY ET AL. (2010).....	51
FIGURE 1.14. PHOTOGRAPHIES DE MEDAKAS ORYZIAS LATIPES MALE (EN HAUT) ET FEMELLE (EN BAS).....	54
FIGURE 1.15. PHOTOGRAPHIES DE MEDAKAS ORYZIAS LATIPES DURANT LES DIFFERENTES PHASES DE LEUR DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE A 26 °C .....	56

## CHAPITRE 2. BASES METHODOLOGIQUES

FIGURE 2.1. SCHEMA DE FONCTIONNEMENT DE L'EVAPORATEUR ROTATIF.....	65
FIGURE 2.2. PROTOCOLE D'EXTRACTION DES HAP ASSISTEE PAR MICRO-ONDES .....	68
FIGURE 2.3. INSTALLATION D'ELEVAGE DE MEDAKA JAPONAIS .....	75
FIGURE 2.4. EMBRYONS DE MEDAKA DE STADE PRE-MORULA (2-4 HEURES PF) .....	77
FIGURE 2.5. ILLUSTRATION DU MATERIEL D'EXPOSITION UTILISE LORS DU TEST MELA .....	79
FIGURE 2.6. EMBRYONS (A) ET LARVES (B) DE MEDAKA EN COURS D'EXPERIENCE.....	79
FIGURE 2.7. VUE GLOBALE DU PROTOCOLE D'EXPOSITION DES SPD DE MEDAKA APPLIQUE LORS DU TEST MELA .....	80
FIGURE 2.8. DEROULEMENT GENERAL DU TEST MELA .....	82
FIGURE 2.9. PHOTOS D'EMBRYONS MORTS (A) ET D'EMBRYONS AU JOUR 6 PF (B) .....	82
FIGURE 2.10. MESURES BIOMETRIQUES SUR LES LARVES NOUVELLEMENT ECLOSES .....	84
FIGURE 2.11. ILLUSTRATIONS DES DIFFERENTS TYPES DE MALFORMATIONS POUVANT ETRE OBSERVES CHEZ LES LARVES A L'ECLOSION .....	86
FIGURE 2.12. EXEMPLES DE COMETES A DIFFERENTS NIVEAUX D'ENDOMMAGEMENT DE L'ADN.....	88
FIGURE 2.13. PRINCIPALES ETAPES DE LA DISSOCIATION CELLULAIRE ET DU TEST COMETE .....	90
FIGURE 2.14. PRINCIPALES ETAPES DU PROTOCOLE DE DOSAGE DES MT PAR SATURATION AU Hg "FROID" .....	92
FIGURE 2.15. GRANDES ETAPES DE LA RETRO-TRANSCRIPTION DE L'ARN EN ADNC .....	96
FIGURE 2.16. EXEMPLE DE COURBES DE FUSION (A) ET DE MIGRATION D'AMPLICONS SUR GEL D'AGAROSE APRES ELECTROPHORESE (B) .....	99
FIGURE 2.17. GRANDES ETAPES D'UN CYCLE DE PCR.....	99
FIGURE 2.18. EXEMPLES DE COURBES D'AMPLIFICATION OBTENUES PAR QPCR SUR LE LIGHT CYCLER® .....	100
FIGURE 2.19. ARBRE DE DECISION UTILISE LORS DU TRAITEMENT STATISTIQUE DES RESULTATS .....	104

## CHAPITRE 3. ANALYSE DES EFFETS TOXIQUES DU CUIVRE ET DU CADMIUM SUR LE DEVELOPPEMENT DU MEDAKA JAPONAIS

FIGURE 3.1. LES VOIES DE TRANSFERT TRANSMEMBRANAIRE APICAL ET BASOLATERAL DU Cd SELON McGEER ET AL. (SOUS PRESSE). .....	110
FIGURE 3.2. LES VOIES DE TRANSFERT TRANSMEMBRANAIRE APICAL ET BASOLATERAL DU Cu SELON GROSELL (SOUS PRESSE). .....	111
FIGURE 3.3. DISTRIBUTION GRANULOMETRIQUE DE LA TAILLE DES PARTICULES DES SEDIMENTS DE REFERENCE .....	125
FIGURE 3.4. VIABILITES EMBRYONNAIRE (A), LARVAIRE (B) ET CUMULEE (C) DES EMBRYONS ET LARVES DE MEDAKA APRES EXPOSITION AUX SEDIMENTS DE REFERENCE .....	129
FIGURE 3.5. DUREE DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DES INDIVIDUS EXPOSES AUX SEDIMENTS DE REFERENCE .....	129

FIGURE 3.6. ACTIVITE CARDIAQUE DES EMBRYONS AGES DE 6 J PF (A) ET 7 J PF (B) EXPOSES AUX SEDIMENTS DE REFERENCE .....	131
FIGURE 3.7. MESURES BIOMETRIQUES ACQUISES SUR LES LARVES NOUVELLEMENT ECLOSES AU COURS DE L'EXPOSITION AUX SEDIMENTS DE REFERENCE .....	131
FIGURE 3.8. POURCENTAGE DE LARVES PRESENTANT DES MALFORMATIONS APRES EXPOSITION AUX SEDIMENTS DE REFERENCE .....	132
FIGURE 3.9. DOMMAGES A L'ADN OBSERVES CHEZ DES LARVES AGEES DE 2 J POST-ECLOSION APRES EXPOSITION AUX DIFFERENTS SEDIMENTS DE REFERENCE EVALUES PAR LE TEST COMETE .....	134
FIGURE 3.10. VIABILITES EMBRYONNAIRE (A) ET LARVAIRE (B) DES EMBRYONS ET LARVES DE MEDAKA EXPOSES AUX SEDIMENTS DOPES EN CUIVRE OU EN CADMIUM .....	140
FIGURE 3.11. TAUX D'ECLOSION (A) ET DUREE DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE (B) DES INDIVIDUS EXPOSES AUX SEDIMENTS DOPES EN CUIVRE OU EN CADMIUM .....	140
FIGURE 3.12. ACTIVITE CARDIAQUE DES EMBRYONS AGES DE 6 J PF (A) ET 7 J PF (B) EXPOSES AUX SEDIMENTS DOPES EN CUIVRE OU EN CADMIUM .....	140
FIGURE 3.13. MESURES BIOMETRIQUES DES LARVES NOUVELLEMENT ECLOSES APRES EXPOSITION AUX SEDIMENTS DOPES EN CUIVRE OU EN CADMIUM .....	142
FIGURE 3.14. POURCENTAGE D'INDIVIDUS PRESENTANT DES MALFORMATIONS APRES EXPOSITION AUX SEDIMENTS DOPES EN CUIVRE OU EN CADMIUM .....	142
FIGURE 3.15. DOMMAGES A L'ADN EVALUES PAR LE TEST COMETE CHEZ DES LARVES AGEES DE 2J POST-ECLOSION APRES EXPOSITION AUX SEDIMENTS DOPES EN CUIVRE OU EN CADMIUM .....	144
FIGURE 3.16. ÉVOLUTION DE LA CONTAMINATION EN Cd DE L'ERS LORS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LE Cd CHEZ LES EMBRYONS DE MEDAKA .....	158
FIGURE 3.17. ÉVOLUTION DE LA TENEUR EN Cd CHEZ LES EMBRYONS (T7) ET LARVES (T9) DE MEDAKA LORS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LE Cd .....	158
FIGURE 3.18. VIABILITE EMBRYONNAIRE LORS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LE Cd .....	160
FIGURE 3.19. TAUX D'ECLOSION (A) ET DUREE DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE (B) OBSERVES LORS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LE Cd .....	160
FIGURE 3.20. RYTHME CARDIAQUE DES EMBRYONS AU JOUR 6 ET 7 PF AU COURS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LE Cd .....	161
FIGURE 3.21. MESURES BIOMETRIQUES ACQUISES SUR LES LARVES NOUVELLEMENT ECLOSES AU COURS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LE Cd .....	161
FIGURE 3.22. POURCENTAGE DE LARVES MALFORMEES OBSERVEES AU COURS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LE Cd .....	163
FIGURE 3.23. ÉVOLUTION DE LA TENEUR EN MT DES EMBRYONS (T7) ET LARVES (T9) DE MEDAKA LORS L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LE Cd .....	163
FIGURE 3.24. SCHEMA GLOBAL DES MECANISMES SUPPOSES DE TOXICITE MIS EN EVIDENCE AU COURS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LE Cd .....	170

#### CHAPITRE 4. ANALYSE DES EFFETS TOXIQUES DU PYRENE ET DU METHYLPYRENE SUR LE DEVELOPPEMENT DU MEDAKA JAPONAIS

FIGURE 4.1. METABOLISATION DU B[A]P .....	180
FIGURE 4.2. METABOLISATION DU MePYR .....	180
FIGURE 4.3. ACTIVATION DE LA VOIE AHR PAR LES HAP .....	188
FIGURE 4.4. STRUCTURE GENERALE DES RETINOÏDES .....	193
FIGURE 4.5. METABOLISME DE LA VITAMINE A .....	193
FIGURE 4.6. VIABILITES EMBRYONNAIRE (A) ET LARVAIRE (B) DES MEDAKA APRES EXPOSITION AUX SEDIMENTS DOPES EN PYRENE ET EN METHYLPYRENE .....	202
FIGURE 4.7. ÉVOLUTION DU TAUX D'ECLOSION JOURNALIER AU COURS DES EXPOSITIONS AUX SEDIMENTS DOPES EN PYRENE (A) ET EN METHYLPYRENE (B) .....	204
FIGURE 4.8. DUREE DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DES MEDAKAS EXPOSES AUX SEDIMENTS DOPES EN PYRENE ET EN METHYLPYRENE .....	204
FIGURE 4.9. ACTIVITE CARDIAQUE DES EMBRYONS AGES DE 6 J PF (A) ET 7 J PF (B) EXPOSES AUX SEDIMENTS DOPES EN PYRENE ET EN METHYLPYRENE .....	205
FIGURE 4.10. MESURES BIOMETRIQUES ACQUISES SUR LES LARVES NOUVELLEMENT ECLOSES APRES EXPOSITION AUX SEDIMENTS DOPES EN PYRENE ET EN METHYLPYRENE .....	207
FIGURE 4.11. POURCENTAGE D'INDIVIDUS PRESENTANT DES MALFORMATIONS APRES EXPOSITION AUX SEDIMENTS DOPES EN PYRENE ET EN METHYLPYRENE .....	207
FIGURE 4.12. TAUX DE SURVIE DES EMBRYONS LORS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LE PYR ET LE MePYR .....	218
FIGURE 4.13. TAUX D'ECLOSION (A) ET DUREE DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE (B) OBSERVES LORS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LE PYR ET LE MePYR .....	220

FIGURE 4.14. RYTHME CARDIAQUE DES EMBRYONS AU JOUR 6 ET 7 PF AU COURS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LE PYR ET LE ME <sub>2</sub> PYR .....	220
FIGURE 4.15. MESURES BIOMETRIQUES ACQUISES CHEZ LES LARVES NOUVELLEMENT ECLOSES AU COURS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LE PYR ET LE ME <sub>2</sub> PYR .....	221
FIGURE 4.16. POURCENTAGE DE LARVES MALFORMEES OBSERVEES AU COURS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LE PYR ET LE ME <sub>2</sub> PYR .....	223
FIGURE 4.17. ÉVALUATION PAR LE TEST COMETE DES DOMMAGES A L'ADN CHEZ DES LARVES DE MEDAKA AGES DE 2J POST-ECLOSION APRES EXPOSITION A DES SEDIMENTS DOPES EN PYR ET EN ME <sub>2</sub> PYR DURANT LEUR DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE .....	225

## CHAPITRE 5. CARACTERISATION DE LA TOXICITE DE SEDIMENTS NATURELS ISSUS DE DIFFERENTS ECOSYSTEMES AQUITAINS SUR LE DEVELOPPEMENT DU MEDAKA JAPONAIS

FIGURE 5.1. SCHEMATISATION DES SITES DE PRELEVEMENTS DES SEDIMENTS NATURELS SUR LE SYSTEME LOT-GARONNE .....	236
FIGURE 5.2. SCHEMATISATION DES SITES DE PRELEVEMENTS DES SEDIMENTS NATURELS SUR LE BASSIN D'ARCACHON (CAMPAGNE DE MARS 2009 EFFECTUEE DANS LE CADRE DU PROJET ASCOBAR) .....	238
FIGURE 5.3. DISTRIBUTION GRANULOMETRIQUE DE LA TAILLE DES PARTICULES DES SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE .....	241
FIGURE 5.4. DISTRIBUTION GRANULOMETRIQUE DE LA TAILLE DES PARTICULES DES SEDIMENTS DU BASSIN D'ARCACHON .....	241
FIGURE 5.5. CONCENTRATIONS TOTALES EN HAP ET EN METAUX MESUREES DANS LES SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE (A) ET DU BASSIN D'ARCACHON (B) .....	245
FIGURE 5.6. SUIVI DE L'OXYGENE DISSOUS LORS DES EXPOSITIONS AUX SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE (A) ET DU BASSIN D'ARCACHON (B) .....	248
FIGURE 5.7. VIABILITES EMBRYONNAIRE (A, B) ET LARVAIRE (C, D) DES EMBRYONS ET LARVES DE MEDAKA APRES EXPOSITION AUX SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE (A, C) ET DU BASSIN D'ARCACHON (B, D) .....	249
FIGURE 5.8. VIABILITE CUMULEE DES EMBRYONS ET LARVES DE MEDAKA APRES EXPOSITION AUX SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE .....	249
FIGURE 5.9. DUREE DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DES INDIVIDUS EXPOSES AUX SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE (A) ET DU BASSIN D'ARCACHON (B) .....	251
FIGURE 5.10. ACTIVITE CARDIAQUE DES EMBRYONS AGES DE 6 J PF (A, B) ET 7 J PF (C, D) PENDANT LEUR EXPOSITION AUX SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE (A, C) ET DU BASSIN D'ARCACHON (B, D) .....	251
FIGURE 5.11. MESURES BIOMETRIQUES ACQUISES SUR LES LARVES NOUVELLEMENT ECLOSES AU COURS DE L'EXPOSITION AUX SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE (A, C) ET DU BASSIN D'ARCACHON (B, D) .....	253
FIGURE 5.12. POURCENTAGE D'INDIVIDUS PRESENTANT DES MALFORMATIONS APRES EXPOSITION AUX SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE (A) ET DU BASSIN D'ARCACHON (B) .....	255
FIGURE 5.13. DOMMAGES A L'ADN EVALUES PAR LE TEST COMETE CHEZ DES LARVES AGEES DE 2 J POST-ECLOSION APRES EXPOSITION AUX SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE .....	258
FIGURE 5.14. SUIVI DE L'OXYGENE DISSOUS LORS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LES SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE ET DU BASSIN D'ARCACHON .....	264
FIGURE 5.15. VIABILITE EMBRYONNAIRE OBSERVEE LORS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LES SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE ET DU BASSIN D'ARCACHON .....	264
FIGURE 5.16. TAUX D'ECLOSION (A) ET DUREE DU DEVELOPPEMENT (B) DES EMBRYONS LORS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LES SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE ET DU BASSIN D'ARCACHON .....	265
FIGURE 5.17. MESURES BIOMETRIQUES ACQUISES SUR LES LARVES NOUVELLEMENT ECLOSES AU COURS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LES SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE ET DU BASSIN D'ARCACHON .....	267
FIGURE 5.18. POURCENTAGE DE LARVES MALFORMEES OBSERVEES AU COURS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LES SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE ET DU BASSIN D'ARCACHON .....	267



# Table des Tableaux

## CHAPITRE 1. CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

TABLEAU 1.1. INFORMATIONS TOXICOLOGIQUES ET ECOTOXICOLOGIQUES A RENSEIGNER LORS DE LA PROCEDURE D'ENREGISTREMENT DES SUBSTANCES AUPRES DE L'AGENCE EUROPEENNE DES PRODUITS CHIMIQUES (SELON LE REGLEMENT CE N°1907/2006 UE, 2006).....	12
TABLEAU 1.2. RECAPITULATIF DES CONCENTRATIONS EN CU ET EN Cd RELEVÉES DANS LES SEDIMENTS DE LA REGION AQUITAINE.....	30
TABLEAU 1.3. QUELQUES SEUILS DE TOXICITE DETERMINES POUR LE PYR CONTENU DANS LES SEDIMENTS MARINS OU D'EAU DOUCE.	34
TABLEAU 1.4. INDICES MOLECULAIRES ET VALEURS SEUILS VISANT A IDENTIFIER LA SOURCE DES APPORTS EN HAP DANS DES MATRICES ENVIRONNEMENTALES D'APRES LA REVUE DE YUNKER ET AL. (2002) .....	44
TABLEAU 1.5. RECAPITULATIF DE LA SOLUBILITE DES HAP DANS L'EAU ET DES LOG $K_{ow}$ , LOG $K_{oc}$ ET $K_D$ PROPOSES PAR SVERDRUP ET AL. (2002) POUR 16 HAP .....	44

## CHAPITRE 2. BASES METHODOLOGIQUES

TABLEAU 2.1. ÉTALONS INTERNES EID ET EICR UTILISES POUR LE DOSAGE DES HAP DANS LES MATRICES SEDIMENTAIRES .....	69
TABLEAU 2.2. SEQUENCES DES AMORCES UTILISEES POUR LES AMPLIFICATIONS DES GENES D'INTERET AU COURS DE L'ETUDE .....	97

## CHAPITRE 3. ANALYSE DES EFFETS TOXIQUES DU CUIVRE ET DU CADMIUM SUR LE DEVELOPPEMENT DU MEDAKA JAPONAIS

TABLEAU 3.1. DIFFERENTES MALFORMATIONS RAPPORTEES DANS LA LITTERATURE CHEZ LES SPD DE PLUSIEURS ESPECES DE POISSON APRES EXPOSITION AU Cd ET AU CU.....	116
TABLEAU 3.2. CONDITIONS D'EXPOSITION APPLIQUEES LORS DE L'EXPOSITION DES EMBRYONS DE MEDAKA AUX SEDIMENTS DE REFERENCE .....	123
TABLEAU 3.3. PARAMETRES SUIVIS LORS DE L'EXPOSITION DES EMBRYONS DE MEDAKA AUX SEDIMENTS DE REFERENCE .....	124
TABLEAU 3.4. TENEURS EN AMMONIUM ( $NH_4^+$ ), SULFURES ( $H_2S$ ) ET CARBONE ORGANIQUE PARTICULAIRE (COP) DES DIFFERENTS SEDIMENTS DE REFERENCE .....	126
TABLEAU 3.5. TENEURS EN PRINCIPAUX ELEMENTS TRACES METALLIQUES DANS LES DIFFERENTS SEDIMENTS DE REFERENCE.....	127
TABLEAU 3.6. CONCENTRATIONS EN HAP INDIVIDUELS DES SEDIMENTS DE REFERENCE .....	128
TABLEAU 3.7. POURCENTAGES D'INDIVIDUS IMPACTES PAR LES DIFFERENTS TYPES DE MALFORMATIONS APRES EXPOSITION AUX SEDIMENTS DE REFERENCE .....	130
TABLEAU 3.8. CONDITIONS D'EXPOSITION APPLIQUEES LORS DE L'EXPOSITION DES EMBRYONS DE MEDAKA AUX SEDIMENTS DOPES EN CU ET EN Cd .....	137
TABLEAU 3.9. PARAMETRES SUIVIS LORS DE L'EXPOSITION DES EMBRYONS DE MEDAKA AUX SEDIMENTS DOPES EN CU ET EN Cd....	137
TABLEAU 3.10. CONCENTRATIONS EN Cd ET EN CU DANS LES SEDIMENTS UTILISES LORS DE L'EXPOSITION DES EMBRYONS DE MEDAKA AU CADMIUM ET AU CUIVRE .....	138
TABLEAU 3.11. POURCENTAGES D'INDIVIDUS IMPACTES PAR DIFFERENTS TYPES DE MALFORMATIONS APRES EXPOSITION AUX SEDIMENTS DOPES EN CUIVRE OU EN CADMIUM .....	141
TABLEAU 3.12. LOEC ETABLIES EN FONCTION DES DIFFERENTS MARQUEURS DE TOXICITE SUIVIS LORS DE L'EXPOSITION DES EMBRYONS DE MEDAKA A DES SEDIMENTS DOPES EN CU AU Cd.....	150
TABLEAU 3.13. LOEC RAPPORTEES DANS LA LITTERATURE APRES EXPOSITION DE DIFFERENTS ORGANISMES AQUATIQUES A DES SEDIMENTS DOPES EN Cd .....	151
TABLEAU 3.14. LOEC RAPPORTEES DANS LA LITTERATURE APRES EXPOSITION DE DIFFERENTS ORGANISMES AQUATIQUES A DES SEDIMENTS DOPES EN CU .....	151
TABLEAU 3.15. QUANTITES DE MATERIEL BIOLOGIQUE NECESSAIRES AUX ANALYSES MOLECULAIRES ENTREPRISES APRES EXPOSITION DES EMBRYONS AU Cd .....	154
TABLEAU 3.16. CONDITIONS D'EXPOSITION APPLIQUEES LORS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LE Cd CHEZ LES EMBRYONS DE MEDAKA.....	154
TABLEAU 3.17. PARAMETRES ETUDIES LORS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LE Cd CHEZ LES EMBRYONS DE MEDAKA.....	155
TABLEAU 3.18. CONCENTRATIONS EN Cd DANS LES SEDIMENTS UTILISES LORS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LE Cd CHEZ LES EMBRYONS DE MEDAKA .....	156
TABLEAU 3.19. POURCENTAGES D'INDIVIDUS IMPACTES PAR LES DIFFERENTS TYPES DE MALFORMATIONS APRES EXPOSITION AUX SEDIMENTS DOPES AU CADMIUM DANS LE CADRE DE L'ANALYSE CROISEE DES REPONSES PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES .....	162
TABLEAU 3.20. EXPRESSION DIFFERENTIELLE DES GENES D'INTERET CHEZ LES EMBRYONS (T7) ET LES LARVES (T9) DE MEDAKA AU COURS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LE Cd .....	164

## CHAPITRE 4. ANALYSE DES EFFETS TOXIQUES DU PYRENE ET DU METHYLPYRENE SUR LE DEVELOPPEMENT DU MEDAKA JAPONAIS

TABLEAU 4.1. LISTE DES HAP CANCERIGENES OU MUTAGENE SELON L'IARC.....	197
TABLEAU 4.2. CONDITIONS D'EXPOSITION APPLIQUEES LORS DE L'EXPOSITION DES EMBRYONS DE MEDAKA AUX SEDIMENTS DOPES EN PYRENE ET EN METHYLPYRENE.....	199
TABLEAU 4.3. PARAMETRES SUIVIS LORS DE L'EXPOSITION DES EMBRYONS DE MEDAKA AUX SEDIMENTS DOPES EN PYRENE ET EN METHYLPYRENE.....	199
TABLEAU 4.4. TENEURS DES SEDIMENTS DE MARCENAC ET D'YVILLE EN PYRENE ET METHYLPYRENE LORS DES ESSAIS PRELIMINAIRES D'ENROBAGE.....	200
TABLEAU 4.5. CONCENTRATIONS EN PYR ET EN MePYR DANS LES SEDIMENTS UTILISES LORS DE L'EXPOSITION DES EMBRYONS DE MEDAKA AU PYR ET AU MePYR.....	201
TABLEAU 4.6. POURCENTAGES D'INDIVIDUS IMPACTES PAR LES DIFFERENTS TYPES DE MALFORMATIONS APRES EXPOSITION AUX SEDIMENTS DOPES EN PYRENE ET EN METHYLPYRENE.....	208
TABLEAU 4.7. ESTIMATION DES CONCENTRATIONS EN PYR ET EN MePYR DANS LA PHASE AQUEUSE SELON LES TRAVAUX DE SVERDRUP ET AL. (2002).....	211
TABLEAU 4.8. QUANTITES DE MATERIEL BIOLOGIQUE NECESSAIRES AUX ANALYSES MOLECULAIRES ENTREPRISES APRES EXPOSITION DES EMBRYONS AU PYR ET AU MePYR.....	215
TABLEAU 4.9. CONDITIONS D'EXPOSITION APPLIQUEES LORS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LE PYR ET LE MePYR CHEZ LES EMBRYONS DE MEDAKA.....	215
TABLEAU 4.10. PARAMETRES ETUDIES LORS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LE PYR ET LE MePYR CHEZ LES EMBRYONS DE MEDAKA.....	216
TABLEAU 4.11. CONCENTRATIONS EN PYR ET MePYR DANS LES SEDIMENTS UTILISEES LORS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LE PYR ET LE MePYR CHEZ LES EMBRYONS DE MEDAKA.....	217
TABLEAU 4.12. POURCENTAGES D'INDIVIDUS IMPACTES PAR LES DIFFERENTS TYPES DE MALFORMATIONS APRES EXPOSITION AUX SEDIMENTS DOPES EN PYR ET EN MePYR DANS LE CADRE DE L'ANALYSE CROISEE DES REPONSES PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITES.....	222
TABLEAU 4.13. EXPRESSION DIFFERENTIELLE DES GENES D'INTERET CHEZ LES EMBRYONS (T7) ET LES LARVES (T9) DE MEDAKA AU COURS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LE PYR ET LE MePYR.....	226
TABLEAU 4.14. LOEC ETABLIES EN FONCTION DES DIFFERENTS MARQUEURS DE TOXICITE SUIVIS LORS DE L'EXPOSITION DES EMBRYONS DE MEDAKA A DES SEDIMENTS DOPES EN PYR ET EN MePYR.....	232

## CHAPITRE 5. CARACTERISATION DE LA TOXICITE DE SEDIMENTS NATURELS ISSUS DE DIFFERENTS ECOSYSTEMES AQUITAINS SUR LE DEVELOPPEMENT DU MEDAKA JAPONAIS

TABLEAU 5.1. CONDITIONS D'EXPOSITION APPLIQUEES LORS DE L'EXPOSITION DES EMBRYONS DE MEDAKA AUX SEDIMENTS NATURELS DU SYSTEME LOT-GARONNE ET DU BASSIN D'ARCACHON.....	239
TABLEAU 5.2. PARAMETRES SUIVIS LORS DE L'EXPOSITION DES EMBRYONS DE MEDAKA AUX SEDIMENTS NATURELS DU SYSTEME LOT-GARONNE ET DU BASSIN D'ARCACHON.....	240
TABLEAU 5.3. TENEURS EN CARBONE ORGANIQUE PARTICULAIRE DES SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE ET DU BASSIN D'ARCACHON.....	242
TABLEAU 5.4. CONCENTRATIONS EN HAP INDIVIDUELS DES SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE ET DU BASSIN D'ARCACHON.....	244
TABLEAU 5.5. TENEURS EN PRINCIPAUX ELEMENTS TRACES METALLIQUES DES SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE ET DU BASSIN D'ARCACHON.....	246
TABLEAU 5.6. POURCENTAGES D'INDIVIDUS IMPACTES PAR LES DIFFERENTS TYPES DE MALFORMATIONS APRES EXPOSITION AUX SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE ET DU BASSIN D'ARCACHON.....	256
TABLEAU 5.7. SYNTHESE DES RESULTATS OBTENUS A L'AIDE DES DIFFERENTS MARQUEURS ETUDIES AU COURS DE L'EVALUATION DE LA TOXICITE DES SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE ET DU BASSIN D'ARCACHON.....	259
TABLEAU 5.8. QUANTITES DE MATERIEL BIOLOGIQUE NECESSAIRES AUX ANALYSES MOLECULAIRES ENTREPRISES APRES EXPOSITION DES EMBRYONS DE MEDAKA AUX SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE ET DU BASSIN D'ARCACHON.....	261
TABLEAU 5.9. CONDITIONS D'EXPOSITION APPLIQUEES LORS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES APRES EXPOSITION DES EMBRYONS DE MEDAKA AUX SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE ET DU BASSIN D'ARCACHON.....	262
TABLEAU 5.10. PARAMETRES ETUDIES LORS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES APRES EXPOSITION DES EMBRYONS DE MEDAKA AUX SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE ET DU BASSIN D'ARCACHON.....	262
TABLEAU 5.11. POURCENTAGES D'INDIVIDUS IMPACTES PAR LES DIFFERENTS TYPES DE MALFORMATIONS APRES EXPOSITION AUX SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE ET DU BASSIN D'ARCACHON DANS LE CADRE DE L'ANALYSE CROISEE DES REPONSES PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITES.....	268
TABLEAU 5.12. EXPRESSION DIFFERENTIELLE DES GENES D'INTERET CHEZ LES EMBRYONS DE MEDAKA AU COURS DE L'ANALYSE CROISEE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET BIOMOLECULAIRES INDUITS PAR LES SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE ET DU BASSIN D'ARCACHON.....	269

TABLEAU 5.13. SYNTHÈSE DES RESULTATS OBTENUS A L'AIDE DES DIFFERENTS MARQUEURS ETUDIES AU COURS DE L'ETUDE DES EFFETS PHENOTYPIQUES ET MOLECULAIRES INDUITS PAR LES SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE ET DU BASSIN D'ARCACHON ...	270
TABLEAU 5.14. VALEURS QTEC ET QPEC CALCULES POUR LES SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE ET DU BASSIN D'ARCACHON .....	275
TABLEAU 5.15. COEFFICIENTS DE CORRELATION DE PEARSON ENTRE LES DIFFERENTES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE ET DU BASSIN D'ARCACHON.....	276
TABLEAU 5.16. COEFFICIENTS DE CORRELATION DE PEARSON ENTRE LES DIFFERENTES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES ET LES REPONSES TOXIQUES OBSERVEES POUR LES SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE .....	277
TABLEAU 5.17. COEFFICIENTS DE CORRELATION DE PEARSON ENTRE LES DIFFERENTES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES ET LES REPONSES TOXIQUES OBSERVEES POUR LES SEDIMENTS DU BASSIN D'ARCACHON.....	278





## Liste des Abréviations

8-oxodG : 8-Oxo-2'-désoxyguanosine  
 ADH : alcool déshydrogénase  
 ADN : acide désoxyribonucléique  
 ADNc : ADN complémentaire  
 AhR : aryl hydrocarbon receptor  
 AKR : aldo-céto réductase  
 ALDH : aldéhyde déshydrogénase  
 AR : acide rétinoïque  
 ARAT : acyl-coenzyme A rétinol acyltransférase  
 ARN : acide ribonucléique  
 ARNT : aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator  
 ASCOBAR : programme Apports Scientifiques face à la problématique COncylique dans le Bassin d'ARcachon  
 AVS : acid volatile sulfide  
 B[a]P : benzo[a]pyrène  
 BCF : facteur de bioconcentration  
 BER : base excision repair  
 BET : bromure d'éthidium  
 BSAF : biota-sediment accumulation factor  
 BSD : blue sac disease  
 CAR : constitutive androstane receptor  
 CAT : catalase  
 Cd : cadmium  
 CL50 : concentration létale à 50%  
 COP : carbone organique particulaire  
 CYP1A : cytochrome P4501A  
 DCE : directive cadre sur l'eau  
 DCM : dichlorométhane  
 DDT : dichlorodiphényltrichloréthane  
 DEPC : diéthyl pyrocarbonate  
 EH : époxyde hydrolase  
 EICR : l'étalon interne de contrôle de récupération  
 EID : étalon interne de dosage  
 EROD : éthoxyrésorufine-o-dééthylase  
 ERS : egg rearing solution  
 FET : Fish Embryo Toxicity  
 FI : facteur d'induction de l'expression d'un gène  
 GC-MS : chromatographie en phase gazeuse couplée la spectrométrie de masse  
 GPx : glutathion peroxydase  
 GSH : glutathion  
 GST : Glutathion-S-transférase  
 HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques  
 HER : hydrolase des esters du rétinol  
 Hg : mercure  
 HIF-1 : facteur inductible par l'hypoxie 1 ou hypoxia-inducible factor 1  
 HPLC : chromatographie liquide haute performance  
 $K_d$  : coefficient de partage entre le sédiment et l'eau  
 $K_i$  : coefficient de réponse  
 $K_{oc}$  : coefficient de partage sédiment - eau normalisé par la teneur en carbone organique du sédiment  
 $K_{ow}$  : coefficient de partage *n*-octanol-eau  
 $K_{ow}$  : coefficient de partage octanol-eau  
 LC/MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse  
 LMPA : low melting point agarose  
 LOEC : lowest observed effect concentration  
 LOEC : Lowest observed effects concentration  
 LRAT : lécithine rétinol acyltransférase  
 MELA : Medaka embryo-larval assay  
 MELA : test embryo-larvaire Medaka  
 MEM : minimum essential medium  
 MePyr : 1-méthylpyrène  
 MFO : mixed function oxydase  
 MMR : mismatch repair  
 MT : métallothionéines

NER : nucleotide excision repair  
NMPA : normal melting point agarose  
NOEC : no observed effect concentration  
NQE : norme de qualité environnementale  
OCDE : Organisation du Commerce et du Développement Économique  
p.f. : poids frais  
p.h. : poids humide  
p.s. : poids sec  
PCB : polychlorobiphényle  
PEC : probable effect concentration  
pf : post-fécondation  
PNEC : predicted no effect concentration  
POP : polluants organiques persistants  
PXR : pregnane X receptor  
Pyr : pyrène  
qPCR : quantitative polymerase chain reaction ou réaction en chaîne par polymérase  
QR : quinone réductase  
RALDH : rétinaldéhyde déshydrogénase  
RAR : récepteur de l'acide rétinoïque  
RARE : éléments de réponses de l'acide rétinoïque  
REACH : Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals  
RNO : Réseau National d'Observation  
ROCCH : Réseau d'Observation de la Contamination Chimique  
RODH : rétinol déshydrogénase  
RT : rétro-transcription ou transcription inverse  
RXR : récepteur X des rétinoïdes  
*shh* : sonic hedgehog  
*sih* : mutation *silent heart*  
SPD : stades précoces de développement  
T3 : triiodothyronine  
TBT : tributylétain  
TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine  
TEC : threshold effect concentration  
TEF : toxic equivalent factor  
TEQ : toxic equivalent  
Tm : température de fusion ou d'hybridation  
TR : récepteur de l'hormone thyroïdienne  
UE : Union européenne  
UGT : UDP-glucuronyltransférase  
VEGF : vascular endothelium growth factor  
XRE : xenobiotic response element  
Zn : zinc  
 $\alpha$ NF :  $\alpha$ -naphthoflavone  
 $\beta$ NF :  $\beta$ -naphthoflavone

---

# *INTRODUCTION GENERALE*

---



## Introduction Générale

Depuis le début de l'ère industrielle, les écosystèmes aquatiques et terrestres subissent une pression anthropique grandissante. Le développement exponentiel notamment de l'industrialisation et de l'urbanisation engendre chaque année le déversement de milliers de substances de nature variée dans l'environnement. Ces composés finissent bien souvent leur course dans le milieu aquatique qui agit comme le réceptacle final d'un bon nombre de polluants d'origine anthropique.

Devant la dégradation grandissante de la qualité des eaux européennes, engendrant des problèmes sanitaires mais menaçant également la biodiversité et donc l'équilibre déjà précaire des écosystèmes aquatiques, l'Union européenne (UE) a réagi en adoptant, le 23 octobre 2000, une directive établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau, nommée directive cadre sur l'eau (DCE ; UE, 2000). Ce texte impose à l'ensemble des états membres de parvenir à un « bon état chimique et écologique » des eaux continentales, souterraines et côtières à l'horizon 2015. La directive s'accompagne notamment d'une décision dressant une liste de 41 substances identifiées comme prioritaires, parmi lesquelles 13 sont classées comme dangereuses, dont les rejets dans le milieu aquatique doivent être fortement limités ou supprimés d'ici 2020 (décision N°2455/2001/CE ; UE, 2001a). Au sein de cette liste de substances ou de familles de composés, figurent notamment des métaux (Cd, Pb, Hg), des polluants industriels comprenant certains hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des pesticides principalement organochlorés. Ces composés ont une forte capacité d'adsorption à la phase particulaire et peuvent donc être retrouvés en concentrations importantes dans le compartiment sédimentaire des fleuves, estuaires ou zones côtières dont les bassins versants sont anthropisés.

Les sédiments constituent parfois un véritable réservoir de substances chimiques telles que des polluants organiques persistants (POP) et des métaux qui, en raison de leur hydrophobicité et/ou de leur forte affinité pour la matière organique ou les oxy-hydroxydes métalliques, se fixent sur les particules en suspension. En conditions d'hydrodynamisme favorables, ces particules chargées en contaminants vont précipiter, sédimenter et enfin se déposer au niveau du compartiment sédimentaire où les substances se retrouveront piégées et concentrées. Ce stockage n'est pas permanent et les polluants peuvent être remobilisés dans la colonne d'eau dans certaines conditions de forçage naturel (par exemple les tempêtes, les crues, la bioturbation ou les changements physico-chimiques des masses d'eau) ou anthropique tel que les opérations d'aménagement des cours d'eau ou le trafic nautique. Les estuaires représentent des zones de forts bouleversements des conditions physico-chimiques des masses d'eau avec notamment la présence d'un gradient de salinité pouvant conduire à la remobilisation d'éléments métalliques dans la phase dissoute, les rendant alors beaucoup plus biodisponibles pour les organismes aquatiques.

Ce phénomène a rendu tristement célèbre l'estuaire de la Gironde en favorisant la désorption du cadmium (Cd) originaire des rejets d'une ancienne usine d'extraction de minerai de zinc (Zn) située aux abords de Decazeville en Aveyron (Audry *et al.*, 2004a). Cette remobilisation du Cd a entraîné une bioaccumulation importante de cet élément chez plusieurs espèces de bivalves et de poissons vivants dans l'estuaire (Baudrimont *et al.*, 2005 ; Durrieu *et al.*, 2005) dont certains présentent un intérêt économique majeur. Les teneurs élevées en Cd mesurées chez ces organismes

aquatiques ont entraîné le classement des eaux de l'estuaire en zone D par la communauté européenne, conduisant à l'interdiction de la production et du ramassage de coquillages. De plus, la menace pèse dorénavant aussi sur la baie de Marennes-Oléron, première zone ostréicole d'Europe, où la concentration en Cd dans les huîtres s'approche dangereusement du seuil d'interdiction de consommation fixée par l'UE (UE, 2001b).

Le Bassin d'Arcachon, haut lieu de l'ostréiculture et du tourisme de la région Aquitaine, est également placé sous haute surveillance depuis plusieurs années. En effet, l'intensification exponentielle des activités nautiques halieutiques et touristiques ainsi que l'urbanisation grandissante aux abords du bassin ont considérablement augmenté la pression anthropique pesant sur la lagune au cours des dernières décennies, menaçant de plus en plus l'équilibre de l'écosystème présent. Un rapport de l'Ifremer publié en 2008 tire la sonnette d'alarme en classant les eaux de la zone amont du Bassin dans les masses d'eau en Risque de Non Atteinte du Bon État 2015 chimie au vu de leur teneurs en fluoranthène (HAP représentatif de la contamination globale en HAP ; RNO, 2006). En s'appuyant sur les données RNO (Réseau National d'Observation) disponibles pour ce composé dans les huîtres du bassin sur la période 1996-2004, ce rapport indique également que la teneur des huîtres en fluoranthène se rapproche dangereusement de la valeur guide définie par l'ANSES, seuil qui pourrait être atteint dans les années à venir si l'augmentation observée ces dernières années se poursuit (Ifremer & LPTC, 2008).

Les bivalves filtreurs sont exposés aux contaminants à la fois par la phase dissoute mais également par l'intermédiaire des particules en suspension ingérées. Les espèces benthiques sont particulièrement exposées à la contamination présente dans les sédiments. Cependant, les poissons pélagiques ne sont pas pour autant épargnés par ce risque en raison des phénomènes de bioamplification conduisant à une augmentation de la concentration tissulaire en polluants faiblement biodégradables tout au long de la chaîne trophique. Ainsi, le compartiment sédimentaire, en tant que zone de stockage pour un certain nombre de polluants environnementaux, représente une source de contamination des espèces aquatiques lors de la remise en suspension des particules sédimentaires ou du relargage des contaminants. Cette pollution pourrait donc compromettre l'application de la DCE et remettre en question l'atteinte du bon état chimique et écologique des eaux d'ici 2015. La contamination des sédiments est d'autant plus difficile à évaluer que les normes de qualité environnementales (NQE) établies par la DCE concernant les substances polluantes prioritaires ne sont définies que pour la colonne d'eau (Directive 2008/105/CE ; UE, 2008). Il paraît donc nécessaire de prendre en compte le risque environnemental associé à la contamination des sédiments en caractérisant la nature et la quantité de polluants stockés dans ce compartiment ainsi que la toxicité globale qu'ils représentent. Il importe également d'évaluer les niveaux d'exposition et les effets toxiques engendrés par les différentes familles de contaminants présents dans les sédiments, d'améliorer la compréhension de leurs mécanismes d'action et d'identifier les cibles biologiques de ces composés. Cette démarche devrait permettre d'alimenter les bases de données toxicologiques sur ces substances à risque, dans le but ultime d'aider à définir des NQE pour le compartiment sédimentaire.

La définition de ces normes environnementales s'appuie sur le principe simple selon lequel la protection des espèces et des stades de vie les plus sensibles revient à protéger l'ensemble de l'écosystème. Or, les stades précoces de développement (SPD) de poisson s'avèrent particulièrement vulnérables aux variations des conditions environnementales et notamment à la présence d'une

contamination chimique (Hutchinson *et al.*, 1998). De plus, ces premiers stades de développement ont une importance écologique majeure à la fois pour le renouvellement de leur propre population mais également en raison de leur rôle clé dans les réseaux trophiques. Si l'on souhaite préserver les écosystèmes aquatiques, il nous paraît primordial d'étudier la sensibilité des SPD vis-à-vis de la pollution chimique globale et plus particulièrement des polluants identifiés comme prioritaires par la DCE dont les HAP et les métaux, substances également problématiques dans la région Aquitaine.

Dans ce contexte, nous avons choisi de développer un bioessai utilisant les SPD d'un poisson modèle, le Medaka japonais *Oryzias latipes*, qui soit sensible, intégrateur, facile à mettre en œuvre et permettant d'évaluer la toxicité de matrices environnementales complexes telles que les sédiments. Les objectifs généraux du projet Aquitox, dans lequel s'intègrent ces travaux de thèse, sont d'une part, de caractériser la contamination et les effets toxiques de polluants organiques et métalliques vis-à-vis des SPD du Medaka japonais et d'autre part, d'utiliser le bioessai développé pour évaluer la biodisponibilité et la toxicité de mélanges complexes de polluants contenus dans des sédiments naturels prélevés dans divers écosystèmes aquatiques de la région Aquitaine. Plus précisément, ce travail de thèse avait pour objectifs spécifiques :

- ✓ La validation du test embryo-larvaire Medaka (MELA) et la caractérisation des effets toxiques létaux et sublétaux (incluant l'évaluation du potentiel génotoxique) de substances caractéristiques de la contamination des sédiments de la région Aquitaine.
- ✓ D'approfondir la compréhension de la toxicité de ces composés modèles en étudiant leurs mécanismes d'actions et leurs cinétiques de bioaccumulation en joignant aux observations phénotypiques une approche biomoléculaire, incluant notamment l'étude de l'expression de gènes intervenant dans différents mécanismes physiologiques et l'analyse des métallothionéines (MT), protéines impliquées dans la détoxification des éléments métalliques.
- ✓ De définir, au vu des résultats obtenus par ces deux approches, des concentrations sans effet observé (CSEO ou NOEC pour « no observed effect concentration ») et/ou des concentrations minimales avec effet observé (CMEO ou LOEC pour « lowest observed effect concentration ») pour chacune des substances pures testées.
- ✓ D'appliquer la double-approche « phénotypique » et « biomoléculaire » à l'évaluation de la toxicité globale de sédiments collectés dans deux milieux aquatiques emblématiques de la région Aquitaine à savoir le Bassin d'Arcachon et le système Lot-Garonne. Les spectres de réponses ainsi obtenus pourront éventuellement être comparés à ceux observés avec les substances pures.

Dans le *premier chapitre* nous proposerons une description synthétique du contexte bibliographique dans lequel s'inscrit ce travail de thèse, en décrivant dans un premier temps le cadre réglementaire servant de base à ce travail. Puis, dans une seconde partie, une rapide présentation de l'environnement aquitain et de sa problématique de contamination sera faite. Ceci permettra le choix des substances modèles étudiées ainsi que la sélection des sites de prélèvement des différents sédiments naturels qui seront évalués grâce au test MELA. Enfin, ce premier chapitre fera le point sur le développement et l'utilisation actuelle des tests embryo-larvaires poisson dans le cadre de l'évaluation de la toxicité de composés chimiques et se terminera sur une présentation du Medaka japonais en tant que modèle biologique.

Le *Chapitre 2* sera consacré à la description de l'ensemble des techniques et méthodes analytiques utilisées au cours de ce travail de thèse.

Les *Chapitres 3 et 4* viseront à présenter les données expérimentales obtenues à la suite de l'exposition des embryons de Medaka à des sédiments artificiellement contaminés par les différentes substances modèles préalablement sélectionnées. Dans chacun de ces chapitres seront exposés les protocoles expérimentaux propres à chaque série d'expositions ainsi que les connaissances toxicologiques actuelles sur les différents composés ou famille de composés étudiés vis-à-vis des organismes aquatiques et plus particulièrement des SPD de poissons.

Le *Chapitre 5* s'attachera à présenter et à discuter les résultats obtenus après exposition des embryons de Medaka aux sédiments naturels provenant des milieux aquatiques d'intérêt de la région Aquitaine.

Enfin, le *Chapitre 6* aura pour objet de synthétiser l'ensemble des résultats de ce travail et proposera des perspectives de recherche dans la continuité de cette thèse.



---

*Chapitre 1. CONTEXTE  
BIBLIOGRAPHIQUE*

---



# Chapitre 1. Contexte bibliographique

Ce chapitre propose tout d'abord un rappel du contexte réglementaire européen concernant la politique européenne dans le domaine de l'eau en soulevant la problématique liée au compartiment sédimentaire qui représente un véritable puits pour de nombreux polluants. Nous évoquerons ensuite le cas de la contamination des sédiments de différents écosystèmes de la région Aquitaine dont nous identifierons quelques-unes des substances potentiellement à risque pour cet environnement. La quatrième partie de ce chapitre proposera un point rapide sur les caractéristiques générales des principaux contaminants ciblés dans notre étude. Dans la partie suivante, nous aborderons le développement actuel de bioessais utilisant les SPD de poisson comme outils d'évaluation de la toxicité liée à la contamination du milieu aquatique. Enfin, nous terminerons par une présentation synthétique du Medaka japonais, *Oryzias latipes*, en tant qu'organisme modèle notamment au cours de telles études.

## 1. CADRE REGLEMENTAIRE ET CAS DU COMPARTIMENT SEDIMENTAIRE

### 1.1. La Directive Cadre Eau : le milieu aquatique au cœur des préoccupations européennes

Depuis le début de l'ère industrielle, des milliers de substances de différentes natures sont déversées en grande quantité dans l'environnement, provoquant la dégradation parfois irréversible de nombreux écosystèmes terrestres et aquatiques. Chaque année, de nouvelles substances sont introduites dans l'environnement aquatique qui représente bien souvent le réceptacle final des pollutions d'origine anthropique. Ainsi, depuis les années 1970, la politique publique de l'eau s'inscrit dans un cadre européen. En effet, la qualité de l'eau a fait partie des grandes préoccupations de la politique de l'Union européenne (UE) dès sa création. La législation communautaire s'est d'abord intéressée aux usages de l'eau (par exemple, l'eau potable ou de baignade, la pisciculture, la conchyliculture...), puis à la réduction des pollutions (notamment des eaux usées et des nitrates d'origine agricole). Une réglementation européenne est indispensable pour la gestion des cours d'eau qui traversent plusieurs pays (comme le Rhin, la Meuse, la Sambre, l'Escaut et le Rhône). Elle s'applique également à la protection des mers, à travers des conventions internationales, comme celles d'Oslo (1974 et 1978) régissant la protection du Nord-est Atlantique et celle de Barcelone (1976) portant sur la conservation de la Méditerranée.

En Europe, la réduction de la biodiversité dans les milieux aquatiques et la qualité de l'eau restent au cœur des préoccupations malgré les nombreux efforts de dépollutions déjà engagés. En France, les dégradations physiques apportées aux cours d'eau, avec la création de seuils et de barrages, la dérivation des eaux, le recalibrage et la rectification du chevelu des rivières, ainsi que les prélèvements d'eau ont entraîné un affaiblissement biologique de ces milieux et à une diminution de la qualité de l'eau.

Le Parlement européen et le Conseil réagissent en adoptant le 23 octobre 2000 une directive établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau, nommée directive

cadre sur l'eau ou DCE (UE, 2000). Ce texte vise à donner une cohérence à l'ensemble de la législation avec une politique communautaire globale dans le domaine de l'eau en synthétisant et simplifiant toutes les directives concernant les eaux continentales et côtières. Elle définit un cadre pour la gestion et la protection des eaux par grand bassin hydrographique sur un plan européen avec une perspective de développement durable. Les points essentiels de cette directive concernent la protection des ressources en eaux douces, saumâtres, côtières, superficielles et souterraines ainsi que la protection et l'amélioration des écosystèmes associés. Elle vise ainsi à réduire le niveau des pollutions des eaux et des milieux connexes pour promouvoir une utilisation durable des ressources.

La DCE impose notamment deux démarches fondamentales à l'ensemble des états membres :

- ✓ l'identification des bassins et districts hydrographiques. Cette identification doit être complétée par une caractérisation de l'état chimique et biologique des masses d'eau, une étude des impacts de l'activité humaine sur les eaux, le référencement des zones nécessitant une protection particulière (par exemple les masses d'eaux désignées comme eaux de plaisance ou de baignade, les sites Natura 2000, ZNIEFF ou les zones désignées pour la protection des espèces aquatiques importantes économiquement), une analyse économique de l'utilisation des eaux et le recensement des masses d'eau utilisées pour le captage d'eau destinée à la consommation humaine.
- ✓ l'adoption de « plans de gestion » et de « programmes de mesures » appropriés à chaque masse d'eau, le premier devant couvrir la période 2010-2015, et adopté fin 2009.

L'ensemble de ces actions devrait permettre d'atteindre « un bon état écologique et chimique » des milieux aquatiques et des bassins versants d'ici 2015 en garantissant une gestion durable des ressources en eau. L'accès ou le maintien du « bon état écologique et chimique » implique nécessairement l'adoption de mesures spécifiques contre la pollution des eaux par certaines substances ou groupes de substances présentant un risque significatif pour ou via l'environnement aquatique. Pour ces substances dites prioritaires, les mesures visent à réduire graduellement les rejets, les émissions ou les pertes de ces composés. Parmi ces substances prioritaires, la DCE identifie également des substances prioritaires dangereuses pour lesquelles le texte prévoit l'élimination ou la suppression progressive de la pollution entraînée par les rejets, les émissions ou les pertes de ces polluants dans un délai de 20 ans à compter de l'adoption de ces mesures au niveau communautaire.

La liste des 41 substances prioritaires dont 13 sont classées comme dangereuses a été publiée par la décision N°2455/2001/CE du 20 novembre 2001 et comprend notamment des métaux (Cd, Pb, Hg), des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), le tributylétain et ses dérivés, les diphényléthers bromés, des pesticides organochlorés. Afin de prévenir et réduire la pollution des eaux, les concentrations dans le milieu pour ces composés sont comparées à un seuil admissible dans les eaux appelé Norme de Qualité Environnementale, ou NQE, définie comme la « concentration d'un polluant ou d'un groupe de polluants dans l'eau, les sédiments ou le biote qui ne doit pas être dépassée, afin de protéger la santé humaine et l'environnement ». Actuellement, les NQE des substances prioritaires ne sont établies que pour la colonne d'eau (Directive 2008/105/CE ; UE, 2008). Il est à noter que la DCE prévoit une révision de la liste des substances prioritaires et des NQE associées tous les 4 ans. Bon nombre de ces substances peuvent se retrouver en concentrations importantes dans les sédiments des fleuves, estuaires et zones marines côtières situés en aval de bassins versants anthropisés en raison de leur capacité d'adsorption aux matières particulaires.

## 1.2. La Réglementation REACh : « Pas de données, pas de marché »

Toujours dans l'optique de protéger à la fois la santé humaine et l'environnement contre les risques induits par la surexposition aux substances chimiques, l'Union Européenne a mis en place un système d'enregistrement, d'évaluation, d'autorisation et de restrictions des substances chimiques (REACh, pour Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals). Cette nouvelle réglementation, actée par le règlement CE N°1907/2006 du 18 décembre 2006, oblige les entreprises qui fabriquent et importent des substances chimiques à évaluer les risques résultant de leur utilisation et à prendre les mesures nécessaires pour gérer et limiter tout risque identifié. Il appartient désormais à l'industriel et non plus aux autorités publiques de prouver que les risques liés aux substances qu'ils produisent ou importent sont valablement maîtrisés : c'est le renversement de la charge de la preuve.

Cette réglementation met en place trois processus successifs : l'enregistrement des substances en fonction du tonnage et de leur dangerosité, l'évaluation des dossiers d'enregistrement et des substances par l'Agence européenne des substances chimiques (EChA) et enfin l'autorisation de mise sur le marché des substances les plus préoccupantes. À partir du 1<sup>er</sup> décembre 2008, toute substance n'ayant pas été préalablement préenregistrées ou enregistrées est interdite de production et/ou de mise sur le marché de la Communauté européenne. Un régime transitoire allant jusqu'au 1er juin 2018 est mis en place pour certaines substances devant faire l'objet d'un pré-enregistrement. La mise en œuvre de REACh représente donc 3 enjeux majeurs :

- ✓ Comblent le déficit de connaissances sur les risques environnementaux et sanitaires des substances chimiques, y compris les plus anciennes introduites sur le marché européen avant 1981 sur lesquelles très peu d'informations sont disponibles puisqu'avant cette date aucun dossier d'enregistrement n'était obligatoire.
- ✓ Confier la responsabilité de l'évaluation et de la gestion des risques des substances aux entreprises productrices et importatrices et non plus aux autorités administratives, avant leur mise sur le marché ou leur utilisation, selon le « principe de précaution ».
- ✓ Favoriser une politique d'innovation et de substitution des substances les plus dangereuses, via notamment la procédure d'autorisation.

La réglementation REACh remplace plus de 40 directives et règlements et crée un seul système applicable à tous les produits chimiques. Ainsi, dans les 11 années qui suivent l'entrée en vigueur du règlement, 30 000 substances chimiques (sur les 100 000 existantes sur le marché communautaire) produites ou importées, existantes ou nouvelles, à partir d'un volume annuel supérieur à 1 tonne, seront ainsi enregistrées auprès de l'Agence européenne des produits chimiques. Ces données servent à alimenter des bases de données qui sont accessibles aux entreprises, aux particuliers et aux ONG gratuitement sur Internet (tout du moins en partie, sauf en cas de demande satisfaite de confidentialité).

Certaines substances sont soumises à une autorisation spécifique : celles classées CMR 1 ou 2 (cancérogène, mutagène, reprotoxique dont les perturbateurs endocriniens) et celles les plus nocives pour l'environnement, c'est-à-dire persistantes, bioaccumulables et toxiques ainsi que les substances très persistantes ou très bioaccumulables. Par ailleurs l'Agence se réserve le droit, après examen du dossier, de définir quelles substances doivent être soumises à autorisation.

L'enregistrement exige de l'industrie (fabricants et importateurs) de fournir des informations relatives aux propriétés, aux utilisations et aux précautions d'emploi des substances chimiques (dossier technique). Les données requises sont proportionnées aux volumes de production et aux risques présentés par la substance. Par exemple des tests poussés de toxicité sont exigés concernant les substances fabriquées ou importées pour plus de 1000 t. Par ailleurs, pour les substances importées ou fabriquées à plus de 10 t par an, le dossier d'enregistrement doit détailler les risques liés à cette substance de même que les différents scénarios d'exposition possibles et les mesures de gestion de ces risques (rapport sur la sécurité chimique). Pour les composés dont la production ou l'importation est supérieure à 100 t par an, différents tests de toxicité doivent être entrepris, notamment sur les phases précoces de développement des poissons. Le **Tableau 1.1** récapitule les informations toxicologiques et écotoxicologiques à renseigner lors de la procédure d'enregistrement des substances auprès de l'Agence européenne des produits chimiques en fonction du volume annuel produit ou importé.

**Tableau 1.1. Informations toxicologiques et écotoxicologiques à renseigner lors de la procédure d'enregistrement des substances auprès de l'Agence européenne des produits chimiques (selon le règlement CE N°1907/2006 UE, 2006)**

	Tonnage annuel			
	1 à 10 t	10 à 100 t	100 à 1 000 t	> 1 000 t
Test de toxicité aiguë	Oui	Oui	Oui	Oui
Test d'irritation cutanée et oculaire	Oui	Oui	Oui	Oui
Test de sensibilisation cutanée	Oui	Oui	Oui	Oui
Test d'Ames (mutagénicité)	Oui	Oui	Oui	Oui
Étude de toxicité par administration répétée		Oui	Oui	Oui
Test de reprotoxicité		Oui	Oui	Oui
Test complémentaire de mutagénicité			Oui	Oui
Étude de toxicité subchronique			Oui	Oui
Test embryo-larvaire			Oui	Oui
Étude complémentaire de génotoxicité				Oui
Étude de toxicité à long terme				Oui
Étude multigénérationnelle				Oui
Étude de carcinogénicité				Oui

### 1.3. Le compartiment sédimentaire : un réservoir à polluants

Depuis quelques dizaine d'années maintenant, la contamination du compartiment sédimentaire attire de plus en plus l'attention de la communauté scientifique. En effet, les sédiments se comportent comme un véritable réservoir pour de nombreux micropolluants comme les polluants organiques persistants (POP) et les métaux.

Les sédiments représentent une matrice complexe et hétérogène (Simpson *et al.*, 2005) composés de trois fractions principales : l'eau interstitielle qui occupe des espaces entre les particules, la phase inorganique composée de minéraux (principalement argiles, carbonates, silicates, hydroxydes métalliques...) issus de l'érosion de roches, et la phase organique qui ne représente souvent qu'une faible fraction du sédiment (de l'ordre de quelques pourcents) mais qui joue, comme nous le verrons, un rôle primordial dans la mobilité (et donc la biodisponibilité) de nombreux contaminants. De plus, Les particules inorganiques sont généralement enrobées d'hydroxydes et de substances organiques qui leur confèrent une grande capacité d'adsorption vis-à-vis d'un grand nombre de substances. En effet, la forte hydrophobicité de certains composés organiques leur

procure une affinité particulière pour les particules sédimentaires et notamment pour la fraction organique (Dupree & Ahrens, 2007). Ces polluants peuvent donc être transportés, fixés à la phase particulaire, puis être déposés sur le fond et les berges des rivières, des estuaires et des zones côtières peu profondes lorsque les conditions hydrodynamiques le permettent. Les métaux sont également très affins pour la matière organique et les oxy-hydroxydes contenus dans les matières en suspension ou les sédiments (Chapman *et al.*, 1998). Ces propriétés leur confèrent donc également un important pouvoir de fixation aux matières en suspension dans la colonne d'eau qui par la suite se déposent naturellement vers les fonds sédimentaires où ils peuvent être piégés, notamment en eau douce au niveau des barrages et retenues d'eau. Malheureusement, ce stockage des contaminants n'est pas définitif. Sous certaines conditions de forçage naturel (bioturbation, tempêtes, crues, modifications des paramètres physico-chimiques du milieu...) ou anthropique (trafic fluvial, aménagement des cours d'eau, dragages...), les polluants fixés à la matrice sédimentaire peuvent être remobilisés dans la colonne d'eau (par exemple, Wolz *et al.*, 2008 ; Chapman *et al.*, 1998). En particulier, au niveau des zones estuariennes et côtières, le changement des conditions physico-chimiques et notamment de salinité des eaux peut conduire à une remobilisation de certains éléments métalliques piégés dans les sédiments vers la phase dissoute de la colonne d'eau, les rendant beaucoup plus biodisponibles vis-à-vis des organismes aquatiques (Baudrimont *et al.*, 2005).

Le compartiment sédimentaire sert d'habitat et/ou de source de nourriture pour de nombreuses espèces benthiques qui peuvent alors être en contact avec les contaminants pourtant enfouis à plusieurs centimètres de profondeur et les rendre ainsi à nouveau biodisponibles. Par conséquent, la contamination des sédiments peut représenter un risque écotoxicologique à moyen et long terme pour les écosystèmes aquatiques. Les concentrations en certains polluants hydrophobes comme les HAP peuvent être de 1 000 à 10 000 fois supérieures dans les sédiments en comparaison des niveaux mesurés dans la colonne d'eau, rendant les organismes benthiques particulièrement exposés à ce genre de substances (Dupree & Ahrens, 2007). Cependant, les espèces pélagiques ne sont pas totalement épargnées en raison des phénomènes de bioamplification tout au long de la chaîne trophique des composés peu ou faiblement biodégradables et de la remobilisation des contaminants piégés dans les sédiments évoquée ci-dessus. Les sédiments représentent donc une source de contamination potentielle non-négligeable pour les écosystèmes aquatiques et la persistance de la pollution au sein de ce compartiment peut compromettre la réalisation des objectifs fixés par la DCE à l'horizon 2015.

Afin d'apprécier les risques environnementaux associés à la contamination des milieux aquatiques, il importe de connaître la nature et la quantité des polluants stockés dans ces sédiments, leur toxicité potentielle (biodisponibilité) ainsi que leur capacité de remobilisation. Il est nécessaire ensuite d'évaluer les niveaux d'exposition et de caractériser les effets toxiques (*in vivo*) associés aux différentes familles de polluants contenus dans les sédiments et de mieux comprendre les mécanismes d'action et les cibles biologiques de ces toxiques. Enfin, il faut pouvoir identifier les composés toxiques présentant un risque majeur pour l'écosystème et définir pour ceux-ci les limites maximales admissibles dans le compartiment sédimentaire (PNEC, predicted no effect concentration, ou NQE).

## 2. CONTAMINATION DE L'ENVIRONNEMENT AQUITAIN

Avec ses 41 309 km<sup>2</sup>, l'Aquitaine est la troisième région métropolitaine française par sa superficie et correspond ainsi à 8 % du territoire national. Bordée par la chaîne des Pyrénées au sud, le massif central à l'est et l'océan Atlantique à l'ouest, la région Aquitaine fait partie du vaste bassin sédimentaire du Sud-Ouest (ou Bassin Aquitain). Avec plus de 20 000 km de cours d'eau, le réseau hydrographique de l'Aquitaine est dense et diversifié. On distingue quatre grands bassins : la Garonne dont la source se situe dans le Val d'Aran en Espagne, la Dordogne qui s'écoule du Massif Central avant d'entrer en Aquitaine et de confluer avec la Garonne pour former l'estuaire de la Gironde, l'Adour et les Gaves au Sud-ouest et enfin de nombreux fleuves côtiers à l'Ouest ainsi que les lacs Médocains et les étangs landais (source : DIREN Aquitaine).

L'Aquitaine est très privilégiée d'un point de vue environnemental avec une biodiversité remarquable liée à une abondance de milieux et d'espèces parfois très particulières, un territoire doté d'importants réservoirs d'eau et de ressources forestières, une diversité de paysages et sites de grande qualité etc... Parmi les sites d'importance nationale, la région Aquitaine compte notamment l'estuaire de la Gironde, la vallée de la Vézère, le bassin d'Arcachon, la Corniche Basque, le pic du Midi d'Ossau, les étangs landais et la vallée de la Dordogne (GEREA, 2010). Les secteurs agricoles, sylvicoles et les activités marines et aquacoles jouent un rôle majeur dans l'économie de l'Aquitaine (10 % de la population active régionale travaille dans le secteur agricole contre 4 % au niveau national, source : Conseil Régional Aquitaine). Les principaux pôles industriels restent Bordeaux, Pau-Lacq et Bayonne. Une carte d'occupation des sols est proposée sur la [Figure 1.1](#). Globalement dans cette région, le secteur rural reste important, l'urbanisation et l'industrialisation sont encore assez modestes à l'exception du pourtour des grandes agglomérations. La région accueille également de nombreux touristes grâce à son patrimoine architectural, gastronomique, culturel et naturel

Le groupe GERE A publie en 2010 un profil environnemental de la région Aquitaine qui alerte sur la présence de nitrates et de pesticides dans les eaux superficielles et souterraines de la région, entraînant le déclassement de certaines masses d'eau. Le rapport signale également l'identification récente d'une contamination en PCB (polychlorobiphényles) des anguilles de l'estuaire de la Gironde. Cependant, les concentrations dans les sédiments restent globalement inférieures à 10 µg/kg. À cela vient s'ajouter la présence maintenant bien connue de Cd et de Zn dans les eaux et les sédiments du Lot, de la Garonne et de l'estuaire de la Gironde (voir [paragraphe 2.1](#) de ce chapitre). Selon l'étude du GERE A (2010), en 2007, sur les 147 points suivis concernant la contamination en micropolluants métalliques dans les eaux, 56 % des points sont de bonne et très bonne qualité, 39 % de qualité moyenne et seulement 5 % de mauvaise qualité (principalement dans les départements des Landes, du Lot-et-Garonne et des Pyrénées-Atlantique). En termes de contamination des sols, l'Aquitaine est au 6<sup>ème</sup> rang des régions pour le nombre de sites pollués avec 234 sites. Les principaux contaminants constatés (seuls ou en mélanges) sur ces sols pollués sont les hydrocarbures (31,2 %), le plomb (13,3 %), les HAP (11,1 %), le chrome (9,0 %), le Cu, le nickel et le Cd (6,4 %), le zinc et l'arsenic (5,6 %) et les pesticides (2,6 %) (GEREA, 2010).

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à deux systèmes de la région Aquitaine présentant un intérêt écologique notable, le continuum Lot-Garonne-Gironde et le Bassin d'Arcachon.



### Occupation du sol en 2006

VALIDATION DE LA METHODE : MAI 2006  
Carte mise à jour le 10 septembre 2011

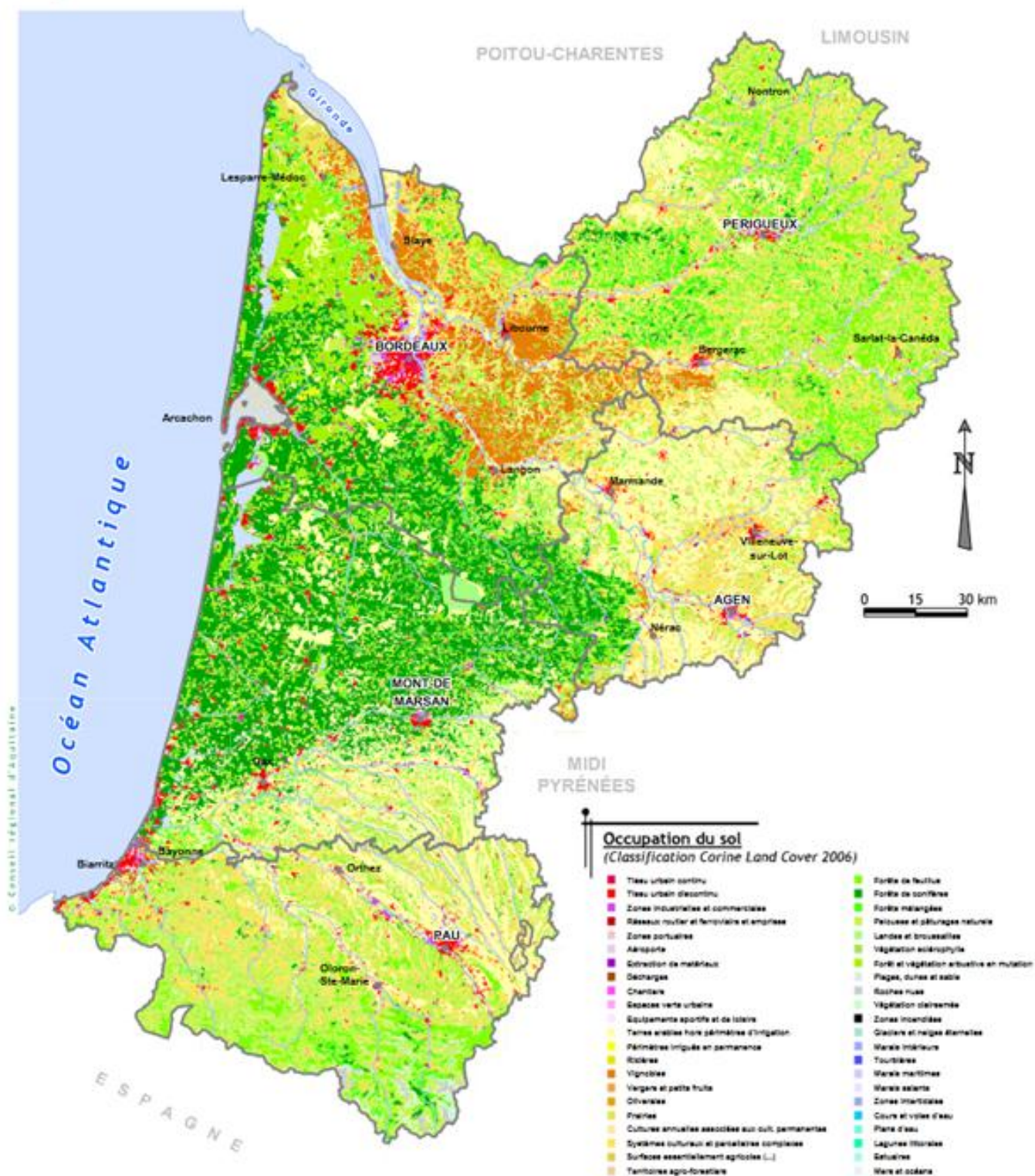


Figure 1.1. Occupation des sols de la Région Aquitaine en 2006

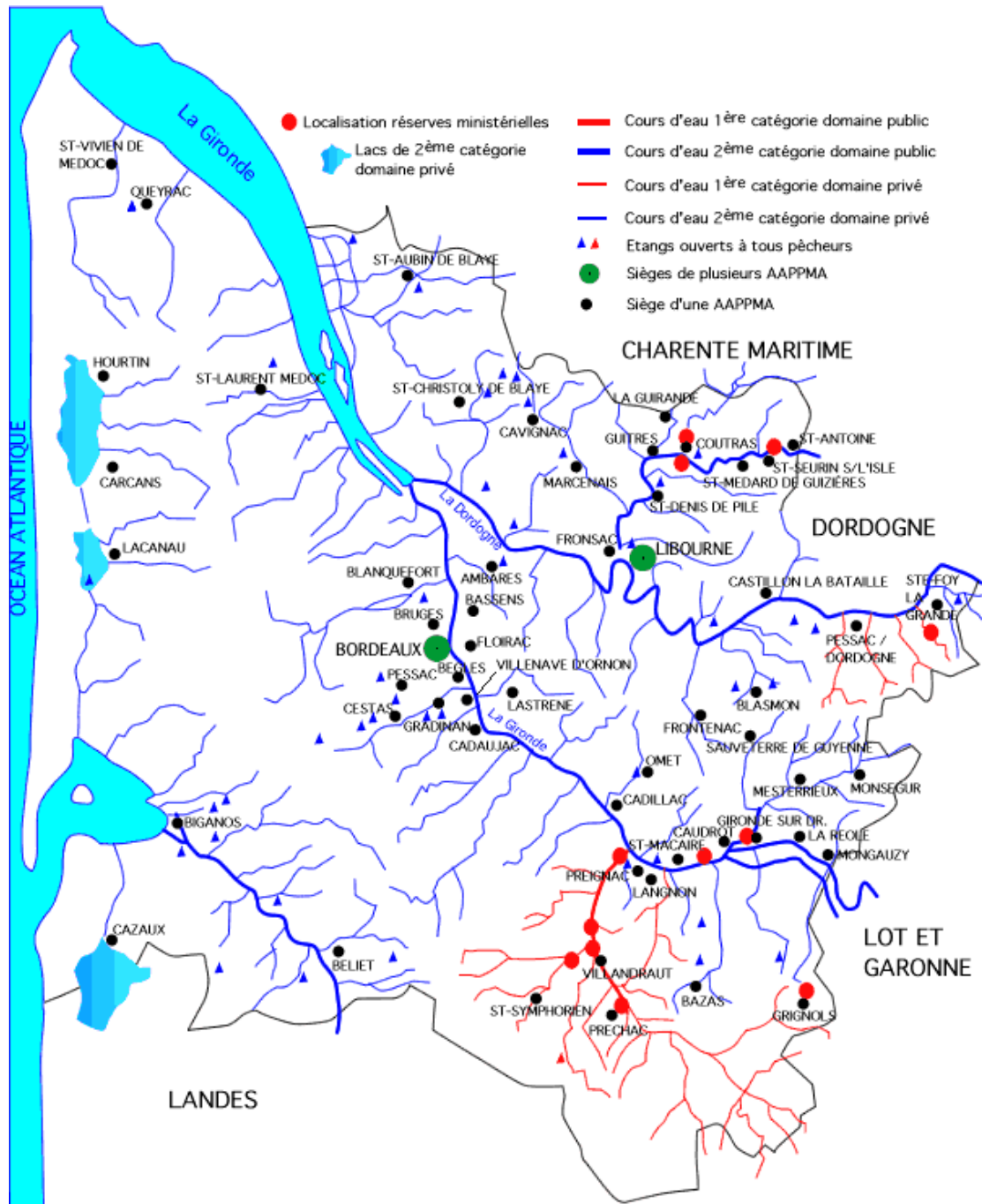
Sources : Union européenne - SOeS, CORINE Land Cover 2006. ; REGION AQUITAINE - Fond de plan : IGN BDCarto®

## 2.1. Cas du continuum Lot-Garonne-Gironde

Le système fluvio-estuarien de la Gironde est le plus vaste estuaire macrotidal européen avec une superficie de 625 km<sup>2</sup>. Au sein de l'estuaire, la limite de la marée de salinité correspond environ au Bec-d'Ambès, à près de 75 km de l'embouchure. En revanche, la marée dynamique se fait sentir sur plus de 70 km en amont du début de l'estuaire que ce soit sur la Dordogne, l'Isle ou la Garonne (Cotten, 1996). Cet estuaire est caractérisé par la présence d'un bouchon vaseux pouvant s'étendre sur plusieurs dizaines de kilomètres et dont la masse totale est estimée à environ 5 millions de tonnes. La Gironde draine deux bassins versants principaux que sont celui de la Garonne couvrant environ 55 000 km<sup>2</sup> et celui de la Dordogne qui représente près de 16 000 km<sup>2</sup> (Cotten, 1996). Les débits annuels moyens entrant dans l'estuaire par l'intermédiaire de ces fleuves avoisinent les 1 000 m<sup>3</sup> par seconde, apportant ainsi près de 3 millions de tonnes de matières en suspension dans l'estuaire, contribuant à alimenter le bouchon vaseux (Etcheber *et al.*, 2006). Le débit d'intrusion d'eau marine est de loin supérieur aux apports fluviaux et varie entre 15 000 et 25 000 m<sup>3</sup> par seconde (Cotten, 1996). La *Figure 1.2* présente une carte du réseau hydrographique principal du département de la Gironde.

L'estuaire représente un patrimoine naturel extraordinaire par la qualité des écosystèmes et des réseaux trophiques qu'il abrite (ECOBAG, 2006). L'estuaire est classé Zone Naturelle d'intérêt Ecologique Faunistique et Floristique (ZNIEFF) de type 2 et Natura 2000 (Zone Spéciale de Conservation Directive "Habitat-Faune-Flore" et en partie Zone Spéciale de protection Directive « Oiseaux »). En constituant un véritable réceptacle des eaux des bassins de la Garonne et de la Dordogne, la Gironde se révèle donc être un révélateur complexe et intégrateur de l'état de l'environnement d'une grande moitié de la région Aquitaine. Le bilan écologique actuel est le suivant : la quasi-disparition des dernières populations naturelles d'esturgeon européen, une diminution importante des stocks d'aloses et une contamination des anguilles aux PCB qui a engendré une interdiction de prélèvements de ces espèces par l'arrêté préfectoral du 27 avril 2010, une contamination métallique des bivalves (huîtres, moules) qui a conduit au classement en zone D (interdiction de la production et du ramassage des coquillages) des eaux de l'estuaire par la communauté européenne et certainement la plus importante pollution en Cd au niveau national (GEREA, 2010).

La contamination du Lot par le Cd a été mise en évidence dès le début des années 70 par les Inventaires Nationaux de la pollution des eaux superficielles. En 1979, le Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin (RNO) révèle des concentrations en Cd très élevées dans les bivalves (huîtres) collectés dans la zone aval de l'estuaire de la Gironde qui s'avèrent être, à l'époque, les plus contaminés du littoral européen. Au début des années 80 une étude confiée par l'Agence de l'Eau à l'Institut de Géologie du bassin d'Aquitaine (Université de Bordeaux) démontrera que l'origine essentielle de la contamination par le Cd de l'ensemble du Riou-Mort, du Lot, de la Garonne aval et de l'estuaire de la Gironde provient du site métallurgique de l'Union Minière (anciennement société Vieille Montagne) à Viviez (Aveyron), près de Decazeville. Cette activité créée en 1871 est localisée dans le bassin du Riou-Mort, un affluent du Lot. L'usine produisait essentiellement du zinc à partir de minerais (calamine puis blende) importés sur le site. Ces minerais contenaient environ 50 % de zinc mais aussi du Cd, du Cu, du plomb, de l'argent et du soufre. L'extraction et la purification du zinc par électrolyse conduisaient à la formation de boues chargées



**Figure 1.2. Réseau hydrographique simplifié de la Gironde**  
 Sources : Fédération départementale des Associations agréées pour la pêche et la protection du milieu aquatique de la Gironde.

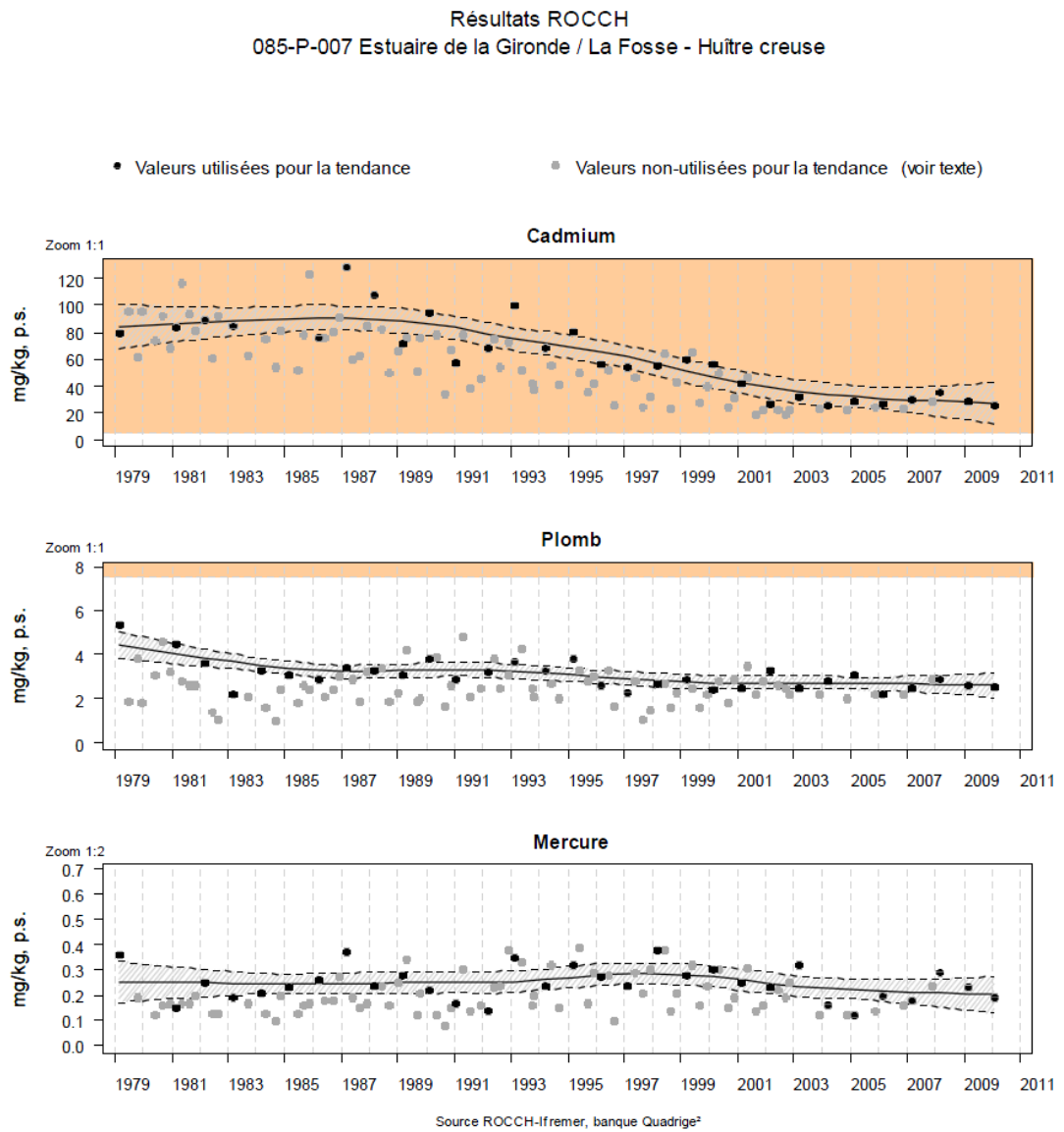
en éléments métalliques. Ainsi, durant la période d'exploitation minière, l'activité d'extraction de zinc a conduit indirectement à la production de 10 000 tonnes de Cd (Cassadou & Pouey, 2002).

L'augmentation de la production au cours des années 60 a conduit à stocker les boues résiduelles et les stériles dans des crassiers à proximité de l'usine. Le lessivage de ces crassiers par les eaux de pluie a entraîné la contamination de la nappe phréatique du Riou-Mort et du Lot. En juillet 1986, une pollution accidentelle provenant d'un crassier de stockage des anciens résidus de Cd a atteint le Lot et a entraîné l'arrêt de l'activité d'extraction du Zn. Un suivi des conséquences environnementales des anciens rejets est également entrepris et se poursuit toujours de nos jours. Des opérations de confinement du crassier par recouvrement d'argile ainsi que des opérations de pompage et traitement des eaux de la nappe phréatique ont été réalisées. Depuis, les flux de Cd dissous émis par l'usine ont été diminués pour représenter aujourd'hui environ 3 à 4 kg/j alors qu'au début des années 80, ils pouvaient atteindre 80 kg/j. Cette pollution touche à la fois la pleine eau, mais aussi les matières en suspension et les sédiments déposés au fond du Lot ou dans l'estuaire de la Gironde (Cassadou & Pouey, 2002).

L'estuaire de la Gironde subit donc une pollution historique polymétallique notamment en Cd, Cu, Zn, Pb, Hg, Ni, Cr, Mn, V et As (par exemple, Castelle *et al.*, 2007 ; Masson *et al.*, 2007 ; Audry *et al.*, 2004a ; Grousset *et al.*, 1999). Si la source principale de cette contamination est bien l'ancienne usine d'extraction de zinc de Decazeville, l'agriculture intensive présente dans la région est également à l'origine d'importants apports en Zn, Cu et As dans l'estuaire (Masson *et al.*, 2006 ; Michel *et al.*, 2000).

La pollution en Cd mise en évidence dans les années 80 par le RNO (Réseau National d'Observation de l'IFREMER, récemment rebaptisé Réseau d'Observation de la Contamination Chimique, ROCCH) a encore aujourd'hui des impacts socio-économiques importants dans la région où la conchyliculture et la pêche sont culturellement ancrées dans la culture régionale. Ainsi, de nombreuses études se sont focalisées sur ce métal. Les concentrations en Cd mesurées dans les huîtres atteignaient à cette époque plus de 100 µg/g p.s. (poids sec) (Claisse, 1989) rendant ces organismes impropres à la consommation selon la norme fixée à 10 µg/g p.s. jusqu'en 2001 puis abaissée à 5 µg/g p.s. (UE, 2001b). L'arrêt de l'activité minière dans le bassin du Riou-Mort ainsi que la mise en place de moyens de remédiation et de gestion du système fluvial ont permis d'abaisser les apports en Cd à l'estuaire et les concentrations dans les bivalves (25 µg/g p.s., Ifremer, 2011). Cependant, les teneurs mesurées sont toujours trop élevées pour en permettre la consommation malgré une tendance à la diminution au cours du temps. Les concentrations en Pb mesurées dans les huîtres de l'estuaire sont supérieures à la médiane nationale mais restent inférieures à la norme de consommation (Ifremer, 2011). L'évolution de la bioaccumulation en Pb, Cd et Hg (les trois métaux réglementés au titre de la surveillance sanitaire et donc suivis par le ROCCH) au cours du temps est présentée sur la [Figure 1.3](#). Le rapport RNO de 2006 rapporte de très fortes concentrations en Cu dans les huîtres de Gironde pouvant atteindre plus de 1 000 µg/g p.s. (soit 7 fois supérieure à la médiane de la façade Atlantique). Ces résultats sont surprenants si l'on considère que le Cu intervient dans le métabolisme de nombreux bivalves qui en régulent généralement leur contenu aux alentours de 7 µg/g p.s. (RNO, 2006).

L'accumulation de sédiments contaminés en éléments métalliques le long du continuum Lot-Garonne-Gironde représente toujours une source potentielle de contamination lors de la



**Figure 1.3. Évolution de la bioaccumulation en Cd, Pb et Hg chez les huîtres creuses de l'Estuaire de la Gironde**

Source : bulletin de surveillance de la Qualité du milieu littoral Edition 2011 (IFREMER, ROCCH).

remobilisation des sédiments au cours d'évènements de crues, de dragage ou de travaux d'aménagements (Coynel *et al.*, 2007 ; Audry *et al.*, 2004b). Les stocks en polluants métalliques du système Lot-Garonne ont été évalués à environ 200 t de Cd (Audry *et al.*, 2004a ; d'après les travaux de Lapaquellerie *et al.*, 1995), 10 000 t de Zn, 1 000 t de Pb et 300 t de Cu (Audry, 2003). Selon les travaux d'Audry *et al.* (2004a), les flux en éléments métalliques entrant dans l'estuaire de la Gironde sont estimés à 11-14 t/an pour le Cd, 1 300-1 450 t/an pour le Zn, 126-214 t/an pour le Cu et 127-155 t/an pour le Pb. Ces métaux sont très majoritairement transportés par la phase particulaire et la contribution du Lot à ces apports est évaluée de 74 % à 96 % pour le Cd, à environ 60 % pour le Zn, de 50 % à 60 % pour le Cu et à près de 80 % pour le Pb (Audry *et al.*, 2004a). L'évolution des concentrations en Cd particulaire et dissous le long du continuum Lot-Garonne-Gironde selon l'étude de Blanc *et al.* (1999) est présentée sur la [Figure 1.4](#). Ces teneurs diminuent progressivement de 460 µg/g à 0,43 µg/g entre le Riou-Mort et Le Verdon pour la phase particulaire. Les concentrations dans la phase dissoute suivent la même tendance, allant de plus de 40 000 ng/L dans le Riou-Mort à 64 ng/L pour La Réole, puis tendent à remonter jusqu'à 380 ng/L dans l'estuaire, au niveau du Verdon.

Ainsi, plus de 90 % des apports en Cd particulaire seront libérés sous forme dissoute au niveau de l'estuaire avec l'apparition du gradient de salinité. Toutefois, cette dissolution peut s'étaler sur plusieurs années. Les concentrations en matière en suspension et les réactions d'oxydo-réduction dans les zones à forte turbidité et dans les sédiments de l'estuaire de la Gironde contribuent également à piéger temporairement le Cd sous forme particulaire. Les bilans de masse indiquent que plus de 50 % de Cd sortant sous-forme dissoute de l'estuaire de la Gironde dérivent indirectement de la remise en suspension des sédiments de l'estuaire par les opérations de dragage (Blanc *et al.*, 2006). Cette remobilisation du Cd dans la colonne d'eau entraîne une bioaccumulation de cet élément métallique chez plusieurs espèces de bivalves et de poissons de l'estuaire présentant un intérêt économique tels que les huîtres creuses, l'anguille européenne, la sole ou le mullet (Baudrimont *et al.*, 2005 ; Durrieu *et al.*, 2005). Cette contamination peut avoir également des répercussions même au-delà de l'estuaire. En effet, au sein de la baie de Marennes-Oléron, première zone ostréicole européenne, les concentrations en Cd dans les huîtres sont proches du seuil de consommation et ses teneurs sont au moins partiellement corrélées aux apports en Cd dissous et particulaire provenant de la Gironde (Strady *et al.*, 2011).

Parmi les polluants organiques, la présence des HAP reste modérée dans l'estuaire avec des teneurs en HAP totaux dans les sédiments globalement comprises entre 1 000 et 2 000 ng/g p.s. (Budzinski *et al.*, 1997). Selon ces travaux, les HAP les plus représentés dans ces sédiments sont les suivants : pérylène > fluoranthène > pyrène > chrysène > benzo[b]fluoranthène + benzo[j]fluoranthène > benzo[g,h,i]pérylène > indéno[1,2,3-c,d]pyrène > benzo[a]anthracène > benzo[k]fluoranthène, benzo[e]pyrène, benzo[a]pyrène (B[a]P) > anthracène, dibenzo[a,c]anthracène, dibenzo[a,h]anthracène. Enfin, les rejets médicamenteux et leurs impacts sur les organismes aquatiques restent au cœur des recherches actuelles bien que l'estuaire de la Gironde se soit avéré faiblement contaminé par cette classe de composés en comparaison d'autres estuaires français tels que l'estuaire de l'Adour et l'estuaire de Seine (Budzinski & Togola, 2006).

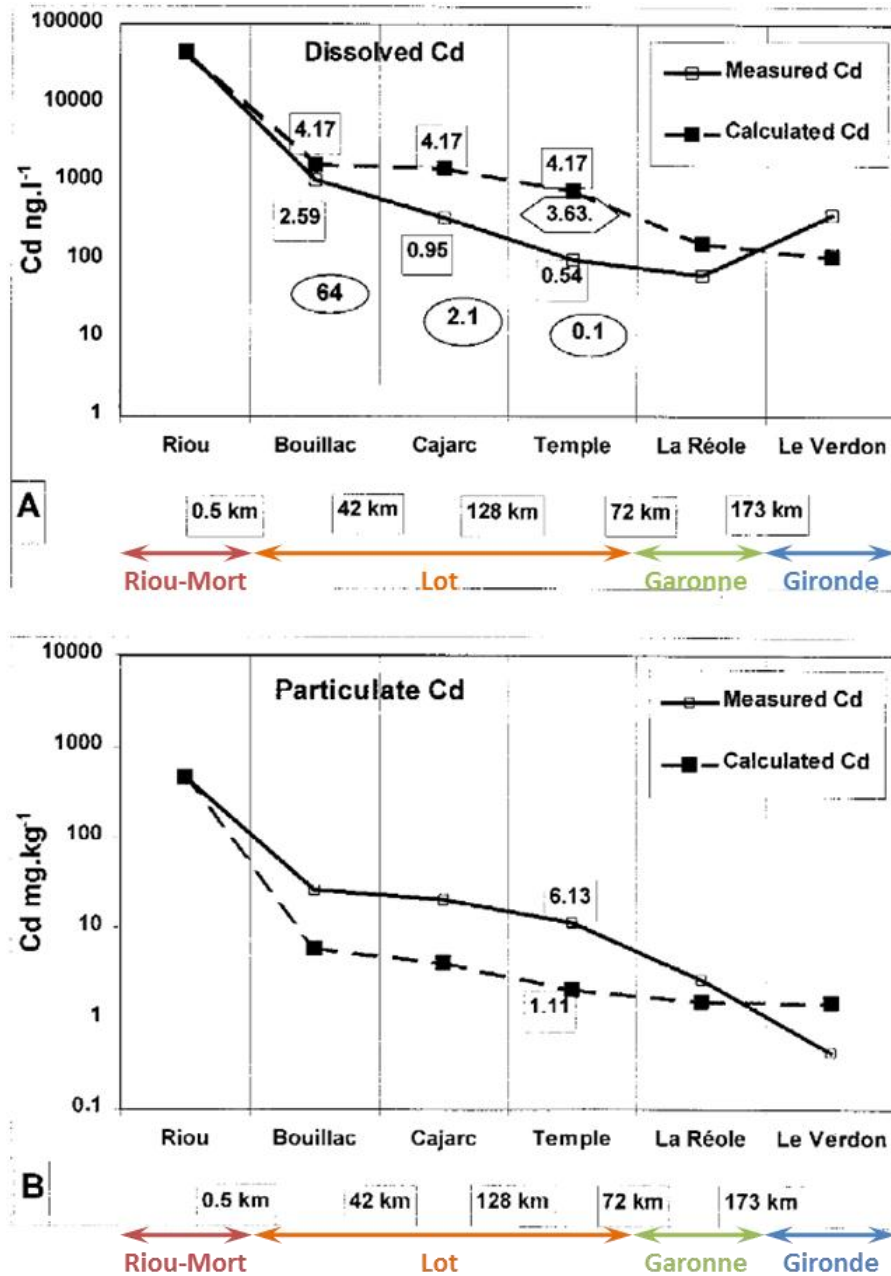


Figure 1.4. Évolution des concentrations en Cd dissous (A) et particulaire (B) le long du continuum Lot-Garonne-Gironde, d'après Blanc et al. (1999).

Les flux sont mentionnés en t/an dans les carrés blancs et en µg/m.sec dans les cercles blancs. Les distances kilométriques indiquées en bas de chaque figure correspondent aux distances entre chaque point de prélèvements.

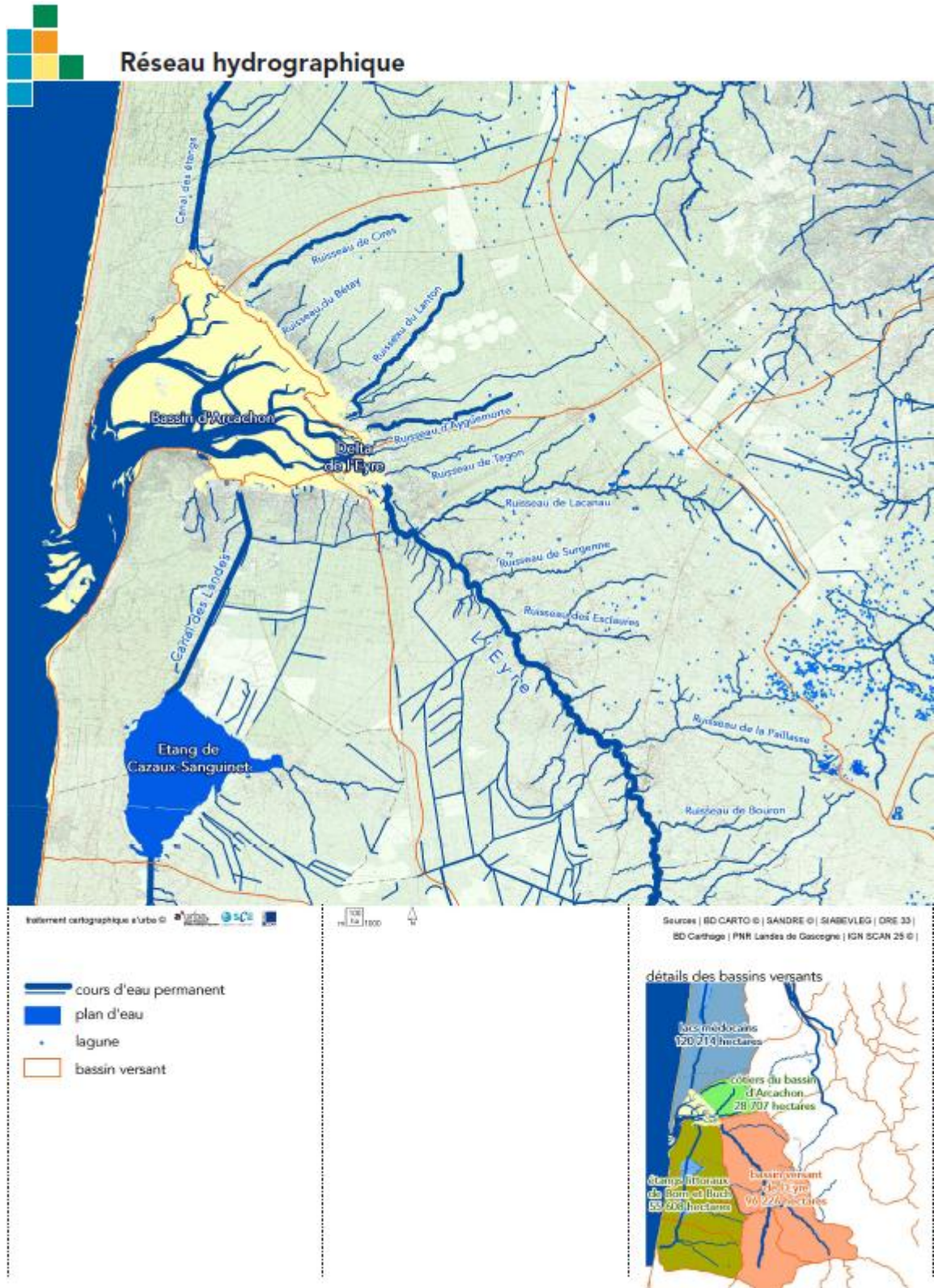
## 2.2. Cas du Bassin d’Arcachon

Le Bassin d’Arcachon est une lagune mésotidale semi-fermée de forme triangulaire qui s’étend sur 155 km<sup>2</sup> dont les deux tiers sont découverts à marée basse. L’ouverture du bassin sur l’océan Atlantique se fait par un accès unique d’environ 3 km de large, appelé « les passes », qui permettent la circulation de l’eau entre le Bassin et l’océan. Ces passes sont constituées de chenaux principaux délimités par des bancs de sable dont le tracé est modifié au gré des marées et des tempêtes rendant la navigation délicate dans cette zone. Les courants de jusant dominant dans cette partie aval du Bassin tendent à expulser les eaux de la lagune vers l’Océan alors que les courants plus faibles des zones plus internes et des chenaux transversaux dirigés vers l’intérieur tendent à faire stagner les eaux (Plus *et al.*, 2006). Le temps de renouvellement des eaux du Bassin (nombre de jours nécessaires à l’abaissement de la concentration d’une substance marqueur jusqu’à 37 % de sa teneur initiale) a été estimé à 13 j et 16 j respectivement pour les saisons hivernale et estivale malgré une grande hétérogénéité de ces valeurs entre l’entrée de la lagune et sa partie interne où les durées de renouvellement peuvent être multipliées par deux ou trois (Plus *et al.*, 2006). L’étude montre aussi une forte influence du vent et des débits des principaux tributaires du Bassin.

Le bassin versant total de la lagune couvre une superficie de 4 138 km<sup>2</sup> et comprend deux systèmes hydrographiques : les bassins versants drainés de manière directe par les cours d’eau naturels (~3 000 km<sup>2</sup> ; 19 rivières sur les façades sud et à l’Est) et ceux drainés de manière indirecte par les lacs ou canaux (~1 140 km<sup>2</sup> ; les lacs de Hourtin et de Lacanau ainsi que le canal du Porge au Nord et le lac de Cazaux-Sanguinet et le canal des Landes au sud). La Leyre constitue le principal apport en eau douce de la lagune, drainant 70 % de la surface des bassins versants et déversant 50 % du volume total d’eau douce. L’ensemble de ces cours d’eau draine un bassin versant composé d’environ 80 % de forêts, 5 % de cultures agricoles et 10 % de zones urbaines (Crespo, 2009 ; d’après les travaux de Manaud *et al.*, 1997). La [Figure 1.5](#) présente une illustration du réseau hydrographique du Bassin d’Arcachon.

Le Bassin est constitué de différents environnements tels que les prés-salés, les marais endigués, l’île aux Oiseaux, les bancs de sables (Banc d’Arguin), les larges platiers intertidaux, les deltas fluviaux (Leyre, Lège), les parcs ostréicoles et les récifs d’huîtres sauvages. Comme l’estuaire de la Gironde, le Bassin est classé Zone Naturelle d’intérêt Écologique Faunistique et Floristique (ZNIEFF) de type 2 et Natura 2000 (Zone Spéciale de Conservation Directive "Habitat-Faune-Flore" et Zone Spéciale de protection Directive « Oiseaux » ; GERE, 2010). En effet, il est notamment colonisé par le plus grand herbier à zostères d’Europe (*Zostera noltii* et *Zostera marina*) servant de frayère et de nourricerie à de nombreuses espèces. Par ailleurs, le Bassin est également un site préférentiel de nidification, d’hivernage ou de haltes migratoires pour un bon nombre d’espèces d’oiseaux remarquables (LPO-Aquitaine, 2004). Par conséquent, le Bassin d’Arcachon constitue un site écologique d’importance internationale (GERE, 2010). L’économie du Bassin est principalement tournée vers l’ostréiculture, la pêche et le tourisme et l’industrialisation y est encore faible. De plus, la navigation de plaisance est en plein essor depuis maintenant plusieurs années engendrant une fréquentation très importante du bassin par les embarcations dont la densité a été évaluée à environ 168 bateaux au km<sup>2</sup> (Ifremer & LPTC, 2008). Par ailleurs, le Bassin subit une pression démographique très importante et représente dorénavant à lui seul 25 % de la population habitant sur le littoral Aquitain (GERE, 2010).





**Figure 1.5. Réseau hydrographique du Bassin d'Arcachon**  
 Source : SYBARVAL, SCOT – Bassin d'Arcachon et Val de l'Eyre, état initial de l'environnement (2008)

Malgré une bonne connaissance de l'environnement physique et biologique de la lagune dès le début du 20<sup>ème</sup> siècle, l'étude de la contamination du Bassin par les polluants anthropiques n'a débuté, comme pour l'estuaire de la Gironde, que dans les années 1980 avec la fondation du RNO. Actuellement, les trois métaux réglementés (Cd, Pb et Hg), les HAP (les 16 HAP prioritaires ainsi que certains dérivés alkylés), les PCB et le DDT (dichlorodiphényltrichloréthane) ainsi que ses produits de dégradation (DDE et DDD) sont régulièrement suivis dans le Bassin. De plus, depuis l'interdiction d'utilisation du TBT (tributylétain) en tant qu'antifouling, les substances l'ayant remplacé (biocides, Cu) sont également au cœur de récentes études (par exemple, ASCOBAR, 2010 ; Ifremer & LPTC, 2008) tout comme les pesticides et insecticides (ASCOBAR, 2010 ; Auby *et al.*, 2007).

Selon le rapport sur la qualité du milieu marin littoral de l'Ifremer (2008), la contamination des huîtres du Bassin (sites des Jacquets, de Comprian et du Cap Ferret) reste globalement faible avec des valeurs généralement inférieures ou proches de la médiane nationale. Plus précisément, les teneurs en Cd qui avaient tendance à décroître jusqu'aux années 1999-2000, sont dorénavant stables et bien inférieures à la norme de consommation. Les concentrations en Ag des huîtres du Bassin sont bien inférieures à la médiane nationale, les teneurs en Cr, Ni et V sont peu différentes de celles-ci, ou un légèrement supérieures. Depuis le début des années 1990, les teneurs en Pb tendaient à décroître lentement dans les huîtres des 3 points du Bassin d'Arcachon. Depuis le début des années 2000, la même tendance est observée au Cap Ferret alors qu'une augmentation est notée aux Jacquets et de manière encore plus marquée à Comprian. Les médianes des concentrations mesurées dans les huîtres des trois sites du Bassin sont proches de la médiane nationale. Les teneurs en Hg sont stables depuis quelques années et proches de la médiane nationale. Cependant, une légère augmentation de la bioaccumulation est notable pour ce composé sur le site de Comprian conduisant à une valeur médiane supérieure à celle observée au niveau national. Quels que soient les sites, les concentrations mesurées sont très inférieures aux seuils réglementaires. Le bulletin 2011 de l'Ifremer confirme la stabilité des concentrations en Cd et Hg. Une nouvelle fois, les teneurs en Pb montrent une légère augmentation au cours des dernières années pour les sites du fond de bassin (Comprian et Les Jacquets) notamment (Ifremer, 2011).

Après une période où les teneurs en Zn avaient diminué dans les huîtres, les concentrations sont actuellement stables au Cap Ferret mais tendent à augmenter sur les deux autres sites, notamment aux Jacquets (Ifremer, 2008). Les teneurs médianes sont actuellement proches voire légèrement supérieures à la médiane nationale. La situation semble plus inquiétante pour le Cu, dont la concentration dans les bivalves augmente progressivement au cours du temps pour tous les sites de prélèvement, notamment pour les sites de Comprian et des Jacquets (*Figure 1.6*). Le rapport du projet ASCOBAR (2010) fait également état d'une bioaccumulation importante en Zn et Cu chez les huîtres provenant de différents sites internes du Bassin, alors que les teneurs des organismes en Cd restent faibles. Ces résultats sont d'autant plus inquiétants que le Cu et le Zn sont des éléments essentiels normalement bien régulés par les organismes. Les facteurs de bioaccumulation obtenus en comparant les teneurs mesurées chez les huîtres du site le plus contaminé (Le Tès) à celles obtenues sur le site référence (banc d'Arguin) sont aux alentours de 2,5 à 3 pour le Zn et de 6 pour le Cu démontrant ainsi une présence non-négligeable de ces composés dans le bassin (ASCOBAR, 2010) malgré l'absence de données analytiques sur le compartiment abiotique.

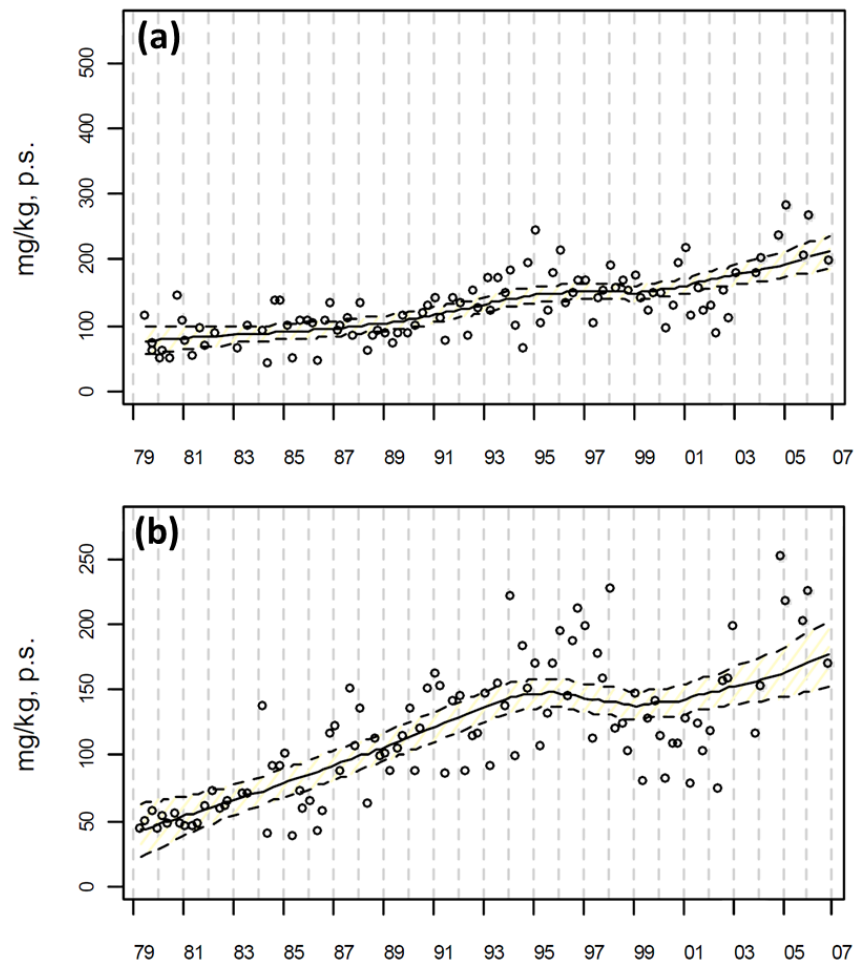


Figure 1.6. Évolution de la bioaccumulation en Cu chez les huîtres du site de Comprian (a) et des Jacquets (b) selon le rapport Ifremer de 2008.

L'augmentation des teneurs en Cu chez les huîtres du Bassin depuis ces 20 dernières années est probablement liée à l'utilisation de ce composé dans les peintures antisalissure en remplacement du TBT (Ifremer & LPTC, 2008). Selon le rapport présenté par l'IFREMER et le LPTC (Université de Bordeaux) concernant l'impact potentiel des activités nautiques sur la qualité des eaux du Bassin d'Arcachon (2008), entre 3 et 4,5 t de cuivre seraient utilisées annuellement à cet effet (évaluation sur la période 1997-1999). Cependant, les médianes des concentrations en Cu mesurées dans les huîtres du Bassin sont du même ordre ou inférieure à la médiane nationale (Ifremer, 2008).

Les PCB sont également suivis dans le Bassin d'Arcachon. Le congénère 153 est considéré comme représentatif de la contamination globale par ce groupe de substances (RNO, 2006). Les concentrations en PCB 153 dans les huîtres sont assez stables au cours du temps au sein du Bassin avec des teneurs plus élevées au Cap Ferret (valeur égale à la médiane nationale) que sur les autres points (Comprian et Les Jacquets) dont la concentration est inférieure à la médiane nationale (Ifremer, 2008).

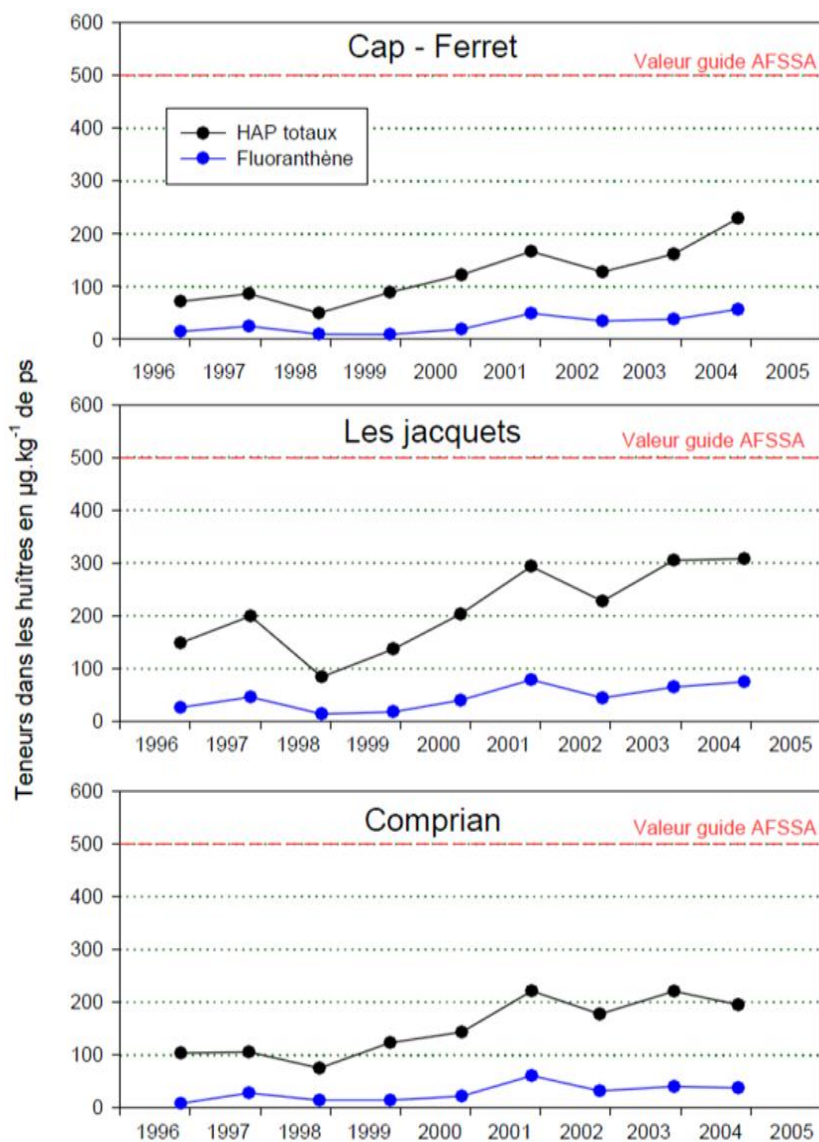
Malgré une forte diminution des concentrations en DDT et ses produits de dégradation, certains sites du Bassin sont encore marqués par une contamination non-négligeable par ce type de composés par rapport aux autres sites côtiers français, avec des teneurs quatre fois supérieures à la médiane nationale pour les sites du Cap Ferret et des Jacquets (Ifremer, 2008).

Dans une étude menée par l'Ifremer sur la période 2005-2006 visant à caractériser l'état de la contamination du Bassin d'Arcachon par les insecticides (Fipronil et métabolites, Chlorpyrifos et métabolite, Chlorfenapyr, Bifenthrine, Cyperméthrine, Perméthrine et Lindane) et les herbicides (Diuron, Terbutylazine et métabolite, Métalochlore, Alachlore, Oxadiazon et Irgarol), il a été démontré que l'ensemble des composés recherchés sont présents dans le Bassin, au moins une fois dans l'une des matrices échantillonnées (eaux des tributaires ou du bassin, sédiments ou huîtres, (Auby *et al.*, 2007). Globalement les concentrations en insecticides mesurées dans les eaux du Bassin sont faibles, parfois en dessous de la limite de quantification. Cependant, certains composés comme de Chlorpyrifos et la Bifenthrine atteignent des teneurs susceptibles de nuire aux crustacés (supérieures à la NOEC, no observed effect concentration, de la mysidacée marine *Americamysis bahia*). De façon similaire, les concentrations mesurées dans les eaux pour les herbicides sont généralement inférieures aux seuils de toxicité déterminés pour les microalgues, sauf dans le cas de l'Irgarol, molécule très toxique pour le phytoplancton et très rémanente, dont l'utilisation dans le Bassin se limite aux peintures anti-salissures. Ce biocide présente, dans les eaux du Bassin, des concentrations supérieures à ce qui était mesuré par le passé et mériterait, selon les auteurs, d'être suivi dans l'avenir. La contamination des huîtres par de nombreux pesticides a été mise en évidence presque exclusivement entre le printemps et l'été qui correspond à la période durant laquelle leur teneur lipidique est maximale. Cependant, la majorité des substances a seulement été détectée (valeurs inférieures au seuil de quantification) ou mesurée dans des proportions largement inférieures aux plus faibles limites maximales de résidus autorisés pour la consommation. La bioaccumulation la plus importante a été enregistrée pour la Perméthrine avec une teneur de 3 µg/g p.s. chez les huîtres de Comprian et des Jacquets. Globalement, la comparaison des valeurs obtenues par cette étude aux normes et seuils de qualités actuels ne montre pas de risque environnemental particulier bien que cette conclusion soit à nuancer étant donné que les pesticides sont présents sous forme de mélange complexe et que les valeurs guides actuelles ne sont pas déterminées pour l'ensemble des composés (Auby *et al.*, 2007).

Les travaux de Baumard *et al.* (1998) ont montré une contamination modérée des sédiments prélevés dans le Bassin d’Arcachon en 1995 avec des concentrations en HAP totaux à l’intérieur de la lagune comprises entre 900 ng/g et 4 100 ng/g. Le site océanique du Banc d’Arguin est très marginalement contaminé avec une teneur de seulement 30 ng/g. La transplantation de moules sur les différents sites étudiés montre que la bioaccumulation en HAP est positivement corrélée au niveau de contamination des sédiments. En effet, les individus exposés aux sédiments modérément contaminés (< 2 000 ng/g) révèlent également une bioaccumulation modérée comprise entre 300 et 500 ng/g alors que ceux transplantés sur les sites les plus fortement impactés (> 3 000 ng/g) accumulent jusqu’à plus de 2 000 ng/g de HAP (Baumard *et al.*, 1998). Selon ces auteurs, la pollution ainsi révélée est principalement d’origine pyrolytique et liée aux activités anthropogéniques. Cette conclusion est soutenue par le bulletin de l’Ifremer (2008) qui fait état d’une contamination au fluoranthène (HAP pyrolytique provenant notamment de la combustion des essences et considéré comme représentatif de la contamination globale en HAP ; RNO, 2006) supérieure à la médiane nationale chez les huîtres de Comprian et des Jacquets, jugés comme les deux points les plus contaminés de la côte Aquitaine pour ce composé (Ifremer, 2008). L’étude rapporte également que les teneurs en fluoranthène semblent avoir diminué entre 2004 et 2006 au Cap Ferret et aux Jacquets, alors qu’à Comprian, l’augmentation des concentrations observées depuis la fin des années 1990 paraît se poursuivre.

Toujours en 2008, le rapport fourni par l’IFREMER et le LPTC alerte sur le fait que sur les sites des Jacquets et du Cap Ferret ont vu leur contamination en HAP tripler en dix ans. Ces deux points sont proches d’une très grande zone de mouillage et situés dans la partie de la lagune qui subit la plus forte pression motonautique. À Comprian, où la pression nautique est plus faible, la progression est plus faible puisque les valeurs n’ont que doublé au cours de la période 1996-2004 (Ifremer & LPTC, 2008). La [Figure 1.7](#) illustre l’augmentation de l’accumulation en HAP totaux et en Fluoranthène évoquée dans cette étude. Les résultats représentés sur cette figure montrent également que les teneurs en HAP dans les huîtres s’approchent dangereusement de la valeur guide de l’ANSES fixée à 500 µg/g p.s. Selon l’extrapolation linéaire théorique des données, ce seuil pourrait être atteint aux alentours de 2017 (Ifremer & LPTC, 2008). De plus, étant donné l’existence d’une forte variabilité inter-saisonnière dans la bioaccumulation des contaminants par les huîtres du Bassin (ASCOBAR, 2010), il est possible que les teneurs en HAP soient différentes, probablement plus fortes, si elles sont mesurées lors de la période estivale au lieu de la période hivernale comme c’est actuellement le cas (Ifremer & LPTC, 2008). Par ailleurs, les auteurs concluent également au classement de la zone amont du Bassin d’Arcachon dans les masses d’eau en Risque de Non Atteinte du Bon État (RNABE) chimique au vu des teneurs en fluoranthène dans les eaux du Bassin extrapolées des concentrations présentes dans les sédiments.

Au vu de l’ensemble des informations rassemblées ici, la problématique de la contamination du Bassin d’Arcachon semble extrêmement complexe étant donné la diversité et la fragilité des écosystèmes qu’il abrite, les nombreuses sources de contaminations potentielles, la variabilité intrinsèque du milieu, et le temps de séjour relativement long des contaminants dans la lagune lié au faible taux de renouvellement des eaux.



**Figure 1.7. Évolution de la bioaccumulation en HAP chez les huîtres du Bassin d’Arcachon sur les sites du Cap Ferret, des Jacquets et de Comprian.**

Figure issue du rapport IFREMER-LPTC (2008) construite à partir des données recueillies par le RNO sur la période 1996-2004

### 3. CHOIX DES SUBSTANCES TESTEES ET DES SITES DE PRELEVEMENTS

---

L'un des objectifs principaux de ce travail de thèse consistait à caractériser les effets toxiques de substances chimiques emblématiques de la contamination des sédiments aquitains à l'aide du test embryo-larvaire Medaka (MELA). Au vu des profils de contamination détaillés dans les paragraphes précédents, les deux familles de composés paraissant les plus problématiques en Aquitaine semblent être les éléments traces métalliques et les HAP notamment pour le continuum Lot-Garonne-Gironde et le Bassin d'Arcachon respectivement. Nous avons donc choisi d'orienter nos études autour d'une problématique « contamination métallique » centrée sur le système fluvio-estuarien de la Gironde et d'une problématique « contamination organique – HAP » autour du Bassin d'Arcachon.

#### 3.1. Sélection des substances modèles, des concentrations cibles testées et des sites de prélèvements pour la problématique « contamination métallique »

##### 3.1.1. Choix des composés modèles et des concentrations cibles

Le Cd s'est imposé dans cette sélection en tant que composé emblématique de la contamination polymétallique historique du système Lot-Garonne-Gironde. Comme évoqué précédemment, la découverte d'une accumulation excessive en Cd dans les bivalves de la zone aval de l'estuaire de la Gironde marque le début d'une longue série d'études visant à suivre l'évolution et les impacts de la pollution métallique sur les écosystèmes de la région. De nos jours, le Cd est encore présent dans des concentrations notables dans les différents compartiments environnementaux du système Lot-Garonne-Gironde comme discuté plus haut. Les effets liés à une intoxication massive au Cd sont tristement connus depuis les années 1950. Ce composé est identifié comme étant à l'origine de la maladie touchant certains habitants de la région de Toyama au Japon fortement exposés par l'intermédiaire de l'eau et de la nourriture, contaminées elles-mêmes par les rejets d'une exploitation minière de la région. L'intoxication au Cd conduit à un ramollissement osseux et à de graves insuffisances rénales. Les violentes douleurs causées par la maladie lui valent le surnom de maladie Itai-Itai. Par ailleurs, le Cd a été identifié comme agent cancérigène et potentiellement mutagène (UE, 2004). Les effets toxiques du Cd chez les organismes aquatiques sont détaillés dans le *paragraphe 1.2 du Chapitre 3*.

En parallèle du Cd, nous avons souhaité étudier un élément métallique essentiel au bon fonctionnement de l'organisme. Le Cu a été retenu en raison de sa présence dans des gammes de concentrations équivalentes à celle du Cd au sein du système Lot-Garonne-Gironde (**Tableau 1.2**). Par ailleurs, la bioaccumulation en Cu croissante d'année en année observées chez les bivalves du bassin d'Arcachon en fait également un composé d'intérêt pour cet environnement d'étude. Ces données indiquent également qu'en dépit des processus de régulation présents chez les organismes exposés, ce composé omniprésent en Aquitaine peut s'accumuler anormalement dans les tissus et potentiellement engendrer des effets délétères chez les individus contaminés (voir *paragraphe 1.2 du Chapitre 3* pour plus de détails). Le Cu et le Cd font parties des dix métaux considérés comme les plus préoccupants pour l'environnement et les plus toxiques pour les écosystèmes aquatiques (Islam

& Tanaka, 2004). Ces dix métaux sont, dans un ordre décroissant de toxicité : le Hg, le **Cd**, l'Ag, le Ni, le Se, le plomb, le **Cu**, le Cr, l'As et le An.

Les concentrations cibles lors des tests embryo-larvaires visant à caractériser le spectre de toxicité de ces composés ont été déterminées en fonction des teneurs rapportées pour le compartiment sédimentaire le long du continuum Lot-Garonne-Gironde, qui sera notre milieu modèle pour la problématique « contamination métallique ». Une synthèse des concentrations en Cu et en Cd rapportées dans la littérature est donnée dans le **Tableau 1.2** (Quelques valeurs concernant le Bassin d'Arcachon sont également présentées à titre indicatif).

**Tableau 1.2. Récapitulatif des concentrations en Cu et en Cd relevées dans les sédiments de la Région Aquitaine**

Système	Site	Cd ( $\mu\text{g/g p.s.}$ )	Cu ( $\mu\text{g/g p.s.}$ )	Référence
Gironde	Le Verdon	0,43	-	(Blanc <i>et al.</i> , 1999)
	Marais salant Nord Médoc	< 0,5	~25	(Baudrimont <i>et al.</i> , 2005)
	Cheyzin	0,67	33	(Geffard, 2001)
Garonne	Bordeaux	0,7	29,5	(Grousset <i>et al.</i> , 1999)
	La Réole	2,6	-	(Blanc <i>et al.</i> , 1999)
	La Réole	0,92	21,7	(Grousset <i>et al.</i> , 1999)
	Tonneins	0,93	9,6	(Grousset <i>et al.</i> , 1999)
	Saint Léger	0,44	17,1	(Grousset <i>et al.</i> , 1999)
	Port Pascau	1,44	-	(Blanc <i>et al.</i> , 1999)
	Thouars	0,41	10,3	(Grousset <i>et al.</i> , 1999)
Lot	Moyenne annuelle Temple/Luzech/Cajarc 2006	14,75	24,35	(Shinn <i>et al.</i> , 2009)
	Moyenne annuelle Temple/Luzech/Cajarc 1987	41,67	31,67	(Shinn <i>et al.</i> , 2009)
	Temple	12,5	-	(Blanc <i>et al.</i> , 1999)
	Temple	53	43	(Audry <i>et al.</i> , 2004a)
	Temple	20,4	30,7	(Audry <i>et al.</i> , 2004b)
	Saint Radegonde	17	22,8	(Grousset <i>et al.</i> , 1999)
	Cajarc	20,6	-	(Blanc <i>et al.</i> , 1999)
	Cajarc	125	97,7	(Audry <i>et al.</i> , 2004b)
	Cajarc	65	64	(Audry <i>et al.</i> , 2004a)
	Bouillac	26,4	-	(Blanc <i>et al.</i> , 1999)
	Riou	16,1	25,4	(Grousset <i>et al.</i> , 1999)
	Decazeville/Riou-Mort	460	-	(Blanc <i>et al.</i> , 1999)
	Boisse-Penchot (amont)	0,74	27	(Audry <i>et al.</i> , 2004a)
Marcenac (amont)	0,81	26,9	(Audry <i>et al.</i> , 2004b)	
Bassin d'Arcachon	Arès	0,3	20,4	(Geffard, 2001)
	Argiles	0,28	7,8	(Geffard, 2001)

La gamme de concentrations cibles testées comprend trois valeurs en plus du témoin négatif. Les doses correspondant à chaque point de la gamme ont été déterminées en fonction des concentrations en Cd, retrouvées dans le continuum Lot-Garonne-Gironde. La plus forte concentration (**3X**) a été fixée à **20  $\mu\text{g/g p.s.}$**  comme représentative des teneurs en Cd pouvant être observées dans les sédiments du Lot, à l'exception des zones très fortement impactées les plus proches de la source de contamination qui peuvent atteindre des concentrations parfois supérieures à 100  $\mu\text{g/g}$ . Les deux autres points de la gamme ont été répartis de manière homogène avec un traitement **1X** fixé à **6,5  $\mu\text{g/g p.s.}$**  qui correspond globalement à la moyenne des teneurs en Cd des sédiments du continuum (en excluant les « hot spots ») et une dose **0,3X** établie à **2  $\mu\text{g/g p.s.}$** , légèrement supérieure au niveau de base déterminé à 0,33  $\mu\text{g/g}$  par Audry *et al.* (2004b). Cette concentration se situe dans les valeurs hautes pouvant être mesurées au sein des sédiments de la Garonne.



### 3.1.2. Choix des sites de prélèvements

Au cours de l'étude de l'impact toxique de matrices sédimentaires naturelles contaminées en éléments métalliques, nous avons souhaité analyser les réponses toxiques induites par différents sédiments prélevés le long du système Lot-Garonne en suivant le gradient de la contamination dont la source se situe aux abords de Decazeville en Aveyron. Cinq points de prélèvements stratégiques ont été sélectionnés :

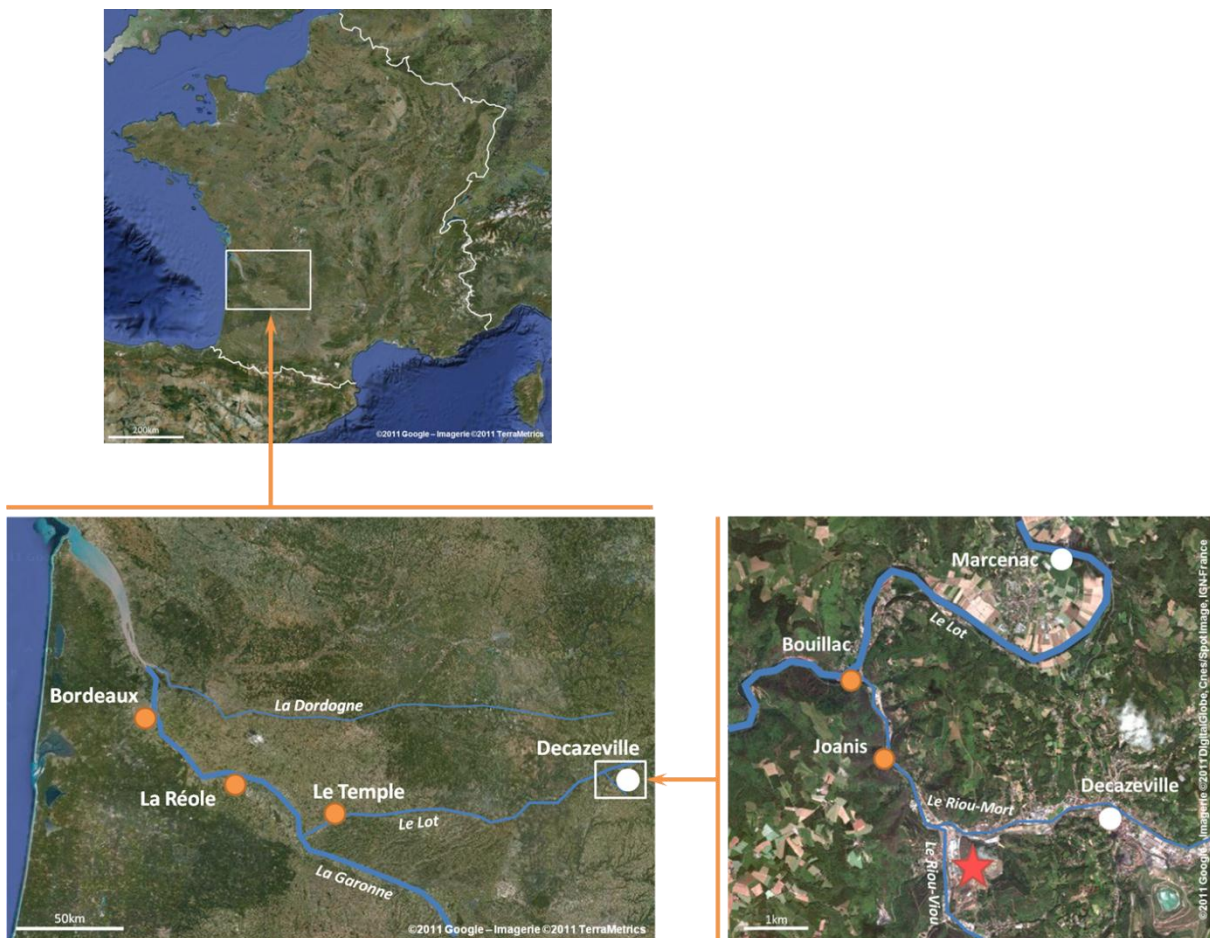
- ✓ JOANIS : ce point est situé sur le Riou-Mort, à équidistance (environ 2 km) du site de l'ancienne usine d'extraction minière responsable de la pollution métallique et de la confluence avec le Lot. La concentration en métaux dans les sédiments de cette zone est très forte (Bertin & Bourg, 1995) étant donné que les rejets sous forme dissoute commencent à s'adsorber sur la phase particulaire dès 0,5 km de la source (Blanc *et al.*, 1999).
- ✓ BOUILLAC : ce point de prélèvement est placé à l'exacte confluence du Riou-Mort avec le Lot, résultant théoriquement en une dilution de la pollution métallique apportée par le cours d'eau contaminé. Ce site, lorsqu'il est comparé à un point amont, représente également le potentiel toxique des sédiments apportés par le Riou-Mort dans le Lot.
- ✓ LE TEMPLE : ce site se situe sur le Lot, à environ 200 km en aval de la source de la contamination et à une quinzaine de km de la confluence du Lot avec la Garonne. Ce point servira d'état des lieux de la toxicité des sédiments juste avant leur entrée dans la Garonne.
- ✓ LA REOLE : ce point est situé à environ 50 km en aval de la confluence du Lot avec la Garonne et marque également la limite amont de la marée dynamique mais sans que le gradient de salinité ne s'y fasse déjà sentir.
- ✓ BORDEAUX : ce point est situé à environ 25 km du début de l'estuaire (Bec d'Ambès) et est soumis à la marée dynamique et à la marée de salinité. L'étude de ce point pourra permettre d'évaluer la toxicité des sédiments juste avant leur entrée dans l'estuaire, intégrant à la fois la contamination métallique potentielle issue du Lot et l'éventuel apport en contaminants provenant de l'agglomération bordelaise.

L'ensemble des points de prélèvements étudiés pour cette problématique « contamination métallique » est présentée sur la [Figure 1.8](#). Le détail de la méthode de prélèvement utilisée est présenté dans la *partie 1 du Chapitre 2*.

## 3.2. Sélection des substances modèles, des concentrations cibles testées et des sites de prélèvements pour la problématique « contamination organique – HAP »

### 3.2.1. Choix des composés modèles et des concentrations cibles

Comme mentionné précédemment, le Bassin d'Arcachon servira de milieu d'étude pour la problématique « contamination organique – HAP ». Les HAP modèles ont donc été déterminés d'après la caractérisation chimique des sédiments de la lagune réalisée dans le cadre du projet ASCOBAR 2008-2009 (Crespo, 2009). Il est à noter que lors du choix des substances et des concentrations cibles effectué au cours du premier semestre 2009, les données des travaux sus-cités



**Figure 1.8. Sites d'échantillonnage sur le continuum Lot-Garonne**

Les sites d'échantillonnage sont marqués d'un point orange. L'étoile rouge symbolise la source de la contamination métallique (site de l'ancienne usine d'extraction de zinc).

n'étaient pas disponibles dans leur intégralité. Par ailleurs, la toxicité de nombreux HAP a préalablement été évaluée au cours des travaux de thèse de Ludovic Vicquelin (2011). L'efficacité du test MELA pour la caractérisation du profil de réponses toxiques induites par des composés hydrophobes contenus dans une matrice sédimentaire a déjà été démontrée au cours de ce travail. Il ne s'agit donc pas ici de réitérer les mêmes études mais bien d'utiliser le test MELA, dans un contexte visant à évaluer la toxicité et le mode d'action de composés présents dans l'environnement d'étude mais dont le potentiel toxique reste néanmoins mal connu.

Le pyrène (Pyr) fait partie des trois HAP les plus abondants dans les sédiments du Bassin d'Arcachon (Crespo, 2009 ; Chodjaï, 2008) et de l'estuaire de la Gironde (Budzinski *et al.*, 1997). Ce composé appartient d'ailleurs à la liste des substances prioritaire de l'US-EPA. Malgré cela, le Pyr reste relativement peu étudié en termes de toxicité vis-à-vis des organismes aquatiques (INERIS, 2005b). De plus, selon les travaux d'Alexia Crespo (2009), « le pyrène est d'autant plus intéressant à suivre que ses concentrations dans l'eau (comprendre « dans les eaux du Bassin d'Arcachon ») sont équivalentes voire supérieures à sa concentration calculée sans effet qui est particulièrement basse (3 ng/L) ». Les profils de bioaccumulation des HAP dans les huîtres du Bassin sont similaires à ceux observés dans les sédiments. De plus, le Pyr fait partie des HAP les plus présents dans les tissus des huîtres avec des concentrations variant de 15,4 ng/g p.s. pour le site d'Arguin à 81 ng/g p.s. pour le site de Comprian (Crespo, 2009). À titre indicatif, les valeurs de bioaccumulation en HAP totaux pour ces mêmes points de prélèvements sont respectivement de 287,5 ng/g p.s. et de 511,8 ng/g p.s.

Le Pyr a été sélectionné comme HAP modèle au cours du présent travail. Nous avons également souhaité étudier les effets d'un dérivé monoalkylé de ce composé, le 1-méthylpyrène (MePyr). Ce composé a déjà été détecté dans des sédiments marins contaminés en HAP (Notar *et al.*, 2001) et s'est avéré bioaccumulable chez des organismes aquatiques tels que les huîtres, les crabes et les poissons téléostéens (Monien *et al.*, 2009 ; Kollock *et al.*, 2008 ; d'après les travaux de Pancirov & Brown, 1977). Le MePyr est par ailleurs considéré comme potentiellement cancérigène chez les mammifères (Glatt *et al.*, 2008 ; Engst *et al.*, 1999). La présence de HAP alkylés a également été démontrée dans les sédiments du Bassin d'Arcachon les plus fortement contaminés en HAP (Crespo, 2009). Parmi les HAP alkylés analysés, les dérivés monoalkylés du Pyr sont, en moyenne, les plus abondants dans les sédiments, et leur teneur relative peut atteindre 10 % à 15 %. Dans ces mêmes sédiments, les teneurs relatives en Pyr peuvent atteindre 15 % à 20 % de l'ensemble des HAP dosés (Crespo, 2009).

Les concentrations en Pyr dans les sédiments de l'intérieur du Bassin d'Arcachon sur la période 2008-2009 sont comprises entre moins de 1 ng/g pour le site d'Arguin et de Grand Banc (juin 2008) à plus de 1 100 ng/g pour le site de Bélisaire (mars 2009 ; Crespo, 2009). Étant donné que l'évaluation du potentiel toxique du Pyr et du MePyr au cours de ce travail comprend un aspect toxicologique, les concentrations cibles ont été également déterminées en fonction des différents seuils de toxicité estimés pour ces composés dans la littérature, dont quelques-uns sont rapportés dans le **Tableau 1.3**. Comme pour l'étude des composés métalliques la gamme des concentrations cibles en HAP comprend trois doses en plus du contrôle négatif. La concentration **1X** a été fixée à **900 ng/g p.s.** afin de représenter les teneurs des sédiments les plus fortement contaminés en Pyr (comme Arès ou Bélisaire en mars 2009 avec respectivement 742 ng/g et 1 156 ng/g ; Crespo, 2009). Cette valeur est également comprise entre les seuils ERL et ERM du Pyr (ou TEL et PEL ou TEC et PEC ; MacDonald *et al.*, 2000 ; Long *et al.*, 1998 ; MacDonald *et al.*, 1996), indiquant l'induction potentielle d'effets

toxiques. La concentration **0,3X** a été établie à **270 ng/g p.s.**, représentative de teneur moyenne en Pyr des sédiments de l'intra-bassin égale à 224 ng/g selon les données recueillies en 2008 et 2009 (Crespo, 2009). Enfin, la concentration **3X** a été fixée à **2 700 ng/g p.s.** soit dix fois la dose représentative des teneurs présentes dans les sédiments du Bassin. Cette valeur est également supérieure aux seuils ERM, PEL et PEC, au-delà desquels des effets toxiques sont fortement probables. Cette concentration a surtout un intérêt toxicologique mais peut également être atteinte dans des sites très fortement impactés, comme ce fut le cas en 2002 dans le port de la Teste où une teneur de 2 740 ng/g de Pyr a été mesurée dans les sédiments de surface (Crespo, 2009).

**Tableau 1.3. Quelques seuils de toxicité déterminés pour le Pyr contenu dans les sédiments marins ou d'eau douce**

	<b>Pyrène (ng/g p.s.)</b>	<b>Source</b>
ERL	665	(Long <i>et al.</i> , 1995)
ERM	2 600	(Long <i>et al.</i> , 1995)
TEL	153	(MacDonald <i>et al.</i> , 1996)
PEL	1 398	(MacDonald <i>et al.</i> , 1996)
TEC	195	(MacDonald <i>et al.</i> , 2000)
PEC	1 520	(MacDonald <i>et al.</i> , 2000)

*ERL : Effect range low ; ERM : Effect range medium ; TEL : Threshold effect level ; PEL : Probable effect level ; Ces valeurs sont définies pour les sédiments marins ; TEC : Threshold effect concentration ; PEC : Probable effect concentrations ; Ces valeurs sont établies pour les sédiments d'eau douce.*

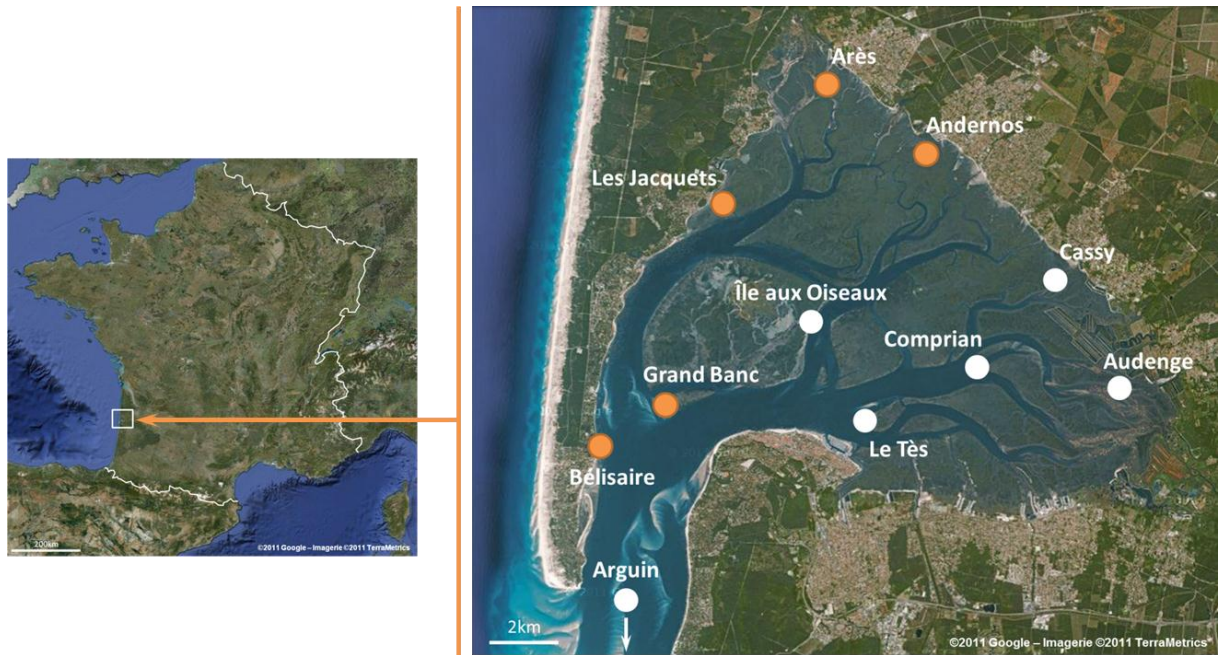
Les mêmes concentrations ont été utilisées pour le MePyr par manque de données environnementales précises pour ce composé et afin de pouvoir éventuellement comparer les réponses toxiques induites par le HAP parent et sont dérivé alkylé.

### 3.2.2. Choix des sites de prélèvements

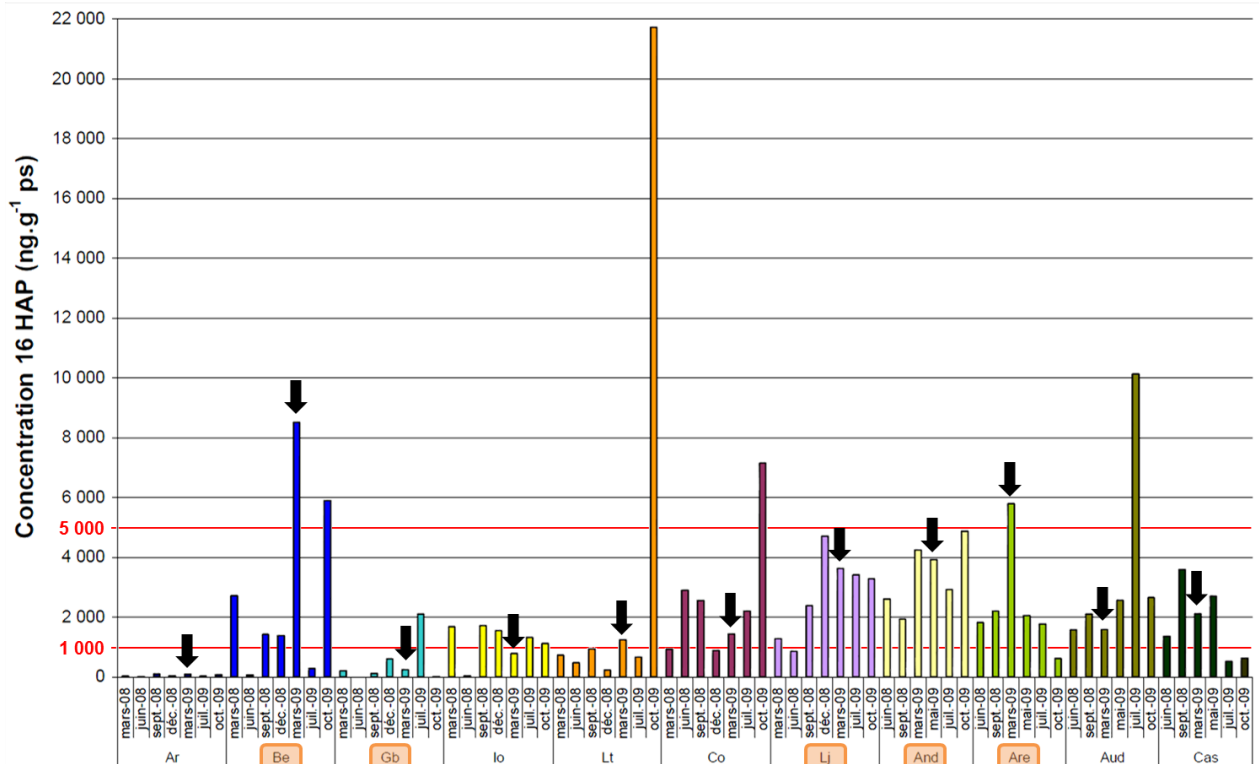
Les sédiments analysés lors de cette étude pour la problématique « contamination organique » sont issus de la campagne de prélèvements de mars 2009 effectuée dans le cadre du projet ASCOBAR (2010) dont l'ensemble des sites d'échantillonnage est présenté sur la [Figure 1.9](#).

Cinq sédiments provenant de cette campagne ont été retenus pour l'évaluation de leur toxicité à l'aide du test MELA en se basant sur leur niveau global de contamination en HAP, présenté sur la [Figure 1.10](#). Le jeu de sédiments a été sélectionné de manière à comprendre un sédiment « témoin » marginalement contaminé en HAP (<< 1 000 ng/g), deux sédiments modérément contaminés (compris entre 1 000 ng/g et 5 000 ng/g mais plus proche de la limite supérieure) et deux sédiments fortement contaminés (> 5 000 ng/g). Les cinq sédiments retenus sont les suivants :

- ✓ GRAND BANC : ce point est situé à l'Ouest du Bassin, face aux passes. La concentration en HAP totaux du prélèvement de Mars 2009 est estimée à 280 ng/g (Crespo, 2009). C'est une zone d'ostréiculture et d'affluence nautique aux eaux néritiques moyennes (température de 6 °C à 22,5 °C, salinité de 26,8 ‰ à 33,2 ‰).
- ✓ LES JACQUETS : ce site est situé sur la façade Ouest du Bassin, proche de la côte. Il est également fréquenté par le tourisme nautique. Ces eaux néritiques moyennes abritent des activités ostréicoles. La concentration en HAP totaux sur le prélèvement de mars 2009 est évaluée à environ 4 300 ng/g (Crespo, 2009).
- ✓ ANDERNOS : ce point est situé au nord-est du bassin, proche de la côte et en sortie de port où les eaux ne sont que faiblement renouvelées notamment en période estivale



**Figure 1.9. Sites d'échantillonnage sur le Bassin d'Arcachon (Projet ASCOBAR 2008-2009)**  
 Les sites échantillonnés au cours du projet ASCOBAR sont symbolisés par un point (blanc ou orange). Les sites retenus au cours du présent travail de thèse sont représentés par un point orange.



**Figure 1.10. Concentrations en HAP (ng/g p.s.) mesurées dans les sédiments du Bassin d'Arcachon (Projet ASCOBAR 2008-2009)**

Figure adaptée du compte-rendu du projet ASCOBAR (2010). Les concentrations ne concernent que les 16 HAP prioritaires retrouvés dans les sites suivants : Arguin (Ar), Bélisaire (Be), Grand Banc (Gb), Ile aux Oiseaux (Io), Le Tès (Lt), Comprian (Co), Les Jacquets (Lj), Andernos (And), Arès (Are), Audenge (Aud) et Cassy (Cas). Les sédiments prélevés au cours de la campagne de mars 2009 sont indiqués par une flèche noire. Les sites retenus au cours du présent travail de thèse ont leur nom encadré d'un rectangle orange. Les seuils de contamination de 1 000 ng/g et 5 000 ng/g de HAP ayant servi au choix des sédiments sont indiqués par une ligne rouge.

(Plus et al., 2006). Ses eaux sont qualifiées de néritiques internes (température de 1 °C à 25 °C, salinité de 22 ‰ à 32 ‰). La concentration en HAP totaux pour le prélèvement de mars 2009 est évaluée à environ 4 900 ng/g (Crespo, 2009).

- ✓ ARES : ce site se trouve dans la pointe Nord du bassin, en zone côtière, et également en sortie de port ce qui explique probablement les fortes concentrations en HAP totaux mesurées sur ce site. En mars 2009, les teneurs en HAP s'élevaient à environ 6 700 ng/g (Crespo, 2009). Comme pour Andernos, ses eaux sont dites néritiques internes et également lentement renouvelées.
- ✓ BELISAIRE : ce point se situe dans l'angle Sud-Ouest du Bassin, presque en face du site de Grand Banc, sur la zone côtière du Cap Ferret dont la fréquentation nautique est importante. Non loin des passes, il est donc sous influence océanique, ce qui peut expliquer la variabilité des concentrations en HAP mesurées à ce point. La concentration en HAP totaux en mars 2009 s'élevaient à environ 9 900 ng/g (Crespo, 2009).

### 3.3. Sélection des sites de référence potentiels

Le choix d'un sédiment de référence « non-contaminé » est essentiel d'une part pour servir de contrôle négatif lors de l'évaluation de la toxicité des matrices sédimentaires naturellement contaminées issues du continuum Lot-Garonne-Gironde et du Bassin d'Arcachon et d'autre part pour servir de matrice de dopage lors de la caractérisation des effets toxiques des substances modèles mentionnées précédemment. Ce sédiment doit offrir des conditions acceptables pour le développement des embryons de Medaka. Il doit donc présenter les caractéristiques suivantes :

- ✓ Une granulométrie intermédiaire et globalement homogène. Des particules fines risqueraient d'engendrer le recouvrement total des embryons et de perturber leurs échanges avec le milieu extérieur. Inversement, une granulométrie trop grossière limiterait les surfaces de contact entre les œufs et les grains de sédiments, compromettant ainsi un bon transfert des contaminants vers les organismes. D'autre part, une taille de particules trop élevée limiterait la surface spécifique disponible pour l'adsorption des substances au cours des procédures d'enrobage.
- ✓ Une teneur en matière organique limitée afin de restreindre d'éventuels développements de microorganismes qui pourraient biaiser les résultats des tests.
- ✓ Une contamination chimique marginale n'induisant pas d'effets toxiques notables chez les embryons et larves de Medaka se développant à son contact. Ceci inclut évidemment des concentrations en polluants environnementaux de type métaux et polluants organiques faibles mais également des teneurs limitées en d'autres macropolluants tels que l'ammonium ou les sulfures.
- ✓ Le sédiment doit aussi permettre le maintien de conditions d'oxygénation suffisantes pour le bon développement des embryons à l'interface eau-sédiment d'au moins 60 % de saturation minimum selon la réglementation (OCDE, 1998, 1992b).
- ✓ Enfin, la matrice sédimentaire devrait en théorie être représentative de l'environnement étudié. Cependant, étant donné la diversité et la complexité des milieux analysés au cours de ces travaux de thèse, il semblerait que ce critère-là ne soit pas réalisable, ne serait-ce

qu'en considérant le fait que nous étudions une lagune marine et un système fluvial. De plus, les sédiments au sein d'un même milieu, par exemple le continuum Lot-Garonne-Gironde, sont également très variables. Satisfaire le présent critère reviendrait à multiplier le nombre de matrices de référence, ce qui n'aurait plus aucun sens dans le cadre de l'évaluation de la toxicité de sédiments le long d'un gradient de contamination, comme c'est le cas ici.

Deux sites de référence potentiels ont été retenus le long du continuum Lot-Garonne-Gironde :

- ✓ MARCENAC : ce site est situé sur le Lot, en amont de sa confluence avec le Riou-Mort et donc non-impacté par la contamination métallique apportée par ce dernier. Le point de prélèvement est placé en amont du barrage de Livinhac Le Haut, village de l'Aveyron situé à 5 km environ de Decazeville. Le sédiment de ce site est considéré comme peu ou pas contaminé du point de vue des micropolluants métalliques (Audry *et al.*, 2010 ; Audry *et al.*, 2004b).
- ✓ CADAUJAC : Ce point est situé à une dizaine de km en amont de Bordeaux sur la Garonne. Ce site a été envisagé comme point de référence potentiel étant donné que Grousset *et al.* (1999) ont montré que les teneurs en éléments métalliques des sédiments récents (jusqu'à 25 cm de profondeur) de Bordeaux ont retrouvés un niveau comparable à la situation précédant les événements de contamination originaire de l'usine de Decazeville pour la quasi-totalité des éléments métalliques.

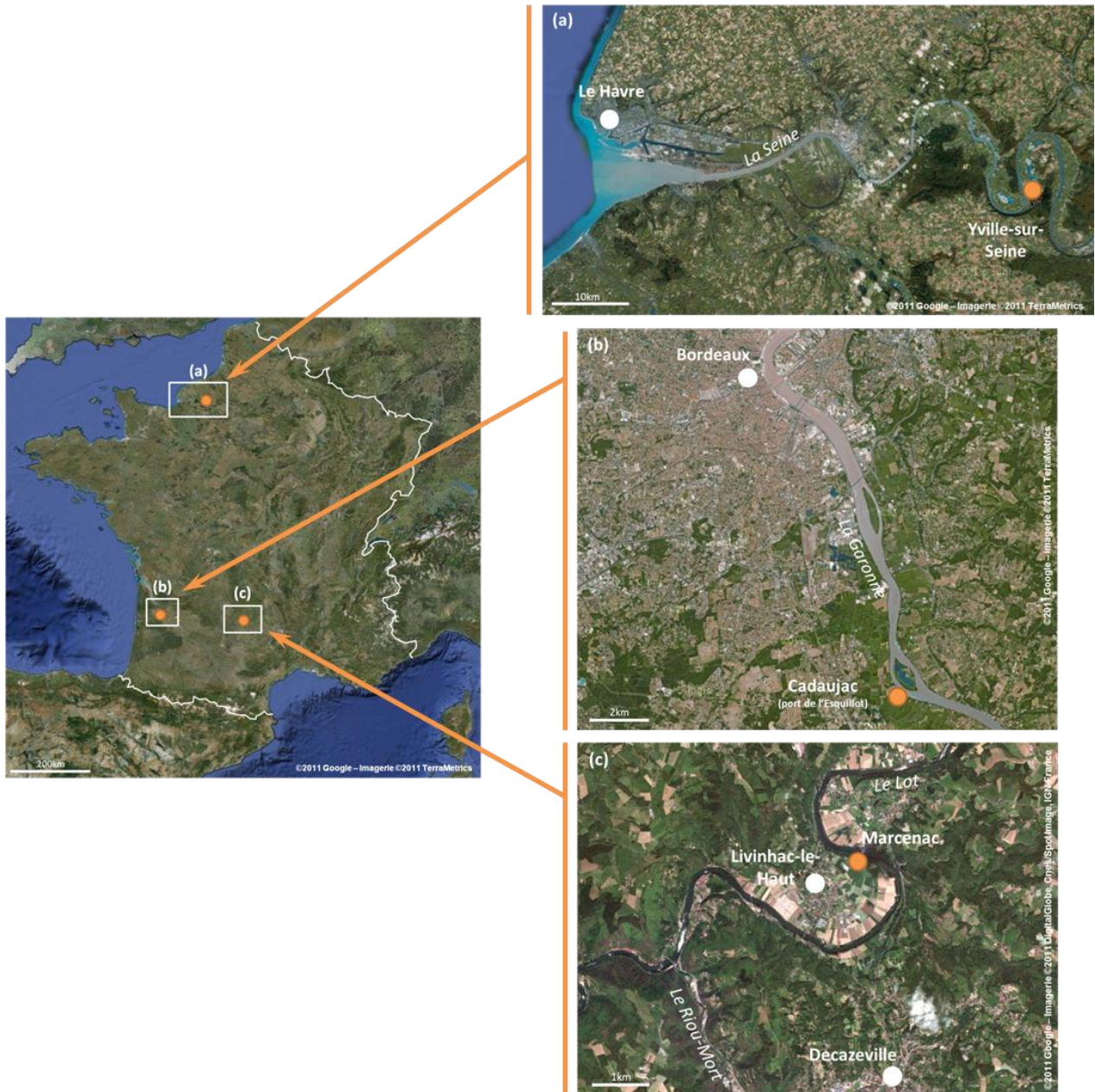
Enfin, un sédiment provenant d'une ancienne gravière située à YVILLE-SUR-SEINE (Seine-Maritime, France) a servi de contrôle négatif lors du choix du sédiment de référence aquitain puisqu'il est très marginalement contaminé en métaux et composés organiques, ne présente aucune toxicité et s'avère être un substrat adéquat au développement du Medaka japonais (Vicquelin *et al.*, 2011 ; Cachot *et al.*, 2007 ; Cachot *et al.*, 2006). L'ensemble des points de prélèvements de ces trois sédiments sont présentés sur la [Figure 1.11](#).

Par ailleurs, un sédiment marin de référence potentiel (site de Grand Banc) a été ajouté, en plus du sédiment de référence global, au cours de l'analyse des sédiments du Bassin d'Arcachon afin de prendre en compte le changement notable de la nature du milieu.

## 4. SOURCE, DEVENIR ET BIODISPONIBILITE DES PRINCIPAUX CONTAMINANTS

---

Dans le cadre de ses travaux de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'étude de sédiments contaminés par deux classes de polluants majeurs, les métaux et les contaminants organiques de la famille des HAP. Dans cette partie, nous décrirons rapidement quelques caractéristiques générales de ces deux classes de composés ainsi que les facteurs influant sur leur biodisponibilité dans le milieu aquatique.



**Figure 1.11. Sites d'échantillonnage des sédiments de référence potentiels**

Les sites d'échantillonnage sont marqués d'un point orange. Le sédiment d'Yville a été échantillonné en février 2009, celui de Cadaujac en décembre 2008 et celui de Marcenac en mars 2009.



## 4.1. Les éléments traces métalliques

### 4.1.1. Source et caractéristiques

Les métaux sont des éléments naturellement présents dans l'environnement. Ils sont notamment présents dans la croûte terrestre en des teneurs variables selon la nature des roches. Ces composés sont souvent retrouvés à l'état de traces dans l'environnement, dans lequel ils sont introduits par l'intermédiaire de phénomènes naturels tels que l'érosion, l'activité volcanique ou les dépôts atmosphériques. Par ailleurs, les propriétés thermiques et électriques de ces composés en font des éléments de choix dans de nombreuses activités humaines, favorisant ainsi leur dispersion dans l'environnement. Les principales sources anthropiques responsables de la contamination des écosystèmes par les éléments traces métalliques dont le Cu et le Cd sont : l'activité minière, les cimenteries, la production de composants électriques et électroniques, la fabrication de pigments, l'utilisation d'engrais, de fongicides, d'insecticides et de peintures antisalissures, la combustion de carburants fossiles, l'incinération de déchets et les eaux usées municipales (Grosell, sous presse ; McGeer *et al.*, sous presse ; Rodríguez-Cea *et al.*, 2005 ; Islam & Tanaka, 2004).

Les métaux rencontrés dans l'environnement peuvent être classés selon leur caractère essentiel ou non. Un métal, comme le Cu, est considéré comme essentiel lorsqu'il remplit des fonctions biochimiques bien précises dans l'organisme et que son absence entraîne l'apparition de symptômes pathologiques qui disparaissent lorsque le composé est à nouveau présent (Geffard, 2001 ; d'après Förstner & Wittmann, 1979). Le Cu présente un fort potentiel redox capable de catalyser le déplacement des électrons dans les molécules biologiques. Cet élément sert donc de cofacteur à des protéines impliquées dans de nombreux mécanismes métaboliques comme la respiration, le métabolisme du Fe, la lutte contre le stress oxydant et certaines fonctions neurologiques, par exemple (Valko *et al.*, 2005). La preuve de l'importance du Cu en tant qu'oligoélément chez le poisson est démontrée par la croissance réduite observée chez les individus carencés en Cu (Kamunde *et al.*, 2002). Cependant, tout comme le Cd, cet élément peut engendrer des effets toxiques divers et variés lorsqu'il est présent en trop grande quantité dans le milieu (voir *paragraphe 1.2 du Chapitre 3* pour plus de détails).

Inversement, un élément métallique est dit non-essentiel lorsqu'on ne lui connaît aucune fonction biologique particulière. Généralement ces composés entraînent des effets toxiques délétères à partir de concentrations pouvant être très faibles.

### 4.1.2. Spéciation et biodisponibilité

Les éléments métalliques peuvent être présents dans l'environnement sous différentes formes physiques et chimiques, en interaction avec les ligands du milieu, c'est ce que l'on appelle la spéciation (Templeton *et al.*, 2000). On définit deux grands types de spéciations. La spéciation physique d'un métal est sa répartition à travers les formes particulières (> 220 nm), colloïdales (10-220 nm) et dissoutes « vraies » (< 10 nm). La spéciation chimique identifie la distribution des éléments métalliques selon les différentes espèces chimiques présentes dans le milieu (Campbell & Couillard, 2004). Ce dernier cas est détaillé dans ce qui suit.

Dans la phase dissoute (dont colloïdale), les métaux peuvent se présenter sous les formes suivantes (Campbell & Couillard, 2004 ; Templeton *et al.*, 2000 ; Chapman *et al.*, 1998) :

- ✓ Ion métallique libre :  $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$  pour les éléments métalliques étudiés ici, en réalité ces ions sont toujours associés à une molécule d'eau.
- ✓ Complexe avec des anions inorganiques tels que  $\text{OH}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  etc...
- ✓ Complexe avec des ligands organiques comme, par exemple, les protéines, les acides fulviques, aminés, carboxyliques ou humiques.

Au niveau de la phase particulaire, les éléments métalliques peuvent être (Gonzalez *et al.*, 1999 ; Chapman *et al.*, 1998) :

- ✓ Intégrés dans la structure cristalline des minéraux.
- ✓ Liés à la fraction organique (carbonates, restes d'organismes, fécès...).
- ✓ Précipités ou co-précipités avec différentes fractions minérales notamment les carbonates, les phosphates, les oxydes et hydroxydes de Fe et de Mn et les sulfures.
- ✓ Adsorbés sur des phases de natures variables incluant les argiles, les silts, la matière organique, les oxydes et hydroxydes de Fe et de Mn etc...

Ce genre d'associations conditionne le comportement des métaux sous forme particulaire dans l'environnement aquatique. Il est également important de noter le caractère dynamique de la spéciation des éléments métalliques qui peuvent passer d'une forme à l'autre très rapidement en fonction des conditions environnantes. Ainsi, la spéciation chimique des éléments métalliques est fortement dépendante d'un grand nombre de facteurs propres à la composition de l'environnement dans lequel ils se trouvent. Les principaux processus responsables de la partition des métaux entre la phase dissoute et particulaire comprennent des réactions de complexation/dissociation (dépendantes de la présence des différents ligands et de leur constante de complexation), des réactions d'adsorption/désorption (influencées par de nombreux facteurs comme le pH, la salinité, la présence d'éléments compétiteurs et la surface spécifique des substrats), des réactions d'oxydo-réduction (qui régissent les phénomènes de dissolution/précipitation des métaux ; influencées également par la remise en suspension des sédiments par des phénomènes physiques de type tempêtes, aménagements de cours d'eau, trafic fluvial, marées, crues...) et des processus biologiques (comme la dégradation de la matière organique, la bioturbation, ou la sécrétion de molécules organiques complexantes). Ces réactions influencent également fortement les processus d'oxydo-réductions (Gonzalez *et al.*, 1999 ; Chapman *et al.*, 1998).

La spéciation d'un métal va conditionner sa mobilité, sa biodisponibilité et donc sa toxicité vis-à-vis des organismes aquatiques. Au sein du sédiment, les échanges entre la phase particulaire et dissoute sont nombreux et complexes, influencés par un grand nombre de facteurs physiques, chimiques et biologiques qui peuvent avoir un impact sur la biodisponibilité ou la séquestration des contaminants.

Afin de pouvoir relier le niveau de contamination des différents compartiments de l'environnement aquatique au risque que représente cette pollution vis-à-vis des organismes qui y vivent, il est indispensable de connaître la fraction biodisponible de chaque contaminant. La biodisponibilité d'une substance peut être définie comme la fraction de la charge totale du produit présent dans le sédiment et l'eau (dont l'eau interstitielle) qui peut être transférés aux tissus de l'organisme, à l'exception du tractus digestif (qui est considéré comme faisant partie du milieu

extérieur ; Belfroid *et al.*, 1996). L'exposition des organismes aquatiques peut avoir lieu directement par l'intermédiaire de la colonne d'eau ou de l'eau interstitielle au niveau des voies respiratoires et du tégument, mais également par la nourriture contaminée au niveau du système digestif ou par le biais des particules de sédiment notamment lors de l'ingestion de celles-ci (Belfroid *et al.*, 1996). De plus, les éléments métalliques peuvent être transférés de la femelle à la descendance par l'intermédiaire des réserves vitellines, rendant ainsi les SPD particulièrement sensibles aux effets potentiellement induits par les substances toxiques contenues dans les ovaires (Bang *et al.*, 2008). Par conséquent, la biodisponibilité des métaux dépend non seulement de leur distribution (et de leur spéciation) entre les différents compartiments mais également de la physiologie et de l'écologie de l'organisme lui-même.

Depuis plusieurs dizaines d'années, de nombreuses études se sont portées sur l'établissement d'un lien entre la spéciation des métaux et leur biodisponibilité. Il est de nos jours largement admis que les réponses toxiques induites par les éléments métalliques chez les organismes exposés varient en fonction de la concentration en métaux sous leur forme ionique libre laquelle peut être déterminée en tenant compte la teneur totale en métaux dissous ainsi que des ligands en solution (nature et concentration ; Campbell & Couillard, 2004). Il est souvent difficile de corrélérer les effets biologiques observés avec les teneurs totales en contaminants présents dans les sédiments. En revanche, ces corrélations sont plus facilement mises en évidence lorsque les concentrations en polluants ainsi que les facteurs majeurs qui gèrent leur répartition sont conjointement pris en compte. Pour les métaux, les principaux paramètres qui semblent conditionner leur biodisponibilité sont les teneurs en matière organique (ou carbone organique), en hydroxydes métalliques et en AVS (acid volatile sulfide), qui fixent fortement les métaux en formant des complexes insolubles, ainsi que le pH (Di Toro *et al.*, 2005 ; Ankley *et al.*, 1996 ; Di Toro *et al.*, 1990). Certains modèles utilisent la normalisation de la concentration en métaux du sédiment par la teneur en carbone organique de celui-ci afin de prédire la biodisponibilité des éléments métalliques et donc leur impact toxique potentiel (Di Toro *et al.*, 2005). Cette démarche serait suffisamment robuste pour s'abstenir de prendre en compte certaines caractéristiques physico-chimiques de l'eau interstitielle influant normalement sur la biodisponibilité telles que la dureté de l'eau, la salinité, le carbone organique dissous, et la présence d'autres ligands complexants ou compétitifs.

Cependant, les interactions intervenant à l'interface biotique/abiotique jouent également un rôle primordial dans la biodisponibilité/activité des métaux. En effet, l'élément métallique peut rencontrer à ce niveau des sites de liaison physiologiquement inertes où dans ce cas, il n'induirait pas d'effets notables, ou des sites physiologiquement actifs où, en se liant, le métal affecterait directement ou indirectement un certain nombre de mécanismes cellulaires (Campbell & Couillard, 2004 ; les voies de transfert des métaux étudiés sont détaillées dans le *Chapitre 3 paragraphe 1.1.*). Ainsi, les réactions biologiques, physiologiques et chimiques s'opérant à proximité immédiate de la surface biologique jouent un rôle important dans le contrôle de la biodisponibilité des éléments traces métalliques (Worms *et al.*, 2006). L'ensemble de ces processus sont donc autant de paramètres à prendre en compte, en plus de ceux influençant la spéciation des métaux dans le milieu abiotique, lors de l'évaluation de la biodisponibilité des métaux et probablement d'autres contaminants.

## 4.2. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

### 4.2.1. Sources et caractéristiques

Les HAP sont des hydrocarbures formés d'au moins deux cycles benzéniques condensés éventuellement substitués par des groupements alkylés, soufrés ou azotés. Ces composés sont stables et de structure variable, linéaire ou angulaire. Au sein de cette classe de substances, 16 d'entre eux sont considérés comme des substances prioritaires par l'Agence pour la Protection de l'Environnement Américaine (US-EPA citée par INERIS, 2005a). Leurs structures sont illustrées sur la *Figure 1.12*.

Il existe trois origines distinctes de HAP dans l'environnement. La plus importante est la source pyrolytique qui correspond à la combustion incomplète de la matière organique à haute température. La seconde est pétrogénique, elle inclut tous les déversements de pétrole dans l'environnement, naturels ou anthropiques. Enfin la dernière, moins importante, est la diagenèse précoce, processus qui transforme la matière organique présente dans les dépôts sédimentaires et les roches en pétrole (Geffard, 2001 ; d'après les travaux de McElroy *et al.*, 1989 ; Neff, 1979). Cette dernière source est tout à fait naturelle et ne représente qu'un apport marginal en HAP dans l'environnement. Les pollutions d'origine pétrogénique peuvent survenir naturellement lors de fuites de réserves naturelles de pétrole. Par ailleurs, les opérations de dégazage des bateaux ainsi que le déversement accidentel de pétrole lors de son exploitation ou de son transport peuvent contribuer à l'apport de HAP de source pétrogénique dans l'environnement. Ce type de contaminations, bien que ponctuelles, impactent durablement l'environnement comme l'ont démontré les différents épisodes de marées noires survenues au cours du XX<sup>ème</sup> et XXI<sup>ème</sup> siècle (l'Exxon Valdez en 1989 en Alaska, l'Erika en 1999 en Bretagne et le Prestige en 2002 au large du Portugal). Enfin, la dernière source et la plus importante actuellement concerne les HAP pyrolytiques. Les sources naturelles sont les feux de forêts ou l'activité volcanique. Cependant, de nos jours, les apports en HAP de cette origine sont principalement anthropiques par l'intermédiaire de l'utilisation du charbon, du bois de chauffe, de l'essence ou du gaz comme source d'énergie, des incinérateurs, des carburants utilisés dans les moyens de transports, de la production industrielle. Enfin, le dépôt de particules atmosphériques chargées en HAP contribue à la dispersion des HAP dans l'environnement (INERIS, 2006).

Selon les processus ayant mené à leur formation, les profils moléculaires des mélanges de HAP sont différents. Les HAP pétrogéniques sont généralement de faible poids moléculaire et plus fréquemment substitués par des groupements alkylés, soufrés ou azotés. A l'inverse, les mélanges d'origine pyrolytique sont majoritairement composés de HAP parents (non-substitués) de haut poids moléculaire (Vicquelin, 2011 ; d'après les travaux de McElroy *et al.*, 1989 ; Blumer, 1976). Un certain nombre d'indices moléculaires ont été développés afin de pouvoir identifier la source principale d'une contamination en HAP dans les échantillons environnementaux. Le **Tableau 1.4** synthétise les valeurs seuils de certains d'entre eux selon la revue de Yunker *et al.* (2002).

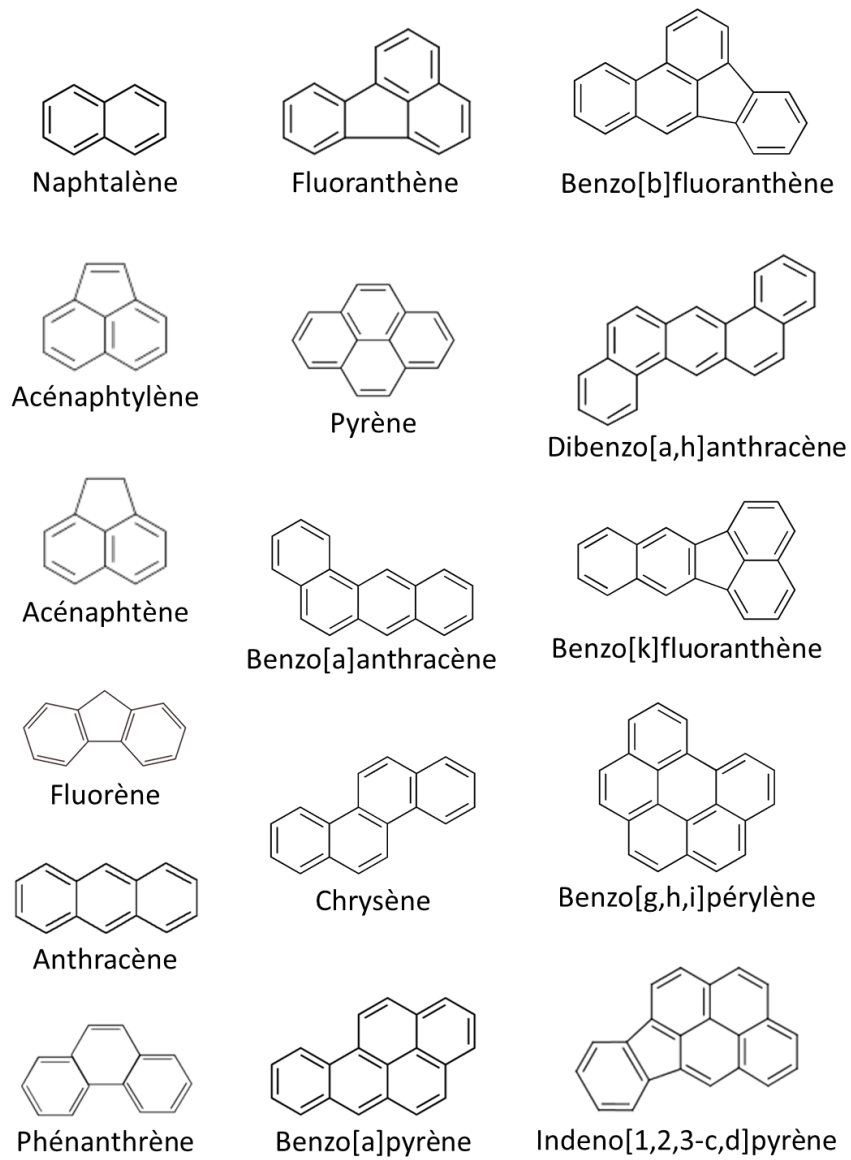


Figure 1.12. Structure chimique des 16 HAP prioritaires de l'US-EPA.

**Tableau 1.4. . Indices moléculaires et valeurs seuils visant à identifier la source des apports en HAP dans des matrices environnementales d'après la revue de Yunker et al. (2002)**

Origine	Indices moléculaires					
	An/(An + Phe)	Fluo/(Fluo + Pyr)	B[a]A/Chrys	IP/(IP + BPe)	CO/(CO + C1) [Phe et An]	CO/(CO + C1) [Fluo et Pyr]
Pétrogénique	< 0,1	< 0,5	< 0,2	< 0,2	< 0,5	< 0,5
Pyrolytique	> 0,1	> 0,5 (Fioul 0,4 – 0,5)	> 0,35	> 0,5 (Fioul 0,2 – 0,5)	Charbon et bois : > 0,5	> 0,5

An : Anthracène ; Phe : Phénanthrène ; Fluo : Fluoranthène ; Pyr : Pyrène ; B[a]A : Benzo[a]anthracène ; Chrys : Chrysène ; IP : Indéno[1,2,3-c,d]pyrène ; BPe : Benzo[g,h,i]pérylène ; CO : HAP parent (non-substitué) ; C1 : HAP mono-alkylé.

#### 4.2.2. Accumulation dans les sédiments et biodisponibilité

La dispersion dans l'environnement aquatique, la biodisponibilité et donc la bioaccumulation des HAP (ainsi que leurs effets chez les organismes comme nous le verrons plus tard) sont fortement conditionnées par leur structure chimique et leur masse moléculaire. Les HAP ont un caractère lipophile et sont par conséquent peu solubles. La solubilité de ces composés peut être appréhendée par leur coefficient de partage *n*-octanol-eau ( $K_{ow}$ ), propre à chaque composé. Ce coefficient traduit l'affinité des HAP pour la fraction lipidique, et donc leur hydrophobicité : plus le  $K_{ow}$  est élevé, plus le composé est hydrophobe et inversement. De manière générale, ce coefficient est positivement corrélé à la masse moléculaire du HAP considéré.

Ainsi, les HAP de faible poids moléculaire, caractéristiques d'un apport pétrogénique, auront une plus forte propension à se retrouver dans la phase dissoute en comparaison de leurs congénères de haut poids moléculaire. Ces derniers, plutôt d'origine pyrolytique, seront préférentiellement fixés aux particules en suspension (Cailleaud *et al.*, 2007). La mobilité et la disponibilité des HAP dépendent également de la source qui les a générés. Cependant, selon Cailleaud *et al.* (2007), entre 81 % et 99 % des HAP présents dans la colonne d'eau sont liés à la phase particulaire. La répartition entre la phase dissoute et particulaire (ou sédimentaire) est définie par le coefficient de partage entre le sédiment et l'eau ( $K_d$ ), lui-même positivement corrélé à la valeur de  $K_{ow}$ . Comme c'est le cas pour les métaux, les HAP ont également une forte affinité pour la matière organique ce qui accentue l'accumulation de ces composés dans le sédiment. De plus, en raison de leur structure chimique aromatique et planaire, il est supposé que les HAP puissent pénétrer profondément dans les espaces intermoléculaires, ce qui réduirait leur potentiel de désorption (Dupree & Ahrens, 2007).

Le coefficient  $K_d$  est normalisé par rapport à la teneur en carbone organique de la matrice sédimentaire pour donner le coefficient de partage  $K_{oc}$ . Sverdrup *et al.* (2002) proposent une synthèse des  $\log K_{ow}$  et de quelques  $\log K_{oc}$  disponibles dans la littérature ainsi qu'une évaluation des  $K_d$  et de certains  $K_{oc}$  pour un sédiment contenant 1,6 % de carbone organique (**Tableau 1.5**).

Comme évoqué précédemment, les HAP sont majoritairement présents dans la phase particulaire de la colonne d'eau. Cependant, certains facteurs peuvent augmenter la solubilité des HAP comme la température, la présence de matière organique dissoute dont les acides humiques pour lesquels ils ont une forte affinité, les phénomènes de photo-oxydation ou la présence de microorganismes dégradant ces composés en une forme plus soluble (Cui *et al.*, 2011 ; Lippold *et al.*, 2008 ; Viamajala *et al.*, 2007 ; Lee, 2003). Par conséquent, tous les paramètres pouvant influencer sur ces processus comme le pH ou la salinité auront également un impact sur la solubilité des HAP.

**Tableau 1.5. Récapitulatif de la solubilité des HAP dans l'eau et des  $\log K_{ow}$ ,  $\log K_{oc}$  et  $K_d$  proposés par Sverdrup *et al.* (2002) pour 16 HAP**

Composé	Solubilité ( $\mu\text{g/L}$ )	Log $K_{ow}$	Log $K_{oc}$	$K_d$
Naphtalène	31 700	3,32	3,11	21
Acénaphthylène	3 930	4,07	3,83	108
Acénaphène	16 100	3,94	3,79	99
Fluorène	1 980	4,23	4,15	226
Anthracène	73	4,50	4,41	542
Phénanthrène	1 290	4,60	4,22	266
Pyrène	135	5,20	4,82	1060
Fluoranthène	260	5,20	4,74	879
Benzo[a]anthracène	14	5,66	5,252	2840
Chrysène	2,0	5,80	5,372	3750
Benzo[b]fluoranthène	1,5	6,40	5,89	12300
Benzo[k]fluoranthène	0,8	6,40	5,89	12300
Pérylène	0,4	6,40	5,89	12300
Benzo[a]pyrène	3,8	6,20	5,71	8280
Indéno[1,2,3-c,d]pyrène	0,19	6,70	6,14	22300
Dibenzo[a,h]anthracène	0,6	6,50	5,97	15000

Au sein des sédiments, les HAP sont globalement stables et rémanents bien qu'ils puissent être dégradés par les microorganismes (Cui *et al.*, 2011) et que leur fixation sur les particules soit réversible. Ces composés sont retrouvés préférentiellement dans la fraction fine des sédiments (Ghosh *et al.*, 2000) cependant cette relation n'est pas systématique (Dupree & Ahrens, 2007). Ghosh *et al.* (2000) ont observé que près des deux tiers de la charge en HAP étaient retenus par les particules dérivées du bois et du charbon qui ne représentent que 5 % de la masse totale du sédiment. Le tiers des HAP restant est retrouvé dans la fraction argileuse et les silts. Selon Belfroid *et al.* (1996), la teneur en matière organique du sédiment est le facteur abiotique le plus important qui conditionne la biodisponibilité des HAP chez les organismes benthiques en la limitant. Cependant, de nombreux autres paramètres abiotiques jouent également un rôle non-négligeable dans la biodisponibilité et l'absorption des HAP incluant la nature de la matière organique (et notamment sa teneur en noir de charbon, molécule organique super-absorbante), la distribution granulométrique des particules, la présence de silt, d'argile, d'huile et de métaux ainsi que le temps de présence du contaminant (Crespo, 2009 ; Dupree & Ahrens, 2007 ; Ten Hulscher *et al.*, 2003 ; Ghosh *et al.*, 2000 ; Belfroid *et al.*, 1996 ; Landrum *et al.*, 1992). Par conséquent, l'ensemble des interactions complexes entre la phase dissoute et particulaire va influencer la biodisponibilité des HAP pour les organismes aquatiques. En dépit d'une apparente faible biodisponibilité des HAP par la phase dissoute en raison notamment de leur hydrophobicité, la contamination des organismes aquatiques par cette classe de composés est bien réelle. Les mécanismes d'absorption et de bioaccumulation des HAP sont détaillés plus loin, dans le *Chapitre 4 paragraphe 1.1*.

Comme nous venons de le voir pour les métaux et les HAP, la biodisponibilité des polluants environnementaux est difficile à évaluer par le biais de techniques analytiques classiques (dosages chimiques) étant donné la complexité des interactions existant entre les différents compartiments aquatiques ainsi que le grand nombre de paramètres influant sur ces processus. Par conséquent, le potentiel toxique des matrices environnementales complexes telles que les sédiments doit être abordé conjointement à l'aide d'analyses chimiques et de tests biologiques. En effet, la toxicité doit être définie comme une réponse biologique induite par l'exposition à un environnement particulier en comparaison d'un état de référence propre au milieu considéré. Cette démarche sous-entend une bonne compréhension des mécanismes biologiques et chimiques mis en jeu afin de pouvoir

extrapoler le « risque environnemental » à partir de l'évaluation du « danger » et des niveaux d'exposition (Chapman *et al.*, 2002).

## 5. LES TESTS EMBRYO-LARVAIRES DE TOXICITE

---

L'utilisation d'organismes vivants dans le cadre de l'évaluation de la toxicité de substances ou de matrices environnementales doit être considérée en tenant compte de deux constats soutenus par différents textes réglementaires : (1) la nécessité de générer de nombreuses données toxicologiques notamment chez le poisson concernant des substances chimiques potentiellement relarguées dans l'environnement afin d'améliorer l'évaluation du risque (dans le cadre de la réglementation REACH par exemple ; UE, 2006) et parallèlement, (2) la préoccupation éthique de réduire de manière conséquente l'utilisation de l'expérimentation animale en développant des tests alternatifs sur cellules ou embryons (Directive 2010/63/UE ; UE, 2010). Pour répondre à la fois à ces deux objectifs au premier abord contradictoire, les tests sur les stades précoces de développement (SPD) de poisson sont proposés comme une alternative potentielle à certaines procédures utilisant des individus adultes ou juvéniles tout en restant pertinents dans le cadre de l'évaluation de la toxicité *in vivo* des substances chimiques à risque.

### 5.1. Intérêt des stades précoces de développement poisson en écotoxicologie : pertinence écologique, sensibilité et acceptabilité éthique

Dans le cadre de la contamination de l'environnement aquatique, les poissons et plus spécifiquement les SPD (embryons et larves) sont particulièrement vulnérables et doivent, par conséquent, faire l'objet d'une attention toute particulière. En effet, les poissons ont une place clé dans la structure des réseaux trophiques aquatiques à la fois en tant que proies et prédateurs de nombreuses espèces aquatiques. Par ailleurs, de nombreuses espèces de poissons représentent une valeur économique et/ou patrimoniale importante et font l'objet d'une pêche intensive qui a conduit à une grave diminution de leur population, en lien direct avec l'activité de pêche ou la pollution du milieu (morue, thon rouge, esturgeons, anguilles...). Par leur position au sein des réseaux trophiques, les poissons sont particulièrement concernés par les phénomènes de bioamplification de certains polluants comme les PCB, les dioxines et d'autres substances bioaccumulables dont la concentration tissulaire augmente avec le niveau trophique. Les espèces benthiques ou se nourrissant d'organismes vivant dans le sédiment sont d'autant plus exposées à la contamination puisqu'elles intègrent à la fois la pollution de la colonne d'eau et celle du compartiment sédimentaire.

De plus, le sédiment sert de substrat de ponte à de nombreuses espèces de poissons. Comme nous l'avons évoqué précédemment, le compartiment sédimentaire agit comme un véritable puits pour certains polluants hydrophobes et métaux. Par conséquent, chez les espèces effectuant tout ou une partie de leur développement en contact direct ou à proximité du sédiment, les stades embryonnaires et larvaires sont particulièrement exposés aux contaminants stockés dans la matrice sédimentaire. Or, les embryons et les larves sont d'une importance capitale pour le renouvellement des populations. Malheureusement, ces SPD sont également très sensibles à une large gamme de contaminants incluant des substances hydrophobes telles que les HAP mais également des métaux



(par exemple : Lizardo-Daudt & Kennedy, 2008 ; Fraysse *et al.*, 2006 ; Vosyliene *et al.*, 2003 ; Carls *et al.*, 1999 ; Heintz *et al.*, 1999). À l'aide des données compilées dans la base de données ECETOC (Centre européen d'écotoxicologie et de toxicologie des substances chimiques), Hutchinson *et al.* (1998) ont évalué, en se basant sur des valeurs de concentrations létales 50 % (CL50), que la sensibilité des embryons est supérieure ou égale à celle des larves pour 99 % des substances considérées. Les stades larvaires s'avèrent également plus sensibles que les juvéniles dans 71 % des cas. Enfin, les stades juvéniles montrent une sensibilité égale ou supérieure aux poissons adultes pour 92 % des substances testées.

Les substances hydrophobes et les éléments métalliques peuvent traverser les membranes de l'œuf et s'accumuler dans les réserves vitellines bien que pour les métaux, ce phénomène soit plus limité (Lacoue-Labarthe *et al.*, 2008 ; Hornung *et al.*, 2007 ; Helmstetter & Alden, 1995a). Un apport en contaminants chez les SPD peut également s'opérer par transfert maternel au moment de la constitution des réserves de l'œuf (Bang *et al.*, 2008 ; Sundberg *et al.*, 2007). Cette accumulation de substances dans le vitellus des embryons conduit potentiellement à une exposition continue de l'organisme jusqu'à la résorption complète des réserves nutritives. L'exposition des SPD de poisson à des polluants environnementaux peut conduire à l'apparition d'une grande variété d'effets létaux et sublétaux qui seront discutés plus en détails dans les chapitres suivants dans le cas des HAP et des métaux. Une partie de ces effets peut avoir des impacts à long-terme voire des conséquences transgénérationnelles chez les individus exposés pouvant alors se répercuter au niveau populationnel (Carreau & Pyle, 2005 ; Vosyliene *et al.*, 2003 ; Heintz *et al.*, 1999 ; White *et al.*, 1999).

Ainsi, la sensibilité particulière des embryons et larves vis-à-vis d'une large gamme de substances, l'impact à long-terme que peuvent avoir ces composés chez les individus exposés ainsi que leur rôle primordial dans la dynamique des populations font des SPD de poisson des organismes modèles tout à fait pertinents dans le cadre de l'évaluation de la toxicité des polluants au sein de l'environnement aquatique.

Enfin, un autre avantage à l'utilisation des SPD de poisson lors des biotests visant à caractériser l'impact toxique de substances ou de pollutions environnementales repose sur le fait que ces stades de développement ne sont pas concernés par les lois de bioéthiques encadrant l'expérimentation animale. La dernière directive européenne en date à ce sujet (Directive 2010/63/CE ; UE, 2010), actée le 22 septembre 2010, vise notamment à (1) remplacer autant que possible les expérimentations animales par des procédures n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants, (2) réduire au maximum le nombre d'individus utilisés dans une expérimentation sans pour autant compromettre les objectifs et la validité de l'étude et (3) améliorer les conditions d'élevage, d'hébergement et de soins ainsi que les méthodes destinées à « éliminer ou réduire toute douleur, souffrance ou angoisse, dommage durable susceptibles d'être infligés aux animaux », selon le principe de remplacement, de réduction et de raffinement. Cependant, pour les organismes vertébrés (hors mammifères), cette directive ne s'applique qu'à partir des stades larvaires autonomes c'est-à-dire lorsque les larves acquièrent la capacité de se nourrir à partir d'une source exogène. Concrètement, pour les poissons, les stades de développement embryonnaires *in ovo* ainsi que les stades larvaires jusqu'à la résorption complète de la vésicule vitelline ne sont pas directement concernés par cette directive. Par ailleurs, ce texte n'exclut pas la possibilité d'octroyer des autorisations ou des dérogations dans le cas où les projets nécessitent l'utilisation d'animaux vivants mais en apportant de solides justifications scientifiques.

## 5.2. Les tests embryo-larvaires poisson normalisés

Au vu de l'intérêt que peuvent représenter les SPD de poisson dans le cadre de l'évaluation de la toxicité d'une substance, l'Organisation du Commerce et du Développement Économique (OCDE) a proposé des lignes directrices concernant les essais de produits chimiques utilisant les stades de développement embryonnaire et larvaire notamment à travers deux textes publiés en 1992 et 1998.

La ligne directrice 210 (LD210 ; OCDE, 1992b) intitulée « Poisson, Essai de Toxicité aux Premiers Stades de la Vie » a pour objectif de déterminer les effets létaux et sublétaux chroniques des produits chimiques dissous dans l'eau sur les premiers stades de développement des espèces étudiées. Selon les préconisations de ces lignes directrices, l'exposition des embryons doit débuter dès que possible après la fécondation des œufs et se poursuivre au moins jusqu'à ce que les individus témoins se nourrissent de façon autonome (fin du stade éleuthéroembryonnaire pendant lequel l'individu se nourrit exclusivement des réserves vitellines de l'œuf). Un minimum de 60 individus doit être également réparti dans au moins deux enceintes par traitement. Les embryons doivent être exposés à une gamme de concentrations globalement homogène sous des conditions de renouvellement du milieu continu ou semi-statique. Il est également conseillé de surveiller régulièrement un certain nombre de paramètres sur toute la durée du test et notamment la teneur en oxygène dissous (au minimum de 60 % de la valeur de saturation en air ou air sat.), la température de l'eau (qui ne doit pas montrer d'écarts de plus de 1,5 °C entre les différentes enceintes expérimentales), la concentration du composé testé (maintenue dans un intervalle de  $\pm 20$  % autour des valeurs moyennes mesurées) et le taux de survie des œufs fécondés du groupe témoin qui doit être supérieur aux valeurs seuils définies pour chaque espèce préconisée. Par ailleurs, dans le cas où un agent solubilisant doit être employé pour dissoudre le composé étudié, il est nécessaire de démontrer que le solvant n'induit aucun effet significatif léthal ou sublétal chez les SPD de l'espèce de poisson utilisée à l'aide d'un groupe témoin exposé au solvant seul. Au besoin, la nourriture doit être apportée *ad libitum* de manière adaptée à chaque stade de développement tout en minimisant les surplus.

Une liste de 7 critères visant à caractériser la toxicité de la substance est proposée bien que tous les marqueurs ne soient pas obligatoirement et systématiquement suivis :

- ✓ La mortalité cumulée
- ✓ Le nombre de poissons sains à la fin de l'essai
- ✓ Le temps de début et de fin de l'éclosion
- ✓ Le nombre de larves écloses chaque jour
- ✓ La longueur et le poids des animaux survivants
- ✓ Le nombre de larves déformées
- ✓ Le nombre de poissons présentant un comportement anormal

Les résultats pour chaque paramètre et condition doivent être traités statistiquement par comparaison au groupe témoin. Il est également conseillé de déterminer la concentration sans effet observé (CSEO ou NOEC pour « no observed effect concentration »), la concentration minimale avec effet observé (CMEO ou LOEC pour « lowest observed effect concentration ») à  $p = 0,05$  selon l'analyse statistique effectuée pour chacune des réponses étudiées ainsi que si possible les courbes

dose-réponses disponibles. La liste des espèces recommandées pour l'application de ces tests sont, en eau douce, la truite arc-en-ciel (*Onchorhynchus mykiss*), le tête-de-boule (*Pimephales promelas*), le poisson zèbre (*Danio rerio*) et le medaka japonais (*Oryzias latipes*) ainsi que le cyprinodon (*Cyprinodon variegatus*) en eau salée.

Globalement, la ligne directrice 212 (LD212 ; OCDE, 1998) intitulée « Poisson, essai de toxicité à court terme aux stades de l'embryon et de l'alevin » reprend les grandes lignes de la LD210 en proposant une adaptation de celle-ci à l'évaluation de la toxicité à court terme de substances chimiques dissoutes. Dans cette norme, la période d'exposition est limitée au stade éléuthéroembryonnaire et le test vise principalement à déterminer les effets létaux et, dans une moindre mesure, sublétaux induits par les produits chimiques. Le texte souligne cependant un aspect intéressant d'un point de vue (éco)toxicologique en insistant sur le fait que « seuls les essais couvrant tous les stades de la vie du poisson sont généralement susceptibles de donner une estimation précise de la toxicité chronique de produits chimiques pour les poissons, et que toute limitation de l'exposition écartant tel ou tel stade de la vie risque de diminuer la sensibilité et donc de donner lieu à une sous-estimation de la toxicité chronique ». La directive poursuit en mentionnant que, par conséquent, cet essai à court terme devrait probablement être moins sensible que celui préconisé par la LD210 notamment dans le cas de substances fortement lipophiles ( $\log K_{ow} > 4$ ) et les composés possédant un mode d'action toxique particulier.

Enfin, en mai 2006, l'OCDE soumet une proposition de ligne directrice intitulée « Draft proposal for a new guideline – Fish Embryo Toxicity (FET) Test » visant à définir les effets létaux des produits chimiques chez les stades embryonnaires poissons et donc de constituer une alternative aux tests de toxicité aiguë utilisant les poissons adultes et juvéniles comme proposé dans la LD203 (OCDE, 1992a). Le test FET a principalement été développé sur le modèle *D. rerio* selon les travaux de Braunbeck *et al.* (2005) mais peut être adapté à d'autres espèces comme le Medaka japonais et le tête-de-boule. Ce texte propose une adaptation des lignes directrices mentionnées précédemment à l'utilisation de microplaques 24 puits comme enceinte d'exposition avec un renouvellement semi-statique, minimisant ainsi le nombre d'organismes utilisés par condition à 20. Les embryons de poisson zèbre sont exposés à la substance dissoute testée dès leur fécondation, comme pour les autres lignes directrices, et cette exposition se poursuit pendant 48 h (durée du développement embryonnaire du *D. rerio* jusqu'à l'éclosion). Dans le cas où la substance a ou est suspectée d'avoir des effets retardés, la période d'exposition peut être étendue jusqu'à la fin du stade éléuthéroembryonnaire, soit 2 j post-éclosion pour le *D. rerio* (et 3 j post-éclosion pour le Medaka japonais). Seuls des paramètres de toxicité aiguë sont observés après 24 h et 48 h d'exposition, comprenant (1) la coagulation des œufs fécondés à partir de 4 h pf (post-fécondation) ; (2) l'absence de formation des somites à partir de 16 h pf ; (3) l'absence du détachement de la queue du sac vitellin à partir de 24 h pf ; (4) l'absence de battements cardiaques à partir de 36 h pf.

Ce test FET est destiné à mesurer la toxicité aiguë des substances chimiques chez le poisson en général. Cependant, la proposition met en garde sur le fait qu'il ne semble pas adapté à l'évaluation du potentiel toxique des composés fortement lipophiles, volatiles ou peu stables, pour lesquels l'application d'une autre stratégie est recommandée (par exemple dans la LD203 ; OCDE, 1992a). La [Figure 1.13](#) récapitule les différents tests embryo-larvaires normalisés présentés dans cette partie ainsi que les stades de développement concernés selon le schéma proposé par Embry *et al.* (2010).

### 5.3. Applications et perspectives des SPD de poisson pour l'évaluation du risque environnemental et la recherche scientifique

Les tests de toxicité utilisant les SPD de poisson ont, depuis leur normalisation, largement été utilisés pour évaluer la toxicité de nombreuses substances chimiques principalement hydrosolubles comme recommandé par l'OCDE (OCDE, 2006, 1998, 1992b). Quelques modifications mineures ont été apportées, notamment en ajoutant l'observation de paramètres sublétaux décrits par la LD210 ou d'autres tels que la mesure de l'activité cardiaque. Lammer *et al.* (2009) proposent une synthèse des résultats obtenus avec les tests FET (parfois étendus au stade éléuthéroembryonnaire) sur près de 150 substances dont la toxicité a été évaluée chez cinq espèces différentes recommandées par l'OCDE (1992a) comprenant le poisson zèbre, le tête-de-boule, le Medaka japonais, la truite arc-en-ciel et le poisson-chat africain (*Clarias gariepinus*). De plus, les auteurs proposent une comparaison des données obtenues sur 81 de ces composés avec les résultats issus du test « classique » de toxicité aiguë de la LD203 effectué sur les stades adultes ou juvéniles. L'étude met en évidence une corrélation significative entre les CL50 obtenues chez les SPD de poisson et celles issues des individus adultes ou juvéniles, selon l'équation suivante :

$$\text{Log}(CL50_{\text{poisson}}) = 1,07 \times \text{Log}(CL50_{\text{FET}}) - 0,35 ; \text{avec } r = 0,89 \text{ et } p < 0,0001$$

La pente de l'équation proche de 1 ainsi que son ordonnée à l'origine avoisinant 0 indiquent une grande similarité de la toxicité des composés évaluée à l'aide des SPD ou des stades plus matures chez le poisson. Une relation similaire (pente et ordonnée à l'origine proches de 0 et 1 respectivement) est également rapportée entre les embryons et les éléuthéroembryons avec une forte corrélation ( $r^2 = 0,96$ ) suggérant une sensibilité identique des deux stades de développement, à l'exception de quelques substances pour lesquelles les larves nouvellement écloses s'avèrent plus sensibles que les embryons *in ovo* (Lammer *et al.*, 2009). De telles observations ont déjà été rapportées et semblent concerner plus particulièrement les métaux et les composés fortement hydrophobes tels que les HAP et les PCB (Embry *et al.*, 2010). Enfin, la comparaison des réponses toxiques inter-espèces démontre également qu'une bonne prévision de la toxicité globale des substances chez le poisson peut être obtenue à l'aide d'espèces modèles comme celles préconisées par l'OCDE (Lammer *et al.*, 2009).

L'ensemble de ces observations semble donc globalement approuver l'utilisation des tests FET comme une alternative valable au test de toxicité aiguë « classique » à la fois dans un cadre réglementaire, scientifique et pour l'analyse du risque environnemental (Lammer *et al.*, 2009). De plus, les tests FET présentent plusieurs avantages techniques comprenant une quantité restreinte de substance chimique utilisée, des durées d'exposition courtes, la non-nécessité de maintenir les organismes durant une phase de croissance avant leur utilisation au cours des tests (seul le maintien d'un stock de géniteurs est nécessaire), la réduction de la taille des enceintes d'exposition, la maintenance aisée des embryons... L'ensemble de ces points devrait conduire à une réduction des coûts d'expérimentation ce qui *in fine* devrait encourager la génération de données toxicologiques comme recommandé par la réglementation REACH (UE, 2006). Enfin, l'ajout de marqueurs sublétaux lors des tests FET peut permettre d'améliorer la compréhension des mécanismes de toxicité

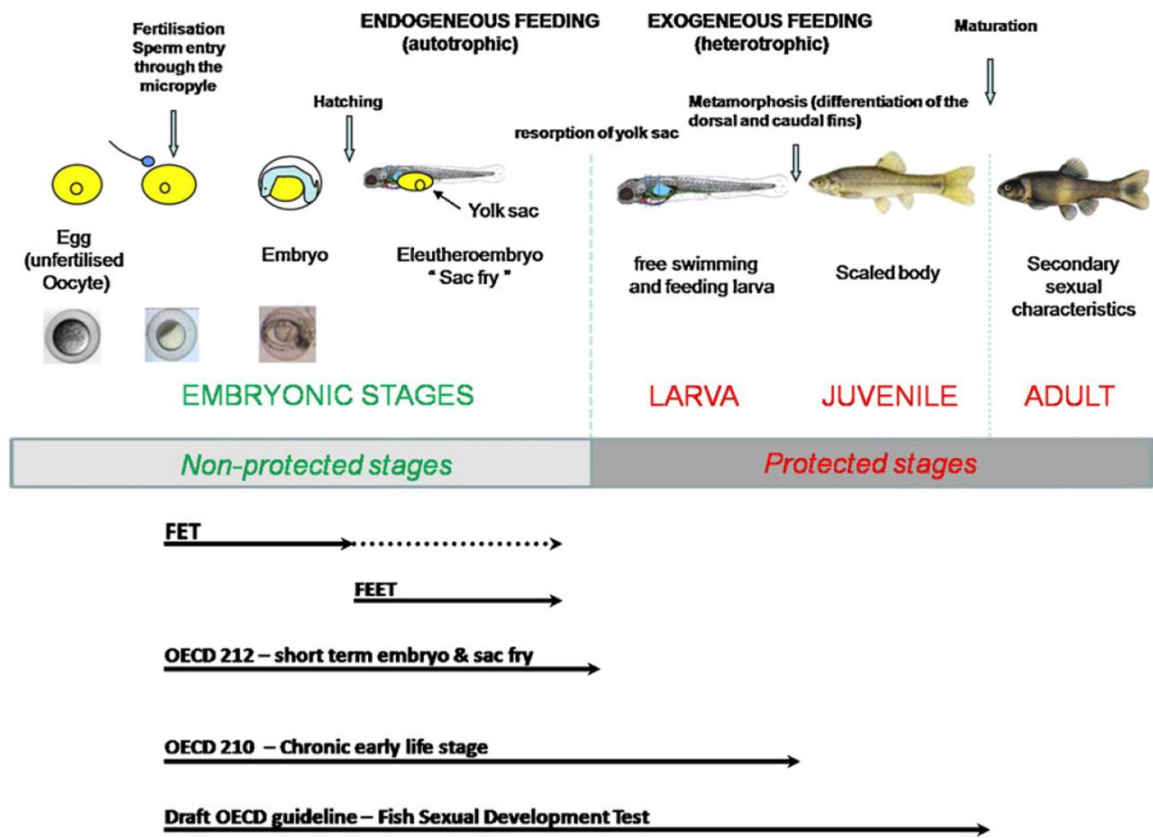


Figure 1.13. Stades de développement, durées des tests normalisés poissons et statuts de protection, selon Embry et al. (2010)

chronique et de tératogénicité (Nagel, 2002) faisant alors de ce test un outil précieux dans le cadre de recherches en toxicologie.

Cependant, Embry *et al.* (2010) nuancent quelque peu la validation définitive des tests FET en remplacement complet des tests de la LD203. En vue d'améliorer la performance de ces tests, les auteurs préconisent notamment (1) d'étendre la durée d'exposition des tests au moins au stade éléuthéroembryonnaire ; (2) d'ajouter d'autres paramètres au test FET aigu afin d'améliorer l'évaluation de la toxicité chronique : les auteurs encouragent notamment l'utilisation de l'analyse de l'expression génique comme outil précoce de mise en évidence d'effets plus tardifs ; (3) d'intégrer les tests FET à des stratégies globales d'évaluation du danger et du risque.

D'un point de vue environnemental, le test FET proposé par l'OCDE (2006) a déjà été adapté et standardisé pour la détermination de la toxicité aiguë des eaux usées par l'Organisation Internationale de la Standardisation (ISO, 2007). Cependant, comme évoqué précédemment, ces tests bien que pertinents dans le cas de l'évaluation de la toxicité de masses d'eau et de composés hydrosolubles, restent peu applicables à des substances fortement hydrophobes en raison de leur faible solubilité. Ce problème peut être contourné par l'ajout de solvants organiques visant à solubiliser les composés comme le DMSO (diméthylsulfoxyde). La question de la pertinence écologique se pose alors étant donné que le solvant va, par définition, modifier la biodisponibilité des composés et augmenter leur capacité à traverser les membranes biologiques. De même, ces tests ne permettent pas d'évaluer la toxicité des sédiments ou des matières en suspension contaminées à moins que les contaminants ne soient extraits au préalable avant d'être ajoutés sous forme dissoute dans le milieu aqueux d'exposition. Une fois encore la biodisponibilité naturelle des contaminants est modifiée et, de plus, seule une partie des polluants présents dans la matrice initiale est prise en compte, en fonction de la technique d'extraction employée. Cette démarche est donc susceptible d'induire un biais dans l'évaluation de la toxicité des sédiments (Kosmehl *et al.*, 2007 ; Burton, 1991).

Très récemment, le test embryo-larvaire utilisant le *D. rerio* a été adapté par une équipe allemande à l'évaluation de la toxicité de sédiments naturels (Kosmehl *et al.*, 2008 ; Kosmehl *et al.*, 2007 ; Kosmehl *et al.*, 2006 ; Hallare *et al.*, 2005a ; Hollert *et al.*, 2003). Selon les auteurs et les résultats rapportés dans ces études, ce type d'exposition « réaliste » par sédiment contact s'avère très prometteuse, offrant un outil pratique et sensible pour l'évaluation globale de la fraction biodisponible des contaminants adsorbés à la matrice sédimentaire. Au vu de l'intérêt que présente cette approche, nous avons choisi de l'appliquer à l'évaluation de la toxicité, dans un premier temps, de substances pures artificiellement ajoutées à une matrice de référence, puis dans un second temps, à l'évaluation de sédiments contaminés provenant des deux écosystèmes étudiés. Les effets toxiques induits par ces différentes matrices sédimentaires seront évalués chez une autre espèce piscicole modèle, le Medaka japonais également recommandé par l'OCDE et présenté dans le paragraphe suivant.

## 5.4. Le modèle biologique Medaka japonais (*Oryzias latipes*)

### 5.4.1. Généralités – classification et données écologiques

Le Medaka japonais (*Oryzias latipes*) est décrit pour la première fois par Temminck et Schelgel en 1846. Selon la classification présentée par ITIS (Integrated Taxonomic Information System), ce poisson appartient à la classe des Actinoptérygiens regroupant les poissons épineux, à nageoires

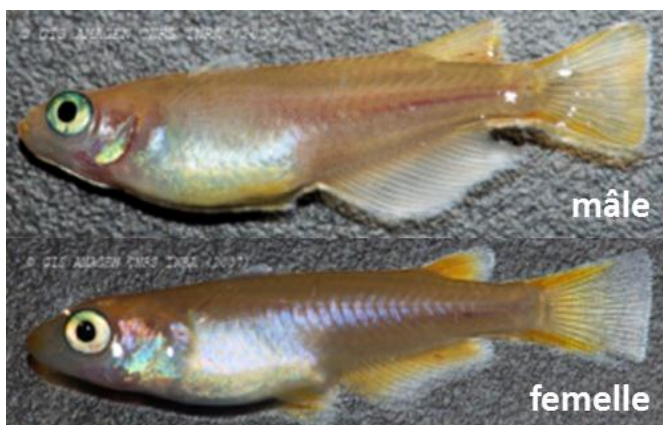
rayonnées et à l'ordre des Béloniformes parmi lesquels on retrouve les anguilles de mer et les orphies. Initialement rattachés à l'ordre des Cyprinodontiformes, ils en sont finalement déclassés en raison de caractéristiques particulières comme une mâchoire supérieure fixe ou nonprotrusible. Au sein de cet ordre, les Medakas appartiennent à la famille des Adrianichthyidae des poissons de rizières et au genre *Oryzias*, seul représentant de la sous-famille des Oryziinae. Le genre comprendrait près d'une vingtaine d'espèces différentes (ITIS, dernière mise à jour en 2004). La [Figure 1.14](#) présente des photographies d'individus mâle et femelle de l'espèce *O. latipes* (GIS-AMAGEN).

Le Medaka japonais est originaire d'Asie du sud, principalement en Corée, au Japon et en Chine. Il est fréquemment rencontré dans les rizières des zones côtières, ce qui lui vaut le surnom de « Japanese ricefish ». Les espèces du genre *Oryzias* vivent principalement en eau douce, bien que le Madaka japonais investisse également des eaux saumâtres et même des bâches (nappe d'eau accumulée dans une dépression après le passage de la marée) de certaines plages de Corée ou du Japon (Yamamoto, 1975) ; cette espèce peut donc être qualifiée d'euryhaline. Par ailleurs, le Medaka est également eurytherme, c'est-à-dire capable de résister à une large gamme de températures, comme cela peut se produire dans la région de Tokyo où la température chute jusqu'à 0 °C en hiver et atteint près de 40 °C en été (Shima & Mitani, 2004). Sa température optimale se situe néanmoins entre 25 °C et 28 °C. Omnivore, ce poisson n'a pas de mal à trouver sa nourriture dans les eaux peu profondes où il vit ; son bol alimentaire peut être constitué de phytoplancton, zooplancton, de débris végétaux ou de petits poissons. Son comportement placide le rend adapté à la vie en communauté avec ses congénères jusqu'à une densité de 2 à 3 individus/L (GIS-AMAGEN). Il atteint une taille de 3 à 4 cm de long à l'âge adulte (Wittbrodt *et al.*, 2002). Le dimorphisme sexuel est évident, comme le montre la [Figure 1.14](#), principalement visible au niveau des nageoires anales et dorsales.

La période naturelle de reproduction du Medaka japonais s'étend de la mi-avril à la fin du mois de septembre au Japon (Iwamatsu, 2004). La ponte a lieu dans les deux heures suivant le lever du jour et est stimulée par la prise de nourriture. La fraie, au cours de laquelle le mâle féconde les ovocytes, est rapide et précédée de manœuvres d'approches sexuelles caractéristiques. La femelle peut produire une trentaine d'œufs quotidiennement qui restent accrochés sous son ventre sous la forme d'une grappe et reliés entre eux par des filaments collants jusqu'à ce que la femelle s'en sépare sous l'action de la nage et du contact avec des plantes aquatiques (Iwamatsu, 2004 ; Yamamoto, 1975). En conditions de laboratoire la ponte peut être stimulée tout au long de l'année sous un contrôle strict de la photopériode, de la température et des apports en nourriture. Par ailleurs, la maturité sexuelle peut être atteinte dans les 2 à 4 mois suivants l'éclosion en conditions d'élevage optimales (Shima & Mitani, 2004).

#### 5.4.2. Les grandes étapes du développement embryonnaire

Le développement embryonnaire *in ovo* du Medaka est relativement rapide et dure une dizaine de jours à 26 °C. Dès l'éclosion, les larves sont capables de se déplacer en nageant et la prise de nourriture exogène débute environ 3 jours après la sortie de l'œuf. Le stade juvénile s'étend pendant sur environ 2 mois et comme mentionné précédemment, la maturité sexuelle est atteinte entre 2 à 4 mois suivant l'éclosion. Cependant, le développement du Medaka est fortement influencé par la température et peut donc être aisément accéléré ou ralenti en jouant sur ce paramètre (Yamamoto, 1975).



**Figure 1.14. Photographies de Medakas *Oryzias latipes* mâle (en haut) et femelle (en bas)**  
Source : site internet du GIS-AMAGEN (<http://amagen.inaf.cnrs-gif.fr>)



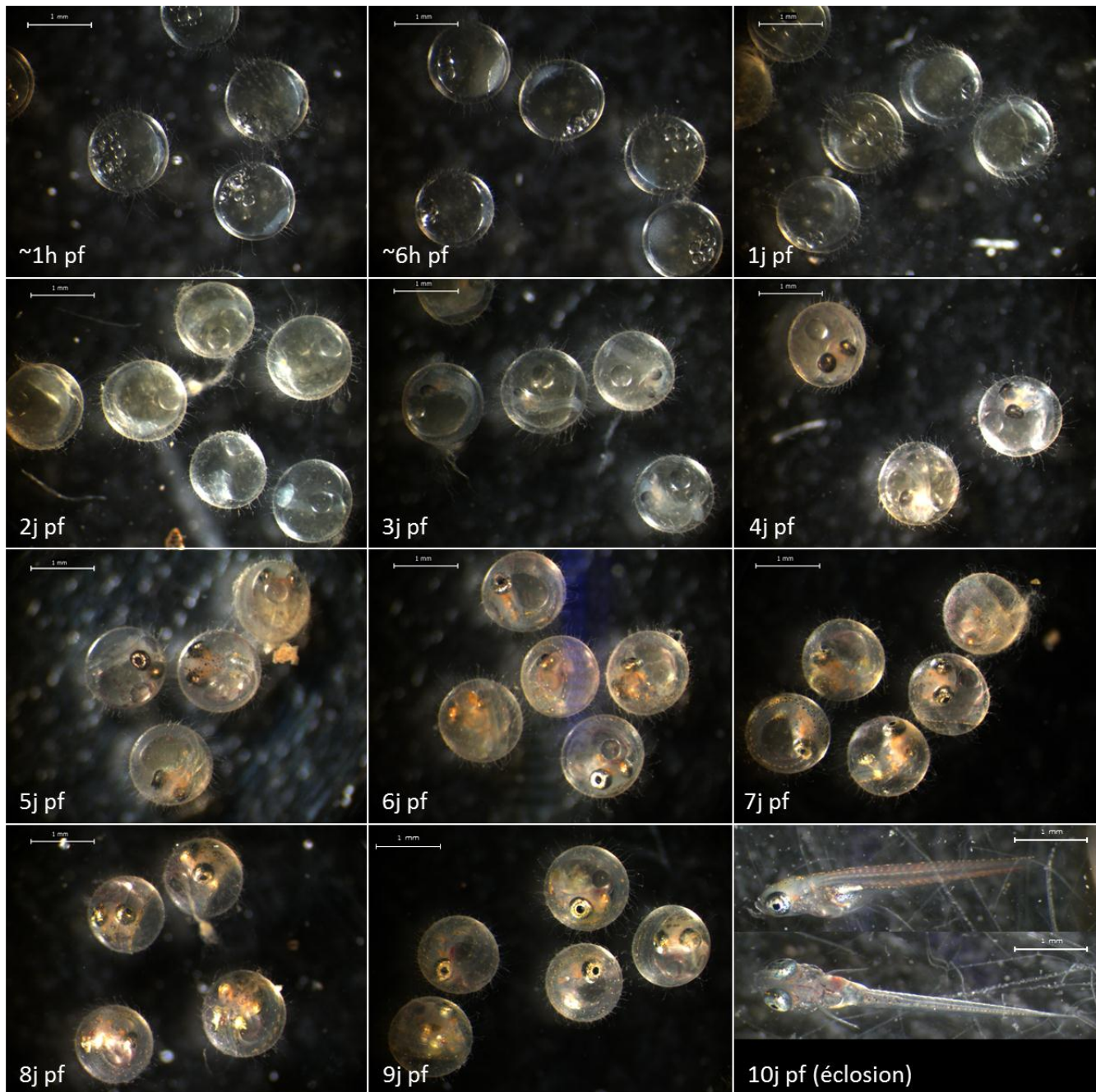
Grâce à la transparence de son chorion, le développement embryonnaire du Medaka a été décrit dans plusieurs travaux dont celui proposé par Iwamatsu (2004) qui distingue 39 stades de développement *in ovo* et 4 stades post-éclosion. Par la suite, Gonzalez-Doncel *et al.* (2005) publie un « guide de référence synthétique » reprenant ces différentes étapes du développement. La description des principales étapes du développement qui suit est principalement basée sur les observations faites dans ces deux ouvrages et les temps de développement, mentionnés en heures ou jours pf, pour une incubation à 26 °C.

Dans les 3 min qui suivent la fécondation, l'œuf d'environ 1 mm de diamètre, est activé (stade 1), étape caractérisée par la formation de l'espace périvitellin séparant la sphère vitelline de l'enveloppe externe du chorion, et environ une heure plus tard, la première division cellulaire a lieu (stade 3). Le début du stade morula (stade 8) est atteint au bout de 4 h et 5 min pf. L'embryon atteint le stade blastula (stade 10) après 6 h 30 min pf, le stade gastrula (stade 13) au bout de 13 h pf et enfin le stade neurula (stade 17) 1 j et 1 h pf marquant le début de la formation de la tête. Environ 2 h 30 plus tard, les premiers somites sont formés (stade 19). Une ébauche du cœur (cœur tubulaire) est visible au bout d'1 j et 14 h (stade 22, 9 somites) et les premiers battements cardiaques débutent environ 6 h plus tard (stade 24, 16 somites). Le rudiment de la future nageoire pectorale est formé environ 2 j et 10 h pf (stade 27, 24 somites). 24 h plus tard, au stade 30, apparaissent les premiers vaisseaux sanguins. La formation des somites s'achève 4 j et 5 h pf (stade 32). L'organogénèse du cœur est achevée au jour 6 pf (stade 36) et 24 h plus tard, c'est au tour de la cavité péricardique d'être mise en place (stade 37). Au moment de l'éclosion, au jour 9 pf environ (stade 39), les organes principaux des larves sont déjà formés et la suite du développement consistera principalement en une phase de grossissement, de développement et de différenciation des nageoires, la formation des dents et des écailles jusqu'à l'apparition des caractères sexuels secondaires (stade 44) marquant le début de la maturité sexuelle. La [Figure 1.15](#) propose quelques illustrations du développement du Medaka japonais jour par jour dans les conditions d'élevage appliquées au cours de ce travail et détaillées dans le *Chapitre 2, partie 5*.

### 5.4.3. Utilisation du Medaka japonais en tant qu'organisme modèle

Les capacités d'adaptation du Medaka à des conditions environnementales variées (température, salinité, pH...) ainsi que la relative simplicité de son élevage et du contrôle de la reproduction tout au long de l'année en laboratoire, couplés à un faible temps de génération, font de cet organisme un modèle d'étude couramment utilisé, notamment en Asie, depuis plus de cent ans (Yamamoto, 1975). En effet, cette espèce a été largement employée dans différents domaines comme par exemple, la mutagénèse, la génétique du développement, l'embryogénèse (notamment le développement de l'œil et l'étude des cellules souches), la cancérogénèse, la toxicologie, l'étude de la reproduction... (voir Shima & Mitani, 2004 ; Wittbrodt *et al.*, 2002 ; Yamamoto, 1975 pour revues).

Le séquençage du génome du Medaka, la taille réduite de ce génome (estimée entre 650 et 1 000 millions de paires de bases soit deux fois moins que le *D. rerio*) et l'existence de nombreux mutants spontanés chez cette espèce ont par exemple permis l'identification de gènes impliqués dans le phénotype particulier des mutants et l'élaboration de carte de liaison génétique faisant ainsi un peu plus avancer la compréhension des mécanismes sous-jacents (Wittbrodt *et al.*, 2002). En



**Figure 1.15. Photographies de Medakas *Oryzias latipes* durant les différentes phases de leur développement embryonnaire à 26 °C**

*Les embryons sont issus de notre élevage et maintenus selon les conditions décrites dans le Chapitre 2, partie 5.*

génétique, les utilisations de ce modèle sont nombreuses allant de l'étude des mutations spontanées ou induites à la création de lignées transgéniques spécifiques en passant par l'étude du déterminisme sexuel (Shima & Mitani, 2004 ; Wittbrodt *et al.*, 2002). En effet, le déterminisme génétique du sexe chez le Medaka japonais est, comme celui des mammifère, basé sur un système de détermination sexuelle XX, XY chromosomique (Yamamoto, 1975). Ceci permet d'étudier l'importance de ces gènes et leur conservation au cours de l'évolution (Wittbrodt *et al.*, 2002). Cette démarche comparative est d'ailleurs fortement encouragée, notamment entre *O. latipes* et *D. rerio* qui sont suffisamment éloignés d'un point de vue phylogénétique, afin d'améliorer les connaissances et la compréhension du génome. Les deux espèces sont considérées comme complémentaires plutôt que redondantes dans ce type de recherche (Wittbrodt *et al.*, 2002).

De plus, les SPD du Medaka s'avèrent particulièrement sensibles à différents contaminants (par exemple Vicquelin *et al.*, 2011 ; Gonzalez-Doncel *et al.*, 2008 ; Farwell *et al.*, 2006 ; Gonzalez-Doncel *et al.*, 2003a ; Kim & Cooper, 1999) et leur chorion transparent facilite la mise en œuvre d'un certain nombre d'observations non-invasives durant le développement (Gonzalez-Doncel *et al.*, 2005 ; Iwamatsu, 2004 ; Yamamoto, 1975). L'ensemble de ces qualités fait du Medaka japonais une espèce modèle préconisée dans les lignes directives de l'OCDE (1998, 1992a, b) et encourage l'utilisation de ce modèle et notamment des SPD dans le cadre d'études (éco)toxicologiques. L'utilisation de ce modèle permet d'étudier les effets toxiques de polluants de nature variée chez les SPD exposés par différentes voies de contamination comme la phase dissoute (Farwell *et al.*, 2006 ; Gonzalez-Doncel *et al.*, 2003a ; Kim & Cooper, 1999 ; Bentivegna & Piatkowski, 1998 ; Helmstetter & Alden, 1995b) ou l'injection de contaminants directement dans l'œuf pour mimer le transfert maternel (Nassef *et al.*, 2010 ; Hano *et al.*, 2007). Récemment, les SPD de Medaka japonais ont été utilisés pour évaluer les réponses toxiques engendrées par l'exposition à des sédiments contaminés artificiellement par des substances pures ou des mélanges environnementaux de contaminants (Vicquelin *et al.*, 2011 ; Cachot *et al.*, 2007 ; McElroy *et al.*, 2006).



---

*Chapitre 2. BASES  
METHODOLOGIQUES*

---



## Chapitre 2. Bases Méthodologiques

L'enjeu de ce travail de thèse a été de proposer un test embryo-larvaire, utilisant le Medaka japonais (*Oryzias latipes*) comme organisme modèle, permettant d'évaluer la toxicité de matrices sédimentaires dans un premier temps artificiellement contaminées par des polluants modèles puis, dans un second temps, issues directement du milieu naturel. Par la suite, en plus des marqueurs de toxicité majoritairement phénotypiques, le test MELA (Medaka Embryo-Larval Assay) a été enrichi de plusieurs analyses moléculaires afin d'étudier et de mettre en évidence certains mécanismes d'action des polluants testés. Dans ce chapitre, vous sont présentées les différentes techniques d'analyses et méthodes expérimentales qui ont été utilisées au cours de ces travaux.

### 1. PRELEVEMENT ET TRAITEMENT DES SEDIMENTS

Lors de tous les prélèvements de sédiments, seule la couche superficielle oxygène (de quelques millimètres à quelques centimètres de profondeur) a été prélevée. Ce choix permet de certifier que le sédiment prélevé est d'une part, représentatif de l'habitat des organismes benthiques qui vivent à son contact ou enfouis dedans, et d'autre part le résultat d'une sédimentation récente. Dans le cas de prélèvements effectués en zone de marnage, les campagnes ont eu lieu à marée basse afin d'offrir une surface de plusieurs m<sup>2</sup>, suffisante pour les prélèvements et représentative du site sélectionné. La quantité de sédiment nécessaire à l'ensemble des analyses est échantillonnée au cours d'un prélèvement unique sur chaque site. Les sédiments sont prélevés à l'aide d'une cuillère en aluminium lavée et pyrolysée, puis stockés dans des barquettes de même nature pour être ensuite congelés le plus rapidement possible et conservés à -20 °C jusqu'à utilisation et analyse (caractérisation physico-chimique et test embryo-larvaire). Une aliquote de quelques grammes de chaque sédiment est conditionnée séparément dans un tube en polyéthylène pour une analyse des métaux traces et également conservée à -20 °C jusqu'à analyse.

#### 1.1. Sédiments de référence

Au cours de ces travaux de thèse, le sédiment de référence a été utilisé dans un double but : (1) lors des expositions à des substances pures, il sert de matrice d'enrobage pour les contaminations artificielles à des doses prédéfinies ; (2) il est également utilisé comme témoin négatif lors de l'évaluation de la toxicité de sédiments naturels. Deux sédiments de la Région Aquitaine ont été présélectionnés comme matrice de référence potentielle. Un premier sédiment a été prélevé fin décembre 2008 à Cadaujac (Gironde, France) au niveau du petit port de l'Esquillot et un second en mars 2009 en amont du barrage du site de Marcenac (Livinhac-le-Haut, Aveyron, France). Enfin, un troisième sédiment provenant d'une ancienne gravière située à Yville sur Seine (Seine-Maritime, France) et collecté en février 2009, a servi de contrôle négatif lors du choix du sédiment de référence aquitain. En effet, il a été précédemment démontré que ce sédiment d'Yville, faiblement contaminé en métaux traces et composés organiques, ne présentait aucune toxicité et s'avérait être un substrat adéquat pour le développement des embryons de Medaka japonais (Vicquelin, 2011 ; Cachot *et al.*,

2007 ; Cachot *et al.*, 2006). Ces trois sites de prélèvements sont illustrés dans la *Figure 1.11* du *Chapitre 1*.

Chaque sédiment collecté est divisé en deux lots. Le premier lot est conservé sous sa forme brute à -20 °C puisque destiné aux tests sur sédiments natifs. Ces sédiments bruts sont néanmoins tamisés à 1 mm afin d'éliminer la fraction granulométrique la plus grossière qui gênerait le bon contact des embryons avec le substrat. La seconde partie des sédiments est lyophilisée puis légèrement broyée au mortier afin d'homogénéiser la taille des particules et améliorer ainsi la capacité de sorption du sédiment. Ces sédiments, destinés aux expositions sur sédiments artificiellement contaminés, sont ensuite conservés à température ambiante et à l'obscurité dans des bouteilles en verre ambré.

## 1.2. Sédiments natifs testés

Un second volet de ce travail de thèse consistait à évaluer la toxicité de sédiments naturels dit « bruts » ou « natifs ». Pour cela, deux zones d'étude ont été choisies : le continuum Lot-Garonne-Gironde, connu notamment pour sa contamination historique en métaux lourds ; et le Bassin d'Arcachon, zone d'intérêt écologique mais également touristique et ostréicole dont la forte anthropisation de son bassin versant et de la lagune elle-même alimente une contamination non négligeable en composés organiques dont les HAP.

Cinq sites ont été choisis le long du système Lot-Garonne en partant de la source de la contamination métallique dont l'origine est identifiée aux abords de Decazeville (Aveyron, France) : Joanis (sur le Riou-Mort, Viviez, Aveyron, France), Bouillac (à la confluence du Riou-Mort avec le Lot, Aveyron, France), Le Temple (sur le Lot, Lésigne, Le Temple sur Lot, Lot-et-Garonne, France), La Réole (sur la Garonne, Pont du Rouergue, La Réole, Gironde, France) et Bordeaux (sur la Garonne, Parc d'activité des Queyries, Bordeaux, Gironde, France). Les localisations des différents sites de prélèvements ont été présentées sur la *Figure 1.8* du *Chapitre 1*. L'ensemble de ces sédiments a été prélevé en avril 2011.

Concernant les sédiments du Bassin d'Arcachon, nous avons utilisé des sédiments collectés en mars 2009 dans le cadre du Projet ASCOBAR 2008-2009 (Programme « Apports Scientifiques face à la problématique CONchylicole dans le Bassin d'ARcachon » soutenu par la région Aquitaine). Parmi les sites étudiés dans ce projet, nous avons choisi cinq points de prélèvement présentant des niveaux de contamination contrastés en HAP : Grand Banc (platiers intertidaux, zone intra-bassin), Andernos (zone côtière du Bassin nord-est), Les Jacquets (zone côtière du Cap Ferret), Arès (zone côtière du Bassin nord-est) et Bélisaire (zone côtière du Cap Ferret). Les sites sélectionnés sont illustrés dans la *Figure 1.9* du *Chapitre 1*.

De la même manière que les lots de sédiments de référence destinés aux tests sur sédiments natifs, les sédiments prélevés le long du continuum Lot-Garonne-Gironde et dans le Bassin d'Arcachon ont été conservés sous leur forme brute dans des barquettes en aluminium et stockés à -20 °C. Juste avant leur utilisation dans le cadre des tests embryon-larvaires, un tamisage léger à 1 mm a été effectué.



## 2. CARACTERISATION GENERALE DES SEDIMENTS COLLECTES

---

### 2.1. Granulométrie et Carbone organique particulaire

La granulométrie et le carbone organique particulaire (COP) ont été analysés sur les trois sédiments de référence potentiels (Marcenac, Yville et Cadaujac) sous leur forme « brute » et lyophilisée/broyée ainsi que sur l'ensemble des sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon, sous leur forme « brute » uniquement. La distribution de la taille des particules de chaque sédiment a été déterminée par diffractométrie aux rayons X par l'équipe de Michel Cremer (CR-CNRS HDR ; équipe Sédimentologie) du laboratoire EPOC (UMR CNRS 5805). La concentration en carbone organique particulaire des sédiments a été mesurée par spectrométrie infrarouge en utilisant un spectromètre LECO C-S 125, après avoir retiré les carbonates avec une solution d'acide chlorhydrique 2 M selon le protocole détaillé par Etcheber *et al.* (1999). Ces analyses ont été effectuées par l'équipe d'Henri Etcheber (CR-CNRS HDR ; équipe Écologie et Biogéochimie des Systèmes Côtiers) du laboratoire EPOC (UMR CNRS 5805).

### 2.2. Ammonium et Sulfures

L'équipe de Pierre Anschutz (Pr HDR ; équipe Écologie et Biogéochimie des Systèmes Côtiers) du laboratoire EPOC (UMR CNRS 5805) a mesuré le taux d'ammonium et de sulfates dissous dans l'eau interstitielle récupérée des différents sédiments de référence (« bruts » et lyophilisés/broyés) par centrifugation (20 min, 4000 rpm). Une aliquote d'eau interstitielle a été congelée à -20 C pour l'analyse de l'ammonium qui, par la suite, a été analysée par colorimétrie d'après la technique de Strickland et Parsons (1972). Les sulfates dissous ont été dosés sur une seconde aliquote fixée par une solution d'acétate de zinc par une analyse spectrophotométrique après coloration au du bleu de méthylène (Cline, 1969).

Les protocoles de dosage des polluants organiques et métalliques sont décrits plus loin (voir *partie 4* de ce chapitre).

## 3. DOPAGE DES SEDIMENTS

---

La contamination artificielle d'un sédiment, appelée « dopage » ou encore « enrobage », consiste à mettre une matrice sédimentaire non-contaminée (sédiment de référence) en présence de la substance que l'on souhaite étudier. Pour cela, le composé est préalablement dissout dans un solvant adéquat puis mélangé au sédiment pendant environ une heure, ce qui permet à la substance de se fixer sur les particules de sédiment. Le solvant est éliminé ce qui permet d'obtenir *in fine* un sédiment sec artificiellement contaminé. La concentration finale en composé d'intérêt dans le sédiment dépend bien évidemment de la quantité de substance ajoutée dans le solvant mais également du rendement d'enrobage (*i.e.* le pourcentage de composé effectivement fixé sur le sédiment par rapport à la quantité de substance apportée initialement) qui dépend lui-même des propriétés du composé et des caractéristiques physico-chimiques de la matrice sédimentaire

(granulométrie, teneur en matière organique...). L'enrobage est effectué dans les jours précédant le lancement de l'exposition des embryons.

### 3.1. Dopage en substances hydrophobes

L'enrobage en composés hydrophobes a été effectué sur le sédiment de référence, préalablement lyophilisé et broyé, à l'aide d'un évaporateur rotatif (RV10 Basic, VWR®) muni d'un bain chauffant (HB10 basic) dont le principe de fonctionnement est illustré sur la *Figure 2.1*. Dans un premier temps, pour chaque substance hydrophobe étudiée dans cette étude, une solution mère de contamination est confectionnée en solubilisant une quantité donnée de composé testé dans de l'isooctane (moins volatil, plus stable que le dichlorométhane, ce solvant permet une meilleure précision lors de la confection des solutions de contamination). C'est par dilution de cette solution mère dans de l'isooctane que seront obtenues les solutions de contamination utilisées au cours de l'enrobage. Les concentrations des solutions de contamination sont déterminées en fonction des concentrations finales souhaitées dans le sédiment et de la quantité de sédiment à enrober. La masse nécessaire de sédiment lyophilisé et broyé est placée dans un ballon d'enrobage en verre 250 mL, dans lequel on ajoute également 1 ou 2 mL de solution de contamination (selon la quantité de sédiment) et environ 2 mL de dichlorométhane (DCM, solvant d'enrobage) par gramme de sédiment. Le ballon d'enrobage ainsi rempli et relié au condenseur est alors plongé au 2/3 de son volume dans le bain chauffant dont la température est fixée à 45 °C soit quelques degrés au-dessus de la température d'ébullition du dichlorométhane qui est de 40 °C. La vitesse de rotation du ballon d'enrobage est fixée à 70 rpm (changement du sens de rotation toutes les 60 s) afin de permettre une fixation du composé de la manière la plus homogène possible. L'opération se poursuit jusqu'à évaporation totale du solvant soit de 50 min à 70 min selon la quantité de solvant ajoutée. Le sédiment ainsi enrobé est ensuite récupéré dans une coupelle aluminium et placé une nuit sous hotte afin d'éliminer toute trace résiduelle de solvant. Pour finir, le sédiment est aliquoté en fonction des besoins et conservé à l'obscurité dans des flacons en verre ambrés et à température ambiante jusqu'à utilisation. Une aliquote est réservée pour la caractérisation chimique. La confection des solutions de contamination ainsi que les quantités de ces solutions et de sédiment ajoutées au moment de l'enrobage sont suivies gravimétriquement ce qui permet de déterminer précisément les concentrations théoriques attendues dans le sédiment en fin d'enrobage.

### 3.2. Dopage en éléments métalliques

De la même manière que pour les composés hydrophobes, le dopage est effectué sur une matrice sédimentaire de référence lyophilisée et broyée. La solution mère de contamination est obtenue soit en diluant le composé métallique sous forme de sel dans de l'eau Milli-Q soit en utilisant directement un standard analytique à 1 g/L. Comme précédemment, les solutions de contamination sont produites en diluant la solution mère dans de l'eau Milli-Q de façon à obtenir les concentrations finales adéquates. La quantité de sédiment nécessaire au test est placée dans un bécher en verre de 400 mL avec 1 ou 2 mL de solution de contamination (selon la quantité de sédiment) et environ 0,5 mL d'eau Milli-Q par gramme de sédiment. L'ensemble est placé sous agitation magnétique pendant 1 h à température ambiante puis laissé à sédimenter pendant 10-15 min. L'excédent d'eau est alors enlevé et le sédiment est séché durant toute une nuit à température ambiante et à l'obscurité. Les quantités de sédiment nécessaire à l'exposition des



**Figure 2.1. Schéma de fonctionnement de l'évaporateur rotatif**

*Le sédiment de référence, la solution de contamination et le solvant d'enrobage (dichlorométhane) sont placés dans le ballon d'enrobage. Celui-ci est plongé dans le bain chauffant dont la température est fixée à 45 °C (supérieure à la température d'ébullition du dichlorométhane). Le solvant s'évapore puis se recondense au niveau du condenseur dont le serpentin est traversée par de l'eau à 10-12 °C et s'écoule enfin jusqu'au ballon de récupération.*

embryons ainsi que les concentrations sélectionnées pour les tests étant déterminées pour du sédiment sec, une série de pesées avant enrobage (sédiment sec) et en fin de séchage (sédiment humide) permettra par la suite de calculer la masse de sédiment humide correspondant à la quantité de sédiment sec nécessaire au test embryo-larvaire. Enfin, le sédiment dopé est aliquoté selon les besoins, soit directement dans les boîtes de Petri servant à l'exposition des embryons, soit dans des tubes en polypropylène pour la caractérisation chimique. Dans le cas où la quantité de sédiment à enrober est trop importante pour permettre une bonne homogénéisation durant l'enrobage, le dopage a été effectué en deux fois, puis les deux lots de sédiment d'une même condition ont été réunis et soigneusement mélangés avant aliquotage.

## 4. ANALYSE DES CONTAMINANTS DANS LES SEDIMENTS, PHASE AQUEUSE ET LES TISSUS)

---

### 4.1. Dosage des HAP

La procédure d'extraction et d'analyse des HAP totaux (27 composés dosés) dans les différentes matrices (sédiments naturels, phases aqueuses et tissus biologiques) a été effectuée par l'équipe « AQUA » du Laboratoire de Physico- et Toxicochimie (EPOC UMR 5805), sous la direction du DR1 Hélène Budzinski. Le suivi de la contamination en HAP modèles au sein des sédiments dopés a été effectué par mes soins au sein de cette même équipe. Les protocoles de dosage des HAP sont similaires pour les deux démarches dont le principe général est décrit ci-dessous. Par la suite, ces protocoles seront décrits pour les différentes matrices.

Le dosage des HAP par chromatographie en phase gazeuse couplée la spectrométrie de masse (GC-MS) nécessite au préalable une extraction des composés hydrophobes. Les techniques d'extraction utilisées dépendent entre autre de la nature de la matrice étudiée et seront détaillées au cas-par-cas dans les paragraphes suivants. La technique de quantification repose sur le principe d'étalonnage interne : un premier composé est ajouté à l'échantillon à quantifier en quantité connue avant toute phase d'extraction, il est appelé « étalon interne de dosage » (EID) ; un second composé est ajouté, toujours en quantité connue, juste avant dosage ; c'est l'étalon interne de contrôle de récupération (EICR). Les étalons internes sont choisis de manière à ce qu'ils se comportent comme les analytes que l'on souhaite doser, et en particulier lors des différents traitements que l'on fait subir à l'échantillon initial. Ainsi, si les phases d'extraction engendrent une perte en composé à quantifier, celle-ci sera « compensée » par une perte équivalente en EID. Les étalons sont ajoutés en quantité similaire (avec un facteur multiplicatif de  $\pm 10$ ) à la quantité attendue en analyte. Les composés étalons utilisés lors du dosage des HAP dans les différentes matrices d'étude sont des HAP deutérés. Une fois le dosage effectué, il est possible de remonter à la concentration en composé d'intérêt initialement présente dans l'échantillon en utilisant l'aire des pics de réponse obtenus pour l'analyte et l'EID et le coefficient de réponse ( $K_i$ ) EID/analyte. L'étalon EICR permet quant à lui de déterminer le rendement d'extraction (ou efficacité de récupération) en quantifiant la quantité d'EID présent en fin de préparation (à l'aide des aires de réponses de l'EID et de l'EICR ainsi que leur coefficient de réponse) de l'échantillon et en la comparant à celle introduite en début de manipulation. Les différents coefficients de réponse des composés sont calculés à chaque série de dosages grâce à l'injection de solutions standards contenant les différentes molécules (étalons et

analytes) en concentrations connues (solutions  $K_i$ ). De plus, les coefficients  $K_i$  ainsi déterminés sont d'abord testés sur une autre solution standard contenant les mêmes composés dans des teneurs différentes mais toujours connues (solution  $C_i$ ) permettant ainsi de déterminer le « rendement méthode » en comparant les quantités des différents composés étudiés grâce au coefficient  $K_i$  précédemment calculé à la composition réelle de la solution  $C_i$ . De plus, lors de chaque série d'extraction, un blanc protocole est ajouté afin de vérifier l'absence de l'introduction d'une contamination lors de la préparation des échantillons. La teneur mesurée en composé d'intérêt dans ce blanc sera soustraite de la concentration dosée dans les échantillons de la série. Les différentes équations utilisées lors des calculs sont mentionnées ci-dessous :

$$K_{AI,E} = \frac{A_E}{A_{AI}} \times \frac{m_{AI}}{m_E}$$

$$m_{AI} = K_{AI,E} \times \frac{A_{AI}}{A_E} \times m_E$$

$$R(\%) = \frac{m_{dosée}}{m_{introduite}} \times 100$$

$$C_{\mu g/g} = \frac{m_{AI}^{initiale}}{M}$$

$$C_{corr} = \frac{m_{AI\text{échantillon}} - m_{AI\text{Blanc}}}{M}$$

Avec :  $K_{AI,E}$  : coefficient de réponse analyte inconnue (AI)/composé étalon (E)

A : aire de réponse obtenue par dosage GC/MS

$m$  : masse de composé présente en  $\mu\text{g}$

R : rendement en pourcentage

$C_{\mu g/g}$  : concentration de l'échantillon en  $\mu\text{g}$  d'analyte par g de matrice initiale

$m^{initiale}$  : masse d'analyte avant extraction en  $\mu\text{g}$

M : masse de matrice initiale

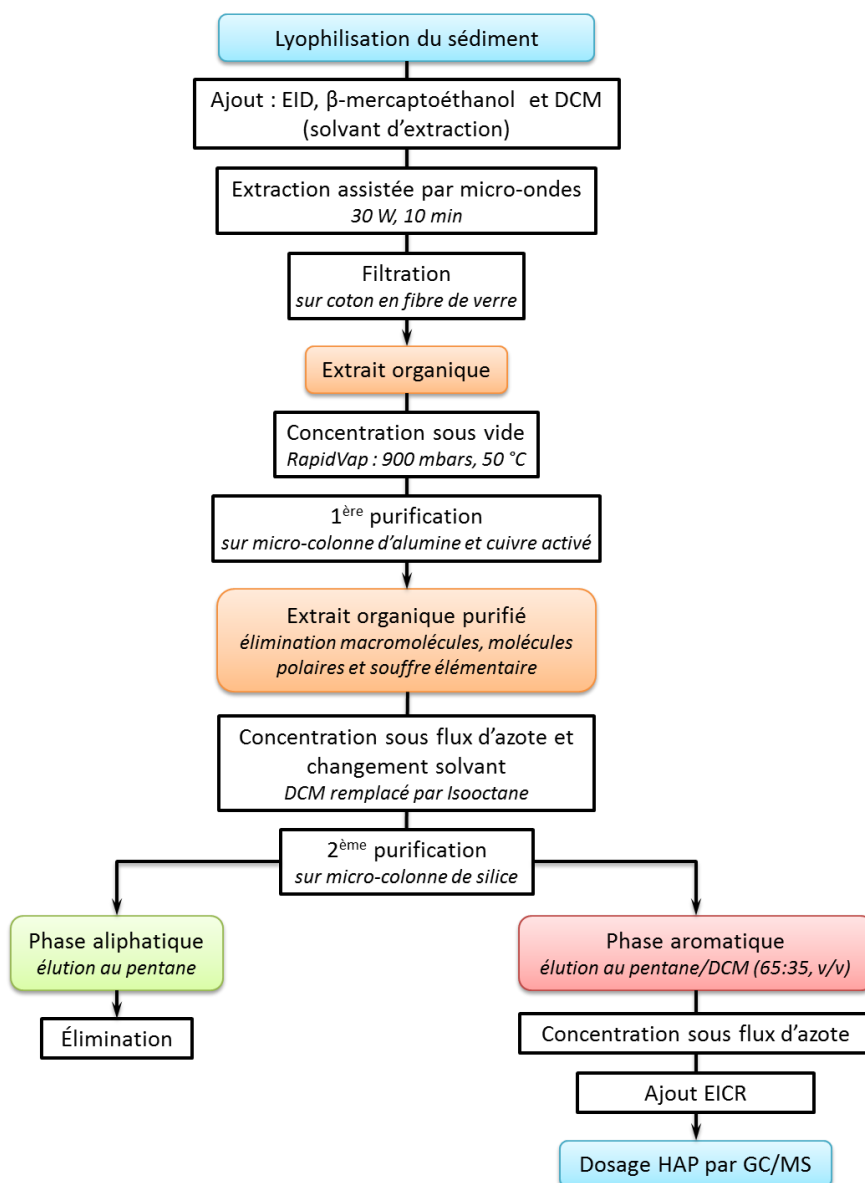
$C_{corr}$  : concentration de l'échantillon corrigée par la valeur du blanc protocole en  $\mu\text{g}$  de l'analyte par g de matrice initiale

#### 4.1.1. Préparation des échantillons et protocole d'extraction

##### 4.1.1.1. Les sédiments

Après lyophilisation, les HAP sont extraits de la matrice sédimentaire par extraction assistée par micro-ondes selon le protocole développé par Letellier *et al.* (1999). Les différents EID et EICR utilisés pour le dosage des différents composés organiques sont présentés dans le **Tableau 2.1**. Le protocole d'extraction des HAP à partir d'une matrice sédimentaire est illustré sur la *Figure 2.2*.

La quantité de matrice extraite a été déterminée en fonction de la teneur attendue en composés hydrophobes et sa charge en matière organique (pouvant créer des interférences lors du dosage). Entre 0,5 g et 1 g de sédiment est pesé puis placé dans un matra en verre dans lequel est ajoutée gravimétriquement la quantité adéquate d'EID. Le tout est mélangé à 30 mL de DCM (dichlorométhane, solvant d'extraction) et 30  $\mu\text{L}$   $\beta$ -mercaptoéthanol (protège le HAP d'une



**Figure 2.2. Protocole d'extraction des HAP assistée par micro-ondes**

Entre 0,5 g et 1 g de sédiment lyophilisé sont extraits sous champs de micro-ondes dans du DCM (dichlorométhane), en présence de β-mercaptoéthanol et de l'étalon interne de dosage (EID). Après filtration, l'extrait organique est purifié des macromolécules organiques, molécules polaires et du soufre élémentaire qu'il contient par passage sur micro-colonne d'alumine et de cuivre activé en utilisant le DCM comme solvant d'élué. L'élué est concentré et le DCM remplacé par de l'isooctane, puis une seconde purification sur micro-colonne de silice permet de séparer la phase aliphatique (élué au pentane) et la phase aromatique (élué par un mélange pentane/DCM 65:35 v/v). L'extrait contenant les HAP est concentré et mis en présence de l'étalon interne de contrôle de récupération (EICR) avant d'être caractérisé par GC/MS.

éventuelle dégradation par son action anti-oxydante), puis placé sous un champ de micro-ondes de 30 W pendant 10 min (Maxidigest 350, ProLabo). La matrice sédimentaire est ensuite éliminée par filtration sur du coton en fibre de verre. L'extrait est quant à lui reconcentré à quelques centaines de microlitres, sous vide (900 mBars) à 50 °C (RapidVap, Labconco). L'extrait est purifié une première fois des macromolécules, des molécules polaires et du soufre élémentaire qu'il contient par passage sur une micro-colonne de cuivre activé et d'alumine en utilisant le DCM comme solvant d'élution. Après concentration de l'éluat sous flux d'azote et changement de solvant (le DCM remplacé par de l'isooctane), l'extrait passe par une seconde étape de purification sur micro-colonne de silice permettant la séparation des phases aliphatiques, éluées par du pentane, des phases aromatiques qui restent fixées à la silice, dans un premier temps, puis qui sont éluées à leur tour (une fois la phase aliphatique éliminée) par un mélange pentane-DCM (65:35 v/v). L'extrait organique est une nouvelle fois concentré sous flux d'azote puis repris dans du DCM pour être conditionné dans un vial d'analyse GC. Juste avant le dosage de l'extrait par GC-MS, l'étalon EICR est ajouté gravimétriquement.

**Tableau 2.1. Étalons internes EID et EICR utilisés pour le dosage des HAP dans les matrices sédimentaires**

HAP	EID (HAP deutéré)	EICR (HAP deutéré)
N	N d8	Pyr d10
Acty	Phe d10	Pyr d10
Acte	Phe d10	Pyr d10
Fle	Phe d10	Pyr d10
DBT	DBT d8	Pyr d10
Phe	Phe d10	Pyr d10
An	An d10	Pyr d10
Fluo	Fluo d10	Pyr d10
Pyr	Fluo d10	Pyr d10
MePyr*	Fluo d10	Pyr d10
BNT	Chys d12	B[b]F d12
B[a]A	Chys d12	B[b]F d12
Chys + Triph	Chys d12	B[b]F d12
B[b]F + B[j]F + B[k]F	B[e]P d12	B[b]F d12
B[a]F	B[e]P d12	B[b]F d12
B[e]P	B[e]P d12	B[b]F d12
B[a]P	B[a]P d12	B[b]F d12
Per	B[e]P d12	B[b]F d12
IP	BPe d12	B[b]F d12
D[a,h]A + D[a,c]A	BPe d12	B[b]F d12
Pi	BPe d12	B[b]F d12
BPe	BPe d12	B[b]F d12
Cor	Cor d12	B[b]F d12
D[a,l]P	Cor d12	B[b]F d12

*N : naphthalène ; Acty : acénaphthylène ; Acte : acénaphthène ; Fle : fluorène ; DBT : dibenzothiophène ; Phe : phénanthrène ; An : anthracène ; Fluo : fluoranthène ; Pyr : pyrène ; MePyr : méthylpyrène ; BNT: 2,1benzobenzothiophène ; B[a]A : benzo[a]anthracène ; Chys + Triph : chrysène + triphénylène ; B[b]F + B[j]F + B[k]F : benzo[b]fluoranthène + benzo[j]fluoranthène + benzo[k]fluoranthène ; B[a]F : benzo[a]fluoranthène ; B[e]P : benzo[e]pyrène ; B[a]P : benzo[a]pyrène ; Per : pérylène ; IP : indéno[1,2,3-c,d]pyrène ; D[a,h]A + D[a,c]A : dibenzo[a,h]anthracène + dibenzo[a,c]anthracène ; Pi : picène ; BPe : benzo[g,h,i]pérylène ; Cor : coronène ; D[a,l]P : dibenzo[a,l]pyrène. \* le MePyr a uniquement été dose dans les sédiments dopes en HAP modèles.*

#### 4.1.1.2. La phase aqueuse

Lorsque la quantité de milieu aqueux présente dans les enceintes d'exposition le permettait, le dosage des composés hydrophobes dans la colonne d'eau a été entrepris, selon le protocole proposé par Cailleaud *et al.* (2007). Les échantillons sont prélevés dans des bouteilles en verre et conservés à -20 °C jusqu'à analyse. Les mêmes standards internes que décrits précédemment (voir *paragraphe 4.1.1.1* de ce chapitre) ont été ajoutés avant le début de l'étape d'extraction (EID) et juste avant quantification de l'extrait (EICR).

Après filtration de l'échantillon aqueux à 0,7 µm sur un filtre en microfibre de verre (Whatman), les HAP dissous sont séparés de la phase aqueuse par extraction liquide-liquide en mélangeant le filtrat à du DCM 8 % v/v (pour lequel ces composés ont une forte affinité). Le mélange est vigoureusement agité et l'étape est répétée 3 fois pour parfaire l'extraction. L'extrait est ensuite deshydraté en présence de sulfate de sodium anhydre et reconcentré sous flux d'azote. Par la suite, l'échantillon est purifié sur micro-colonne de cuivre activé et de silice puis élué par un mélange de pentane/DCM (9:1 v/v), comme décrit précédemment pour les extraits de matrice sédimentaire (voir *paragraphe 4.1.1.1* de ce chapitre). L'éluat est reconcentré sous flux d'azote (environ 100 µL) pour être conditionné dans des vials d'injection et analysé par GC/MS.

#### 4.1.1.3. Les échantillons biologiques

Le suivi de la bioaccumulation en HAP chez les embryons et larves de Medaka a été réalisé sur des pools de 45 à 50 individus. Les échantillons sont conditionnés dans des tubes Eppendorf et pesés avant d'être stockés à -20 °C en attendant leur extraction. La procédure d'étalonnage interne décrite précédemment pour la caractérisation chimique des sédiments dopés a également été entreprise lors des présentes analyses.

L'extraction des HAP a été effectuée sur matrice biologique, préalablement lyophilisée, par extraction liquide-liquide en utilisant du pentane comme solvant d'extraction comme décrit par Baumard *et al.* (1998). L'extrait est ensuite incubé dans une solution d'éthanol-KOH puis concentré sous flux d'azote. Comme décrits dans le cas de l'analyse des matrices sédimentaires et des échantillons aqueux, des purifications successives sur micro-colonnes d'alumine et de silice sont effectuées. L'éluat est reconcentré sous flux d'azote pour être ensuite purifié par chromatographie liquide haute performance (HPLC) avec une colonne d'aminosilane, du pentane comme phase mobile selon un débit de 1 mL/min et une détection UV à 254 nm, selon le protocole décrit par Thompson *et al.* (2002). La fraction collectée, contenant les HAP d'intérêt est ensuite analysée par GC-MS.

#### 4.1.2. Dosage des HAP par GC/MS

Une fois extraits, les HAP sont analysés par couplage chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (GC-MS 6890, Agilent). La partie GC permet la séparation des analytes vaporisés en fonction de leur temps de rétention dans la colonne chromatographique. La vaporisation se fait dans la chambre de vaporisation à 250-300 °C, à pression atmosphérique. Les composés vaporisés sont transportés par un gaz vecteur (hélium ; phase mobile) vers la colonne où ils sont plus ou moins retenus par la phase stationnaire (siloxane greffée de fonctions méthyles et phényles) en fonction de leur coefficient de partage entre les deux phases, lui-même dépendant des caractéristiques physico-chimiques de la molécule. Le temps de rétention des analytes au sein de la colonne chromatographique est donc propre à chaque composé selon son affinité pour la phase stationnaire. Cependant, les matrices naturelles renferment bien souvent un nombre très important



de molécules organiques dont certaines sous forme d'isomère structurellement très proche les unes des autres pouvant créer des interférences ou des co-élutions. Il est donc nécessaire de compléter la séparation des analytes par spectrométrie de masse.

La partie MS permet l'identification des composés. Elle se déroule sous vide. Les molécules arrivant dans le spectromètre sont ionisées par impact d'électrons. Les différents ions ainsi générés sont séparés en fonction de leur rapport masse/charge dans un champ électrique quadripolaire puis détectés par un multiplicateur d'électrons qui convertit le courant ionique en signal électrique. La détection peut être effectuée soit en mode balayage Scan, comprenant une détection de tous les ions générés compris entre deux masses atomiques permettant de caractériser structurellement la molécule mais avec une sensibilité moindre, soit en mode Single Ion Monitoring (SIM) pendant lequel les ions à détecter sont spécifiés par leur masse atomique permettant une quantification de meilleure sensibilité. Cette dernière méthode a été retenue pour les différentes analyses de ce travail. L'ion caractéristique d'un analyte a été défini comme étant la forme ionique la plus abondante lors de l'ionisation de la molécule et fut utilisé pour la quantification. Le signal émis par chaque ion caractéristique des molécules recherchées a été extrait du signal total grâce à leur rapport masse/charge spécifique. Leur temps de rétention permet d'identifier le pic correspondant à l'analyte étudié.

Les dosages de HAP dans la phase dissoute, les tissus biologiques et une partie des sédiments sont en cours d'analyse au sein de l'équipe « AQUA » du Laboratoire de Physico- et Toxicochimie (EPOC UMR 5805), sous la direction du DR1 Hélène Budzinski. Pour les échantillons disponibles, les rendements méthodes moyens sont compris entre 98 % et 102 %. Les rendements d'extractions sont quant à eux compris entre 76 % et 80 %, en moyenne.

## 4.2. Dosage des Métaux

### 4.2.1. Dosage des métaux

Le dosage de 10 principaux métaux traces a été effectué sur l'ensemble des sédiments naturels utilisés au cours de ces travaux de thèse par la technique ICP-MS au sein du Centre Commun d'Analyses du laboratoire CNRS 3097 FREDD (Fédération De Recherche En Environnement Pour Le Développement Durable) de l'Université de La Rochelle sous la responsabilité de Michel Robert. Les concentrations en éléments métalliques ont été déterminées sur les sédiments sous leur forme « brute ». Le suivi de la contamination des sédiments dopés en éléments métalliques, de la phase aqueuse et des tissus biologiques a été effectué par mes soins au sein de l'équipe « Écotoxicologie Aquatique » de la Station Marine d'Arcachon (UMR CNRS 5805 EPOC), sous la responsabilité du PR Magalie Baudrimont. Le détail de ces analyses est présenté dans les paragraphes suivants.

### 4.2.2. Préparation des échantillons et minéralisation

#### 4.2.2.1. Les sédiments

Un suivi de la contamination des sédiments dopés en métaux lourds (Cu et Cd) a été effectué au cours des différentes expositions des embryons de Medaka. Pour cela, environ 1 g de sédiment p.h. (poids humide) est mis à sécher pendant 48 h à 55 °C. Les échantillons sont ensuite minéralisés en présence de 3 mL d'acide nitrique 65 % pendant 3 h à 100 °C.

Dans chaque série de 10 échantillons, 3 blancs de minéralisation ainsi que 1 échantillon certifié Tort-2 sont ajoutés. Ceci permet de contrôler que les étapes de préparation des échantillons n'apportent pas (ou de façon négligeable) d'éléments métalliques et que l'exactitude des mesures (par comparaison des valeurs dosées avec les valeurs certifiées) soit respectée. En fin de minéralisation, les échantillons sont dilués dans 15 mL d'eau Milli-Q. Pour finir, les teneurs en Cu et en Cd sont mesurées à l'aide d'un spectromètre d'absorption atomique à flamme. Dans le cas où la teneur en Cd s'est avérée trop basse dans l'échantillon pour être quantifiée par cette technique, les minéralisats ont été dosés une nouvelle fois par spectrométrie d'absorption atomique à four graphite (limite de détection en mode flamme pour le Cd = 0,02 ppm *versus* 0,1 ppb pour le mode four).

#### 4.2.2.2. La phase aqueuse

Au cours de l'exposition des embryons de Medaka à des sédiments contaminés en éléments métalliques (naturellement ou par dopage) destinés à l'analyse des réponses biomoléculaires, la quantité milieu aqueux présente dans chaque répliat a permis d'entreprendre le dosage de métaux présents dans la colonne d'eau. Les échantillons d'eau sont prélevés et directement acidifiés par ajout d'1 % (v/v) d'acide nitrique 65 %. Ils sont ensuite conservés à -20 °C jusqu'à leur dosage par spectrométrie d'absorption atomique à four graphite pour le Cd ou en mode flamme pour les autres éléments métalliques. Ces analyses ne nécessitent aucune autre étape de préparation des échantillons aqueux. Au moment du dosage, 3 blancs ainsi que 1 échantillon certifié Tort-2 tous les 10 échantillons sont ajoutés à chaque série de dosage.

#### 4.2.2.3. Les échantillons biologiques

Le suivi de la bioaccumulation du Cd chez les embryons et larves de Medaka a été réalisé au cours de l'exposition au Cd destinée à l'analyse des réponses biomoléculaires, sur des pools de 15 individus. Les échantillons sont conditionnés dans des tubes Eppendorf et pesés avant d'être stockés à -20 °C en attendant leur minéralisation. Au moment de l'analyse, les tissus sont placés dans des tubes à minéralisation de 1,5 mL en présence de 200 µL d'acide nitrique 65 % puis minéralisés pendant 3 h à 100 °C. Comme décrit pour l'analyse des sédiments, chaque série d'échantillons comprend 3 blancs de minéralisation ainsi que 1 échantillon certifié Tort-2 tous les 10 échantillons. En fin de minéralisation, les échantillons sont dilués dans 1 mL d'eau Milli-Q, puis les teneurs en cadmium sont déterminées par spectrométrie d'absorption atomique à four graphite.

### 4.2.3. Dosage des éléments métalliques par spectrométrie d'absorption atomique à flamme

Après minéralisation, les teneurs en Cu et en Cd des sédiments dopés ont été déterminées à l'aide du spectromètre SpectrAA 220FS (Varian®).

L'échantillon minéralisé sous forme liquide (au moins 5 mL) est en partie aspiré à l'aide d'un capillaire par le nébuliseur qui l'éjecte à sa sortie sous forme d'un aérosol constitué de fines gouttelettes homogènes. Entraîné par un flux d'un mélange air/acétylène à grande vitesse, l'aérosol pénètre dans l'atomiseur constitué d'un brûleur à fente produisant une flamme laminaire à 2 100 °C. Le brûleur est alimenté par le flux de gaz air/acétylène et aligné sur le chemin de rayonnement du spectromètre. Dans ce même alignement, se trouve également une lampe à cathode creuse constituée du même élément que celui que l'on souhaite doser qui génère une émission atomique propre à celui-ci. Après atomisation, les analytes sont sous leur forme élémentaire et sont capables d'absorber une partie plus ou moins importante de ces rayonnements spécifiques, en fonction de

leur concentration. Deux photomultiplicateurs mesurent l'intensité des rayonnements en entrée (non-atténués) et en sortie (atténués) du brûleur. La différence entre ces deux intensités permet de déterminer la concentration initiale de l'échantillon en élément métallique, grâce à un étalonnage externe préalable. L'absorption des rayonnements non-spécifiques, due à la présence de molécules non atomisées, de fumées ou de particules solides, est corrigée à l'aide d'une lampe deutérium dont le rayonnement n'est affecté quasiment uniquement que par ces absorptions parasites.

Le logiciel Varian SpectrAA fournit la concentration de l'échantillon sous sa forme liquide minéralisée en  $\mu\text{g/mL}$ . Il suffit alors de prendre en compte les facteurs de dilution appliqués lors de la préparation des échantillons pour revenir à la concentration initiale de l'échantillon liquide. Pour les échantillons solides (sédiments et embryons/larves), ces résultats sont également rapportés à la quantité de matrice minéralisée pour obtenir la concentration en masse d'analyte/masse de matrice initiale. Les taux de recouvrement obtenus pour les échantillons certifiés ont variés de 105 % à 110 % pour le Cd et de 104 % à 105 % pour le Cu.

#### 4.2.4. Dosage du cadmium par spectrométrie d'absorption atomique à four graphite

Lorsque les concentrations attendues en Cd dans les échantillons étaient trop faibles pour être dosées en flamme, le spectromètre d'absorption atomique à four graphite (ou électrothermique) M6 Solaar FS95 (Thermo Elemental®) a été utilisé. Grâce à sa limite de détection bien plus basse que celle du SpectrAA, la quantité d'échantillon minéralisée à analyser est elle aussi réduite de plusieurs mL à moins d'un mL dans le cas présent. Le principe de fonctionnement du M6 Solaar est très similaire à celui du SpectrAA, à l'exception de l'atomiseur qui est cette fois constitué d'un four en graphite cylindrique. Lorsque l'échantillon est déposé dans le four par le passeur automatisé, il subit plusieurs traitements thermiques sous flux d'argon. Dans un premier temps, une phase de séchage à 120 °C pendant 40 s a lieu, puis la matrice organique est détruite par pyrolyse à 250 °C durant 5 s. L'échantillon est ensuite minéralisé à 600 °C pendant 25 s puis atomisé à 1800 °C durant 3 s. À la fin de cette phase, l'étape de lecture se déroule selon le même principe que décrit pour la flamme. Enfin, le four procède à son nettoyage à 2500 °C durant 3 s avant de procéder à l'analyse suivante. La limite de détection de ce système étant très basse, il est important qu'aucune interférence ne vienne fausser les mesures ce qui engendrerait un biais important dans les valeurs déterminées. Pour pallier à ce phénomène, des modificateurs de matrice sont utilisés de manière à éviter tout parasitage de la mesure par d'autres molécules contenues dans l'échantillon. Lors du dosage du Cd, deux modificateurs ont été utilisés. Tout d'abord, le nitrate de magnésium à 1 g/L a été ajouté pour son rôle d'activateur de combustion de la matrice qui sera alors décomposée à des températures plus basses, et donc plus tôt lors des traitements thermiques. D'autre part, ce modificateur a également une action (modérée) de stabilisateur de l'analyte. Le second modificateur qui a été employé fut le palladium à 2 g/L qui forme un alliage stable avec le Cd ce qui augmente sa température d'atomisation de 400 °C à 900 °C. Ceci permet d'augmenter la température du four de manière à mieux détruire la matrice et donc à limiter le risque d'interférence par les molécules qui la composent.

Les concentrations en Cd dans les échantillons injectés sont données par le logiciel selon le même principe de mesure que précédemment décrit pour le spectromètre d'absorption atomique à la flamme. Les calculs effectués pour remonter à la teneur réelle en Cd de l'échantillon sont donc

identiques à ceux présentés dans le paragraphe précédent. Les taux de recouvrement obtenus pour les échantillons certifiés étaient compris entre 98 % et 101 %.

## 5. PRODUCTION D'EMBRYONS DE MEDAKA JAPONAIS

---

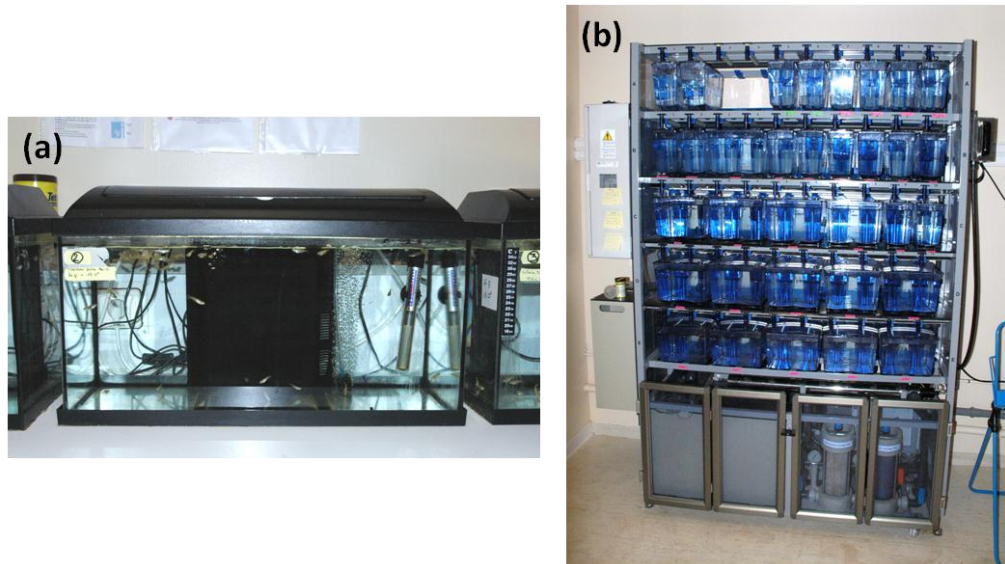
### 5.1. Élevage et maintien du stock de géniteurs

Les Medaka japonais matures fournis par le Gis-AMAGEN (Gif-sur-Yvette, France) de la lignée CAB sont maintenus dans des aquariums de 40 L munis d'une pompe permettant la circulation de l'eau sans intermittence et d'un système de filtration (*Figure 2.3.a*). En phase de grossissement, la température de l'eau est maintenue à 24 °C sous une photopériode de 12 h de jour/12 h de nuit. Les aquariums sont remplis d'un mélange d'eau osmosée et d'eau du robinet selon un ratio volumique 2:1 (pH 7,5 ; 53,4 ppm CaCO<sub>3</sub> ; 0,025 ppm NO<sub>2</sub> ; 1,5 ppm PO<sub>4</sub> ; 5 ppm NO<sub>3</sub> ; < 0,1 ppm NH<sub>4</sub>) qui a préalablement été maintenu sous bullage d'air pendant 24 h au minimum pour déchloration. Les Medaka adultes sont au nombre de 30 individus environ par bacs selon un sex-ratio de deux femelles pour un mâle. L'eau des aquariums est renouvelée à 30 % deux fois par semaine. À cette occasion, une mesure du taux de nitrites est également effectuée grâce à un kit JBL Nitrite Test Set. Dans le cas où le taux de nitrites dans les aquariums s'avère trop important (> 0,1 ppm), le taux de renouvellement de l'eau des aquariums est augmenté et la charge en nitrites est suivie quotidiennement. Les poissons sont nourris deux fois par jour avec de la nourriture inerte (Tetramin® Tropical, Tetra) le matin et des nauplii d'artémies de moins de 48 h le soir (Ocean Nutrition). Chaque jour, les poissons sont examinés et les individus présentant des signes de mauvaise santé sont retirés puis euthanasiés à l'aide d'une solution de benzocaïne à 120 mg/L. De plus, le stock de géniteurs est renouvelé une fois par an grâce à des collectes d'embryons effectuées dans ce but (voir *paragraphe 5.2* de ce chapitre).

Avant de rejoindre les Medaka adultes dans les aquariums et dès qu'elles ont atteint une taille suffisante (1 à 1,5 cm, soit au bout d'un mois environ), les larves sont placées dans un bac du système d'élevage Zebtec (Tecniplast®, *Figure 2.3.b*) pour leur phase de grossissement et de maturation sexuelle (de 3 à 6 mois). Le système est automatisé et maintient l'eau à 26 °C, sous une photopériode 12 h/12 h. Des sondes pH et de conductivité permettent de contrôler et d'ajuster au besoin la qualité de l'eau. Dans le système, l'eau est renouvelée en intégralité toutes les 24 h à raison d'1 L/h. Jusqu'à l'âge de 3 mois, les juvéniles sont nourris deux fois par jour avec de la nourriture inerte TetraMin® Junior (Tetra) et des nauplii d'artémies, puis leur régime alimentaire est identique à celui des géniteurs. Une fois matures, les mâles et les femelles sont triés et les jeunes adultes sont placés dans les aquariums pour entrer en reproduction.

### 5.2. Reproduction assistée et collecte des embryons

En phase de stimulation de ponte, la température de l'eau est augmentée progressivement puis maintenue à 26 °C et la photopériode est allongée à 16 h de jour pour 8 h de nuit. Un à deux repas supplémentaires (nourriture inerte) sont également ajoutés, l'un en fin de matinée et l'autre en début d'après-midi. La période de stimulation débute environ 2 à 3 semaines précédant le jour



**Figure 2.3. Installation d'élevage de Medaka japonais**  
(a) Installation de maintien des géniteurs et (b) le système d'élevage Zebtec (Techniplast) pour les juvéniles.

souhaité de récolte des embryons. La collecte des œufs commence environ 1 h après le début de la période d'éclairement et la prise du premier repas, et peut se poursuivre de 2 h à 3 h au-delà. Durant ce laps de temps, chaque femelle gravide est isolée et les grappes d'œufs sont délicatement détachées du ventre de la femelle. A la fin de la collecte, l'ensemble des pontes est rassemblé et mélangé. Les œufs sont ensuite rincés dans de l'ERS (Egg Rearing Solution : 85,56 mM NaCl ; 0,40 mM KCl ; 0,36 mM CaCl<sub>2</sub> ; 1,36 mM MgSO<sub>4</sub>) et individualisés en retirant les filaments adhérent qui recouvre le chorion en les roulant sous les doigts avec précaution. Les œufs non-fécondés ou les embryons avortés ou désynchronisés sont retirés. La détermination du stade de développement se fait suivant les descriptions d'Iwamatsu (2004) et Gonzalez-Doncel *et al.* (2005). Seuls les embryons au stade pré-morula (soit 2-4 h post-fécondation, pf) sont conservés pour les tests embryo-larvaires (Figure 2.4). Dans le cas de collectes d'embryons effectuées uniquement en vue du renouvellement du stock de géniteurs, un désynchronisme du développement des embryons plus important est toléré.

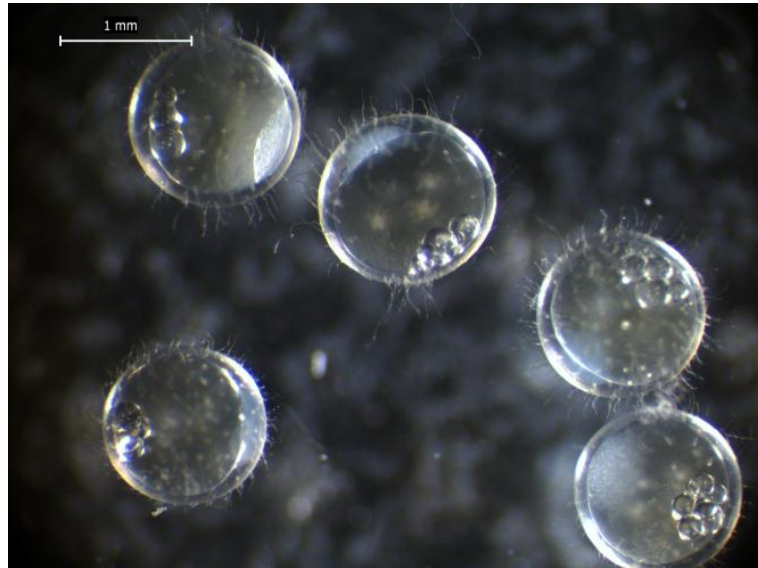
Une fois triés, les embryons destinés à devenir de futurs géniteurs sont maintenus dans de l'ERS jusqu'à éclosion (soit environ 10 j pf). Les larves nouvellement écloses sont alors transférées dans un béccher en verre de 400 mL contenant environ 250 mL d'eau de mélange (identique à celle présente dans les aquariums) intégralement renouvelée deux fois par semaine. Dès que les larves ont atteint l'âge de 2 jours, elles sont nourries deux fois par jour avec de la nourriture inerte (TetraMin® Baby, Tetra) ou des nauplii d'artémies. Les embryons et larves sont maintenues à  $26 \pm 0,3$  °C sous une photopériode de 12 h/12 h dans une enceinte thermostatée (Economic Delux, Snijders Scientific) fournissant une lumière blanche de 5000 Lux jusqu'à ce que les larves soient suffisamment développées pour rejoindre le système Zebtec.

## 6. DEROULEMENT DU TEST EMBRYO-LARVAIRE MEDAKA (MELA)

---

### 6.1. Conditions d'exposition

Le test MELA consiste en une exposition d'embryons de Medaka au stade pré-morula à des sédiments naturellement ou artificiellement contaminés. Les embryons sont incubés durant tout leur développement embryonnaire en contact direct avec la matrice sédimentaire, en conditions statiques (sans renouvellement du sédiment et de l'ERS) ou semi-statiques (renouvellement de l'ERS quotidien ; cas des expositions aux sédiments natifs). En fonction des paramètres suivis et des analyses entreprises au cours des différentes expositions, le plan expérimental de chaque expérience a été adapté afin que les conditions d'exposition soient comparables entre chaque exposition. En effet, les quantités de matériel biologique nécessaires à la mise en œuvre des analyses biomoléculaires et des dosages des contaminants imposent d'augmenter significativement le nombre d'individus par réplicat en comparaison d'une exposition « classique ». En effet, au cours de celle-ci, seul le suivi de paramètres phénotypiques ou d'analyses qui ne requièrent que peu de matériel biologique est entrepris. Chaque condition d'exposition est réalisée en triplicat indépendants (*i.e.* 3 boîtes de Petri par condition). Le détail du protocole expérimental propre à chaque exposition est présenté dans la 1<sup>ère</sup> partie de chaque section dédiée aux expositions des Chapitres 3 à 5.



**Figure 2.4. Embryons de Medaka de stade pré-morula (2-4 heures pf)**  
*Illustration d'embryons triés et individualisés juste avant exposition.*

De manière générale, les sédiments à tester sont placés à température ambiante (23 °C dans une salle climatisée) la veille du lancement de la série d'expositions. Entre 3 et 4 h avant le début de l'exposition, le sédiment à étudier est déposé dans une boîte de Petri en plastique à ergots (permettant une bonne aération) en quantité équivalente à 0,5 g de sédiment p.s. au cm<sup>2</sup> puis humidifié avec de l'ERS à raison de 0,4 mL par g de sédiment p.s. (période d'équilibration). Les embryons de stade pré-morula triés et individualisés comme décrit précédemment sont placés aléatoirement sur une grille Nitex® de maillage 1 mm. La grille et les embryons sont déposés à la surface du sédiment à raison d'environ 3 embryons au cm<sup>2</sup>. La grille est ensuite légèrement enfoncée dans le sédiment de manière à optimiser le contact entre les œufs et la matrice sédimentaire. Enfin, de l'ERS est ajouté afin d'immerger totalement les embryons et à atteindre un volume total équivalent à environ 0,1 mL d'ERS par embryon. Le matériel utilisé est illustré sur la [Figure 2.5](#). L'ensemble est placé dans une enceinte thermostatée (Economic Delux, Snijders Scientific) maintenue à 26 °C ± 0,3 sous une photopériode de 12 h/12 h (lumière blanche 5000 Lux) pendant toute la durée de l'expérience ([Figure 2.6](#)). Il est cependant à noter que le suivi des différents paramètres nécessite de sortir les embryons de l'enceinte thermostatée à 26 °C et a été effectué dans une salle climatisée à 23 ± 1 °C.

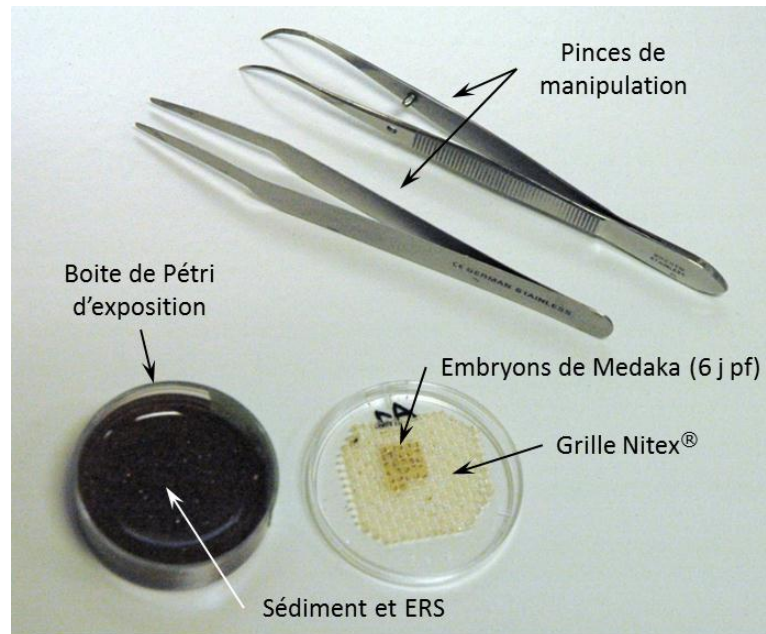
Dans le cas d'une exposition à des sédiments dopés, le niveau d'ERS dans chaque réplicat est contrôlé tous les jours et complété avec de l'ERS propre si nécessaire. Pour les sédiments naturels (natifs), un renouvellement complet de l'ERS est effectué quotidiennement pour assurer une bonne oxygénation du milieu. Les embryons de Medaka restent ainsi en contact direct avec le sédiment jusqu'au pic d'éclosion dans l'une des conditions (en général, 9 à 10 jours dans nos conditions expérimentales). Les embryons non-éclos sont alors transférés dans une nouvelle boîte de Petri contenant de l'ERS propre à raison de 0,3 mL/cm<sup>2</sup>. L'ERS n'est alors plus renouvelé jusqu'à la fin de l'expérience afin de ne pas risquer de diluer l'enzyme d'éclosion, ce qui pourrait engendrer une désynchronisation des éclosions. Chaque jour, les larves nouvellement écloses sont récupérées puis placées en milieu propre, dans des béciers de 100 mL contenant 50 mL d'eau de mélange qui sera intégralement renouvelée tous les deux jours. Après 48 h post-éclosion, les larves sont nourries 2 fois par jour avec du TetraMin® Baby (Tetra). Les embryons non-éclos et les larves sont maintenus ainsi jusqu'à la fin de l'expérience, au jour 20 pf. À ce moment-là, les individus (embryons et larves) vivants restants sont euthanasiés à l'aide d'une solution de benzocaïne à 120 mg/L.

La [Figure 2.7](#) propose une vue globale du protocole d'exposition des embryons de Medaka appliqué lors du test MELA.

## 6.2. Suivi de l'oxygène dissous

L'oxygène dissous a été mesuré quotidiennement à l'interface ERS/sédiment à l'aide d'une sonde optique (Neofox, Oceanoptics) pendant toute la durée de l'exposition. Par ailleurs, des micro-profilés d'oxygène ont été réalisés sur le sédiment d'Yville et de Marcenac (lyophilisé/broyé et natifs) dans les mêmes conditions que le test (26 °C ± 0,3 ; photopériode 12 h/12 h ; 3 embryons au cm<sup>2</sup>) sur la colonne d'eau totale ainsi que dans les premiers millimètres de sédiment, à une profondeur d'incrément de 50 µm avec un détecteur de type Clark et avec une cathode de garde (Revsbech, 1989). Les détecteurs ont un diamètre en pointe de 25-50 µm et sont connectés à un pico ampèremètre à haute sensibilité (PA2000, Unisense) et un ordinateur via un convertisseur A/D. La sensibilité liée à l'agitation a été inférieure à 2 % et le temps de 90 % de réponse inférieur à





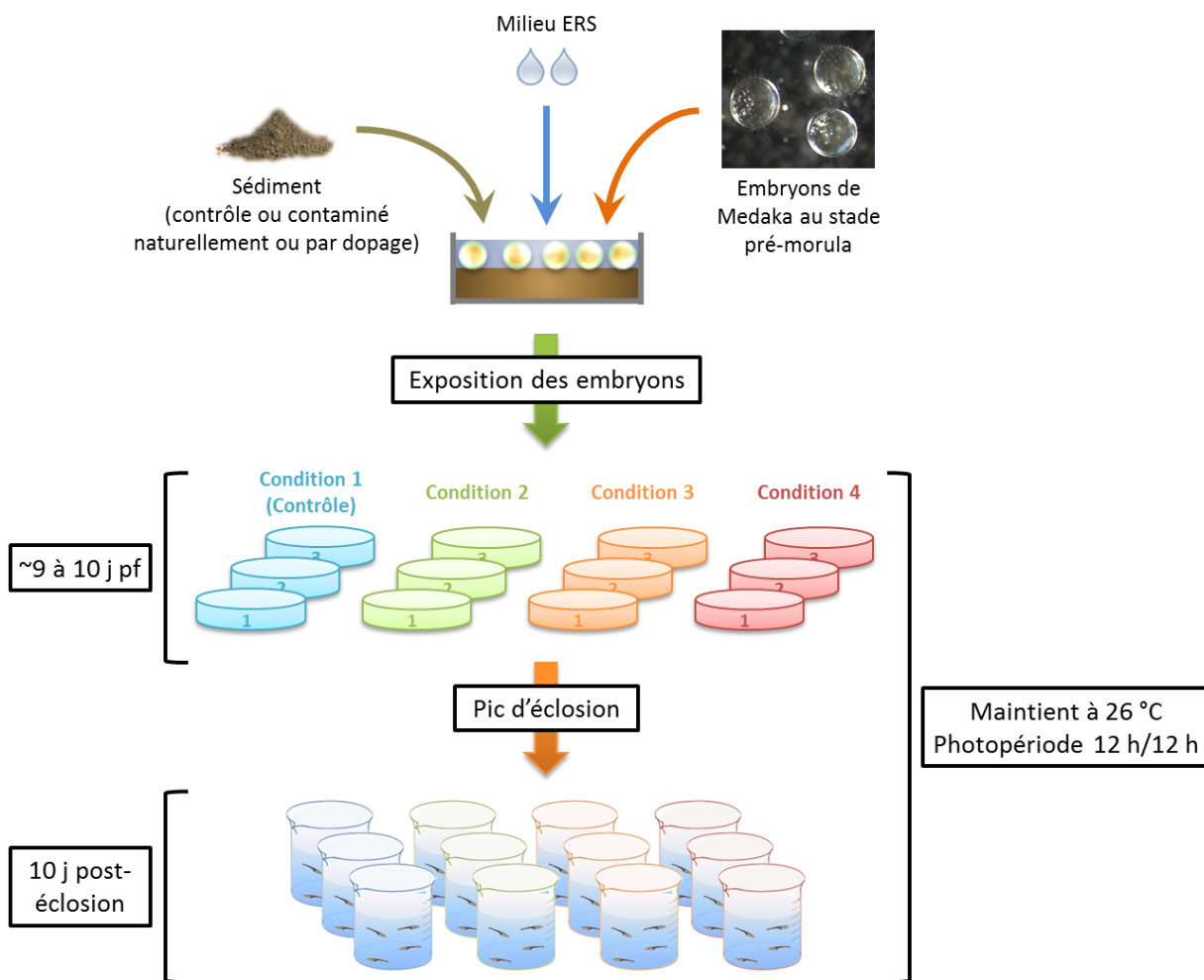
**Figure 2.5. Illustration du matériel d'exposition utilisé lors du test MELA**

Les embryons âgés de 2-4 heures pf sont placés sur une grille en Nitex®. La grille est ensuite légèrement enfoncée dans le sédiment qui a préalablement été déposé dans une boîte de Pétri et humidifié. De l'ERS est ajouté pour immerger complètement les embryons. La grille est manipulée avec une pince rigide courbe alors que les embryons sont exclusivement manipulés avec une pince d'entomologie ultra souple.



**Figure 2.6. Embryons (a) et larves (b) de Medaka en cours d'expérience**

Embryons de Medaka en cours d'exposition (a) et larves de Medaka nouvellement écloses dans leur béchers (b) dans l'enceinte thermostatée.



**Figure 2.7. Vue globale du protocole d'exposition des SPD de Medaka appliqué lors du test MELA**  
 Une fois le sédiment à étudier déposé dans la boîte de Pétri d'exposition, les embryons de Medaka au stade pré-morula sont déposés en contact avec celui-ci. Ils sont maintenus ainsi jusqu'au pic d'éclosion aux alentours du jour 10 pf. Une fois écloses, les larves sont placées en milieu propre et maintenues durant encore 10 jours post-éclosion. L'ensemble des individus sont placés dans une enceinte thermostatée à 26 °C sous une photopériode de 12 h de jour et 12 h de nuit.

5 secondes. Des calibrations linéaires ont été faites entre 100 % de saturation d'air dans l'eau (la concentration en oxygène a été précisément déterminée par titration selon la méthode de Winkler) et le niveau zéro dans une partie anoxique du sédiment. Les profils d'oxygène ont été obtenus en utilisant le logiciel PRO2FLUX (Deflandre & Duchêne, 2010).

### 6.3. Suivi des paramètres phénotypiques

Le test MELA a été développé afin de permettre l'évaluation de la toxicité de sédiments naturels ou dopés grâce au suivi de différents critères de toxicité principalement phénotypiques, visibles à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe binoculaire. Le fait de privilégier ainsi des marqueurs non-invasifs permet de réduire considérablement le nombre d'individus nécessaires lors du bioessai. De plus, il est alors possible de suivre les effets sub-létaux d'une contamination au cours du temps sur les mêmes individus. Par ailleurs, la diversité des paramètres étudiés permet de mettre en évidence les effets de substances présentant différents modes d'action, ce qui donne au test MELA un caractère intégratif très intéressant dans le cadre d'une démarche d'évaluation de la toxicité de matrice environnementale complexe. Le déroulement général du test MELA est illustré dans la [Figure 2.8](#).

#### 6.3.1. Viabilité, taux d'éclosion et durée du développement

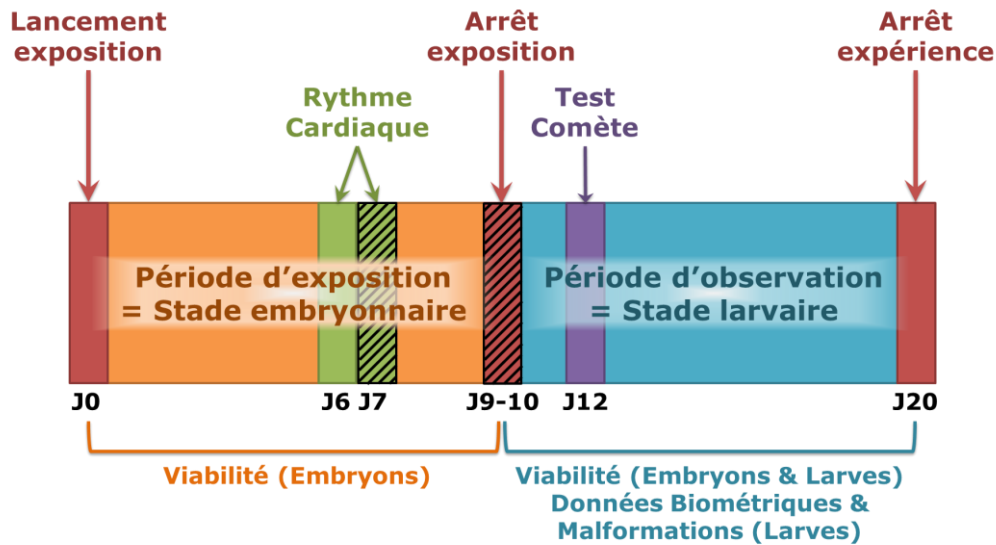
Les embryons et larves de Medaka sont observés quotidiennement sous stéréomicroscope (Leica MZ75, x20 à x50) équipé d'une source de lumière froide externe (Intralux® 4100, Volpi AG 145) pendant toute la durée de l'expérience, soit pendant 20 j pf. Les embryons morts sont comptabilisés et éliminés quotidiennement. Un embryon est considéré comme mort en l'absence de battements cardiaques, lorsque l'espace périvitellin a disparu et que les tissus embryonnaires s'agrègent en une pelote blanche au centre de l'œuf et/ou lorsque le chorion devient opaque ([Figure 2.9.a](#)). De façon similaire, les larves sont observées tous les jours et les individus morts sont dénombrés puis éliminés. De ces observations sont dérivées les viabilités embryonnaire, larvaire et cumulée (produit de la viabilité embryonnaire par la viabilité larvaire) sur l'ensemble de l'expérience. La comptabilisation quotidienne du nombre d'individus parvenant à éclore entièrement (i.e. le corps de la larve est complètement sorti du chorion) permet de calculer la durée moyenne du développement embryonnaire et le taux d'éclosion (qui intègre également la mortalité embryonnaire) dans chaque réplicat. Les formules utilisées pour calculer ces paramètres sont présentées ci-dessous :

$$VE (\%) = \frac{N_E^{tot} - N_E^{mort}}{N_E^{tot}} \times 100 \quad VL (\%) = \frac{N_L^{tot} - N_L^{mort}}{N_L^{tot}} \times 100$$

$$VC (\%) = \frac{VE \times VL}{100}$$

$$TE (\%) = \frac{N_E^{tot} - N_E^{mort} - N_E^{non-éclos}}{N_E^{tot}} \times 100$$

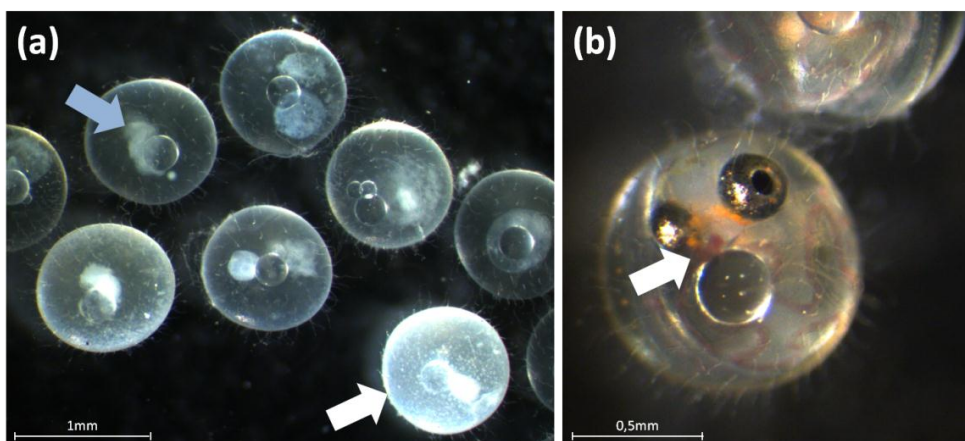
$$DD (j \text{ pf}) = \frac{\sum_i N_L^{éclosé \text{ jour } i} \times \text{jour}_i}{N_L^{tot}}$$



▨ Prélèvements pour approche moléculaire

**Figure 2.8. Déroulement général du test MELA**

L'exposition des embryons débute au jour 0 pf et se poursuit durant tout le développement embryonnaire soit jusqu'aux alentours du jour 10 pf. Durant cette période, la viabilité est suivie chaque jour et le rythme cardiaque est mesuré chez les embryons âgés de 6 et 7 j pf. Au moment du pic d'éclosion, les individus (embryons et larves) sont placés en milieu propre et maintenus jusqu'au jour 20 pf, date de fin de l'expérience. Durant cette période, les larves nouvellement écloses sont examinées quotidiennement pour observer la présence éventuelle de malformations et acquérir des données biométriques. Le test Comète est mis en œuvre sur des larves de 48 h, soit au jour 12 pf environ. Les analyses moléculaires (bioaccumulation, dosage des métallothionéines et l'analyse de l'expression des gènes d'intérêt par RT-PCR) sont entreprises sur des embryons (jour 7 pf) et les larves (au jour 9-10pf).



**Figure 2.9. Photos d'embryons morts (a) et d'embryons au jour 6 pf (b)**

Sur la photo (a), seuls des embryons morts sont présents. On peut noter l'absence d'espace périvitellin et l'opacification du chorion (flèche blanche). La flèche bleue indique l'agrégation des tissus embryonnaires, bien visible lorsque le chorion n'est pas encore opaque. Chez les embryons âgés de 6 j pf (b), le système cardiovasculaire est suffisamment développé et permet d'observer facilement le cœur (flèche blanche) et la circulation sanguine.

Avec :  $VE$  : viabilité embryonnaire en %  
 $N_E^{tot}$  : nombre total d'embryons exposés  
 $N_E^{mort}$  : nombre d'embryons morts au cours de l'expérience  
 $VL$  : viabilité larvaire en %  
 $N_L^{tot}$  : nombre total de larves écloses au cours de l'expérience  
 $N_L^{mort}$  : nombre de larves mortes au cours de l'expérience  
 $VC$  : viabilité cumulée en %  
 $TE$  : taux d'éclosion en %  
 $N_E^{non-éclos}$  : nombre d'embryons non-éclos vivants à la fin de l'expérience  
 $DD$  : durée moyenne du développement embryonnaire en jour pf  
 $N_L^{éclosé\ jour\ i}$  : nombre de larves écloses au jour  $i$   
 $jour_i$  : jour  $i$  exprimé en jour pf (correspond à l'âge embryonnaire des larves écloses au jour  $i$ )

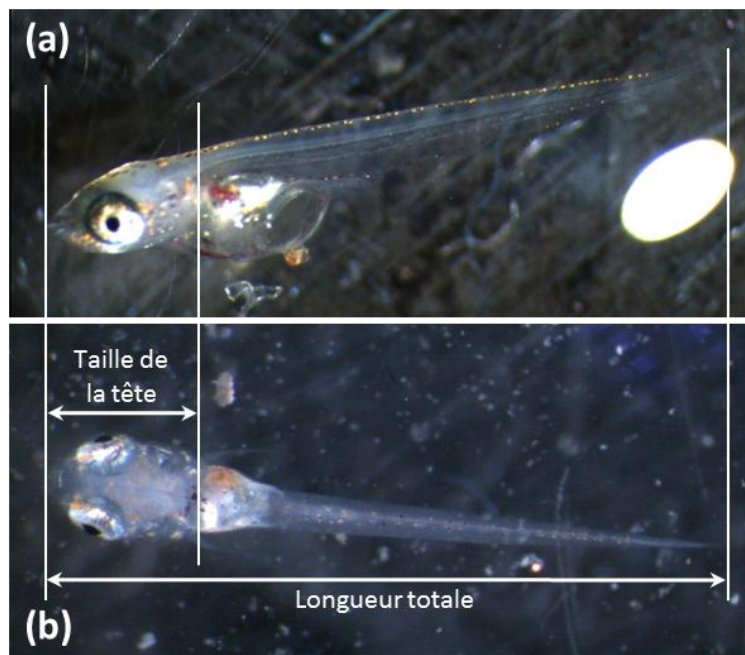
### 6.3.2. Rythme cardiaque

L'activité cardiaque a été suivie chez les embryons âgés de 6 et 7 j pf. A ces stades de développement, le cœur est suffisamment formé et le sang suffisamment coloré pour permettre une bonne observation du rythme cardiaque (*Figure 2.9.b*) et ce, même en présence de particules de sédiment en surface de l'œuf. Au jour 6 pf, la plicature cardiaque est bien avancée et permet une bonne différenciation visuelle des deux loges cardiaques. Le jour suivant (7 j pf), la cavité péricardique est en formation et la fréquence cardiaque se stabilise normalement aux alentours de 180 battements par minutes à 25 °C (Iwamatsu, 2004).

Chaque réplicat est sorti de l'enceinte thermostatée et laissé quelques instants sur la paille afin que les embryons s'acclimatent à la température ( $23 \pm 1$  °C dans la salle climatisée de manipulation *versus* 26 °C dans l'enceinte). Les embryons sont placés sous un stéréomicroscope (Leica MZ75, x20 à x50) muni d'une source de lumière froide (Intralux® 4100, Volpi AG,145) pour observation. Chaque manipulation des embryons est suivie d'une mise au calme de ceux-ci afin de stabiliser leur rythme cardiaque. Le nombre de battements cardiaques est comptabilisé sur trois périodes de 20 s chacune chez 5 individus choisis au hasard dans chaque réplicat. Le rythme cardiaque de chaque individu, exprimé en nombre de battements par minute (batt./min), résulte de la somme de ces 3 mesures. Enfin, l'activité cardiaque moyenne pour un réplicat donné est obtenue en faisant la moyenne des rythmes cardiaques observés sur les 5 individus pris en compte dans le réplicat considéré.

### 6.3.3. Malformations

À chaque jour d'éclosion, les larves nouvellement écloses sont endormies sur glace et examinées au stéréomicroscope (Leica MZ75) équipé d'une caméra couleur CDD (Leica DFC 420C) et connecté à un ordinateur pour acquisition de données biométriques et observations d'éventuelles anomalies de développement. Afin d'évaluer la croissance générale des larves, une photo de chaque individu dans son intégralité est prise et la longueur totale ainsi que la taille de la tête sont mesurées (*Figure 2.10*) à l'aide du logiciel Leica Application Suite (v2.8.1.). Par la suite, le rapport taille de la tête sur longueur totale (T/L) est également calculé pour évaluer les proportions morphologiques générales de chaque individu. Chaque larve est ensuite observée soigneusement et les



**Figure 2.10. Mesures biométriques sur les larves nouvellement écloses**

La figure présente une vue latérale (a) et ventrale (b) d'une larve de Medaka à l'éclosion. La longueur totale de l'individu est mesurée depuis le bout de la mâchoire inférieure jusqu'à l'extrémité de la nageoire caudale. La taille de la tête s'étend du bout de la mâchoire inférieure jusqu'à l'arrière de la capsule otique, qui correspond également au niveau d'attache des nageoires pectorales.

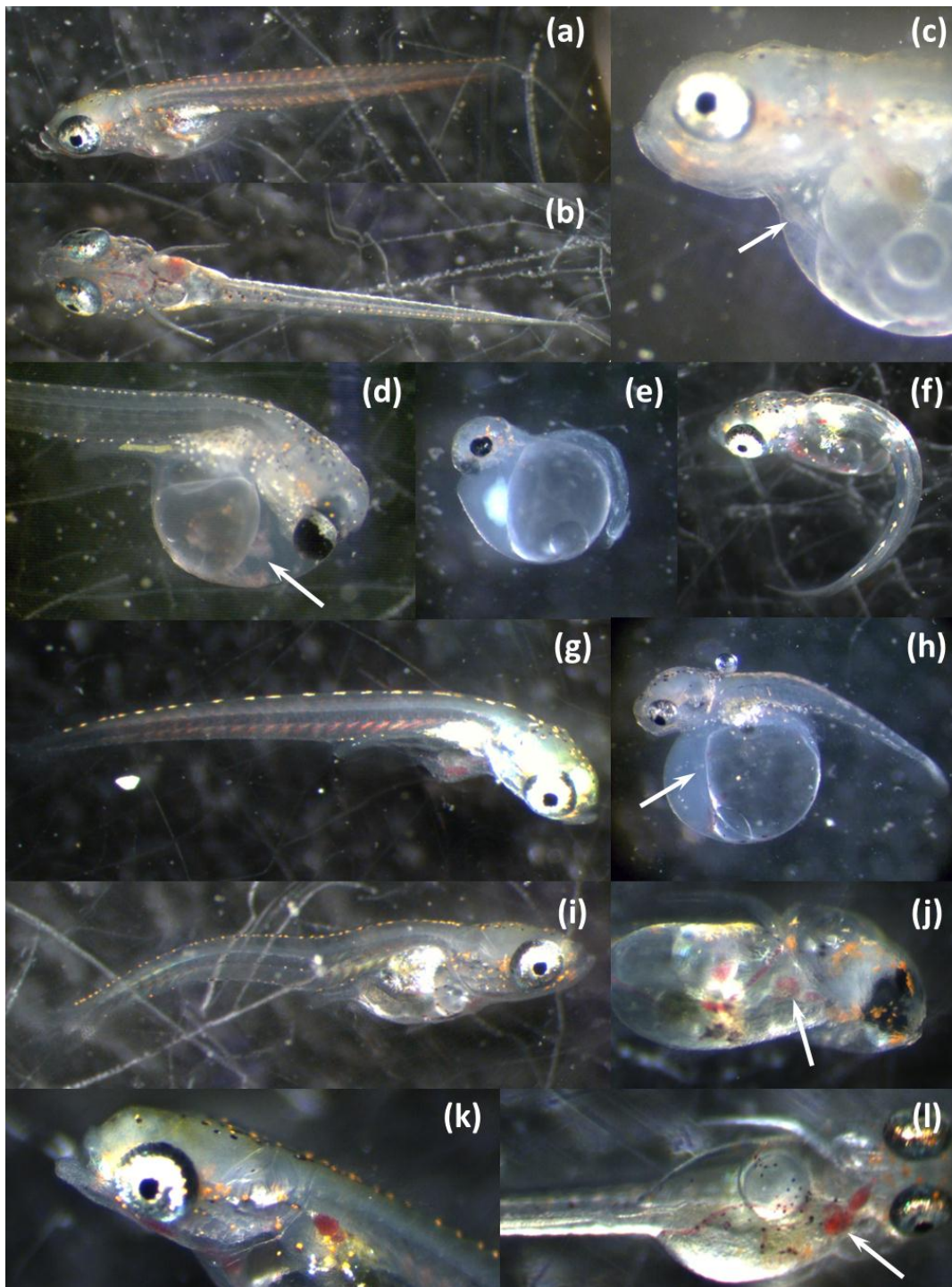
malformations phénotypiques sont répertoriées. Six catégories de malformations ont été sélectionnées en fonction des anomalies de développement les plus fréquemment rapportées dans la littérature chez les embryons de poissons exposés à divers polluants dont les métaux lourds, les HAP, les PCB et les composés dioxine-like (Vicquelin *et al.*, 2011 ; Gonzalez-Doncel *et al.*, 2008 ; Farwell *et al.*, 2006 ; Kim & Cooper, 1999). La plupart des pathologies observées font partie des symptômes associés à la maladie du sac bleu (BSD : blue sac disease), initialement identifiée après exposition à la dioxine. Les six catégories sont illustrées sur *Figure 2.11* et détaillées ci-dessous :

- ✓ **Oedèmes** : péricardique, périvitellin et céphaliques
- ✓ **Malformations squelettiques** : scoliose, lordose, cyphose, larve en forme de C et malformation des nageoires
- ✓ **Malformations cranio-faciales** : déformations crâniennes (notamment hypoplasie) et des mâchoires
- ✓ **Malformations oculaires** : aplasie, hyper/hypoplasie, dysplasie, altération de la pigmentation, cyclopie
- ✓ **Anomalies cardiaques** : atrophie, hypertrophie, dystrophie, anomalie de positionnement du cœur, plicature (ou courbure) cardiaque incomplète ou anormale, « tubular heart » (cœur tubulaire dont les chambres ne sont pas différenciées), anémies (absence de cellules sanguines circulantes), hémorragies, accumulation de cellules sanguines immobiles
- ✓ **Anomalies du sac vitellin** : malabsorption des réserves vitellines, absence de sac vitellin à l'éclosion

Le pourcentage de larves écloses présentant une ou plusieurs malformations (toutes catégories confondues) est ensuite calculé pour chaque réplicat, ainsi que le pourcentage de larves écloses atteintes par chaque classe de malformations.

#### 6.4. Évaluation des dommages à l'ADN par le test Comète

En complément de l'analyse des effets phénotypiques, le potentiel génotoxique des sédiments dopés ou naturellement contaminés a également été appréhendé au cours du test MELA. La génotoxicité d'un composé peut se définir comme sa capacité à compromettre l'intégrité du matériel génétique de l'organisme exposé à cette substance. Les cassures de l'ADN (acide désoxyribonucléique) peuvent survenir par action directe ou indirecte de l'agent génotoxique. Parmi les différentes méthodes existantes pour mettre en évidence les dommages à l'ADN, le test Comète (également appelé Single Cell Gel Electrophoresis) est reconnu comme une technique sensible, rapide, de moindre coût et tout à fait appropriée à la détection non-spécifique des cassures de l'ADN (Collins, 2004 ; Devaux *et al.*, 1997). En effet, la version alcaline du test Comète (Singh *et al.*, 1988) permet de détecter à la fois les cassures simple et/ou double brins de l'ADN ainsi que les sites alkali-labiles. Cette technique simple et intégrative d'évaluation quantitative des dommages à l'ADN permet donc la mise en évidence de l'effet génotoxique global d'une substance sans distinction des mécanismes mis en jeu.



**Figure 2.11. Illustrations des différents types de malformations pouvant être observés chez les larves à l'éclosion**

Larve normale vue de profil (a) et vue de dessous (b). (c) Larve présentant un cœur tubulaire (flèche), un œdème péricardique et une malformation de la mâchoire inférieure. (d) Larve présentant une lordose, un œdème péricardique et périvitellin important, des malformations cardiaque (flèche) et oculaire graves. (e) Larve présentant une anémie, un œdème péricardique très important, une malformation du crâne et des mâchoires, une cyphose, une malabsorption du sac vitellin et une atrophie générale du corps. (f) Larve présentant une scoliose importante. (g) Larve présentant une cyphose légère et dont les réserves vitellines sont quasi-inexistantes. (h) Larve présentant une cyphose, une malabsorption des réserves vitellines, un œdème péricardique et périvitellin, un cœur tubulaire (flèche), une malformation crânienne, oculaire et des mâchoires ainsi que des accumulations de sang au niveau du sac vitellin. (i) Larve présentant une malformation squelettique alternant lordose cyphose. (j) Larve présentant une importante malformation crânienne globale, une absence de développement des mâchoires, une anomalie de positionnement et de courbure du cœur (flèche) et une cyclopie. (k) Larve présentant une malformation de la mâchoire inférieure ainsi qu'une hémorragie et une malformation crânienne légère. (l) Larve présentant une importante anomalie de positionnement et de plicature du cœur (flèche).



La mise en œuvre du test Comète nécessite une individualisation des cellules au préalable. Pour cela, un protocole de dissociation cellulaire par traitement enzymatique et mécanique sur larves de Medaka a été développé au sein du laboratoire. L'adaptation du test Comète et le développement du protocole de dissociation sont détaillés dans les travaux de Morin *et al.* (2011) rapportés en *Annexe 1*.

Dans notre étude, l'analyse des dommages à l'ADN a été entreprise, à l'aide du test comète, sur un pool de 5 larves de Medaka écloses depuis 48 h (soit au jour 12 pf) et prélevées aléatoirement dans chaque réplicat.

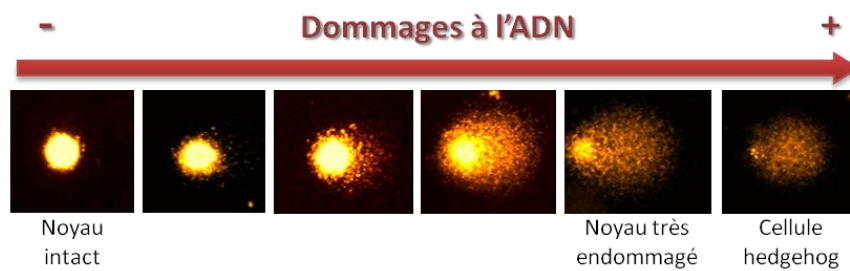
#### 6.4.1. Dissociation cellulaire

Après avoir anesthésiés les individus sur glace pendant 10-15 min, les larves sont délicatement ciselées à l'aide de deux lames de rasoir. Le matériel biologique est récupéré à la pipette dans 200  $\mu$ L de MEM (Minimum Essential Medium) puis, 1 mL de MEM-Collagénase IV (Collagénase de *Clostridium histolyticum* de Type IV, Sigma Aldrich) à 1,25 mg/mL est ajouté. L'ensemble est placé sous agitation douce à 37 °C pendant 45 min. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 10 min, à 100 g et à température ambiante. Le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans 1 mL de MEM propre. Une nouvelle centrifugation est effectuée dans les mêmes conditions que précédemment et le culot est à nouveau remis en suspension dans 200  $\mu$ L de MEM. La viabilité cellulaire est examinée en ajoutant 20  $\mu$ L d'une solution de Bleu de Trypan à 1 mg/mL dans une aliquote de 20  $\mu$ L de suspension cellulaire. Les cellules apparaissant colorées en bleu sont considérées comme mortes alors que les cellules viables restent réfringentes. Seules les suspensions cellulaires présentant une viabilité supérieure à 80 % sont utilisées. La densité cellulaire de chaque échantillon est également déterminée au cours de ce test sur cellule de Malassez. Une dernière centrifugation est effectuée, le surnageant est une nouvelle fois éliminé et le culot remis en suspension dans un volume de MEM nécessaire à l'obtention d'une concentration cellulaire d'environ  $2,5 \times 10^6$  cell./mL.

#### 6.4.2. Le Test Comète

Le test comète est réalisé sur cellules fraîchement isolées selon le protocole de Singh *et al.* (1988) avec quelques modifications.

Brièvement, 30  $\mu$ L de suspension cellulaire précédemment préparée sont ajoutés à 120  $\mu$ L de LMPA (low melting point agarose) 1 %. Par la suite, deux dépôts de 50  $\mu$ L de ce mélange sont réalisés sur une lame préalablement recouverte d'une mince couche de NMPA (normal melting point agarose) 1 %. Les deux gels sont répartis uniformément sur la lame par application de deux lamelles 18x18 mm et laissés solidifier à 4 °C pendant 5 min. Puis, les lamelles sont retirées et deux nouveaux dépôts de LMPA 1 % (sans cellules) sont superposés aux gels précédents et également recouverts de lamelles. Après polymérisation des nouveaux gels à 4 °C durant 5 min, les lames sont placées dans une solution de lyse alcaline (2,5 M NaCl ; 0,1 M EDTA ; 0,01 M Tris ; 1 % Triton X-100 ; pH 10) pendant 1 h à 4 °C ce qui a pour effet de détruire les membranes, les protéines et les ARN (acide ribonucléique), libérant ainsi les noyaux. À partir de cette étape, les lames sont maintenues à l'obscurité pour éviter au maximum toute photodégradation de l'ADN. L'étape de déroulement alcalin consiste à immerger les lames horizontalement (directement dans la cuve d'électrophorèse) dans un tampon alcalin d'électrophorèse (0,3 M NaOH ; 1 mM EDTA ; pH >13) durant 15 min à 4 °C,



**Figure 2.12. Exemples de comètes à différents niveaux d'endommagement de l'ADN**

Une fois révélées par un agent intercalant (BET), les comètes sont visibles sous épifluorescence. Plus l'ADN est fragmenté, plus la queue de la comète sera longue et dense pour atteindre l'aspect d'une cellule hedgehog, dans son cas d'endommagement le plus extrême. A l'inverse, un noyau dont l'ADN est intact apparaîtra comme une sphère bien ronde et intense. Sur cette figure, des cellules dissociées selon le protocole décrit provenant de larves de Medaka âgées de 12 j pf.

ce qui permet la dénaturation et la distorsion de l'ADN ainsi que l'exposition des sites sensibles (dont sites alcali-labiles et les réparations incomplètes par excision) aux agents alcalins. Immédiatement après, l'électrophorèse est lancée pendant 15 min également, sous un courant de 25 V et 300 mA. À la fin de cette étape, les fragments d'ADN ont migré formant des comètes plus ou moins importantes en fonction du nombre de cassures et de la taille des fragments (*Figure 2.12*). Les lames sont ensuite neutralisées à l'aide de trois bains successifs de 5 min chacun dans une solution de Tris 0.4 M (pH 7,5). Enfin, les lames sont déshydratées dans de l'éthanol absolu glacé pour permettre une bonne conservation des lames en attendant la lecture. Les lames peuvent ainsi être simplement stockées à température ambiante et à l'obscurité.

### 6.4.3. Lecture des lames

Au moment de la lecture, 20 µL d'une solution de bromure d'éthidium (BET) sont déposés sur chaque gel et recouverts d'une lamelle 20x20 mm. L'ajout de cet agent intercalant permet la révélation de l'ADN présent sur les gels. L'observation des comètes s'effectue ensuite grâce à un microscope à épifluorescence (Olympus, grossissement 400x) équipé d'une caméra CDD à niveau de gris (Zeiss). Les lames sont codées et lues aléatoirement à l'aide du logiciel Komet 5.5. Un nombre de 75 cellules par gel est analysé. Le pourcentage d'ADN dans la queue (le pourcentage d'ADN ayant migré hors du noyau qui forme la tête de la comète) a été sélectionné en tant que paramètre le plus représentatif du taux d'endommagement de l'ADN de la cellule (Hartmann *et al.*, 2003).

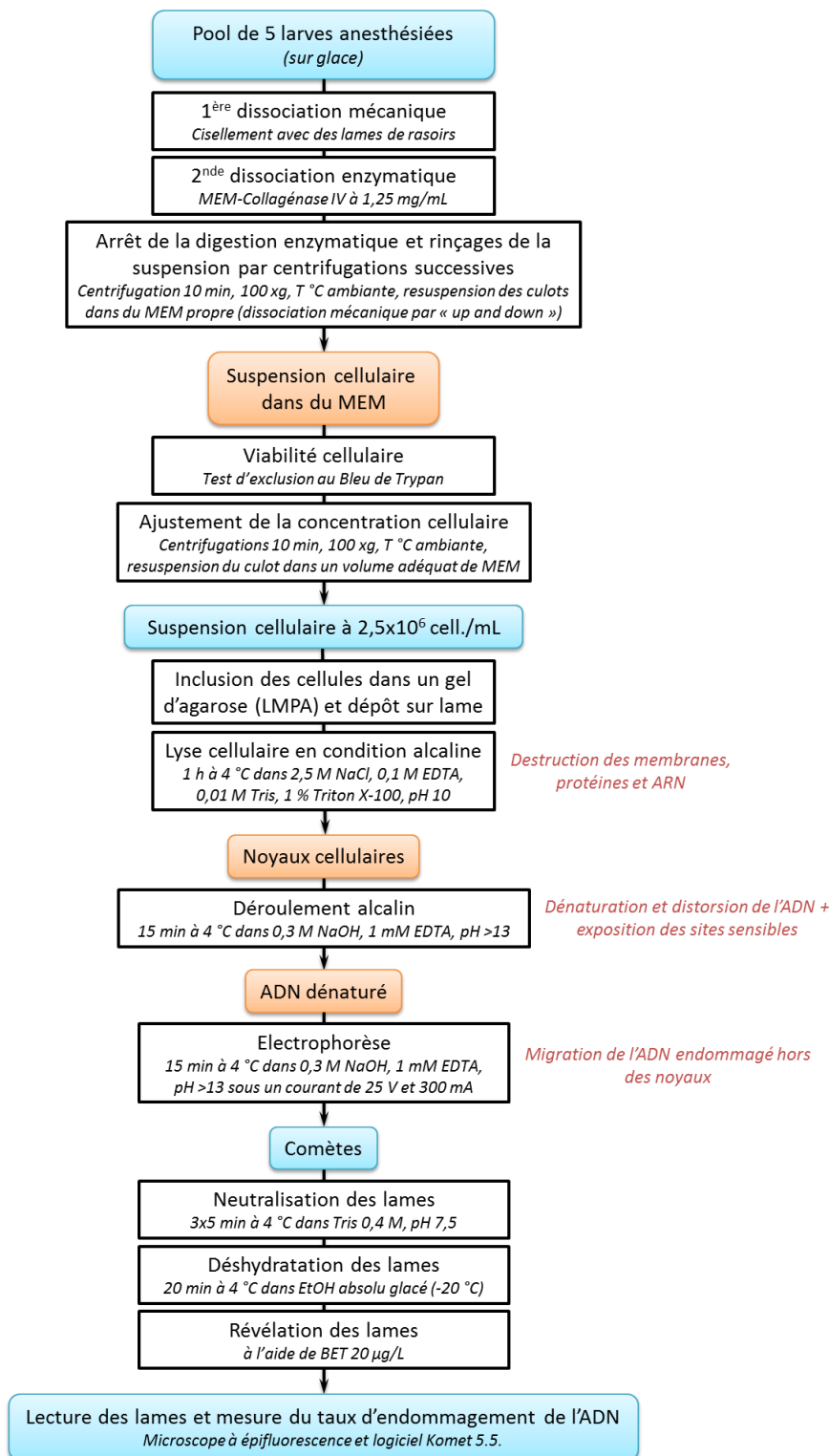
Les noyaux fortement endommagés donnant lieu à des comètes présentant une tête très petite voire inexistante et une longue queue diffuse sont appelées cellules « hedgehog » (*Figure 2.12*). Ces cellules n'ont pas été prise en compte lors de la mesure des comètes, comme le recommande Kumaravel *et al.* (2009), afin de ne pas dépasser les capacités de mesure du système d'acquisition d'image ce qui engendrerait des mesures aberrantes. Les cellules « hedgehog », considérées comme le résultat de cellules apoptotiques ou nécrotiques (Olive & Banath, 1995), ont néanmoins été dénombrées sur un total de 100 cellules par gel.

La *Figure 2.13* propose un schéma global du test Comète depuis la dissociation cellulaire jusqu'à la lecture des lames.

## 7. ANALYSES BIOMOLECULAIRES

---

Afin d'affiner l'analyse de la toxicité des différentes matrices sédimentaires testées, un certain nombre d'analyses moléculaires ont été entreprises dans le but d'étudier plus précisément les mécanismes mis en jeu chez les organismes en présence d'une contamination. En effet, l'induction de mortalité, d'un retard de développement, d'une réduction de la taille ou encore de malformations par une substance ou un mélange de composés est bien souvent le résultat de modes d'action très complexes. C'est dans le but d'explorer plus en détails cet aspect mécanistique que le test MELA a été enrichi de différents marqueurs moléculaires comprenant le dosage des métallothionéines (MT) et l'analyse de l'expression de plusieurs gènes cibles.



**Figure 2.13. Principales étapes de la dissociation cellulaire et du test Comète**

Les larves de Medaka de 48h sont ciselées à l'aide de lames de rasoir. Il s'en suit une dissociation enzymatique dans un mélange de MEM-Collagénase IV à 1,25mg/mL. La digestion enzymatique est arrêtée par centrifugation et élimination du surnageant. Une fois la viabilité de la suspension cellulaire vérifiée, la concentration cellulaire est ajustée à  $2,5 \times 10^6$  cell./mL. La suspension cellulaire est ensuite mélangée à de l'agarose NMPA puis déposée sur lame. La lyse cellulaire est effectuée en condition alcaline et permet de détruire les membranes biologiques, les protéines et les ARN, libérant ainsi les noyaux cellulaires. Les lames sont placées dans le tampon d'électrophorèse pour l'étape de déroulement alcalin puis un champ électrique est appliqué afin de permettre la migration de l'ADN endommagé en dehors des noyaux. Après avoir été rincées dans un tampon de neutralisation, les lames sont révélées avec du BET et les comètes peuvent être mesurées sous épifluorescence à l'aide du logiciel Comet 5.5. La mesure du pourcentage d'ADN dans la queue et du taux de cellules hedgehog donne une évaluation du potentiel génotoxique du sédiment auquel ont été exposés les embryons de Medaka durant leur développement.

Ces marqueurs ainsi que la mesure de la bioaccumulation ont été analysés aux stades embryonnaire et larvaire afin d'étudier les différences de réponses au cours du développement. Le temps de prélèvement sur stade embryonnaire a été défini au jour 7 pf, qui correspond potentiellement à une bioaccumulation stable en HAP (Vicquelin, 2011) et en métaux (Meteyer, 1988) dans le cas d'une exposition débutant dans les 24 premières heures de la fécondation. Par ailleurs, ce jour correspondrait également à une accumulation maximale en métabolites de HAP, selon les travaux d'Hornung *et al.* (2004, 2007), confirmant ainsi que les organes impliqués dans la métabolisation de ces composés sont bien fonctionnels. Le temps de prélèvement sur stade larvaire a été déterminé afin de correspondre au stade éleuthéroembryonnaire recommandé par la réglementation, c'est-à-dire avant 3 jours post-éclosion. Par ailleurs, l'ouverture du tractus digestif dans les heures suivant l'éclosion peut entraîner une excrétion massive des contaminants accumulés. Nous avons donc choisis d'effectuer les différentes analyses moléculaires chez les larves justes écloses (au jour 9 ou 10 pf), avant une détoxification trop importante de l'organisme.

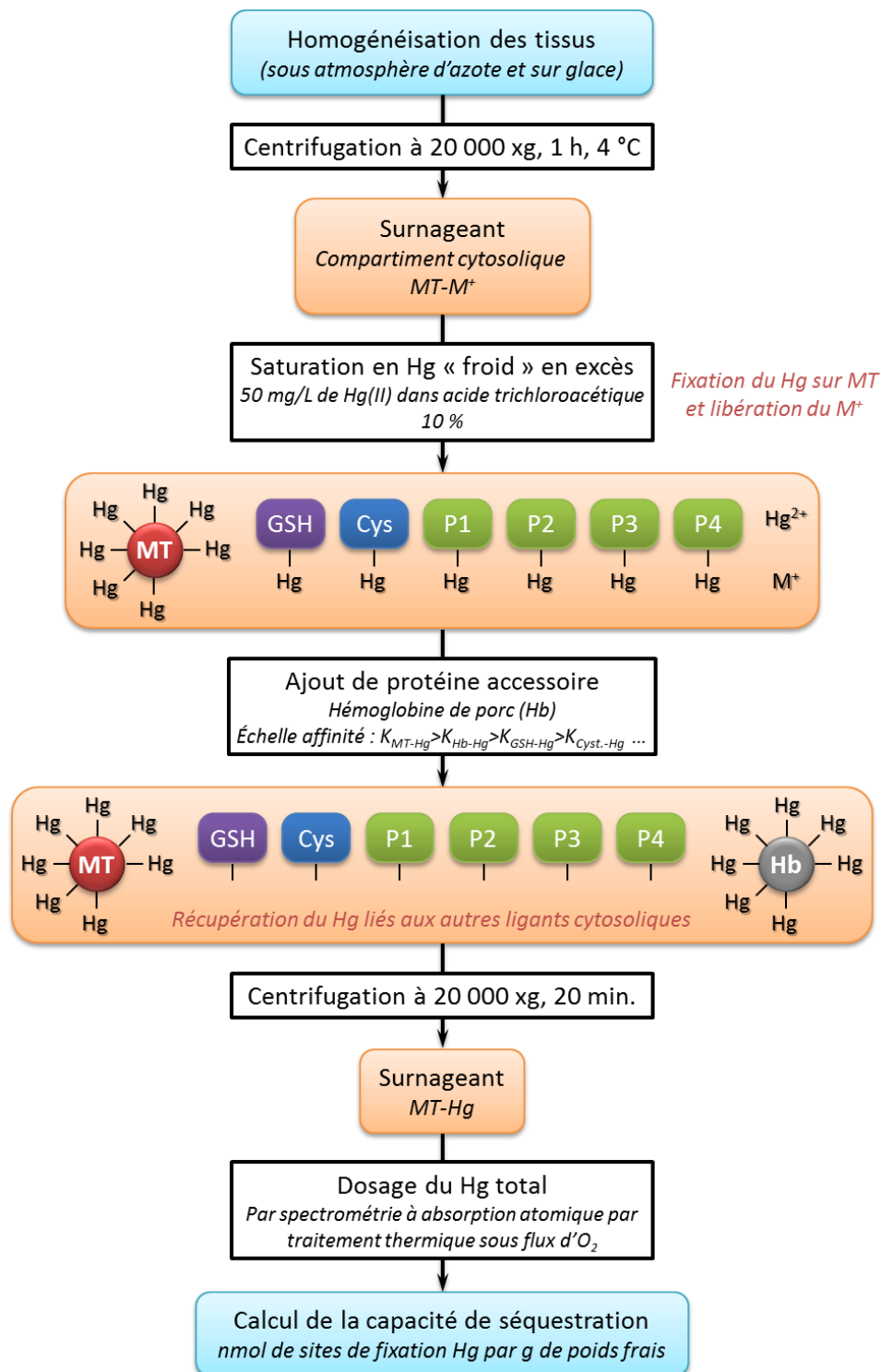
## 7.1. Dosage des métallothionéines (MT)

Les MT sont des protéines dont la capacité de séquestration de certains éléments métalliques leur attribue un rôle essentiel dans la régulation de la teneur en métaux dans l'organisme et les implique également dans les mécanismes de détoxification des xénobiotiques métalliques. Ces protéines sont inductibles par les métaux (Roesijadi, 1992) mais également par d'autres substances comme certains agents oxydants, par exemple (Bauman *et al.*, 1991). Le dosage des MT est depuis longtemps considéré comme un marqueur potentiel de la présence d'une contamination métallique (Roesijadi, 1994). C'est en raison de leur forte teneur en cystéines portant des groupements thiols que les MT ont une si forte affinité pour les éléments métalliques. Le protocole d'extraction et de dosage des MT utilisé dans cette étude est justement basé sur les différences d'affinité des groupements cystéines selon les métaux, en remplaçant l'élément métallique initialement fixé sur la protéine par celui qui présente plus forte affinité de fixation : le mercure, Hg. Celui-ci est ajouté en excès et son dosage par spectrométrie d'absorption atomique permet ensuite de mesurer indirectement la concentration en MT présente dans l'échantillon.

Au cours de ce travail, les teneurs en MT ont été dosées sur un pool de 15 individus par réplicat, sur stade embryonnaire (jour 7 pf) et sur larves nouvellement écloses, selon le protocole adapté de Baudrimont *et al.* (1997) dont le principe général est décrit sur la [Figure 2.14](#).

### 7.1.1. Protocole d'extraction et de purification des MT

La première étape du processus d'extraction des MT consiste à homogénéiser les tissus biologiques à l'aide d'un broyeur mécanique (ULTRA-TURRAX T10 basic, IKA®) dans 300 µl de tampon Tris 10 mM, sur glace et sous atmosphère d'azote. Les MT étant des protéines facilement dégradables, il est essentiel que le broyage s'effectue sur plusieurs courtes périodes (<30 s) afin de ne pas surchauffer l'échantillon. De la même manière, le travail sous atmosphère d'azote empêche l'oxydation des groupements thiols et la présence de glace limite l'action des différentes protéases présentes dans les tissus. Immédiatement après la phase de broyage, l'homogénat est centrifugé 1 h à 20 000 g et à 4 °C. Le surnageant composé de la fraction cytosolique contenant les MT est récupéré et divisé en deux aliquotes de volume égal (100 µL) alors que le culot renfermant les organites, les noyaux et d'autres débris cellulaires est écarté. Dans chaque série d'échantillon,



**Figure 2.14. Principales étapes du protocole de dosage des MT par saturation au Hg "froid"**  
Schéma adapté de Paul-Pont (2010). Le métal (M<sup>+</sup>) fixé aux MT présentes dans l'échantillon biologique est remplacé par du Hg ajouté en excès. Le Hg excédentaire et/ou fixé aux autres ligands cytosoliques est éliminé par complexation à de l'hémoglobine (Hb). Le Hg restant dans l'échantillon est dosé par spectrométrie d'absorption atomique permettant ainsi de déduire la teneur initiale en MT de l'échantillon. GSH : glutathion, Cys : cystéine, P<sub>1-4</sub> : protéines cytosoliques

3 blancs d'extraction (100  $\mu$ L de tampon Tris 10 mM) et 3 étalons MT (100  $\mu$ L d'une solution de MT de foie de lapin, dans du tampon Tris 25 mM, 10  $\mu$ g/mL finaux) sont ajoutés afin de valider respectivement l'absence de contamination et un bon taux de récupération des MT (100  $\pm$  20 % au minimum) au cours des étapes d'extraction.

La saturation en Hg s'effectue ensuite en ajoutant 100  $\mu$ L d'une solution de Hg « froid » (50 mg/L de HgCl<sub>2</sub> dans de l'acide trichloroacétique 10 %) à la fraction cytosolique. Après une rapide homogénéisation, le Hg est laissé en contact de l'extrait pendant 10 min afin qu'il se substitue aux métaux séquestrés par les MT et qu'il sature l'ensemble des sites de fixation des autres composants cytosoliques. D'autre part, la présence d'acide entraîne une précipitation des protéines de haut poids moléculaires alors que les MT restent sous forme dissoute. Enfin, 200  $\mu$ L d'une solution d'hémoglobine (Hb) de porc-Tris 30 mM sont ajoutés afin de complexer l'excès d'Hg en solution ou fixé aux protéines autres que les MT dont la constante d'affinité au Hg est supérieure à celle de l'hémoglobine. De plus, le complexe Hb-Hg précipite en condition acide, ce qui permet de le séparer du complexe MT-Hg au cours d'une centrifugation de 20 min à 20 000 *g* à température ambiante réalisée très rapidement afin d'éviter une éventuelle décomplexation du Hg fixé aux MT. À ce moment-là, le Hg contenu dans le surnageant est exclusivement fixé aux groupements thiols des MT. Le surnageant est alors récupéré et pesé avant d'être stocké à 4°C en attendant le dosage du Hg.

### 7.1.2. Dosage du mercure par spectrométrie d'absorption atomique sans flamme

Le dosage du Hg des extraits biologiques contenant les MT est effectué à l'aide de l'analyseur de mercure AMA-254 (Leco) sous flux d'O<sub>2</sub> permanent. Pour cela, 100  $\mu$ L d'extrait sont déposés dans une nacelle en nickel alors placée sur le passeur d'échantillon automatique (ASS-254, Leco). Pour chaque série de dosages, 3 blancs mesure (nacelles vides) sont ajoutés en début de série ainsi qu'un échantillon certifié Tort-2 (hépatopancréas de homard, NRCCC-CNRC) tous les 10 échantillons. La moyenne des teneurs mesurées en Hg dans les blancs est soustraite aux valeurs mesurées dans les autres échantillons. Les mesures obtenues sur les échantillons certifiés permettent de valider la série de dosages en calculant le taux de recouvrement de Hg dosé *versus* certifié. Lors des analyses effectuées dans ce travail, les taux de recouvrement ont variés de 94 % à 97 %.

En entrant dans l'analyseur, chaque échantillon traverse dans un premier temps le four, dans lequel il va subir une phase de séchage (60 s à 200 °C) et une phase de décomposition (180 s à 600 °C) sous flux d'O<sub>2</sub>. Cette étape de minéralisation permet d'atomiser et de volatiliser les différentes formes d'Hg présentes dans l'échantillon en Hg élémentaire sous forme gazeuse (Hg<sup>0</sup>). Les gaz de combustion, poussés par le flux d'oxygène, traversent ensuite un catalyseur chauffé à 600 °C ce qui complète la combustion et piège les composés halogénés qui pourraient interférer avec le Hg lors du dosage par spectrométrie. En sortie du catalyseur, l'Hg<sup>0</sup> est à son tour piégé sur un amalgame composé d'or. L'Hg<sup>0</sup> ainsi concentré est ensuite relargué par chauffage de l'amalgame et dirigé vers la cellule de lecture où son absorbance est lue à 253,65 nm. La limite de détection est 0,01 ng d'Hg.

En rapportant la concentration en Hg dosée par l'appareil à la quantité d'extrait analysée ainsi qu'aux différents facteurs de dilution appliqués lors des étapes de préparation de l'échantillon, il est possible de calculer la concentration en Hg initialement présente dans l'échantillon et donc effectivement fixée par les MT. Cependant, il existe, chez le poisson, plusieurs isoformes des MT

ayant chacune un nombre de sites de fixation différents. Ne connaissant pas la répartition des différentes isoformes chez les embryons et larves de Medaka japonais, les concentrations en MT sont exprimées en nmol de sites de fixation d'Hg par g de poids frais (p.f.).

## 7.2. Analyses de l'expression de gènes cibles

L'expression génique traduit l'activation d'un gène afin que l'information génétique qu'il contient soit lue et traduite pour aboutir à la synthèse de molécules fonctionnelles qui auront un rôle actif dans le fonctionnement cellulaire, comme les ARN et les protéines en général. Tant que le gène est exprimé, de l'ARN est synthétisé. Par conséquent, on peut dire que la quantité d'ARN synthétisé à partir d'un gène est proportionnelle à son niveau d'activation c'est-à-dire à son niveau d'expression. C'est sur ce principe là que se base l'analyse des profils d'expression génique par qRT-PCR (Retrotranscription polymerase chain reaction ou réaction en chaîne par polymérase après transcription inverse). En effet, il va s'agir d'extraire les ARN totaux, puis de les rétro-transcrire en ADN complémentaire (ADNc). À l'aide d'amorces spécifiques, les gènes d'intérêt seront ensuite amplifiés et quantifiés. Puisqu'issus de la transcription inverse d'ARN, les gènes retro-transcrits seront présents en quantité plus ou moins importante en fonction du niveau d'activation initiale du gène de l'ADN. Dans cette étude, l'expression génique de chaque gène étudié sera rapportée à l'expression d'un gène de ménage (ou gène de référence) dont le niveau d'activation est sensiblement identique dans toutes les cellules de l'organisme, quelles que soient les conditions. Ceci permet de pallier à des variations de quantité d'ARN entre les échantillons liées à l'échantillonnage ou à la manipulation des échantillons.

### 7.2.1. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux issus de 3 pools de 8 individus par réplicats, au stade embryonnaire (7j pf) ou larvaire (juste à l'éclosion), ont été extraits à l'aide de kits « Absolutely RNA® Miniprep kit » (Stratagene, Agilent) selon les instructions du fournisseur. Une étape de purification au phénol-chloroforme a été ajoutée afin d'améliorer la qualité de l'extraction. Par ailleurs, certaines précautions ont été prises en cours de manipulation afin d'éviter toute contamination de la préparation par des protéines RNase qui risqueraient de détruire une partie du matériel extrait. Afin de pallier à cela, en plus du port permanent de gants durant toute la préparation des échantillons, les paillasses de travail sont systématiquement nettoyées à l'éthanol 95% puis décontaminées au RNase Away® (Molecular Bioproducts) avant et après toute manipulation. De plus, l'intégralité du matériel (tubes, potters, embouts de pipette...) pendant toutes les étapes d'extraction des ARN totaux doit être certifiée « RNase et DNase free » par le fabricant ou préalablement décontaminée au RNase Away® puis autoclavée. Il en est de même pour l'eau utilisée pour la préparation des réactifs du kit qui a été traitée au diéthyl-pyrocarbonate (DEPC) 0,1 % (v/v) à 37 °C durant 12 h et autoclavée.

En premier lieu, les tissus biologiques sont immergés dans 600 µL de tampon de lyse contenant du thiocyanate de guanidine qui, en plus de son action de lyse cellulaire, dénature les RNases et DNases les empêchant ainsi d'altérer l'échantillon. Le tampon de lyse est supplémenté avec 4,2 µL de β-mercaptoéthanol qui linéarise les protéines en cassant leurs ponts disulfures. Les tissus sont ensuite broyés au potter dans ce mélange tampon de lyse/β-mercaptoéthanol, puis le broyat est filtré sur une micro-colonne lors d'une centrifugation de 5 min à 13 500 rpm (température ambiante) dans le but d'éliminer les gros débris cellulaires. Le filtrat est alors mélangé à 600 µL de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1 v/v) afin de séparer les protéines, hydrophobes,

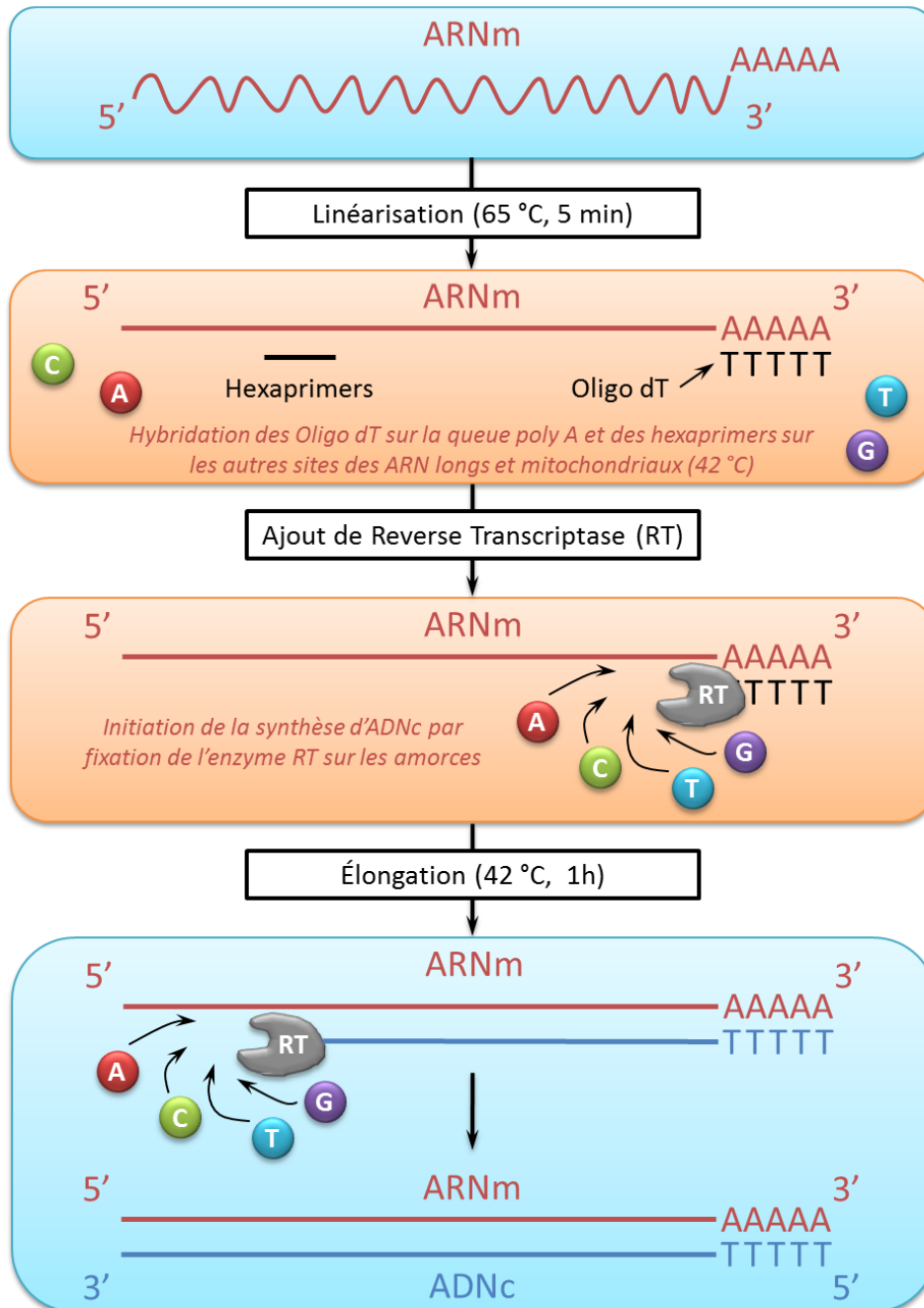


amphiphiles et hydrophiles. En effet, après centrifugation du mélange durant 5 min à 13 500 rpm, l'échantillon se sépare en 3 phases : une phase inférieure jaunâtre contenant les protéines hydrophobes, une galette blanche intermédiaire renfermant les protéines amphiphiles et une phase supérieure transparente composée des protéines d'intérêt hydrophiles, dont les ARN. Le prélèvement précautionneux de cette phase aqueuse permet de laisser de côté jusqu'à 90 % des autres formes de protéines. Un volume équivalent d'éthanol-eau DEPC à 75 % est ajouté à cet extrait aqueux dans le but de favoriser les liaisons ioniques lors du dépôt de l'échantillon sur la micro-colonne d'affinité qui fixe les acides nucléiques. Après centrifugation à 13 500 rpm pendant 1 min et élimination du filtrat, la colonne est rincée avec 600  $\mu$ L de solution faiblement chargée en sels. Deux étapes de centrifugation d'1 min puis de 2 min, à 13 500 rpm en éliminant le filtrat à chaque fois, permettent respectivement de laver et de sécher la colonne. Les ADN fixés à la colonne sont dégradés en présence de 55  $\mu$ L d'un mélange de tampon de digestion-DNase I (10:1 v/v) au cours d'une incubation au bain-marie à 37 °C pendant 15 min. Deux lavages successifs de la colonne sont alors effectués, le premier avec 600  $\mu$ L d'une solution fortement concentrée en sels qui diminue la force ionique et favorise l'élimination des restes de DNase et de fragments d'ADN, le second avec 300  $\mu$ L de solution faiblement chargée en sels permettant de revenir à une salinité normale. Chaque rinçage est suivi d'une centrifugation à 13 500 rpm durant 1 min et 2 min respectivement. A ce stade, les ARN totaux purifiés sont encore fixés sur la colonne d'affinité. 30  $\mu$ L de tampon d'élution chauffé à 55 °C sont déposés en tête de colonne et laissés incubés 2 min à température ambiante. Enfin, les ARN totaux sont récupérés au fond du tube par centrifugation de l'ensemble 1 min à 13 500 rpm. Les échantillons sont stockés à -80 °C avant utilisation pour la rétro-transcription.

### 7.2.2. Rétro-transcription (RT)

Le processus de RT permet de synthétiser un brin d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'ARN grâce à une ADN polymérase ARN-dépendante appelée reverse transcriptase. Cette étape est incontournable puisqu'elle permet d'une part de conserver l'information génétique de l'échantillon sous forme ADN, plus stable et donc moins facilement dégradable, et d'autre part d'effectuer par la suite la procédure d'amplification par PCR et de remonter ainsi jusqu'à l'expression génique. Pour la rétrotranscription, les kits « AffinityScript™ Multiple Temperature cDNA Synthesis kit » (Stratagene, Agilent) ont été utilisés. Les principales étapes de la rétro-transcription sont illustrées sur la [Figure 2.15](#).

Dans un premier temps, 1  $\mu$ L d'oligo dT (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L d'hexaprimer (0,1  $\mu$ g/ $\mu$ L), 0,8  $\mu$ L de dNTPs 100 mM (25 mM chaque) et 2  $\mu$ L de Tampon d'activité AffinityScript™ sont mélangés à 14  $\mu$ L d'ARN totaux précédemment extraits. L'ensemble est placé dans le thermocycleur (Mastercycler pro™) à 65 °C pendant 5 min, ce qui linéarise tout d'abord l'ARN puis permet l'hybridation des amorces (oligodT et hexaprimers) sur les brins d'ARN lorsque la température redescend à 45 °C en fin de cycle. La seconde étape permettant la synthèse des brins d'ADNc (phase d'élongation) consiste à ajouter tout d'abord 0,5  $\mu$ L de RNase block (inhibiteur de RNase) et 1  $\mu$ L de reverse transcriptase à chaque échantillon puis de les placer à 42 °C durant 1 h dans le thermocycleur. Durant cette phase, les amorces oligo dT hybridées sur la queue poly A des ARNm d'intérêt lors de la première étape permettent, grâce à leur extrémité 3'-OH libres, d'initier la transcription inverse qui utilisera les désoxyribonucléotides dNTP (G, A, C et T) ajoutés au début de la RT pour synthétiser l'ADNc.



**Figure 2.15. Grandes étapes de la rétro-transcription de l'ARN en ADNc**

L'ARN est linéarisé à 65 °C, puis lorsque la température redescend aux alentours de 45 °C, les oligo dT et les hexaprimers s'hybrident à l'ARN. Après ajout de l'enzyme reverse transcriptase, la température est maintenue à 42 °C durant 1 h, ce qui permet à la reverse transcriptase de synthétiser le brin d'ADN complémentaire (ADNc) en utilisant les désoxyribonucléotides dNTPs préalablement ajoutés. C'est la phase d'élongation.

### 7.2.3. Design et contrôle de la qualité des amorces

#### 7.2.3.1. Design des amorces et PCR

Les séquences des amorces nécessaires à l’amplification spécifique des gènes d’intérêt ont été déterminées à partir des séquences codantes rapatriées depuis la banque de données GenBank (via pubmed-NCBI) et HGNC (Ensembl, EMBL – EBI) en utilisant le logiciel LightCycler probe design v1.0 (Roche). Les paires d’amorces (15 à 20 paires de bases) ont été choisies de manière à ce que leur température de fusion (ou température d’hybridation, Tm) soit proche les unes des autres et aux alentours de 65 °C, et que la taille de l’amplicon (150 paires de bases minimum) permette une bonne identification de l’ARNm correspondant. Les séquences des amorces utilisées pour les amplifications des gènes d’intérêt étudiés dans ce travail ont été synthétisées par Sigma-Aldrich (Fast Oligo™) et sont présentées dans le **Tableau 2.2**.

**Tableau 2.2. Séquences des amorces utilisées pour les amplifications des gènes d’intérêt au cours de l’étude**

Gène d’intérêt	Numéro d’accès NCBI ou Ensembl	Séquence des amorces
<i>β-actine</i>	S74868	GTGACCCACACAGTGCC <sup>a</sup> /GCGACGTAGCACAGCTTC <sup>b</sup>
<i>rpl7</i>	NM_001104870	AACGTGGCTACGGCAG <sup>a</sup> /CGAGGTGACGACAGCTT <sup>b</sup>
<i>18s</i>	AB105163	GCAATAACAGGTCTGTGATGCC <sup>a</sup> /CGCGAGCTTATGACCCG <sup>b</sup>
<i>cox 1</i>	NC_004387 (gene ID 805432)	TCCCCCAACACTTCTTAGGC <sup>a</sup> /TGTGGCTGTAGTTCCGACTGA <sup>b</sup>
<i>nd5</i>	NC_004387 (gene ID 805441)	ACCCTCCCCTTACTCGG <sup>a</sup> /AGCAAAGGCAGGTGGAC <sup>b</sup>
<i>p53</i>	AF212997	TCTGGCACTGCAAAGTCTGT <sup>a</sup> /CCTCGTTTTGGTGGTGGG <sup>b</sup>
<i>mt</i>	AY466516	ACAAACTGCTCCTGCACC <sup>a</sup> /ACTGACAACAAGTAGTGTCCG <sup>b</sup>
<i>cyp1A</i>	AY297923	CTCCCTTTCACAATTCCACACT <sup>a</sup> /TGCAACGCCGCTTTCC <sup>b</sup>
<i>rad51</i>	ENSORLG00000017821	CGCATGCTGCTGCGACTG <sup>a</sup> /TTCCCTCGACCTTTCCTC <sup>b</sup>
<i>wnt1</i>	AJ243208	CCGCTTTGACGGAGCAT <sup>a</sup> /TTGAACCCACGCCACAGC <sup>b</sup>
<i>sod(Mn)</i>	ENSORLG00000013261	ATGGCTGGGCTATGACAAAG <sup>a</sup> /TGGCTATCTGAAGACGCTCAC <sup>b</sup>
<i>sod(Cu)</i>	ENSORLG00000008041	GGGAAATGTGACCGCAGG <sup>a</sup> /GCCAAACGCGCTCCAG <sup>b</sup>
<i>bax</i>	ENSORLG0000000456	TCTTCGCTCAGTCCCTCC <sup>a</sup> /GCCAACGTCTGCCAGCA <sup>b</sup>
<i>ogg1</i>	ENSORLG00000010758	CTCGTATTCAGGGCATGGT <sup>a</sup> /ACCCGTGGCTGTCTAAG <sup>b</sup>
<i>emx2</i>	ENSORLG00000014157	CCATTACGTGGTGGGAGCA <sup>a</sup> /GGGCTCGCTGTTTGTAG <sup>b</sup>
<i>raldh2</i>	NM_001104821	GCCGCTCACCTGTCTCTAT <sup>a</sup> /TCCCTGCCGCTCTTG <sup>b</sup>
<i>rara1</i>	EF546452	GCATCATCAAGACGGTGGAG <sup>a</sup> /GGCGAAAGCGAAAACCAGG <sup>b</sup>
<i>rary1</i>	EF546454	CTCGTGTCTACAAACCCTGC <sup>a</sup> /ATGCCGACCTCGAAGC <sup>b</sup>
<i>rxra1</i>	EF537036	GGGTGCCTTCGAGCCA <sup>a</sup> / CCGTAACCGCAGCAACAGT <sup>b</sup>

(a) : amorce sens (5' → 3') ; (b) : amorce anti-sens (3' → 5')

#### 7.2.3.2. Contrôle de la qualité des couples d’amorces

Chaque paire d’amorces a été testée afin de contrôler leur spécificité et la bonne amplification des gènes d’intérêt. Pour cela, une série d’amplifications a été effectuée sur de l’ADNc rétro-transcrit à partir de l’ARN extrait de pools de larves ou d’embryons de Medaka. Les PCR quantitatives ont été réalisées à l’aide du LightCycler® (Roche) selon le protocole décrit plus loin (voir *paragraphe 7.2.4.1*). Les courbes de fusion sont examinées pour chaque gène amplifié. Les amplicons ont ensuite été visualisés après migration sur gel par électrophorèse.

Dans cette optique, un gel d’agarose à 1 % a été préparé en diluant 0,5 g de NMPA dans 50 mL de tampon TAE-1X (40 mM de Tris-Base, 20 mM d’acide acétique, 2 mM de Na<sub>2</sub>EDTA:2H<sub>2</sub>O), et auquel a été ajouté, 1 µL d’une solution de BET 10mg/mL. Le gel est ensuite délicatement déposé dans une cuve d’électrophorèse contenant du tampon TAE-1X. Par la suite, 5 µL d’amplicon mélangés à 5 µL de bleu de charge sont déposés dans un puits du gel d’agarose. 5 µL de marqueur de taille (Kb DNA ladder, Agilent) sont également déposés sur gel pour mesurer la taille des différents fragments

PCR. La migration est finalement lancée sous un champ électrique de 100 V pendant 30 min. Le gel est ensuite retiré de la cuve d'électrophorèse puis placé sur table UV (GelDoc, BioRad) pour visualiser les fragments PCR.

Pour chaque amplification, la qualité de l'amplicon est évalué en observant (1) l'allure de la courbe de fusion (*Figure 2.16.a*) obtenue par qPCR qui ne doit présenter qu'un seul pic bien dessiné et (2) le profil de la migration électrophorétique de l'amplicon qui doit également ne montrer qu'une seule bande de migration, elle aussi bien nette (*Figure 2.16.b*). Les couples d'amorces ne produisant pas d'amplicon de qualité suffisante sont écartés et de nouvelles amorces sont dessinées.

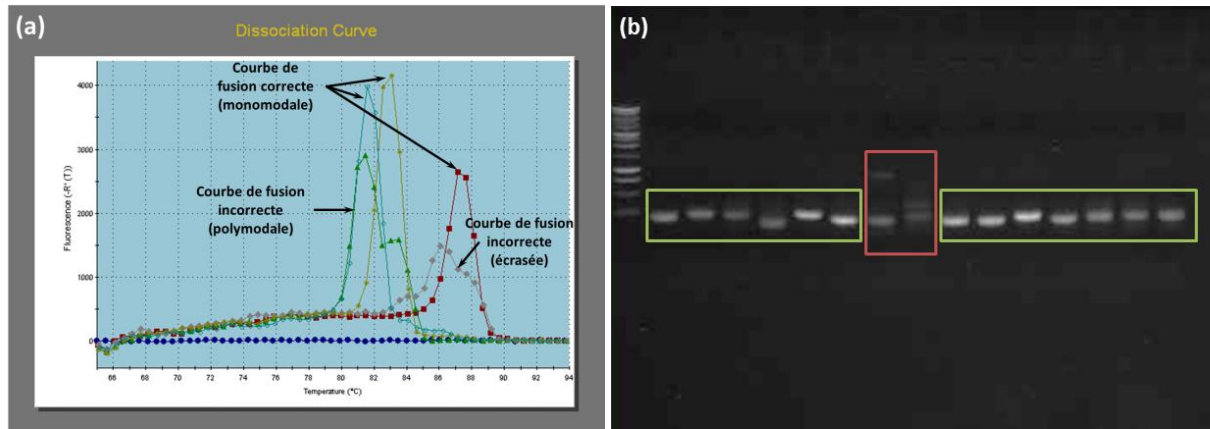
#### 7.2.4. PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Les niveaux d'expression des gènes d'intérêt préalablement sélectionnés ont été analysés grâce à l'utilisation de la qPCR en temps réel. Avant d'évoquer les spécificités de cette technique, il est bon de rappeler le principe général de la PCR. Cette technique permet d'amplifier spécifiquement une région d'intérêt de l'ADN (ou d'un gène) pour en obtenir une quantité suffisante pour pouvoir l'étudier, grâce à une enzyme de type ADN polymérase appelée Taq polymérase (issue de la bactérie *Thermus aquaticus*). Cette enzyme est capable de synthétiser une copie complémentaire d'une séquence d'ADN très rapidement (plus de 1000 paires de bases par minute). L'enzyme est placée en présence de  $MgCl_2$  (un co-facteur de la Taq polymérase), d'un tampon d'activité, des amorces sens et anti-sens du gène d'intérêt, de dNTPs et bien sûr de l'ADNc que l'on souhaite étudier. Puis, le mélange réactionnel va subir différents cycles thermiques comprenant trois étapes (*Figure 2.17*) :

- ✓ La phase de dénaturation : séparation du double brin de l'ADN en deux fragments d'ADN simple brin à **95 °C** durant environ 30 s à quelques minutes.
- ✓ La phase d'hybridation : fixation des amorces sur les zones spécifiques encadrant le segment d'ADN d'intérêt à amplifier durant 30 s environ **entre 55 et 65 °C** selon la  $T_m$  de l'amorce considérée
- ✓ La phase d'élongation : synthèse du brin d'ADN complémentaire par la Taq polymérase à **72 °C** pendant 1 min.

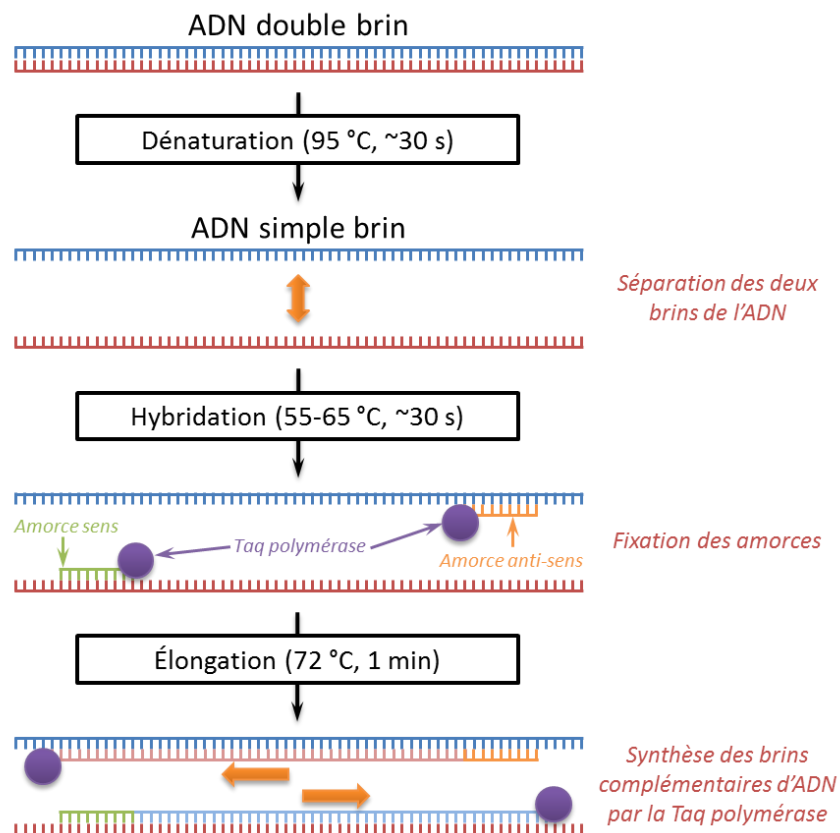
Le cycle de température est répété de 35 à 55 fois ; le nombre de cycles étant fixé en fonction de la quantité de copies du gène étudié présentes initialement dans l'échantillon. Au bout du 3<sup>ème</sup> cycle, les séquences d'ADN amplifiées correspondent exactement à la portion du gène encadré par les amorces. La technique de qPCR en temps réel est une évolution de la PCR « classique », basée sur le même principe, qui permet de suivre et de quantifier les amplifications des gènes ciblés en temps réel au cours de la réaction, grâce à un agent intercalant appelé SYBR Green I. Ce fluorophore a la propriété de n'émettre de la fluorescence que lorsqu'il est intercalé entre les bases d'une séquence nucléotidique double brin, ce qui en fait un produit de choix lors de l'application de la qPCR. En effet, les thermocycleurs utilisés pour la qPCR sont équipés d'un spectrophotomètre mesurant la fluorescence verte à 530 nm émise par le SYBR Green I en fin de chaque phase d'élongation. Puisque l'intensité de la lumière émise est proportionnelle au nombre de copies du fragment amplifié, l'appareil est alors capable de suivre leur production en temps réel tout au long de la PCR, permettant l'établissement d'une courbe d'amplification comme illustré sur la *Figure 2.18*.

De plus, une fois la phase d'amplification terminée, l'appareil procède à la détermination de la courbe de fusion de chaque amplicon. Pour cela, la température est élevée de 65 °C à 95 °C



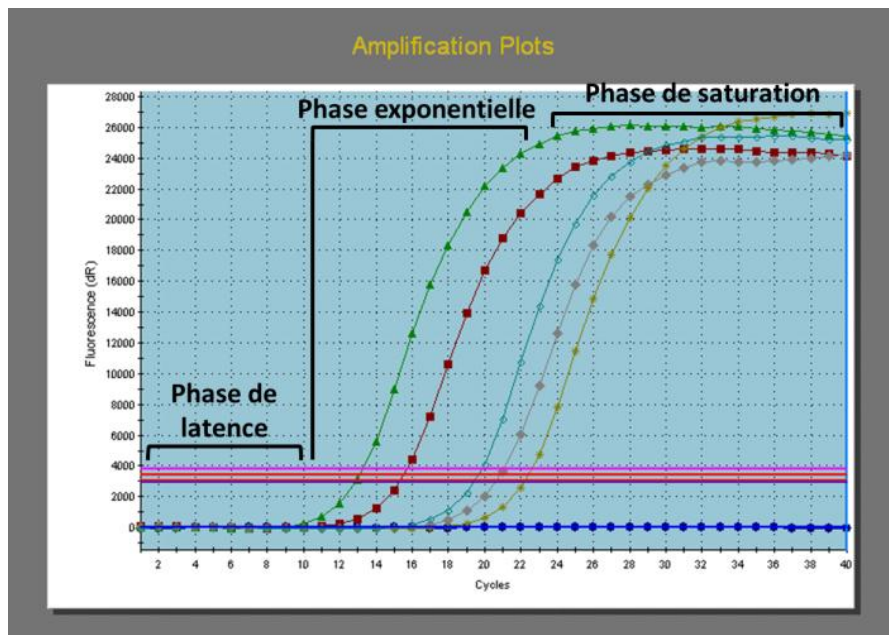
**Figure 2.16. Exemple de courbes de fusion (a) et de migration d'amplicons sur gel d'agarose après électrophorèse (b)**

L'analyse de la courbe de fusion (a) permet d'évaluer la qualité de l'amplification. Une courbe polymodale (plusieurs pics) indiquera par exemple une mauvaise spécificité du couple d'amorces utilisé. Une amplification spécifique de bonne qualité se traduit par un seul pic, bien net, sans épaulement. Une analyse des gels issus de la migration des amplicons (b) permet de confirmer ou d'infirmer la bonne qualité des couples d'amorces choisis. Si l'amplicon ne contient qu'une seule séquence amplifiée en bonne quantité, le produit PCR apparaîtra nettement sous la forme d'un seul trait de bonne densité lumineuse (cadre vert). A l'inverse, si plusieurs bandes apparaissent après électrophorèse, cela sous-entend qu'il y a plusieurs amplicons (cadre rouge).



**Figure 2.17. Grandes étapes d'un cycle de PCR**

L'ADN est tout d'abord dénaturé à 95 °C, puis la température redescend jusqu'à atteindre la  $T_m$  d'hybridation des amorces (entre 55 °C et 65 °C selon la composition des amorces en bases A, C, T et G). Enfin, la température remonte jusqu'à 72 °C, température optimale pour la synthèse des brins d'ADN complémentaires par la Taq polymérase à partir des extrémités 3'-OH libres des amorces.



**Figure 2.18. Exemples de courbes d'amplification obtenues par qPCR sur le Light Cycler®**

Une courbe d'amplification se décompose en trois parties : une première phase de latence où la luminescence est basse, proche du niveau basal. La seconde est la phase exponentielle durant laquelle le gain en luminescence est maximal (i.e. le nombre de copies augmente très rapidement). Enfin, la phase de saturation marque la fin de la période d'amplification : la luminescence reste stable car il n'y a plus de réactifs disponibles et donc plus de copie de l'ADN.

progressivement (environ 0,1 °C/s) tout en suivant l'évolution de la luminescence au cours de la montée en température. En arrivant à la température  $T_m$  de l'amplicon, la luminescence chute de façon brutale correspondant à la dénaturation spécifique du fragment amplifié, libérant ainsi le SYBR Green I qui cesse alors d'émettre de la fluorescence. Ainsi, lorsque l'amplification est de bonne qualité, la courbe de fusion (classiquement représentée par  $-\frac{dLuminescence}{dt}$  en fonction de la température) doit présenter un pic unique et franc, signe d'une amplification efficace (en terme de quantité) et mono-spécifique (*i.e.* un seul gène amplifié par amplicon). Une fois la montée en température complète effectuée, l'appareil redescend à 40 °C rapidement (environ 20 °C/min) afin de reformer les séquences d'ADN double brins afin que les amplicons puissent servir ultérieurement. De plus, il est fréquent que le run d'amplifications soit précédé d'une phase d'activation de l'enzyme d'une dizaine de minutes à 95 °C car la Taq polymérase utilisée est fourni sous forme « hot start » (c'est-à-dire sous forme inactivé par le biais d'une molécule inhibitrice qui doit être dégradée à 95 °C avant que l'enzyme ne puisse agir).

Les caractéristiques précises de chaque cycle (durée et température de chaque phase), de chaque run (nombre de cycle) est paramétré selon le type de thermocycleur, la nature des réactifs utilisés et des ADN utilisés (qualité, quantité...). Pour des raisons techniques, deux appareils PCR différents ont été utilisés au cours de ce travail. Les paramètres appliqués et les réactifs utilisés au cours des amplifications effectuées dans le cadre de cette thèse sont décrits dans les paragraphes ci-dessous.

#### 7.2.4.1. Le Light Cycler® (Roche)

Les premières amplifications en qPCR (test des amorces et exposition au Cd) ont été réalisées à l'aide d'un LightCycler® (Roche) et de kits de réactifs « fastStart Taq DNA Polymerase dNTPack » (Roche) en suivant les instructions du fournisseur. Brièvement, les réactions de PCR sont préparées dans des capillaires en verre en présence de :

- ✓ 1 µL de tampon 1b activé (contenant la Tap polymérase sous forme « hot start », les dNTPs, le SYBR Green I et le tampon d'activité)
- ✓ 3,2 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
- ✓ 12,8 µL d'eau ultra-pure
- ✓ 2 µL de mélange d'amorces sens et anti-sens (3 µM)
- ✓ 1 µL d'ADNc

Les capillaires sont placés sur un carrousel puis centrifugés pour mélanger tous les réactifs et les faire culoter en bas des capillaires. Le tout est placé dans le thermocycleur pour subir les traitements thermiques suivants :

- ✓ Étape d'activation de l'enzyme de 10 min à 95 °C
- ✓ Étape d'amplification : 45 cycles comprenant une phase de dénaturation (5 s à 95 °C), une phase d'hybridation (5 s à 60 °C) et une phase d'élongation (20 s à 72 °C)
- ✓ Courbe de Fusion : 0 s à 95 °C (20 °C/s), 65 °C (20 °C/s) pendant 15 s puis montée en température jusqu'à 95 °C à raison de 0,05 °C/s (10 min)

- ✓ Etape de refroidissement : abaissement de la température (20 °C/s) jusqu'à 40 °C et maintien pendant 30 s

Les résultats sont visualisés à l'aide du logiciel LightCycler Run 5.32 (Roche).

#### 7.2.4.2. Le MX3000P (Stratagene)

Par la suite, les amplifications ont été effectuées avec le Mx3000P (Stratagene) en utilisant les kits de réactifs « Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix » (Agilent) qui permet d'amplifier plus d'échantillons à la fois (ici, sur microplaque 96 puits *versus* un carrousel de 32 capillaires pour le LightCycler®), même si les runs sont plus longs. Dans chaque puits de la microplaque sont déposés successivement :

- ✓ 10 µL de Tampon 2X SYBR® Green (contenant la Tap polymérase sous forme « hot start », les dNTP, le SYBR Green I, le tampon d'activité et le MgCl<sub>2</sub>)
- ✓ 7 µL d'eau Ultra-pure
- ✓ 2 µL de mélange d'amorces sens et anti-sens (2 µM)
- ✓ 1 µL d'ADNc.

La microplaque est ensuite centrifugée pour mélanger tous les réactifs et les faire tomber au fond des puits puis placée dans le thermocycleur pour suivre les traitements thermiques suivants :

- ✓ Étape d'activation de l'enzyme de 10 min à 95 °C
- ✓ Etape d'amplification : dénaturation (30 s à 95 °C), hybridation (40 s à 60 °C) et élongation (30 s à 72 °C) – 50 cycles
- ✓ Courbe de Fusion : 1 min à 95 °C, 65 °C pendant 30 s puis montée en température jusqu'à 95 °C à raison de 0,1 °C/s

Les résultats sont visualisés à l'aide du logiciel MxPro™ QPCR Software (Stratagene).

#### 7.2.4.3. Exploitation des résultats

Les deux logiciels fournissent, en fin d'amplification, les Ct de chaque amplicon. Les Ct correspondent au nombre de cycles nécessaires pour que la luminescence émise dépasse significativement le niveau basal et permette une quantification par les appareils de mesure associés. Ce nombre de cycle de PCR est appelé "Ct" en référence à "Cycle Threshold" qui signifie cycle seuil. Plus le nombre de copies initiales du gène d'intérêt est important, plus le Ct sera faible, et inversement.

Dans les présents travaux, les expressions géniques (E) sont exprimées par rapport à celle d'un gène de référence selon la formule suivante :

$$E = 2^{-\Delta Ct} \text{ avec } \Delta Ct = Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{gène de référence}}$$

Les facteurs d'induction (FI) seront ensuite calculés pour chaque gène d'intérêt et chaque traitement en divisant l'expression génique moyenne ( $\bar{E}$ ) de la condition contaminée par celle du groupe témoin :

$$FI = \frac{\bar{E}_{\text{contaminé}}}{\bar{E}_{\text{témoin}}}$$



## 8. TRAITEMENT ET ANALYSE STATISTIQUES DES RESULTATS

---

Lorsque plusieurs données sont acquises au sein d'une même unité expérimentale (*i.e.* réplicat), elles sont moyennées pour obtenir la valeur représentative d'un réplicat. Par la suite, les réplicats sont considérés comme des échantillons indépendants les uns des autres. Les tests statistiques employés pour mettre en évidence des différences significatives entre les différents traitements (exposés et contrôle) sont donc des tests adaptés à la comparaison de plusieurs moyennes issues d'échantillons indépendants.

Les jeux de données issus de chaque série d'exposition sont traités indépendamment les uns des autres. Seuls les résultats obtenus pour un paramètre au cours d'une même expérience sont comparés les uns aux autres. Tous les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse ont été analysés en fonction des caractéristiques du jeu de données de chaque paramètre en suivant l'arbre de décision présenté sur la [Figure 2.19](#), adaptée de Clérandeau (2007). Les tests paramétriques sont privilégiés au cours du traitement des résultats pour leur meilleure sensibilité et robustesse. Lorsque les conditions de normalité et d'homogénéité des variances ne sont pas respectées, le jeu de données est transformé pour tenter de vérifier ces modalités d'application. Si la transformation des données s'avère infructueuse, des tests non-paramétriques sont alors utilisés.

Seules les expressions géniques (E) ont subi un traitement statistique légèrement différent qui a permis une meilleure discrimination des résultats. Dans ce cas, l'ANOVA (analyse de variance et test *post-hoc* de Tukey) a été remplacée par le test *t* pour échantillons indépendants et chaque valeur obtenue pour les groupes contaminés été comparée au groupe contrôle.

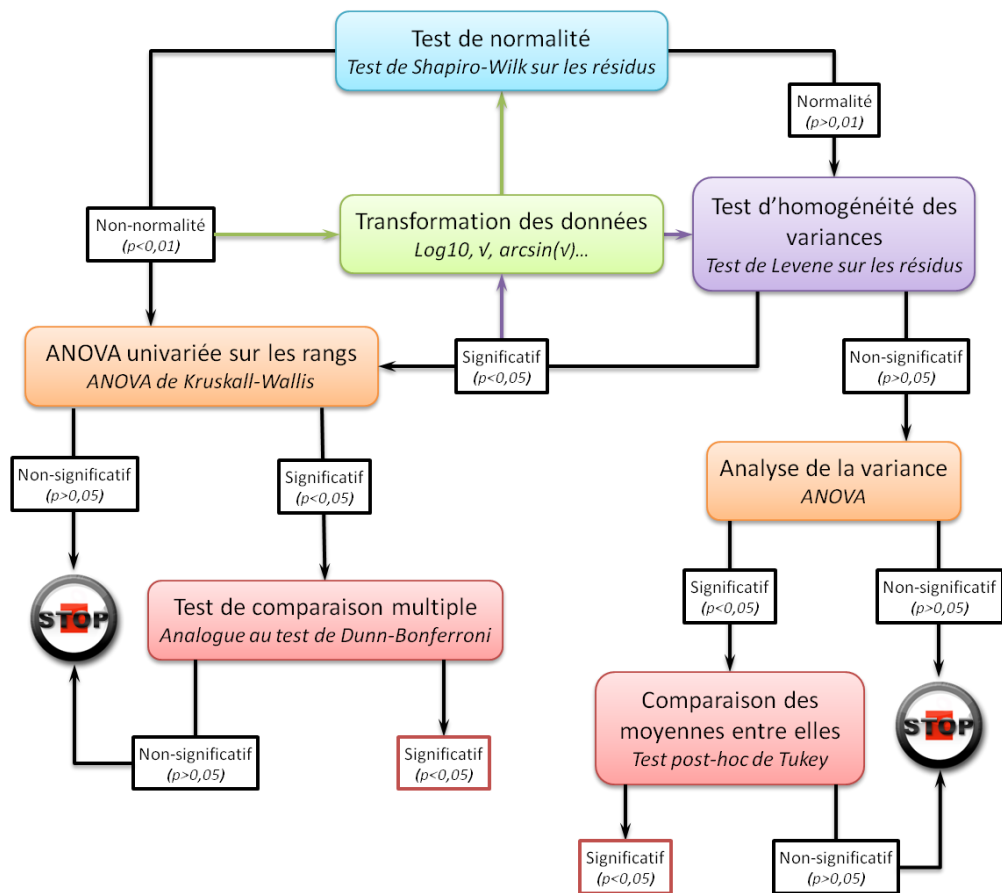


Figure 2.19. Arbre de décision utilisé lors du traitement statistique des résultats

---

*Chapitre 3. ANALYSE DES EFFETS  
TOXIQUES DU CUIVRE ET DU  
CADMIUM SUR LE  
DEVELOPPEMENT DU MEDAKA  
JAPONAIS*

---



## Chapitre 3. Analyse des effets toxiques du Cuivre et du Cadmium sur le développement du Medaka japonais

Le test embryo-larvaire Medaka a initialement été développé pour caractériser le spectre de toxicité de composés hydrophobes. La problématique de ces travaux, effectués dans le cadre du projet Toxseine (programme Seine-Aval IV), reposait sur un contexte écologique particulier, celui de l'estuaire de Seine. Les substances modèles utilisées lors du développement du bioessai ont donc été choisies en fonction de la contamination des écosystèmes de ce milieu et comprenaient des HAP, des PCB (coplanaires et non-coplanaires) et des alkylphénols (Vicquelin, 2011). De la même manière, le sédiment de référence utilisé comme témoin négatif et matrice d'enrobage lors de cette étude provenait d'une ancienne gravière située dans un des méandres de la Seine à proximité d'Yville-sur-Seine.

Le chapitre suivant propose une adaptation de ce test à un autre environnement d'étude présent en région Aquitaine, le continuum Lot-Garonne-Gironde et sa contamination historique en éléments traces métalliques. Dans cette optique, il a tout d'abord fallu sélectionner un nouveau sédiment de référence représentatif du système étudié. Par la suite, la matrice sédimentaire retenue a été utilisée pour évaluer l'applicabilité du test MELA à la mesure de la toxicité du cuivre (Cu) et du cadmium (Cd), deux éléments métalliques modèles hydrosolubles mais ayant néanmoins une forte capacité de fixation sur les particules sédimentaires. Enfin, dans une troisième série d'expositions, le bioessai a été enrichi de plusieurs analyses moléculaires afin d'étudier plus en détail les mécanismes d'action d'un élément trace modèle dont la toxicité est avérée, le Cd. Avant de présenter les résultats expérimentaux de ces différentes expositions, la première partie de ce chapitre propose une synthèse générale des effets toxiques des métaux chez les organismes aquatiques rapportés dans la littérature. Une attention toute particulière sera portée sur les deux composés étudiés dans ce chapitre.

### 1. GENERALITES SUR LA TOXICITE DES ELEMENTS TRACES METALLIQUES CHEZ LES ORGANISMES AQUATIQUES

---

#### 1.1. Transfert des éléments métalliques aux organismes aquatiques

##### 1.1.1. Généralités

Les principales voies d'absorption des métaux par les organismes aquatiques sont les branchies (voie respiratoire), le tube digestif (voie trophique) et, dans une moindre mesure, la peau (voie transcutanée) et l'épithélium du système olfactif. Bien entendu, le mode de passage de l'élément métallique au travers des différentes barrières biologiques qu'il rencontre dépend de la spéciation chimique du métal (donc des conditions physico-chimiques du milieu), de l'organe par lequel l'absorption a lieu (donc de la voie d'exposition) et de l'organisme concerné (McGeer *et al.*, sous presse).

Dans un premier temps, l'élément métallique, sous forme ionique ou complexée, va diffuser depuis le milieu extérieur en direction de la surface biologique (**phase de diffusion**). Cette étape est rarement limitante dans l'assimilation des métaux sauf lorsque l'élément métallique est présent sous forme particulaire ou colloïdale. Dans ce cas, la phase de diffusion sera contrôlée par la labilité chimique et la mobilité physique du complexe.

Lorsque le métal atteint l'interface entre le milieu extérieur et la membrane biologique, il va pouvoir se lier à différents ligands (lipophiles ou hydrophiles) grâce à sa grande affinité notamment pour les groupements soufrés des protéines à la surface de la membrane (**phase de complexation**).

L'étape clé du processus d'assimilation des métaux est la **phase d'internalisation** durant laquelle le composé va effectivement entrer dans l'organisme. Nous distinguerons quatre mécanismes principaux de transport des éléments métalliques (Worms *et al.*, 2006 ; Campbell *et al.*, 2002) :

- ✓ La diffusion passive : ce mécanisme est basé sur l'existence d'un gradient de concentrations entre le milieu extérieur et intérieur (biologique) et dépend du coefficient de partage de l'élément métallique entre les phases aqueuse et lipidique. Seules les molécules neutres ou apolaires sont concernées par ce type de transport étant donné le caractère globalement hydrophobe des membranes biologiques. Ce n'est donc pas la voie d'internalisation préférentielle de la majorité des espèces métalliques qui sont hydrophiles.
- ✓ Les transporteurs anioniques : de nombreux mécanismes de transport relativement peu sélectifs existent permettant l'assimilation de nutriments inorganiques (phosphates, sulfates) ou d'anions organiques (aminoacides, ions carboxylates). Dans certains cas, ces anions peuvent former des complexes avec les ions métalliques tout en gardant une charge totale négative. Ainsi, les éléments métalliques peuvent traverser « accidentellement » les membranes biologiques par l'intermédiaire des transporteurs d'anions.
- ✓ Les canaux transmembranaires ou pompes transmembranaires protéiques : ces catégories de transporteurs permettent le maintien de l'homéostasie des éléments traces essentiels (Zn, Cu, Fe, Mg, Na...) dans les compartiments cellulaires. Les transports peuvent être passifs en reposant sur le principe de diffusion facilitée (canaux transmembranaires) ou actifs en consommant de l'énergie (ATP) pour transporter les métaux vers l'intérieur de l'organisme (pompes transmembranaires). Ces processus peuvent également être impliqués dans le transport des métaux non-essentiels qui sont pris en charge par mimétisme avec l'oligoélément qu'ils sont censés transporter. Les métaux présents dans la phase dissoute sont principalement internalisés par cette voie, en particulier le Cd qui peut se substituer au Ca.
- ✓ L'endocytose : ce processus va concerner majoritairement les éléments métalliques sous forme particulaire et le cas d'une ingestion de la particule. L'internalisation du complexe métallique repose alors sur la fixation de la particule à la surface membranaire puis l'invagination de la membrane plasmique qui va entraîner la formation d'une vésicule d'endocytose qui migre par la suite vers l'intérieur de la cellule.

Dans les paragraphes suivants, nous évoquerons uniquement les mécanismes impliqués dans le cas d'une contamination directe de l'organisme, qui concerne donc plus particulièrement la voie d'exposition étudiée dans ce travail.

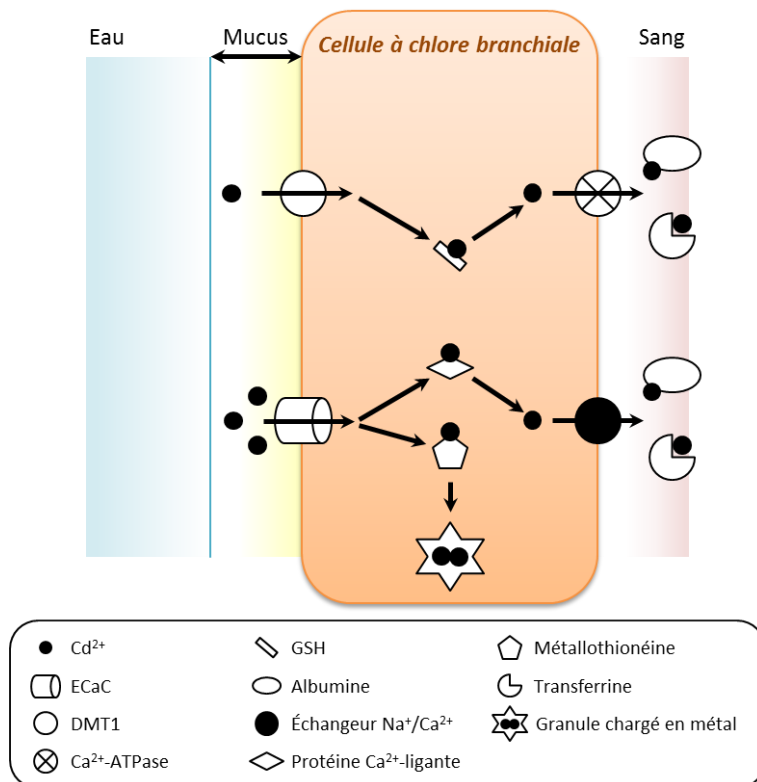
### 1.1.2. Les voies d'assimilation du Cu et du Cd

Les voies d'assimilation des métaux chez les poissons adultes et juvéniles sont relativement bien connues et largement décrites dans la littérature (voir Grosell, sous presse ; McGeer *et al.*, sous presse pour revue). Concernant le Cd<sup>2+</sup>, il semblerait que l'assimilation apicale au niveau des branchies se fasse par l'intermédiaire des canaux calciques messenger-dépendant (ou voltage-indépendant, ECaC) des cellules à chlore riches en mitochondries de l'épithélium branchial, par mimétisme avec le Ca<sup>2+</sup> et le Zn<sup>2+</sup> qui utilisent ces transporteurs en temps normal. Il semblerait également que certains transporteurs appelés DiMétal transporteurs 1 (DMT-1) soient impliqués dans le passage de la barrière apicale par le Cd<sup>2+</sup>. Ces derniers transporteurs ne sont pas spécifiques et interviennent également dans le transport d'autres cations divalents comme le Cu<sup>2+</sup>, le Mn<sup>2+</sup>, le Zn<sup>2+</sup>, le Ni<sup>2+</sup> ou le Pb<sup>2+</sup>. Par la suite, l'expulsion basolatérale du Cd<sup>2+</sup> résultant en son passage dans le sang, est effectuée par les transporteurs transmembranaires Ca<sup>2+</sup>-ATPases et les échangeurs ioniques Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>. Le passage du Cd depuis le milieu extérieur vers l'organisme par la voie cutanée et l'épithélium du système olfactif n'est *a priori* qu'une voie de contamination très secondaire et semblerait également mettre en jeu les voies d'assimilation du Ca.

Une fois dans les cellules, le Cd peut être séquestré par des protéines riches en groupements thiols (MT, GSH, cystéines) ou d'autres protéines Ca<sup>2+</sup>-ligantes (Zalups & Ahmad, 2003). Sous forme conjugué ou ionique, le Cd peut passer la membrane basolatérale et se retrouver dans le réseau sanguin où il sera alors pris en charge par des protéines circulantes telles que les albumines ou les transferrines. L'ensemble de ces mécanismes d'assimilation du Cd sont illustrés sur la [Figure 3.1](#).

En temps normal, l'absorption de Cu se fait par la voie intestinale, et l'assimilation branchiale ne représente qu'une très faible proportion (environ 10%) du Cu absorbé. Cependant, dans le cas d'un apport alimentaire réduit en Cu, l'absorption par voie branchiale est fortement impliquée et peut représenter jusqu'à 60% des apports totaux en Cu. Il semblerait donc que cette voie d'assimilation soit néanmoins importante dans le maintien de l'homéostasie de ce composé. Bien que l'absorption du Cu par les branchies soit démontrée, relativement peu de choses sont connues sur le fonctionnement et la régulation de ce phénomène. Certaines études semblent suggérer que deux voire trois transporteurs pourraient participer à l'assimilation apicale du Cu dont des canaux Na<sup>+</sup>, les transporteurs spécifiques du Cu Ctr1 et les DMT-1. Parmi ces trois transporteurs potentiels, les deux premiers prendraient préférentiellement en charge la forme réduite Cu<sup>+</sup> et les DMT-1 la forme divalente Cu<sup>2+</sup>. De plus, les conditions acides générées par l'extrusion de H<sup>+</sup> et la présence éventuelle d'enzymes Cu-réductase favoriseraient l'absorption de Cu sous forme Cu<sup>+</sup>. Chez le poisson, le transfert basolatéral du Cu pourrait impliquer des transporteurs transmembranaires Cu-ATPases orthologues des protéines humaines ATP7A et B qui amènent le Cu vers l'appareil de Golgi pour y être associé aux enzymes cupriques (Minghetti *et al.*, 2010). La [Figure 3.2](#) illustre les différents modes de transport du Cu évoqués.

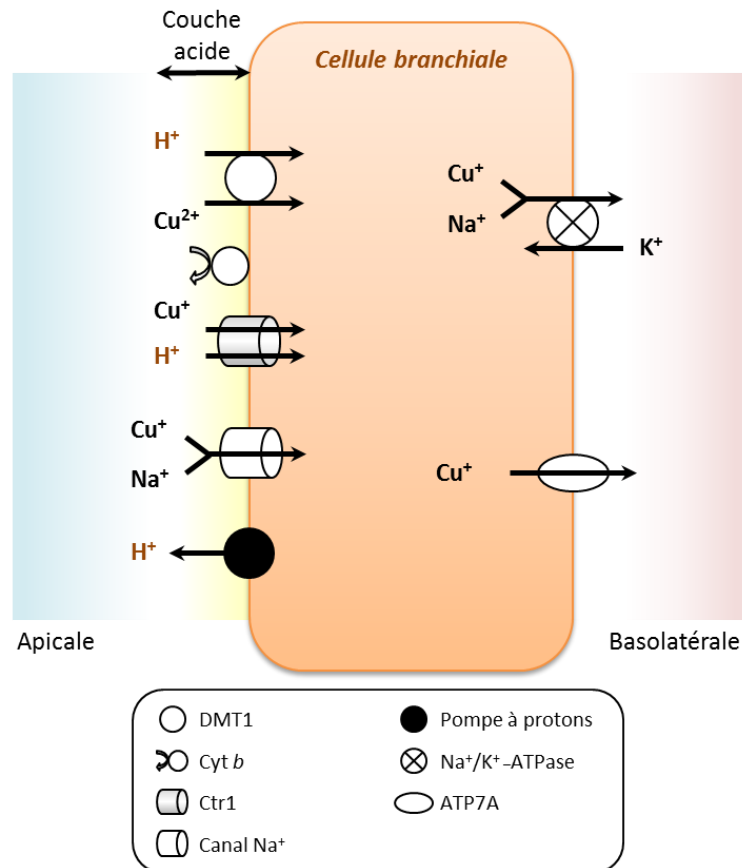
Les mécanismes exacts de transfert des éléments métalliques chez les embryons de poissons restent encore mal connus. Il est cependant suggéré que le chorion agisse tel un échangeur de



**Figure 3.1. Les voies de transfert transmembranaire apical et basolatéral du Cd selon McGeer et al. (sous presse).**

Diagramme des mécanismes d'assimilation et de prise en charge du Cd dans les cellules branchiales après contamination par voie directe. À noter que certains mécanismes restent hypothétiques. EcaC : canaux calciques messenger-dépendants ; DMT1 : DiMétal transporteur 1 ; GSH : glutathion.





**Figure 3.2. Les voies de transfert transmembranaire apical et basolatéral du Cu selon Grosell (sous presse).**

Diagramme des mécanismes d'assimilation et de prise en charge du Cu dans les cellules branchiales après contamination par voie directe. À noter que certains mécanismes restent hypothétiques. DMT1 : DiMétal transporteur 1 ; Cyt b : protéine cytochrome b ; Ctr1 : transporteur hautement spécifique du Cu ; ATP7A : Cu-ATPases ATP7A.

cations lors du passage des éléments métalliques ioniques vers l'embryon en développement (Rombough, 1985).

### 1.1.3. Bioaccumulation dans l'organisme

Le Cd circule dans le sang et est distribué vers les différents organes dans lesquels il va s'accumuler avec plus ou moins d'affinité. Dans le cas d'une contamination directe, les branchies sont les premiers organes à accumuler le Cd en grande quantité, suivies par les reins et le foie. Les muscles et le cerveau montrent généralement une capacité moindre d'accumulation du Cd (Karaytug *et al.*, 2007 ; Gonzalez *et al.*, 2006 ; Hollis *et al.*, 1999). Ces différences d'accumulation entre les organes peuvent être le résultat de variations métaboliques, structurales et fonctionnelles inter-tissulaires (Karaytug *et al.*, 2007). De plus, le niveau d'accumulation au sein des différents organes varie en fonction de la durée de l'exposition (Gonzalez *et al.*, 2006). Chez les embryons de poissons, plusieurs études rapportent que la très grande majorité (plus de 90%) du Cd mesuré chez les organismes est en réalité fixée sur la couche externe du chorion (Meteyer *et al.*, 1988 ; Michibata, 1981). La bioaccumulation est également variable en fonction du stade de développement de l'individu probablement du fait de changements physiologiques de l'embryon et des propriétés du chorion au cours du développement modifiant ainsi la dynamique de pénétration des métaux dans le fluide périvitellin (Lacoue-Labarthe *et al.*, 2008 ; Gonzalez-Doncel *et al.*, 2003b ; Meteyer *et al.*, 1988).

Par ailleurs, l'amplitude et la dynamique interne de l'accumulation en éléments métalliques chez les organismes aquatiques varient également fortement entre les différentes espèces et en fonction de l'ensemble des facteurs qui conditionnent leur biodisponibilité (Luoma & Rainbow, 2005). Ainsi, la bioaccumulation du Cd et du Cu peut être diminuée en présence de substances capables de réduire sa biodisponibilité en formant des complexes avec lui, comme la matière organique dissoute (Burnison *et al.*, 2006) ou les substances humiques (Meinelt *et al.*, 2001). De la même manière, la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu contribue à limiter l'assimilation de Cd probablement en saturant les voies de pénétration du métal par compétition avec celui-ci (Meinelt *et al.*, 2001). Par ailleurs, toute modification des conditions physico-chimiques du milieu incluant le pH, la dureté, les teneurs en Na et Mg, la salinité ou la température, peut entraîner des changements dans la spéciation chimique de l'élément métallique et donc sa biodisponibilité elle-même conditionnant son accumulation (Cao *et al.*, 2009 ; Benaduce *et al.*, 2008 ; Michibata *et al.*, 1986).

De plus, il a été montré qu'il existe une relation négative entre le facteur de bioconcentration (BCF, concentration accumulée dans l'organisme *versus* concentration dans le milieu aqueux) en métaux, dont le Cu et le Cd, et la concentration en éléments métalliques présente dans l'eau (DeForest *et al.*, 2007 ; McGeer *et al.*, 2003). Les BCF sont généralement compris entre 100 et 1 000 pour les métaux chez les organismes aquatiques (McGeer *et al.*, 2003). Le calcul de ce genre de facteur est fréquemment utilisé comme modèle de bioaccumulation des substances chimiques dans le but d'évaluer et d'identifier le risque environnemental lié à la présence de contaminants dans le milieu aquatique. Cependant, ce type de modélisation s'avère inadapté aux éléments métalliques car il ne tient pas compte de plusieurs points cruciaux incluant : (1) le caractère essentiel de certains éléments métalliques et donc le niveau d'accumulation basal normal de ces métaux ; (2) les capacités d'adaptation des organismes conduisant à une modulation du taux d'assimilation et d'élimination des éléments métalliques en fonction du régime d'exposition ; (3) les capacités spécifiques de chaque

individu et/ou espèce à séquestrer, détoxifier ou stocker les métaux assimilés qui peuvent à la fois augmenter la capacité de résistance de l'organisme ou engendrer des effets toxiques (McGeer *et al.*, 2003). Enfin, une saturation des voies d'assimilation ainsi qu'une excrétion continue et stimulée des éléments métalliques en cas de forte contamination pourrait expliquer ce phénomène (Grosell, sous presse). Par conséquent, la mesure de la charge totale en éléments métalliques chez un organisme (ou un organe) ne peut être considérée comme un prédicateur direct du niveau de contamination du milieu.

## 1.2. Effets toxiques des éléments métalliques chez les organismes aquatiques

L'exposition chronique au Cd engendre, entre autres, des perturbations de l'ionorégulation, de la croissance et du développement, du système neurologique, immunitaire et endocrinien, du comportement ainsi que l'apparition de pathologies graves affectant particulièrement les organes dans lesquels il s'accumule préférentiellement tels que les reins, les branchies et le foie (McGeer *et al.*, sous presse ; Kumar & Singh, 2010). De plus, le Cd a été identifié comme agent cancérigène et potentiellement mutagène (JOCE, 2004). Le caractère essentiel du Cu protège, dans une certaine mesure, l'organisme des effets toxiques de ce composé. Cependant, les systèmes impliqués dans le maintien de l'homéostasie du Cu peuvent se trouver dépassés par les concentrations présentes dans le milieu au point que l'augmentation de la teneur en Cu dans les cellules altère certaines fonctions protéiques. En dépit d'une capacité d'acclimatation et de tolérance des organismes, le Cu peut perturber l'homéostasie d'autres oligo-éléments, mais également la croissance et le développement, le système immunitaire, respiratoire et sensoriel, ainsi que le comportement et la reproduction.

Dans cette partie, nous traiterons plus particulièrement de la génération de stress oxydant, de l'altération de la croissance et de la survie ainsi que de la perturbation des mécanismes d'ionorégulation chez les organismes exposés au Cd et au Cu. Nous évoquerons également le potentiel génotoxique (au sens large) des deux éléments métalliques. Enfin, nous aborderons quelques effets de ces composés sur le comportement.

### 1.2.1. Effets sur la survie, la croissance et le développement

#### 1.2.1.1. Effets létaux

La toxicité d'un métal sous-entend que le composé se lie et réagit avec des ligands biologiques, générant des perturbations plus ou moins graves. La forme du Cd la plus réactive dans l'eau est sa forme dissoute divalente  $Cd^{2+}$  qui est très souvent directement corrélée avec la toxicité observée (Campbell *et al.*, 2002).

Les différentes études effectuées sur la toxicité des métaux lourds chez les SPD de poisson mettent en évidence la variabilité des résultats obtenus concernant la mortalité. Cao *et al.* (2009) soulèvent déjà ce problème en rapportant de larges écarts de CL50 (concentration létale à 50%, organismes adultes) à 48 h concernant le Cd selon les espèces, allant de 12 mg/L pour des capucettes *Menidia menidia* (Middaugh & Dean, 1977) jusqu'à 1775,6 mg/L pour la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* (Lacroix & Hontela, 2004). Ces mêmes auteurs soulignent également les différences de sensibilité des individus face à la toxicité des métaux en fonction de leur stade de développement et de la durée du test. De manière générale, les adultes s'avèrent plus résistants que

les juvéniles (Cao *et al.*, 2009), et les larves nouvellement écloses, plus sensibles que les embryons (Matz *et al.*, 2007).

Globalement, les mêmes observations sont transposables au Cu. En effet, les CL50 à 96 h déterminées sur stade larvaire et qui peuvent varier de 3,4 µg/L pour le saumon *Oncorhynchus tshawytscha* (Welsh *et al.*, 2000) jusqu'à 690 µg/L chez le tilapia *Oreochromis aureus* (Straus, 2003) ce qui confirme bien une sensibilité au Cu variable suivant l'espèce étudiée. Par ailleurs, les paramètres physico-chimiques du milieu comme la teneur en matière organique et en substances humiques ainsi que la salinité contrôlent également la biodisponibilité et donc la toxicité du Cu (Grosell *et al.*, 2007 ; Ryan *et al.*, 2004). La présence d'autres éléments tels que le Na (salinité), le Ca et le Mg peuvent également modifier les seuils de toxicité observés chez différentes espèces de poissons (Grosell *et al.*, 2007 ; Welsh *et al.*, 2000). De manière générale, les larves et les juvéniles de plusieurs espèces de poissons sont plus sensibles à une contamination au Cu que les embryons et on peut raisonnablement imaginer que les SPD sont plus vulnérables que les stades adultes (McGeer *et al.*, sous presse).

Dans le cas d'exposition aux deux éléments métalliques étudiés ici, dans les mêmes conditions expérimentales, certaines études rapportent une toxicité plus importante du Cu en comparaison du Cd (Sarnowski & Witeska, 2008, 130 mg/L CaCO<sub>3</sub>, pH 6,7 ; Lugowska, 2007, 230 mg/L CaCO<sub>3</sub>, pH 7,8). Les auteurs supposent que cette différence est liée au caractère essentiel du Cu qui, selon eux, favoriserait son absorption par les organismes en comparaison du Cd, dont il n'existe pas de transporteur spécifique. Cependant, ces différences de toxicité ne sont pas systématiquement observées en ce sens selon l'organisme étudié et les marqueurs de toxicité retenus. En effet, la tendance peut être inversée comme en témoigne l'étude de Nguyen et Janssen (2002), au cours de laquelle 100 % de mortalité est observé chez les larves de poisson-chat africain *Clarias gariepinus* dès 1,5 mg/L de Cd alors qu'aucune mortalité n'est observé jusqu'à 2,5 mg/L de Cu (dureté de 200 mg/L de CaCO<sub>3</sub> et pH 7,7 ; ses conditions sont très comparables à celles de l'étude de Sarnowski & Witeska, (2008).

#### 1.2.1.2. Effets sublétaux

##### Croissance et développement

La croissance et le développement des organismes peuvent tout deux être affectés suite à une exposition au Cu et au Cd. En effet, la croissance des larves de poissons-chats sud-américain *Rhamdia quelen* diminue de manière dose-dépendante pour des concentrations en Cd comprises entre 2 µg/L et 18 µg/L à 63 mg/L de CaCO<sub>3</sub> mais les effets ne sont plus si marqués à 90 mg/L de CaCO<sub>3</sub> (Benaduce *et al.*, 2008). De même, Fraysse *et al.* (2006) observent une baisse de la croissance des larves ainsi qu'un retard d'éclosion chez le poisson zèbre *Danio rerio* pour des concentrations de 0,4 mg/L à 1,5 mg/L de Cd. Une réduction de la croissance ainsi qu'une inhibition du succès d'éclosion sont également observées chez la dorade japonaise *Pagrus major* à partir de 0,8 mg/L de Cd (Cao *et al.*, 2009). Enfin, une exposition au Cu à des concentrations allant de 53 à 1099 µg/L induit une diminution du nombre d'éclosions ainsi que de la croissance des larves de poisson zèbre *D. rerio* (Johnson *et al.*, 2007). De même, les larves de poisson-chat africain exposées à du Cu (0,63 à 2,5 mg/L) ont une longueur réduite en comparaison des individus contrôles (Nguyen & Janssen, 2002). Il semblerait que l'inhibition du développement pourrait survenir à différents stades de développement selon le métal étudié, depuis les premières divisions mitotiques jusqu'à la fin de

l'organogénèse (Jezierska *et al.*, 2009). La mobilisation de l'énergie de l'organisme nécessaire à l'élimination du toxique ou à la réparation des dommages induits pourrait être à l'origine d'une réduction globale du développement (Johnson *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'éclosion est le résultat d'une combinaison de mécanismes chimiques, osmotiques et mécaniques (Frayse *et al.*, 2006). Les éléments métalliques pourraient donc affecter ce processus en agissant sur un ou plusieurs mécanismes impliqués. Par exemple, il a été montré que des métaux comme le Cu et le Zn pouvaient engendrer une détérioration des glandes d'éclosion chez la carpe *Cyprinus carpio*, résultant en une inhibition de la production de l'enzyme d'éclosion, la chorionase (Mis & Bigaj, 1997). Les éléments métalliques pourraient également générer des perturbations de l'osmorégulation ce qui affecterait l'activité de la chorionase et/ou les mouvements musculaires nécessaires au processus d'éclosion (Dave & Xiu, 1991). Selon ces auteurs, une perturbation de l'oxygénation des embryons pourrait également être impliquée dans les altérations du taux d'éclosion et de la durée du développement des embryons exposés Cu.

### Tératogénèse

L'un des paramètres les plus fréquemment observés lors de l'exposition des SPD de poisson à des composés potentiellement toxiques est l'apparition de malformations.

Par exemple, Cheng *et al.* (2001) rapportent que 20 % des embryons de *D. rerio* exposés à environ 11 mg/L de Cd présentent des malformations (squelettiques, cardiovasculaires et cranio-faciales) à 48 h pf. Chez cette même espèce, Fraysse *et al.* (2006) rapportent quant à eux 25 %, 40 % et 70 % d'individus malformés (dont malformations squelettiques, cardiovasculaires et cranio-faciales ainsi que la présence d'œdèmes) à 48 h pf après des expositions à 0,4 mg/L, 0,8 mg/L et 1,5 mg/L de Cd respectivement. Des valeurs quasi-identiques sont obtenues par Cao *et al.* (2009) chez des larves de *Pagrus major* juste écloses, avec des pourcentages d'individus présentant des malformations (comprenant œdèmes, malformations squelettiques et des nageoires) de 10 %, 42 %, 79 %, 89 % et 100 % après exposition à des concentrations respectives en Cd de 0,4 mg/L, 0,8 mg/L, 1,2 mg/L et 2,4 mg/L.

Les différentes malformations rapportées dans la littérature sont présentées dans le **Tableau 3.1**. Parmi les différents types d'anomalies du développement, les plus fréquemment retrouvées après exposition à des métaux sont les malformations de la colonne vertébrale ou du squelette axial, qui peuvent concerner jusqu'à 90 % des individus exposés (Benaduce *et al.*, 2008).

Lugowska et Witeska (2004) ont observé un rétablissement partiel à total, après transfert en milieu propre, des larves de carpe commune présentant des courbures de la colonne, un corps en forme de C ou atrophié et des malformations du sac vitellin suite à une exposition au Cu. Cependant, malgré une rémission graduelle potentielle des larves malformées, celles-ci présentaient une capacité de nage restreinte. Les auteurs observent également une réduction de la capacité de capture de proies à la suite de l'altération de la locomotion induite par le Cu. Par ailleurs, seul un nombre très restreint de larves malformées parviennent à survivre jusqu'à la fin de l'expérience, soit 20 j post-éclosion. Ces résultats démontrent que les anomalies du développement induites par une contamination aux métaux peuvent compromettre le développement, la croissance et la survie des individus exposés, même après l'arrêt de l'exposition.

**Tableau 3.1. Différentes malformations rapportées dans la littérature chez les SPD de plusieurs espèces de poisson après exposition au Cd et au Cu**

Catégories	Détails*
<i>In ovo</i> **	Blastomères asymétriques, irréguliers ou anormalement distribués ; blastula déformée ; déformation de la notocorde ; lésion blastodermale ; exogastrulation ; spasmes ; hyperactivité
Colonne vertébrale, squelette axial	Lordose ; cyphose ; scoliose ; en forme de C ou arqué, en forme de L, de V ou de S ; extrémité de la queue malformée ; absence de queue ; colonne vrillée (hélicoïdale) ; colonne vertébrale cassée avec musculature fine
Cranio-faciale	Malformation de la mâchoire inférieure, du crâne ; hypoplasie crânienne ou des mâchoires ; dystrophie des mâchoires ; hypertrophie crânienne
Sac vitellin	Malabsorption des réserves vitellines
Œil	Cyclopie ; trois ou quatre yeux ; microphthalmie simple ou double ; anophtalmie ; absence de pigmentation ou hypo-pigmentation ;
Vascularisation, circulation sanguine	Hémorragies ; caillots ; collapsus cardiovasculaire, réseau vasculaire aberrant (vaisseaux sanguins plus petits, moins de branches et baisse de la complexité du réseau) ; hypertension ; accumulation d'érythrocytes
Œdèmes	Périveritellins ; cardiaques ; crâniens
Cœur	Cardiomégalie ; cœur tubulaire ; plicature cardiaque anormale ; arythmie ; cardiomyopathie ; disproportion de l'atrium et/ou du ventricule
Autres	Corps raccourci/atrophié ; siamois ; hypo-pigmentation ; nageoire boursouflée, présence de cloques ; posture anormale ; arrêt du développement ; absence de nageoire

\*D'après Johnson *et al.* (2007) ; Lugowska *et Witeska* 2004 (2004) ; Jezierska *et al.* (2000) ; Jezierka *et al.* 2009 (2009) ; Nguyen *et Janssen* 2002 (2002) ; Lugowska 2007 (2007) ; Frayse *et al.* (2006) ; Lizardo-Daudt *et Kennedy* (2008) ; Hallare *et al.* (2005b) ; Cao *et al.* (2009) ; Benaduce *et al.* (2008) ; Gonzalez-Doncel *et al.*, (2003b) ; Cheng *et al.*, (2001). \*\* : ne sont citées ici que les anomalies du développement propres à ce stade ; certaines malformations mentionnées dans les autres catégories peuvent également être observées *in ovo*.

### 1.2.2. Perturbations de l'ionorégulation

L'un des mécanismes qui semble être la clé des effets toxiques du Cu et du Cd est la perturbation de l'homéostasie de certains éléments essentiels au bon fonctionnement de l'organisme.

L'exposition de larves de *D. rerio* à du Cu et du Cd induit une baisse de la concentration totale en Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> chez les organismes (Alsop & Wood, 2011). Les deux métaux induisent une réduction de l'absorption du Ca<sup>2+</sup>, mais pas du Na<sup>+</sup>, ce qui suggère un passage épithélial des deux métaux par les voies apicales d'absorption du Ca<sup>2+</sup>. L'activité des Ca<sup>2+</sup>-ATPases des cellules à chlore des branchies de tilapia *Oreochromis mossambicus* exposées au Cd montrent également une activité réduite par le métal (Wong & Wong, 2000). Il semblerait que le Cd puisse également altérer l'homéostasie d'autres composés comme le Zn<sup>2+</sup>, le Cl<sup>-</sup> et le Cu<sup>2+</sup> (McGeer *et al.*, sous presse ; Kumar & Singh, 2010).

Par ailleurs, les diminutions en Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> observées par Alsop et Wood (2011) sont proportionnelles au gradient ionique existant entre le plasma et l'eau ce qui semble indiquer, selon les auteurs, que la perte en éléments essentiels correspond à une diffusion de ces composés depuis l'organisme vers le milieu extérieur. Selon les résultats de cette étude, les effets toxiques aigus (mortalité) observés seraient non pas à relier directement avec une inhibition des mécanismes d'absorption mais bien à une perte en éléments essentiels, particulièrement marquée pour le Na<sup>+</sup>.

Cependant, la perturbation de l'homéostasie des oligoéléments peut être réversible après une exposition à des doses relativement faibles en Cd même lorsque celle-ci se poursuit, indiquant la mise en place de mécanismes de détoxification par séquestration (MT, GSH...) ainsi que l'induction de système de réparation et de compensation corrigeant les perturbations physiologiques engendrées par l'accumulation en métaux (McGeer *et al.*, sous presse).

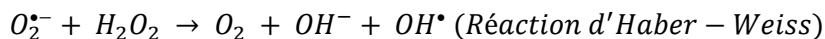
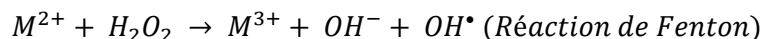
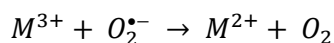
La toxicité aiguë du Cu semble être associée à une altération de l'osmorégulation du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{Cl}^-$ , dont l'équilibre ionique peut également être perturbé à des concentrations sub-létales (Grosell *et al.*, 2002). La diminution en  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  plasmiques peut être le résultat d'une absorption réduite de ces composés, combinée à une fuite accrue au moins aux plus fortes concentrations (Grosell, sous presse). L'augmentation de l'efflux de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{Cl}^-$  est attribuée à un déplacement du Ca par le Cu au niveau des jonctions des protéines augmentant ainsi la perméabilité de l'épithélium branchial (Grosell *et al.*, 2002). Le suivi de la cinétique d'absorption de  $\text{Na}^+$  au cours d'une contamination au Cu laisse penser que la réduction globale de l'assimilation du  $\text{Na}^+$  soit le résultat d'une compétition entre ces deux composés au niveau des canaux sodiques et des échangeurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  apicaux (baisse d'affinité) et d'une baisse de la capacité de transport des  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases (Grosell, sous presse). L'inhibition de l'activité de ces enzymes semble être liée à une interférence entre le  $\text{Cu}^{2+}$  et le  $\text{Mg}^{2+}$ , ce dernier étant un élément capital au bon fonctionnement des  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases (Li *et al.*, 1996).

Chez la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* exposée à des concentrations létales de Cu, une diminution concomitante du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{Cl}^-$  plasmiques est observée (Wilson & Taylor, 1993). Comme évoqué précédemment, une partie de cette diminution de la concentration en  $\text{Cl}^-$  peut être attribuée, comme pour le  $\text{Na}^+$ , à une diffusion du composé par les voies para-cellulaires. L'absence de lien démontré entre l'activité des  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases et l'absorption du  $\text{Cl}^-$  ainsi que la néanmoins simultanée de la réduction en  $\text{Na}^+$  et en  $\text{Cl}^-$  dans l'organisme suggèrent que le Cu affecte le fonctionnement d'un mécanisme commun à la régulation de l'absorption de ces deux composés. L'anhydrase carbonique est une enzyme qui peut être inhibée par le Cu chez certains organismes (Grosell, sous presse) et qui relie également l'absorption du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{Cl}^-$  (Grosell *et al.*, 2002), ce qui expliquerait les effets simultanés du Cu sur l'homéostasie de ces deux éléments chez les individus exposés.

Enfin, la forte corrélation rapportée entre le taux d'absorption ou de renouvellement du  $\text{Na}^+$  et la sensibilité de l'organisme face à une exposition aiguë au Cu indique que la perturbation de l'absorption du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{Cl}^-$  est fortement impliquée dans la mortalité observée (Grosell *et al.*, 2002). Les pertes en  $\text{Na}^+$  et en  $\text{Cl}^-$  qui y sont associées conduisent à une réduction de l'osmolarité du plasma qui finit par induire une fuite du fluide plasmique vers les tissus. Ce phénomène produit toute une série de réactions en chaîne dont la formations d'œdèmes, pouvant conduire *in fine* jusqu'au collapsus cardiovasculaire (Grosell, sous presse).

### 1.2.3. Génération de stress oxydant

Le stress oxydant résulte de la présence excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou de l'azote (ERA) qui ont un très fort pouvoir oxydant. Ces espèces sont des radicaux libres bien que le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  soit également considéré comme une ERO. En effet, celui-ci se dismute en radical hydroxyle  $\text{OH}^\bullet$  par la réaction de Haber-Weiss catalysée par la forme ionique d'un métal de transition (comme le Fe ou Cu) :



De nombreux mécanismes de lutte contre le stress oxydant existent au sein des cellules notamment des enzymes anti-oxydantes telles que la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et les enzymes superoxyde dismutase (SOD). Malgré cela, les métaux en excès peuvent induire un stress oxydant de différentes manières : (1) par l'inhibition des enzymes anti-oxydantes ; (2) par l'altération de la chaîne mitochondriale de transfert des électrons ; (3) par la production directe d'ERO par le biais de la réaction de Fenton (ou assimilée) ; (4) par la génération d'une déplétion en glutathion (GSH) cellulaire. Les ERO générées, si elles ne sont pas neutralisées par les mécanismes de défense, peuvent engendrer l'oxydation de nombreux constituants cellulaires dont l'ADN, les protéines et les lipides ayant pour conséquence l'induction de dommages et d'adduits à l'ADN, la dénaturation de certaines protéines par introduction d'un groupement carbonyle et la peroxydation des lipides.

#### 1.2.3.1. Cas du Cuivre

La génération d'ERO induite par le Cu a été démontrée au sein des cellules branchiales et des hépatocytes de poisson par plusieurs études (Sandrini *et al.*, 2009 ; Bopp *et al.*, 2008 ; Manzl *et al.*, 2004). En effet, un excès de Cu peut engendrer un stress oxydant via la production d'ERO dont l'origine serait la catalyse par l'ion métallique de la réaction de Haber-Weiss qui compte parmi ses produits le radical  $OH^{\bullet}$  (Arabi, 2004 ; Manzl *et al.*, 2004). Or la peroxydation lipidique est initiée en présence de ce type d'ERO et d'ions métalliques (catalyseurs) et conduit à l'altération de l'intégrité des membranes cellulaires (Arabi, 2004).

L'exposition au Cu de cellules branchiales de carpe a également montré que ce métal induisait une déplétion en GSH au sein de ces cellules (Arabi, 2004). L'inhibition de la glutathion synthétase par le Cu ainsi que la formation de complexes GSH-Cu stables, résultant de la forte réactivité du métal avec cette enzyme, semblent contribuer à la réduction de la teneur en GSH. Les cellules se retrouvent alors partiellement désarmées face à la présence d'un stress oxydant puisque le GSH fait partie des premières lignes de défense anti-oxydante par son pouvoir de chélation et de détoxication des métaux ainsi que son rôle de scavenger d'ERO (Grosell, sous presse). Par ailleurs, le Cu contribue également à la génération d'un stress oxydant par l'inhibition d'autres enzymes anti-oxydantes comme le montre la diminution de l'activité de la CAT et de la GPx chez l'anguille *Anguilla anguilla* exposée au Cu (Ahmad *et al.*, 2005). Il semblerait que les réponses en termes de modulation d'activité (et également au niveau transcriptionnel) des enzymes anti-oxydantes notamment CAT, GPx et SOD après exposition au Cu soit très variables, parfois dans le sens de l'induction, parfois de l'inhibition (Grosell, sous presse). Selon ces auteurs, cela pourrait provenir du fait que les réponses enzymatiques et transcriptionnelles soient transitoires, même dans le cas d'une exposition continue, et puisse être interprétées comme le résultat d'interactions complexes entre l'activation des systèmes antioxydants face à la production de ROS et l'inhibition de certaines enzymes impliquées dans ces processus par le Cu (Sanchez *et al.*, 2005).



### 1.2.3.2. Cas du cadmium

A l'inverse du Cu, le Cd n'est pas un métal de transition. Il ne peut donc pas participer à la réaction d'Haber-Weiss (ou de Fenton) et ainsi produire des ERO de manière directe. Cependant, plusieurs études démontrent la génération du stress oxydant chez le poisson à la suite d'une exposition au Cd (Risso-de Faverney *et al.*, 2004 ; Risso-de Faverney *et al.*, 2001). L'inhibition de plusieurs enzymes de la chaîne mitochondriale de transfert d'électrons par le Cd résulte en une surproduction d'ERO selon les travaux de Wang *et al.* (2004). De plus, comme pour le Cu, l'inhibition de l'activité d'enzymes anti-oxydantes comme la CAT, les SOD (Mn et Cu/Zn), la GPx et la GST (Glutathion-S-transférase) ainsi qu'une réduction du contenu cellulaire en GSH a été observé chez différentes espèces de poissons après exposition au Cd (voir McGeer *et al.*, sous presse pour revue). La diminution de l'efficacité des mécanismes de défense contre le stress oxydant peut également être à l'origine de l'augmentation des ERO cellulaires induite par le Cd, comme discuté précédemment.

Enfin, certains auteurs suggèrent également que le Cd pourrait générer indirectement des ERO par le déplacement de Fe et Cu au niveau de sites intracellulaires variés (cytoplasmiques ou protéines membranaires), ce qui augmenterait les teneurs cellulaires en Cu et Fe ioniques qui pourraient à leur tour subir une réaction de Fenton et engendrer par ce biais le stress oxydant observé (Waisberg *et al.*, 2003).

### 1.2.4. Génotoxicité

De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont démontré l'induction de dommages à l'ADN à la suite d'une exposition au Cu ou au Cd chez différentes espèces de poissons (Bopp *et al.*, 2008 ; Kilemade *et al.*, 2004 ; Gabbianelli *et al.*, 2003 ; Risso-de Faverney *et al.*, 2001). Ces études utilisent le test comète comme outil d'évaluation du pouvoir génotoxique global des substances testées. Ce test permet d'évaluer les cassures des brins d'ADN qui peuvent être engendrées par l'interaction directe d'un xénobiotique avec l'ADN ou la production d'ERO mais également indirectement via la formation de sites alcali-labiles ou l'intervention des mécanismes de réparation par excision-resynthèse de l'ADN (Mitchelmore & Chipman, 1998). Ces dommages à l'ADN ont été principalement attribués à la génération d'un stress oxydant par le Cu et le Cd selon les auteurs de ces études.

Par ailleurs, d'autres effets confirmant l'altération de l'intégrité du génome par ces deux métaux ont été mis en évidence. L'exposition de *Channa punctata* à 0,4 mg/L de sulfate de Cu a engendré l'apparition significative d'aberrations chromosomiques dans les reins des individus contaminés (Yadav & Trivedi, 2009a). Chez la même espèce exposée à des doses similaires en Cu, une augmentation de la présence de micronoyaux a également été observée (Yadav & Trivedi, 2009b). Similairement, un accroissement de la fréquence de présence de micronoyaux et autres aberrations nucléiques a été noté après exposition de tilapias du Nil *Oreochromis niloticus* à 0,5 et 1,0 mg/L de Cd (Ozkan *et al.*, 2009). De plus, Hong *et al.* (2006) ont montré que le Cd<sup>2+</sup> avait la capacité d'interagir directement avec l'ADN en s'insérant entre les paires de bases et en se liant aux acides nucléiques dans les cellules rénales de carpe *Carassius auratus gibelio*.

Bien que certaines études rapportent l'activation des mécanismes de réparation de l'ADN après exposition de poissons à des métaux (Gonzalez *et al.*, 2006 ; Gonzalez *et al.*, 2005), d'autres travaux rapportent l'effet inhibiteur du Cu et du Cd sur l'expression de certains gènes impliqués dans ces mécanismes tels que *ogg1* et *rad51* (Sandrini *et al.*, 2009 ; Mouchet *et al.*, 2006). De la même

manière, il a été démontré que ces deux éléments métalliques étaient capables de déclencher l'entrée en apoptose des cellules chez différentes espèces de poisson (Hernandez *et al.*, 2006 ; Risso-de Faverney *et al.*, 2001). Cependant, les gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (*bax*, *bcl2*, *p53*, *gadd45 $\alpha$* , *cyclinG1*...) peuvent être alternativement surexprimés ou réprimés par le Cd ou le Cu selon les études (Sandrini *et al.*, 2009 ; Giaginis *et al.*, 2006 ; Gonzalez *et al.*, 2006 ; Mouchet *et al.*, 2006). Enfin, il a également été démontré que la prolifération cellulaire pouvait être stimulée par l'exposition de différentes espèces de poisson au Cu (Chen & Chan, 2011 ; Monteiro *et al.*, 2009) et au Cd (Garcia-Santos *et al.*, 2011 ; Wong & Wong, 2000).

Les études utilisant l'analyse de la réponse génique ont pu démontrer que beaucoup d'autres mécanismes étaient affectés en présence de Cu ou de Cd tels que le métabolisme mitochondrial, les mécanismes de réponse au stress (protéines chaperonnes type heat-shock proteins), le cytosquelette, les mécanismes antioxydants et de détoxification, la prolifération cellulaire et la régulation du cycle cellulaire, certains facteurs de transcription ou voies de signalisation, les transporteurs membranaires, le métabolisme lipidique, le système immunitaire, l'apoptose, la synthèse protéique (Chen & Chan, 2011 ; Garcia-Santos *et al.*, 2011 ; Monteiro *et al.*, 2009 ; Sandrini *et al.*, 2009 ; Auslander *et al.*, 2008 ; Woo *et al.*, 2008 ; Gonzalez *et al.*, 2006 ; Mouchet *et al.*, 2006 ; Waisberg *et al.*, 2003).

Quelques travaux ont tenté de relier les effets phénotypiques induits par le Cd à l'altération de certaines fonctions ou voies de signalisation moléculaires. Après exposition d'embryons de *D. rerio* à environ 1 mg/L de Cd, Cheng *et al.* (2000) notent que les malformations de types scoliotiques des larves justes écloses sont concomitantes avec une désorganisation et une altération morphologique des myotomes ainsi qu'une réduction de la production de myosine à chaîne lourde. Par ailleurs, l'expression de gènes tels que *eve1* (evenskipped 1) et *nt1* (no tail 1) au niveau de certaines malformations de la queue indiquent, selon les auteurs, que le Cd interfère lors du développement axial des embryons en induisant l'expression ectopique de gènes spécifiques du développement mésodermal. Au niveau des déformations cranio-faciales (acéphalie, microcéphalie, microphthalmie et anophthalmie) la répression du gène de *shh* (sonic hedgehog, qui contrôle la structuration du tube neural et des somites) qui semble suggérer un manque de signaux inductifs de la voie shh durant la neurogénèse. Par ailleurs, les auteurs notent également un sous-développement du système nerveux central (tissu neural) chez les individus souffrant d'hypoplasie oculaire et crânienne. Une seconde étude effectuée par Chow *et al.* (2008) démontre que chez certains embryons de *D. rerio* exposés à 1 mg/L de Cd, le sous-développement de la tête est associé à une subdivision du cerveau peu claire, particulièrement marquée au niveau du mésencéphale postérieur. L'expression de plusieurs gènes pro-neuronaux dont *ngn1*, *zash1a* et *zash1b* est inhibée spécifiquement dans certaines régions du cerveau. Par ailleurs, chez les embryons exposés au Cd, les auteurs observent une réduction du nombre de neurones et cellules gliales différenciées, attestée par une inhibition de l'expression de l'anticorps zn-12. L'ensemble des données de cette étude suggère, selon les auteurs, que la neurotoxicité induite par le Cd est issue de l'altération de la neurogénèse qui se traduit par une différenciation neuronale et une axonogénèse réduite.

La grande diversité des effets pouvant être générés à la suite d'une exposition au Cu ou au Cd révèlent la complexité des mécanismes de toxicité impliqués. Il ne fait aucun doute cependant, que l'altération de voies métaboliques si variées puissent avoir des conséquences dramatiques sur le bon fonctionnement de l'organisme, sa survie et son état de santé. Par ailleurs, le pouvoir cancérigène du

Cd n'est plus à démontrer et les quatre mécanismes principaux impliqués dans la cancérogénèse induite par ce composé sont (1) l'expression aberrante de gènes-cibles ; (2) l'inhibition des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN ; (3) l'inhibition de l'apoptose ; (4) l'induction d'un stress oxydant (Joseph, 2009). Malgré la similitude des effets observés entre le Cd et le Cu exposés dans les paragraphes précédents, il n'y a actuellement, à notre connaissance, aucune preuve directe d'une cancérogénèse associée au Cu chez les organismes aquatiques.

### 1.2.5. Quelques effets sur le comportement

Parce qu'il est souvent difficile de prédire quels seront les effets sur la vie et le comportement de l'individu à partir de réponses enregistrées au niveau moléculaire, certains travaux tentent de répondre à ces questions en étudiant à la fois les effets physiologiques et les répercussions sur le comportement de l'individu.

Chez des juvéniles de truite *O. mykiss* exposés à 50 µg/L de Cd durant une semaine, Li *et al.* (2011b) ont observé la présence d'un stress oxydant (peroxydation lipidique et oxydation des protéines) important au niveau du foie et des branchies ainsi qu'une inhibition et une induction de l'activité des enzymes anti-oxydantes (SOD, GPx et glutathion réductase) dans les branchies et le foie respectivement. Ces altérations physiologiques sont associées à une altération notable du comportement comprenant hyperactivité, convulsions, perte d'équilibre, comportement natatoire erratique et difficultés respiratoires. Les auteurs rapportent également que les modifications biochimiques sont totalement annulées et l'altération du comportement est significativement réduite lors d'une co-exposition au Cd et au vérapamil qui est un bloqueur des canaux calciques, ce confirmant bien une assimilation du Cd par ces voies-là.

Le système olfactif des poissons est un organe extrêmement sensible à la présence de contaminants dans le milieu puisque directement exposé à celui-ci. D'autre part, de nombreux comportements essentiels à la survie et à la pérennité de l'espèce dépendent du bon fonctionnement du système olfactif. En effet, le système olfactif est sollicité lors de la recherche de nourriture, la capture de proie, la reproduction et la fuite en présence de prédateurs, par exemple.

Il a été démontré qu'un des effets spécifiques d'une exposition au Cd par voie directe (en comparaison à la voie trophique) est l'accumulation de ce métal au niveau du système olfactif chez les juvéniles de truite *O. mykiss* exposés à seulement 2 µg/L de Cd durant 7 j (Scott *et al.*, 2003). Cette accumulation est accompagnée d'une absence de réponse face à un stimulus olfactif issu de la présence d'une substance d'alarme (signal chimique produit par l'épithélium d'un poisson après une attaque d'un prédateur ayant occasionnée une plaie de la peau). En temps normal, une brève élévation du taux plasmatique de cortisol est observée chez le poisson en réponse à ce signal, ce qui n'est plus le cas chez les individus exposés au Cd. Selon les auteurs, ce phénomène expliquerait l'altération de la stratégie d'évitement de prédateurs chez les juvéniles de truites exposés à ce composé.

L'utilisation d'une lignée transgénique de poisson zèbre *D. rerio* exprimant la protéine fluorescente eGFP sous le contrôle du promoteur du gène *hsp70* a montré une surexpression particulièrement forte au niveau des neurones du système sensoriel olfactif chez les larves exposées jusqu'à 14 mg/L de Cd pendant seulement 3 h (Blechinger *et al.*, 2007). Cette induction est fortement corrélée à une altération des tissus par mort cellulaire. Par ailleurs, une surexpression du gène endogène *hsp70* et du transgène *hsp70/eGFP* est également observée au niveau des neuromastes de

la ligne latérale des larves exposées. La cytotoxicité induite par le Cd au niveau du système olfactif est associée à une réduction du comportement d'évitement de prédateurs après stimulation par une substance d'alarme durant 4 à 6 semaines après arrêt de l'exposition. Ces résultats démontrent d'une part que l'altération du comportement liée à une contamination du milieu en Cd peut se manifester dès les stades précoces du développement et, d'autre part, que ces effets peuvent persister bien après la disparition de la contamination. Ces résultats sont d'ailleurs confirmés par d'autres travaux (Kusch *et al.*, 2008 ; Matz *et al.*, 2007).

Plusieurs études démontrent que le Cu peut également engendrer des effets tout à fait similaires sur le comportement des poissons exposés. En effet, Carreau and Pyle (2005) décrivent une absence totale de réaction face à un stimulus par substance d'alarme chez les juvéniles de *Pimephales promelas* exposés à 10 µg/L de Cu pendant 84 à 96 j. Ces altérations du comportement de fuite en présence d'un prédateur potentiel sont également observées chez les individus exposés au Cu uniquement durant leur développement embryonnaire (5 à 7 j pf) ce qui démontre que les effets à l'origine des modifications comportementales persistent plusieurs mois après l'arrêt de la contamination.

La ligne latérale des poissons semble être également la cible de la toxicité induite par le Cu. Le système de la ligne latérale est composé de neuromastes qui contiennent des cellules ciliées analogues à celles que l'on peut trouver dans l'oreille interne des vertébrés. L'exposition de larves de *D. rerio* à des concentrations sub-létales de Cu comprises entre 60 µg/L et 3 mg/L durant seulement 2 h induit l'entrée en apoptose et la perte de fonctionnalité des cellules ciliées des neuromastes (Hernandez *et al.*, 2006). Selon les auteurs, cet effet serait spécifique du Cu. Après exposition, les individus sont placés en dépuración pour une durée de 5 j afin d'étudier la persistance des effets observés. Au niveau de la ligne latérale postérieure, une régénération des neuromastes est possible jusqu'à 0,6 mg/L de Cu environ alors qu'à 3 mg/L, la perte des cellules ciliées semble irréversible. A l'inverse, les neuromastes de la ligne latérale antérieure, partiellement protégés car encastrés dans des alvéoles ou des canaux au niveau de la tête, sont capables de se régénérer intégralement même après une exposition à des concentrations allant jusqu'à 25 mg/L de Cu.

Une étude de Johnson *et al.* (2007) vient compléter ces travaux en rapportant également une diminution du nombre de neuromastes fonctionnels au niveau de la ligne latérale des larves de *D. rerio* exposées à 68 et 244 µg/L de Cu. Cette altération de la ligne latérale est associée à une perte d'équilibre et une incapacité à s'orienter dans un courant chez les individus exposés.

L'ensemble de ces travaux met en évidence les impacts concrets que peuvent avoir les altérations physiologiques induites par le Cu et le Cd sur le comportement des individus exposés et soulèvent donc la question de la survie de ces individus mais également de la population dans leur milieu naturel dans le cas où celui-ci serait contaminé par des métaux.

## 2. SELECTION DU SEDIMENT DE REFERENCE

---

L'enjeu de cette première exposition est d'identifier un sédiment de référence pour le test embryo-larvaire MELA. Pour cela, la matrice de référence choisie ne doit induire aucune réponse biologique notable au niveau des paramètres évalués lors du bioessai afin de ne pas biaiser la mesure des effets toxiques associés aux polluants étudiés. Deux sédiments de la Région Aquitaine ont été

présélectionnés pour remplir ce rôle : le sédiment de Cadaujac (sur la Garonne, port de l'Esquillot, prélevé fin décembre 2008) et celui de Marcenac (sur le Lot, prélevé en mars 2009, en amont du barrage). Au cours de cette exposition, le sédiment d'Yville-sur-Seine (Haute Normandie) servira de contrôle négatif, puisque précédemment validé comme matrice sédimentaire témoin acceptable pour le test MELA au cours des travaux de thèse de Ludovic Vicquelin (2011). Chaque sédiment a été testé sous sa forme native (ou « brute ») et lyophilisée/broyée pour évaluer la différence éventuelle de toxicité induite par le traitement et les conditions de stockage des sédiments. La lyophilisation permet d'éliminer l'eau ainsi que (au moins en partie) la faune et la flore microbiologiques présentes dans la matrice sédimentaire. Ainsi, le sédiment lyophilisé peut être conservé à long terme à température ambiante. Le broyage a pour but d'uniformiser la taille des particules en éliminant les grains les plus grossiers. Ceci permet d'une part, d'assurer un meilleur contact des embryons avec la matrice sédimentaire et d'autre part, d'améliorer de rendement et l'homogénéité de l'enrobage du sédiment en uniformisant sa granulométrie et en augmentant la surface spécifique des particules. Parallèlement au suivi des réponses biologiques, les sédiments ont été caractérisés chimiquement et granulométriquement.

## 2.1. Protocole expérimental

### 2.1.1. Conditions d'exposition

L'évaluation de la toxicité des trois sédiments de référence (Cadaujac, Marcenac et Yville) a été effectuée à l'aide du test MELA. Chaque sédiment a été traité sous sa forme lyophilisée/broyée (LB) et native (N), en triplicat, selon les conditions d'exposition figurant dans le **Tableau 3.2** et le protocole décrit dans le *Chapitre 2 au paragraphe 6.1*, sans renouvellement d'ERS (le niveau à seulement été complété au besoin).

**Tableau 3.2. Conditions d'exposition appliquées lors de l'exposition des embryons de Medaka aux sédiments de référence**

Ø BP (mm)	Nb. Emb.	Stade	M <sub>sed</sub> (g p.s.)	V <sub>h</sub> ERS (mL)	V <sub>i</sub> ERS (mL)	T <sub>incub</sub> (°C)	Photopériode (j/n)
35	20	pré-morula (2-4 h pf)	5	2	1	26 °C	12 h/12 h

Ø BP : diamètre de la boîte de Pétri d'exposition ; Nb. Emb. : nombre d'embryons exposés par réplicat ; M<sub>sed</sub> : masse de sédiment par réplicat en gramme de poids sec ; V<sub>h</sub> ERS : volume d'ERS ajouté pour humidifier le sédiment de chaque réplicat ; V<sub>i</sub> ERS : volume d'ERS ajouté dans un réplicat pour immerger les embryons ; T<sub>incub</sub> : température d'incubation des embryons pour toute la durée du test.

### 2.1.2. Paramètres suivis

L'ensemble des paramètres suivis lors de l'exposition des embryons de Medaka aux sédiments de référence est rappelé dans le **Tableau 3.3**. Les différents paramètres ont été mesurés selon le protocole détaillé dans le *Chapitre 2 au paragraphe 0 et 0*. Les marqueurs de toxicité utilisés au cours de cette expérience sont exclusivement non-invasifs et effectués sur l'ensemble des individus exposés, à l'exception du test Comète qui nécessite le sacrifice de 5 larves par réplicat et du suivi de l'activité cardiaque effectué sur 5 individus par réplicat.

Les prélèvements destinés à l'évaluation des dommages à l'ADN par le test comète ont été effectués le jour même à raison d'un pool de 5 larves âgées de 12 j pf par réplicat. Les larves sont prélevées aléatoirement dans chaque bécher et placées dans un Eppendorf de 2 mL contenant

environ 1 mL d'eau de mélange propre. Les échantillons sont placés sur glace en attendant la mise en œuvre du test comète.

**Tableau 3.3. Paramètres suivis lors de l'exposition des embryons de Medaka aux sédiments de référence**

Paramètre/Analyse	Matrice concernée	Cinétique de mesure	Donnée dérivée
Viabilité	Embryons Larves	Tous les jours	Viabilité embryonnaire Viabilité larvaire Viabilité cumulée
Rythme Cardiaque*	Embryons	Jour 6 et 7 pf	Activité Cardiaque
Éclosions	Embryons Larves	Tous les jours	Taux d'éclosion Durée du développement
Données biométriques	Larves	Jour d'éclosion	Longueur totale Taille de la tête Rapport T/L
Malformations	Larves	Jour d'éclosion	Occurrence des malformations
Dommages ADN (Test Comète)**	Larves	Jour 12 pf	Pourcentage d'ADN dans la queue

*N.B. : Toutes les observations sont effectuées sur l'ensemble des individus (embryons et/ou larves) de chaque réplicat sauf indication contraire ci dessous.*

*\* Mesure effectuée sur 5 embryons par réplicat*

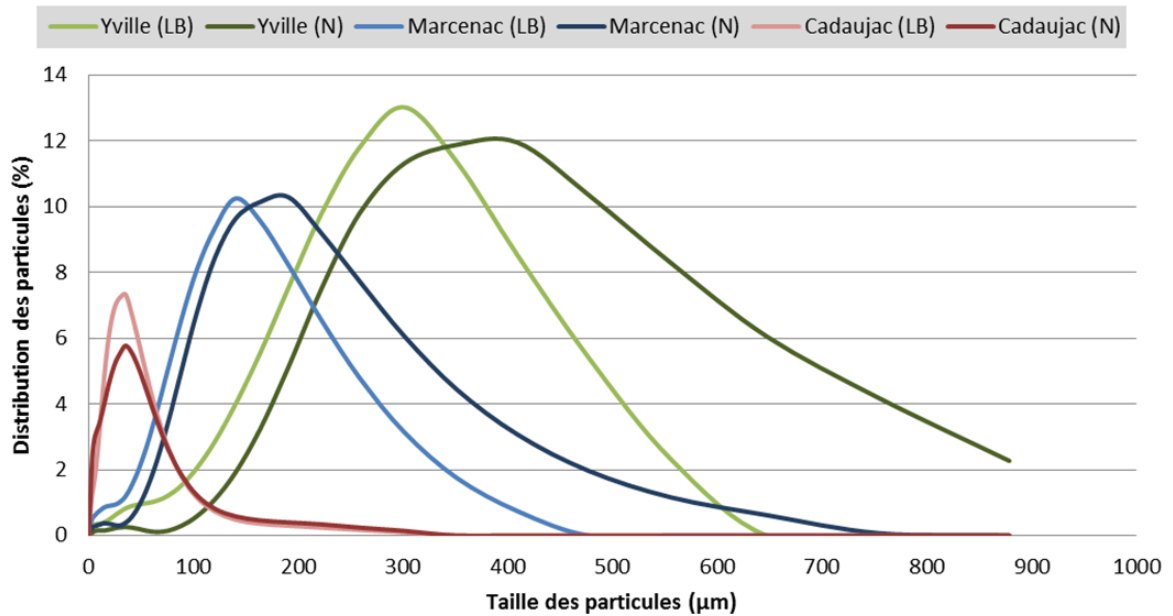
*\*\* Analyse effectuée sur un pool de 5 larves par réplicat*

Des micro-profilis d'oxygène ont été réalisés sur la colonne d'eau totale ainsi que dans les premiers millimètres de sédiment pour le sédiment d'Yville et de Marcenac (LB et N) dans les mêmes conditions que le test (26 °C, photopériode 12 h/12 h, 20 embryons et 3 mL d'ERS au total par réplicat), avec une sonde de type Clark munie d'une cathode de garde. Les profils d'oxygène ont été obtenus à l'aide du logiciel PRO2FLUX (Deflandre & Duchêne, 2010) et ont montré une bonne oxygénation de la colonne d'eau (supérieure à 80 % de saturation dans l'air, air sat.). Cependant, dès l'entrée de la sonde dans le sédiment, les profils obtenus montrent une diminution abrupte de la concentration en oxygène suggérant la présence d'une activité microbiologique. Les deux sédiments étudiés présentent des profils similaires. Par ailleurs, ces profils d'oxygénation caractéristiques sont observables dès les premières 24 h pour les sédiments natifs. Il faut attendre environ 24 h supplémentaires pour que les mêmes profils soient également observés dans les sédiments LB (auparavant, les profils correspondent à la diffusion passive de l'oxygène).

## 2.2. Caractérisation physico-chimique des sédiments

### 2.2.1. Granulométrie

La distribution de la taille des particules des différents sédiments sous leur forme native (N) et lyophilisée/broyée (LB) est présentée sur la [Figure 3.3](#). La représentation graphique de la proportion de particules de sédiment en fonction de leur taille permet de distinguer deux groupes de sédiments. Le premier groupe comprend les sédiments de Cadaujac (LB et N) dont la distribution de la taille des particules est peu dispersée et majoritairement composée de grains très fins (<63 µm). Le second groupe inclut les sédiments provenant de Marcenac et d'Yville (LB et N), dont la distribution granulométrique est plus étalée et principalement composée de grains plus grossiers (>63 µm). En se référant à l'échelle de Wentworth modifiée, il est possible de déterminer la classe granulométrique de chaque sédiment en utilisant la médiane de la taille des particules. Selon ce principe, les sédiments de Cadaujac (N et LB de médiane 22,78 µm et 18,46 µm respectivement) sont considérés comme des limons (silts) moyens, le sédiment de Marcenac LB (médiane égale à 111,49 µm) comme un sable très fin, les sédiments de Marcenac N et d'Yville LB (de médianes respectivement égales à



Proportions (%)	0,06-5 µm	<63 µm	63-125 µm	>125 µm	500-900 µm	D(0,10) µm	D(0,50) µm	D(0,90) µm
Yville (LB)	2,97	8,99	8,73	76,99	2,32	41,25	229,9	390,91
Yville (N)	0,98	2,88	2,25	73,1	20,79	155,5	321,83	588,43
Marcenac (LB)	4,79	17,22	32,97	45	0	14,75	111,49	224,74
Marcenac (N)	2,32	7,26	26,05	62,51	1,85	58,08	151,03	314,27
Cadaujac (LB)	11,5	76,87	10	1,65	0	4,2	22,78	59,86
Cadaujac (N)	19,21	68,72	9,93	2,16	0	2,77	18,46	61,33

**Figure 3.3. Distribution granulométrique de la taille des particules des sédiments de référence**

Les sédiments d'Yville, Marcenac et Cadaujac ont été caractérisés du point de vue granulométrique sous leur forme lyophilisée/broyée (LB) et native (N). La figure propose une représentation graphique (en haut) de la distribution des particules (en %) en fonction de leur taille (en µm) et un tableau (en bas) qui synthétise les grandes classes de taille de particules selon leur présence (en %) au sein de chaque sédiment, ainsi que le 10<sup>ème</sup> centile D(0,10) ; la médiane D(0,50) et le 90<sup>ème</sup> centile D(0,90) de la distribution (en µm).

151,03  $\mu\text{m}$  et 229,9  $\mu\text{m}$ ) comme des sables fins et le sédiment d'Yville N (médiane égale à 321,83  $\mu\text{m}$ ) comme un sable moyen.

Le broyage est quasiment sans effet sur le sédiment de Cadaujac dont la granulométrie est déjà très fine avant traitement. Sans changer fondamentalement l'allure de la distribution de la taille des particules, le broyage des sédiments sableux diminue de 15 % à 20 % la proportion de grains grossiers (>125  $\mu\text{m}$  ou >500  $\mu\text{m}$ ), les redistribuant dans les classes plus fines (<63  $\mu\text{m}$  ou 63-125  $\mu\text{m}$ ).

Lors des tests embryo-larvaires, la présence de particules très fines en trop grande proportion peut poser un problème en recouvrant les œufs et perturbant ainsi potentiellement les échanges, notamment gazeux, entre les embryons et le milieu extérieur.

### 2.2.2. Teneurs en ammonium, sulfures et carbone organique particulaire

Les concentrations en ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) et en sulfures ( $\text{H}_2\text{S}$ ) ont été mesurées dans l'eau interstitielle des différents sédiments après 9 j d'incubation dans les mêmes conditions (26 °C, photopériode 12 h/12 h, 3 ml d'ERS) que le test embryo-larvaire MELA. Les teneurs en carbone organique particulaire (COP) ont également été évaluées dans toutes les matrices sédimentaires testées. Les résultats de ces analyses sont synthétisés dans le **Tableau 3.4**.

**Tableau 3.4. Teneurs en ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), sulfures ( $\text{H}_2\text{S}$ ) et carbone organique particulaire (COP) des différents sédiments de référence**

	Concentration ( $\mu\text{M}$ )		
	$\text{NH}_4^+$	$\text{H}_2\text{S}$	COP (%)
Yville (LB)	40,7	17,6	0,14
Yville (N)	63,8	8,0	0,07
Marcenac (LB)	62,3	44,1	0,11
Marcenac (N)	16,8	16,8	0,10
Cadaujac (LB)	31,1	8,0	1,37
Cadaujac (N)	47,8	4,4	1,37

L'ammonium est le résultat de la dégradation de la matière organique en décomposition ou de la réduction des nitrates par action microbienne hétérotrophe. Les concentrations en ammonium mesurées dans l'eau interstitielle sont relativement faibles et varient de 16,8  $\mu\text{M}$  à 63,8  $\mu\text{M}$ . De manière générale, la concentration en ammonium est inférieure pour les sédiments LB en comparaison des teneurs obtenues pour la forme N de ces mêmes sédiments, ce qui semble en accord avec une perte partielle de la teneur en  $\text{NH}_4$  au cours de la lyophilisation (Griffin *et al.*, 2005 ; Van Kessel *et al.*, 1999). Étrangement, la valeur obtenue pour le sédiment de Marcenac N est très basse en comparaison des autres et inférieure à celle observée sur la forme lyophilisée de ce sédiment, ce qui soulève la question de cette validité de la mesure. Si ce sédiment avait subi une perte en ammonium lors de la lyophilisation dans les mêmes proportions que les autres sédiments (~35 % de perte), la concentration en  $\text{NH}_4^+$  dans l'eau interstitielle du sédiment de Marcenac N serait aux alentours de 97  $\mu\text{M}$ .

Le sulfure d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{S}$ ) est principalement issu de la réduction du soufre organique par voie aérobie ou anaérobie lors de la décomposition de la matière organique par la flore microbienne. Les concentrations en sulfures mesurées dans les différents sédiments sont comprises entre 4,4  $\mu\text{M}$  et 44,1  $\mu\text{M}$ . Au vue des différentes valeurs obtenues, il semble que la lyophilisation induise une



augmentation de la teneur en H<sub>2</sub>S des sédiments qui pourrait être expliquée par une modification de la spéciation chimique des éléments soufrés au cours du processus de séchage (Hjorth, 2004). Les plus fortes concentrations sont observées pour le sédiment de Marcenac (16,8 µM et 44,1 µM pour la forme N et LB respectivement). Cependant, le laboratoire en charge de ces analyses a rapporté une présence importante de particules en suspension dans les échantillons d'eau interstitielle de Marcenac, notamment dans l'échantillon provenant du sédiment lyophilisé. La présence de ces particules conduit à une coloration orangée de l'échantillon qui a certainement résulté en une surévaluation de la teneur en sulfures lors du dosage colorimétrique. Cette hypothèse paraît en accord avec la faible coloration bleue due aux sulfures observée dans ces mêmes échantillons par le laboratoire.

Les teneurs en COP mesurées dans les différents sédiments sont globalement faibles et comprises entre 0,07 % et 1,37 %. À l'exception du sédiment d'Yville, les teneurs en COP mesurées dans les autres sédiments ne sont absolument pas affectées par le processus de lyophilisation. Les valeurs observées pour les sédiments de Marcenac et d'Yville (LB et N) sont très proches, avoisinant toutes les 0,1 % et semblent indiquer que ces sédiments sont pauvres en matière organique. Le sédiment de Cadaujac semble plus riche, avec des teneurs en COP supérieures, puisque égales à 1,37 %.

### 2.2.3. Teneurs en micropolluants dans les sédiments

#### 2.2.3.1. Teneurs en éléments traces métalliques

Le résultat des analyses en métaux des différents sédiments de référence est reporté dans le **Tableau 3.5**.

**Tableau 3.5. Teneurs en principaux éléments traces métalliques dans les différents sédiments de référence**

	Concentration en µg/g p.s.									
	Co	Mn	Ni	Zn	Cr	Cu	As	Ag	Cd	Pb
Cadaujac	10,7	677	19	126	25,2	17,1	14,3	0,23	0,43	35,9
Marcenac	5,6	261	9,5	35	10,0	6,2	17,5	0,04	0,14	12,5
Yville	0,74	8,0	1,0	7,3	1,74	0,33	0,63	0,009	0,020	1,09
Niveau S1	-	-	50	300	150	100	30	-	2	100

*Co : cobalt ; Mn : Manganèse ; Ni : nickel ; Zn : zinc ; Cr : chrome ; Cu : cuivre ; As : arsenic ; Ag : argent ; Cd : cadmium ; Pb : plomb ; Niveau S1 : niveau de référence pour la qualité de sédiments extraits de cours d'eau ou de canaux préconisé par l'arrêté du 9 août 2006.*

Pour les dix éléments traces métalliques qui ont été recherchés, le sédiment d'Yville présente des concentrations très inférieures à celles observées pour les sites de Cadaujac et Marcenac, avec des valeurs généralement aux alentours ou inférieures à 1 µg/g p.s. (à l'exception du Zn et du Mn à 7-8 µg/g p.s.). Au regard de leur teneurs en métaux, les différents sédiments pourraient être classés du plus au moins contaminé comme suit : Cadaujac > Marcenac > Yville. Pour les six éléments concernés (Ni, Zn, Cr, Cu, As et Pb), les concentrations mesurées pour les trois sites sont toutes inférieures au seuil de référence mentionné par l'arrêté du 9 août 2006 concernant les sédiments d'eau douce.

#### 2.2.3.2. Teneurs en HAP

Les analyses en contaminants organiques dans les trois matrices de référence potentielles sont présentées dans le **Tableau 3.6**. Les analyses des sédiments de Marcenac et d'Yville montrent une contamination en HAP marginale de ces deux matrices sédimentaires. En effet, concernant les 16 HAP prioritaires, les teneurs mesurées pour ces deux sites sont de l'ordre ou inférieur à 2 ng/g p.s.

Les teneurs en HAP totaux qui en résultent sont également très faibles avec des valeurs de 13 ng/g p.s. et de 6 ng/g p.s. respectivement pour les sédiments d'Yville et de Marcenac.

**Tableau 3.6. Concentrations en HAP individuels des sédiments de référence**

	Concentration en ng/g p.s.														
	N	Acty	Acte	Fle	An	Phe	Fluo	Pyr	B[a]A	Chrys + Triph	B[a]P	B[b]F + B[k]F	D[a,h]A+ D[a,c]A	BPe	IP
Cadaujac	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
Marcenac	n.d.	n.d.	n.d.	0,03	n.d.	0,5	0,4	0,4	0,3	0,3	0,8	1,3	n.d.	0,5	0,5
Yville	<0,1	<0,1	0	0	<0,1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	0

*N* : naphthalène ; *Acty* : acénaphtylène ; *Acte* : acénaphène ; *Fle* : fluorène ; *An* : anthracène ; *Phe* : phénanthrène ; *Fluo* : fluoranthène ; *Pyr* : pyrène ; *B[a]A* : benzo[a]anthracène ; *Chys + Triph* : chrysène + triphénylène ; *B[a]P* : benzo[a]pyrène ; *B[b]F + B[k]F* : benzo[b]fluoranthène + benzo[k]fluoranthène ; *D[a,h]A + D[a,c]A* : dibenzo[a,h]anthracène + dibenzo[a,c]anthracène ; *BPe* : benzo[g,h,i]pérylène ; *IP* : indéno[1,2,3-c,d]pyrène. (1) : en cours d'analyse au sein de l'équipe « AQUA » du LPTC sous la direction du DR1 H. Budzinski.

## 2.3. Résultats du test MELA

### 2.3.1. Toxicité aigüe

L'exposition des embryons de Medaka aux différents sédiments de référence potentiels, sous leur forme lyophilisée/broyée (LB) ou native (N), ne conduit à aucune augmentation significative de la mortalité embryonnaire. En effet, au cours de cette expérience, la viabilité à ce stade de développement est comprise entre 95 % et 100 % toutes conditions confondues (*Figure 3.4.a*).

De la même manière, la survie larvaire observée lors de ce test est supérieure à 90 % en moyenne pour tous les traitements, à l'exception du sédiment de Cadaujac N (natif) pour lequel la viabilité larvaire est évaluée à  $82 \pm 2$  % (*Figure 3.4.b*). Cependant, aucune différence statistique n'est mise en évidence entre les différents sédiments pour ce paramètre.

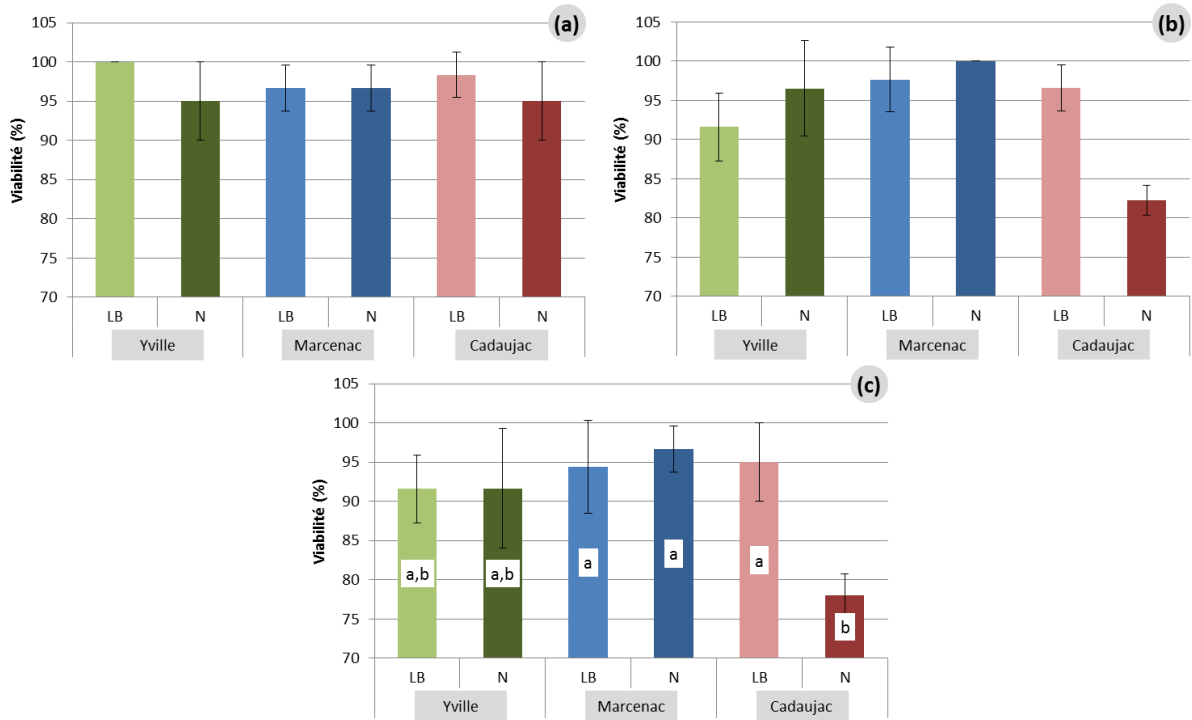
La survie cumulée des embryons et larves reflète cependant bien cette augmentation de la mortalité larvaire après exposition au sédiment de Cadaujac N. En effet, alors que les viabilités cumulées des individus exposés aux autres matrices sédimentaires sont relativement élevées et comprises entre 91 % et 97 %, la survie cumulée calculée pour le sédiment de Cadaujac N est significativement plus basse que celles de Cadaujac LB (lyophilisé/broyé) et de Marcenac (LB et N), avec une valeur moyenne de  $78 \pm 2$  % (*Figure 3.4.c*).

### 2.3.2. Tératogénicité & autres effets sublétaux

#### 2.3.2.1. Développement embryonnaire

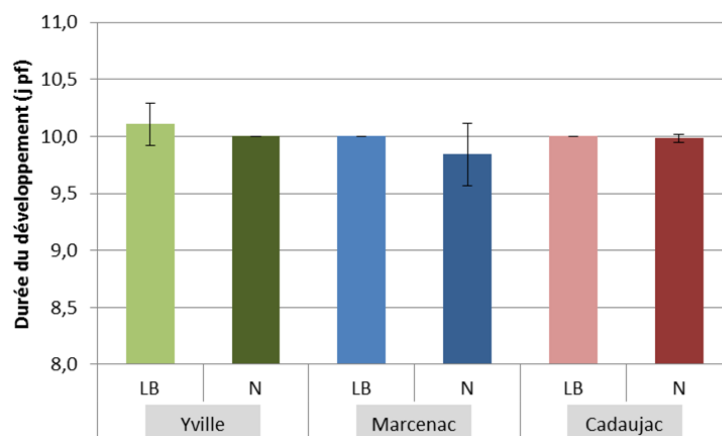
Tous les embryons restés vivants tout au long de cette expérience ont réussi à éclore avant 20 j pf. Par conséquent, le taux d'éclosion observé pour chaque groupe est égal à la viabilité embryonnaire et n'est donc pas mentionné à nouveau ici.

Pour tous les traitements appliqués lors de cette série d'exposition, la très grande majorité des embryons a éclos de façon extrêmement synchrone au jour 10 pf. La durée de développement est donc très similaire pour toutes les conditions d'exposition et est comprise en moyenne entre 9,84j pf et 10,11j pf (*Figure 3.5*).



**Figure 3.4. Viabilités embryonnaire (a), larvaire (b) et cumulée (c) des embryons et larves de Medaka après exposition aux sédiments de référence**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type (N = 3). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres au centre des barres : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey). LB : lyophilisé/broyé ; N : natif.



**Figure 3.5. Durée du développement embryonnaire des individus exposés aux sédiments de référence**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type (N = 3). Lors du calcul de la durée du développement, le jour de la fécondation des embryons est considéré comme le jour 0 pf. LB : lyophilisé/broyé ; N : natif

### 2.3.2.2. Activité cardiaque

La fonction cardiaque a été évaluée par la mesure du rythme cardiaque chez les embryons âgés de 6 et 7 j pf dont les résultats sont illustrés sur la *Figure 3.6*. Au jour 6 pf, les embryons exposés aux sédiments d'Yville LB et de Cadaujac N présentent une activité cardiaque de  $95 \pm 4$  batt./min et  $94 \pm 1,5$  batt./min respectivement. Les individus exposés aux sédiments d'Yville N, de Marcenac LB et N ainsi que de Cadaujac LB ont un rythme cardiaque significativement plus bas, avec des valeurs moyennes comprises entre 82 et 87 batt./min (*Figure 3.6.a*).

Le jour suivant, le même profil de réponse est observé : les embryons exposés aux sédiments d'Yville LB et de Cadaujac N ont une activité cardiaque aux environs de 87 batt./min alors que pour les autres conditions d'exposition, le rythme cardiaque a tendance à être moins soutenu, avec des valeurs comprises entre 72 et 78 batt./min. Cependant, cette tendance n'est significative que pour les individus du groupe Marcenac LB avec une pulsation cardiaque moyenne de  $72 \pm 5$  batt./min (*Figure 3.6.b*).

### 2.3.2.3. Données biométriques

Les longueurs totales des larves écloses sont très proches pour toutes les conditions testées, variant de 5,11 mm à 5,18 mm en moyenne (*Figure 3.7.a*). Il en est de même pour les mesures de la taille de la tête qui s'échelonnent de 0,92 mm à 1 mm parmi les différents groupes d'individus exposés aux sédiments (*Figure 3.7.b*). Il en résulte un rapport T/L relativement constant entre les traitements, avec des valeurs moyennes comprises entre 18 % et 19,5 % (*Figure 3.7.c*).

### 2.3.2.4. Tératogénicité

L'observation des malformations chez les larves nouvellement écloses a permis de mettre en évidence une certaine variabilité entre les différents groupes étudiés.

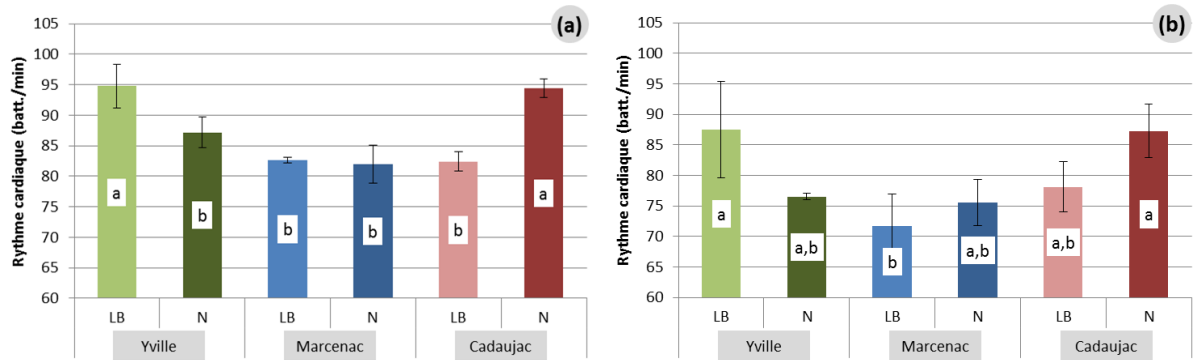
En effet, le pourcentage moyen d'individus affectés par une ou plusieurs anomalies de développement atteint  $20,3 \pm 18$  %,  $14 \pm 2,5$  %,  $12 \pm 12,5$  %,  $10,5 \pm 0$  %,  $20,9 \pm 14$  % et  $14,5 \pm 2,5$  % pour les sédiments d'Yville LB et N, de Marcenac LB et N, et de Cadaujac LB et N respectivement (*Figure 3.8*). De manière inexplicable, les variabilités sont plus importantes lorsqu'il s'agit des sédiments LB en comparaison de leur forme N. Malgré les écarts de valeurs observés, l'analyse statistique ne révèle aucune différence significative entre les différents groupes.

Le **Tableau 3.7** récapitule les pourcentages d'individus impactés par chaque type de malformations observées au cours de cette expérience.

**Tableau 3.7. Pourcentages d'individus impactés par les différents types de malformations après exposition aux sédiments de référence**

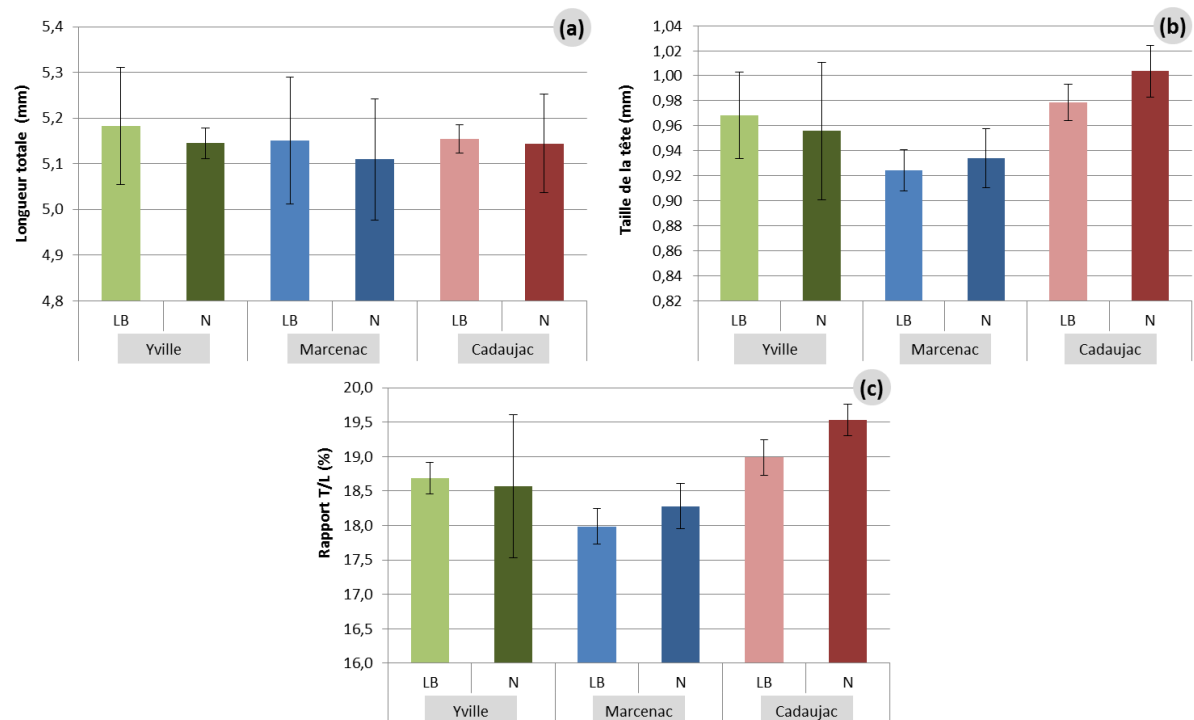
	Œdèmes	Squelette axial Cranio-faciale	Œil	Cardio-vasculaire	Sac Vitellin
Yville (LB)	$2 \pm 3,04$ %	$7 \pm 7,64$ %	$4 \pm 6,08$ %	$14 \pm 15,22$ %	$0 \pm 0,00$ %
Yville (N)	$0 \pm 0,00$ %	$12 \pm 2,43$ %	$0 \pm 0,00$ %	$2 \pm 3,04$ %	$0 \pm 0,00$ %
Marcenac (LB)	$3 \pm 5,77$ %	$5 \pm 5,01$ %	$0 \pm 0,00$ %	$4 \pm 6,42$ %	$2 \pm 2,89$ %
Marcenac (N)	$0 \pm 0,00$ %	$2 \pm 3,04$ %	$0 \pm 0,01$ %	$9 \pm 3,04$ %	$0 \pm 0,00$ %
Cadaujac (LB)	$2 \pm 2,89$ %	$9 \pm 3,19$ %	$5 \pm 0,15$ %	$12 \pm 8,16$ %	$0 \pm 0,00$ %
Cadaujac (N)	$2 \pm 3,21$ %	$7 \pm 3,30$ %	$2 \pm 3,12$ %	$9 \pm 2,75$ %	$0 \pm 0,00$ %

Les catégories de malformations les plus fréquemment rencontrées concernent le squelette axial et le système cardiovasculaire, touchant jusqu'à  $12 \pm 2,4$  % et  $14 \pm 15,2$  % des larves



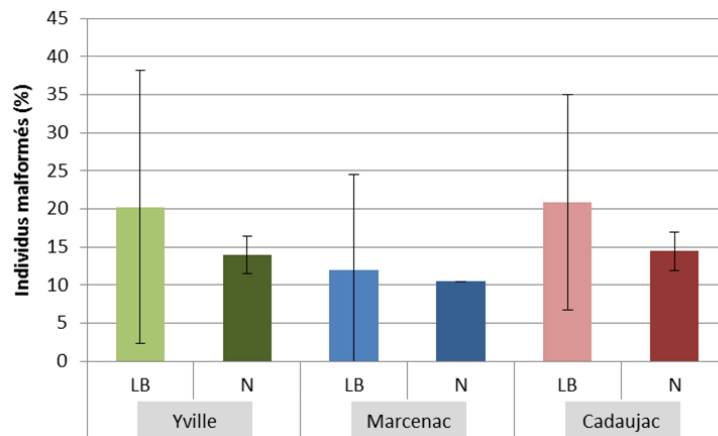
**Figure 3.6. Activité cardiaque des embryons âgés de 6 j pf (a) et 7 j pf (b) exposés aux sédiments de référence**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type ( $N = 3$ ). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres au centre des barres : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey). LB : lyophilisé/broyé ; N : natif



**Figure 3.7. Mesures biométriques acquises sur les larves nouvellement écloses au cours de l'exposition aux sédiments de référence**

Les données biométriques acquises au cours du MELA incluent la longueur totale des larves (a), la taille de la tête (b) et le rapport entre la taille de la tête et la longueur totale du corps (c) noté rapport T/L. Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type ( $N = 3$ ). LB : lyophilisé/broyé ; N : natif



**Figure 3.8. Pourcentage de larves présentant des malformations après exposition aux sédiments de référence**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type ( $N = 3$ ). Une larve nouvellement éclos est considérée comme malformée dès lors qu'elle présente l'une des anomalies de développement décrite dans le Chapitre 2, paragraphe 6.3.3, sans tenir compte de la gravité ou du nombre de malformation. LB : lyophilisé/broyé ; N : natif

nouvellement écloses respectivement. Les autres types d'anomalies du développement restent marginaux et concernent, en moyenne, moins de 5 % des individus observés.

### 2.3.3. Génotoxicité (test comète)

Au vue de l'ensemble des résultats présentés ci-dessus, nous avons choisi d'évaluer le potentiel génotoxique des sédiments de Marcenac LB et N uniquement en le comparant à la matrice de référence déjà validée d'Yville LB. Les résultats obtenus à l'aide du test Comète sont présentés sur la *Figure 3.9*. Les pourcentages moyens d'ADN dans la queue ont été évalués à  $8,23 \pm 4,5 \%$ ,  $7,20 \pm 2,3 \%$  et  $7,29 \pm 2,9 \%$  respectivement pour les sédiments d'Yville LB et de Marcenac LB et N et aucune différence statistique significative n'a été mise en évidence.

## 2.4. Discussion et choix de la matrice de référence

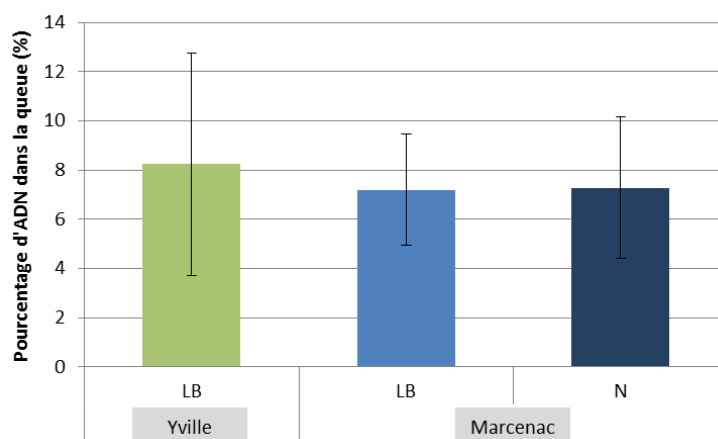
L'enjeu premier de cette exposition était de sélectionner un sédiment de référence représentatif du contexte sédimentaire de la région Aquitaine, tout en offrant des conditions satisfaisantes pour le développement des embryons de Medaka à son contact direct.

Les recommandations européennes concernant les tests de toxicité utilisant les stades précoces de développement (SPD) de poisson exigent des taux d'éclosion et de survie post-éclosion supérieurs à 80 % (OECD, 1998, 1992). Ces conditions sont remplies pour tous les sédiments testés qu'ils soient lyophilisés/broyés (LB) ou natifs (N) avec des viabilités comprises entre 95 % et 100 % pour le stade embryonnaire (équivalentes aux taux d'éclosion) et entre 82 % et 100 % pour le stade larvaire, tous traitements confondus. Ces résultats sont également en adéquation avec ceux issus de plusieurs études au cours desquelles un test embryo-larvaire poisson est utilisé pour évaluer la toxicité de matrices sédimentaires (Tuikka *et al.*, 2011 ; Höss *et al.*, 2010 ; Sternecker & Geist, 2010 ; Hallare *et al.*, 2005a).

Cependant, la réduction significative de la viabilité cumulée (a priori le reflet de la tendance à la diminution du taux de survie larvaire) observée pour la matrice sédimentaire de Cadaujac N pose la question de sa réelle validité en tant que sédiment de référence. Les teneurs plus importantes en certains éléments métalliques (notamment en Mn, Zn et Pb) de ce sédiment par rapport à ceux de Marcenac et d'Yville pourraient expliquer la mortalité observée. Cette embryotoxicité pourrait également être la conséquence d'une granulométrie plus fine et de la charge plus importante en matière organique (Höss *et al.*, 2010) du sédiment de Cadaujac qui pourrait notamment altérer la teneur en oxygène vers l'interface eau-sédiment et perturber les échanges gazeux entre l'embryon et son environnement extérieur (Strecker *et al.*, 2011 ; Sternecker & Geist, 2010).

La durée du développement embryonnaire fut très similaire entre les différents traitements avec plus de 85 % des individus ayant éclos au jour 10 pf quel que soit le sédiment considéré. Ces résultats sont en accord avec les observations de la littérature qui rapportent usuellement une durée du développement embryonnaire de 9 j à 12 j pf chez le Medaka japonais maintenu à 25-26 °C (Gonzalez-Doncel *et al.*, 2008 ; Farwell *et al.*, 2006 ; Gonzalez-Doncel *et al.*, 2003b).

De la même manière, les longueurs totales moyennes des larves issues des expositions aux différents sédiments étaient très proches et aux alentours de 5,15 mm pour tous les traitements. Plusieurs études utilisant le Medaka japonais comme organisme modèle mentionnent des individus de taille plus réduite, mesurant en moyenne de 3,8 mm à 4,2 mm à l'éclosion



**Figure 3.9. Dommages à l'ADN observés chez des larves âgées de 2 j post-éclosion après exposition aux différents sédiments de référence évalués par le test Comète**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type ( $N = 3$ ). La génotoxicité des sédiments a été évaluée chez les larves de Medaka âgées de 2 jours post-éclosion à l'aide du test Comète. Le pourcentage d'ADN dans la queue d'une comète est directement proportionnel au taux d'endommagement de l'ADN de la cellule considérée. LB : lyophilisé/broyé ; N : natif



(Farwell et al., 2006 ; Oxendine et al., 2006 ; Iwamatsu, 2004). Ces variations biométriques observées entre des études et des laboratoires différents pourraient être liées aux conditions d'élevage des poissons géniteurs et aux facteurs environnementaux appliqués lors du développement des embryons (température, luminosité, photopériode...) ainsi qu'à la souche de Medaka utilisée.

Les rythmes cardiaques mesurés au cours de cette expérience variaient de 72 batt./min à 95 batt./min selon le jour d'acquisition et les conditions d'exposition. Ces activités cardiaques sont beaucoup plus basses que celles rapportées dans la littérature qui sont comprises entre 129 et 138 batt./min au jour 6 pf (Nassef *et al.*, 2010) et se stabilisent vers 180 batt./min chez les embryons de 7 j pf (Gonzalez-Doncel *et al.*, 2005). Les valeurs plus basses de rythme cardiaque mesurées lors de la présente étude pourraient s'expliquer par le fait qu'au moment où cette exposition a eu lieu, le système de climatisation n'était pas encore installé dans nos locaux dont la température avoisinait alors les 20 °C alors que celle appliquée lors du maintien des embryons est de 26 °C. En effet, Hallare *et al.* (2005b) observent une activité cardiaque de 110 à 130 batt./min chez des embryons de *Danio rerio* élevés à 26 °C alors qu'à 21 °C le rythme cardiaque enregistré n'est plus que de 60 à 80 batt./min. Pour la suite de nos expositions, une attention toute particulière sera portée à la température de la salle lors de la mesure de la fonction cardiaque afin qu'elle ne diffère pas de plus de 2 °C de celle des enceintes thermorégulées servant d'incubateur lors du développement des embryons exposés.

L'apparition de malformations au cours du développement est un marqueur sensible classiquement retenu lors des tests embryo-larvaires poisson. Dans la présente étude, toute anomalie de développement en comparaison du développement optimal décrit par Iwamatsu (2004) et Gonzalez-Doncel (2005) a été prise en compte sans considérer le degré de sévérité de la malformation concernée. Selon cette approche, le taux d'individus malformés varie de 10 % à 20 %, les valeurs moyennes les plus hautes ayant été enregistrées pour Yville LB et Cadaujac LB. Ces résultats sont en accord avec certaines données de la littérature concernant le Medaka ou d'autres espèces de poisson (Benaduce *et al.*, 2008 ; Farwell *et al.*, 2006). Il faut cependant noter que les différentes catégories de malformations (types de malformations et nombre de catégories) ainsi que les critères de prise en compte des anomalies du développement (sévérité, seuil de classification sain/malformé) sont très variables entre les études et influencent grandement le nombre d'individus considérés comme « malformés » ou non. Dans étude, nous avons sélectionné une large gamme de malformations et d'organes cibles et toute anomalie, même légère, est prise en compte.

Pour finir, l'application du test comète sur des larves âgées au jour 12 pf, issues de l'exposition aux sédiments d'Yville LB et de Marcenac (LB et N), n'a pas mis en évidence d'effet génotoxique particulier. En effet, le pourcentage d'ADN dans la queue reste similaire pour les différentes conditions d'exposition et toutes inférieures à 10 % en moyenne ce qui confirme un faible endommagement de l'ADN des cellules, compatible avec les résultats attendus chez des individus contrôles (Collins, 2004).

Le suivi de l'oxygène dissous sur ces mêmes sédiments a permis de mettre en évidence un niveau d'oxygénation approprié au bon développement des organismes à son contact. En effet, le taux de saturation en oxygène est toujours supérieur à 80 % air sat. ce qui correspond tout à fait aux exigences de la réglementation européenne (OECD, 1998, 1992) ainsi qu'aux recommandations fournies par plusieurs auteurs dans la littérature (Strecker *et al.*, 2011 ; Marty *et al.*, 1990).

En conclusion, aucun des sédiments testés n'induit d'effets notables sur le développement du Medaka japonais, à l'exception du sédiment de Cadaujac N qui induit une diminution significative de la viabilité des individus exposés. D'autre part, la présence de particules fines recouvrant les embryons exposés à ce sédiment et gênant leur observation a nécessité le nettoyage manuel des œufs. Ces manipulations, même effectuées avec beaucoup de précaution, représentent un risque supplémentaire d'endommagement des embryons par l'intermédiaire de l'expérimentateur et sont donc à limiter au maximum.

**Au vue de l'ensemble des résultats et observations acquis au cours de cette série d'expériences, le sédiment de Marcenac a finalement été retenu comme matrice de référence pour l'ensemble des expériences ultérieures. En effet, l'analyse des différents marqueurs de toxicité a permis de conclure à l'induction d'effets très limités (voire inexistant) de ce sédiment sur les SPD du Medaka japonais. D'autre part, la nature du sédiment, de granulométrie moyenne et de teneur en COP très faible et sa contamination marginale en éléments métalliques et HAP, en fait une matrice tout à fait acceptable comme substrat pour le développement des embryons de Medaka.**

### 3. ÉVALUATION DE L'EMBRYOTOXICITE DU CUIVRE ET DU CADMIUM PAR LE MELA

---

Dans cette étude, nous avons choisi deux métaux représentatifs de la contamination métallique du continuum Lot-Garonne-Gironde : le cadmium (Cd), métal non-essentiel tératogène et potentiellement génotoxique et le cuivre (Cu), oligoélément essentiel, dont la présence en excès peut engendrer une toxicité importante chez les organismes aquatiques. Les teneurs en Cd et Cu dans les sédiments varient le long du continuum avec l'éloignement de la source de contamination et les variations des conditions physico-chimiques du milieu (notamment le pH et la salinité). Les concentrations en éléments traces métalliques testées ont été choisies en tenant compte des valeurs pouvant être observées le long du gradient de contamination et fixées à **0 µg/g p.s.** (0X : témoin négatif), **2 µg/g p.s.** (0,3X ; contamination faible équivalente au seuil S1 de référence préconisé par l'arrêté du 9 août 2006), **6,5 µg/g p.s.** (1X : contamination environnementale moyenne) et **20 µg/g p.s.** (3X ; contamination modérée à forte du compartiment sédimentaire).

#### 3.1. Protocole expérimental

##### 3.1.1. Conditions d'exposition

L'évaluation de la toxicité des deux éléments traces modèles a été réalisée en exposant des embryons de Medaka juste fécondés au sédiment de référence de Marcenac préalablement lyophilisé/broyé puis dopé en Cu ou en Cd selon les doses citées ci-dessus. La quantité de sédiment nécessaire à la réalisation de chaque test (environ 25 g de sédiment p.s. par condition) a été artificiellement contaminée en éléments métalliques selon le protocole détaillé dans le *Chapitre 2, paragraphe 3.2.*

Une trentaine d'embryons de stade pré-morula par réplicat, issus de la reproduction des géniteurs de notre élevage, ont ensuite été exposés aux différents sédiments au cours de deux expositions indépendantes selon les conditions détaillées dans le **Tableau 3.8** et le protocole décrit

dans le *Chapitre 2, paragraphe 6.1*, sans renouvellement d'ERS (le niveau à seulement été complété au besoin).

**Tableau 3.8. Conditions d'exposition appliquées lors de l'exposition des embryons de Medaka aux sédiments dopés en Cu et en Cd**

Nb. Conditions traitées	Nb. Réplicats par condition	Ø BP (mm)	Nb. Emb.	Stade	M <sub>sed</sub> (g p.s.)	V <sub>h</sub> ERS (mL)	V <sub>i</sub> ERS (mL)	T <sub>incub</sub> (°C)	Photop. (h j/n)
4	3	35	30	pré-morula (2-4 h pf)	5	2	1	26 °C	12 h/12 h

Ø BP : diamètre de la boîte de Pétri d'exposition ; Nb. Emb. : nombre d'embryons exposés par réplicat ; M<sub>sed</sub> : masse de sédiment par réplicat en gramme de poids sec ; V<sub>h</sub> ERS : volume d'ERS ajouté pour humidifier le sédiment de chaque réplicat ; V<sub>i</sub> ERS : volume d'ERS ajouté dans un réplicat pour immerger les embryons ; T<sub>incub</sub> : température d'incubation des embryons pour toute la durée du test ; Photop. : photopériode appliquée pour toute la durée du test en h de jour/h de nuit.

### 3.1.2. Paramètres suivis

Les marqueurs suivis au cours des expositions des embryons de Medaka au Cu et au Cd sont identiques à ceux utilisés lors du choix de la matrice de référence et rappelés dans le **Tableau 3.9**.

**Tableau 3.9. Paramètres suivis lors de l'exposition des embryons de Medaka aux sédiments dopés en Cu et en Cd**

Paramètre/Analyse	Matrice concernée	Cinétique de mesure	Donnée dérivée
Caractérisation chimique	Sédiment	T0 (avant exposition) T9 (arrêt exposition)	Suivi de la contamination
Viabilité	Embryons Larves	Tous les jours	Viabilité embryonnaire Viabilité larvaire Viabilité cumulée
Rythme Cardiaque*	Embryons	Jour 6 et 7 pf	Activité Cardiaque
Éclosions	Embryons Larves	Tous les jours	Taux d'éclosion Durée du développement
Données biométriques	Larves	Jour d'éclosion	Longueur totale Taille de la tête Rapport T/L
Malformations	Larves	Jour d'éclosion	Occurrence des malformations
Dommages ADN (Test Comète)**	Larves	Jour 12 pf	Pourcentage d'ADN dans la queue

*N.B. : Toutes les observations sont effectuées sur l'ensemble des individus (embryons et/ou larves) de chaque réplicat sauf indication contraire ci dessous.*

\* Mesure effectuée sur 5 embryons par réplicat

\*\* Analyse effectuée sur un pool de 5 larves par réplicat

Les marqueurs de toxicité utilisés au cours de cette expérience sont exclusivement non-invasifs et effectués sur l'ensemble des individus exposés, à l'exception du test Comète qui nécessite le sacrifice de 5 larves par réplicat et du suivi de l'activité cardiaque effectué sur 5 individus par réplicat.

Les prélèvements de sédiments destinés aux dosages des éléments métalliques à T0 sont effectués au moment de l'aliquotage du sédiment dopé dans les boîtes d'exposition. L'aliquote de sédiment réservé à ces analyses est conservé à -20 °C dans un tube en polypropylène jusqu'à la caractérisation chimique. Au moment de l'arrêt de l'exposition (T9), les sédiments sont débarrassés au maximum de l'ERS et conservés dans les boîtes de Pétri d'exposition scellées à -20 °C jusqu'à analyse.

Les prélèvements de larves destinés à l'analyse des dommages de l'ADN par le test comète ont été effectués comme décrits au *paragraphe 2.1.2* de ce chapitre.

### 3.2. Concentrations en éléments métalliques dans le sédiment

Les résultats des dosages en Cd et Cu effectués sur les sédiments, au lancement de l'exposition des embryons (T0) et en fin d'exposition (T9) sont reportés dans le **Tableau 3.10**. Ces analyses ont permis de déterminer les niveaux de base (ou background) en Cu et Cd dans le sédiment de Marcenac dont les concentrations respectives sont de **7,18 µg/g p.s.** et **0,17 µg/g p.s.** La teneur en Cu du sédiment de référence est relativement élevée en comparaison des concentrations cibles d'enrobage. En revanche, le background en Cd est négligeable en comparaison des doses utilisées pour le dopage.

**Tableau 3.10. Concentrations en Cd et en Cu dans les sédiments utilisés lors de l'exposition des embryons de Medaka au Cadmium et au Cuivre**

	<b>C<sub>dosée</sub> (µg/g p.s.)</b>		<b>C<sub>relative</sub> (µg/g p.s.)</b>		<b>C<sub>cible</sub> (µg/g)</b>	<b>C<sub>théorique</sub> (µg/g)</b>	<b>R<sub>enrobage</sub> (%)</b>
	T0	T9	T0	T9			
<i>Exposition au Cd / Concentrations en Cd dans le sédiment</i>							
Cd-0X	0,18	0,15 ± 0,00 a	0,00	n.d.	0,00	0,00	-
Cd-0,3X	1,91	1,83 ± 0,02 b	1,74	1,66 ± 0,02	2,00	2,00	86,83
Cd-1X	6,67	5,82 ± 1,69 c	6,50	5,65 ± 1,69	6,50	6,48	100,18
Cd-3X	19,80	17,13 ± 1,35 d	19,62	16,96 ± 1,35	20,00	19,95	98,35
<i>Exposition au Cu / Concentrations en Cu dans le sédiment</i>							
Cu-0X	6,95	7,13 ± 0,08 a	n.d.	n.d.	0,00	0,00	-
Cu-0,3X	8,49	8,94 ± 0,51 b	1,31	1,76 ± 0,51	2,00	1,99	65,94
Cu-1X	12,70	13,03 ± 0,13 c	5,52	5,85 ± 0,13	6,50	6,47	85,41
Cu-3X	23,11	28,43 ± 0,64 d	15,94	21,25 ± 0,64	20,00	19,89	80,12
<b>Valeur du background (µg/g p.s.)</b>			<b>Cd : 0,17 ± 0,04</b>		<b>Cu : 7,18 ± 0,49</b>		

*C<sub>dosée</sub> : concentration dosée ; C<sub>relative</sub> : concentration après soustraction des valeurs du background ; C<sub>cible</sub> : concentration sélectionnée pour le test embro-larvaire ; C<sub>théorique</sub> : concentration attendue après enrobage (après ajustement à la concentration des solutions de contamination et la quantité exacte de matrice dopée) ; R<sub>enrobage</sub> : rendement de l'enrobage (écart entre C<sub>théorique</sub> et C<sub>relative</sub> à T0) ; n.d. : donnée non déterminée car la valeur du background est supérieure à la valeur dosée. Les données sont présentées, lorsqu'elles s'y prêtent, sous forme de moyenne par condition ± écart-type (N = 3). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres à droite des valeurs concernées : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés (p < 0,05 selon le test post-hoc de Tukey)*

Les rendements d'enrobage du sédiment de Marcenac varient d'environ 87 % à 100 % pour le Cd et de 66 % à 85 % pour le Cu. Cette performance plus faible du procédé de dopage pour le Cu que pour le Cd pourrait s'expliquer par la présence initiale plus importante de Cu dans la matrice sédimentaire qui aurait réduit la capacité d'adsorption de cet élément lors de la contamination artificielle en occupant déjà une partie des sites de fixation du métal.

Malgré les écarts de rendements d'enrobage entre les deux métaux testés, les concentrations en Cu et Cd dans les sédiments dopés sont globalement proches des valeurs fixées initialement et significativement différentes les unes des autres (p < 0,05 selon le test *post-hoc* de Tukey). Par ailleurs, la comparaison des concentrations mesurées à T0 et T9 pour chacun des traitements indique que plus de 80 % de la dose initiale est toujours présente en fin d'exposition, démontrant ainsi la stabilité de la contamination tout au long de l'expérience.

Nous retiendrons donc comme concentrations d'exposition des embryons des teneurs dans le sédiment de **1,91 µg/g p.s.**, **6,67 µg/g p.s.** et **19,80 µg/g p.s.** pour les groupes Cd-0,3X, -1X et -3X et de **8,49 µg/g p.s.**, **12,70 µg/g p.s.** et **23,11 µg/g p.s.** pour les traitements Cu-0,3X, -1X et -3X, respectivement.

### 3.3. Résultats du test MELA

#### 3.3.1. Toxicité aigüe

Les différentes concentrations en Cu et Cd testées n'ont pas induit d'effets létaux chez les embryons et larves de Medaka exposés aux sédiments dopés. En effet, la viabilité embryonnaire observée lors de l'exposition au Cd était supérieure à 80 % en moyenne, pour tous les traitements envisagés (89 %, 81 %, 91 % et 85 % pour le contrôle et les groupes Cd-0,3X, Cd-1X et Cd-3X respectivement, *Figure 3.10.a*). De la même manière, la survie larvaire dans les 10 j suivant le pic d'éclosion n'a pas été significativement altérée par la contamination en Cd avec des valeurs moyennes de 83 %, 85 %, 80 % et 80 % respectivement pour les groupes cités ci-dessus (*Figure 3.10.b*).

Comme pour l'exposition au Cd, le taux de survie des embryons exposés au Cu est resté haut durant toute l'expérience, avec des valeurs comprises entre 93 % et 99 % pour toutes les concentrations testées (*Figure 3.10.a*). Cependant, des viabilités plus basses ont été observées au stade larvaire avec des survies moyennes respectives de 81 %, 75 %, 70 % et 71 % pour les groupes contrôle, Cu-0,3X, Cu-1X et Cu-3X (*Figure 3.10.b*).

Les viabilités cumulées observées au cours de ces deux séries d'expositions n'apportant pas d'informations supplémentaires, elles ne sont pas présentées ici.

#### 3.3.2. Tératogénicité & autres effets sublétaux

##### 3.3.2.1. Développement embryonnaire

Encore une fois, les taux d'éclosion pour les deux expériences suivent la même tendance que les viabilités embryonnaires étant donné que peu d'embryons n'ont pas éclos avant la fin de l'expérience. Ainsi, les taux d'éclosion moyens étaient compris entre 80 % et 91 % lors de l'exposition au Cd et variaient de 93 % à 99 % au cours de celle au Cu, sans que l'analyse statistique ne révèle de différences significatives entre les traitements (*Figure 3.11.a*).

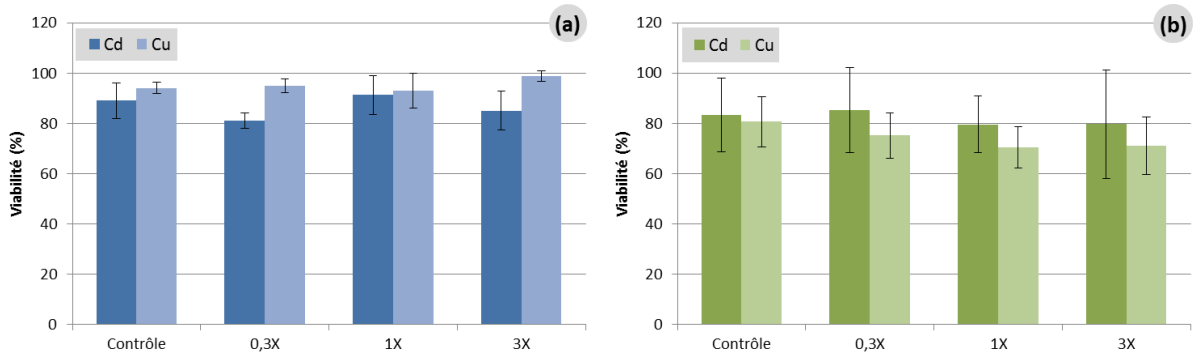
La durée du développement embryonnaire n'a pas été affectée lors de l'exposition au Cu ou au Cd. En effet, ce paramètre présente des valeurs moyennes très similaires pour les deux séries d'exposition et comprises entre 9,88 j pf et 10,42 j pf, sans distinction de composés ni de doses appliquées (*Figure 3.11.b*).

##### 3.3.2.2. Activité cardiaque ( $23 \pm 1$ °C)

Malgré une légère tendance à l'augmentation au jour 6 pf, l'exposition au Cu n'induit aucun effet significatif sur l'activité cardiaque chez les embryons de Medaka aux différentes doses testées (*Figure 3.12*).

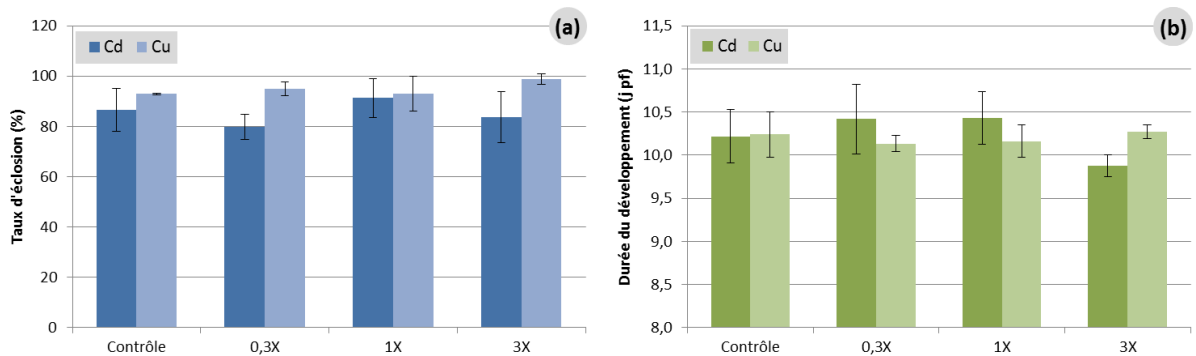
À l'inverse et de façon surprenante, la concentration Cd-3X induit une tachycardie chez les individus âgés de 6 j pf (*Figure 3.12.a*). Cet effet est renforcé le jour suivant puisqu'il est significatif dès la concentration 1X (*Figure 3.12.b*).

Les rythmes cardiaques moyens observés chez les groupes témoins lors de ces deux séries d'expérimentations sont relativement similaires et compris entre 131 et 135 batt./min au jour 6 pf et entre 137 et 143 batt./min au jour 7 pf.



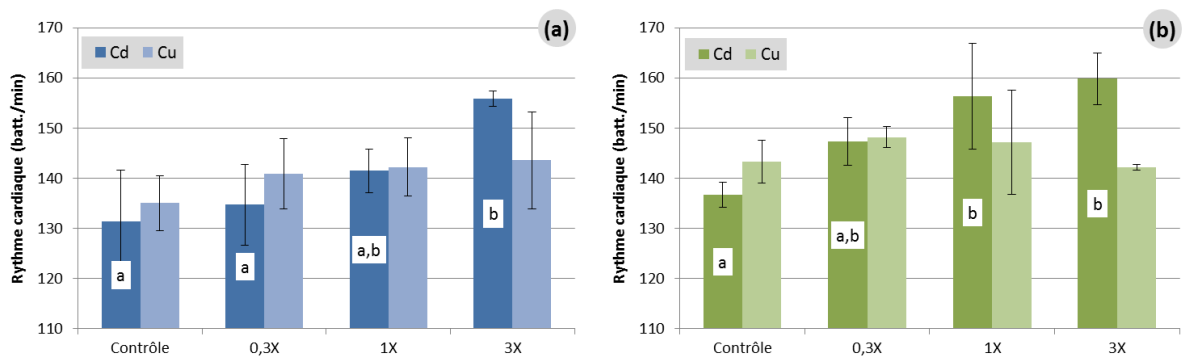
**Figure 3.10. Viabilités embryonnaire (a) et larvaire (b) des embryons et larves de Medaka exposés aux sédiments dopés en Cuivre ou en Cadmium**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type (N = 3).



**Figure 3.11. Taux d'éclosion (a) et durée du développement embryonnaire (b) des individus exposés aux sédiments dopés en Cuivre ou en Cadmium**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type (N = 3). Lors du calcul de la durée du développement, le jour de la fécondation des embryons est considéré comme le jour 0 pf.



**Figure 3.12. Activité cardiaque des embryons âgés de 6 j pf (a) et 7 j pf (b) exposés aux sédiments dopés en Cuivre ou en Cadmium**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type (N = 3). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres au centre des barres : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey).

### 3.3.2.3. Données biométriques

Les différentes mesures biométriques (longueur totale, taille de la tête et rapport tête/longueur T/L) ne sont pas modifiées chez les groupes contaminés au Cu ou au Cd en comparaison des groupes témoins respectifs (*Figure 3.13*). La longueur totale moyenne des larves issues de l'exposition au Cd est comprise entre 4,95 mm et 5,00 mm, la taille de la tête entre 1,07 mm et 1,09 mm et le rapport T/L entre 21,52 % et 22,11 % selon le traitement considéré.

De façon surprenante, une augmentation significative de la longueur totale ainsi que de la taille de la tête des larves du groupe Cu-3X ( $5,03 \pm 0,03$  mm et  $1,11 \pm 0,02$  mm respectivement) par rapport au groupe Cu-0,3X ( $4,90 \pm 0,05$  mm et  $1,05 \pm 0,02$  mm respectivement) est observée (*Figure 3.13.a* et *b*). Ces différences représentent 6 % et 2,6 % de hausse pour la taille de la tête et la longueur totale respectivement.

Le rapport T/L ne répercute pas les écarts observés avec une répartition homogène des valeurs entre 21,5 % et 22 % (*Figure 3.13.c*). Cependant, la valeur moyenne de ce paramètre est, une nouvelle fois, significativement plus élevée pour le groupe Cu-3X par rapport au groupe Cu-0,3X ( $22,01 \pm 0,21$  % et  $21,52 \pm 0,20$  % respectivement).

Les valeurs moyennes obtenues pour les paramètres biométriques chez les groupes témoins des deux séries d'expériences sont très similaires avec des longueurs totales des larves égales à  $5,00 \pm 0,07$  mm et  $4,96 \pm 0,03$  mm, des tailles de la tête moyennes de  $1,07 \pm 0,01$  mm et de  $1,08 \pm 0,01$  mm et des rapports T/L évalués à  $21,52 \pm 0,40$  % et  $21,73 \pm 0,11$  % respectivement pour les expositions au Cd et au Cu.

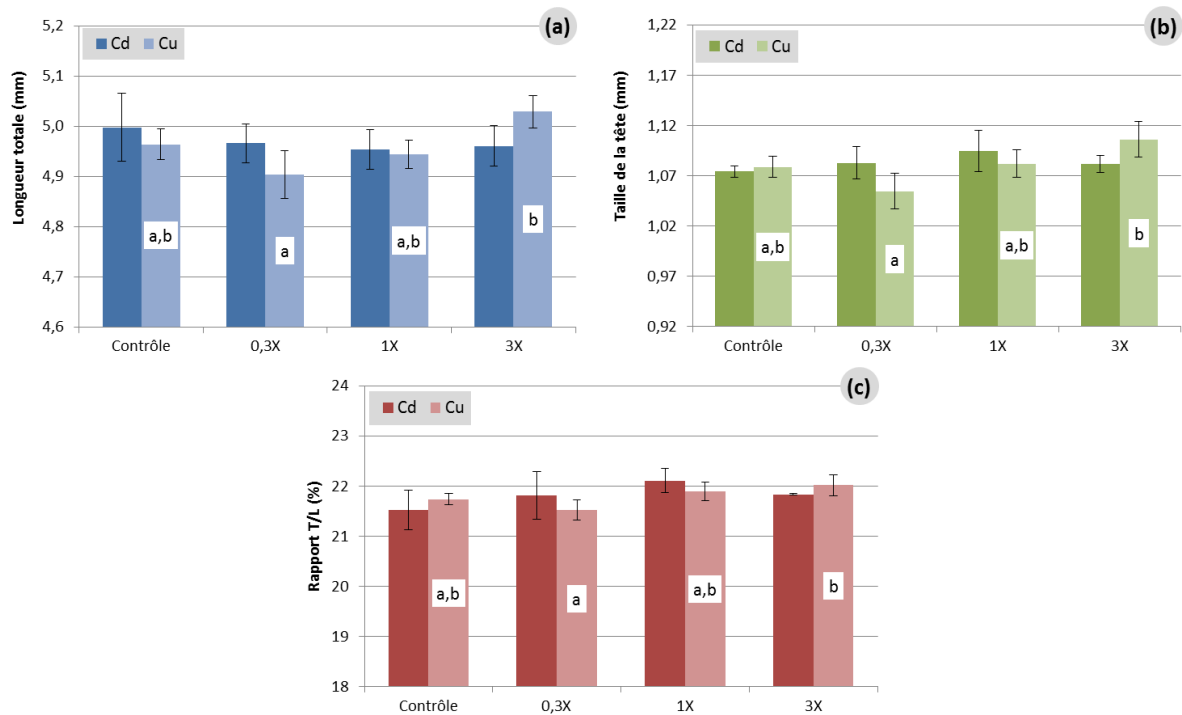
### 3.3.2.4. Tératogénicité

Les pourcentages d'individus présentant une ou plusieurs malformations sont présentés sur la *Figure 3.14*. Le taux basal de larves malformées dans les contrôles de chaque expérience est de  $20,33 \pm 4,51$  % et de  $16,54 \pm 5,21$  % respectivement. Ces valeurs plus élevées que celles observées lors de l'exposition aux sédiments de référence peuvent s'expliquer par des différences dans la qualité des œufs récoltés au sein de l'élevage ou de l'amélioration de l'œil de l'expérimentateur au cours des travaux. Les différentes catégories de malformations répertoriées ainsi que les pourcentages d'individus atteints par celles-ci sont synthétisés dans le **Tableau 3.11**.

**Tableau 3.11. Pourcentages d'individus impactés par différents types de malformations après exposition aux sédiments dopés en Cuivre ou en Cadmium**

	Œdèmes	Squelette axial	Cranio-faciale	Œil	Cardio-vasculaire	Sac Vitellin
<i>Exposition au Cd</i>						
Cd-0X	$4 \pm 0,73$ %	$6 \pm 5,57$ % <i>a</i>	$3 \pm 2,20$ %	$0 \pm 0,00$ %	$11 \pm 1,01$ % <i>a</i>	$14 \pm 6,00$ %
Cd-0,3X	$11 \pm 3,18$ %	<b><math>56 \pm 23,40</math> % <i>b</i></b>	$2 \pm 2,89$ %	$2 \pm 2,89$ %	<b><math>26 \pm 5,93</math> % <i>b</i></b>	$19 \pm 1,05$ %
Cd-1X	$7 \pm 3,54$ %	$41 \pm 8,49$ % <i>a,b</i>	$0 \pm 0,00$ %	$0 \pm 0,00$ %	$22 \pm 3,87$ % <i>a,b</i>	$18 \pm 7,41$ %
Cd-3X	$8 \pm 3,16$ %	<b><math>59 \pm 22,96</math> % <i>b</i></b>	$1 \pm 2,22$ %	$0 \pm 0,00$ %	<b><math>24 \pm 6,05</math> % <i>b</i></b>	$9 \pm 4,42$ %
<i>Exposition au Cu</i>						
Cu-0X	$2 \pm 4,28$ %	$8 \pm 6,54$ % <i>a</i>	$4 \pm 6,42$ %	$2 \pm 4,28$ %	$9 \pm 2,57$ % <i>a</i>	$9 \pm 5,50$ % <i>a</i>
Cu-0,3X	$3 \pm 2,48$ %	$32 \pm 11,30$ % <i>a,b</i>	$0 \pm 0,00$ %	$0 \pm 0,00$ %	$11 \pm 6,67$ % <i>a</i>	$14 \pm 3,99$ % <i>a,b</i>
Cu-1X	$5 \pm 4,72$ %	$19 \pm 12,82$ % <i>a,b</i>	$1 \pm 2,31$ %	$0 \pm 0,00$ %	<b><math>29 \pm 4,85</math> % <i>b</i></b>	<b><math>23 \pm 1,87</math> % <i>b</i></b>
Cu-3X	$2 \pm 4,12$ %	<b><math>35 \pm 10,38</math> % <i>b</i></b>	$1 \pm 2,06$ %	$0 \pm 0,00$ %	$18 \pm 9,30$ % <i>a,b</i>	$21 \pm 7,17$ % <i>a,b</i>

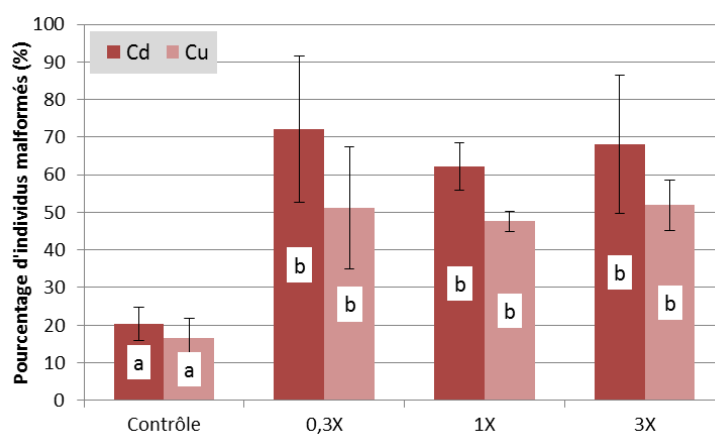
Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type ( $N = 3$ ). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres à droite des valeurs concernées : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey)



**Figure 3.13. Mesures biométriques des larves nouvellement écloses après exposition aux sédiments dopés en Cuivre ou en Cadmium**

Les données biométriques incluent la longueur totale des larves (a), la taille de la tête (b) et le rapport T/L (c).

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type (N = 3). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres au centre des barres : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey).



**Figure 3.14. Pourcentage d'individus présentant des malformations après exposition aux sédiments dopés en Cuivre ou en Cadmium**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type (N = 3). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres au centre des barres : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey).



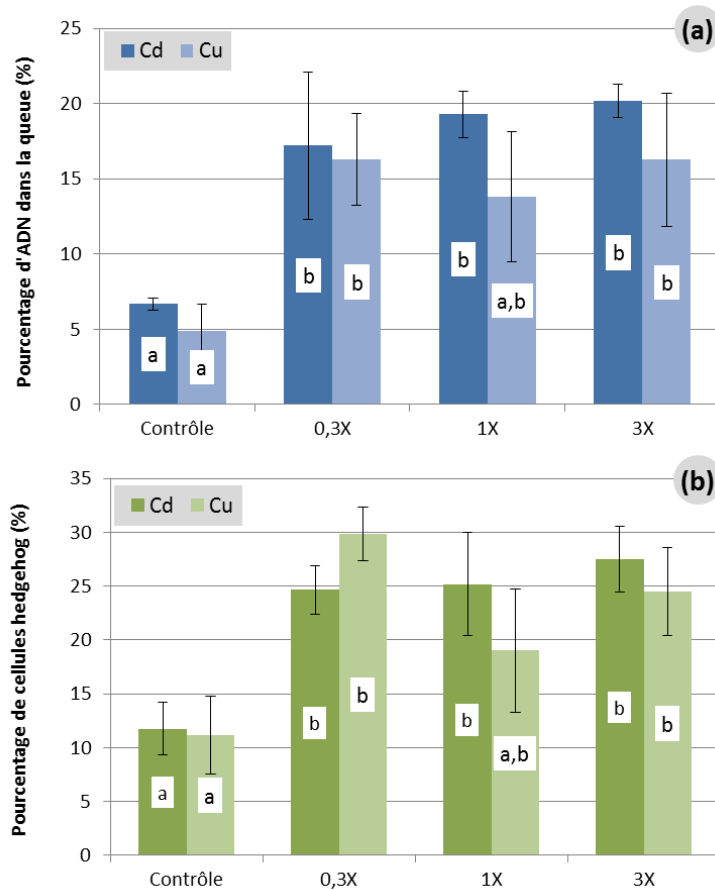
Toutes les doses de Cd testées ont engendré une augmentation significative ( $p < 0,05$  selon le test de Tukey) du pourcentage d'individus malformés qui atteint environ 60 % quel que soit le traitement considéré (*Figure 3.14*). Plus précisément, le taux d'individus présentant des déformations de la colonne vertébrale (majoritairement des cyphoses et des lordoses ainsi que des larves au corps arqué en forme de C) et du système cardio-vasculaire (principalement des positionnements et plicatures anormales du cœur) est significativement accru ( $p < 0,05$  selon le test de Tukey) pour les concentrations Cd-0,3X et Cd-3X (**Tableau 3.11**). Le pourcentage d'individus atteints de malformations cardio-vasculaires exposés à la concentration 1X est également proche du seuil de significativité par rapport au groupe contrôle ( $p = 0,074$ ).

L'exposition au Cu a globalement généré le même profil de réponse que le Cd en augmentant significativement ( $p < 0,05$  selon le test de Tukey) le taux d'individus malformés jusqu'aux alentours de 50 % pour toutes les doses en comparaison du groupe témoin (*Figure 3.14*). Comme lors de l'exposition au Cd, la majorité des malformations impacte significativement le squelette axial (larves arquées, cyphoses et lordoses) et le système cardio-vasculaire (positionnement et courbure anormales du cœur) au sein des groupes Cu-3X et Cu-1X respectivement. Le pourcentage d'individus issus du traitement Cu-0,3X présentant des malformations de la colonne vertébrale est également proche du seuil de significativité ( $p = 0,077$ ) par rapport au contrôle (**Tableau 3.11**). De plus, le taux de larves souffrant de malabsorption des réserves vitellines est significativement augmenté après exposition des embryons à la dose Cu-1X en comparaison du groupe témoin. Pour ce même paramètre, les résultats issus du traitement Cu-3X sont proches de la significativité par rapport au contrôle ( $p = 0,061$ ).

### 3.3.3. Génotoxicité du cuivre et du cadmium (Test comète)

Les effets génotoxiques du Cu et du Cd ont été évalués à l'aide du test Comète chez les larves âgées de 12 j pf. Le pourcentage d'ADN dans la queue des comètes a été retenu comme marqueur de l'état d'endommagement de l'ADN des cellules. En complément de cette approche, le taux de cellules hedgehog a été observé dans chaque échantillon. Les résultats de ces analyses sont présentés sur la *Figure 3.15*. Le niveau basal de dommages à l'ADN dans les groupes témoins (5-7 % d'ADN dans la queue) peut correspondre au cycle de vie normal des cellules et peut également être lié au traitement des cellules notamment lors de la dissociation cellulaire nécessaire à la mise en œuvre du Test Comète. La même interprétation peut-être proposée pour expliquer le taux basal de cellules hedgehog évalué à environ 10 % au sein des groupes contrôles des deux séries d'expériences.

Une augmentation significative du pourcentage d'ADN dans la queue des comètes est observée pour toutes les concentrations testées en Cd, confirmant le caractère génotoxique de ce composé. En effet, l'exposition au Cd induit un, accroissement dose-dépendant des dommages à l'ADN dose-dépendante avec un pourcentage d'ADN dans la queue variant de 17% à 20% en moyenne selon le traitement (*Figure 3.15.a*). Cependant, l'analyse statistique ne permet pas de discriminer les doses entre elles. Le Cu induit également une augmentation significative des dommages à l'ADN aux concentrations Cu-0,3X et Cu-3X avec environ 16 % d'ADN dans la queue pour les deux doses considérées. Les dommages à l'ADN induits par cet élément trace dessinent un plateau pouvant traduire la mise en place de systèmes de défense ou de réparation permettant de limiter l'ampleur des dommages à l'ADN générés par cet oligoélément essentiel.



**Figure 3.15. Dommages à l'ADN évalués par le test Comète chez des larves âgés de 2j post-éclosion après exposition aux sédiments dopés en Cuivre ou en Cadmium**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type (N = 3). Le pourcentage d'ADN dans la queue d'une comète (a) a été mesuré sur 150 cellules par échantillon. Le pourcentage de cellules hedgehog (b) a été déterminé sur un total de 200 cellules par échantillon. Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres à droite des valeurs concernées : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey)

Des profils de réponses très similaires sont observés avec le taux de cellules hedgehog. En effet, l'exposition au Cd induit une augmentation significative de ce paramètre chez tous les groupes contaminés, mais sans discrimination statistique possible entre les différentes doses. Globalement, un taux d'environ 25 % de cellules « hedgehog » est mesuré pour l'ensemble des traitements au Cd. À nouveau, un profil en plateau est notable pour les groupes contaminés en Cu. En effet, le pourcentage de cellules « hedgehog » baisse entre la condition Cu-0,3X et Cu-1X, avec des taux respectifs de 30 % et 19 %. Cette variation, suivie d'une légère remontée du pourcentage à environ 25 % pour la plus forte concentration, pourrait confirmer l'hypothèse précédemment évoquée de la mise en place de mécanismes de défense et de réparation.

### 3.4. Discussion

L'objectif premier de cette série d'expositions était d'utiliser le sédiment de référence de Marcenac précédemment sélectionné pour évaluer la toxicité de polluants représentatifs de la contamination du continuum Lot-Garonne-Gironde. Le Cu et le Cd ayant été retenus pour servir de polluants modèles, il a fallu tester l'applicabilité du test MELA pour l'évaluation de la toxicité de substances non hydrophobes. Ainsi, la première tâche fut de doper efficacement la matrice sédimentaire de référence avec les deux éléments métalliques choisis, le Cu et le Cd.

#### 3.4.1. Dopage du sédiment

Le protocole d'enrobage utilisé est extrêmement simple puisqu'il repose sur l'ajout d'une solution de contamination contenant la substance à tester directement dans le sédiment et en présence d'eau pour permettre une homogénéisation sous agitation durant 1h. Cette méthode a permis d'obtenir de très bons rendements d'enrobage supérieurs à 80 % pour toutes les conditions et chaque composé, à l'exception de la dose Cu-1X dont l'efficacité d'enrobage est de seulement 66 %. De plus, lors du dosage des différents sédiments en fin d'exposition (T9), nous avons pu constater que la contamination artificielle du sédiment est stable au cours du temps et permet de conserver plus de 80 % de la charge initialement présente à T0. Par ailleurs, la variabilité des mesures à T9 obtenues entre les réplicats d'une même condition est relativement faible pour tous les traitements (coefficients de variation, CV < 8 %) à l'exception d'un seul traitement (Cd-1X pour lequel CV = 29 %) ce qui semble indiquer une bonne homogénéité du dopage. La spéciation chimique des métaux dans le sédiment, et donc leur biodisponibilité et leur capacité de sorption aux particules, est fortement influencée par de nombreux paramètres physico-chimiques comme le potentiel d'oxydoréduction, le pH, la température, la taille des particules, la qualité et la quantité de matière organique ainsi que par les capacités d'adsorption, de sédimentation, de complexation ou de précipitation du sédiment (Burton, 1991). Par conséquent, si le protocole de dopage utilisé ici s'est avéré très efficace sur la matrice sédimentaire de Marcenac, il est probable que sa performance ne soit pas la même en présence d'un sédiment aux caractéristiques différentes.

Par ailleurs, la durée de mise en contact entre le sédiment et l'élément métallique conditionne également la biodisponibilité et la spéciation chimique du composé. En effet, il semblerait que dans un premier temps la molécule se fixe rapidement mais de façon très labile aux particules. Ce n'est que dans un second temps que la substance se fixerait plus fortement à d'autres sites à la surface ou dans les particules en formant, par exemple, des liaisons covalentes (Burton, 1991). Le procédé de dopage des sédiments utilisé au cours de cette étude simulerait donc davantage d'une pollution récente de l'environnement. D'autre part, ce changement de biodisponibilité des métaux en fonction

de leur temps de contact avec les particules de sédiment expliquerait l'absence d'effet notable observé pour le sédiment de Marcenac qui renferme 7,18 µg/g p.s. de Cu. En raison du peu de réactivité du Cu contenu initialement dans le sédiment de Marcenac, les concentrations en métaux seront mentionnées après soustraction du background naturel (*i.e.* concentrations relatives).

### 3.4.2. Impact du Cu et du Cd sur le taux de survie et le développement général

Les résultats obtenus dans les groupes témoins pour les différents marqueurs étudiés étant très similaires à ceux observés lors de l'exposition des embryons aux différents sédiments de référence, ils ne seront pas discutés en détail dans cette partie.

Les expositions des embryons de Medaka au Cd ou au Cu, à des concentrations environnementales comprises respectivement entre 1,74 µg/g et 19,62 µg/g et entre 1,31 µg/g et 15,94 µg/g, n'ont pas impacté la survie embryonnaire ou larvaire, ni le taux d'éclosion ou la durée du développement embryonnaire. Une absence d'effets létaux a également été décrite après exposition d'embryons de Medaka au stade morula tardif (environ 5 h pf) à des concentrations en Cd comprises entre 2,5 mg/L et 80 mg/L (Gonzalez-Doncel *et al.*, 2003b). Au cours de cette même étude, les auteurs ont réitéré la même expérience en avançant le lancement de l'exposition au moment de la fécondation des œufs, ce qui a conduit à une réduction significative du succès d'éclosion dès 20 mg Cd/L. Cette différence de sensibilité des embryons en fonction du stade de développement est expliquée, selon les auteurs, par une perméabilité du chorion plus importante avant et pendant le durcissement du chorion (déclenché par la fécondation de l'œuf) qui facilite ainsi les transferts ioniques et par conséquent l'absorption du Cd. A l'inverse, chez les embryons plus âgés dont le chorion est complètement durci, la perméabilité de l'enveloppe externe est moindre et limiterait le transfert des polluants vers l'embryon en développement, agissant telle une barrière protectrice. Les concentrations environnementales relativement faibles, ainsi que le rôle protecteur du chorion pourraient expliquer l'absence d'effet aigu observée lors des expositions au Cu et au Cd.

La grande majorité des études visant à étudier la toxicité d'éléments métalliques sur les SPD poisson utilisent des expositions par voie dissoute, ce qui rend difficile toute comparaison quantitative des doses appliquées ou des effets observés avec la présente étude au cours de laquelle les expositions ont lieu par sédiment-contact.

La réduction de la taille des larves à l'éclosion est souvent concomitante avec une diminution du succès d'éclosion et/ou un développement retardé lors d'exposition à des éléments métalliques tels que le Cu ou le Cd (Cao *et al.*, 2009 ; Johnson *et al.*, 2007 ; Fraysse *et al.*, 2006). De manière générale, ces auteurs s'accordent à dire que la diminution du succès d'éclosion est la conséquence d'une altération de la sécrétion et/ou de l'activité protéolytique de l'enzyme d'éclosion appelée chorionase. Bien sûr, un ralentissement global du développement peut également être une explication (Jeziarska *et al.*, 2009). Dans notre étude, l'absence de différence significative entre les groupes exposés et contrôles concernant les mesures biométriques semble donc en accord avec les taux d'éclosion et les durées de développement qui sont restés inchangés en présence de sédiments contaminés ou non. Ces observations sont également en adéquation avec d'autres études au cours desquelles aucun effet sur la taille des larves n'est observé après une exposition d'embryons de *Pimephales promelas* à 10 µg Cu/L (Carreau & Pyle, 2005) ni sur celle des prolarves de *D. rerio* après une exposition embryonnaire à 100 µM de Cd, soit environ 112 µg Cd/L (Cheng *et al.*, 2001).

### 3.4.3. Tératogénicité du Cu et du Cd

Plusieurs travaux ont montré que l'exposition à des métaux pouvait conduire au développement d'autres altérations morphologiques sévères chez les SPD de nombreuses espèces de poissons. Au cours de notre série d'exposition, une augmentation significative des malformations a été observée après incubation des embryons au contact de sédiments dopés en Cd ou en Cu, dès la plus faible concentration testée soit 1,74 µg/g et 1,31 µg/g respectivement. Le pourcentage d'individus affectés avoisine les 50 % pour le Cu et 70 % pour le Cd. Ces taux sont certes très élevés mais ont néanmoins déjà été rencontrés auparavant lors, par exemple, de l'exposition d'embryons de carpe *Cyprinus carpio* à 0,2 mg/L de Cu qui a conduit à plus de 60 % d'individus malformés (Lugowska & Witeska, 2004). Fraysse *et al.* (2006) observent également de 25 % à 70 % de prolarves de *D. rerio* malformées 48 h pf après exposition à des concentrations en Cd comprises entre 3,3 µM et 13,3 µM (soit 370 µg/L et 1,5 mg/L). De nombreux types de malformations ont été rapportés dans la littérature lors d'études similaires, comprenant des œdèmes, des hémorragies, des anomalies vasculaires, des défauts de pigmentation, des malformations cranio-faciales et cardiaques, des déformations du sac vitellin et des malformations vertébrales diverses (Jeziarska *et al.*, 2009 ; Lugowska & Witeska, 2004 ; Cheng *et al.*, 2001 ; Cheng *et al.*, 2000). Lors de la présente étude, les deux métaux testés ont significativement induit l'apparition de malformations du squelette axial (corps arqué, cyphoses et lordoses principalement) et des anomalies cardiaques notamment au niveau du positionnement et de la plicature du cœur.

Les malformations squelettiques sont observées très fréquemment après l'exposition d'embryons de poissons à des éléments traces métalliques dont le Cu et le Cd (Lugowska & Witeska, 2004 ; Chow & Cheng, 2003), pouvant aller jusqu'à représenter plus de 80 % de l'ensemble des malformations observées (Jeziarska *et al.*, 2000). Plusieurs études semblent supporter l'hypothèse que le Cd induirait des malformations squelettiques par le biais de l'inhibition de la production de chaîne lourde de myosine au niveau du tronc qui serait corrélée à une désorganisation et une altération morphologique des myotomes présents dans les somites (Chow & Cheng, 2003 ; Cheng *et al.*, 2000). Selon ces auteurs, toutes ces modifications pourraient être le fruit d'actions directes du Cd au niveau de différents mécanismes cellulaires probablement en entrant en compétition avec d'autres ions divalents comme le Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup>, ou d'effets indirects du Cd sur certains gènes ou voies signalétiques essentiels à la somitogénèse et au développement embryonnaire en général. La perturbation de l'homéostasie du Ca<sup>2+</sup> (Manzl *et al.*, 2003 ; Wong & Wong, 2000) par le Cd, ou la fixation par mimétisme du Cd sur les protéines Ca<sup>2+</sup>-ligantes au niveau du squelette (Jeziarska *et al.*, 2009 ; Bridges & Zalups, 2005) pourraient être à l'origine de certaines malformations observées.

Comme mentionné précédemment, le système cardio-vasculaire est également l'une des cibles fréquemment impactée à la suite d'une contamination en éléments métalliques. Parmi les nombreuses pathologies cardio-vasculaires décrites après exposition d'embryons de téléostéens à des métaux, sont cités les hémorragies, l'hypertension, les œdèmes (résultat d'une altération de la perméabilité vasculaire), l'hypertrophie cardiaque, un cœur tubulaire, des collapsus circulatoires, une altération de la mobilité des cellules sanguines, des perturbations du rythme cardiaque, des altérations morphologiques de l'atrium et du ventricule, une plicature cardiaque anormale et une vascularisation aberrante (Cao *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2009 ; Prozialeck *et al.*, 2008 ; Gonzalez-Doncel *et al.*, 2003b ; Cheng *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 1999). Bien que ces pathologies soient fréquemment

observées au cours d'études publiées dans la littérature, les mécanismes exacts impliqués dans ces dysfonctionnements cardiovasculaires restent relativement flous.

Au cours de la présente étude, l'un des premiers signes visibles de l'altération de la fonction cardiaque chez les embryons de Medaka fut l'apparition d'une tachycardie chez les individus exposés au Cd dès 6,50 µg/g. Plusieurs études ont déjà montré les effets du Cu et du Cd sur l'activité cardiaque. En effet, le rythme cardiaque des embryons de *D. rerio* augmente significativement après une exposition au Cu (Johnson *et al.*, 2007) alors que le Cd induit une bradycardie chez les embryons de poisson zèbre et de dorade rose *Pagrus major* (Cao *et al.*, 2009 ; Hallare *et al.*, 2005b). Une hypothèse proposée par ces auteurs pour expliquer ce phénomène repose sur la perturbation de l'activité de certains canaux ioniques comme les Ca<sup>2+</sup>-ATPases et les Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases par le Cd et le Cu respectivement, comme l'ont démontré des travaux antérieurs (Eyckmans *et al.*, 2010 ; Bridges & Zalups, 2005 ; Wong & Wong, 2000). Les conséquences de ces perturbations de l'ionorégulation pourraient être la réduction de l'absorption du Ca<sup>2+</sup> par les organismes ce qui engendrerait la bradychardie observée, et une accélération du rythme cardiaque en réponse au stress occasionné. Il semblerait également que les effets des éléments métalliques sur l'activité cardiaque soient variables, parfois inhibiteurs, parfois promoteurs. Ce phénomène serait étroitement lié au degré de valence et à la spéciation de l'élément métallique, au mode d'exposition, aux concentrations appliquées et à l'espèce étudiée (Wang *et al.*, 1999). Dans le cas de notre étude, nous pouvons supposer que les doses de Cd utilisées lors de l'exposition des embryons de Medaka sont insuffisantes pour générer une bradycardie liée à une diminution du Ca<sup>2+</sup> extracellulaire, mais suffisantes pour générer un stress (lié à la perturbation de l'ionorégulation ou au caractère protoxydant du Cd) qui engendrerait une accélération métabolique en première réponse à ce stress, se traduisant par l'accélération de l'activité cardiaque (Cao *et al.*, 2009). L'altération de la fonction cardiaque n'a pas été le seul effet mis en évidence sur le système cardiovasculaire à la suite de l'exposition des embryons de Medaka au Cu et au Cd. En effet, les deux composés ont significativement induit l'apparition d'anomalies de la morphologie cardiaque chez les individus exposés à 5,52 µg/g de Cu et 1,74 µg/g de Cd. Ces malformations concernent principalement un positionnement anormal du cœur dans la cavité péricardique et une plicature incomplète ou aberrante du cœur. Plusieurs études se sont efforcées de démontrer combien la fonction cardiaque et les conditions hémodynamiques en général conditionnent et influencent fortement la morphogénèse cardiaque et la formation de l'endothélium vasculaire (Sidi & Rosa, 2004 ; Glickman & Yelon, 2002 ; Topper & Gimbrone, 1999). De plus, les altérations morphologiques du cœur décrites par Hove *et al.* (2003) après une perturbation physique du flux sanguin sont très similaires à celles observées au cours de notre étude (le positionnement et la plicature du cœur). Ces observations semblent suggérer qu'une altération de la fonction cardiaque et des conditions hémodynamiques pourraient être impliquées dans les malformations cardiovasculaires résultant d'une exposition aux métaux. Incardona *et al.* (2004) ont également montré que le dysfonctionnement cardiaque pouvait être à l'origine de l'apparition de diverses anomalies phénotypiques dont des malformations squelettiques.

Enfin, l'exposition des embryons de Medaka à du sédiment dopé en Cu à 5,52 µg/g a induit une augmentation significative du taux d'individus atteints de malabsorption des réserves vitellines en comparaison des individus témoins. Lugowska et Witeska (2004) ont également observé des résorptions anormalement faibles du sac vitellin chez des embryons de carpe commune exposées à

0,2 mg/L de Cu. De même une augmentation de la surface du sac vitellin a été mise en évidence chez des larves de *D. rerio* exposées à 190-464 µg/L de Cu (Johnson *et al.*, 2007). Ces auteurs ont noté une réduction parallèle de la longueur des individus touchés par ce type de malformation et concluent donc à une réduction de l'utilisation des réserves vitellines liée à un ralentissement du développement embryonnaire. Cependant, aucune diminution de longueur totale des larves de Medaka ni de la durée de développement n'a pu être mise en évidence au cours de notre étude, à la suite de l'exposition aux sédiments contaminés en Cu.

Au vu des différentes observations et remarques mentionnées plus haut, il semble que les malformations observées lors des expositions des embryons de Medaka au Cu et au Cd soient le résultat et la traduction de dysfonctionnements plus profonds non mis en évidence ici. Il est également clair que, même si nous n'avons observé aucun impact significatif sur la mortalité des individus exposés, ces anomalies de développement et les dysfonctionnements sous-jacents auraient très probablement des conséquences bien plus dramatiques sur le comportement, les performances biologiques et la survie des individus, à plus ou moins long terme, dans leur milieu naturel où la prédation et la compétition pour les ressources sont fortes (Johnson *et al.*, 2007 ; Lugowska, 2007 ; Incardona *et al.*, 2004 ; Lugowska & Witeska, 2004).

#### 3.4.4. Pouvoir génotoxique du Cu et du Cd

Un autre aspect de la toxicité du Cu et du Cd a été étudié lors de nos expériences. Il s'agit de leur pouvoir génotoxique, qui a été évalué à l'aide du test comète. Ce test permet d'évaluer les cassures des brins d'ADN qui peuvent être engendrées par l'action directe d'un xénobiotique sur l'ADN ou la production d'ERO mais également indirectement par la formation de sites alcali-labiles ou l'induction des systèmes de réparation de l'ADN par excision (Mitchelmore & Chipman, 1998). Lors de la présente étude, le Cd et le Cu ont provoqué une augmentation des dommages à l'ADN dès la plus faible concentration testée, à l'exception de la concentration Cu-1X. L'application du test comète sur des cellules de poissons a déjà révélé l'induction significative de dommages à l'ADN suite à une exposition *in vivo* ou *in vitro* au Cd et au Cu (Morin *et al.*, 2011 ; Kilemade *et al.*, 2004 ; Gabbianelli *et al.*, 2003). Il semblerait que la génotoxicité de ces deux éléments métalliques soit le résultat de la génération d'ERO par ces composés qui, si elle dépasse les capacités anti-oxydantes et de réparation de l'ADN de la cellule, peut conduire à la mort cellulaire et/ou à l'entrée en apoptose des cellules (Bopp *et al.*, 2008 ; Manzl *et al.*, 2004 ; Risso-de Faverney *et al.*, 2001). L'augmentation significative et simultanée du pourcentage d'ADN dans la queue et du taux de cellules hedgehog observé semble rejoindre cette explication. Nous pouvons d'ailleurs supposer que le profil de réponse en « U » des dommages à l'ADN observé pour le Cu au cours de notre étude soit le résultat de la mise en place de mécanismes de défense. En effet, une fois induits par une dose en Cu suffisante, les systèmes de réparations limiteraient la formation de cassures à l'ADN comme observé à la concentration Cu-1X. Puis, leur capacité de réparation pourrait être dépassée à la plus forte dose testée causant ainsi une nouvelle augmentation significative du taux de dommages à l'ADN. Initialement, les cellules hedgehog, caractérisées lors de la visualisation du test Comète par une tête très petite suivie d'une queue longue et diffuse, étaient considérées comme des cellules nécrotiques ou apoptotiques (Fairbairn *et al.*, 1996 ; Olive & Banath, 1995). Cependant, il semblerait que l'origine exacte de ce type de comète reste mal connue. En effet, certains travaux ont montré que les cellules apoptotiques ne donnaient pas systématiquement lieu à des cellules hedgehog après la mise en œuvre du test comète (Meintieres *et al.*, 2003 ; Choucroun *et al.*, 2001). Il a également été démontré

que ces cellules hedgehog pouvaient être observées à la suite de phénomènes d'apoptose et de nécrose, mais également après des expositions à de fortes doses de radiations ou d'agents mutagènes (Kumaravel *et al.*, 2009 ; Burlinson *et al.*, 2007). Il convient donc de rester extrêmement prudent lors de l'exploitation mécanistique des résultats obtenus en suivant l'apparition de cellules hedgehog. Nous concluons sur ce sujet en expliquant que l'origine de ce type de cellules est le résultat de l'électrophorèse de cellules dont le bagage ADN est extrêmement endommagé et dont la survie est par conséquent fortement compromise (Choucroun *et al.*, 2001). Au cours de notre étude, la mesure du pourcentage de cellules hedgehog a permis de prendre en compte des cellules dont l'endommagement excessif de l'ADN dépassait les capacités de mesure du système d'analyse d'images et s'est avéré, par conséquent, complémentaire au test comète.

### 3.4.5. Proposition de LOEC dans le sédiment pour le Cu et le Cd

L'ensemble des effets induits par le Cd et le Cu au cours du travail présenté ici sont très comparables, ce qui semble indiquer que le mode d'action des deux composés serait analogue, probablement basé, sur la génération d'un stress oxydant et/ou l'altération des mécanismes d'ionorégulation. Des études antérieures ont déjà mis en évidence la similitude des effets tératogènes induits par des concentrations équivalentes de Cu et de Cd (Lugowska, 2007 ; Lugowska & Witeska, 2004). Les résultats de notre étude permettent de déterminer des LOEC (Lowest observed effects concentration) concernant les deux métaux testés pour le compartiment sédimentaire en fonction des différents marqueurs utilisés au cours du bioessai. Les valeurs de LOEC sont présentées dans le **Tableau 3.12**. Les valeurs de LOEC ont été déterminées à partir des concentrations moyennes mesurées dans les sédiments à T0, une fois le background en Cu et Cd soustrait afin que les valeurs mentionnées tiennent uniquement compte de la fraction ayant induit des effets toxiques notables (*i.e.* la dose ajoutée lors du dopage des sédiments).

**Tableau 3.12. LOEC établies en fonction des différents marqueurs de toxicité suivis lors de l'exposition des embryons de Medaka à des sédiments dopés en Cu au Cd**

Marqueurs suivis	LOEC ( $\mu\text{g/g}$ )*	
	Cd	Cu
Viabilité larvaire/embryonnaire	> 19,62	> 15,94
Taux d'éclosion	> 19,62	> 15,94
Durée du développement	> 19,62	> 15,94
Rythme Cardiaque	6,50	> 15,94
Données biométriques	> 19,62	> 15,94
Malformations	1,74	1,31
Domages à l'ADN (Test Comète)	1,74	1,31

*Les LOEC indiquées mentionnent les concentrations relatives en Cu et Cd, une fois le background soustrait, comme discuté précédemment.*

Selon les recommandations faites par la législation, les LOEC retenues à la suite de cette étude pour le Cu et le Cd seront celles obtenues par le biais des marqueurs qui se sont avérés les plus sensibles à la contamination.

Deux paramètres ont montré des réponses significatives dès les plus faibles doses de Cu et Cd utilisées : le pourcentage d'individus malformés et le pourcentage d'ADN dans la queue. Il en résulte des LOEC de **1,74  $\mu\text{g/g p.s.}$**  et de **1,31  $\mu\text{g/g p.s.}$**  pour le Cd et le Cu respectivement. Ces valeurs pourraient être confirmées et précisées en testant des doses plus faibles dans une autre série d'exposition. À quelques exceptions près, les LOEC obtenues dans la présente étude sont bien plus basses que celles rapportées dans la littérature qui varient de 0,5  $\mu\text{g/g}$  à 820  $\mu\text{g/g}$  pour le Cd



(Tableau 3.13) et de 17,2 µg/g à plus de 2 000 µg/g pour le Cu (Tableau 3.14) selon les espèces et les conditions d'exposition.

**Tableau 3.13.** LOEC rapportées dans la littérature après exposition de différents organismes aquatiques à des sédiments dopés en Cd

Organisme modèle	Paramètre	Durée test (j)	LOEC (µg/g p.s.)	Références
« Weight-of-evidence approach »	-	-	3,5 <sup>c</sup>	(Outridge <i>et al.</i> , 1994)
« Consensus-based TEC <sup>b</sup> »	-	-	0,99 <sup>c</sup>	(MacDonald <i>et al.</i> , 2000)
Amphipodes				
<i>Melita plumulosa</i> (adult)	Mortalité	10	>260	(King <i>et al.</i> , 2006)
<i>Melita plumulosa</i> (juvenile)	Mortalité	10	820	(King <i>et al.</i> , 2006)
<i>Melita plumulosa</i>	Bioaccumulation	42	50	(Gale <i>et al.</i> , 2006)
<i>Chaetocorophium cf. lucasi</i>	Mortalité	10	748	(Dewitt <i>et al.</i> , 1999)
<i>Hyaella azteca</i>	Mortalité	4	128 <sup>a</sup>	(Nebeker <i>et al.</i> , 1986)
Gastropodes				
<i>Helisoma sp</i>	Mortalité	10	340 <sup>a</sup>	(Ditoro <i>et al.</i> , 1992)
Larves d'insectes				
<i>Chironomus riparius</i>	Émergence	28	0,5	(Marinkovic <i>et al.</i> , 2011)
Poissons				
<i>Micropterus salmonides</i>	Bioaccumulation	7	540 <sup>a</sup>	(Francis <i>et al.</i> , 1984)

(a) valeur NOEC ; (b) : TEC = Threshold effect concentration ; (c) : valeurs issues de l'analyse de bases de données expérimentales incluant les données de tests de toxicité utilisant différentes espèces, conditions d'exposition et concentrations.

**Tableau 3.14.** LOEC rapportées dans la littérature après exposition de différents organismes aquatiques à des sédiments dopés en Cu

Organisme modèle	Paramètre	Durée test (j)	LOEC (µg/g p.s.)	Références
« Consensus-based TEC** »	-	-	31,6	(MacDonald <i>et al.</i> , 2000)
Amphipodes				
<i>Hyaella azteca</i>	Mortalité	10	> 2 010	(Huggett <i>et al.</i> , 1999)
<i>Hyaella azteca</i>	Mortalité	14	180	(Roman <i>et al.</i> , 2007)
<i>Hyaella azteca</i>	Croissance	28	95,4	(Roman <i>et al.</i> , 2007)
<i>Hyaella azteca</i>	-	28	41*	(Ingersoll <i>et al.</i> , 1996)
<i>Gammarus pulex</i>	Mortalité /croissance	35	176	(Roman <i>et al.</i> , 2007)
<i>Melita plumulosa</i> (adult)	Mortalité	10	550	(King <i>et al.</i> , 2006)
<i>Melita plumulosa</i> (juvenile)	Mortalité	10	820	(King <i>et al.</i> , 2006)
<i>Melita plumulosa</i>	Bioaccumulation	42	350	(Gale <i>et al.</i> , 2006)
Larves d'insectes				
<i>Chironomus tentans</i>	Mortalité	10	> 2 010	(Huggett <i>et al.</i> , 1999)
<i>Chironomus riparius</i>	Mortalité	14	180	(Roman <i>et al.</i> , 2007)
<i>Chironomus riparius</i>	Croissance	28	188	(Roman <i>et al.</i> , 2007)
<i>Chironomus riparius</i>	Émergence	28	89,2	(Roman <i>et al.</i> , 2007)
<i>Chironomus riparius</i>	Émergence	28	17,2	(Marinkovic <i>et al.</i> , 2011)
Crustacés				
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Mortalité	10	1 469	(Huggett <i>et al.</i> , 1999)
Oligochètes				
<i>Lumbriculus variegatus</i>	Mortalité	28	140	(Roman <i>et al.</i> , 2007)
<i>Lumbriculus variegatus</i>	Biomasse	28	103	(Roman <i>et al.</i> , 2007)
<i>Lumbriculus variegatus</i>	Reproduction	28	103	(Roman <i>et al.</i> , 2007)
<i>Tubifex tubifex</i>	Mortalité	28	158	(Roman <i>et al.</i> , 2007)
<i>Tubifex tubifex</i>	Croissance	28	102	(Roman <i>et al.</i> , 2007)
<i>Tubifex tubifex</i>	Reproduction	28	102	(Roman <i>et al.</i> , 2007)
<i>Tubifex tubifex</i>	Reproduction	28	92-166	(Pasteris <i>et al.</i> , 2003)

\* valeur NOEC ; \*\*TEC = Threshold effect concentration

Les LOEC établies dans la littérature sont souvent basées sur des réponses obtenues grâce à des marqueurs d'effets létaux observés chez des invertébrés. Généralement, l'évaluation des LOEC est privilégiée lors d'étude de toxicité subaiguë et servent ensuite à la détermination NQE (norme de qualité environnementale) pour le compartiment étudié. Dans cette optique là et au vu des résultats recueillis au cours de la présente étude, nous pouvons supposer que les tests de toxicité utilisant les SPD poisson et les différents marqueurs associés sont tout-à-fait adaptés et pertinents, notamment en terme de sensibilité, à l'évaluation de la toxicité de métaux lourds présents dans les sédiments comme le Cu et Cd. En effet, de nombreux poissons même pélagiques une fois adultes, passent une partie de leur vie et/ou de leur développement en contact avec le sédiment. Or les valeurs de LOEC déterminées au cours de ce travail sont relativement faibles et sont dépassées par de nombreux sédiments tout au long du continuum Lot-Garonne-Gironde (**Tableau 1.2, paragraphe 3.1.1 du Chapitre 1**) ce qui pourrait représenter un risque non-négligeable pour les espèces vivant (même temporairement) à leur contact.

Par ailleurs, la valeur de LOEC évaluée au cours de la présente étude pour le Cd est inférieure à la  $PNEC_{\text{sédiment}}$  établie à  $2,3 \mu\text{g/g p.s.}$  pour les sédiments d'eau douce (UE, 2005b). Ceci pourrait conduire à une réévaluation vers une valeurs plus basse de la norme de qualité concernant le Cd pour le compartiment sédimentaire, qui est obtenue en ajoutant la concentration de background en Cd du milieu à la valeur  $PNEC_{\text{sédiment}}$  (UE, 2005b).

En conclusion, lors de la présente étude, nous avons pu démontrer avec succès l'applicabilité du test MELA à l'évaluation de la toxicité de matrices sédimentaires contaminées par d'autres substances que les polluants hydrophobes. Ceci a été réalisable notamment grâce à des marqueurs de toxicité qui se sont avérés particulièrement sensibles en présence d'éléments traces métalliques, tels que le Cu et le Cd, à des niveaux de contamination faibles à modérés. Le test MELA semble donc prometteur pour l'évaluation de la toxicité d'une substance avant sa mise sur le marché (REACH) ou dans le cadre du suivi de la pollution du milieu aquatique (DCE).

Les résultats de ces séries d'exposition ont donné lieu à la rédaction d'un article publié dans le journal *Ecotoxicology and Environmental Safety* et présenté en *Annexe 3*.

De plus, un aspect plus mécanistique peut être abordé, comme nous allons le voir dans la partie suivante, pour tenter de mieux comprendre les modes d'actions des substances testées en complétant le bioessai par des analyses biomoléculaires.

## 4. ANALYSE CROISEE DES EFFETS EMBRYOTOXIQUES ET DES REPONSES BIOMOLECULAIRES APRES EXPOSITION AU CADMIUM

---

L'enjeu de cette étude est d'affiner l'analyse de la toxicité des sédiments testés grâce à la mise en œuvre d'un certain nombre de marqueurs moléculaires dans le but d'étudier plus précisément les mécanismes complexes mis en jeu chez les organismes en présence d'une contamination en Cd. Ce composé a été choisi comme substance modèle en raison de son large spectre de toxicité dès des concentrations relativement faibles et de sa présence persistante en quantité non-négligeable dans les sédiments du continuum Lot-Garonne-Gironde.

Dans cette optique, le test MELA a été complété par l'analyse de différents marqueurs moléculaires dont le dosage des métallothionéines (MT), la mesure de la bioaccumulation et l'analyse de l'expression de plusieurs gènes cibles. Ces analyses ont été entreprises sur stade embryonnaire (au jour 7 pf), en fin d'organogénèse (moment où les principaux organes sont bien développés et fonctionnels, du moins partiellement) et sur stade larvaire, juste à l'éclosion (aux alentours du jour 9 pf), avant que toute décontamination ait lieu par l'excrétion des déchets organiques lors de l'ouverture du tube digestif. Le nombre de temps de prélèvement a été limité à deux en raison de la grande quantité d'embryons nécessaire aux différentes analyses (voir le *paragraphe 4.2.1* du présent chapitre pour plus de détails)

Afin de pouvoir relier ces informations aux éventuels effets phénotypiques observés, les mêmes paramètres (viabilité, taux d'éclosion, durée de développement, biométrie, malformations et rythme cardiaque) que lors des expositions précédentes ont également été suivis. Pour cette expérience, deux concentrations ont été choisies parmi celles utilisées lors des expositions précédentes ayant engendré des effets significatifs : l'une relativement faible (**0,3X = 2 µg/g p.s.**) afin de mettre en évidence les réponses biologiques les plus sensibles et précoces lors de l'exposition au Cd, et l'autre plus élevée (**3X = 20 µg/g p.s.**), mimant une contamination déjà modérée de l'environnement. Le sédiment de Marcenac a servi de matrice de référence.

#### 4.1. Choix des gènes étudiés

Au vu des effets connus du Cd (Cf *1<sup>ère</sup> partie* de ce chapitre) et mis en évidence chez les SPD du Medaka japonais au cours de la première série d'expériences, 12 gènes cibles ont été choisis de manière à balayer un spectre de toxicité potentiel le plus large possible (en fonction également des séquences codantes disponibles sur les bases de données) :

- ✓ La chaîne respiratoire mitochondriale : cytochrome c oxydase sous-unité I du complexe IV (*coxI*) et NADH-déshydrogénase sous-unité 5 du complexe I (*Nd5*) également appelée NADH-ubiquinone réductase.
- ✓ Les mécanismes de détoxification et de métabolisation : le gène codant pour les métallothionéines (*mt*), impliquées dans la séquestration des métaux et le gène codant pour la biotransformation des xénobiotiques par la voie du cytochrome P450-1A (*cyp1A*).
- ✓ Les systèmes antioxydants : superoxyde dismutase cytosolique à cofacteur Cu et Zn (*sodCu*) et mitochondriale à cofacteur Mn (*sodMn*)
- ✓ Les mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire et d'apoptose : le gène suppresseur de tumeur *p53* et le gène codant la protéine pro-apoptotique de la famille Bcl (*bax*).
- ✓ Les processus du développement embryonnaire : le gène *wnt1* impliqué dans la somitogénèse et la prolifération cellulaire de manière générale et le gène spécifiquement impliqué dans le développement du système nerveux *emx2*.
- ✓ Les systèmes de réparation de l'ADN : le gène *rad51* impliqué dans la réparation des lésions double-brin de l'ADN par recombinaison homologue (homologue de *recA*) et le gène *ogg1* spécifique des réparations des lésions oxydatives des bases de l'ADN telle que la 8-oxodG (8-Oxo-2'-désoxyguanosine).

Le gène *β-actine* a été utilisé comme gène de référence.

## 4.2. Protocole expérimental

Les quantités de matériel biologique nécessaires à la mise en œuvre du suivi de la bioaccumulation, des MT et de l'expression génique nous ont amené à augmenter le nombre d'embryons exposés par réplicat par rapport aux expositions précédentes. Le développement embryonnaire est sensible aux conditions environnementales auxquelles sont soumis les embryons. Il a donc fallu veiller à adapter le matériel (boîtes d'exposition, quantités de sédiment et de milieu...) au nombre d'embryons nécessaires aux différentes analyses afin que ces derniers soient soumis aux mêmes conditions, durant leur développement, que lors des études antérieures.

### 4.2.1. Conditions d'exposition

Comme évoqué plus haut, les analyses moléculaires entreprises au cours de cette étude nécessitent un nombre non-négligeable d'individus par réplicat dont les quantités exactes sont rappelées dans le **Tableau 3.15**.

**Tableau 3.15. Quantités de matériel biologique nécessaires aux analyses moléculaires entreprises après exposition des embryons au Cd**

Analyse	Nb. d'individus par prélèvement	Nb. de prélèvement par réplicat	Nb. d'individus total
RT-PCR	8	3	24
MT	15	2	30
ACC	15	2	30
<b>TOTAL</b>			<b>84</b>

Afin de pouvoir en outre suivre les autres marqueurs phénotypiques précédemment analysés, le nombre d'embryons par réplicat a été porté à 100. Par ailleurs, chaque condition d'exposition (0X : contrôle ; Cd-0,3X : 2 µg/g ; Cd-3X : 20 µg/g) a été traitée en six réplicats pour pouvoir effectuer les prélèvements aux deux stades de développement sélectionnés, sur trois réplicats expérimentaux à chaque fois. Les conditions d'exposition ont été adaptées au nombre plus important d'embryons exposés par réplicat comme détaillé dans le **Tableau 3.16**.

**Tableau 3.16. Conditions d'exposition appliquées lors de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par le Cd chez les embryons de Medaka**

Nb. Conditions traitées	Nb. Réplicats par condition	Ø BP (mm)	Nb. Emb.	Stade	M <sub>sed</sub> (g p.s.)	V <sub>h</sub> ERS (mL)	V <sub>i</sub> ERS (mL)	T <sub>incub</sub> (°C)	Photop. (j/n)
3	6	65	100	1 j pf	17	6,5	3,5	26 °C	12 h/12 h

Ø BP : diamètre de la boîte de Pétri d'exposition ; Nb. Emb. : nombre d'embryons exposés par réplicat ; M<sub>sed</sub> : masse de sédiment par réplicat en gramme de poids sec ; V<sub>h</sub> ERS : volume d'ERS ajouté pour humidifier le sédiment de chaque réplicat ; V<sub>i</sub> ERS : volume d'ERS ajouté dans un réplicat pour immerger les embryons ; T<sub>incub</sub> : température d'incubation des embryons pour toute la durée du test ; Photop. : photopériode appliquée pour toute la durée du test en h de jour/h de nuit.

Au total, pas moins de 1 800 embryons ont été nécessaires pour cette exposition « biomoléculaire ». Cette quantité dépassant de loin les capacités de production de notre élevage, les embryons de Medaka (lignée CAB) utilisés lors de cette étude nous ont été fournis par le GIS-AMAGEN (Gif-sur-Yvette, France). L'exposition n'a donc pas pu débuter juste après la fécondation mais seulement 24 h après en raison du temps de transport des embryons. Dès réception, les embryons sont triés afin d'éliminer les individus morts ou désynchronisés. Les embryons âgés de 24h pf sont ensuite exposés comme décrits dans le *Chapitre 2 au paragraphe 6.1*, sans renouvellement d'ERS (le niveau à seulement été complété au besoin).

### 4.2.2. Paramètres suivis et prélèvements

L'ensemble des paramètres suivis et des analyses effectuées au cours de ce test, ainsi que leur cinétique de mesure sont présentés dans le **Tableau 3.17**.

**Tableau 3.17. Paramètres étudiés lors de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par le Cd chez les embryons de Medaka**

Paramètre/Analyse	Matrice concernée	Cinétique de mesure	Donnée dérivée
Caractérisation chimique	Sédiment ERS	T0 (avant exposition) T7 (prélèvement) T9 (fin exposition)	Suivi de la contamination
MT*	Embryons Larves	T7 (prélèvement) T9 (fin exposition)	Concentration en protéines MT
Bioaccumulation*	Embryons Larves	T7 (prélèvement) T9 (fin exposition)	Contamination des organismes
RT-PCR**	Embryons Larves	T7 (prélèvement) T9 (fin exposition)	Expression génique
Viabilité	Embryons	Tous les jours	Viabilité embryonnaire
Rythme Cardiaque***	Embryons	Jour 6 et 7 pf	Activité Cardiaque
Éclosions****	Embryons Larves	Tous les jours	Taux d'éclosion Durée du développement
Données biométriques*****	Larves	Jour d'éclosion	Longueur totale Taille de la tête Rapport T/L
Malformations*****	Larves	Jour d'éclosion	Occurrence des malformations

*N.B. : Toutes les observations sont effectuées sur l'ensemble des individus (embryons et/ou larves) de chaque réplicat sauf indication contraire ci dessous.*

*\* Analyse effectuée sur 2 pools de 15 individus par réplicat (N=3) et par temps de prélèvement*

*\*\* Analyse effectuée sur 3 pools de 8 individus par réplicat (N=3) et par temps de prélèvement*

*\*\*\* Mesure effectuée sur 5 embryons par réplicat (N=3)*

*\*\*\*\* Observation effectuée sur l'ensemble des individus de 3 réplicats par condition*

*\*\*\*\*\* Mesure effectuée sur 15 larves par réplicat (N=3)*

Les prélèvements de sédiments destinés aux dosages de Cd ont été réalisés à T0, T7 (3 réplicats) et T9 (3 réplicats) comme indiqué au *paragraphe 3.1.2* de ce chapitre.

Les prélèvements d'ERS destinés au dosage du Cd ont été réalisés à T0, T7 et T9 puis conditionnés dans des cryotubes en polypropylène de 5 mL (3-4 mL d'ERS récupérés à la pipette dans chaque réplicat puis centrifugés à environ 3 500 xg pendant 15 minutes à 15 °C, le surnageant est récupéré pour analyse) et acidifiés immédiatement par l'ajout de 10 % (v/v) d'acide nitrique 65 % puis stockés à -20 °C jusqu'à analyse.

Les pools d'embryons et de larves de Medaka destinés aux dosages des MT et au suivi de la bioaccumulation sont déposés dans un Eppendorf 1,5 mL. Une fois l'ERS ou l'eau de mélange éliminée par aspiration à la micropipette et le matériel biologique pesé, chaque échantillon est congelé rapidement par immersion dans de l'azote liquide. Les échantillons de MT seront conservés dans ce milieu pour éviter une dégradation des protéines. Les échantillons réservés aux dosages chimiques sont stockés à -80 °C jusqu'à analyse.

Les pools d'embryons et de larves prélevés pour la RT-PCR sont immergés dans du RNA Later® (stoppe la dégradation des tissus et protège l'ARN cellulaire) après que l'ERS ou l'eau de mélange ait été retirée comme décrit ci-dessus. Les échantillons sont congelés rapidement par immersion dans de l'azote liquide puis conservés à -80 °C en attendant l'extraction de l'ARN. Les prélèvements à T9 ont été préparés dans la mesure du possible le même jour pour toutes les conditions (jour 8 pf).

*N.B. : l'arrêt de l'exposition a lieu au moment du pic d'éclosion, lorsque tous les prélèvements ont pu être faits, ce qui correspond également à la fin de l'expérience.*

Le suivi des paramètres phénotypiques a été effectué comme décrit précédemment, à quelques exceptions près.

Seule la viabilité embryonnaire a pu être évaluée au cours de cette étude (sur les six réplicats de chaque condition). En effet, lorsque tous les prélèvements T9 ont été réalisés, les larves et les embryons éventuellement restants ne sont pas conservés et l'expérience prend alors fin. De la même manière, le taux d'éclosion et la durée du développement ne sont calculés que sur la période allant du début des premières éclosions à la fin des prélèvements à T9, pour les trois réplicats réservés aux prélèvements sur stade larvaire.

Afin de ne pas interférer sur les résultats des différentes analyses, l'acquisition des données biométriques et l'observation des malformations a été entreprise sur 15 individus par réplicat (sur trois réplicats par condition) et en aucun cas sur des individus prélevés pour l'analyse de l'expression génique.

Pour les mêmes raisons, la mesure du rythme cardiaque au jour 6 et 7 pf a été entreprise sur les 3 réplicats réservés aux prélèvements sur stade larvaire.

### 4.3. Concentrations en métaux lourds dans le sédiment et l'ERS

Le suivi de la contamination en Cd des sédiments dopés a été réalisé aux différents temps de prélèvements (*i.e.* T0, T7 et T9) et a conduit aux résultats présentés dans le **Tableau 3.18**. Comme pour la précédente série d'expositions au Cu et Cd, les concentrations dosées ont été corrigées en soustrayant la teneur basale naturelle en Cd du sédiment de référence (Marcenac) évaluée à 0,17 µg/g p.s. dans le *paragraphe 3.2 de ce chapitre*.

**Tableau 3.18. Concentrations en Cd dans les sédiments utilisés lors de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par le Cd chez les embryons de Medaka**

	$C_{\text{dosée}}$ (µg/g p.s.)			$C_{\text{relative}}$ (µg/g p.s.)			$C_{\text{cible}}$ (µg/g)	$C_{\text{théorique}}$ (µg/g)	$R_{\text{enrobage}}$ (%)
	T0	T7	T9	T0	T7	T9			
Cd-0X	0,14	0,27 ± 0,09 <i>a</i>	0,23 ± 0,01 <i>a</i>	n.d.	0,09 ± 0,09 <i>a</i>	0,06 ± 0,01 <i>a</i>	0,00	0,00	-
Cd-0,3X	1,67	1,71 ± 0,04 <i>b</i>	1,64 ± 0,15 <i>b</i>	1,50	1,54 ± 0,04 <i>b</i>	1,47 ± 0,15 <i>b</i>	2,00	2,00	75,00
Cd-3X	16,27	14,88 ± 1,09 <i>c</i>	15,03 ± 0,62 <i>c</i>	16,10	14,71 ± 1,09 <i>c</i>	14,85 ± 0,62 <i>c</i>	20,00	19,95	80,38
<b>Valeur du background (µg/g p.s.)</b>		<b>Cd : 0,17 ± 0,04</b>							

*C<sub>dosée</sub> : concentration dosée; C<sub>relative</sub> : concentration après soustraction des valeurs du background ; C<sub>cible</sub> : concentration sélectionnée pour le test embro-larvaire ; C<sub>théorique</sub> : concentration attendue après enrobage (après ajustement à la concentration des solutions de contamination et la quantité exacte de matrice dopée) ; R<sub>enrobage</sub> : rendement de l'enrobage ; n.d. : donnée non déterminée car la valeur du background est supérieure à la valeur dosée. Les données sont présentées, lorsqu'elles s'y prêtent, sous forme de moyenne par condition ± écart-type (N = 3). Les résultats de l'analyse statistique des jeux de données sont indiqués par des lettres à droite des valeurs concernées : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés (p < 0,05 selon le test post-hoc de Tukey). Les jeux de données T7 et T9 ont également été comparés entre eux.*

Les rendements d'enrobage obtenus dans la présente expérience sont sensiblement plus bas que ceux déterminés précédemment. En effet, l'efficacité de dopage est ici de 75 % et 80 % respectivement pour les concentrations Cd-0,3X et Cd-3X alors qu'elle était supérieure à 85 % lors de la première série de dopages. Les doses d'exposition résultant de cette contamination artificielle sont donc légèrement plus basses que les valeurs cibles et correspondent finalement à **1,50 µg/g p.s.** et **16,10 µg/g p.s.** respectivement pour les conditions Cd-0,3X et Cd-3X.

Par ailleurs, les conditions d'exposition sont significativement différentes les unes des autres ( $p < 0,05$  selon le test *post-hoc* de Tukey), pour un même temps de prélèvement. Inversement, les concentrations mesurées à T7 et T9 pour un même traitement ne sont pas significativement différentes entre elles. De plus, pour ces deux temps de prélèvement, les concentrations relatives en Cd représentent plus de 90 % de la dose initiale mesurée à T0. Ces observations indiquent que les teneurs en Cd dans le sédiment dopé restent stables sur toute la durée de l'expérience.

En parallèle du dosage des sédiments aux différents temps de prélèvements, un suivi de la contamination de l'ERS a également été entrepris (*Figure 3.16*).

Le niveau de contamination de l'ERS dans le traitement contrôle est resté stable ( $p > 0,05$  selon le test *post-hoc* de Tukey) tout au long de l'expérience, avec des valeurs comprises entre 0,031 µg/L à T0 (identique pour tous les traitements) et 0,223 µg/L à T9.

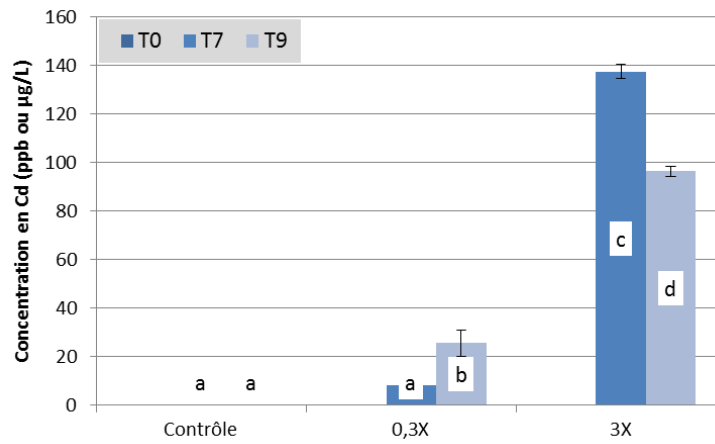
Cependant, les concentrations en Cd de l'ERS varient significativement selon le temps de prélèvement et la concentration en Cd dans le sédiment. En effet, la teneur en Cd du milieu augmente progressivement de 0,031 µg/L (ERS vierge T0) à 8,14 µg/L au temps T7, pour finalement atteindre 25,76 µg/L en fin d'exposition pour le traitement Cd-0,3X. Seule cette dernière valeur est significativement différente du contrôle correspondant (Témoin T9,  $p < 0,05$  selon le test *post-hoc* de Tukey).

De manière surprenante, la concentration en Cd dans l'ERS pour le traitement 3X est significativement plus forte à T7 qu'à T9, avec des valeurs de 137,62 µg/l et 96,40 µg/L respectivement et toutes deux sont statistiquement différentes des teneurs en Cd mesurées pour la condition contrôle à T7 et T9.

#### 4.4. Bioaccumulation du cadmium chez les embryons et larves

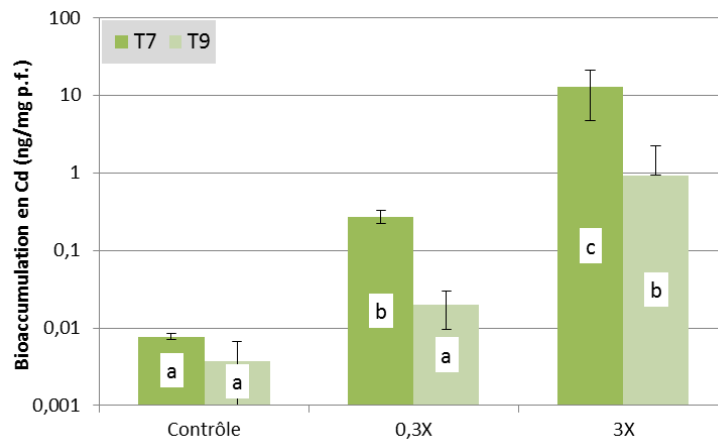
La mesure de l'accumulation en Cd a été effectuée chez les embryons (T7) et les larves (T9) exposés aux trois traitements par dosage du Cd total sur deux pools de 15 individus pour chaque réplicat. Les résultats de ces analyses, présentés sur la *Figure 3.17*, montrent que la bioaccumulation en Cd chez les organismes exposés augmente de façon exponentielle avec la concentration en Cd du sédiment. La charge en Cd mesurée chez les embryons à T7 (0,27 ng Cd/mg de poids frais, p.f. et 12,9 ng Cd/mg p.f. pour Cd-0,3X et Cd-3X respectivement) est significativement plus élevée ( $p < 0,05$  selon le test *post-hoc* de Tukey) chez tous les groupes contaminés en comparaison du témoin (0,008 ng Cd/mg p.f.). Les teneurs mesurées chez les larves nouvellement écloses (T9 : 0,02 ng Cd/mg p.f. et 0,94 ng Cd/mg p.f. pour Cd-0,3X et Cd-3X respectivement) sont significativement plus basse que pour les embryons. Seules les larves exposées à la plus forte concentration présentent des teneurs en Cd significativement plus élevées par rapport au groupe contrôle (0,004 ng Cd/mg p.f.).

Les coefficients de corrélation de Pearson ont été calculés pour comparer les concentrations en Cd dans les organismes par rapport à celles mesurées dans l'ERS ou les sédiments. Les deux analyses donnent des coefficients de Pearson significatifs de 0,76 pour l'ERS et de 0,57 pour les sédiments. Ces résultats confirment bien une forte corrélation entre la bioaccumulation observée chez les organismes et la concentration en Cd des milieux aqueux et sédimentaires. Ceci semble indiquer que la phase aqueuse est une voie de contamination non-négligeable des individus exposés.



**Figure 3.16. Évolution de la contamination en Cd de l'ERS lors de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par le Cd chez les embryons de Medaka**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type ( $N = 3$ ). Les résultats de l'analyse statistique combinée des jeux de données à T7 et T9 sont indiqués par des lettres à droite des valeurs concernées : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey).



**Figure 3.17. Évolution de la teneur en Cd chez les embryons (T7) et larves (T9) de Medaka lors de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par le Cd**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type ( $N = 3$ ). Les résultats de l'analyse statistique combinée des jeux de données à T7 et T9 sont indiqués par des lettres à droite des valeurs concernées : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey).



## 4.5. Toxicité et modification du profil d'expression génique

### 4.5.1. Toxicité aiguë

Comme mentionné plus haut, seul le suivi de la viabilité embryonnaire a pu être mis en œuvre au cours de cette exposition. Comme le montre la *Figure 3.18*, la survie des embryons n'a pas été affectée par la contamination des sédiments en Cd puisque comprise entre 94 % et 99 % sur l'ensemble des conditions. Ces résultats viennent confirmer l'absence de toxicité aiguë induite par le Cd aux doses appliquées, comme l'ont démontré les expositions précédentes.

### 4.5.2. Tératogénicité & autres effets sublétaux

#### 4.5.2.1. Développement embryonnaire

Les taux d'éclosion des embryons au sein des différents groupes sont élevés puisque compris entre 91 % et 95 % quelle que soit la teneur en Cd du sédiment (*Figure 3.19.a*). Même si ces calculs ne prennent en compte que les éclosions ayant eu lieu jusqu'au jour 9 pf seulement, le très faible nombre d'embryons non-éclos restant, répartis de manière homogène entre les conditions, laisse penser que les valeurs mentionnées restent valides.

En effet, les éclosions ont eu lieu en nombre, de façon relativement précoce, et très synchronisée puisque environ 30 % des embryons ont éclos au jour 8 pf et 63 % au jour 9 pf. Les durées de développement moyennes qui en découlent sont, par conséquent, très proches et comprises entre 8,63 j pf et 8,76 j pf selon les conditions (*Figure 3.19.b*). Une fois encore, le Cd n'a pas affecté les paramètres généraux du développement *in ovo*, conformément aux observations que nous avons faites au cours de la précédente série d'expériences.

#### 4.5.2.2. Activité cardiaque ( $23 \pm 1$ °C)

Les mesures du rythme cardiaque des embryons acquises au cours de cette étude sont illustrées sur la *Figure 3.20*.

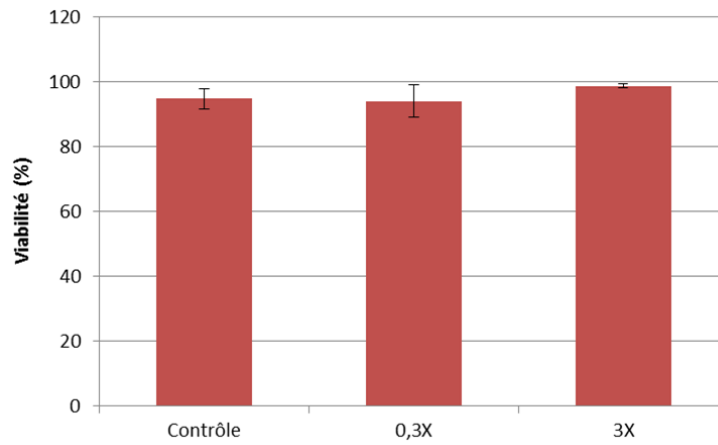
Comme nous l'avons observé au cours de la première exposition au Cd, ce composé induit une tachycardie chez les embryons âgés de 6 j pf exposés à la plus forte concentration testée qui atteint environ 114 batt./min en moyenne alors que l'activité cardiaque des individus contrôle avoisine les 101 batt./min. Inversement, le jour suivant, le rythme cardiaque des individus de cette même condition diminue significativement jusqu'aux alentours de 91 batt./min par rapport au groupe témoin (environ 105 batt./min).

#### 4.5.2.3. Données biométriques

Aucune différence statistique n'est mise en évidence entre les groupes contaminés et le traitement témoin pour les trois mesures biométriques réalisées au cours de cette exposition.

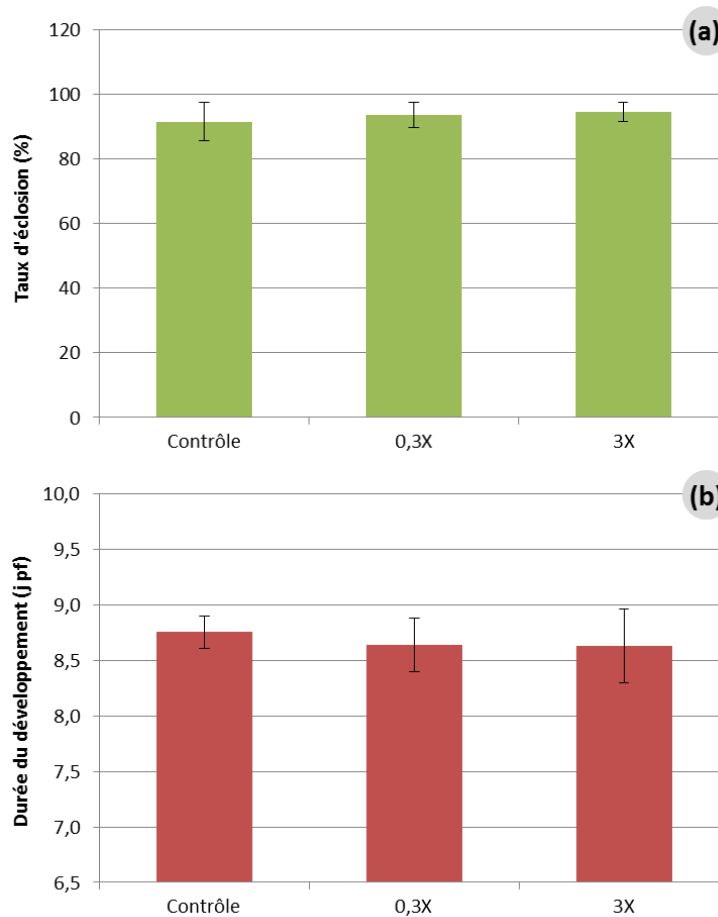
Cependant, la longueur totale des larves à l'éclosion issues du groupe Cd-0,3X ( $4,64 \pm 0,05$  mm) est significativement inférieure à celle mesurée au sein du traitement Cd-3X ( $4,81 \pm 0,05$  mm ; *Figure 3.21.a*). Cependant, cette différence est relativement faible puisqu'elle représente moins de 4 % d'augmentation entre les deux conditions. Ces effets sont semblables à ceux mis en évidence lors de l'évaluation de la toxicité des sédiments dopés au Cu.

Globalement les larves écloses au cours de cette exposition sont plus petites que celles obtenues lors des expositions précédentes (ici de 4,7 mm à 4,8 mm versus 4,9 mm à 5,0 mm



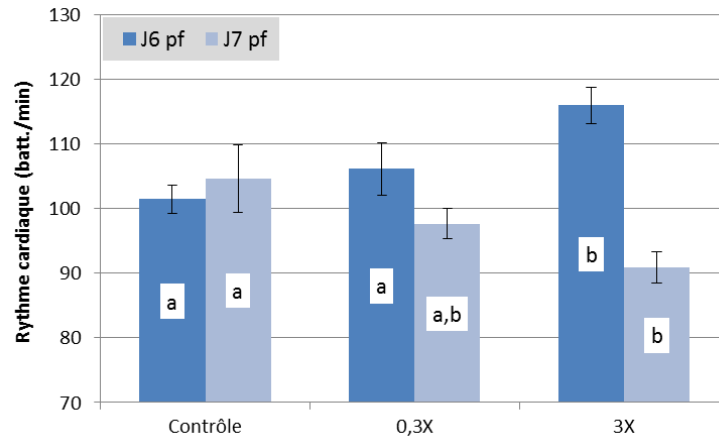
**Figure 3.18. Viabilité embryonnaire lors de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par le Cd**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type (N = 6).



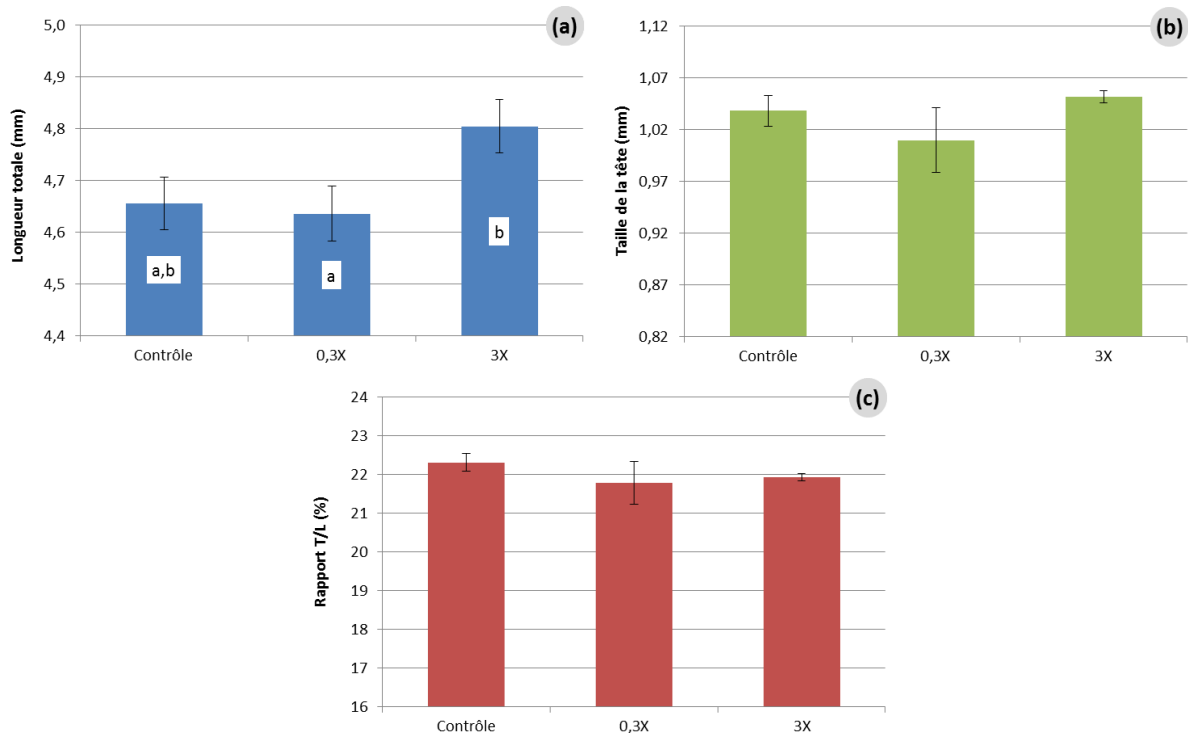
**Figure 3.19. Taux d'éclosion (a) et durée du développement embryonnaire (b) observés lors de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par le Cd**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type (N = 3). Le taux d'éclosion et la durée du développement ont été évalués sur les trois réplicats par condition réservés aux prélèvements sur stade larvaire.



**Figure 3.20. Rythme cardiaque des embryons au jour 6 et 7 pf au cours de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par le Cd**

L'activité cardiaque a été évaluée sur les trois réplicats par condition réservés aux prélèvements sur stade larvaire. Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type ( $N = 3$ ). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres au centre des barres : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey).



**Figure 3.21. Mesures biométriques acquises sur les larves nouvellement écloses au cours de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par le Cd**

Les données biométriques acquises au cours du MELA incluent la longueur totale des larves (a), la taille de la tête (b) et le rapport T/L (c) et sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type ( $N = 3$ ). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres au centre des barres : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey).

précédemment). Ceci pourrait s'expliquer par les éclosions plus précoces survenues au cours de la présente expérience.

La taille de la tête et le rapport T/L des différents traitements appliqués sont relativement homogènes puisque compris respectivement entre 1,01 et 1,05 mm et entre 21,8 % et 22,3 % (Figure 3.21.b et c).

#### 4.5.2.4. Tératogénicité

Une fois encore, l'exposition des embryons de Medaka à des sédiments contaminés en Cd induit une augmentation significative du pourcentage d'individus malformés qui se situe aux alentours de 50 % pour les deux concentrations testées alors que le groupe contrôle ne présente que  $13 \pm 6,67$  % de larves atteintes d'anomalies du développement (Figure 3.22).

Comme nous avons pu l'observer au cours de la précédente exposition, le pourcentage d'individus présentant des malformations squelettiques (44 %) ou cardiovasculaires (37 %) est significativement induit par la concentration Cd-0,3X et Cd-3X respectivement (Tableau 3.19).

**Tableau 3.19. Pourcentages d'individus impactés par les différents types de malformations après exposition aux sédiments dopés au Cadmium dans le cadre de l'analyse croisée des réponses phénotypiques et biomoléculaires**

	Œdèmes	Squelette axial	Cranio-faciale	Œil	Cardio-vasculaire	Sac Vitellin
Cd-0X	0% ± 0,00	7% ± 6,67 <i>a</i>	0% ± 0,00	0% ± 0,00	7% ± 6,67 <i>a</i>	2% ± 3,85
Cd-0,3X	2% ± 3,85	<b>44% ± 7,70 <i>b</i></b>	7% ± 6,67	2% ± 3,85	24% ± 10,18 <i>a,b</i>	4% ± 7,70
Cd-3X	0% ± 0,00	20% ± 9,43 <i>a</i>	0% ± 0,00	0% ± 0,00	<b>37% ± 14,14 <i>b</i></b>	0% ± 0,00

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition ± écart-type (N = 3). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres à droite des valeurs concernées : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey)

Ces résultats semblent confirmer que le squelette axial et le système cardiovasculaire sont des organes particulièrement sensibles à la présence d'une contamination en éléments traces métalliques.

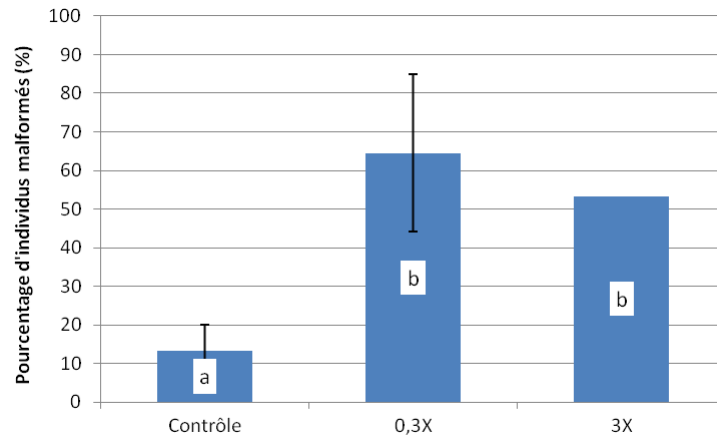
#### 4.5.3. Dosage des métallothionéines

Le dosage des protéines MT chez les embryons et larves de Medaka a été effectué par la méthode de saturation au Hg froid sur la fraction cytosolique. Les résultats de cette analyse sont présentés sur la Figure 3.23. Les teneurs en MT observées chez les organismes témoins varient de  $8,52 \pm 1,19$  à  $12,17 \pm 5,16$  nmol de sites de fixation du Hg/g p.f. (poids frais) aux temps T7 et T9 respectivement. Aucune différence statistique n'est mise en évidence quelle que soit la concentration ou le temps de prélèvement, malgré une légère tendance à la diminution des teneurs en MT des groupes contaminés par rapport au groupe témoin.

#### 4.5.4. Altération du profil d'expression génique

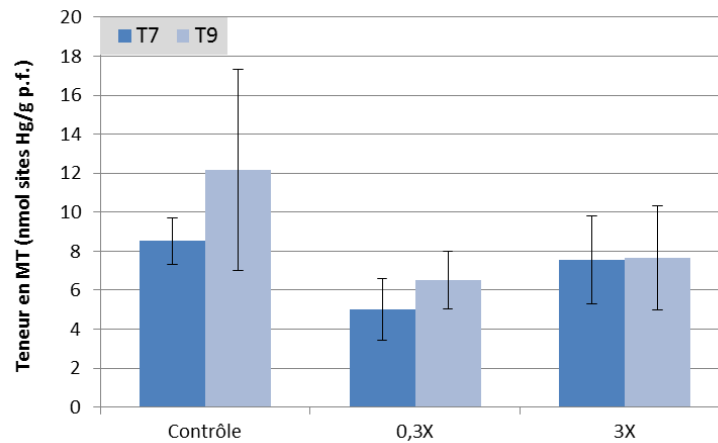
L'expression de plusieurs gènes impliqués dans différents mécanismes cellulaires a été analysée par la technique de la RT-PCR chez les embryons en fin d'organogénèse (T7) et les larves à l'éclosion (T9) après une exposition à des sédiments artificiellement contaminés en Cd.

Les expressions différentielles des gènes étudiés ont été calculées en utilisant la  $\beta$ -actine comme gène de référence (le détail des expressions est présenté en Annexe 4). Les résultats sont présentés sous la forme de facteurs d'induction (FI) qui sont obtenus en divisant l'expression moyenne d'un gène donné dans un groupe contaminé par celle du groupe contrôle correspondant.



**Figure 3.22. Pourcentage de larves malformées observées au cours de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par le Cd**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type ( $N = 3$ ).



**Figure 3.23. Évolution de la teneur en MT des embryons (T7) et larves (T9) de Medaka lors l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par le Cd**

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type ( $N = 3$ ) et exprimés en nmol de sites de fixation du Hg par g de poids frais (p.f.)

Ces facteurs d'induction sont usuellement considérés comme indiquant une modulation significative de l'expression génique lorsqu'ils sont supérieurs à 2 (surexpression) et inférieurs à 0,5 (répression).

L'exploitation des résultats a été complétée par une analyse statistique par le test *t* pour échantillons indépendants. Les séries de données à T7 et T9 ont été traitées séparément et seules les comparaisons deux à deux entre groupes contaminés et traitement témoin correspondant ont été effectuées. L'ensemble des résultats de cette étude est présenté dans le **Tableau 3.20**.

**Tableau 3.20.** Expression différentielle des gènes d'intérêt chez les embryons (T7) et les larves (T9) de Medaka au cours de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par le Cd

	Métabolisme mitochondrial		Métabolisation / Détoxification		Défense stress oxydant		Arrêt cycle cellulaire/ apoptose		Développement		Réparation ADN	
	<i>cox I</i>	<i>nd5</i>	<i>mt</i>	<i>cyp1A</i>	<i>sod (Mn)</i>	<i>sod (Cu)</i>	<i>p53</i>	<i>bax</i>	<i>wnt1</i>	<i>emx2</i>	<i>rad51</i>	<i>ogg1</i>
<i>Stade embryonnaire (T7)</i>												
Cd-0,3X	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Cd-3X	/	/	/	/	/	/	/	0,5*	/	/	0,4*	/
<i>Stade larvaire (T9)</i>												
Cd-0,3X	/	0,6*	/	/	/	/	/	/	2,4	/	/	/
Cd-3X	/	/	/	/	/	/	2,3	2,4	2,5*	/	2,1	3,5

Les résultats sont mentionnés sous la forme de facteurs d'induction (>1) ou de répression (<1) par rapport au contrôle. Un astérisque (\*) symbolise une différence significative par rapport au groupe témoin selon le test *t* pour échantillons indépendants ( $p < 0,05$ ). Le signe / signifie l'absence de variation notable de l'expression génique par rapport au contrôle ( $0,5 < FI < 2$  et test *t* non-significatif).

L'analyse de l'expression génique effectuée sur les embryons de Medaka a montré une répression significative des gènes *bax* et *rad51* à la plus forte concentration en Cd uniquement. Ces gènes sont respectivement impliqués dans la régulation de l'entrée en apoptose des cellules et les mécanismes de réparation de l'ADN par recombinaison génétique.

A l'inverse, les expressions géniques modulées par la présence de Cd le sont principalement dans le sens d'une surexpression chez les stades larvaires de Medaka. L'unique exception est le gène du métabolisme énergétique mitochondrial *nd5*, dont l'expression est significativement inhibée à la concentration 0,3X ( $p < 0,05$  selon le test *t*) malgré un facteur d'induction supérieur à 0,5 en comparaison du traitement contrôle. Plusieurs autres gènes impliqués dans différents mécanismes cellulaires, incluant la régulation du cycle cellulaire (arrêt du cycle ou apoptose), le développement embryonnaire et les réparations des dommages à l'ADN, ont tendance à être surexprimés en présence de Cd ( $FI > 2$ ). Cependant, seule l'expression génique de *wnt1* s'avère significativement amplifiée à la concentration Cd-3X selon le test *t* ( $p < 0,05$ ). Ce gène prend part aux événements fondamentaux du développement embryonnaire puisqu'il intervient dans les mécanismes de régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire.

## 4.6. Discussion

Le but de cette série d'expositions était d'analyser conjointement les effets phénotypiques et moléculaires d'une exposition au Cd par sédiment contact chez les SPD du Medaka japonais. Pour atteindre cet objectif, plusieurs analyses supplémentaires incluant le dosage des MT et l'étude de l'expression de plusieurs gènes d'intérêt ont été entreprises, en parallèle des paramètres précédemment étudiés.

#### 4.6.1. Suivi de la contamination en Cd dans le sédiment et la phase aqueuse

Les concentrations en Cd à T0 sont de **1,50 µg/g p.s.** et de **16,10 µg/g p.s.** respectivement pour les conditions Cd-0,3X et Cd-3X. De plus, les différents dosages entrepris au temps intermédiaire (T7) et en fin d'exposition (T9) révèlent que la contamination du sédiment reste stable dans le temps puisque les valeurs moyennes obtenues représentent plus de 90 % de la teneur en Cd à T0.

Afin de mieux caractériser les voies d'exposition impliquées dans le cas d'une contamination via une matrice sédimentaire, le suivi de la concentration en Cd dans l'ERS a été entrepris selon la même cinétique d'échantillonnage. Il résulte de ces analyses qu'une quantité non-négligeable de Cd se désorbe des particules pour se retrouver dans la phase aqueuse avec des concentrations d'environ 26 µg/L pour le traitement Cd-0,3X (T9) et comprises entre 96 µg/L et 138 µg/L pour la condition Cd-3X. Ceci illustre très certainement le passage dans la phase aqueuse de la fraction la plus labile du Cd fixé aux particules de sédiment comme discuté dans la partie précédente, ou encore de la dilution d'eaux interstitielles fortement chargées en Cd. La mise en évidence de cette contamination de l'ERS en Cd indique donc une seconde voie potentielle de contamination des embryons de Medaka par la phase aqueuse.

#### 4.6.2. Toxicité aiguë et impact sur le développement général

Gonzalez-Doncel *et al.* (2003b) ont exposé des embryons de cette même espèce dès le stade morula tardif à des concentrations en Cd bien supérieures (jusqu'à 80 mg/L) à celles retrouvées au cours de notre étude dans la phase aqueuse. Ces auteurs ne notent pas de modification du succès d'éclosion ni de retard de développement. En accord avec ces résultats et conformément à ce que nous avons observé précédemment, les doses de Cd testées n'ont pas induit d'effet notable sur la survie embryonnaire, le taux d'éclosion, la durée du développement et la croissance (étudiée au travers des données biométriques) en comparaison du groupe témoin. Le Cd n'a pas non plus affecté la survie d'embryons de *D. rerio* exposés à des doses allant de 0,25 mg/L à 10 mg/L (26 °C, Hallare *et al.*, 2005b). À l'inverse, la durée du développement des embryons de truite *Oncorhynchus mykiss* a été alternativement raccourcie ou allongée en fonction des concentrations en Cd comprises entre 0,05 µg/L et 2,50 µg/L (Lizardo-Daudt & Kennedy, 2008). Au cours de cette étude, les auteurs notent également une réduction de la taille des larves exposées à la plus forte concentration. L'ensemble de ces observations met une fois de plus en évidence la différence de sensibilité existante entre les espèces. Les écarts de toxicité entre espèces peuvent également être amplifiés par les conditions d'exposition, adaptées aux besoins de l'organisme étudié, étant donné que les paramètres physico-chimiques (dont le pH, la dureté de l'eau et la température) du milieu influencent grandement la biodisponibilité des éléments métalliques (Benaduce *et al.*, 2008 ; Hallare *et al.*, 2005b ; Burton, 1991).

#### 4.6.3. Bioaccumulation en Cd chez les embryons et larves de Medaka

Malgré l'absence d'effets aigus induits par le Cd chez les SPD du Medaka au cours de notre étude, la contamination effective des individus a été confirmée par la mesure de la teneur en Cd total chez les individus exposés. Ces analyses ont mis en évidence une bioaccumulation dose-dépendante du Cd qui s'est avérée positivement corrélée à la concentration en Cd mesurée dans le sédiment et dans l'ERS (coefficient de Pearson significatifs de 0,57 et 0,76 respectivement). Plusieurs

études ont préalablement décrit la même augmentation significative de l'accumulation en Cd avec la concentration d'exposition chez les SPD d'autres espèces de poissons (Burnison *et al.*, 2006 ; Meteyer *et al.*, 1988). De manière intéressante, l'accumulation en Cd chez des larves de *D. rerio* exposées durant 3 h à différentes doses de Cd est très similaire à celle observée au cours de notre étude puisque également dose-dépendante et comprise entre 0,01 ng/mg p.f. et 11 ng/mg p.f. pour des concentrations allant de 0,2 µM (22 µg/L) jusqu'à 125 µM (14 mg/L) (Matz *et al.*, 2007).

De plus, au cours de notre étude, une réduction d'environ 93 % de l'accumulation en Cd est observée entre les embryons (T7) et les larves nouvellement écloses (T9). Cette diminution de la charge en Cd est très probablement le résultat de la perte du chorion au moment de l'éclosion, et donc du Cd associé à celui-ci. En effet, Michibata (1981) avait déjà démontré que chez des embryons de Medaka *O. latipes* exposés à 10 mg/L de Cd, plus de 94 % du Cd total mesuré était en réalité absorbé par le chorion. Quelques années plus tard, ces résultats sont confirmés par Meteyer *et al.* (1988) qui évaluent à plus de 92 % la proportion de Cd total associé au chorion lors de l'exposition de *Cyprinodon variegatus* à 442 µg/L de Cd pendant 12 h. Le phénomène peut être expliqué par la présence de mucopolysaccharides et d'acides glutamiques chargés négativement sur le chorion qui serviraient de ligands au Cd (Meteyer *et al.*, 1988 ; Rombough, 1985). D'autre part, l'étude de Meteyer *et al.* (1988) met également en évidence une absorption en Cd variable au cours du temps, certainement liée à des modifications physiologiques de l'embryon lors du développement embryonnaire et probablement à un changement dans les propriétés du chorion. En effet, avant l'éclosion, le chorion présenterait une plus grande perméabilité et moins de sites d'absorption pour le Cd ce qui faciliterait le passage du composé vers le fluide périvitellin (Lacoue-Labarthe *et al.*, 2008 ; Gonzalez-Doncel *et al.*, 2003b ; Meteyer *et al.*, 1988).

#### 4.6.4. Tératogénicité et altération du rythme cardiaque

Les quantités de Cd néanmoins assimilées par les embryons de Medaka ont été suffisantes pour induire plusieurs réponses phénotypiques, majoritairement très similaires à nos précédentes observations. En effet, le potentiel tératogène du Cd s'est une nouvelle fois manifesté en augmentant fortement le pourcentage de larves malformées à l'éclosion aux alentours de 50 % pour les deux concentrations testées. Les malformations cardiaques (principalement des positionnements et plicatures anormales du cœur) et squelettiques (majoritairement des cyphoses et lordoses ainsi que des larves au corps arqué en forme de C) ont été significativement induites chez les individus exposés au Cd durant tout leur développement embryonnaire. Ces résultats viennent confirmer la sensibilité particulière du système cardiovasculaire et du squelette axial face à une contamination en métaux et le lien possible entre les deux types de symptômes. Comme observé au cours de la première série d'expositions au Cd, la plus forte concentration a induit une tachycardie chez les embryons de 6 j pf pouvant être à nouveau interprétée comme une première réponse du métabolisme vis-à-vis du stress occasionné par la contamination en Cd. Inversement, au jour 7 pf, une réduction du rythme cardiaque a été notée chez les embryons du même traitement. La manifestation d'une bradycardie à la suite d'une exposition au Cd a déjà été rapportée dans la littérature (Cao *et al.*, 2009). Les auteurs expliquent cet effet par une perturbation par le Cd de l'absorption du Ca<sup>2+</sup> au niveau de la membrane cellulaire. Le fait que cet effet du Cd n'ait pas été observé au cours de la première exposition pourrait être lié au fait que les embryons utilisés au cours des deux expériences provenaient d'élevages différents. Dans la première expérience, les embryons étaient issus de notre élevage et exposés quelques heures après la fécondation, alors qu'au cours de



la présente étude, les embryons ont été fournis par le GIS-AMAGEN et ont donc été exposés un jour après la fertilisation des œufs. Ces décalages de la fenêtre d'exposition et le changement de géniteurs pourraient expliquer les différences de sensibilité des deux souches d'embryons.

D'après les résultats que nous venons de décrire, nous pouvons abaisser la LOEC précédemment établie pour le Cd à **1,50 µg/g p.s.** Cette LOEC est sensiblement plus basse que celles rapportées dans la littérature (voir **Tableau 3.13**) pour des espèces benthiques. La valeur LOEC établit dans la présente étude pourrait servir à réévaluer la PNEC<sub>sédiment</sub> et la NQE correspondante pour le Cd dans le compartiment sédimentaire. L'exposition des embryons de Medaka à des sédiments contaminés au Cd s'est traduite par une imprégnation significative des organismes qui a engendré des répercussions phénotypiques notables. L'analyse des marqueurs moléculaires suivis au cours de ce travail devrait permettre d'étudier l'implication particulière de certains mécanismes cellulaires.

#### 4.6.5. Réponse des métallothionéines (MT)

Les MT font partie d'une classe de protéines intracellulaires de faible poids moléculaire (6-7 kDa) et riches en cystéines, ce qui leur confère un fort potentiel de séquestration des ions métalliques. Les MT sont considérées comme jouant un rôle important dans plusieurs mécanismes clés de l'homéostasie des métaux essentiels et/ou toxiques (Coyle *et al.*, 2002). Bien qu'il ait été montré que le Cd pouvait induire une augmentation de la concentration en MT chez les embryons de poissons (Riggio *et al.*, 2003), aucune évolution de la teneur protéique en MT n'a été mise en évidence au cours de notre étude. Conformément à ces observations, l'expression du gène *mt* n'a pas été modifiée significativement par l'exposition au Cd. Gonzalez *et al.* (2006) soulignent également que la réponse des MT (tant au niveau de l'expression génique que de la synthèse des protéines) peut être relativement tardive (jusqu'à 21 j de contamination) et variable selon l'organe considéré. Outre le fait que le temps d'exposition au Cd de la présente étude ait pu être insuffisant pour induire la synthèse de MT, il est également possible que le dosage des MT, effectué sur des pools de 15 organismes entiers, ait entraîné une « dilution » de la réponse certainement plus marquée au niveau d'organes internes spécifiques (foie, branchies...). D'autre part, le suivi de la concentration en MT sur les premiers stades de développement d'embryons de *D. rerio* exposés à du Cd a montré que si ce métal induisait une augmentation du contenu en MT chez les embryons au stade blastula, il n'induisait plus aucune modification sur la teneur protéique au stade mi-gastrula (Riggio *et al.*, 2003). Ces résultats suggèrent que la régulation de la synthèse des MT est différente et variable selon la durée d'exposition, les organes et tissus étudiés, les organismes ainsi que leur stade de développement.

#### 4.6.6. Réponses des mécanismes pro-apoptotiques et de réparations de l'ADN chez les embryons

L'analyse des profils d'expression génique sur les embryons de Medaka exposés au Cd a montré, dans un premier temps, une répression significative du gène pro-apoptotique *bax* et du gène *rad51* impliqué dans les mécanismes de réparation de l'ADN par recombinaison homologue. Plusieurs études ont démontré l'induction de l'apoptose chez des cellules exposées *in vitro* à du Cd par le biais de l'activation de *p53* et *bax* (Risso-de Faverney *et al.*, 2004 ; Lag *et al.*, 2002). Cependant, une induction ou une répression du gène *bax* a également été observée chez le *D. rerio* en fonction de la concentration en Cd, de l'organe étudié et/ou du temps de prélèvement (Gonzalez *et al.*, 2006).

De plus, une répression concomitante des gènes *bax* et *rad51* a déjà été rapportée lors d'une exposition de larves de *Xenopus laevis* à 30 µg/L de Cd alors que ces mêmes gènes étaient surexprimés à une concentration plus basse (Mouchet *et al.*, 2006). Selon ces auteurs, les cellules présentant des dommages à l'ADN sont supposées arrêter leur cycle cellulaire en stade G2/M et G1/S afin de réparer les lésions de l'ADN et dans le cas contraire, entrer en apoptose. Ainsi, la répression des gènes pro-apoptotiques observée chez *X. laevis* pourrait être liée à l'inhibition des mécanismes de réparation de l'ADN (Mouchet *et al.*, 2006). L'effet inhibiteur du Cd sur les mécanismes de réparation de l'ADN de type NER (nucleotide excision repair), BER (base excision repair) et MMR (mismatch repair) a été largement rapporté dans la littérature. Il serait le résultat de l'inactivation des protéines initiatrices du mécanisme de réparation BER et de la perturbation des interactions protéines-ADN dans le cas des mécanismes BER et MMR (voir Giaginis *et al.*, 2006 pour revue). Cependant, l'étude de Mouchet *et al.* (2006) et la nôtre sont, à notre connaissance, les seules à mettre en évidence une inhibition des gènes intervenant dans la réparation des cassures double-brins de l'ADN par le Cd. L'inhibition par le Cd des mécanismes de réparation de l'ADN fait encourir le risque de la fixation des dommages à l'ADN sous la forme de mutations et du développement de tumeurs cancéreuses (Joseph, 2009 ; Waisberg *et al.*, 2003).

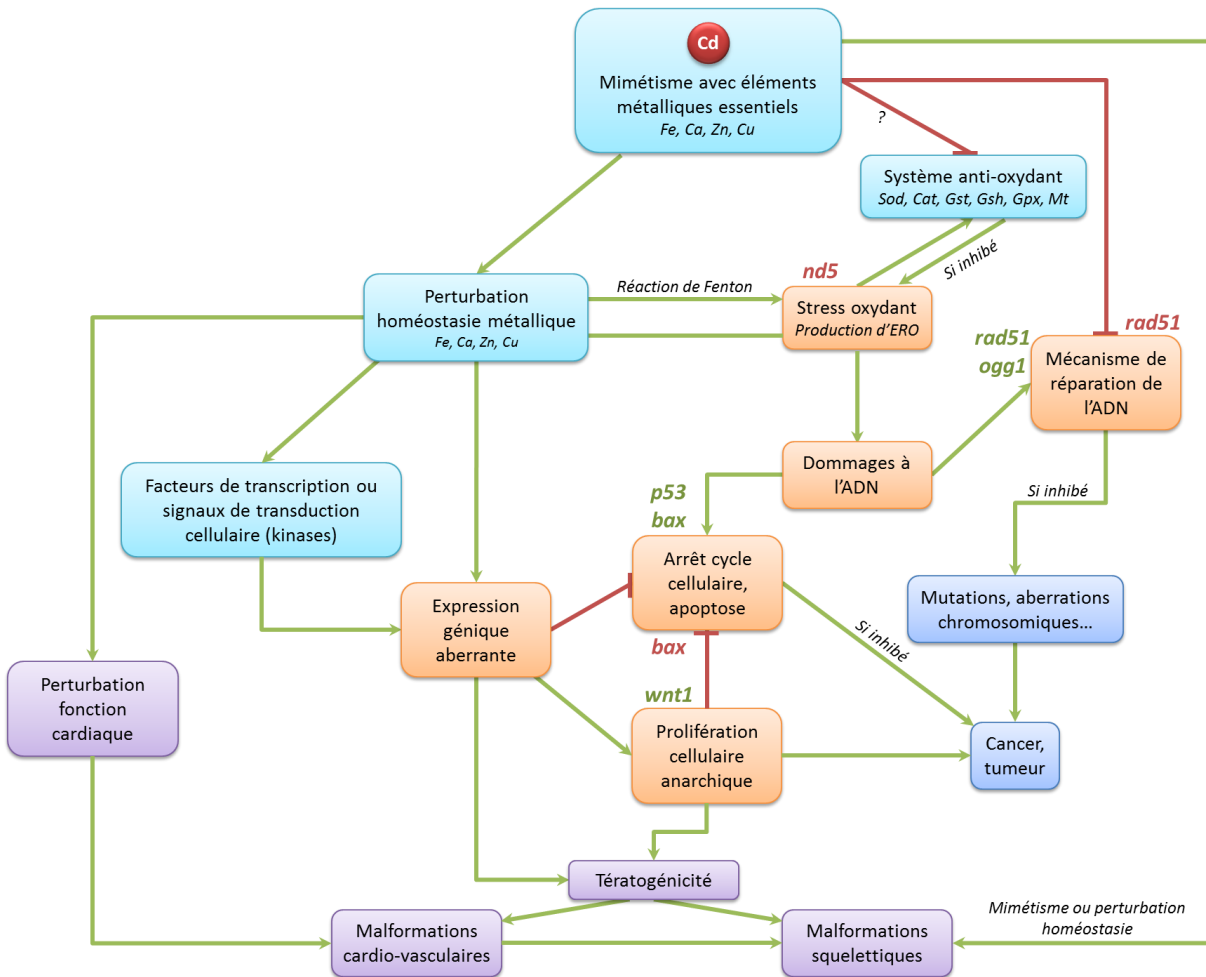
#### 4.6.7. Impact sur le métabolisme mitochondrial larvaire

La même analyse de l'expression génique effectuée chez les larves nouvellement écloses a mis en évidence un profil de réponse très différent de ce qui a été observé sur stade embryonnaire. En effet, une répression du gène *nd5* (NADH déshydrogénase sous-unité 5 ou NADH-ubiquinone réductase sous-unité 5) impliqué dans le métabolisme énergétique mitochondrial (réduction de l'ubiquinone par le NADH) a été observée chez les individus exposés à la concentration Cd-0,3X. Cette observation suggère une atteinte du complexe I de la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie. L'inhibition de l'activité de la chaîne de transfert d'électrons est considérée comme un effet toxique majeur du Cd sur la mitochondrie et la cause de la production d'ERO par cet élément métallique (Bertin & Averbek, 2006). Cependant, le suivi de l'activité des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale *in vitro* chez le cochon d'Inde a montré que les complexes II et III étaient plus sensibles à l'effet inhibiteur du Cd que les complexes I et IV (Wang *et al.*, 2004). A l'inverse, chez l'huître de Virginie, le complexe II reste le plus fortement inhibé par le Cd mais il est suivi cette fois par les complexes I, IV et enfin III (Ivanina *et al.*, 2008). Ces derniers résultats semblent en adéquation avec les observations effectuées au cours de la présente étude puisque le gène *nd5* (complexe I) est assez légèrement réprimé (FI = 0,6) alors que l'expression du gène *coxI* (cytochrome c oxydase sous-unité I du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale) n'est pas modulée significativement par le Cd. Selon l'étude de Wang *et al.* (2004), le complexe III serait le principal site de formation d'ERO induites par le Cd, mais le complexe I est également un site potentiel de génération d'un stress oxydant. La répression du gène *nd5* observée au cours des présents travaux pourrait donc traduire la présence d'un stress oxydant chez les larves issues du traitement Cd-0,3X. Il est maintenant largement reconnu que la production d'ERO par les métaux a de nombreuses conséquences cellulaires incluant l'altération de l'ADN (cassures ADN, adduits, oxydation des bases, mutations...), l'induction de la peroxydation lipidique, la perturbation de l'homéostasie de certains oligo-éléments essentiels dont le Ca<sup>2+</sup>, la modification des fonctions membranaires et enfin, l'activation des mécanismes d'entrée en apoptose des cellules (Bertin & Averbek, 2006 ; Valko *et al.*, 2005).

#### 4.6.8. Activation de la voie Wnt-1

La plus forte concentration en Cd a engendré, chez les larves de Medaka, une surexpression du gène *wnt1*. La voie de signalisation Wnt est très fortement impliquée lors de l'embryogénèse et la morphogénèse par son rôle dans les processus de différenciation et de prolifération cellulaire ainsi que lors de l'adressage des cellules (L'Allemain, 2006). L'induction de la voie Wnt-1 active des voies de survie cellulaire en inhibant l'activation de *p53* et en forçant la surexpression du gène anti-apoptotique *bcl-2* et *bcl-xL* ce qui a pour effet d'empêcher l'entrée en apoptose des cellules via *bax* (Zeilstra *et al.*, 2011 ; Venkatesan *et al.*, 2010). A l'inverse l'inhibition de la voie de signalétique Wnt-1 induit la mort cellulaire par apoptose (You *et al.*, 2004). Comme résultat de ces propriétés, le gène *wnt1* est fréquemment surexprimé chez de nombreuses cellules cancéreuses qui deviennent alors résistantes à l'apoptose (L'Allemain, 2006). Une étude récente rapporte les effets d'une exposition chronique au Cd sur l'expression des gènes de la famille Wnt dans les reins de souris (Chakraborty *et al.*, 2010). Les auteurs observent une induction de la grande majorité des gènes Wnt par le Cd (y compris *wnt1*) ainsi que de leur récepteur *Frizzled (fz)*. Par ailleurs, ils mettent également en évidence une activation des gènes cibles de la voie Wnt canonique ( $\beta$ -caténine dépendante), *c-Myc*, *cyclin D1* et *Abcb1b*. Ces gènes, impliqués notamment dans la prolifération cellulaire et les voies de survie cellulaire (anti-apoptotique), sont également des proto-oncogènes en cas de surexpression aberrante. Ainsi, en activant la voie de signalétique Wnt/ $\beta$ -caténine, le Cd peut induire une prolifération cellulaire et l'activation erratique de voies de survie cellulaire promouvant ainsi la carcinogénèse (Waisberg *et al.*, 2003). De plus, la perturbation de la régulation de la  $\beta$ -caténine, étroitement liée à celle de l'E-cadhérine, au cours du développement peut conduire à des effets tératogènes chez l'embryon (Thevenod, 2009). Certains auteurs suggèrent qu'une partie des malformations du squelette axial induites chez les embryons de *D. rerio* exposés à environ 1 mg/L de Cd pourrait être le résultat d'une perturbation de la voie de signalisation Wnt lors de la somitogénèse (Chow & Cheng, 2003). Simultanément, l'expression des gènes pro-apoptotiques (*bax* et *p53*) ainsi que celle des gènes de réparation de l'ADN (*rad51* et *ogg1*) a tendance à être légèrement induite (FI compris entre 2,1 et 3,5) chez les larves, à la plus forte concentration en Cd. Une répression partielle de l'activation des gènes pro-apoptotiques par le biais de la voie Wnt ainsi que le pouvoir inhibiteur du Cd sur les mécanismes de réparation de l'ADN, pourrait expliquer que l'induction de ces gènes ne soit pas suffisante pour être statistiquement significative. Cependant, cette tendance à la surexpression de ces gènes vient confirmer les effets génotoxiques du Cd que nous avons mis en évidence à l'aide du test comète lors de la première série d'expositions.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette exposition à enjeux « biomoléculaires » a permis de révéler une nouvelle fois les effets tératogènes et génotoxiques au sens large du Cd. Les voies d'action de ce composé semblent extrêmement complexes, alliant inhibition et activation de nombreux mécanismes clé du métabolisme et de la régulation du cycle cellulaire. Il a été rapporté que les effets du Cd sur l'expression de nombreux gènes reposaient sur la génération d'un stress oxydant et de la perturbation homéostatique d'oligo-éléments essentiels comme le  $\text{Ca}^{2+}$  (Joseph, 2009). Au vu des différents points discutés ici, il semblerait que ces deux mécanismes soient à l'origine d'une grande partie des effets du Cd observé dans la présente étude. La [Figure 3.24](#) offre une vue globale des effets en chaîne du Cd en tentant de relier réponses moléculaires et tératogènes mises en évidence au cours de ce travail, complétée par les différentes études de la littérature à ce sujet évoquées dans ce chapitre.



**Figure 3.24. Schéma global des mécanismes supposés de toxicité mis en évidence au cours de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par le Cd**

Ce schéma s'appuie sur les résultats de la présente étude et des différents travaux cités dans ce chapitre. Les flèches vertes symbolisent un effet inducteur et les traits rouges un effet inhibiteur. Les noms des gènes dont l'expression a été modulée (induction en vert, inhibition en rouge) au cours des présents travaux sont rapportés sur la figure. Les cadres bleus symbolisent des mécanismes supposés. Les cadres orange symbolisent des mécanismes dont l'implication dans les modes d'action du Cd est suggérée par les résultats des présents travaux. Les cadres violets symbolisent des effets toxiques phénotypiques mis en évidence au cours des présents travaux.

---

*Chapitre 4. ANALYSE DES EFFETS  
TOXIQUES DU PYRENE ET DU  
METHYLPYRENE SUR LE  
DEVELOPPEMENT DU MEDAKA  
JAPONAIS*

---



## Chapitre 4. Analyse des effets toxiques du Pyrène et du Méthylpyrène sur le développement du Medaka japonais

Le continuum Lot-Garonne-Gironde est notamment connu pour sa contamination en éléments métalliques stockés dans le compartiment sédimentaire. Cependant, le caractère ubiquitaire des HAP dans l'environnement ainsi que leur présence problématique au sein du Bassin d'Arcachon rendent incontournable l'étude d'au moins un représentant de cette famille de composés dans le cadre du projet Aquitox.

Le pyrène (Pyr) s'est avéré être l'un des trois HAP les plus abondants dans les sédiments du Bassin d'Arcachon (Chodjaï, 2008) et de l'estuaire de la Gironde (Budzinski *et al.*, 1997). Malgré son appartenance à la liste des substances prioritaires de l'US-EPA, la toxicité du Pyr envers les organismes aquatiques reste peu documentée (INERIS, 2005b). Par ailleurs, la présence de HAP alkylés a été démontrée dans les sédiments du Bassin d'Arcachon les plus fortement contaminés en HAP. Les dérivés monoalkylés peuvent présenter une distribution relative quasiment équivalente à leur HAP parent (Crespo, 2009). Nous avons donc choisi un représentant de cette classe de composé, le 1-méthylpyrène (MePyr), pour lequel, encore une fois, très peu de données écotoxicologiques sont disponibles.

Dans ce chapitre, le test MELA a cette fois-ci été appliqué dans un contexte exploratoire afin de caractériser la toxicité induite par le Pyr et le MePyr, dont les effets toxiques ne sont pas encore bien caractérisés chez les organismes aquatiques. Une première série d'expositions utilisant des marqueurs phénotypiques de toxicité fut entreprise pour valider les concentrations choisies. Puis, comme développé précédemment pour le Cd, le bioessai sera complété par une approche biomoléculaire *via* l'application de la RT-PCR afin d'étudier plus précisément les mécanismes d'action de ce type de contaminants et les réponses biologiques adaptatives ou toxiques induites chez les organismes. Avant de présenter les réponses toxiques induites par ces deux composés chez les embryons et larves de Medaka japonais, la première partie de ce chapitre sera consacrée à une synthèse générale des effets toxiques des HAP chez les organismes aquatiques, en insistant lorsque les connaissances actuelles le permettent, sur les impacts rapportés chez les SPD poissons.

### 1. GENERALITES SUR LA TOXICITE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES CHEZ LES ORGANISMES AQUATIQUES

---

#### 1.1. Transfert des HAP aux organismes aquatiques

##### 1.1.1. Absorption et bioaccumulation des HAP

Le caractère hydrophobe des HAP leur permet de traverser les membranes biologiques relativement aisément et leur confère une forte affinité pour les tissus lipidiques dans lesquels ils auront tendance à s'accumuler. Les organismes aquatiques, parmi lesquels les poissons, peuvent être

exposés aux HAP directement par la phase aqueuse, les matières en suspension et les sédiments contaminés ou par la voie trophique. Cette dernière voie ne sera pas détaillée ici car ne concerne pas directement la problématique étudiée.

De manière générale, l'absorption et la bioaccumulation des HAP chez les organismes aquatiques sont fortement liées au degré d'hydrophobicité ( $K_{ow}$ ) du composé. En effet, la voie de contamination des HAP faiblement hydrophobes ( $\log K_{ow} < 5$ ) par la phase dissoute (colonne d'eau ou eau interstitielle) est très importante notamment au niveau des branchies ou par transfert transcutané. Les particules de sédiment peuvent représenter quant à elles un vecteur de contamination important (par ingestion ou contact direct) dans le cas des composés aromatiques fortement lipophiles ( $\log K_{ow} > 5$ , Belfroid *et al.*, 1996). L'absorption des contaminants hydrophobes se fait par diffusion passive au travers des membranes semi-perméables de l'organisme. Ce processus peut avoir lieu au niveau de n'importe quelle membrane biologique à partir du moment où il existe un gradient de concentration de part et d'autre de la membrane et ne nécessite aucun apport énergétique (Belfroid *et al.*, 1996). Ce mécanisme intervient quelle que soit la voie de contamination et reste valable chez les SPD poisson (Helmstetter & Alden, 1995a). Les HAP sont rapidement absorbés depuis le milieu extérieur et atteignent un état d'équilibre stationnaire dans une période de temps relativement courte (de l'ordre de quelques jours), positivement corrélée à la valeur du  $K_{ow}$  du composé (Mathew *et al.*, 2008 ; Petersen & Kristensen, 1998).

Les facteurs de bioconcentration (BCF) rapportés dans la littérature chez différentes espèces de poissons sont généralement largement supérieurs à 1 (compris entre moins de 10 pour le pérylène et plus de 8 000 pour le benzo[k]fluoranthène par exemple, voir Crespo, 2009 pour revue). Il existe donc une absorption importante des HAP depuis la phase dissoute qui résulte en des concentrations en composés organiques plus élevées au sein de ces organismes que dans la colonne d'eau.

Lorsque l'organisme est exposé à des sédiments ou des matières en suspension chargées en HAP, les phénomènes de sorption/désorption des HAP depuis les particules sédimentaires seront des facteurs limitants pour la biodisponibilité et donc la bioaccumulation de ces composés en contrôlant leur concentration dans l'eau interstitielle (Belfroid *et al.*, 1996). L'ingestion de ces particules peut également représenter une voie de contamination supplémentaire même si les HAP semblent difficilement extractibles par les fluides biologiques (Dupree & Ahrens, 2007). De plus, alors que la plupart des modèles développés considèrent que la phase dissoute est l'unique voie de contamination des organismes en présence de sédiments contaminés, certaines études semblent mettre en évidence que le transfert des HAP et leur toxicité subséquente chez les embryons pourraient se faire par contact direct des individus avec les particules chargées en HAP (Kocan *et al.*, 1996). Il apparaît que l'absorption et la bioaccumulation de ces substances par les organismes aquatiques soient le résultat d'interactions complexes entre le compartiment sédimentaire, le milieu aqueux et l'organisme lui-même.

Le caractère hydrophobe et le poids moléculaire (encombrement stérique) du HAP conditionnent fortement son potentiel de bioconcentration et de bioaccumulation. En effet, les HAP de haut poids moléculaire présentent un taux d'absorption réduit par rapport aux composés plus légers chez le poisson zèbre *D. rerio* exposé à des sédiments contaminés avec différents HAP en présence de sédiment (Djomo *et al.*, 1996). Par ailleurs, Van der Oost *et al.* (2003) rapportent des valeurs de BSAF (Biota-sediment accumulation factor) majoritairement inférieures à 1 chez différentes



espèces de poissons exposés à des sédiments contaminés en HAP. La valeur du BSAF peut néanmoins atteindre la valeur de 10 avec certains composés de faible poids moléculaire tels que le phénanthrène.

Comme évoqué dans le *Chapitre 1 (paragraphe 0)*, de nombreux paramètres vont influencer le taux d'absorption des HAP. Selon Belfroid et al. (1996), la teneur en matière organique du milieu serait le facteur le plus influant sur la bioconcentration et la bioaccumulation des HAP par les organismes benthiques.

De plus, les capacités de l'organisme à métaboliser puis excréter les HAP sont autant de facteurs biotiques à prendre en compte lors de l'évaluation de la bioaccumulation des xénobiotiques. En effet, de nombreuses études ont démontré que les mécanismes de métabolisation des HAP pouvaient être efficaces dès les SPD chez le poisson, réduisant ainsi la charge en HAP parent de l'organisme (Honkanen *et al.*, 2008 ; Hornung *et al.*, 2007 ; McElroy *et al.*, 2006 ; Hornung *et al.*, 2004). Cependant, même si les HAP sont métabolisés au cours du développement *in ovo*, ils ne sont effectivement éliminés de l'organisme qu'après éclosion, lorsque le tractus gastro-intestinal devient complètement fonctionnel, après disparition de la membrane proctodéale (soit environ 3 j post-éclosion chez le Medaka japonais, Hornung *et al.*, 2004). Ces résultats semblent indiquer que la cinétique d'accumulation des HAP va évoluer au cours du développement de l'individu.

En effet, chez le poisson zèbre *D. rerio*, le taux d'absorption des HAP est plus élevé chez les larves que chez les embryons, selon l'étude de Petersen *et al.* (1998). Ces résultats suggèrent un taux de transfert des HAP depuis le milieu extérieur vers l'organisme plus restreint au travers du chorion que de l'épithélium branchial des larves. Les auteurs de l'étude proposent plusieurs explications à ce phénomène : (1) une surface de contact exposée à l'environnement externe moins importante chez les embryons que chez les larves ; (2) l'absence de fluide circulant au niveau du chorion alors que la circulation sanguine est soutenue au niveau des branchies des larves ; (3) un transfert transcutané qui peut, chez les organismes de petite taille et notamment les larves, représenter une voie d'absorption importante ; (5) un contenu lipidique près de deux fois plus élevé chez les larves que chez les embryons. Cependant, le taux d'élimination étant également plus réduit *in ovo* en comparaison de la période post-éclosion, les BCF qui en résultent sont comparables pour les deux stades de développement (Petersen & Kristensen, 1998). Le log BCF varie de 2,46 pour le naphthalène à 4,94 pour le B[a]P (pour le Pyr, le log BCF est évalué à 4,03) chez les larves de *D. rerio* selon cette même étude.

De la même manière, la sensibilité accrue des SPD poisson face à la bioaccumulation et la toxicité des HAP par rapport aux individus adultes pourrait s'expliquer par une teneur lipidique plus importante (d'un facteur compris entre 1,2 – 1,8 entre les larves et les juvéniles de *D. rerio*), une réduction du rapport surface/volume des branchies au cours de la croissance, une plus grande importance relative du transfert transcutané chez les individus de petite taille, un taux de métabolisation plus restreint chez les SPD que chez les organismes juvéniles ou adultes ainsi que, sans doute, des systèmes de métabolisation et d'élimination des toxiques moins efficaces chez les SPD (Hellou *et al.*, 2006 ; van der Oost *et al.*, 2003 ; Petersen & Kristensen, 1998).

Par ailleurs, les taux d'absorption, de métabolisation et de dépuración des organismes aquatiques peuvent varier de manière significative entre les espèces (Mathew *et al.*, 2008 ; Petersen

& Kristensen, 1998). Les différences de teneurs lipidiques, de taille de l'organisme et de capacité de métabolisation et d'élimination inter-espèces peuvent expliquer, du moins en partie, ces variations.

De nombreux autres paramètres (température, pH, interactions entre mélange de substances...) peuvent également influencer les processus d'accumulation des HAP par les organismes aquatiques (Muijs & Jonker, 2009).

Par conséquent, l'évaluation de la toxicité des HAP présents dans la phase dissoute ou dans les sédiments par les différents modèles de bioaccumulation ou de bioconcentration est bien souvent confrontée à la diversité et à la complexité des interactions entre composés et compartiments (biotique et abiotique) au sein du milieu naturel. Par exemple, Di Toro et McGrath (2000) proposent d'évaluer la toxicité de mélanges de HAP présents dans les sédiments à l'aide d'unités toxiques calculées pour chaque composé présent puis sommées afin d'évaluer la toxicité potentielle de la mixture environnementale. Pour ce faire, deux hypothèses principales sont supposées : (1) le mode d'action des HAP est le même pour tous et repose sur la narcose (mode d'action général dont les mécanismes biochimiques exactes restent inconnus utilisé pour décrire l'étroite relation entre le  $K_{ow}$ , la cinétique de bioaccumulation et la létalité aiguë des composés organiques. La cible première des substances narcotiques serait la double couche lipidique de la membrane cellulaire) ; (2) les effets toxiques des HAP en mélange sont strictement additifs. Malgré tout l'intérêt de cette démarche, cette simplification des mécanismes d'action des HAP ne représente pas exactement la réalité des effets de ces composés en mélange. En effet, il a été démontré que les HAP pouvaient exercer leur potentiel toxique à travers d'autres mécanismes que le phénomène de narcose et que ces effets n'étaient pas systématiquement additifs (Billiard *et al.*, 2008). Il a également été montré que l'application du modèle narcose pouvait engendrer une sous-estimation importante de la toxicité de mélanges complexes de HAP chez les SPD de saumon rose et de hareng du Pacifique (Barron *et al.*, 2004a). Ainsi, des écarts non négligeables entre les estimations issues de la théorie de partage à l'équilibre et les niveaux de bioaccumulation en HAP réels *in situ* existent, rendant délicate l'application des modèles développés en condition contrôlées de laboratoire à des situations de terrain (Muijs & Jonker, 2009).

En conclusion, la bioaccumulation des HAP chez les organismes aquatiques résultant de cinétiques d'absorption, de métabolisation et d'élimination parfois complexes sont spécifiques à chaque composé et chaque organisme considéré. De plus, le fait que l'élimination des HAP soit généralement très efficace chez les poissons et que la métabolisation de ses substances puissent conduire à la formation de métabolites plus toxiques que le HAP parent (voir *paragraphe 1.1.3* de ce chapitre pour plus de détail) rend délicate l'utilisation de la bioaccumulation comme indicateur d'exposition pour l'évaluation prédictive de la toxicité (van der Oost *et al.*, 2003 ; Varanasi & Stein, 1991).

### 1.1.2. Distribution dans l'organisme

Une fois absorbés dans l'organisme, les HAP se retrouvent très rapidement dans le sang (Kennedy & Law, 1990) qui les achemine vers différents organes où ils pourront être métabolisés. Chez les poissons, les HAP et leurs métabolites sont retrouvés majoritairement dans le système hépato-biliaire et en moindre proportion dans le muscle ou au niveau de la peau. Cependant, de nombreux facteurs comme la présence d'autres contaminants, la vascularisation d'un organe, le niveau basal de certaines d'enzymes de biotransformation ou la teneur lipidique des organes

peuvent modifier la distribution des HAP et de leurs métabolites dans l'organisme. Une fois encore les variations inter-espèces au niveau des différents paramètres physiologiques et biochimiques vont influencer la répartition de ces composés dans l'organisme. De manière générale, quelles que soient l'espèce considérée, la voie et le mode d'exposition étudiés, les HAP et leurs métabolites sont accumulés préférentiellement dans la bile >> le foie > la peau > muscle (Varanasi & Stein, 1991).

Bien que l'absorption et l'accumulation des HAP soient relativement bien décrites chez les SPD poisson, seules quelques rares études renseignent la distribution de ces composés et de leurs métabolites au sein des tissus des larves et embryons exposés. Deux études traitent de la distribution tissulaire de HAP (benzo[a]pyrène, B[a]P et fluoranthène) le Medaka japonais *O. latipes* (Hornung *et al.*, 2007 ; Hornung *et al.*, 2004). Les principaux résultats de ces travaux sont synthétisés ici.

Les embryons de Medaka juste fécondés sont exposés à 1 µg/L de B[a]P ou de fluoranthène durant 6h. La distribution tissulaire des HAP et de leurs métabolites est ensuite suivie par microscopie à multi-photons laser jusqu'au jour suivant l'éclosion. Pour le B[a]P, une analyse des métabolites par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS) a également été entreprise.

Dans les premières heures suivant l'exposition, les HAP (composés parents) sont majoritairement accumulés dans les gouttelettes lipidiques du vitellus. Au jour 1 pf, les gouttelettes lipidiques sont toujours le site principal d'accumulation des HAP mais une présence modérée de ces composés est également observée au niveau du corps embryonnaire et du vitellus. L'accumulation au niveau des réserves vitellines semble être dûe à la présence de métabolites (B[a]P-sulfates et/ou – glucuronides) plutôt que du composé parent et est particulièrement marquée au niveau de la couche syncytiale. Le jour suivant, la quantité de B[a]P accumulé dans les gouttelettes lipidiques est moins importante et rejoint le niveau observé dans le vitellus. La présence de métabolites conjugués est toujours uniquement notable dans ce dernier. Entre le jour 2 et 3 pf, les prémices du foie se développent et le cœur devient de plus en plus fonctionnel avec la différenciation des chambres cardiaques. Entre le jour 3 et 5 pf, les HAP parents disparaissent progressivement des gouttelettes lipidiques jusqu'à disparaître complètement. Parallèlement, la concentration en B[a]P et de ses métabolites augmente dans le vitellus, suggérant ainsi que la disparition du HAP parent des gouttelettes lipidiques est le résultat de sa métabolisation. Par ailleurs, le fluoranthène, le B[a]P et ses métabolites sont également fortement concentrés au niveau de la vésicule biliaire et du système hépatobiliaire au cours de cette même période. Par contre, aucune teneur significative en B[a]P ou en métabolites n'est retrouvée dans les vaisseaux du sac vitellin. La distribution tissulaire reste alors globalement inchangée jusqu'à l'éclosion. Peu avant l'éclosion, des traces de HAP peuvent être observées au niveau de l'intestin. Chez les larves nouvellement écloses, les HAP et leurs métabolites sont largement présents au niveau du vitellus, du foie et de la vésicule biliaire ainsi que plus modérément dans la portion antérieure de l'intestin. Au cours du temps, le B[a]P et ses métabolites se déplacent tout au long du tractus intestinal puis sont progressivement excrétés par les larves, ce qui engendre une diminution graduelle de la teneur totale en HAP et métabolites au sein de l'organisme. Quatre jours après éclosion, des traces résiduelles de HAP peuvent être observées au niveau de la vésicule biliaire ou de la partie postérieure de l'intestin.

L'ensemble de ces résultats démontre que les nombreux changements physiologiques et biochimiques intervenant au cours du développement embryonnaire influencent de manière très dynamique la distribution des HAP et de leurs métabolites dans l'organisme.

Par ailleurs, Incardona *et al.* (2006) ont démontré que la distribution en benzo[a]anthracène pouvait se faire passivement chez les embryons de *D. rerio* alors que le Pyr et le chrysène nécessitent que la circulation sanguine soit fonctionnelle pour être distribués dans les organes internes. Ces observations semblent indiquer que la cinétique d'accumulation en HAP et la distribution tissulaire qui en résulte sont liées aux propriétés physico-chimiques du composé étudié et au stade de développement des individus exposés, pour une espèce donnée.

### 1.1.3. Les mécanismes de métabolisation (biotransformation)

A l'opposé d'autres POP (polluants organiques persistants) comme les PCB (polychlorobiphényles) qui s'avèrent très faiblement métabolisables chez les poissons, les HAP peuvent être biotransformés par de nombreux organismes aquatiques, et notamment de manière très efficace par le système hépatique des poissons (van der Oost *et al.*, 2003).

L'objectif théorique de la métabolisation des HAP est la conversion du composé parent en un ou plusieurs métabolites plus solubles dans l'eau, favorisant ainsi leur excrétion. Les voies de biotransformation peuvent être multiples pour un même composé même s'il existe généralement une voie majoritaire de métabolisation. Par ailleurs, il est possible qu'une voie réactionnelle classiquement mineure devienne prépondérante dans le cas d'un dysfonctionnement ou d'une inhibition de la voie principale de biotransformation (Botta, 2001).

La première étape de la métabolisation (Phase I), commune à toutes les voies de biotransformation, est la fonctionnalisation par oxydation de la molécule HAP. La phase II consiste en une réaction de conjugaison visant à transférer un groupement hydrophile sur le métabolite intermédiaire afin de favoriser son élimination.

Comme c'est le cas de nombreux xénobiotiques, les réactions de phase I de la métabolisation des HAP sont catalysées par des enzymes du système MFO (Mixed function oxydase) dont la principale est le cytochrome P4501A (CYP1A). Cette réaction produit un premier métabolite époxyde hautement réactif mais qui est rapidement hydrolysé par l'époxyde hydrolase (EH) afin de générer un HAP-diol inactif. Si, le CYP1A est produit en excès, il peut à nouveau oxyder le métabolite sur un autre site non-fonctionnalisé pour former un diol-époxyde. Les réactions de biotransformation catalysées par CYP1A peuvent, dans certains cas, engendrer la formation d'ERO (Morel *et al.*, 1999). Le métabolite diol-époxyde est très réactif, électrophile, mutagène et cancérigène. Certains de ces produits de biotransformation peuvent néanmoins être hydrolysés par l'EH générant ainsi des tétrols qui pourront être éliminés. La voie de métabolisation des diol-époxydes est considérée comme majoritaire dans la biotransformation des HAP tels que le B[a]P (Shimada, 2006). Cependant, il existe d'autres voies de métabolisation pour les HAP de faible poids moléculaire.

Pour certains HAP comme le Pyr et le MePyr, les molécules ne présentent pas de région baie par manque d'un cycle benzénique terminal et ne peuvent donc pas être transformés en dihydrodiol-époxyde vicinal (Glatt *et al.*, 2008). Les principaux métabolites alors formés sous l'action du CYP1A sont des hydroxy-HAP. Ces métabolites peuvent se transformer en quinones puis être réduits en hydro-quinones par la quinone réductase (QR).

Une voie alternative à celle impliquant CYP1A peut également intervenir dans la métabolisation des HAP. En effet, le HAP parent peut être converti en cation radicalaire par une oxydation, catalysée par la cytochrome peroxydase. L'espèce radicalaire est très réactive notamment

vis-à-vis de l'ADN avec lequel elle pourra générer des adduits instables. Cependant, le mécanisme exact de cette voie reste mal connu et son implication dans la cancérogénèse induite par les HAP reste à démontrer *in vivo* (Shimada, 2006).

Enfin, les diols formés par la voie CYP1A peuvent être convertis en quinones par des aldo-céto réductases ou AKR (dihydrodiol déshydrogénases). Ces produits de biotransformation sont très réactifs et peuvent former des adduits stables et dépurinants au niveau de l'ADN. Durant ce cycle redox des quinones, des ERO peuvent également être formées (Baulig *et al.*, 2003).

La phase II de la métabolisation consiste en une réaction de conjugaison du métabolite intermédiaire issu de la phase I avec un groupement hydrophile polaire afin de faciliter l'excrétion de la substance. Ces réactions sont principalement catalysées par des transférases telles que l'UDP-glucosyltransférase (UGT), la GST, ou la sulfotransférase (SULT) (Honkanen *et al.*, 2008 ; Kleinow *et al.*, 1998).

Le B[a]P est le HAP modèle le plus fréquemment étudié lors des travaux visant à décrire les processus de métabolisation des HAP dont les voies sont illustrées sur la [Figure 4.1](#).

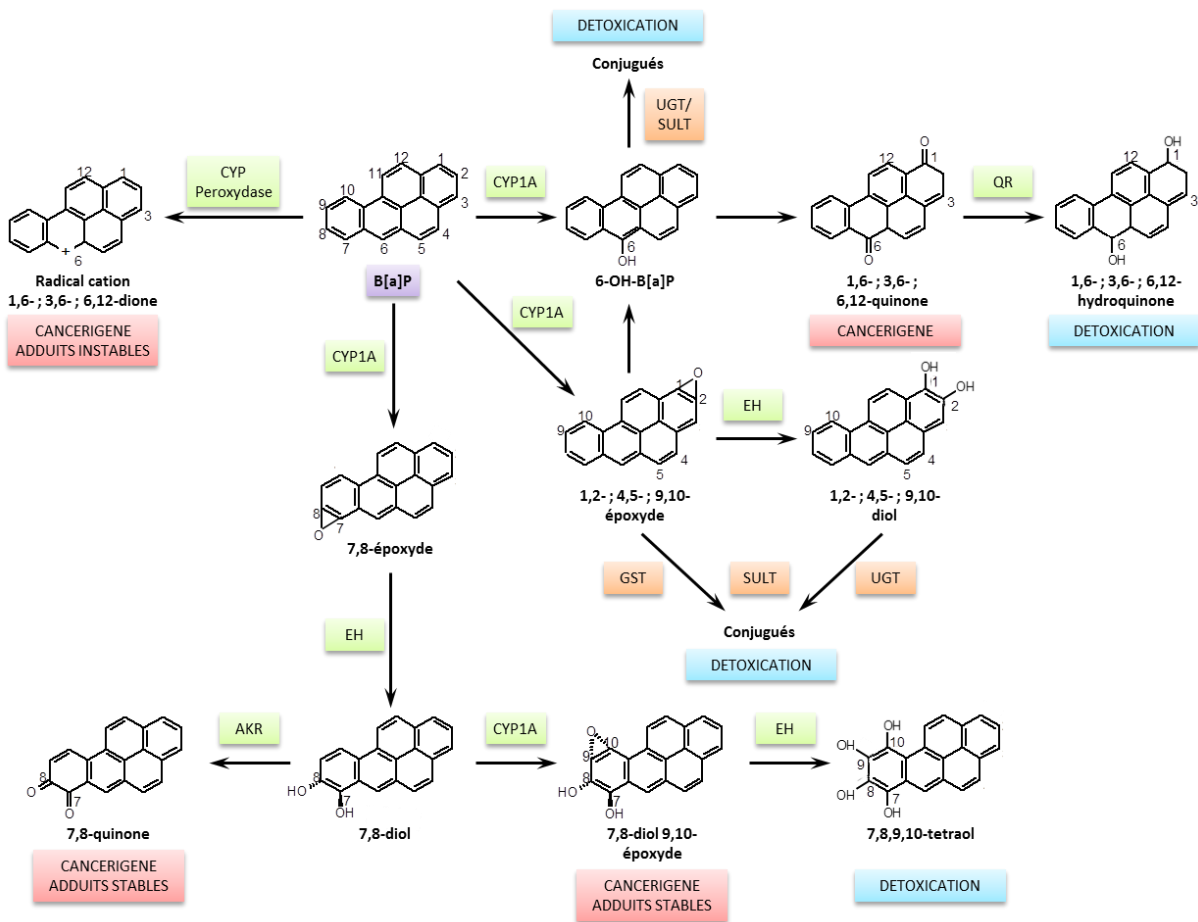
Chez les poissons, le foie est le site principal pour les phases I et II de biotransformation des HAP. Les métabolites sont par la suite stockés dans la vésicule biliaire avant d'être excrétés par le tractus digestif ou les urines chez les adultes et les SPD (Beyer *et al.*, 2010 ; Hornung *et al.*, 2007).

Chez les embryons de Medaka exposés au B[a]P durant leur développement, le 3-OH B[a]P fut le seul métabolite hydroxylé détecté et uniquement après 3 j d'exposition (Hornung *et al.*, 2007). Les B[a]P-9,10-diol et -7,8-diol furent principalement retrouvés chez les embryons en tout début d'exposition. Les métabolites 1,6-dione et 3,6-dione du HAP ont été mis en évidence tout au long de la période d'exposition de 7 j. Ces résultats indiquent que les mécanismes de métabolisation des HAP sont présents et efficaces dès les premiers stades de développement du Medaka japonais.

Les travaux de Honkanen *et al.* (2008) ont mis en évidence l'activation des mécanismes de biotransformation de phase I et II chez les larves de saumon exposées au Pyr en produisant majoritairement des métabolites sulfoconjugués. Ces produits de transformation ainsi que le HAP parent tendent à s'accumuler chez les larves au cours du temps. Inversement, une faible quantité de 1-OH-Pyr est produite et reste stable au long de l'expérience. La présence de Pyr-1-glucoronide n'est pas détectée chez les individus exposés.

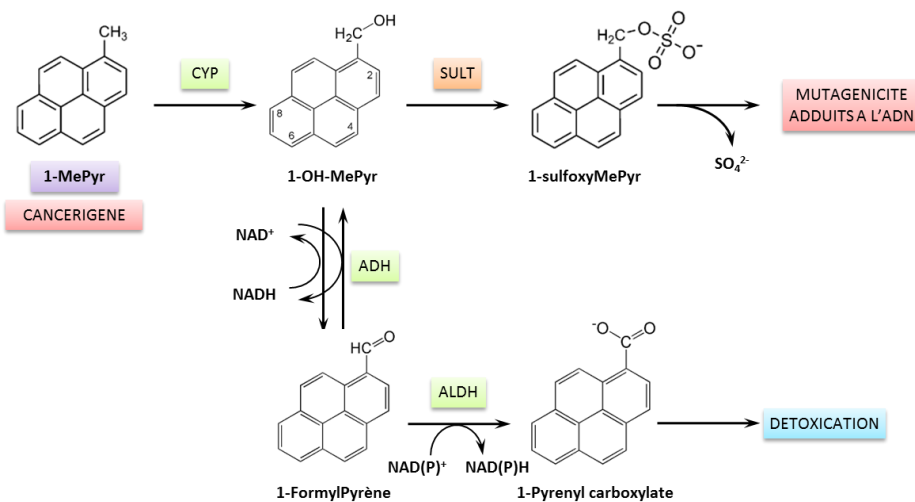
À notre connaissance, il n'existe pas d'étude portant sur la métabolisation du MePyr chez les poissons. Chez le rat, le MePyr est métabolisé en 1-OH-MePyr par les enzymes du système MFO puis conjugué par l'enzyme SULT. Le métabolite sulfoconjugué est identifié comme pouvant induire des adduits à l'ADN (Monien *et al.*, 2009) et comme étant encore plus mutagène que le HAP parent (Glatt *et al.*, 1993). Le 1-OH-MePyr est considéré comme le principal métabolite produit par la métabolisation du MePyr. Une voie de détoxification de ce métabolite *in vitro* impliquerait une première transformation par les alcools déshydrogénases (ADH) suivie d'une nouvelle réaction conduisant à la formation de 1-Pyrenyl carboxylate catalysée par les aldéhydes déshydrogénases (ALDH) selon les travaux de Glatt *et al.* (2008). Une schématisation de ces mécanismes est proposée sur la [Figure 4.2](#).

Le système enzymatique des poissons est donc suffisamment développé pour permettre la biotransformation des HAP en général selon des voies métaboliques variées. Cependant, la toxicité



**Figure 4.1. Métabolisation du B[a]P**

Schéma adapté de Kleinow et al. (1998) et Shimada (2006). CYP Peroxydase : cytochrome peroxydase ; CYP1A : cytochrome P450 1A ; EH : époxyde hydrolase ; QR : quinone réductase ; AKR : aldo-céto réductase ; GST : glutathion S-transférase ; SULT : sulfotransférase ; UGT : UDP-gluconyltransférase.



**Figure 4.2. Métabolisation du MePyr**

Schéma adapté de Glatt et al. (2008) et Monien et al. (2009). CYP : cytochrome P450 ; SULT : sulfotransférase ; ADH : Alcool déshydrogénase ; ALDH : aldéhyde déshydrogénase.

de certains HAP est parfois potentialisée par ces biotransformations qui peuvent produire des métabolites plus toxiques que le composé parent, comme c'est le cas du B[a]P (Varanasi *et al.*, 1987). On parle alors de bioactivation du composé. La voie des diols époxydes est considérée comme l'une des voies principales de génération de métabolites de HAP cancérigènes (Glatt *et al.*, 2008).

## 1.2. Effets toxiques des HAP chez les organismes aquatiques

Historiquement, les HAP tels que le B[a]P ont été particulièrement étudiés en raison de leur potentiel carcinogène. Depuis quelques années, les recherches s'orientent de plus en plus sur les effets de ces polluants ubiquitaires sur le développement notamment chez les poissons. Cette famille de composés comprend un grand nombre de représentants dont les structures chimiques peuvent être très variables. Par conséquent, le spectre de toxicité de cette classe de composés est large, faisant intervenir de nombreux mécanismes et cibles cellulaires.

La toxicité aiguë des HAP chez les poissons est généralement attribuée à des effets narcotiques sévères, ce qui a entraîné le développement de modèles prédictifs basés sur cette notion (Di Toro & McGrath, 2000 ; Di Toro *et al.*, 2000). Cependant, le phénomène de narcose est caractérisé par la réversibilité des effets qu'il induit, ce qui ne correspond pas à certains effets sublétaux persistants rapportés chez les embryons de poisson exposés à divers HAP (Barron *et al.*, 2004a ; Incardona *et al.*, 2004 ; White *et al.*, 1999). De plus, l'application du modèle développé par Di Toro *et al.* (2000) à la prédiction de la toxicité d'un mélange complexe ne s'est pas avérée très performante, en sous-estimant de manière non-négligeable la toxicité des HAP chez les SPD de harreng et de saumon (Barron *et al.*, 2004a). Certains HAP, notamment de haut poids moléculaire, provoquent l'apparition de différents symptômes sublétaux rappelant étrangement ceux observés à la suite d'une contamination en dioxines, suggérant un mécanisme d'action similaire (Incardona *et al.*, 2004 ; Brinkworth *et al.*, 2003). Parmi ceux-ci, les plus fréquemment rapportés sont : l'induction de l'activité du CYP1A, les œdèmes péritellins, les hémorragies, les malformations cranio-faciales et squelettiques et une réduction de la croissance (Incardona *et al.*, 2004 ; Brinkworth *et al.*, 2003 ; Billiard *et al.*, 1999).

D'autres modèles prédictifs basés sur la démarche TEF (toxic equivalent factor) sont alors appliqués pour prédire de la toxicité des HAP. Le concept des TEF a initialement été développé pour l'évaluation du risque engendré par la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo *p*-dioxine (TCDD) ou les composés dioxine-like (Safe, 1993). La méthode consiste à attribuer aux composés ayant le même mécanisme d'action un facteur de toxicité relatif à une substance modèle, comme le B[a]P ou la TCDD. Il est ensuite possible d'évaluer la toxicité d'un mélange de composé en calculant la valeur TEQ (toxic equivalent) de la mixture selon l'équation suivante :

$$TEQ = \sum_i TEF_i \times C_i \quad \text{Équation 1}$$

Dans cette équation,  $TEF_i$  représente le TEF du composé  $i$  présent dans le mélange et  $C_i$  la concentration dosée pour ce composé. L'un des principaux problèmes rencontrés avec ce modèle est qu'il est basé, comme l'illustre l'équation 1, sur une additivité stricte des effets des HAP en mélange et une toxicité induite par la voie AhR (Aryl hydrocarbon receptor ; Safe, 1993). Or il s'avère que ces deux critères ne sont pas respectés pour l'ensemble des composés HAP, et rarement dans le cas de mélanges (Billiard *et al.*, 2008).

L'ensemble de ces observations semblent confirmer que les HAP peuvent exercer leur toxicité par l'intermédiaire de mécanismes multiples et variés. Ceci rend délicate l'évaluation de leur potentiel toxique en ne prenant en compte qu'une seule voie métabolique, particulièrement dans le cas d'une expertise environnementale où ces composés sont présents sous forme de mélanges complexes.

Dans cette partie, nous proposerons dans un premier temps un aperçu global des effets embryotoxiques et tératogènes rapportés à la suite d'expositions aux HAP. Par la suite, nous évoquerons les différents mécanismes d'action pouvant expliquer ces réponses toxiques chez les SPD de poisson. Nous aborderons notamment le mécanisme de narcose et la voie de toxicité AhR-dépendante. Comme le système cardiovasculaire un des organes cibles des HAP chez les SPD poisson (Billiard *et al.*, 2008 ; Incardona *et al.*, 2006 ; Wassenberg *et al.*, 2005 ; Incardona *et al.*, 2004), nous discuterons également de la cardiotoxicité induite par ces substances. Enfin nous examinerons le potentiel génotoxique et cancérigène de cette classe de composés.

### 1.2.1. Embryotoxicité & tératogénicité des HAP

#### 1.2.1.1. Toxicité aiguë

Le pouvoir embryotoxique des HAP chez les poissons, seuls ou en mélange, est aujourd'hui bien établie (Billiard *et al.*, 2008).

Parmi les premiers travaux explorant les effets d'une contamination accidentelle en HAP, les études publiées par Carls *et al.* (1999) et Heintz *et al.* (1999) s'avèrent relativement complètes et pertinentes d'un point de vue environnemental. En effet, ces auteurs proposent une exploration des effets engendrés par la fraction dissoute des HAP provenant de l'Exon Valdez, pétrolier américain qui s'échoua en 1989 dans la baie du Prince William en Alaska provoquant le déversement de plus de 40 000 t de pétrole brut. Les effets toxiques engendrés par cette pollution ont été étudiés chez les SPD de deux espèces autochtones sensibles : le saumon rose *Oncorhynchus gorbuscha* et le hareng du Pacifique *Clupea pallasii*. Chez ces deux espèces, une augmentation de la mortalité est observée dès des concentrations en HAP totaux de 0,7 µg/L et 1 µg/L respectivement, démontrant ainsi que la toxicité aiguë des HAP peut se manifester à des concentrations environnementales de l'ordre du ppb. Selon les auteurs de ces deux études, les effets létaux observés chez les SPD de saumon et de hareng sont principalement liés à la présence de HAP lourds et alkylés.

La relation entre l'intensité des effets toxiques et le degré d'aromaticité de la molécule semble également corroborée par l'analyse de la toxicité d'un extrait organique (ne contenant pas seulement des HAP mais aussi d'autres composés aromatiques comme des PCB) issu de sédiments contaminés chez les SPD de la truite *O. mykiss* (Sundberg *et al.*, 2005). En effet, le fractionnement de l'extrait organique en fonction du degré d'aromaticité des composants a mis en évidence que les sous-fractions les plus tératogènes sont celles contenant majoritairement des composés à 3-4 cycles et 4-5 cycles.

Chez les embryons de turbot *Psetta maxima*, les CL50 rapportées respectivement pour le Pyr, le fluoranthène, le phénanthrène et le naphthalène sont de 5,2 µg/L, 12,3 µg/L, 52,2 µg/L et 142 µg/L (Mhadhbi *et al.*, 2010). Ces résultats confirment l'existence d'une corrélation positive entre la toxicité aiguë des HAP et le nombre de cycles présents chez la molécule étudiée (Black *et al.*, 1983). Selon le même principe, les HAP alkylés, plus lourds et hydrophobes, induisent des effets toxiques à des concentrations plus faibles que leur composé parent chez les SPD poisson. Par ailleurs,



l'augmentation du degré de substitution induit également un accroissement des effets toxiques observés (Turcotte *et al.*, 2011). Cependant, l'exposition d'embryons de Medaka à des sédiments dopés en HAP présentant un nombre de cycle variable n'a pas mis en évidence de lien évident entre le poids moléculaire et les effets toxiques induits par ces composés (Vicquelin, 2011). Ces observations semblent indiquer que cette relation n'est pas toujours aussi évidente lorsque la voie de contamination est plus complexe, comme c'est le cas en présence d'une matrice sédimentaire contaminée.

Par ailleurs, l'étude de Sundberg *et al.* (2005), au cours de laquelle des embryons de truite sont exposés à différentes fractions aromatiques provenant d'un extrait de sédiment contaminé, a montré une toxicité plus importante de la fraction contenant les composés polyaromatiques (3 cycles et plus) que de l'extrait total de sédiment. Ces résultats suggèrent que les mélanges environnementaux de polluants organiques contiennent à la fois des composés fortement toxiques mais également des substances antagonistes qui inhibent partiellement certaines réponses toxiques telles que l'induction d'activité enzymatique et l'apparition de malformations du développement (Sundberg *et al.*, 2005). En conséquence, les auteurs soulignent que les effets des composés aromatiques ne sont pas additifs en mélange et que d'autres facteurs, en plus du degré d'aromaticité, peuvent influencer la toxicité d'une mixture environnementale comme par exemple la présence de composés substitués.

Il a également été démontré que des paramètres environnementaux indépendants de la nature et de l'intensité de la contamination pouvaient affecter les réponses toxiques observées. Par exemple, Mhadhbi *et al.* (2010) mettent en évidence une toxicité accrue du Pyr et du fluoranthène en présence de lumière chez les SPD de turbot. A l'inverse, aucun effet d'une éventuelle photo-activation du phénanthrène et du naphthalène n'est remarqué au cours de cette étude. Une photo-activation du pétrole brut provenant de l'Alaska North Slope a cependant été rapportée, en présence ou non de surfactant, chez les SPD du hareng du Pacifique (Barron *et al.*, 2003).

#### 1.2.1.2. Effets tératogènes et embryotoxiques

L'altération du développement est fréquemment rapportée dans la littérature chez les stades embryonnaires et larvaires de poisson après exposition à des HAP.

De nombreuses études rapportent une réduction du succès d'éclosion et de la durée du développement embryonnaire après exposition à des HAP (Mhadhbi *et al.*, 2010 ; Hendon *et al.*, 2008 ; Rhodes *et al.*, 2005). L'inhibition du taux d'éclosion peut atteindre 70 % dans le cas de mélanges tertiaires de HAP parents ou diméthylés (Rhodes *et al.*, 2005). Inversement, certains HAP tels que le fluoranthène peuvent engendrer un retard d'éclosion chez les embryons de Medaka exposés à des sédiments dopés (Vicquelin, 2011). Farwell *et al.* (2006) ne rapportent aucune altération du taux d'éclosion ni de la durée du développement chez des embryons de Medaka exposés à un mélange de HAP. Cependant, ces auteurs notent que la mortalité tardive induite à la plus forte concentration est souvent associée à des éclosions incomplètes au cours desquelles seule la tête ou la queue sont hors du chorion. Ces observations semblent en accord avec l'hypothèse proposée par Rhodes *et al.* (2005) selon laquelle la réduction du succès d'éclosion serait le résultat d'une perturbation du métabolisme énergétique par les HAP bioactifs. Cette explication pourrait également être cohérente avec la réduction de la taille (et parfois du poids) des larves rapportée par ces mêmes études (Farwell *et al.*, 2006 ; Rhodes *et al.*, 2005 ; Billiard *et al.*, 1999). Chez les larves de

truite exposées au rétène, la réduction de la taille des individus exposés est également associée à une utilisation réduite des réserves vitellines (Billiard *et al.*, 1999). Pour ces auteurs, un dysfonctionnement cardio-vasculaire pourrait être à l'origine d'une mauvaise absorption des réserves vitellines chez les embryons, résultant en une réduction de la croissance et de l'utilisation du vitellus. Sunberg *et al.* (2005) mettent en évidence une disparité des effets induits par les HAP chez les SPD de la truite. En effet, selon la sous-fraction organique issue de l'extrait de sédiment, les auteurs observent une réduction ou une augmentation de la taille des larves, sans relation dose-dépendante évidente. Ces résultats montrent une nouvelle fois toute la complexité des mécanismes de toxicité des HAP, engendrant des réponses antagonistes en fonction de la composition des mélanges.

L'exposition des SPD poisson aux HAP peut engendrer l'apparition de malformations. En effet, certains composés comme, par exemple, le phénanthrène, le diméthylphénanthrène et le rétène, peuvent causer des effets tératogènes chez 100 % des larves de truite et de Madaka japonais exposées (Turcotte *et al.*, 2011 ; Brinkworth *et al.*, 2003).

Le plus souvent, le pouvoir tératogène des HAP se manifeste par des altérations cranio-faciales, cardio-vasculaires et du squelette axial (Mhadhbi *et al.*, 2010 ; Hendon *et al.*, 2008 ; Wassenberg *et al.*, 2005 ; Incardona *et al.*, 2004 ; Billiard *et al.*, 1999). Certains effets comme l'apparition d'œdèmes péricardiques et périvitellins, d'hémorragies, de malformations de la mâchoire inférieure et de la colonne vertébrale (scoliose ; lordose), de perturbations de la fonction cardiaque (Incardona *et al.*, 2006 ; Incardona *et al.*, 2004 ; Brinkworth *et al.*, 2003 ; Billiard *et al.*, 1999) rappellent les symptômes observés après exposition d'embryons à la TCDD (Antkiewicz *et al.*, 2005 ; Incardona *et al.*, 2004 ; Brinkworth *et al.*, 2003 ; Hornung *et al.*, 1999 ; Kim & Cooper, 1999), baptisés maladie du sac bleu ou BSD (blue sac disease).

La plupart des effets tératogènes évoqués ici peuvent compromettre la survie et les performances biologiques des individus dans leur environnement naturel. En effet, Carls *et al.* (1999) rapportent que les larves de hareng souffrant de malformations de la colonne vertébrale présentent également des capacités de nage restreintes, et dans les cas les plus extrêmes, ne peuvent se déplacer que spasmodiquement en décrivant des cercles. Dans cette étude, l'altération des capacités de nage des larves issues d'un même traitement est concomitante à l'apparition d'œdèmes et de malformations squelettiques, suggérant une relation de cause à effet entre ces deux pathologies. Ces altérations de la capacité de déplacement des larves pourraient avoir de graves conséquences sur l'efficacité de capture de proies et l'évitement des prédateurs dans le milieu naturel compromettant ainsi la survie des individus atteints (Carls *et al.*, 1999). De façon similaire, les malformations de la mâchoire peuvent engendrer une altération des capacités de capture de proies, suggérant qu'une mortalité additionnelle pourrait survenir après résorption complète des réserves vitellines (Carls *et al.*, 1999).

Par ailleurs, il a été démontré que les HAP pouvaient être transmis à la descendance par transfert maternel lorsque les adultes sont exposés à des sédiments contaminés (Nye *et al.* 2007). Cette exposition maternelle induit une réduction du taux de croissance des larves, même lorsque les embryons sont ensuite placés sur un sédiment propre. Il a également été mis en évidence que les effets toxiques des HAP pouvaient se manifester chez la seconde génération issue d'individus exposés au B[a]P (White *et al.*, 1999). En effet, les auteurs de cette étude rapportent une réduction

du taux de survie et de la capacité de reproduction chez la génération de *Pimephales promelas* dont les grands-parents avaient été exposés à ce HAP.

L'ensemble de ces observations semble démontrer la pérennité des effets des HAP purs ou en mélange chez les SPD de poisson, compromettant le potentiel de survie ou les performances biologiques des individus exposés sur plusieurs générations. Bien que les mécanismes exacts conduisant à l'apparition de ces malformations restent pour la plupart encore mal connus, les prochains paragraphes évoqueront les modes d'action supposés et/ou potentiels des HAP. Une attention toute particulière sera portée sur les mécanismes de la cardiotoxicité chez les SPD de poisson induits par les HAP, dans la mesure où le système cardiovasculaire est fréquemment impacté par cette classe de composés.

### 1.2.2. Cardiotoxicité

Le cœur est généralement décrit comme l'organe cible le plus sensible chez les embryons et larves exposés aux HAP (Carls *et al.*, 2008 ; Incardona *et al.*, 2004). Les atteintes du système cardiovasculaire fréquemment rapportées se traduisent par des œdèmes péricardiques et péricardiques, des hémorragies, des anémies, une réduction de la circulation sanguine, une élongation et/ou réduction ou dilatation des chambres cardiaques, l'apparition d'un cœur tubulaire, des altérations du rythme cardiaque (bradycardie, arythmie), une diminution de la contractilité du cœur, une plicature anormale du cœur, une altération de la conduction cardiaque (symptôme de bloc atrioventriculaire) et des collapsus des chambres cardiaques (Carls *et al.*, 2008 ; Incardona *et al.*, 2006 ; Incardona *et al.*, 2005 ; Rhodes *et al.*, 2005 ; Sundberg *et al.*, 2005 ; Incardona *et al.*, 2004 ; Billiard *et al.*, 1999).

Les travaux d'Incardona *et al.* (2005 ; 2004) ont démontré que les HAP tricycliques tels que le phénanthrène, le fluorène et le dibenzothiophène, étaient directement cardiotoxiques chez les embryons de *D. rerio*. Les effets observés incluent un symptôme de bloc atrioventriculaire (trouble de la conduction cardiaque entre les chambres du cœur se manifestant par une arythmie ou une bradycardie, et pouvant conduire jusqu'à la syncope) et une perturbation de la plicature cardiaque résultant en un collapsus et une altération de la taille des chambres cardiaques. Ce spectre de malformations est très similaire à celui associé à la mutation *silent heart* (*sih*) qui empêche le développement du cœur par une répression de la troponine T cardiaque (Incardona *et al.*, 2004). Selon ces auteurs, ces observations démontrent que les HAP tricycliques perturbent la morphogénèse cardiaque par une inhibition persistante de la conduction cardiaque dont l'une des causes potentielles pourrait être un dysfonctionnement des canaux ioniques cardiaques.

L'utilisation de morpholinos (molécules synthétiques permettant de bloquer spécifiquement l'expression d'un gène cible) *ahr1* et *ahr2* ne permet pas de prévenir les effets cardiotoxiques induits par le phénanthrène et le dibenzothiophène, indiquant que ces effets interviennent indépendamment de l'induction de la voie AhR/CYP1A (Incardona *et al.*, 2005). Les tests effectués avec des mélanges de HAP contenant des concentrations en HAP totaux identiques mais différant par leur composition ont démontré que seules les mixtures à forte teneurs en HAP tricycliques exercent un pouvoir cardiotoxique (Incardona *et al.*, 2005). Ceci semble indiquer un mode d'action spécifique des HAP plutôt que le résultat de l'additivité des effets des composés présents dans le mélange (Billiard *et al.*, 2008).

Il semblerait que les HAP de plus haut poids moléculaire agissent selon des mécanismes d'action différents. Le chrysène, par exemple, provoque une forte induction de CYP1A et aucune

cardiotoxicité n'est observée. Inversement, le Pyr induit la synthèse de CYP1A et cause une altération des vaisseaux sanguins périphériques semblable à la TCDD qui induit une inhibition de l'angiogénèse, une réduction du flux sanguin et une insuffisance circulatoire (Incardona *et al.*, 2004 ; Hornung *et al.*, 1999). Contrairement à ce qui a été observé pour les HAP tricycliques, la cardiotoxicité du Pyr, principalement localisée au niveau de la vascularisation périphérique, est inhibée ou du moins retardée par l'injection de morpholino *ahr2*, indiquant une voie d'action AhR-dépendante pour ce composé (Incardona *et al.*, 2005).

Un autre mécanisme possible initialement proposé pour expliquer les effets cardiovasculaires induits par la TCDD pourrait être applicable aux HAP. Il s'agit de modulations croisées de la voie AhR et d'autres voies de signalisation comme la voie de réponse à l'hypoxie, par l'intermédiaire de la répression ou la compétition avec des cofacteurs cellulaires ou des facteurs de transcription (Billiard *et al.*, 2008). Le facteur inductible par l'hypoxie 1 (HIF-1) est un facteur de transcription composé de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , cette dernière étant également connue sous le nom d'ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator). HIF-1 participe à la régulation de l'expression génique de facteurs de croissance impliqués dans l'angiogénèse comme VEGF (Vascular endothelium growth factor), critique pour un bon développement de la vascularisation. Une hypothèse a été formulée indiquant que les HAP pourraient interférer avec la transcription du VEGF par compétition avec l'ARNT (Billiard *et al.*, 2008). Cette suggestion est soutenue par le fait que la TCDD induit une altération de l'angiogénèse chez les SPD de poisson (Hornung *et al.*, 1999) et que ces effets ont été associés à une inhibition de l'expression du VEGF chez les oiseaux (Ivnitski-Steele *et al.*, 2005). Par ailleurs, comme mentionné précédemment, la présence d'œdèmes notamment péricardiques est fréquemment rapportée après exposition aux HAP. Or chez les embryons de poisson, la présence d'œdèmes péricardiques est secondaire à l'inhibition de l'angiogénèse, à la réduction du flux sanguin et à l'insuffisance circulatoire (Hornung *et al.*, 1999). Enfin, Carney *et al.* (2006) rapportent que les déficiences cardiovasculaires induites par la TCDD semblent liées à la répression de gènes cardiaques spécifiques codant pour la régulation et la prolifération cellulaire. Cependant, l'étude de l'expression de VEGF au cours du développement embryonnaire de *C. variegatus* exposé au Pyr n'a pas permis de mettre en évidence d'altération de l'expression de ce facteur de croissance (Hendon *et al.*, 2008). Néanmoins, peu d'études se sont penchées sur ce genre d'approches et d'autres travaux sont nécessaires pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Par ailleurs, la mobilisation et le transfert des HAP et de leurs métabolites au cours du développement, notamment au moment du développement du système cardiovasculaire et de la résorption des réserves vitellines précédant le passage à une source de nourriture endogène (Hornung *et al.*, 2007) pourraient expliquer la sensibilité particulière de la vascularisation embryonnaire face aux HAP.

L'ensemble des observations résumées dans ce paragraphe démontre que les mécanismes de toxicité des HAP sont divers et varient en fonction de la structure de la molécule. Par conséquent, des réponses complexes peuvent se manifester en présence de mélanges de HAP contenant à la fois des agonistes et des antagonistes de l'AhR.

### 1.2.3. Mécanisme de toxicité AhR-dépendant (dioxine-like)

#### 1.2.3.1. Activation de la voie AhR par les HAP

L'activation du récepteur aryl hydrocarbure (AhR) par les HAP s'effectue selon un mécanisme similaire à celui des dioxines (Denison & Heath-Pagliuso, 1998) dont les principales étapes sont résumées ci-dessous et illustrées dans la *Figure 4.3*.

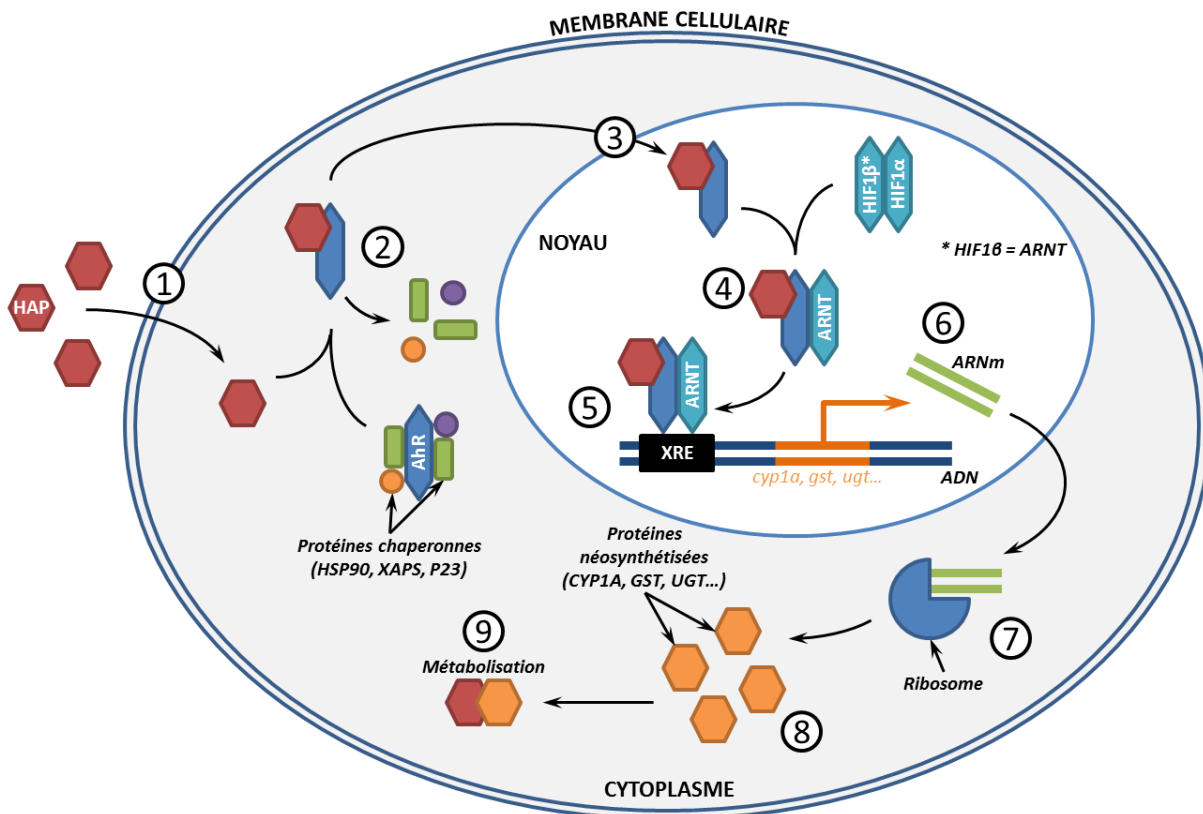
L'activation de la voie AhR débute par la fixation du HAP sur le récepteur Ah, qui, lorsqu'il est inactif, forme un complexe avec des protéines chaperonnes. La fixation de la molécule de HAP sur le récepteur induit la dissociation du complexe et la translocation du nouveau complexe B[a]P-AhR dans le noyau où il se dimérise avec l'ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator). Le nouvel hétérodimère B[a]P-AhR-ARNT se lie à l'ADN au niveau d'éléments de réponse spécifiques aux xénobiotiques (XRE). La fixation du complexe sur ces séquences spécifiques conduit à la transcription de nombreux gènes codant pour la synthèse de protéines dont les plus connues sont CYP1A, GST et UGT (Denison & Heath-Pagliuso, 1998). Par conséquent, les HAP, qui sont capables d'activer la voie AhR, ont la particularité d'être à la fois substrat et inducteur des enzymes intervenant dans leur propre métabolisation.

Tous les HAP ne sont pas susceptibles d'activer le récepteur Ah. En effet, les HAP (non-substitués) présentant deux à trois cycles sont relativement inactifs. A l'inverse, les HAP composés de 4 à 6 cycles contenant un motif phénanthrène ou fluoranthène avec une région baie exposée sont les molécules présentant le plus fort potentiel agoniste du récepteur AhR. Les homologues alkylés ont une affinité pour l'AhR équivalente ou supérieure à celle des composés parents. La position et la taille (méthyl, éthyl...) du groupement alkylé influent sur le potentiel d'activation du récepteur (Barron *et al.*, 2004b).

#### 1.2.3.2. Toxicité dépendante du récepteur AhR

Il existe des preuves à la fois pour et contre l'implication de l'AhR dans le développement du syndrome de BSD (Blue sac disease) chez les SPD de poisson exposés aux HAP, probablement à cause de fortes variations dans les mécanismes de toxicité au sein de cette famille de composés. Dans le cas d'une toxicité AhR-dépendante, les HAP pourraient activer l'AhR mais sans implication directe des enzymes du système MFO (Billiard *et al.*, 2008).

Bien que de nombreuses études aient démontré l'implication de l'AhR dans les réponses toxiques et métaboliques induites par la TCDD et les composés dioxine-like, les mécanismes moléculaires exacts sous-jacents conduisant aux spectres de toxicité observés restent mal connus. L'expression ubiquiste du récepteur Ah dans les tissus et chez les différentes espèces ainsi que son rôle dans la transactivation de nombreux gènes suggèrent qu'une grande partie des réponses toxiques et biochimiques des composés agonistes de l'AhR sont le résultat d'une altération de l'expression de certains gènes (Denison & Heath-Pagliuso, 1998). Par exemple, Teraoka *et al.* (2006) ont démontré que la TCDD induisait une atrophie de la mâchoire inférieure chez les SPD de *D. rerio* par le biais d'une inhibition de l'expression des gènes sonic hedgehog (*shh*) par une voie AhR2-dépendante. Cette sous-expression conduit à une prolifération cellulaire insuffisante, contribuant à la réduction de la croissance de la mâchoire inférieure chez les individus exposés (Teraoka *et al.*, 2006). De façon similaire, il a été montré que le gène *shh* est également réprimé au niveau du squelette cranio-facial des embryons du poisson de roche *Sebasticus marmoratus* exposés au B[a]P, réduisant parallèlement la prolifération cellulaire (He *et al.*, 2011). Durant cette étude, l'activité du



**Figure 4.3. Activation de la voie AhR par les HAP**

Schéma adapté de Denison et Heath-Pagliuso (1998). (1) : diffusion au travers de la membrane cellulaire ; (2) activation du récepteur AhR et libération des protéines chaperonnes ; (3) translocation vers le noyau cellulaire ; (4) hétérodimérisation avec l'ARNT ; (5) reconnaissance et activation de XRE ; (6) activation des gènes cibles et synthèse de l'ARNm ; (7) traduction de l'ARNm ; (8) néosynthèse des protéines ; (9) métabolisation des HAP par les protéines néosynthétisées.

récepteur AhR n'a pas été étudiée. Toutefois, au vu de la similitude des profils de réponses et de l'affinité de ce composé pour le récepteur, il est possible que le B[a]P module l'expression de *shh* par une voie AhR-dépendante (He *et al.*, 2011).

Il est donc possible que certains HAP agissent selon des voies métaboliques similaires à celles de la TCDD et que les différences observées entre les niveaux de toxicité des deux familles de composés soient liées au degré d'affinité pour l'AhR moindre concernant les HAP que la TCDD (Barron *et al.*, 2004b ; Denison & Heath-Pagliuso, 1998). L'identité des gènes modulés par l'AhR et impliqués dans l'apparition d'effets tératogènes restent néanmoins inconnus pour la plupart (Carney *et al.*, 2004).

Contrairement à ce qui vient d'être mentionné, certains HAP à plus de quatre cycles, agonistes de l'AhR et inducteurs potentiels du CYP1A, comme le chrysène, s'avèrent faiblement toxiques pour les embryons dans les limites de leur solubilité (Incardona *et al.*, 2006 ; Incardona *et al.*, 2004 ; Billiard *et al.*, 2002). Pour ce type de composés, le simple fait de se lier au récepteur Ah et d'activer plusieurs gènes ne semble pas suffire pour induire une tératogénicité de type BSD. Cependant, ces mécanismes peuvent prendre part aux effets toxiques observés, dans le cas où la toxicité du composé repose sur une bioactivation de la molécule lors de sa métabolisation, comme c'est le cas pour le B[a]P (Billiard *et al.*, 2008).

Il a été démontré que la co-exposition d'embryons de *D. rerio* ou de *F. heteroclitus* à un agoniste AhR de type HAP, la  $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ NF), et un inhibiteur de CYP1A, l' $\alpha$ -naphthoflavone ( $\alpha$ NF) augmente synergiquement la toxicité induite par ces composés individuels (Billiard *et al.*, 2006 ; Wassenberg & Di Giulio, 2004). De plus, l'utilisation de *D. rerio* mutants AhR2 a permis de montrer que les effets synergiques des HAP sur l'embryotoxicité pouvaient être dépendants de la voie AhR (Billiard *et al.*, 2006). Dans le cas de mélanges pétrogéniques contenant des HAP tricycliques comme le phénanthrène et le dibenzothiophène, les effets tératogènes peuvent néanmoins ne pas être dépendants de la voie AhR (Incardona *et al.*, 2006 ; Incardona *et al.*, 2005). Ces résultats indiquent que les composés présentant une faible affinité pour AhR et une absence de pouvoir inducteur de CYP1A exercent très certainement leur toxicité par une autre voie métabolique, indépendante d'AhR (Incardona *et al.*, 2006 ; Incardona *et al.*, 2005).

A l'inverse, chez les embryons exposés au benzo[a]anthracène, une forte induction de CYP1A est observée ainsi que des effets embryotoxiques qui débutent par une plicature cardiaque incomplète engendrant une cardiotoxicité, suivie du développement d'un syndrome BSD (Incardona *et al.*, 2006). De plus, ces effets toxiques sont inhibés par l'inactivation de l'AhR2 mais pas par celle de CYP1A, suggérant un mécanisme d'action AhR-dépendant mais indépendant de CYP1A (Incardona *et al.*, 2006) comme cela a été montré pour la TCDD (Carney *et al.*, 2004).

### 1.2.3.3. Toxicité dépendante de CYP1A

Selon le HAP considéré ou la composition du mélange de HAP, la protéine CYP1A peut jouer un rôle dans l'embryotoxicité induite.

Chez les embryons de *D. rerio*, l'expression des gènes *cyp1a*, *1b1* et *1c1* est fortement induite par l'exposition à l' $\alpha$ NF et à la  $\beta$ NF. Cette surexpression est accrue de façon synergique dans le cas d'un mélange (Timme-Laragy *et al.*, 2007) alors que l'expression d'*ahr2* est simplement additive. De plus, au cours de cette étude, l'induction de l'expression de ces gènes est précoce (24-48 h pf) et plus importante avant l'apparition des malformations qu'après l'observation des premiers signes de

toxicité. Par ailleurs, l'induction de l'activité EROD (éthoxyrésorufine-o-dééthylase), marqueur de l'activité de la protéine CYP1A, par la  $\beta$ NF est inhibée par l' $\alpha$ NF dans le cas d'une co-exposition alors que l'expression du gène *cyp1a* est stimulée de manière synergique. Ces observations suggèrent que l'inhibition de CYP1A peut altérer la métabolisation des ligands de l'Ahr (et donc leur détoxification) ce qui peut allonger la durée de demi-vie de ces composés au sein de l'organisme et permettre une activation prolongée de la voie Ahr (Timme-Laragy *et al.*, 2007). Ces résultats semblent également indiquer que les effets des HAP peuvent être synergiques, antagonistes et additifs au sein d'un même mélange, selon la cible moléculaire considérée et la composition du mélange.

L'exposition des embryons de *D. rerio* au Pyr provoque une induction de CYP1A, des œdèmes péricardiques et périvitellins, des courbures de la colonne vertébrale et une circulation sanguine périphérique réduite (Incardona *et al.*, 2006 ; Incardona *et al.*, 2005). Ces effets toxiques sont inhibés par l'inactivation de *cyp1a* et *ahr2* et partiellement contrés par l'inactivation d'*ahr1a*. Ces observations semblent impliquer directement l'activité de CYP1A dans la toxicité induite par ce composé et semblent cohérentes avec la production de métabolites toxiques par cette voie-là.

Cependant, comme nous l'avons évoqué précédemment, en temps normal l'activation de CYP1A procure une certaine protection aux embryons exposés à des HAP agonistes de l'Ahr en permettant leur biotransformation. Ainsi, la toxicité de ces HAP serait fonction du taux de production de métabolites intermédiaires très réactifs et de la capacité de l'organisme à les éliminer (Billiard *et al.*, 2008). Le rôle protecteur de CYP1A a été mis en évidence dans différentes études. En effet, il a été démontré que la co-exposition à des HAP agonistes de l'Ahr et des agents inhibiteurs de CYP1A (type  $\alpha$ NF ou morpholino) engendre une toxicité accrue en comparaison des effets induits par les HAP agonistes seuls (Billiard *et al.*, 2006 ; Wassenberg *et al.*, 2005). Cependant, l'inactivation du gène *ahr2* prévient de la cardiotoxicité induite par ces mélanges (Billiard *et al.*, 2006).

Billiard *et al.* (2008) proposent différentes hypothèses expliquant la dualité du rôle de CYP1A dans l'avènement des effets tératogènes chez les SPD de poisson : (1) il existe une voie alternative de biotransformation des HAP Ahr-dépendante responsable de la synergie des effets toxiques observés dans le cas d'une co-exposition à des HAP agonistes Ahr/inducteurs CYP1A et des HAP inhibiteurs de CYP1A ; (2) les HAP peuvent être biotransformés et excrétés par une voie de métabolisation Ahr-indépendante dans le cas d'une inactivation d'Ahr2 ; (3) l'inhibition de CYP1A engendre une réduction du taux de métabolisation des HAP et une accumulation des composés parents, résultant en une activation prolongée d'Ahr comme c'est le cas avec des composés dioxine-like.

Afin de mieux définir le rôle de CYP1A dans les effets toxiques induits par les HAP, Hodson *et al.* (2007) ont suivi la présence de métabolites dans la bile de truites juvéniles co-exposées à du rétène et à l'inhibiteur de CYP1A, l' $\alpha$ NF. Les auteurs rapportent une diminution progressive du nombre et de la quantité de métabolites du rétène (en condition normale, majoritairement métabolisé en dérivés di-hydroxylés et mono-hydroxylés avec très peu de composé parent résiduel) avec l'augmentation des concentrations en  $\alpha$ NF. A des concentrations intermédiaires en  $\alpha$ NF, les concentrations en métabolite mono-hydroxylés sont fortes (pas de métabolite dihydroxylé détecté) et la toxicité est fortement augmentée. Aux plus fortes concentrations en inhibiteur de CYP1A, la toxicité du rétène est quasiment neutralisée et seul le composé parent est détecté dans la bile (Hodson *et al.*, 2007). Ces résultats indiquent qu'une inhibition partielle du CYP1A favorise la production de métabolites plus toxiques alors que son inhibition totale stoppe complètement le mécanisme de métabolisation et supprime les effets toxiques. Ces résultats suggèrent que l'activité



de CYP1A empêche l'accumulation des HAP parents. Par conséquent, le rôle de CYP1A chez les embryons souffrant du syndrome BSD après exposition à des HAP pourrait prévenir la génération de métabolites toxiques (Billiard *et al.*, 2008).

Cependant, l'étude de Timme-Laragy *et al.* (2007) au cours de laquelle l'expression des gènes *cyp1a* mais également *cyp1b1* et *1c1* est induite chez les embryons de *D. rerio* exposés à des composés agonistes de l'AhR ( $\alpha$ NF et  $\beta$ NF), suggère que le métabolisme et la toxicité AhR-dépendants des HAP comprend de nombreuses voies possibles. De plus, les inductions de ces gènes sont importantes, précèdent l'apparition des malformations et contrastent avec l'inhibition de l'activité EROD. Ces résultats semblent indiquer qu'à l'inverse des composés dioxine-like faiblement métabolisables, les HAP peuvent être biotransformés par le biais de différentes voies métaboliques résultant en une production de métabolites toxiques variable et selon des toxicocinétiques différentes (Billiard *et al.*, 2008).

Cette hypothèse semble cohérente avec l'induction de la protéine CYP1A observée après l'exposition d'embryons de *D. rerio* à du chrysène, du Pyr ou du benzo[a]anthracène mais avec des profils d'induction tissulaires et une intensité très différents pour les trois composés. Ceci indique d'importantes variations dans l'absorption et la distribution de ces substances dans l'organisme (Incardona *et al.*, 2006). Une autre preuve allant dans le sens d'une toxicité des HAP repose sur leur métabolisation et l'induction du CYP1A (ou *cyp1A*) avant l'observation des premiers signes de toxicité (Timme-Laragy *et al.*, 2007 ; Brinkworth *et al.*, 2003).

#### 1.2.4. Effets narcotiques des HAP (AhR-indépendante)

Les HAP de faible poids moléculaire (moins de 4 cycles) sont généralement considérés comme ayant une toxicité de base attribuée à un phénomène de narcose de par leur caractère lipophile et leur structure simple (Incardona *et al.*, 2004). Le principe de la narcose repose sur une altération non-spécifique et réversible de l'intégrité membranaire résultant de l'accumulation de composés organiques hydrophobes dans la bicouche lipidique et engendrant un effet anesthésique ou narcotique. Cependant, les mécanismes exacts mis en jeu restent inconnus. En toxicologie, le phénomène de narcose est décrit comme un mécanisme général décrivant la relation positive entre le coefficient de partage  $K_{ow}$ , la cinétique de bioaccumulation et la toxicité aiguë des composés liposolubles (Billiard *et al.*, 2008). Un mode d'action narcotique (et les relations qui en découlent) ne serait cependant valable que pour les HAP ayant un  $\log K_{ow}$  inférieur à 5,2, au-delà duquel la faible hydrosolubilité et donc la biodisponibilité limitée des composés limiteraient leurs impacts toxiques (Sverdrup *et al.*, 2002). L'augmentation de la toxicité observée entre le naphthalène ( $\log K_{ow} = 3,3$ ) et le phénanthrène ( $\log K_{ow} = 4,5$ ) observée par Incardona *et al.* (2004) semble en adéquation avec le modèle narcotique. Cependant, l'altération sélective de la fonction cardiaque par les HAP tricycliques observée par ces auteurs, initiateur des effets embryotoxiques observés, ne correspond pas à un phénomène de narcose. Selon Barron *et al.* (2004a), la narcose semblerait contribuer majoritairement à la mortalité embryonnaire induite par des mélanges complexes de HAP chez le hareng du Pacifique et serait principalement contrôlée par les concentrations en naphthalènes. Cependant, dans cette dernière étude, le modèle narcose ne permet de prédire les réponses toxiques qu'avec 40 % à 50 % d'exactitude, avec une sous-estimation générale des effets sublétaux. Par ailleurs, le modèle narcose est strictement additif, ce qui ne permet pas de prendre en considération les effets synergiques ou antagonistes précédemment décrits. Enfin, les phénomènes

de biotransformation peuvent engendrer une diminution de la charge tissulaire en composés parents, empêchant d'atteindre la concentration critique nécessaire au déclenchement de la narcose.

### 1.2.5. Impact sur le métabolisme de la vitamine A

Les rétinoïdes sont des molécules apparentées au rétinol, également connu sous le nom de vitamine A. La structure générale de rétinoïdes est présentée sur la [Figure 4.4](#). Ces composés sont essentiels à de nombreuses fonctions biologiques telles que la différenciation et la prolifération cellulaire, le mécanisme d'apoptose. Ils ont donc un rôle primordial pour la croissance, la reproduction, le développement embryonnaire et la vision. Cependant, certaines formes de rétinoïdes peuvent engendrer des effets toxiques. Le rétinol, forme sous laquelle les rétinoïdes sont principalement transportés par la circulation sanguine, peut s'avérer cytotoxique en endommageant les membranes cellulaires et l'acide rétinoïque (AR), selon sa concentration tissulaire, peut paradoxalement engendrer des effets tératogènes (Boily *et al.*, 2004). Des études *in situ* et en laboratoire ont démontré que certains polluants environnementaux agonistes du récepteur AhR pouvaient interférer dans le métabolisme de la vitamine A et altérer la teneur en rétinoïdes de l'organisme (voir Novak *et al.*, 2008 ; Rolland, 2000 pour revue).

Les étapes de l'assimilation et du métabolisme de la vitamine A ont été largement décrites dans la littérature (voir Novak *et al.*, 2008 ; Boily *et al.*, 2004 pour revue). Les grandes étapes sont résumées ci-dessous et illustrées par la [Figure 4.5](#). Les animaux ne sont pas capables de néosynthétiser la vitamine A. Les rétinoïdes sont acquis par le biais de la nourriture sous la forme initiale de caroténoïdes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -carotène et cryptoxanthine principalement). Ils sont ensuite stockés, parfois en quantités relativement élevées, au niveau du foie. Le  $\beta$ -carotène est converti en rétinaldéhyde (ou rétinol) par l'enzyme 15,15'-dioxgénase, et est ensuite réduit en rétinol par la rétinaldéhyde réductase. Les enzymes LRAT (Lécithine rétinol acyltransférase) ou ARAT (Acyl-coenzyme A rétinol acyltransférase) vont estérifier le rétinol et les esters formés sont stockés dans le foie majoritairement, bien que d'autres organes tels que les reins et les intestins puissent également servir de lieu de stockage. Chez les poissons, en plus du rétinol et des esters de rétinol, du déhydrorétinol ainsi que ses esters dérivés sont stockés dans le foie. Chez les embryons, les rétinoïdes sont fournis par transfert maternel par le biais du sac vitellin qui sert de stockage pour le rétinol. En fonction des besoins de l'organisme, les esters du rétinol sont hydrolysés enzymatiquement par la HER (hydrolase des esters du rétinol) et transportés, sous forme de rétinol, par la circulation sanguine jusqu'aux cellules cibles. Au sein des cellules, le rétinol peut être transformé en rétinaldéhyde de manière réversible par divers enzymes comme des alcools déshydrogénases (ADH) dont le rétinol déshydrogénase (RODH) mais également plusieurs cytochromes P450. Le rétinal est ensuite irréversiblement transformé en AR par la rétinaldéhyde déshydrogénase (RALDH) ou par les isoformes du cytochrome P450, CYP1A1 et 1A2. L'AR est lipophile et considéré comme la forme active des rétinoïdes. L'AR est présent sous trois isoformes: all-*trans*-, 9-*cis*- et 13-*cis*-AR. Ces isoformes sont interchangeable spontanément ou par l'action d'enzymes comme la GST qui peut convertir le 13-*cis*-AR en all-*trans*-AR.

L'activité biologique associée à la vitamine A résulte de la liaison de l'AR sur l'un de ses récepteurs. Les principaux récepteurs de l'AR appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires et sont les récepteurs de l'AR (RAR) et les récepteurs X des rétinoïdes (RXR) qui

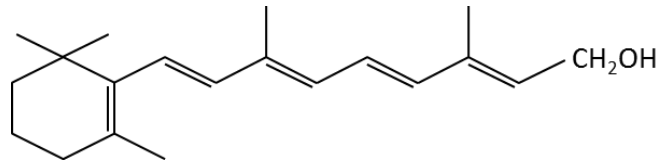


Figure 4.4. Structure générale des rétinoïdes

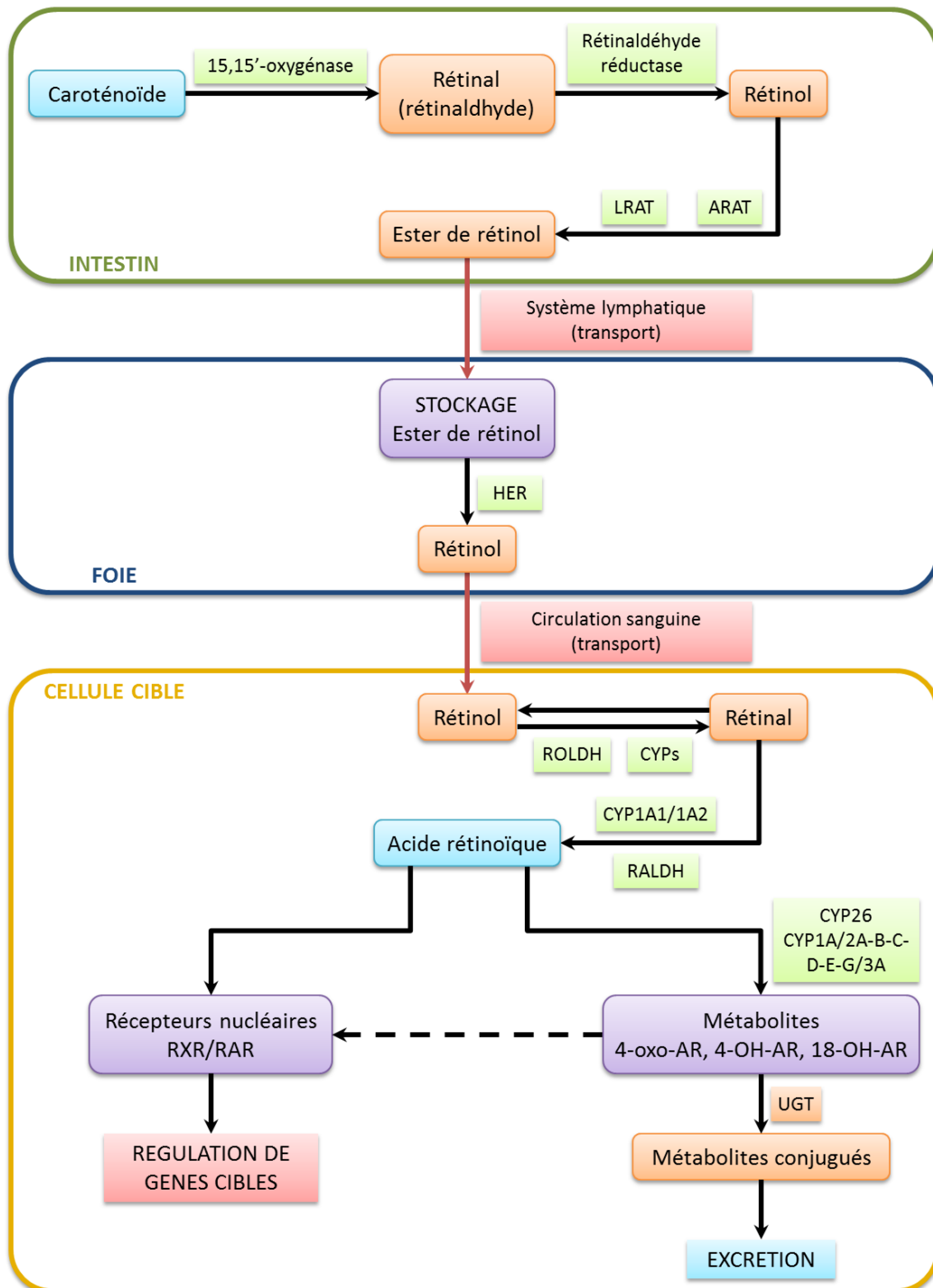


Figure 4.5. Métabolisme de la vitamine A

Schéma d'après Boily et al. (2004). LRAT : lécithine rétinol acyltransférase ; ARAT : acyl-coenzyme A rétinol acyltransférase ; HER : hydrolase des esters du rétinol ; ROLDH : rétinol déshydrogénase ; CYP : cytochrome P450 ; RALDH : rétinol déshydrogénase ; UGT : UDP-glucosyltransférase.

comprennent plusieurs types ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) eux-mêmes composés de plusieurs isoformes. Une fois complexés avec leur ligand, les récepteurs RAR et RXR forment des hétérodimères RAR-AR-RXR qui peuvent se lier aux éléments de réponses de l'AR (RARE) au niveau des promoteurs de gènes cibles. La réponse peut être une activation ou une répression du gène cible selon la position de la fixation des hétérodimères (par exemple, une fixation en position 5' induit une transcription alors que la fixation en 3' la réprime). La multiplicité des effets biologiques de la vitamine A s'explique par le grand nombre de combinaisons possibles entre les ligands et les isoformes RAR et RXR.

De plus, le récepteur RXR peut se dimériser avec d'autres récepteurs comme le récepteur de l'hormone thyroïdienne (TR) et son ligand T3 (triiodothyronine). L'hétérodimère (9-*cis*-) AR-RXR:TR-T3 ainsi formé peut alors lier l'élément de réponse de l'hormone avec plus d'affinité que le complexe TR-T3 seul. Le récepteur RXR peut donc réguler l'expression de gènes impliqués à la fois dans la voie de signalisation de l'AR mais également dans celle d'autres facteurs tels que les hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes, le facteur de croissance... Le récepteur RXR peut également former un hétérodimère avec les récepteurs PXR (pregnane X receptor, également connu sous le nom de steroid and xenobiotic sensing nuclear receptor, SXR) et CAR (constitutive androstane receptor), et réguler ainsi l'expression des gènes *cyp2b* et *cyp3a* respectivement. Les CYP2B et 3A sont impliqués dans le métabolisme oxydatif de nombreux xénobiotiques (voie AhR-indépendante) ainsi que dans celui de l'AR. Certains polluants environnementaux inducteurs de CYP2B et 3A peuvent donc impacter le métabolisme des rétinoïdes et inversement. En effet, l'AR peut inhiber la formation du complexe PXR-RXR et donc la synthèse de CYP2B. En revanche, les rétinoïdes peuvent activer l'hétérodimère RXR-CAR et la voie CYP3A.

La métabolisation de l'AR est catalysée par des enzymes de phase I CYP (1A, 2A-B-C-D-E-G, 3A) et principalement le CYP26, inductible par l'all-*trans*-AR. Chez le poisson, le CYP26 est le seul système spécifiquement identifié intervenant dans la métabolisation de l'all-*trans*-AR. Les métabolites produits (par exemple, 4-oxo-AR, 4-OH-AR et 18-OH-AR) sont plus polaires que l'AR et donc plus facilement excrétés. Par ailleurs, ces métabolites ainsi que la forme parent all-*trans*-AR sont des substrats pour l'UGT qui catalyse leur conjugaison. Cependant, les métabolites de l'AR notamment l'all-*trans*-4-oxo-AR et l'all-*trans*-déhydro-AR, ne perdent pas complètement leur capacité à se lier avec les récepteurs nucléaires rétinoïques. Ainsi, le contrôle de la teneur en AR dans l'organisme est régulé par un équilibre précis entre sa biosynthèse (voie RALDH) et sa métabolisation (voie CYP26).

Par conséquent, le rôle de la voie de signalisation de l'AR dans la modulation de gènes cible ainsi que de la localisation de leur expression repose sur la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse, le métabolisme de l'AR et le grand nombre d'isoformes des récepteurs.

Chez les embryons, une carence en rétinoïdes peut impacter la croissance mais également le développement de presque tous les organes ou tissus incluant le cerveau postérieur, les organes de la vue et de l'ouïe, plusieurs tissus et organes dérivant de la crête neurale, les structures cranio-faciales et pharyngiennes, la glande thyroïde et les parathyroïdes. Une augmentation de l'apoptose et une altération de la migration des cellules de la crête neurale seraient à l'origine de ces anomalies (Boily *et al.*, 2004). Une carence en vitamine A peut conduire à la mort de l'embryon. A l'inverse, un apport excessif en AR provoque des symptômes globalement similaires à ceux observés lors d'une carence chez les embryons (Boily *et al.*, 2004).

Différentes études de terrain ont mis en évidence une altération des niveaux en rétinoïdes chez les poissons provenant de certains sites contaminés. Une étude réalisée sur des barbottes brunes, prélevées dans les Grands Lacs (Amérique du Nord) au niveau de sites contaminés en HAP, a mis en évidence une réduction des concentrations en déhydrorétinol et en palmitate de rétinol (ester de rétinol) hépatiques par rapport aux individus du site de référence (Arcand-Hoy & Metcalfe, 1999). Par ailleurs, la diminution des stocks de rétinoïdes s'est avérée concomitante à la présence de néoplasmes hépatiques, de lésions dermiques, d'une induction de l'activité EROD et de composés aromatiques fluorescents dans la bile. De plus, une forte corrélation a été établie entre la déplétion en rétinoïdes et l'induction de l'activité EROD suggérant que les composés agonistes de l'AhR sont associés à cet effet. De façon similaire, une diminution de la concentration en rétinol hépatique et plasmique ainsi qu'une augmentation de l'activité EROD et de la teneur en protéines CYP1A sont observées chez les flets communs exposés à des sédiments contaminés en HAP et en composés aromatiques halogénés du port de Rotterdam, aux Pays-Bas (Besselink *et al.*, 1998). Étant donné que les teneurs en rétinoïdes ont largement été utilisées comme biomarqueurs d'exposition, un grand nombre d'études similaires rapportent une perturbation du niveau de rétinoïdes chez les individus exposés. Cependant, très peu d'études examinent les implications de ces variations en rétinoïdes et les mécanismes mis en jeu. Parmi les hypothèses avancées, l'une d'entre elles suggère une interconnexion entre le métabolisme de la vitamine A et l'induction d'enzymes de biotransformation par l'intermédiaire de l'activation de l'AhR (Arukwe & Nordbo, 2008). Cette hypothèse semble *a priori* plausible étant donné que certaines enzymes impliquées dans la synthèse de l'AR ou son métabolisme interviennent également dans la métabolisation des HAP (CYP1A, GST, UGT par exemple).

En laboratoire, Alsop *et al.* (2007) montrent une réduction de la teneur en rétinoïdes chez les *D. rerio* exposés au B[a]P par voie trophique. Cette diminution est plus marquée chez les femelles que chez les mâles. Chez les individus femelles, la déplétion touche dans un premier temps les esters rétinoïques puis, une fois que ceux-ci ont quasiment disparu, la concentration en rétinol est réduite à son tour. Seule une augmentation de l'expression de *cyp1A1* a été observée chez les femelles exposées à la plus forte dose de B[a]P alors que les niveaux de transcription de *raldh2* et *cyp26a* ne sont pas modifiés significativement par rapport au groupe témoin. Par ailleurs, la production d'œufs par les femelles carencées n'est pas affectée et le contenu en rétinol des œufs est même plus important après exposition au B[a]P que pour le traitement contrôle. Par ailleurs, aucune malformation apparente des embryons n'est observée dans les 36 h pf.

Récemment, les interactions moléculaires et physiologiques entre la voie de signalisation des rétinoïdes et la voie AhR a été étudiée chez les embryons de Medaka japonais, démontrant que l'AR et les récepteurs RXR et RAR sont nécessaires à l'expression du gène *ahr* (Hayashida *et al.*, 2004). Cette étude a par ailleurs montré que ces mécanismes sont essentiels au bon développement osseux et vasculaire. En effet, une inhibition de la synthèse de l'AR ou un apport excessif en AR induit une agénésie des veines vitellines, une coagulation sanguine, une courbure et un enroulement de la queue ainsi qu'une réduction de la taille de la tête et de la formation des nageoires. Les mêmes symptômes sont rapportés après inhibition des récepteurs RXR et RAR indiquant qu'à la fois l'AR et sa voie de signalétique sont nécessaires au développement de système vasculaire et osseux. Par ailleurs, le traitement des embryons avec un inhibiteur de la synthèse de l'AR et des antagonistes des récepteurs RXR et RAR conduit à une inhibition de l'expression du gène *ahr*. À l'inverse, un apport

exogène en AR génère une surexpression de ce gène. La co-exposition des embryons à un inhibiteur de la synthèse d'AR et un antagoniste d'AhR induit des dommages vasculaires de la même manière que le traitement avec un agoniste d'AhR et un apport exogène en AR. Ces résultats démontrent que l'AR intervient dans la signalisation de l'expression de l'AhR et que ce phénomène a un rôle critique dans le développement vasculaire (Hayashida *et al.*, 2004).

### 1.2.6. Génotoxicité et oncogénèse

Le potentiel génotoxique, mutagène et cancérigène des HAP est l'un des aspects les plus préoccupants de la toxicité des HAP.

La génotoxicité des HAP se manifeste par l'induction de lésions primaires de l'ADN qui comprennent principalement des cassures simple-brin, des modifications de bases et surtout la formation d'adduits à l'ADN.

Chez les soles juvéniles *Solea solea* exposées à un mélange équimolaire de B[a]P, de Pyr et de fluoranthène, le taux de dommages à l'ADN est significativement induit (Wessel *et al.*, 2010). Les auteurs rapportent une corrélation positive entre l'occurrence des lésions de l'ADN et l'augmentation de la concentration en métabolites de HAP mesurés dans la bile, notamment le 1-OH-Pyr, le 3-OH-Fluoranthène, le 3-OH-B[a]P et dans une moindre mesure le 9-OH-B[a]P. Les résultats de cette étude suggèrent que les dommages à l'ADN induits par l'exposition aux HAP sont le résultat de l'induction d'un stress oxydant par les métabolites des HAP et de l'activité d'excision des enzymes impliquées dans la réparation des lésions oxydatives et des adduits de l'ADN (Wessel *et al.*, 2010). En effet, les lésions oxydatives peuvent être le résultat de la génération d'un stress oxydant au cours de la métabolisation des HAP. Des ERO peuvent être générées lors du cycle redox des quinones, et les CYP1A peuvent également en produire au cours de leur activité catalytique (Baulig *et al.*, 2003 ; Morel *et al.*, 1999). La présence d'un stress oxydant peut engendrer l'oxydation de certaines bases de l'ADN et parfois résulter en une diminution de la fidélité de réplication de l'ADN.

Akcha *et al.* (2003) ont mis en évidence l'induction de cassures et de lésions oxydatives de l'ADN chez les limandes *Limanda limanda* prélevées dans un environnement contaminé notamment en HAP. De façon similaire, Winter *et al.* (2004) rapportent une augmentation des dommages à l'ADN chez les chevannes *Leuciscus cephalus* après transfert dans une rivière fortement impactée par les HAP. Au cours de ces deux études, une augmentation du taux de formation d'adduits à l'ADN est observée chez les individus exposés, avec un profil caractéristique d'une exposition à un mélange complexe de HAP (Winter *et al.*, 2004 ; Akcha *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'exposition d'anguilles *Anguilla anguilla* à du B[a]P induit une oxydation des bases de l'ADN qui se traduit par un accroissement du taux de 8-oxo-dG, ainsi que la formation d'adduits à l'ADN de type B[a]P-diol époxyde-ADN (Machella *et al.*, 2005). Des dommages plus graves peuvent également apparaître après une exposition à des HAP, comme des cassures chromosomiques se traduisant par l'apparition de micronoyaux. Une augmentation de la fréquence des micronoyaux et de la présence de cellules apoptotiques sont observés chez les turbots *S. maxima* et les morues *Gadus morua* après traitement avec du pétrole brut (Barsiene *et al.*, 2006).

Les lésions primaires de l'ADN sont généralement réparées par des systèmes enzymatiques, d'abord avec les systèmes de réparation conservatifs faisant intervenir notamment les systèmes NER (Nucleotide excision repair) et BER (Base excision repair) (Dégremon & Cachot, 2009). Lorsque ces mécanismes permettant une réparation fidèle sont insuffisants pour réparer l'ensemble des

dommages de l'ADN, les systèmes fautifs entrent en jeu, mais ces derniers peuvent induire des erreurs (Dégremont & Cachot, 2009). Les lésions primaires peuvent alors être fixées sous la forme de mutations héréditaires et avoir des répercussions irréversibles sur la santé de l'organisme, notamment en termes de cancers et malformations. Certains HAP ont été classés comme molécules prioritaires par les réglementations américaines et européennes, du fait de leurs effets mutagènes et cancérigènes avérés (**Tableau 4.1**).

**Tableau 4.1. Liste des HAP cancérigènes ou mutagène selon l'IARC**

Composé	Nombre de cycles	Cancérogénèse	Mutagénèse	Prioritaire dans la liste	
				de l'EPA	de l'IARC
Fluorène	3		Constatée	Oui	Oui
Phénanthrène	3		Constatée	Oui	Oui
Anthracène	3		Constatée	Oui	Oui
Fluoranthène	4	Non confirmée	Constatée chez l'homme	Oui	Oui
Pyrène	4	Non confirmée	Constatée chez l'homme	Oui	Oui
Benzo[a]anthracène	4	Confirmée	Constatée chez l'homme	Oui	Oui
Chrysène	4	Confirmée	Constatée chez l'homme	Oui	Oui
Benzo[b]fluoranthène	5	Confirmée	Constatée	Oui	Oui
Benzo[j]fluoranthène	5	Confirmée	Constatée	Non	Oui
Benzo[k]fluoranthène	5	Confirmée	Constatée	Oui	Oui
Benzo[a]pyrène	5	Confirmée	Constatée chez l'homme	Oui	Oui
Benzo[e]pyrène	5	Non confirmée	Constatée chez l'homme	Non	Oui
Indeno[1,2,3-cd]pyrène	6	Confirmée	Constatée	Oui	Oui
Benzo[ghi]pérylène	6	Non confirmée	Constatée	Oui	Oui
Dibenzo[ah]anthracène	6	Confirmée	Constatée chez l'homme	Oui	Oui

Une étude réalisée sur des barbottes brunes prélevées dans les Grands Lacs (Amérique du Nord) au niveau de sites contaminés en HAP a mis en évidence la présence significative de lésions cancéreuses cutanées et hépatiques chez les individus exposés en comparaison du site contrôle (Arcand-Hoy & Metcalfe, 1999). Les lésions cutanées comprennent notamment des papillomes au niveau des lèvres, variables en taille et en nombre, allant de la présence d'une unique lésion à l'observation de multiples papillomes sur les deux mâchoires. Au niveau du système hépatobiliaire, des atteintes hyperplasiques et anaplasiques de l'épithélium du canal cholédoque ont été observées, ainsi que la présence de fibroses et de carcinomes bénins et malins.

D'autres travaux ont documenté la présence de lésions prénéoplasiques et néoplasiques au niveau du système hépatique chez les populations de poissons vivant dans des zones contaminées en HAP. La fréquence des lésions tumorales peut dépasser les 50 % chez certaines espèces provenant de zones fortement impactées par une pollution en HAP bien qu'il existe de grandes variations de sensibilité inter-espèces (Wirgin & Waldman, 1998). Une corrélation directe est souvent établie entre la concentration en HAP, les niveaux de formation d'adduits à l'ADN et le développement de tumeurs hépatiques chez les poissons et les embryons exposés à des HAP, seuls (par exemple, le diméthylbenzanthracène) ou en mélange complexe (pétrole brut, Wirgin & Waldman, 1998). Les tissus atteints par des lésions tumorales exhibent souvent une activation du gène pro-oncogène *k-ras* (Wirgin & Waldman, 1998). Selon ces auteurs, une telle sensibilité des espèces de poissons sauvages vis-à-vis des altérations de l'ADN pourraient être liée aux niveaux de contamination particulièrement hauts ainsi qu'une relativement faible efficacité des mécanismes de réparation de l'ADN. Chez des meuniers noirs *Catostomus commersonii* prélevés sur des sites pollués en HAP, une inhibition importante de la GST a pu être observée au niveau des lésions hépatiques en comparaison des tissus

sains (Stalker *et al.*, 1991). Selon ces auteurs, la déplétion en GST pourrait favoriser la progression néoplasique et augmenter la sensibilité des tissus prénéoplasiques à subir des dommages à l'ADN induits par d'autres substances normalement détoxifiées par cet enzyme.

Des études menées sur l'estuaire de Seine, particulièrement impacté par des contaminants organiques, ont permis de démontrer une corrélation entre la concentration en HAP et la génotoxicité des sédiments (Cachot *et al.*, 2006). Les HAP sont des pro-mutagènes et ils nécessitent une bioactivation par les enzymes de biotransformation de phase I pour être génotoxiques. Des tests *in vitro* utilisant des levures ont mis en évidence une prépondérance des transversions G:C vers C:G ou G:C vers T:A engendrées par le métabolite B[a]P-diolépoxyde (Cachot *et al.*, 2004 ; Yoon *et al.*, 2003). L'induction de mutations au niveau des paires de bases G:C a également été observée chez des embryons de Medaka transgéniques  $\lambda$ p cII exposés à des sédiments dopés en B[a]P (McElroy *et al.*, 2006) ou avec un extrait organique de sédiment de Seine (Cachot *et al.*, 2007).

## 2. ÉVALUATION DE L'EMBRYOTOXICITE DU PYRENE ET DU METHYLPYRENE PAR LE MELA

---

L'efficacité du test MELA à l'évaluation de la toxicité des HAP adsorbés au sédiment a été largement démontrée au cours de travaux de thèse de Ludovic Vicquelin (2011). L'objectif de la présente étude est d'utiliser ce test en étudiant les réponses embryotoxiques induits par des composés dont le spectre de toxicité est moins bien caractérisé et décrit dans la littérature. Dans cette optique, nous avons choisi un HAP largement répandu dans l'environnement et appartenant à la liste des composés prioritaires de l'US-EPA, le pyrène (Pyr) et un de ces dérivés alkylés, le 1-méthylpyrène (MePyr). Le Pyr fait partie des HAP les plus abondants dans les sédiments de l'estuaire de la Gironde et du Bassin d'Arcachon, comme c'est d'ailleurs le cas dans la majorité des sites fortement impactés par la présence d'une contamination en HAP. Les concentrations testées ont été définies en fonction des niveaux de contamination rapportés dans notre environnement d'étude (Bassin d'Arcachon et continuum Lot-Garonne-Gironde) et des seuils de toxicité (ERL, ERM...) de la littérature (voir *paragraphe 3.2.1 du Chapitre 1*). En effet, l'objectif de cette étude est de réaliser une étude toxicologique des effets des composés choisis tout en restant réalistes d'un point de vue environnemental au regard des niveaux de contamination des sites de la région. Ainsi, les différentes concentrations en pyrène qui ont été sélectionnées se situent dans la moyenne haute des concentrations mesurées dans les milieux d'étude et restent proches des seuils de toxicité concernant le compartiment sédimentaire. Les concentrations choisies sont également cohérentes avec les gammes de concentrations en HAP totaux relevés dans les sédiments du Bassin d'Arcachon et du continuum Lot-Garonne-Gironde qui ne sont pas considérés comme des environnements hautement contaminés par cette classe de composés (à l'exception de certains « hot spots »). Les concentrations cibles retenues pour cette étude sont de **0 ng/g** (0X : témoin négatif), **270 ng/g** (0,3X : supérieure aux seuils d'effets potentiels TEL/TEC mais inférieure au seuil ERL et compatible avec les concentrations rencontrées dans les sédiments aquitains), **900 ng/g** (1X : valeur avoisinant les seuils d'effets probables ERL/PEL et également les concentrations en pyrène des sites du Bassin les plus impactés par ce composé) et **2 700 ng/g** (3X : concentration « toxicologique », équivalente au seuil d'effet probable ERM et pouvant être atteinte dans les sédiments de sites particulièrement impactés



par les HAP comme les grandes zones portuaires). Étant donné l'absence de données environnementales précises concernant le MePyr dans le milieu d'étude, les mêmes concentrations cibles ont été testées pour le dérivé alkylé que pour le HAP parent. Ceci nous permettra éventuellement de pouvoir comparer les effets toxiques des deux composés.

## 2.1. Protocole expérimental

### 2.1.1. Conditions d'exposition

La toxicité des sédiments dopés en Pyr et MePyr a été évaluée à l'aide du test MELA en exposant des embryons de Medaka juste fécondés provenant de notre élevage. La quantité de sédiment nécessaire à chaque concentration et chaque composé testé a été enrobée suivant le protocole détaillé dans le *Chapitre 2, paragraphe 3.1*. Les embryons de stade pré-morula ont ensuite été exposés aux différents sédiments au cours de deux expositions indépendantes dans les mêmes conditions que lors de l'exposition au Cu et Cd rappelées dans le **Tableau 4.2** et selon le protocole décrit dans le *Chapitre 2, paragraphe 6.1*, sans renouvellement d'ERS (le niveau a seulement été complété au besoin).

**Tableau 4.2.** Conditions d'exposition appliquées lors de l'exposition des embryons de Medaka aux sédiments dopés en pyrène et en méthylpyrène

Nb. Conditions traitées	Nb. Réplicats par condition	Ø BP (mm)	Nb. Emb.	Stade	M <sub>sed</sub> (g p.s.)	V <sub>h</sub> ERS (mL)	V <sub>i</sub> ERS (mL)	T <sub>incub</sub> (°C)	Photop. (h j/n)
4	3	35	25	pré-morula (2-4 h pf)	5	2	1	26 °C	12 h/12 h

Ø BP : diamètre de la boîte de Pétri d'exposition ; Nb. Emb. : nombre d'embryons exposés par réplikat ; M<sub>sed</sub> : masse de sédiment par réplikat en gramme de poids sec ; V<sub>h</sub> ERS : volume d'ERS ajouté pour humidifier le sédiment de chaque réplikat ; V<sub>i</sub> ERS : volume d'ERS ajouté dans un réplikat pour immerger les embryons ; T<sub>incub</sub> : température d'incubation des embryons pour toute la durée du test ; Photop. : photopériode appliquée pour toute la durée du test en h de jour/h de nuit.

### 2.1.2. Paramètres suivis

Les marqueurs de toxicité suivis au cours des expositions des embryons de Medaka au Pyr et au MePyr sont identiques à ceux utilisés lors des expositions « phénotypiques » précédentes et sont rappelés dans le **Tableau 4.3**.

**Tableau 4.3.** Paramètres suivis lors de l'exposition des embryons de Medaka aux sédiments dopés en pyrène et en méthylpyrène

Paramètre/Analyse	Matrice concernée	Cinétique de mesure	Donnée dérivée
Caractérisation chimique	Sédiment	T0 (avant exposition) T10 (arrêt exposition)	Suivi de la contamination
Viabilité	Embryons Larves	Tous les jours	Viabilité embryonnaire Viabilité larvaire Viabilité cumulée
Rythme Cardiaque*	Embryons	Jour 6 et 7 pf	Activité Cardiaque
Éclosions	Embryons Larves	Tous les jours	Taux d'éclosion Durée du développement
Données biométriques	Larves	Jour d'éclosion	Longueur totale Taille de la tête Rapport T/L
Malformations	Larves	Jour d'éclosion	Occurrence des malformations

N.B. : Toutes les observations sont effectuées sur l'ensemble des individus (embryons et/ou larves) de chaque réplikat sauf indication contraire ci dessous.

\* Mesure effectuée sur 5 embryons par réplikat

Les prélèvements de sédiment destinés aux dosages en HAP à T0 sont effectués au moment de l'aliquotage du sédiment dopé et placés dans des vials de verre ambré. L'aliquote de sédiment est ensuite conservée à température ambiante et à l'obscurité jusqu'à analyse. Au moment de l'arrêt de l'exposition (T10), les sédiments sont débarrassés au maximum de l'ERS qui les recouvre puis conservés dans les barquettes en aluminium à -20°C jusqu'à lyophilisation et analyse.

## 2.2. Concentrations en HAP dans le sédiment

Les travaux de thèse de Ludovic Vicquelin (2011) ont mis en évidence une forte variation dans les rendements d'enrobage en HAP selon la nature du composé et la concentration cible. Par conséquent, un test préliminaire de dopage en Pyr et MePyr a été effectué sur les sédiments de Marcenac et d'Yville sur Seine afin de vérifier l'obtention d'un bon rendement d'enrobage. Les résultats obtenus lors de cet essai de dopage sont synthétisés dans le **Tableau 4.4** et montrent que le sédiment de Marcenac a une capacité d'adsorption en Pyr et MePyr très limitée résultant en des rendements d'enrobage faibles compris entre 13 % et 20 %. Pour le sédiment d'Yville, l'efficacité de dopage est meilleure et permet d'atteindre jusqu'à près de 80 % et 66 % de rendement d'enrobage pour le MePyr et le Pyr respectivement.

**Tableau 4.4. Teneurs des sédiments de Marcenac et d'Yville en pyrène et méthylpyrène lors des essais préliminaires d'enrobage**

	Pyrène			Méthylpyrène		
	$C_{dosée}$ (ng/g p.s.)	$C_{théorique}$ (ng/g p.s.)	R (%)	$C_{dosée}$ (ng/g p.s.)	$C_{théorique}$ (ng/g p.s.)	R (%)
Marcenac	444	3385	13	6351	31760	20
Yville	2272	3448	66	25318	31887	79

$C_{dosée}$  : concentration dosée par l'appareil de mesure ;  $C_{théorique}$  : concentration attendue après enrobage (après ajustement à la concentration des solutions de contamination et la quantité exacte de matrice dopée) ;  $R_{enrobage}$  : rendement de l'enrobage (écart entre  $C_{théorique}$  et  $C_{dosée}$ )

Au vu des résultats de cet essai, nous avons choisi d'utiliser le sédiment d'Yville sur Seine comme matrice de dopage lors des expositions des embryons de Medaka au Pyr et au MePyr afin de garantir des concentrations d'exposition les plus proches possibles des valeurs cibles sélectionnées. Les teneurs en Pyr et MePyr des sédiments dopés dans le cadre de l'évaluation de la toxicité du Pyr et du MePyr par le test MELA, au lancement de l'exposition des embryons (T0) et en fin d'exposition (T10) sont reportées dans le **Tableau 4.5**.

Ces analyses chimiques ont permis de déterminer le niveau basal de contamination du sédiment d'Yville en Pyr dont la valeur a été évaluée à 1,73 ng/g p.s. En revanche, les teneurs naturelles en MePyr n'ont pu être précisées car inférieures à la limite de quantification (<0,1 ng/g p.s.). Les concentrations initiales en Pyr et MePyr présentes dans la matrice sédimentaire de référence sont tout à fait négligeables en comparaison des doses d'exposition sélectionnées.

Lors de ce second enrobage du sédiment d'Yville avec le Pyr des rendements compris entre 84 % et 100 % ont été observés (**Tableau 4.5**). Les concentrations d'exposition qui en résultent sont évaluées à **218 ng/g**, **894 ng/g** et **2 452 ng/g** pour les traitements **Pyr-0,3X**, **-1X** et **-3X** respectivement, après soustraction du background en Pyr.

Une diminution importante de la charge en Pyr de la matrice sédimentaire a été observée entre le début (T0) et la fin de l'expérience (T10), pouvant atteindre 85 % de la teneur initiale. Les échantillons de sédiment ayant été stockés à température ambiante un certain temps, il n'est pas

possible de déterminer si la perte en Pyr est intervenue au cours de la période d'exposition, du stockage ou de la préparation des échantillons précédant la caractérisation chimique (lyophilisation).

**Tableau 4.5. Concentrations en Pyr et en MePyr dans les sédiments utilisés lors de l'exposition des embryons de Medaka au Pyr et au MePyr**

	$C_{\text{dosée}}$ (ng/g p.s.)		$C_{\text{cible}}$ (ng/g)	$C_{\text{théorique}}$ (ng/g)	$R_{\text{enrobage}}$ (%)
	T0	T10			
<i>Exposition au Pyr / Concentrations en Pyr dans le sédiment</i>					
Pyr-0X	5	1 ± 0,68 a	0	0,00	-
Pyr-0,3X	219	44 ± 7,06 b	270	237	92
Pyr-1X	896	118 ± 16,5 c	900	892	100
Pyr-3X	2454	490 ± 140 d	2700	2907	84
<i>Exposition au MePyr / Concentrations en MePyr dans le sédiment</i>					
MePyr-0X	<0,1	<0,1 a	0	0	-
MePyr-0,3X	183	56 ± 7,16 b	270	231	79
MePyr-1X	577	188 ± 56,3 c	900	847	68
MePyr-3X	1742	645 ± 131 d	2700	2619	67
<b>Valeur du background (ng/g)</b>		<b>Pyr : 1,73 ± 1,65</b>		<b>MePyr : &lt;0,1</b>	

$C_{\text{dosée}}$  : concentration dosée ;  $C_{\text{cible}}$  : concentration sélectionnées pour le test embryolaire ;  $C_{\text{théorique}}$  : concentration attendue après enrobage (après ajustement à la concentration des solutions de contamination et la quantité exacte de matrice dopée) ;  $R_{\text{enrobage}}$  : rendement de l'enrobage. Les données sont présentées, lorsqu'elles s'y prêtent, sous forme de moyenne par condition ± écart-type (N = 3). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres à droite des valeurs concernées : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey)

Les rendements d'enrobage obtenus avec le MePyr sont légèrement inférieurs à ceux du Pyr puisque compris entre 67 % et 79 % (**Tableau 4.5**). Par conséquent, les concentrations d'exposition des embryons sont évaluées à **183 ng/g**, **577 ng/g** et **1 742 ng/g** respectivement pour les traitements **MePyr-0,3X**, **-1X** et **-3X**. Comme pour le Pyr, une diminution comprise entre 60 % et 70 % de la teneur initiale en MePyr des sédiments est observée entre les temps T0 et T10.

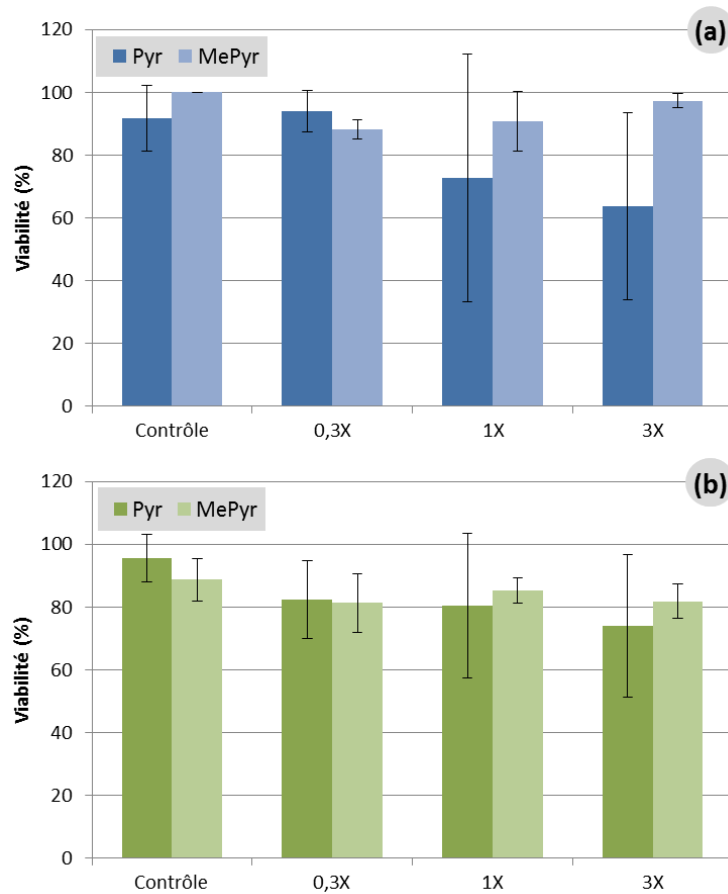
Malgré la réduction de la charge en composé d'intérêt mis en évidence lors des dosages T0 et T10, les concentrations en Pyr ou en MePyr des sédiments sont statistiquement différentes les unes des autres ( $p < 0,05$  selon le test *post-hoc* de Tukey) au sein d'une même série d'exposition.

## 2.3. Résultats du test MELA

### 2.3.1. Toxicité aigüe

La contamination du sédiment à hauteur de 219 ng/g à 2 454 ng/g de Pyr et de 183 ng/g à 1 742 ng/g de MePyr n'a pas affecté significativement la survie des embryons et des larves exposés en comparaison des groupes témoins correspondant. En effet, le taux de survie des embryons exposés au MePyr est compris entre 88 % et 97 % en moyenne pour les groupes contaminés et aucune mortalité embryonnaire n'a été observée dans les réplicats témoin lors de cette série d'exposition (*Figure 4.6.a*). De la même manière, la viabilité larvaire jusqu'au jour 20 pf est supérieure à 80 % pour tous les traitements de l'expérience MePyr (89 %, 81 %, 85 % et 82 % en moyenne pour le contrôle, MePyr-0,3X, -1X et le -3X respectivement, *Figure 4.6.b*).

Les viabilités embryonnaires moyennes observées pour les différents groupes de l'exposition au Pyr ont une légère tendance à la diminution avec l'augmentation de la concentration en Pyr du



**Figure 4.6. Viabilités embryonnaire (a) et larvaire (b) des Medaka après exposition aux sédiments dopés en Pyrène et en Méthylpyrène**

*Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type (N = 3).*

sédiment avec des valeurs de 92 %, 94 %, 73 % et 64 % respectivement pour le traitement contrôle, Pyr-0,3X, -1X et -3X (*Figure 4.6.a*). Ces variations ne sont cependant pas statistiquement significatives selon le test *post-hoc* de Tukey ( $p > 0,05$ ). Des résultats similaires sont obtenus pour la survie des larves dans les 10 j suivant le pic d'éclosion. Les taux de viabilité larvaire moyens sont de 96 %, 82 %, 80 % et 74 % pour les groupes témoins, Pyr-0,3X, -1X et -3X respectivement, et aucune différence statistique n'est mise en évidence entre les différents traitements (*Figure 4.6.b*).

## 2.3.2. Tératogénicité & autres effets sublétaux

### 2.3.2.1. Développement embryonnaire

Au cours des deux séries d'expositions, tous les embryons vivants sont parvenus à éclore. Le taux d'éclosion cumulé moyen de chaque groupe est donc égal au taux de survie embryonnaire observé pour le même traitement. Par conséquent, aucun effet de la contamination en Pyr ou en MePyr n'est mis en évidence pour ce paramètre.

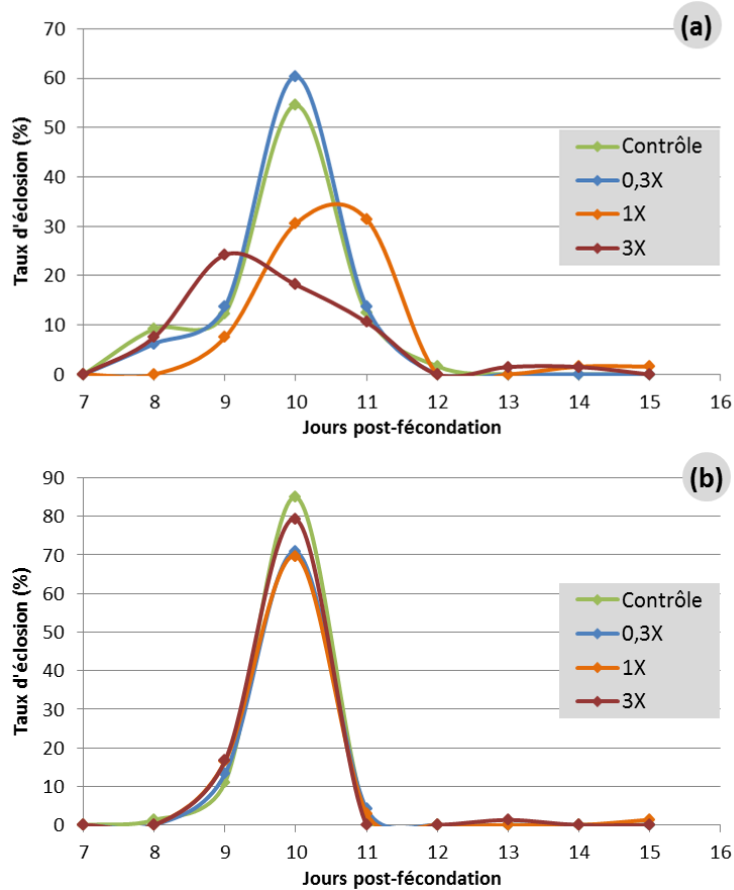
L'évolution du taux d'éclosion journalier moyen pour l'exposition au Pyr, présenté dans la *Figure 4.7.a*, montre néanmoins que la cinétique d'éclosion tend à être modifiée aux deux plus fortes concentrations. En effet, alors que pour les groupes contrôle et Pyr-0,3X, le taux d'éclosion journalier décrit un pic bien net atteignant son maximum au jour 10 pf, les courbes correspondant aux traitements Pyr-1X et -3X présentent une forme plus écrasée et étalée. Malgré cela, aucune différence significative n'est mise en évidence entre les durées du développement embryonnaire moyennes évaluées à 9,84 j pf, 9,87 j pf, 10,2 j pf et 9,75 j pf respectivement pour les groupes témoin, Pyr-0,3X, -1X et -3X (*Figure 4.8*).

Inversement, l'évolution du taux d'éclosion journalier moyen des différents groupes exposés au MePyr est très similaire quel que soit les concentrations considérées : les courbes représentées dans la *Figure 4.7.b* décrivent un pic unique et net centré autour du jour 10 pf. L'allure de ces courbes indique que les différentes concentrations en MePyr testées n'ont pas interférées avec la cinétique d'éclosion des embryons exposés. Entre 84% et 97% des embryons ont éclos au jour 10 pf, ce qui confirme un bon synchronisme dans le développement des individus des différents groupes. Dans la continuité de ces observations, les durées moyennes du développement embryonnaire des poissons exposés au MePyr sont très proches les unes des autres et sont comprises entre 9,39j pf et 9,87 j pf (*Figure 4.8*).

### 2.3.2.2. Activité cardiaque ( $23 \pm 1$ °C)

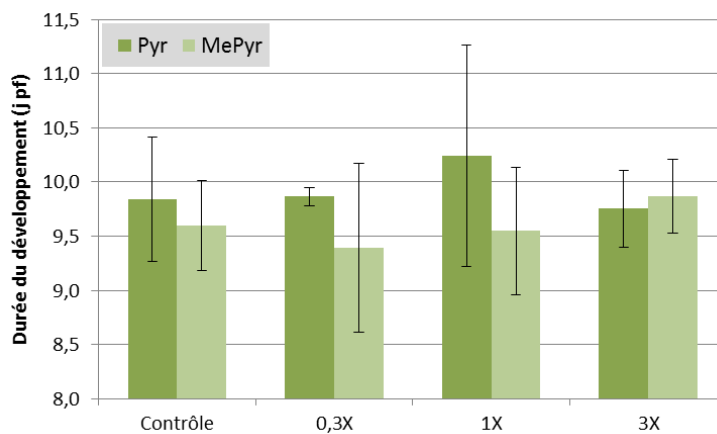
Lors de l'exposition au Pyr, les embryons âgés de 6 j pf des groupes contrôle et Pyr-1X présentent un rythme cardiaque moyen très similaire et égal à  $114 \pm 11$  batt./min et  $113 \pm 5,5$  batt./min respectivement (*Figure 4.9.a*). Pour les traitements Pyr-0,3X et -3X, les individus du même âge ont une activité cardiaque moyenne légèrement plus élevée atteignant respectivement  $120 \pm 7,0$  batt./min et  $123 \pm 5,2$  batt./min. Au jour 7 pf, les embryons des groupes contrôle, Pyr-0,3X et -1X ont un rythme cardiaque moyen très proche les uns des autres, compris entre 113 batt./min et 115 batt./min (*Figure 4.9.b*). L'activité cardiaque moyenne des individus du groupe Pyr-3X reste légèrement plus élevée avec une valeur de  $123 \pm 4,9$  batt./min. Aucun effet significatif du Pyr sur l'évolution de ce paramètre n'est mis en évidence par l'analyse statistique des jeux de données.

Au jour 6 pf, les embryons exposés au MePyr ont un rythme cardiaque moyen compris entre 124 batt./min et 126 batt./min alors que les individus du groupe témoin ont une activité cardiaque



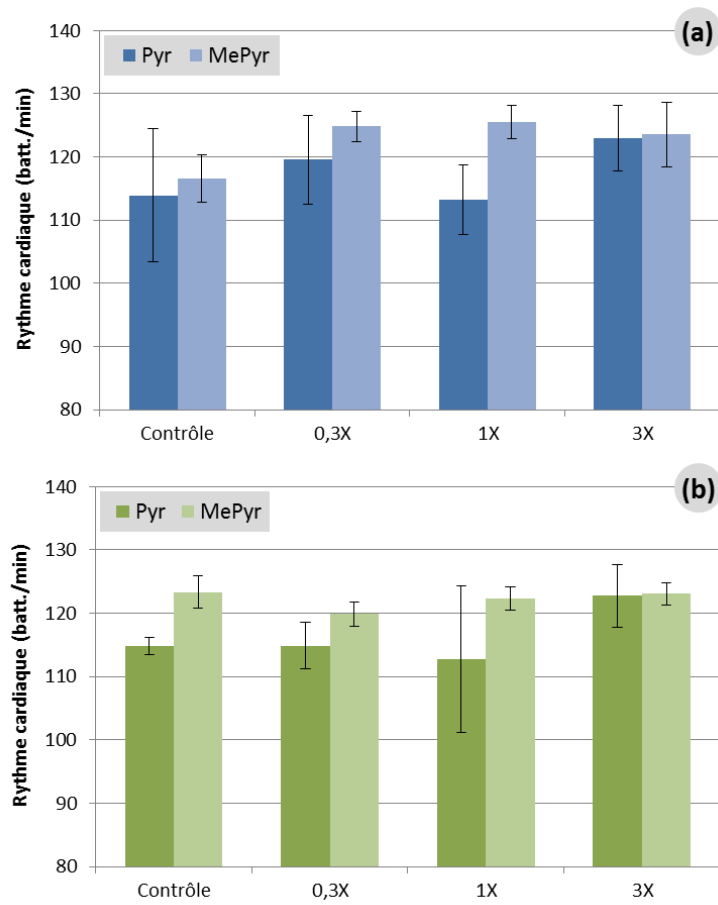
**Figure 4.7. Évolution du taux d'éclosion journalier au cours des expositions aux sédiments dopés en Pyrène (a) et en Méthylpyrène (b)**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition.



**Figure 4.8. Durée du développement embryonnaire des Medakas exposés aux sédiments dopés en Pyrène et en Méthylpyrène**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type (N = 3). Lors du calcul de la durée du développement, le jour de la fécondation des embryons est considéré comme le jour 0 pf.



**Figure 4.9. Activité cardiaque des embryons âgés de 6 j pf (a) et 7 j pf (b) exposés aux sédiments dopés en Pyrène et en Méthylpyrène**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type (N = 3).

légèrement plus basse, évaluée à  $117 \pm 3,7$  batt./min en moyenne (*Figure 4.9.a*). Aucune différence statistique n'est observée entre les différents traitements. Cependant, la valeur de  $p$  entre le groupe MePyr-1X et le traitement témoin est proche du seuil de significativité selon le test *post-hoc* de Tukey ( $p = 0,068$ ).

Au jour 7 pf, l'ensemble des embryons de l'exposition au MePyr montre un rythme cardiaque moyen très similaire quel que soit le traitement considéré, compris entre 120 batt./min et 123 batt./min (*Figure 4.9.b*). L'analyse statistique a confirmé l'absence d'effet induit par le MePyr sur ce paramètre.

### 2.3.2.3. Données biométriques

L'exposition des embryons de Medaka au MePyr n'a pas induit d'altération des différents paramètres biométriques chez les larves à l'éclosion (*Figure 4.10.a, b et c*). En effet, selon le groupe considéré, la longueur totale moyenne des individus éclos varie de 4,86 mm à 4,92 mm, la taille de la tête est comprise entre 1,07 mm et 1,10 mm. Le rapport T/L qui en résulte évolue entre 22,1 % et 22,5 %.

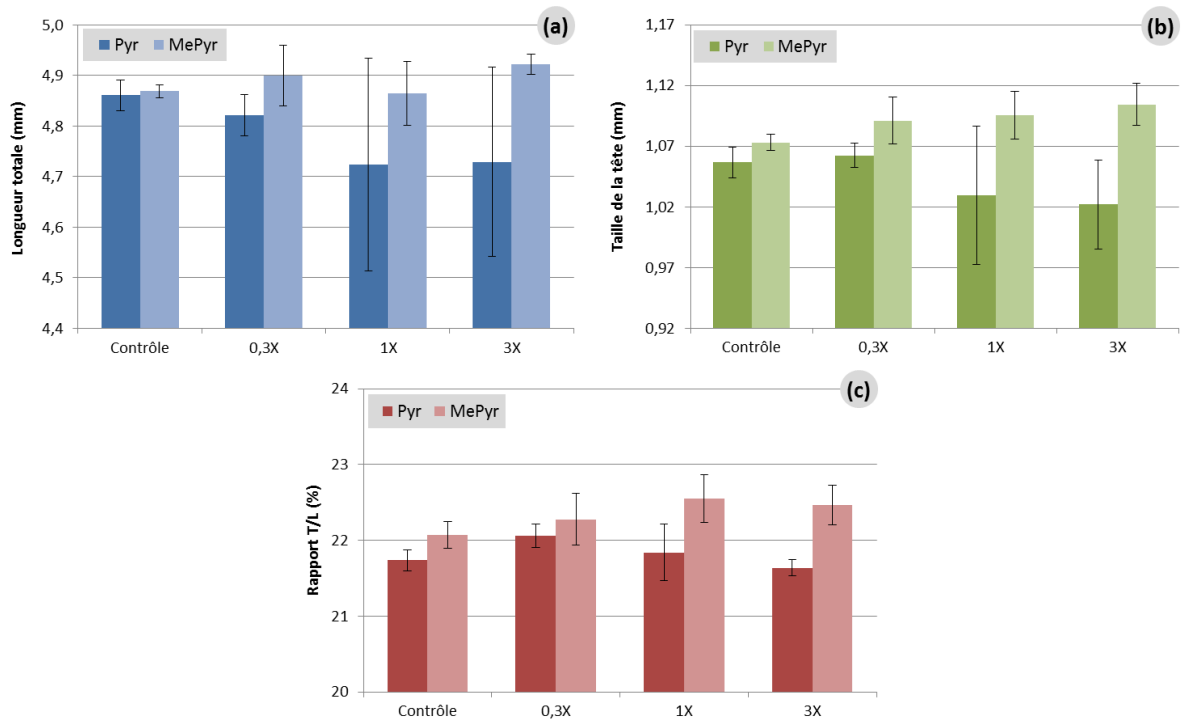
La longueur moyenne des larves exposées au Pyr est légèrement réduite pour les groupes -1X et 3X ( $4,72 \pm 0,21$  mm et  $4,73 \pm 0,19$  mm respectivement) en comparaison du groupe témoin ( $4,86 \pm 0,03$  mm). Cependant, une variabilité plus importante des données biométriques au sein des groupes contaminés ne permet pas de discriminer statistiquement les résultats. De manière similaire, la taille de la tête s'échelonne en moyenne de  $1,06 \pm 0,01$  mm pour le traitement témoin à  $1,02 \pm 0,04$  mm pour la plus forte concentration en Pyr. Cette tendance à la diminution reste très légère et statistiquement non-significative. Les rapports T/L moyens sont relativement stables puisque compris entre 21,6 % et 22,1 %.

### 2.3.2.4. Tératogénicité

Les taux moyens d'individus présentant une ou plusieurs anomalies développementales sont illustrés sur la *Figure 4.11*. Les groupes contrôles des deux séries d'expériences présentent un taux basal moyen d'individus malformés relativement élevé de  $19,7 \pm 14,1$  % et de  $29,1 \pm 3,67$  % respectivement. Le fort pourcentage d'individus présentant des malformations du squelette axial (17 % en moyenne pour les groupes témoins des deux séries d'expositions, **Tableau 4.6**) participe certainement à cette présence non-négligeable de larves malformées au sein des groupes contrôles.

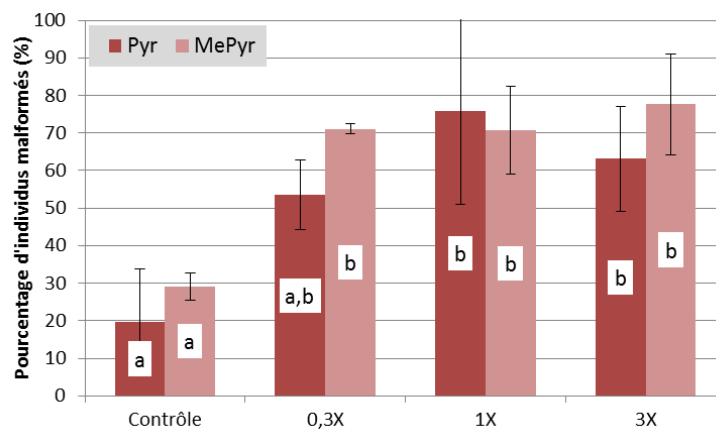
Seules les deux plus fortes concentrations en Pyr testées ont engendré un accroissement significatif ( $p < 0,05$  selon le test de Tukey) d'anomalies du développement en comparaison du traitement contrôle (*Figure 4.11*). Les pourcentages d'individus malformés sont de  $75,9 \pm 25,1$  % et de  $63,1 \pm 14,0$  % dans les groupes Pyr-1X et -3X respectivement. Malgré une élévation du taux de larves malformées à plus de 50 % en moyenne, les résultats du traitement Pyr-0,3X ne sont pas statistiquement différents du groupe témoin. Le taux d'individus présentant des malformations crânio-faciales (majoritairement au niveau de la mâchoire inférieure) et du système cardio-vasculaire (principalement des positionnements et plicatures anormales du cœur) est significativement accru ( $p < 0,05$  selon le test de Tukey) aux concentrations -3X et -1X de Pyr respectivement (**Tableau 4.6**). De plus, le taux d'individus touchés par des anomalies cardio-vasculaires dans le groupe Pyr-3X est proche du seuil de significativité en comparaison du groupe témoin ( $p = 0,08$  selon le test de Tukey).





**Figure 4.10. Mesures biométriques acquises sur les larves nouvellement écloses après exposition aux sédiments dopés en Pyrène et en Méthylpyrène**

Les données biométriques acquises au cours du MELA incluent la longueur totale des larves (a), la taille de la tête (b) et le rapport T/L (c). Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type (N = 3).



**Figure 4.11. Pourcentage d'individus présentant des malformations après exposition aux sédiments dopés en Pyrène et en Méthylpyrène**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type (N = 3). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres au centre des barres : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey).

**Tableau 4.6. Pourcentages d'individus impactés par les différents types de malformations après exposition aux sédiments dopés en Pyrène et en Méthylpyrène**

	Œdèmes	Squelette axial	Cranio-faciale	Œil	Cardio-vasculaire	Sac Vitellin
<i>Exposition au Pyr</i>						
Pyr-0X	2 ± 2,62 %	17 ± 16,8 %	0 ± 0,00 % <i>a</i>	0 ± 0,00 %	6 ± 4,96 % <i>a</i>	0 ± 0,00 %
Pyr-0,3X	0 ± 0,00 %	27 ± 8,92 %	5 ± 5,26 % <i>a,b</i>	0 ± 0,01 %	31 ± 5,30 % <i>a,b</i>	9 ± 11,0 %
Pyr-1X	3 ± 2,96 %	34 ± 24,1 %	10 ± 11,2 % <i>a,b</i>	0 ± 0,00 %	<b>49 ± 17,4 % <i>b</i></b>	42 ± 40,9 %
Pyr-3X	10 ± 8,67 %	26 ± 10,6 %	<b>26 ± 11,6 % <i>b</i></b>	8 ± 14,4 %	42 ± 25,0 % <i>a,b</i>	22 ± 21,0 %
<i>Exposition au MePyr</i>						
MePyr-0X	4 ± 4,00 %	17 ± 3,93 %	5 ± 6,09 %	0 ± 0,01 %	14 ± 8,49 % <i>a</i>	5 ± 4,72 %
MePyr-0,3X	6 ± 5,53 %	34 ± 11,2 %	11 ± 9,99 %	4 ± 3,17 %	<b>45 ± 12,1 % <i>b</i></b>	9 ± 9,11 %
MePyr-1X	5 ± 5,05 %	30 ± 17,2 %	14 ± 5,28 %	0 ± 0,00 %	<b>48 ± 14,8 % <i>b</i></b>	20 ± 9,14 %
MePyr-3X	3 ± 2,42 %	36 ± 14,2 %	5 ± 9,24 %	0 ± 0,00 %	<b>60 ± 12,1 % <i>b</i></b>	7 ± 6,20 %

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition ± écart-type (N = 3). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres à droite des valeurs concernées : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey)

Par ailleurs, le pourcentage de larves nouvellement écloses atteintes de déformations du squelette axial (lordose, scoliose, cyphose et corps arqué) est compris entre 26 % et 34 % au sein des groupes contaminés. Cette tendance à l'augmentation par rapport au groupe contrôle n'est cependant pas significative statistiquement, probablement à cause du fort pourcentage d'individus témoins concernés par ce type de pathologies.

L'exposition au MePyr génère un profil de réponses globalement similaire à celui du Pyr en termes de tératogénicité. En effet, tous les groupes contaminés en MePyr présentent un pourcentage d'individus malformés compris entre 70 % et 78 % significativement plus élevé que le traitement témoin ( $p < 0,05$  selon le test de Tukey), comme l'illustre la [Figure 4.11](#). Cette augmentation semble directement liée à un accroissement du taux d'individus présentant des anomalies cardio-vasculaires (majoritairement des positionnements et plicatures anormales du cœur ainsi que des hypo- ou dystrophies) qui évolue de manière dose-dépendante de 45 ± 12 % au sein du groupe MePyr-0,3X jusqu'à atteindre 60 ± 12 % à la plus forte concentration testée (**Tableau 4.6**). Chez tous les groupes contaminés en MePyr, le taux d'individus touchés par des malformations squelettiques est compris entre 30 % et 36 %. Cependant, de la même manière que lors de l'exposition au Pyr, cette tendance n'est pas statistiquement significative.

## 2.4. Discussion

### 2.4.1. Concentrations en Pyr et en MePyr dans le sédiment

La première étape de la présente étude fut de réaliser un dopage efficace d'une matrice sédimentaire de référence en Pyr et en MePyr. L'enrobage du sédiment a été effectué à l'aide d'un évaporateur rotatif muni d'un bain marie chauffant et de DCM comme solvant à raison de 2 mL/g de sédiment. Cette technique présente de nombreux avantages notamment une bonne homogénéisation du sédiment avec le composé d'intérêt, une évaporation quasi-totale du solvant et une large gamme de concentrations de dopage possibles grâce à l'utilisation d'un solvant organique qui permet d'augmenter la solubilité du HAP étudié.

Il existe actuellement différentes méthodes permettant l'enrobage de sédiment avec des composés hydrophobes qui ont été largement décrites et critiquées dans la revue de Northcott & Jones (2000). Selon ces auteurs, la technique appliquée au cours de notre étude peut, malgré les

avantages qu'elle présente, induire quelques biais lors de l'évaluation de la toxicité des sédiments ainsi dopés. En effet, l'utilisation d'une quantité importante de solvant organique présente un risque de persistance du DCM au sein de la matrice sédimentaire ce qui peut induire d'une part des réponses toxiques chez les organismes test, et d'autre part modifier les propriétés physico-chimiques du sédiment et la biodisponibilité du contaminant. Afin de tenter de limiter au maximum ces effets indésirables, le temps d'évaporation appliqué lors du dopage est relativement long (environ une heure) et ne prend fin que lorsque le sédiment est visuellement complètement sec. Par ailleurs, une fois dopé, le sédiment est conservé toute une nuit sous hotte à température ambiante afin de favoriser la volatilisation des résidus potentiels de DCM. Enfin, puisqu'il est impossible d'empêcher la modification de la matrice sédimentaire par le solvant, nous avons choisi de faire subir le même traitement au sédiment contrôle (le contaminant est remplacé par le même volume de solvant). Les éventuels effets toxiques mis en évidence chez les embryons exposés au sédiment dopé sont ensuite systématiquement comparés à ceux observés pour le groupe témoin exposé au solvant seul.

D'après Northcott & Jones (2000), quelle que soit la procédure de dopage choisie, celle-ci induit inexorablement des biais expérimentaux lors de l'évaluation de la toxicité d'une substance dopée sur une matrice sédimentaire par rapport au même sédiment contaminé dans des conditions naturelles. Comme discuté dans le cas des métaux lourds, il convient de garder à l'esprit ce phénomène lors de l'exploitation des résultats issus des tests de toxicité utilisant des sédiments dopés.

L'efficacité du protocole de dopage a été confirmée par des rendements d'enrobage du sédiment d'Yville relativement élevés pour les deux composés, compris entre 84 % et près de 100 % pour le Pyr et 67 % à 79 % pour le MePyr. Inversement, les rendements d'enrobage obtenus avec le sédiment de Marcenac sont extrêmement faibles avec des valeurs de 13 % et 20 % respectivement pour les deux HAP étudiés. Il semblerait que ces variations de l'efficacité d'enrobage proviennent de la nature différente des deux sédiments. En effet, il est maintenant largement établi que les HAP s'adsorbent différemment sur les particules sédimentaires en fonction de leur répartition granulométrique ainsi que de la nature et la qualité de la matière organique du sédiment (Ghosh *et al.*, 2000). Par ailleurs, le sédiment de Marcenac présente des teneurs en éléments métalliques plus importantes que celui d'Yville (voir *Chapitre 3, paragraphe 2.2.3.1*). Or, les métaux et les HAP ont une même affinité particulière pour la matière organique. Il est donc envisageable que les composés métalliques naturellement présents dans le sédiment de Marcenac occupent déjà une partie des sites de fixation potentiels des HAP, limitant ainsi leur adsorption à court-terme lors de la procédure d'enrobage.

Le dopage du sédiment d'Yville a permis d'obtenir des concentrations d'exposition en Pyr et en MePyr proches des valeurs cibles. Cependant, la caractérisation chimique de ces sédiments après exposition (T10) a mis en évidence une diminution importante de la charge en composés d'intérêt. Cette perte a pu représenter jusqu'à 85 % de la valeur initiale (T0). Au cours de la période d'exposition, un phénomène de photolyse des composés organiques a pu avoir lieu. Ce phénomène a déjà été rapporté dans la littérature pour le Pyr présent dans les eaux de surface et dans les couches supérieures des sols (Zhang *et al.*, 2010 ; Jacobs *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'un des processus clé de la dégradation des HAP dans les sédiments est la biodégradation par la flore microbienne. Les bactéries *Mycobacterium vandaalenii* PYR-1 peuvent minéraliser jusqu'à 80 % du Pyr contenu dans les sédiments en moins de 15 j selon les travaux de Cui *et al.* (2011). Les profils d'oxygène mesurés dans

les sédiments, sous des conditions d'exposition similaires à celles appliquées dans cette étude, semblent indiquer un développement de microorganismes au sein des matrices sédimentaires dans les jours qui suivent la réhumidification du sédiment. Cependant, nous n'avons pas effectué d'étude microbiologique permettant d'affirmer ou non la présence d'une flore microbienne capable de dégrader les HAP. Par ailleurs, Zhao *et al.* (2009) ont montré que le taux d'extraction du Pyr dopé dans des sols pouvait être réduit jusqu'à 40 % à 60 % sur une période d'environ un mois, lors d'un stockage sous forme sèche, stérile et à l'obscurité dans des flacons scellés. Ces auteurs attribuent cette réduction de l'extractabilité du Pyr à sa diffusion dans les micropores du sol, aux changements de répartition avec la matière organique du sol ou à d'autres processus impliqués dans le phénomène de vieillissement du sol. Pour ce qui concerne notre étude, une adsorption des HAP sur les parois en plastique des boîtes de Petri d'exposition a pu également engendrer une diminution de la concentration en Pyr et MePyr dosée dans les sédiments.

Malheureusement, au cours de la présente étude, les analyses chimiques des sédiments après exposition (T10) ayant été entreprise plusieurs semaines après la date de prélèvement (alors que les dosages T0 ont été effectués dans les jours qui ont suivi le dopage), il nous est impossible de définir si la perte et/ou dégradation des composés a eu lieu pendant l'expérience et/ou lors de l'étape de stockage (-20 °C) ou de préparation des échantillons avant analyse (lyophilisation).

Le dopage en Pyr et en MePyr a conduit à des concentrations initiales dans le sédiment d'Yville de 218 ng/g et 183 ng/g pour le traitement 0,3X, de 894 ng/g et 577 ng/g pour la condition 1X et de 2 552 ng/g et 1 742 ng/g pour la concentration 3X respectivement pour le HAP parent et son dérivé alkylé.

#### 2.4.2. Estimation de la concentration en HAP dans la colonne d'eau et toxicité aiguë

Selon les travaux de Geffard *et al.* (2003) sur les larves d'huîtres *Crassostrea gigas* exposées à des sédiments contaminés en polluants organiques, la biodisponibilité des HAP serait fortement corrélée à leur solubilité (dépendante du coefficient de partage octanol-eau,  $K_{ow}$ ) impliquant que seule la fraction de HAP dissoute serait bioaccumulable et donc toxique pour les organismes. Des résultats similaires sont rapportés par Sverdrup *et al.* (2002) lors de l'exposition de collemboles *Folsomia fimetaria* à des sols artificiellement dopés en divers HAP. Ces auteurs proposent d'ailleurs des équations permettant d'estimer la concentration en HAP dans l'eau à partir de leur teneur dans les sols, du coefficient  $K_{ow}$  et de la teneur en carbone organique du sol. Nous avons appliqué ces formules aux différents traitements testés dans la présente étude et les teneurs en Pyr et en MePyr issues de cette estimation sont présentées dans le **Tableau 4.7**.

D'après ce modèle, le dopage du sédiment d'Yville effectué au cours de la présente étude conduirait à des concentrations dans la colonne d'eau comprises entre 2,36 µg/L et 26,5 µg/L pour le Pyr et entre 1,05 µg/L et 10,0 µg/L pour le MePyr, selon la teneur initiale du sédiment en HAP.

Cependant, ces valeurs ne sont que purement indicatives car certaines incertitudes et/ou inexactitudes sont inhérentes à cette estimation comme discuté dans la première partie de ce chapitre (voir *paragraphe 1.1*). L'utilisation de ces concentrations extrapolées pour déterminer les doses d'exposition des organismes et établir des LOEC/NOEC suppose que seule la fraction dissoute des HAP est biodisponible pour les organismes aquatiques exposés à ces composés en présence ou non de sédiment. Comme mentionné précédemment, cette hypothèse est supportée par plusieurs

travaux (par exemple, Carls *et al.*, 2008 ; Geffard *et al.*, 2003). Cependant, d'autres études semblent montrer que la phase dissoute n'est pas le seul vecteur de contamination des embryons exposés à des sédiments contaminés et qu'une partie des effets toxiques induits pourrait être liée au simple contact des embryons avec un substrat contaminé (Hollert *et al.*, 2003 ; Kocan *et al.*, 1996). Les concentrations estimées en HAP dissous ne seront donc ici utilisées qu'à titre indicatif afin de situer globalement les niveaux d'exposition de la présente étude par rapport aux données de la littérature.

**Tableau 4.7. Estimation des concentrations en Pyr et en MePyr dans la phase aqueuse selon les travaux de Sverdrup *et al.* (2002)**

	log $K_{ow}$	log $K_{oc}$	$K_d$
Pyrène	5,20 <sup>(1)</sup>	4,82 <sup>(1)</sup>	92,5 <sup>(4)</sup>
Méthylpyrène	5,48 <sup>(2)</sup>	5,09 <sup>(3)</sup>	174 <sup>(4)</sup>
	Concentration dosée dans le sédiment (ng/g, T0)	Concentration estimée dans l'eau <sup>(5)</sup> (µg/L)	
Pyr-0,3X	218	2,36	
Pyr-1X	894	9,67	
Pyr-3X	2452	26,5	
MePyr-0,3X	183	1,05	
MePyr-1X	577	3,32	
MePyr-3X	1742	10,0	

(1) valeur utilisée par Sverdrup *et al.* (2002) ; (2) valeur prédite par l'US-EPA EPI suite™ ; (3) valeur calculée selon l'équation établie par Sverdrup *et al.* (2002) :  $\log K_{oc} = 0,8613 \times \log K_{ow} + 0,374$  ; (4) valeur calculée selon l'équation établie par Sverdrup *et al.* (2002)  $K_d = K_{oc} \times CO$  où  $CO$  est la fraction de carbone organique du sédiment égale à 0,0014 pour le sédiment d'Yville (voir Chapitre 3 paragraphe 2.2.2) ; (5) valeur estimée selon la formule  $[eau \mu g/L] = [sédiment ng/g]/K_d$ . N.B. :  $K_{ow}$  est le coefficient de partage n-octanol/eau ;  $K_{oc}$  est le coefficient de partage carbone organique du sédiment/eau ;  $K_d$  est le coefficient de partage sédiment/eau.

Le Pyr et le MePyr, même aux plus fortes doses, n'ont pas induit d'effet léthal chez les embryons et larves de Medaka, malgré une légère tendance à la diminution de la viabilité observée pour les deux plus fortes concentrations en Pyr. De façon similaire, le succès d'éclosion et la durée du développement embryonnaire n'ont pas été altérés significativement par l'exposition aux deux HAP en comparaison du traitement témoin. Ces résultats sont en accord avec les observations de Hendon *et al.* (2008) qui ont exposé des embryons et larves de *Cyprinodon variagatus* à des concentrations en Pyr comprises entre 20 µg/L et 150 µg/L durant 18 j pf. En effet, ces auteurs rapportent des effets létaux chez les embryons et larves exposées seulement à partir de 60 µg/L de Pyr. Une réduction du succès d'éclosion n'est notable que pour la plus forte dose et aucun traitement n'induit d'altération de la durée du développement du *C. variagatus*. Cependant, une augmentation significative de la mortalité des larves de *Sebastiscus marmoratus* a été observée après 8 j d'exposition à seulement 1 µg/L de Pyr (Li *et al.*, 2011a). Ces résultats semblent indiquer une grande différence de sensibilité inter-espèces au Pyr.

À notre connaissance, aucune donnée toxicologique n'est disponible concernant les effets du MePyr chez le poisson ce qui ne nous permet pas de comparer nos données à celles de la littérature.

### 2.4.3. Tératogénicité du Pyr et du MePyr

L'activité cardiaque des embryons exposés au Pyr et au MePyr n'a pas été modulée significativement par ces composés. Cette observation est cohérente (tout du moins pour le Pyr) avec les résultats rapportés chez des embryons de *D. rerio* exposés à environ 1 mg/L de Pyr pour lesquels la fréquence et le rythme cardiaque n'a pas été notablement impactée par ce HAP (Incardona *et al.*,

2004). Néanmoins, le système cardio-vasculaire n'a pas été totalement insensible suite à l'exposition au Pyr et au MePyr. En effet, les deux composés ont induit un accroissement significatif des pathologies cardiaques incluant majoritairement des positionnements et plicatures anormales du cœur ainsi que des hypo- ou dystrophies de cet organe. Ces symptômes ont été particulièrement marqués chez les individus exposés au MePyr dès la plus faible concentration testée. A l'inverse, des malformations de la mâchoire inférieure ont été spécifiquement induites chez les larves exposées au Pyr-3X. Enfin, le pourcentage d'individus présentant des déformations du squelette axial s'élève de 26 % à 37 % après exposition au Pyr et jusqu'à 36 % pour le MePyr. Cependant, en raison d'un niveau basal relativement élevé de ces anomalies du développement (17 % en moyenne) au sein du groupe témoin, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence statistique entre les traitements.

Les pathologies cardiaques engendrées par le Pyr et le MePyr au cours de la présente étude chez les larves de Medaka sont très similaires à celles décrites par Antkiewicz *et al.* (2005) après exposition d'embryons de *D. rerio* à la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD). En effet, ces auteurs rapportent une plicature du cœur altéré par la dioxine résultant en un positionnement relatif anormal du ventricule et de l'atrium. La taille du cœur est également réduite lors de l'exposition à ce composé et une dystrophie des deux chambres cardiaques est également observée par rapport aux individus contrôles. Un tel parallèle entre les effets de la TCDD et du Pyr a déjà été mis en évidence chez le *D. rerio* par plusieurs auteurs (Incardona *et al.*, 2006 ; Incardona *et al.*, 2005 ; Incardona *et al.*, 2004). Cependant, chez cette espèce, le Pyr induit plus particulièrement un syndrome d'anémie, une altération de la circulation vasculaire périphérique au niveau de la tête et du tronc (Incardona *et al.*, 2004) et la formation d'œdèmes péricardiques et périvitellins (Incardona *et al.*, 2005). A l'inverse, l'exposition des embryons de *D. rerio* au phénanthrène (HAP tricyclique) et au benzo[*a*]anthracène (Incardona *et al.*, 2006) conduit à des pathologies cardiaques similaires à celles décrites dans notre étude et celle de Antkiewicz *et al.* (2005).

Toujours chez les embryons de *D. rerio*, la présence de morpholino *ahr2* procure une certaine résistance face aux effets létaux et morphologiques induits par le Pyr (Incardona *et al.*, 2005). De manière surprenante, au cours de la même étude, les auteurs rapportent que le morpholino *cyp1A* permet certes de contrecarrer certaines conséquences tératogènes du Pyr, comme la formation d'œdèmes par exemple, mais ne fait que retarder de plusieurs heures la létalité induite par ce composé. En 2006, ces mêmes auteurs complètent ces travaux en démontrant que la neutralisation de l'induction de *ahr1a* prévient des dommages hépatiques, de l'apparition d'œdèmes et de l'induction de la mort des cellules du tube neural mais ne permet pas d'empêcher le développement de malformations squelettiques, l'induction de CYP1A au niveau de l'endothélium vasculaire, ni *in fine* la mort des individus exposés même si celle-ci est à nouveau retardée de plusieurs heures et peut-être liée à une perte d'efficacité du morpholino (Incardona *et al.*, 2006). Les résultats recueillis lors de ces études suggèrent que (1) l'induction de l'activité hépatique de CYP1A est fortement impliquée dans la toxicité systémique du Pyr, probablement par l'intermédiaire de la production d'un métabolite toxique ou d'ERO ; (2) la métabolisation du Pyr au niveau de l'endothélium vasculaire peut également contribuer à l'induction de certains effets tératogènes, notamment l'apparition de courbures de la colonne vertébrale ; (3) la similitude des effets induits par le Pyr et la TCDD suggère des mécanismes d'action similaires, en relation étroite avec la voie de signalisation de l'Ahr (Incardona *et al.*, 2006 ; Incardona *et al.*, 2004).

Contrairement à ce qui est rapporté par Incardona *et al.* (2005), l'exposition des embryons de Medaka à la plus forte dose de Pyr a induit une augmentation significative de l'occurrence des malformations des mâchoires, notamment inférieure. Ces mêmes effets tératogènes ont été rapportés chez les larves de *Sebastiscus marmoratus* exposées au Pyr, au B[a]P et au phénanthrène (Li *et al.*, 2011a) et chez les embryons de *D. rerio* exposés à la TCDD (Teraoka *et al.*, 2002). Selon cette dernière étude, la TCDD agirait dans un premier temps directement sur la mâchoire en inhibant son développement puis, dans un second temps, une perturbation du flux sanguin viendrait appuyer cet effet. De plus, une induction de l'expression du gène *ahr2* est également observée au niveau des mâchoires déformées par la TCDD suggérant une implication de cette voie métabolique dans l'apparition des effets tératogènes cranio-faciaux de ce composé, indépendamment de l'insuffisance circulatoire au moins jusqu'à 72 h pf chez le *D. rerio* (Teraoka *et al.*, 2002).

L'apparition de malformations cranio-faciales n'a pas été induite en présence du MePyr ce qui semble montrer que cet effet est spécifique du Pyr, dans notre étude. Cependant, alors que pour ce dernier composé les anomalies cardiovasculaires n'apparaissent significativement qu'à la concentration 1X, le MePyr engendre une augmentation notable de l'occurrence de ce type de pathologie dès la plus faible concentration testée. En conséquence, le pourcentage d'individus morphologiquement impactés par la contamination augmente significativement dès 183 ng/g de MePyr mais seulement à partir de 894 ng/g de Pyr. Ces résultats semblent indiquer une tératogénicité accrue du dérivé alkylé en comparaison du HAP parent. Turcotte *et al.* (2011) notent également une embryotoxicité des alkyl-phénanthrènes plus importante que le phénanthrène non-substitué, avec des effets rappelant également ceux de la dioxine chez les embryons de Medaka japonais *O. latipes*.

Une fois encore, le pourcentage d'individus malformés s'est avéré le paramètre le plus sensible lors d'une exposition d'embryons de Medaka à des sédiments contaminés en Pyr et en MePyr. Ce marqueur a donc été utilisé pour évaluer les LOEC pour ces composés qui ont été évaluées respectivement à **894 ng/g** et **183 ng/g**. Aucune valeur de LOEC ou NOEC n'est définie pour le Pyr concernant le compartiment sédimentaire par la DCE (UE, 2005a). Par contre, il existe une valeur de NOEC pour les sols établie à 13 µg/g de Pyr qui résulte en une PNEC de 1,3 µg/g. Les LOEC issues de notre étude sont bien inférieures en comparaison de ces estimations. Cependant, la valeur de LOEC déterminée pour le Pyr est comprise entre la valeur TEC (threshold effect concentration) de 195 ng/g et la valeur PEC (probable effect concentration) de 1 520 ng/g établit par MacDonald *et al.* (2000). Le fait que la LOEC obtenue chez les embryons de Medaka soit supérieure à la concentration en dessous de laquelle des effets nocifs sont peu probables et inférieure à celle au-delà de laquelle des effets nocifs sont probables dénote une bonne sensibilité du test MELA pour l'évaluation de la toxicité de ce HAP dans les sédiments.

### 3. ANALYSE CROISEE DES EFFETS EMBRYOTOXIQUES ET DES REPONSES BIOMOLECULAIRES APRES EXPOSITION AU PYRENE ET AU METHYLPYRENE

---

L'analyse de l'expression de gènes cibles après exposition des embryons de Medaka à des sédiments artificiellement contaminés par un élément métallique modèle, le Cd, a permis de mettre

en évidence la perturbation de différents processus physiologiques notamment le métabolisme mitochondrial, la régulation du cycle cellulaire et les réparations des dommages à l'ADN. L'utilisation de la technique de RT-PCR s'est ainsi avérée performante et prometteuse dans le cadre de l'étude des mécanismes de toxicité d'un xénobiotique chez les SPD poisson.

Au cours de la présente étude, nous avons souhaité conserver cette approche biomoléculaire pour tenter d'approfondir les connaissances actuelles concernant les mécanismes d'action de deux HAP environnementaux relativement peu étudiés chez les SPD poisson. Les effets de la contamination artificielle de sédiments en Pyr et MePyr sur l'expression de gènes cibles ont été étudiés à deux moments clés du développement du Medaka japonais : à la fin de l'organogénèse (au jour 7 pf) et à l'éclosion (aux alentours du jour 9 pf). Le potentiel génotoxique des deux polluants organiques a également été évalué par le test comète sur des larves âgées de 48 h post-éclosion (soit au jour 12 pf). Afin de pouvoir proposer une analyse croisée des effets embryotoxiques et génotoxiques du Pyr et du MePyr, les mêmes paramètres « phénotypiques » (viabilité, taux d'éclosion, durée de développement, biométrie, malformations et rythme cardiaque) que lors de la première série d'expositions ont été suivis. Nous avons choisi d'étudier les effets génotoxiques au sens large des deux HAP sélectionnés potentiellement induits par la plus faible (**0,3X = 270 ng/g p.s.**) et la plus forte concentration (**3X = 2700 ng/g p.s.**) pour lesquelles des effets tératogènes ont été mis en évidence lors de la première exposition.

### 3.1. Choix des gènes étudiés

Compte tenu des mécanismes d'action connus du Pyr et du MePyr ainsi que des HAP en général (voir *partie 1* de ce chapitre), 12 gènes d'intérêt dont les séquences codantes sont disponibles sur les bases de données spécialisées, ont été sélectionnés de manière à étudier les effets de ces composés sur une large gamme de processus cellulaires potentiellement impactés par ces substances :

- ✓ La chaîne respiratoire mitochondriale : cytochrome c oxydase sous-unité I du complexe IV (*coxI*).
- ✓ Les mécanismes de métabolisation : métabolisation des xénobiotiques par la voie du cytochrome P450-1A (*cyp1A*).
- ✓ Les systèmes antioxydants : superoxyde dismutase cytosolique à cofacteur Cu et Zn (*sodCu*) et mitochondriale à cofacteur Mn (*sodMn*)
- ✓ Les mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire et d'apoptose : le gène suppresseur de tumeur *p53* et le gène codant la protéine pro-apoptotique de la famille Bcl (*bax*).
- ✓ Les processus du développement embryonnaire : le gène *wnt1* impliqué dans la somitogénèse et la prolifération cellulaire de manière générale.
- ✓ Les systèmes de réparation de l'ADN : le gène *ogg1* spécifique des réparations des lésions oxydatives des bases de l'ADN telles que la 8-oxodG.
- ✓ Le métabolisme de la vitamine A : le gène *raldh2* (Rétinaldéhyde déshydrogénase 2, également appelé *aldh1a2*, aldéhyde déshydrogénase famille 1 membre A2) codant pour l'enzyme nécessaire à la production d'acide rétinoïque à partir du rétinol ; les récepteurs



nucléaires de l'acide rétinoïque *rara1* et *rary1* ainsi que le récepteur X des rétinoïdes *rxra1*.

Le gène  *$\beta$ -actine* a été utilisé comme gène de référence.

## 3.2. Protocole expérimental

Le protocole expérimental appliqué lors de l'évaluation des effets génotoxiques au sens large du Pyr et du MePyr sur les SPD du Medaka est globalement similaire à celui présenté dans le *Chapitre 3 paragraphe 4.2*. Une nouvelle fois, l'ensemble du matériel utilisé (boîtes d'exposition, quantités de sédiment et de milieu...) a été adapté au nombre d'embryons exposés afin que les conditions d'exposition soient au maximum identiques à celles appliquées lors des expériences précédentes.

### 3.2.1. Conditions d'exposition

Les quantités de matériel biologique nécessaires à l'analyse de la génotoxicité du Pyr et du MePyr sont synthétisées dans le **Tableau 4.8**.

**Tableau 4.8. Quantités de matériel biologique nécessaires aux analyses moléculaires entreprises après exposition des embryons au Pyr et au MePyr**

Analyse	Nb. d'individus par prélèvement	Nb. de prélèvement par réplicat	Nb. d'individus total par réplicat
RT-PCR	8	3	24
Test comète	5	1	5
		<b>TOTAL</b>	<b>29</b>

Lors de la première exposition, le Pyr a montré une tendance à la réduction de la survie embryonnaire et larvaire à partir de la concentration 1X testée. Afin de pallier cet effet tout en garantissant la possibilité de suivre les réponses phénotypiques sans compromettre l'analyse des effets génotoxiques, le nombre d'individus par réplicat a été augmenté de 30 à 70 embryons. Comme précédemment, chaque condition d'exposition (0X : contrôle ; Pyr-0,3X : 270 ng/g ; Pyr-3X : 2 700 ng/g ; MePyr-0,3X : 270 ng/g ; MePyr-3X : 2 700 ng/g) a été reproduite en six réplicats dans le but d'effectuer les prélèvements indépendamment sur les deux stades de développement sélectionnés et sur trois réplicats expérimentaux à chaque stade. L'ensemble des conditions d'exposition appliquées au cours de cette étude sont présentées dans le **Tableau 4.9**.

Ces ajustements ont porté le nombre total d'embryons nécessaires à cette expérience à 2 100 individus. En raison de ce nombre élevé, les embryons de Medaka ont été fournis par le GIS-AMAGEN. Dès réception et après le tri de ceux-ci, les embryons âgés de 24 h pf ont été exposés selon le protocole décrit dans le *Chapitre 2 au paragraphe 6.1*, sans renouvellement d'ERS (le niveau à seulement été complété au besoin).

**Tableau 4.9. Conditions d'exposition appliquées lors de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par le Pyr et le MePyr chez les embryons de Medaka**

Nb. Conditions traitées	Nb. Réplicats par condition	Ø BP (mm)	Nb. Emb.	Stade	M <sub>sed</sub> (g p.s.)	V <sub>h</sub> ERS (mL)	V <sub>i</sub> ERS (mL)	T <sub>incub</sub> (°C)	Photop. (j/n)
5	6	55	70	1 j pf	12	4,5	2,5	26 °C	12 h/12 h

Ø BP : diamètre de la boîte de Pétri d'exposition ; Nb. Emb. : nombre d'embryons exposés par réplicat ; M<sub>sed</sub> : masse de sédiment par réplicat en gramme de poids sec ; V<sub>h</sub> ERS : volume d'ERS ajouté pour humidifier le sédiment de chaque réplicat ; V<sub>i</sub> ERS : volume d'ERS ajouté dans un réplicat pour immerger les embryons ; T<sub>incub</sub> : température d'incubation des embryons pour toute la durée du test ; Photop. : photopériode appliquée pour toute la durée du test en h de jour/h de nuit.

### 3.2.2. Paramètres suivis et prélèvements

L'ensemble des paramètres suivis et des analyses effectuées au cours de ce test, ainsi que leur cinétique de mesure est présenté dans le **Tableau 4.10**.

Les échantillons de sédiments (5 g p.s.) destinés aux dosages du Pyr et du MePyr à T0, T7 (3 réplicats) et T9 (3 réplicats) sont prélevés comme indiqué au *paragraphe 2.1.2* de ce chapitre. À T7 et T9, une fois les prélèvements biologiques effectués, l'ERS des trois réplicats de chaque condition est poolé dans un tube à centrifuger en verre pyrolysé, maintenu à 4 °C et à l'obscurité puis centrifugé à environ 3 500 xg pendant 15 minutes à 15 °C. Le surnageant est récupéré et placé dans une bouteille en verre de 50 mL pour être congelé et stocké à -20 °C jusqu'à analyse. Par ailleurs, un prélèvement d'ERS à T0 (20 mL d'ERS vierge) également destiné à la caractérisation chimique a été effectué puis conditionné et stockés dans les mêmes conditions.

**Tableau 4.10. Paramètres étudiés lors de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par le Pyr et le MePyr chez les embryons de Medaka**

Paramètre/Analyse	Matrice concernée	Cinétique de mesure	Donnée dérivée
Caractérisation chimique	Sédiment ERS	T0 (avant exposition) T7 (prélèvement) T9 (fin exposition)	Suivi de la contamination
RT-PCR*	Embryons Larves	T7 (prélèvement) T9 (fin exposition)	Expression génique
Viabilité	Embryons	Tous les jours	Viabilité embryonnaire
Rythme Cardiaque**	Embryons	Jour 6 et 7 pf	Activité Cardiaque
Éclosions***	Embryons Larves	Tous les jours	Taux d'éclosion Durée du développement
Données biométriques****	Larves	Jour d'éclosion	Longueur totale Taille de la tête Rapport T/L
Malformations*****	Larves	Jour d'éclosion	Occurrence des malformations
Dommages ADN (Test Comète)*****	Larves	2 j post-éclosion	Pourcentage d'ADN dans la queue

*N.B. : Toutes les observations sont effectuées sur l'ensemble des individus (embryons et/ou larves) de chaque réplicat sauf indication contraire ci dessous.*

*\* Analyse effectuée sur 3 pools de 8 individus par réplicat (N=3) et par temps de prélèvement*

*\*\* Mesure effectuée sur 5 embryons par réplicat (N=3)*

*\*\*\* Observation effectuée sur l'ensemble des individus de 3 réplicats par condition*

*\*\*\*\* Mesure effectuée sur 15 larves par réplicat (N=3)*

*\*\*\*\*\* Analyse effectuée sur un pool de 5 larves par réplicat (N=3)*

*N.B. : l'arrêt de l'exposition a lieu au moment du pic d'éclosion, lorsque tous les prélèvements ont été faits. L'expérience prend fin dès que les prélèvements destinés au test comète ont été effectués.*

Les prélèvements biologiques destinés aux analyses par RT-PCR ainsi que le suivi des différents marqueurs phénotypiques sont effectués comme décrit dans le *Chapitre 3 paragraphe 4.2.2*. Les pools de larves âgées de 12 j pf destinés au test comète sont prélevés comme décrit dans le *paragraphe 2.1.2 du Chapitre 3*.

Par ailleurs, un suivi de l'oxygène dissous à l'interface ERS-sédiment a été effectué durant toute la période d'exposition des embryons (soit environ 10 j pf). Les mesures ont confirmé une bonne oxygénation du milieu, supérieure à 80 % de saturation pendant toute la durée du test sur sédiment.

### 3.3. Concentrations en HAP dans le sédiment et l'ERS

Les résultats de la caractérisation chimique des sédiments effectuée au cours de cette étude pour les différents temps de prélèvements (T0, T7 et T9) sont présentés dans le **Tableau 4.11**.

Les procédures d'enrobage du sédiment appliquées dans cette étude ont montré une efficacité de dopage comparable à celle obtenue précédemment pour le Pyr et le MePyr. Il en résulte des concentrations d'exposition égale à **248 ng/g** pour le traitement **Pyr-0,3X** et de **2 769 ng/g** pour **Pyr-3X** après soustraction du niveau basal en Pyr du sédiment d'Yville (rendements d'enrobage respectif de 82 % et 92 %). Concernant le MePyr et conformément à ce qui a été observé précédemment, les concentrations d'exposition sont légèrement inférieures avec des teneurs en MePyr de **202 ng/g** pour la condition **MePyr-0,3X** et de **2 586 ng/g** pour le traitement **MePyr-3X** (efficacité de dopage de 70 % et 88 % respectivement).

**Tableau 4.11. Concentrations en Pyr et MePyr dans les sédiments utilisées lors de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par le Pyr et le MePyr chez les embryons de Medaka**

	<b>C<sub>dosée</sub> (ng/g p.s.)</b>			<b>C<sub>cible</sub> (ng/g)</b>	<b>C<sub>théorique</sub> (ng/g)</b>	<b>R<sub>enrobage</sub> (%)</b>
	T0	T7	T9			
<i>Concentrations en Pyrène</i>						
Contrôle	< 0,1.	(1)	(1)	0	0	-
Pyr-0,3X	250	(1)	(1)	270	301	82
Pyr-3X	2770	(1)	(1)	2700	3008	92
MePyr-0,3X	62	(1)	(1)	0	0	-
MePyr-3X	< 0,1	(1)	(1)	0	0	-
<i>Concentrations en Méthylpyrène</i>						
Contrôle	< 0,1	(1)	(1)	0	0	-
Pyr-0,3X	< 0,1	(1)	(1)	0	0	-
Pyr-3X	< 0,1	(1)	(1)	0	0	-
MePyr-0,3X	202	(1)	(1)	270	290	70
MePyr-3X	2586	(1)	(1)	2700	2946	88
<b>Valeur du background (ng/g p.s.) Pyr : 1,73 ± 1,65 MePyr : &lt; 0,1</b>						

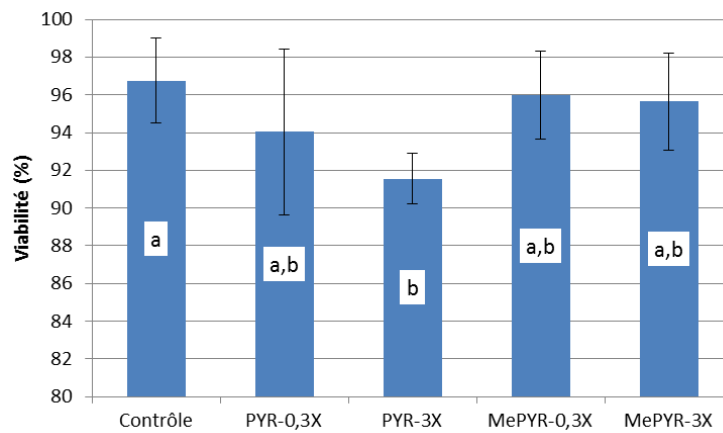
(1) : en cours d'analyse au sein de l'équipe « AQUA » du LPTC sous la direction du DR1 H. Budzinski ; C<sub>dosée</sub> : concentration dosées ; C<sub>cible</sub> : concentration sélectionnées pour le test embro-larvaire ; C<sub>théorique</sub> : concentration attendue après enrobage (après ajustement à la concentration des solutions de contamination et la quantité exacte de matrice dopée) ; R<sub>enrobage</sub> : rendement de l'enrobage.

Les analyses de l'ERS sont en cours au sein de l'équipe au sein de l'équipe « AQUA » du LPTC sous la direction du DR1 H. Budzinski.

### 3.4. Toxicité et modification du profil d'expression génique

#### 3.4.1. Toxicité aigüe

Comme lors de la série d'exposition précédente, l'exposition au Pyr induit une réduction dose-dépendante de la survie moyenne des embryons exposés. Cette diminution de la viabilité embryonnaire est significative ( $p < 0,05$  selon le test de Tukey) pour le traitement Pyr-3X ( $91,6 \pm 1,33$  %) en comparaison du groupe contrôle ( $96,8 \pm 2,24$  %). Chez les groupes exposés au MePyr, le taux de survie embryonnaire moyen est compris entre 95 % et 96 %, soulignant une fois encore l'absence de toxicité aigüe de ce composé à des concentrations allant de 200 ng/g à près de 2 600 ng/g. L'ensemble des résultats concernant le taux de survie des embryons au cours de cette exposition est illustré par la *Figure 4.12*.



**Figure 4.12. Taux de survie des embryons lors de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par le Pyr et le MePyr**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type ( $N = 6$ ). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres au centre des barres : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey).

### 3.4.2. Tératogénicité & autres effets sublétaux

#### 3.4.2.1. Développement embryonnaire

De façon similaire à ce qui a été observé pour la survie embryonnaire, le taux d'éclosion moyen tend à diminuer avec l'augmentation de la concentration en Pyr des sédiments (*Figure 4.13.a*) d'environ 87 % pour le groupe témoin à seulement 71 % de moyenne pour le traitement Pyr-3X.

Cependant, cette tendance ne s'avère pas statistiquement significative selon le test *post-hoc* de Tukey. Une réduction significative du succès d'éclosion ( $46,1 \pm 17,0\%$ ) est observée à la concentration MePyr-0,3X par rapport à la condition témoin ( $87,0 \pm 8,74\%$ ) alors que le taux d'éclosion moyen observé pour la plus forte dose de ce composé reste supérieur à 80 % (*Figure 4.13.a*).

La durée du développement embryonnaire n'a pas été affectée par la présence de Pyr et de MePyr dans les sédiments (*Figure 4.13.b*). En effet, l'âge moyen des embryons à l'éclosion varie très peu d'une condition à une autre puisque compris entre 9,20 j pf et 9,36 j pf quel que soit le traitement considéré.

Cependant, il est important de garder en mémoire que le succès d'éclosion et la durée du développement n'ont été suivis que sur une durée de 12 j pf et qu'un nombre non-négligeable d'embryons non-éclos subsistait à la fin du test. Les résultats présentés ici pour ces deux paramètres auraient donc pu être quelque peu différents si l'expérience s'était poursuivie sur une période plus longue, comme lors des tests précédents.

#### 3.4.2.2. Activité cardiaque ( $23 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

L'activité cardiaque des embryons âgés de 6 j pf et de 7 j pf a été évaluée sur les réplicats destinés aux prélèvements sur stade larvaire. La *Figure 4.14* illustre des résultats obtenus au sein des différents traitements.

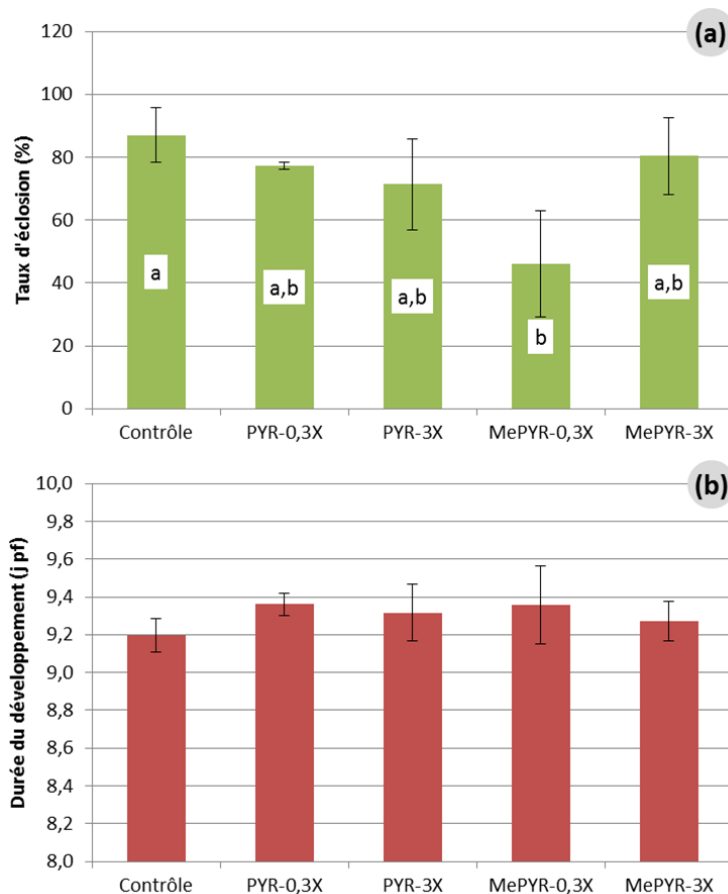
Au jour 6 pf, les rythmes cardiaques moyens des embryons provenant des différents groupes sont très similaires et compris entre 94 batt./min et 97 batt./min, à l'exception du traitement Pyr-3X pour lequel l'activité cardiaque moyenne se situe aux alentours de 87 batt./min. Ce léger ralentissement du rythme cardiaque n'est cependant pas significativement différent du contrôle.

Chez les embryons de 7 j pf, les activités cardiaques moyennes chez les individus exposés (de 88 batt./min à 94,5 batt./min) semblent légèrement plus rapides par rapport à celle des embryons témoins ( $86,3 \pm 2,9$  batt./min). Cependant, seul le traitement Pyr-0,3X induit une tachycardie significative ( $94,5 \pm 3,82$  batt./min,  $p < 0,05$  selon le test de Tukey) par rapport au groupe contrôle.

#### 3.4.2.3. Données biométriques

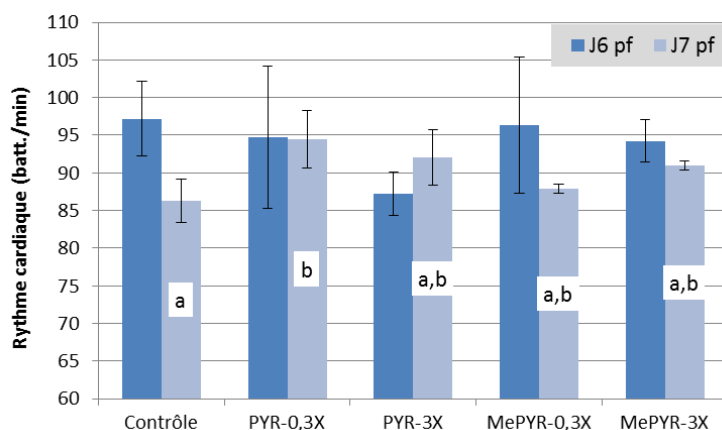
De manière générale, l'exposition au Pyr et au MePyr induit une réduction dose-dépendante de la longueur totale des larves à l'éclosion (*Figure 4.15.a*). En effet, les larves issues des traitements Pyr-3X et MePyr-3X mesurent respectivement  $4,36 \pm 0,05$  mm et  $4,32 \pm 0,05$  mm alors que la longueur totale moyenne des individus contrôle est de  $4,55 \pm 0,07$  mm. Ces diminutions significatives du gabarit des larves exposées correspondent à des baisses d'environ 4 % et 5 % par rapport au témoin respectivement pour les groupes Pyr-3X et MePyr-3X.

La taille moyenne de la tête des larves exposées aux composés organiques tend également à diminuer par rapport au groupe contrôle (*Figure 4.15.b*). Cependant, l'analyse statistique des



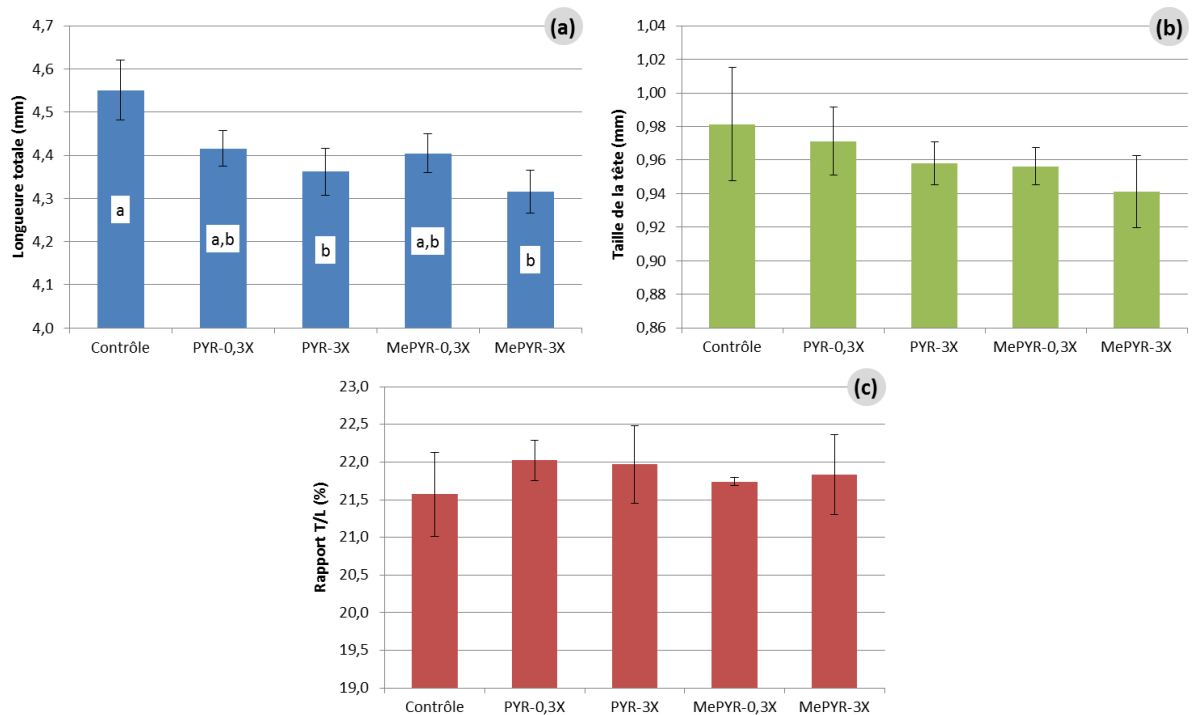
**Figure 4.13. Taux d'éclosion (a) et durée du développement embryonnaire (b) observés lors de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par le Pyr et le MePyr**

Le taux d'éclosion et la durée du développement ont été évalués sur les trois réplicats par condition réservés aux prélèvements sur stade larvaire. Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type ( $N = 3$ ). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres au centre des barres : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey).



**Figure 4.14. Rythme cardiaque des embryons au jour 6 et 7 pf au cours de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par le Pyr et le MePyr**

L'activité cardiaque a été évaluée sur les trois réplicats par condition réservés aux prélèvements sur stade larvaire. Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type ( $N = 3$ ). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres au centre des barres : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey).



**Figure 4.15. Mesures biométriques acquises chez les larves nouvellement écloses au cours de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par le Pyr et le MePyr**  
 Les données biométriques acquises au cours du MELA incluent la longueur totale des larves (a), la taille de la tête (b) et le rapport T/L (c) et sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type (N = 3). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres au centre des barres : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey).

données ne met en évidence aucune différence significative. A l'inverse, le rapport T/L moyen des groupes contaminés (compris entre 21,7 % et 22,0 %) tend à être très légèrement supérieur à celui du traitement contrôle ( $21,6 \pm 0,55$  %) comme l'illustre la *Figure 4.15.c*. Cette tendance, bien que non-statistiquement significative, pourrait confirmer une réduction de la longueur totale plus marquée qu'au niveau de la tête.

#### 3.4.2.4. Tératogénicité

L'exposition des embryons au Pyr et au MePyr conduit à une forte augmentation significative ( $p < 0,05$  selon le test *post-hoc* de Tukey) du pourcentage de larves malformées à l'éclosion (*Figure 4.16*). En effet, le pourcentage moyen d'individus présentant des anomalies du développement varie de 84,4 % à 93,3 % au sein de tous les groupes contaminés en Pyr ou en MePyr alors que dans le groupe contrôle le taux moyen ne s'élève qu'à  $15,0 \pm 7,64$  %. A la différence de ce qui a été observé au cours de la première exposition, la tératogénicité du Pyr est visible dès la plus faible concentration testée.

Le spectre des malformations observé est synthétisé dans le **Tableau 4.12**. De façon similaire à ce qui a été observé précédemment, le système cardio-vasculaire est significativement impacté à la suite d'une contamination en Pyr et en MePyr. En effet, de 61 % à 87 % des larves exposées à ces composés durant leur développement embryonnaire présentent des anomalies cardio-vasculaires (majoritairement des positionnements et plicatures anormales du cœur ainsi que des atrophies, des hyper- ou dystrophies) à l'éclosion alors que seulement 12 % des individus témoins sont concernés par ce type de pathologie.

**Tableau 4.12. Pourcentages d'individus impactés par les différents types de malformations après exposition aux sédiments dopés en Pyr et en MePyr dans le cadre de l'analyse croisée des réponses phénotypiques et biomoléculaires induites**

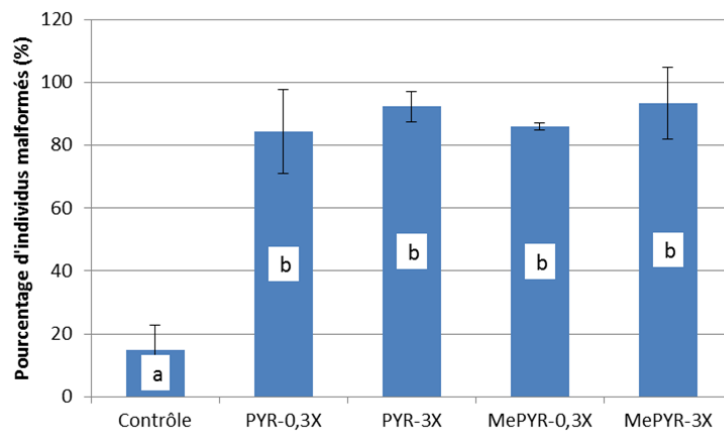
	Œdèmes	Squelette axial	Cranio-faciale	Œil	Cardio-vasculaire	Sac Vitellin
Contrôle	$0 \pm 0,00$ %	$10 \pm 5,00$ % a	$0 \pm 0,00$ % a	$2 \pm 2,89$ %	$12 \pm 7,64$ % a	$0 \pm 0,00$ % a
Pyr-0,3X	$9 \pm 5,30$ %	$29 \pm 12,4$ % a,b	$19 \pm 8,84$ % a,b	$3 \pm 3,54$ %	<b><math>76 \pm 7,95</math> % b,c</b>	<b><math>19 \pm 0,88</math> % b</b>
Pyr-3X	$13 \pm 7,64$ %	$26 \pm 15,0$ % a,b	<b><math>25 \pm 13,2</math> % b</b>	$0 \pm 0,00$ %	<b><math>87 \pm 2,55</math> % c</b>	<b><math>35 \pm 13,23</math> % b</b>
MePyr-0,3X	$0 \pm 0,00$ %	$40 \pm 28,3$ % a,b	$23 \pm 24,7$ % a,b	$3 \pm 4,71$ %	<b><math>61 \pm 8,25</math> % b</b>	$13 \pm 10,61$ % a,b
MePyr-3X	$8 \pm 10,4$ %	<b><math>47 \pm 7,64</math> % b</b>	$8 \pm 6,94$ % a	$2 \pm 2,89$ %	<b><math>81 \pm 9,18</math> % b,c</b>	<b><math>37 \pm 26,6</math> % b</b>

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type ( $N = 3$ ). Les résultats de l'analyse statistique sont indiquées par des lettres à droite des valeurs concernées : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test *post-hoc* de Tukey, à l'exception des malformations cranio-faciales dont l'analyse statistique a été effectuée à l'aide du test non-paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test *post-hoc* de comparaisons multiples,  $p < 0,05$ )

Seule la concentration MePyr-3X conduit à une augmentation significative du pourcentage d'individus présentant des malformations squelettiques (lordose, cyphose et corps arqué en forme de C principalement) par rapport au contrôle (**Tableau 4.12**). Cependant, il semblerait que la variabilité inter-réplicats observée au sein des autres conditions de contamination soit responsable de l'absence de discrimination statistique des résultats puisque les pourcentages moyens des groupes exposés sont tout de même compris entre 26 % et 40% (*versus*  $10 \pm 5,00$  % pour le témoin).

De façon similaire à ce que nous avons mis en évidence dans la première expérience, l'exposition à la plus forte concentration en Pyr induit une augmentation significative des malformations cranio-faciales (exclusivement au niveau des mâchoires) chez les individus exposés en comparaison du traitement contrôle (**Tableau 4.12**). Par ailleurs, les pourcentages de larves touchées par ce type d'anomalies sont également proches du seuil de significativité ( $p = 0,053$ ) pour les groupes MePyr- et Pyr-0,3X par rapport au témoin.





**Figure 4.16. Pourcentage de larves malformées observées au cours de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par le Pyr et le MePyr**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type ( $N = 3$ ). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres au centre des barres : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey).

Enfin, l'exposition des embryons aux deux concentrations en Pyr ainsi qu'à la plus faible dose de MePyr conduit à une proportion significativement plus élevée de malabsorption du sac vitellin alors que ce symptôme est totalement absent chez les individus contrôle (**Tableau 4.12**). Cette réduction de l'utilisation des réserves vitellines est très probablement à mettre en rapport avec la réduction de longueur des larves évoquées plus haut.

### 3.4.3. Génotoxicité (test comète)

Les effets génotoxiques du Pyr et du MePyr chez les larves de 12 j pf ont été mesurés à l'aide du test comète. Le taux d'endommagement de l'ADN est représenté par le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète. En parallèle, la présence de cellules hedgehog a également été examinée.

Les profils de réponse obtenus en termes de taux moyen d'endommagement de l'ADN sont très similaires entre le Pyr et le MePyr. La plus faible concentration résulte en un pourcentage d'ADN dans la queue de  $13,5 \pm 1,08$  % et de  $12,3 \pm 0,76$  % respectivement pour le Pyr et le MePyr. Le taux d'endommagement moyen augmente légèrement à la plus haute dose pour atteindre les valeurs respectives de  $16,2 \pm 6,30$  % et  $16,3 \pm 5,61$  % (*Figure 4.17.a*). Cette tendance dose-dépendante n'est cependant pas significativement différente du traitement témoin dont le pourcentage d'ADN dans la queue est inférieur à 10 %.

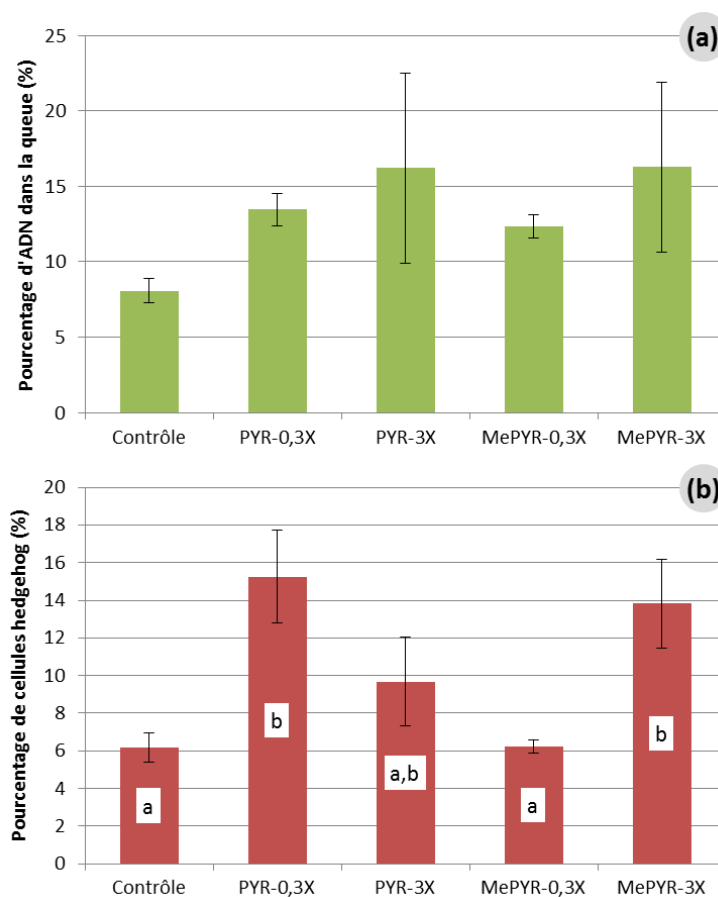
L'exposition des embryons à la concentration Pyr-0,3X et MePyr-3X induit une augmentation significative du pourcentage de cellules hedgehog avec des valeurs moyennes de  $15,3 \pm 2,47$  % et  $13,8 \pm 2,36$  % respectivement en comparaison du groupe témoin ( $6,2 \pm 0,76$  %) (*Figure 4.17.b*). Ces résultats suggèrent la présence de nombreuses cellules dont l'ADN est très fortement endommagé chez les individus exposés à ces deux traitements.

### 3.4.4. Altération du profil d'expression génique

L'expression de 12 gènes cibles impliqués dans plusieurs mécanismes cellulaires a été analysée par RT-PCR quantitative chez les embryons en fin d'organogénèse (T7) et les larves à l'éclosion (T9) après exposition aux sédiments dopés en Pyr et en MePyr.

Les expressions géniques relatives des gènes d'intérêt ont été déterminées en utilisant la  *$\beta$ -actine* comme gène de référence. Les résultats de cette analyse sont présentés dans le **Tableau 4.13**, sous la forme de facteurs d'induction FI (le détail des expressions géniques moyennes obtenues pour chaque réplicat sont rapportées dans l'*Annexe 4*).

Chez les embryons de Medaka, l'exposition à la plus forte concentration en Pyr ainsi qu'aux deux doses de MePyr induisent une surexpression significative ( $p < 0,05$  selon le test *t*) du gène *coxI* du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale (FI compris entre 1,4 et 1,8). Par ailleurs l'expression du gène *cyp1A* de la phase I de la métabolisation des xénobiotiques est également significativement induite par le traitement au Pyr-3X et est proche du seuil de significativité pour le groupe MePyr-3X ( $p = 0,077$ ). Pour cette même condition, le gène *p53* impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire et le gène du récepteur de l'acide rétinoïque *rara1* sont surexprimés significativement chez les embryons exposés. Les gènes *rara1* et *rxra1* sont également surexprimés pour le groupe Pyr-3X avec des valeurs de *p* proches du seuil de significativité par rapport au témoin ( $p = 0,099$  et  $p = 0,056$  respectivement), dénotant une possible altération du métabolisme de la vitamine A par ce HAP.



**Figure 4.17. Évaluation par le test comète des dommages à l'ADN chez des larves de Medaka âgés de 2j post-éclosion après exposition à des sédiments dopés en Pyr et en MePyr durant leur développement embryonnaire**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type ( $N = 3$ ). Le pourcentage d'ADN dans la queue d'une comète a été mesuré sur 150 cellules par échantillon. Le pourcentage de cellules hedgehog a été déterminé sur un total de 200 cellules par réplicat. Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres à droite des valeurs concernées : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey)

De façon similaire, le niveau d'activation du gène *wnt1* impliqué dans la prolifération et la différenciation cellulaire au cours de l'embryogénèse tend à être induit (FI >2) à la plus forte concentration en Pyr et en MePyr. Cependant, l'analyse statistique du jeu de donnée n'est pas parvenue à établir une différence significative relativement au contrôle.

À l'éclosion, seules les expressions du gène antioxydant mitochondrial *sod(Mn)* et du gène de synthèse de l'acide rétinoïque *raldh2* sont significativement induites respectivement à la plus forte concentration en MePyr et à la concentration Pyr-0,3X. Malgré un FI de 0,4 observé pour le gène *wnt1* chez les larves exposées à la plus forte concentration en Pyr, la répression de ce gène n'est pas significative selon le test *t*.

Tableau 4.13. Expression différentielle des gènes d'intérêt chez les embryons (T7) et les larves (T9) de Medaka au cours de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par le Pyr et le MePyr

	Métabolisme mitochondrial <i>cox1</i>	Métabolisation xénobiotique <i>cyp1A</i>	Défense stress oxydant		Arrêt cycle cellulaire / apoptose		Développement <i>wnt1</i>	Réparation ADN <i>ogg1</i>	Métabolisme de la vitamine A			
			<i>sod (Mn)</i>	<i>sod (Cu)</i>	<i>p53</i>	<i>bax</i>			<i>raldh2</i>	<i>rara1</i>	<i>rarg1</i>	<i>rxra1</i>
<b>Stade embryonnaire (T7)</b>												
PYR 0,3X	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
PYR 3X	1,5*	2,1*	/	/	/	/	2,0	/	/	1,4 <sup>b</sup>	/	1,6 <sup>c</sup>
MePYR 0,3X	1,4*	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
MePYR 3X	1,8*	2,5 <sup>a</sup>	/	/	1,6*	/	2,1	/	/	1,7*	/	/
<b>Stade larvaire (T9)</b>												
PYR 0,3X	/	/	/	/	/	/	/	/	1,5*	/	/	/
PYR 3X	/	/	/	/	/	/	0,4	/	/	/	/	/
MePYR 0,3X	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
MePYR 3X	/	/	1,3*	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Les résultats sont mentionnés sous la forme de facteurs d'induction (>1) ou de répression (<1) par rapport au contrôle. Un astérisque (\*) symbolise une différence significative par rapport au groupe témoin selon le test *t* pour échantillons indépendants ( $p < 0,05$ ). Le signe / signifie l'absence de variation significative de l'expression génique par rapport au contrôle ( $0,5 < FI < 2$  et test *t* non-significatif). (a)  $p = 0,077$  avec le groupe témoin ; (b)  $p = 0,099$  ; (c)  $p = 0,056$ .

L'ensemble de ces résultats met en évidence un nombre de gènes dont l'expression est modulée par l'exposition au Pyr et au MePyr plus important au stade embryonnaire par rapport au stade larvaire.

### 3.5. Discussion

L'objectif de cette étude était d'appliquer l'analyse de l'expression génique par RT-PCR quantitative développée précédemment lors de l'exposition au Cd à l'approfondissement de la compréhension des mécanismes toxiques mis en jeu en présence de Pyr et de MePyr. Pour cela, nous avons souhaité tenter de relier les réponses génétiques aux altérations phénotypiques observées chez les larves de Medaka à l'éclosion.

La technique de dopage mise en œuvre au cours de ce travail a permis d'obtenir des rendements d'enrobage globalement similaires à ceux de la première expérience mais plus homogènes ; de 82 % et 92 % pour le Pyr et de 70 % et 88 % pour le MePyr. Ces données indiquent que l'adaptation du protocole à la quantité de sédiment plus importante nécessaire à cette étude a été adéquate. Il en résulte des concentrations d'exposition respectives de **250 ng/g, 2 770 ng/g** pour le traitement **Pyr-0,3X** et **-3X** et de **205 ng/g** et **2 586 ng/g** pour les groupes **MePyr-0,3X** et **-3X**.

Afin d'établir si une partie de la contamination des embryons pouvaient se faire par la phase dissoute, un suivi des concentrations en HAP a été entrepris dans l'ERS (ces analyses sont en cours).

Les profils de réponses embryotoxiques et tératogènes induites par les deux HAP testés au cours de cette étude sont très similaires à ceux observés lors de la première série d'expositions. Cependant, un plus grand nombre de marqueurs ont répondu significativement. Ceci pourrait provenir du nombre d'individus par réplicat plus important au cours de la présente étude. Cependant, il faut également noter que les concentrations dosées dans les sédiments sont également légèrement supérieures à celles mesurées lors la première exposition.

### 3.5.1. Toxicité aiguë du Pyr et du MePyr

L'exposition des embryons de Medaka aux sédiments dopés en Pyr induit une réduction dose-dépendante du taux de survie embryonnaire, qui est significative à la plus forte concentration testée. Cependant, la viabilité des embryons exposés à la concentration Pyr-3X reste élevée, avec une valeur moyenne supérieure à 90 %, ce qui ne représente que 5 % de baisse par rapport au groupe contrôle. Ces résultats indiquent une toxicité aiguë relativement faible de ce composé chez les SPD de Medaka, pour des concentrations allant jusqu'à environ 2,8 µg/g de sédiment. Ces données sont en accord avec les observations de Li *et al.* (2011a), qui rapportent une augmentation significative de la mortalité atteignant 5 % à 10 % chez des embryons de *S. marmoratus* exposés par la phase dissoute à la plus forte concentration de Pyr testée, soit 1 µg/L. Cependant, si nous évaluons la concentration présente dans la colonne d'eau au cours de notre expérience pour le traitement Pyr-3X, nous obtenons une valeur d'environ 30 µg/L selon les calculs proposés par Sverdrup *et al.* (2002). La concentration ainsi évaluée est bien supérieure à celle appliquée par Li *et al.* (2011a). De façon similaire, selon les courbes dose-réponse obtenues pour le Pyr par Mhadhbi *et al.* (2010), une concentration de 30 µg/L permettrait la survie de seulement 25 % des embryons et larves de *P. maxima*. D'après ces travaux, les embryons de Medaka auraient une sensibilité intermédiaire entre ces deux espèces (*S. marmoratus* et *P. maxima*) et celle des SPD de *C. variegatus* pour lesquels une mortalité n'est induite par le Pyr qu'à 60 µg/L (Hendon *et al.*, 2008). Le dosage du Pyr et du MePyr dans la phase aqueuse (ERS) permettra de confirmer ou non cette hypothèse. Par ailleurs, la présence de particules de sédiment chargées en contaminants peut représenter une seconde voie de contamination des embryons, en plus de la voie dissoute, comme le suggèrent Kocan *et al.* (1996). De plus, les différences de température d'exposition respectivement de 27 °C, 26 °C, 18 °C et 14 °C pour *C. variegatus*, *O. latipes*, *S. marmoratus* et *P. maxima* peuvent également expliquer les écarts de sensibilité entre les espèces puisqu'il a été montré que la bioaccumulation des HAP diminue avec l'augmentation de la température (Muijs & Jonker, 2009). Enfin, une photoactivation de la toxicité du Pyr comme l'ont démontré Mhadhbi *et al.* (2010) peut également entrer en ligne de compte dans les écarts de réponses toxiques mises en évidence au cours des différents travaux pour lesquels les conditions lumineuses peuvent être variables en qualité et en intensité.

Incardona *et al.* (2006) remarquent que les larves de *D. rerio* exposées au Pyr commencent à mourir dans les cinq jours qui suivent le début de l'exposition et que cette mortalité coïncide avec la présence de lésions hépatiques et de changements morphologiques du foie. Ces altérations hépatiques incluent un aspect opaque de l'organe avec des bords irréguliers et des hépatocytes hypertrophiés et vacuolisés, signalant peut-être un gonflement des mitochondries ou du réticulum

endoplasmique (Incardona *et al.*, 2006). Selon ces travaux, il semblerait que les effets létaux induit par le Pyr soient la conséquence de graves atteintes du système hépatique.

Le succès d'éclosion des embryons de Medaka, évalué sur la période expérimentale de 12 j pf, est significativement diminué à la plus faible concentration en MePyr. Ces résultats sont contraires à nos observations précédentes qui indiquaient un taux d'éclosion inchangé pour cette concentration en comparaison du contrôle. Concernant le Pyr, la tendance dose-dépendante à la diminution du taux d'éclosion est une nouvelle fois observée sans que l'analyse statistique ne parviennent à discriminer les résultats. Une réduction du taux d'éclosion a été observé suite à l'exposition d'embryons de turbot et de cyprinodon au Pyr (Mhadhbi *et al.*, 2010 ; Hendon *et al.*, 2008) et à des HAP alkylés (Rhodes *et al.*, 2005). Selon ces derniers auteurs, une hypothèse expliquant les effets des HAP sur le succès d'éclosion reposerait sur l'induction d'un stress oxydant par les HAP bioactivés qui altérerait la chaîne de transport d'électron mitochondrial menant à une réduction de l'ATP disponible. Cette diminution du stock d'ATP pourrait expliquer les échecs d'éclosion observés étant donné que l'extraction de la larve hors de son chorion nécessite un apport énergétique important (Rhodes *et al.*, 2005). La surexpression significative du gène *cox* de la sous-unité I de la chaîne de respiration mitochondriale observée chez les embryons pour le traitement Pyr-3X et les deux concentrations en MePyr pourrait être une tentative de réponse compensatoire de l'organisme. En effet, comme proposé par Achard-Joris *et al.* (2006), la surexpression de *coxI*, dont la protéine catalyse l'étape cinétiquement limitante de la respiration mitochondriale, pourrait être stimulée afin de tenter de restaurer une activité mitochondriale suffisante et lutter contre la génération d'un stress oxydant. Une telle induction de l'expression de ce gène a déjà été rapportée chez des juvéniles de truite *O. mykiss* exposés à du Pyr (Krasnov *et al.*, 2005). De plus, la surexpression du gène mitochondrial *sod(Mn)*, dont la protéine est impliquée dans les mécanismes de défense antioxydant semble confirmer la production d'ERO chez les larves exposées à la plus forte concentration en MePyr.

Les résultats obtenus au cours de la présente étude suggèrent que bien que la durée moyenne du développement ne soit pas altérée par l'exposition aux deux HAP testés, le développement embryonnaire du Medaka est impacté par la présence de ces contaminants organiques, ce que vient confirmer l'inhibition de croissance des individus *in ovo*.

### 3.5.2. Tératogénicité et impact des HAP sur la croissance des individus exposés

Une diminution dose-dépendante de la longueur totale des larves nouvellement écloses est observée à la fois pour le Pyr et le MePyr, engendrant une réduction significative de la taille des individus exposés aux plus fortes concentrations des deux composés par rapport au groupe témoin. Par ailleurs, un phénomène de malabsorption des réserves vitellines est également notable chez 20 % à 37 % des individus exposés et est significative pour les deux concentrations en Pyr et la plus forte dose de MePyr. La présence d'œdèmes tend également à augmenter avec la concentration en HAP dans les sédiments mais le traitement statistique ne confirme pas cette observation malgré des valeurs proches du seuil de significativité pour le groupe Pyr-3X ( $p = 0,060$ ). Une réduction de la taille des larves de *C. variegatus* exposées au Pyr ainsi que l'accroissement (non-significatif) de la fréquence des œdèmes péricardiques et péritellins sont également observés par Hendon *et al.* (2008). Des observations similaires sont rapportées chez les embryons de Medaka exposés à un

mélange complexe de HAP (Rhodes *et al.*, 2005). Chez les larves de truites *O. mykiss* contaminées au rétène, Billiard *et al.* (1999) notent également la présence des mêmes symptômes. Selon ces auteurs, la présence d'œdèmes peut indiquer une altération des membranes endothéliales conduisant à une perte de l'intégrité vasculaire. Cette atteinte du système vasculaire peut perturber le passage des nutriments du sac vitellin vers la circulation sanguine et donc avec leur distribution dans l'organisme. Par conséquent, la réduction de la taille des larves observée serait le résultat d'un défaut d'utilisation des réserves vitellines en relation avec un dysfonctionnement cardio-vasculaire comme le suggèrent d'autres travaux portant sur les effets de la TCDD chez différentes espèces de poissons dont le Medaka japonais (Elonen *et al.*, 1998). Cette hypothèse est en accord avec les effets toxiques du Pyr mis en évidence chez *D. rerio* par Incardona *et al.* (2006 ; 2004) qui notent une réduction de la circulation périphérique vasculaire et l'augmentation de l'occurrence de malformations du système cardio-vasculaire chez les individus contaminés.

De façon similaire, au cours de notre étude, le Pyr et le MePyr induisent un accroissement significatif dose-dépendant du taux d'individus présentant des anomalies du système cardiovasculaire dès les plus faibles concentrations testées. Ces malformations concernent majoritairement des positionnements et plicatures anormales du cœur ainsi que des atrophies, des hypertrophies ou des dystrophies. Le spectre de malformations observé est tout-à-fait semblable à celui relevé lors des expositions précédentes. Des profils de malformations similaires ont été mentionnés à la suite de l'exposition de SPD de truite *O. mykiss* et de *D. rerio* à la TCDD (Antkiewicz *et al.*, 2005 ; Hornung *et al.*, 1999). Selon ces auteurs, ces altérations de la morphologie cardiaque seraient le résultat d'une perturbation de la fonction cardiaque.

Par ailleurs, le Pyr induit le développement de malformations cranio-faciales principalement au niveau de la mâchoire inférieure. Des effets similaires ont été rapportés chez les larves de *S. marmoratus* exposées au Pyr, au B[a]P et au phénanthrène (Li *et al.*, 2011a) ainsi que chez les embryons de *D. rerio* contaminés à la TCDD (Teraoka *et al.*, 2006). Ces derniers auteurs mettent ces réponses tératogènes en relation avec la répression du gène *shh* dépendante de l'Ahr2 qui a pour conséquence l'inhibition de la prolifération cellulaire et donc une réduction du développement des mâchoires. Des résultats similaires sont rapportés chez *S. marmoratus* exposés au B[a]P suggérant que le même mécanisme de perturbation de la voie de signalisation Shh peut être mis en cause dans le développement de malformations cranio-faciales induites par les HAP (He *et al.*, 2011). Le gène *shh* n'a pas été analysé dans la présente étude. Cependant, le gène *wnt1* est également impliqué dans les mécanismes de régulation et de prolifération cellulaire. L'expression de ce gène tend, sans discrimination statistique, à être altéré par l'exposition au Pyr et au MePyr dans le sens d'une surexpression ou d'une répression, selon le stade de développement et la concentration considérés. Ces observations semblent indiquer un dérèglement du cycle cellulaire bien que d'autres expérimentations soient nécessaires pour confirmer (ou infirmer) la tendance observée.

Enfin, un accroissement du pourcentage de larves atteintes de malformations squelettiques (lordose, cyphose et corps arqué) est observé chez les individus exposés au Pyr et au MePyr avec entre 26 % et 47 % de larves impactées selon les traitements. Cependant, seule la concentration MePyr-3X conduit à une augmentation significative de ce pourcentage par rapport au groupe contrôle. Ce type d'anomalies du développement a déjà été rapporté à la suite de l'exposition de SPD de poisson au Pyr (Li *et al.*, 2011a ; Mhadhbi *et al.*, 2010 ; Hendon *et al.*, 2008 ; Incardona *et al.*, 2006 ; Incardona *et al.*, 2004). Les deux études de Hendon *et al.* (2008) et d'Incardona *et al.* (2006)

suggèrent que l'induction de la protéine CYP1A est impliquée dans l'apparition de ce type de malformations. Par ailleurs, Li *et al.* (2011a) ont démontré que le Pyr peut engendrer une inhibition de l'activité des Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases et des Ca<sup>2+</sup>-ATPases en parallèle d'une augmentation des malformations squelettiques (cranio-faciale et au niveau de la colonne vertébrale). Selon ces auteurs, la ressemblance des effets induits par le Pyr avec ceux observés pour d'autres contaminants comme le Cd pourrait indiquer des mécanismes d'action similaires impliquant ces ATPases dans le développement de malformations squelettiques. En effet, certaines études rapportent des modifications de l'homéostasie du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et du Cl<sup>-</sup>, du Na<sup>+</sup> et du K<sup>+</sup> plasmiques après exposition à des HAP (Kennedy & Farrell, 2008 ; Reynaud *et al.*, 2003).

L'ensemble des malformations phénotypiques observées suite à l'exposition au Pyr et au MePyr conduit à des pourcentages moyens d'individus impactés très élevés, supérieurs à 80 % pour toutes les conditions de contamination alors que seuls 15 % des individus témoins sont atteints, en moyenne. De tels pourcentages ont déjà été observés chez des embryons de Medaka exposés à du phénanthrène et des alkyl-phénanthrènes ainsi que chez des larves d'*O. mykiss* exposées au rétène (Turcotte *et al.*, 2011 ; Brinkworth *et al.*, 2003). Des taux d'individus malformés aussi élevés posent réellement la question de la survie potentielle de ces animaux dans le milieu naturel, puisque, comme évoqué dans la première partie de ce chapitre, bon nombre des effets tératogènes observés compromettent la capacité de capture de proies et d'évitement des prédateurs. La LOEC du Pyr, précédemment établie à 894 ng/g pour le Medaka peut donc être revue à la baisse pour s'établir seulement **248 ng/g** selon les réponses obtenues concernant la tératogénicité de ce composé.

### 3.5.3. Analyse du profil d'expression génique

L'ensemble des spectres de toxicité induits par le Pyr et le MePyr n'est pas sans rappeler le syndrome BSD engendré par une exposition à la TCDD. Ces similitudes ont déjà été remarquées par plusieurs auteurs travaillant sur le Pyr et suggèrent une implication au moins partielle de la voie de métabolisation AhR/CYP1A (Hendon *et al.*, 2008 ; Incardona *et al.*, 2006 ; Incardona *et al.*, 2005 ; Incardona *et al.*, 2004).

L'analyse de l'expression génique de *cyp1A* semble confirmer cette supposition. En effet ce gène est significativement surexprimé chez les embryons exposés à la plus forte concentration en Pyr et est proche du seuil de significativité ( $p = 0,077$ ) pour le traitement MePyr 3X. L'induction de *cyp1a* reste modérée (FI=2,1 et 2,5 respectivement) ce qui semble en accord avec les potentiels d'induction du récepteur AhR relativement bas pour ces deux composés en comparaison d'autres substances plus fortement agonistes de ce récepteur tels que la TCDD ou même le B[a]P (Barron *et al.*, 2004b). Une induction de *cyp1A* a été également rapportée chez les embryons de *C. variegatus* exposés des concentrations en Pyr variant de 20 µg/L à 120 µg/L (Hendon *et al.*, 2008). Incardona *et al.* (2006) décrivent une induction notable de CYP1A au niveau de l'endothélium vasculaire et du foie des larves de *D. rerio* exposés au Pyr, accompagnée d'une toxicité systémique caractérisée par une courbure de la colonne vertébrale, une circulation sanguine périphérique réduite, des anémies et des œdèmes péricardiques évoluant en œdèmes périvitellins. Par ailleurs, les effets toxiques du Pyr peuvent être annihilés ou du moins retardés par l'inactivation préalable des gènes *ahr1*, *ahr2* ou *cyp1a* (Incardona *et al.*, 2006 ; Incardona *et al.*, 2005). Notamment, lors de l'injection de morpholino *ahr1a*, les larves exposées au Pyr ne présentent plus de signes d'atteintes hépatiques notables (Incardona *et al.*, 2006). L'ensemble de ces observations semblent indiquer que la toxicité du Pyr est liée à la formation



d'un métabolite toxique ou d'ERO par l'intermédiaire de CYP1A, au niveau du foie des individus exposés (Incardona *et al.*, 2006 ; Incardona *et al.*, 2005).

Une observation intéressante issue de l'analyse du profil d'expression génique est l'induction des gènes impliqués dans le métabolisme de la vitamine A. En effet, chez les embryons de 7 j pf, le gène récepteur de l'acide rétinoïque (AR), *rara1*, est surexprimé chez les individus exposés au traitement MePyr-3X et est proche du seuil de significativité ( $p = 0,099$ ) pour la plus forte concentration en Pyr. Pour cette même condition, l'expression moyenne du gène *rxra1* est également proche du seuil de significativité avec une valeur de  $p$  égale à 0,056. À noter que la surexpression de ces gènes des récepteurs de l'AR est concomitante avec l'activation de *cyp1A*. Enfin, chez les larves exposées à la plus faible dose de Pyr, le gène *raldh2*, impliqué dans la formation d'AR à partir de rétinol est significativement surexprimé. Ces observations semblent indiquer une induction de la transformation du rétinol ou des réserves de rétinoïdes en AR par l'intermédiaire de RALDH2 et une activation de la voie de signalisation RXR/RAR par les deux HAP. Ces résultats paraissent donc en accord avec la réduction des réserves de rétinoïdes corrélée avec l'induction de CYP1A ou de l'activité EROD observée chez les poissons exposés à un environnement contaminé en HAP (Arcand-Hoy & Metcalfe, 1999 ; Besselink *et al.*, 1998). Ces observations peuvent indiquer une augmentation de la métabolisation du rétinol (Besselink *et al.*, 1998). De plus, chez les rats contaminés à la TCDD, Schmidt *et al.* (2003) rapportent une augmentation dose-dépendante des concentrations d'all-*trans*-AR ainsi que de l'activité et de l'expression de CYP1A1, ce qui suggère que la synthèse de l'AR induite par la dioxine impliquerait cette enzyme. L'ensemble de ces résultats et de ces observations suggèrent que, comme pour la TCDD, les effets du Pyr et du MePyr sur le métabolisme des rétinoïdes sont liés au récepteur AhR. Il a été proposé que l'activation de ce récepteur puisse conduire à un phénomène d'activation croisée avec la voie de signalétique des rétinoïdes et/ou des modifications de l'activité des enzymes impliquées dans la transformation des rétinoïdes (Novak *et al.*, 2008).

Enfin, l'activation de *cyp1A* ainsi que les indices de la présence d'un stress oxydant liés à l'induction de *cox1* par le Pyr et le MePyr auraient pu conduire à une augmentation des dommages à l'ADN. Cependant, l'évaluation du taux de cassures de l'ADN par le test comète ne met pas en évidence d'augmentation significative des dommages à l'ADN suite à l'exposition des embryons de Medaka au Pyr ou au MePyr, malgré une tendance dose-dépendante à l'augmentation du taux d'ADN dans la queue de la comète. Par contre, le pourcentage de cellules hedgehog dont l'ADN est fortement endommagé est significativement induit pour le traitement au Pyr-0,3X et la plus forte concentration de MePyr. Pour ce dernier traitement, l'induction significative du gène *p53* chez les embryons âgés de 7 j pf semble confirmer la présence d'altérations de l'ADN nécessitant un arrêt du cycle cellulaire pour la mise en place des mécanismes de réparation de l'ADN (Basu & Haldar, 1998). Un phénomène de mort cellulaire a été mis en évidence au niveau du cerveau et du tube neural induit par le Pyr chez les embryons de *D. rerio* (Incardona *et al.*, 2005 ; Incardona *et al.*, 2004). L'ensemble de ces observations semble indiquer que le Pyr et le MePyr pourraient induire *a minima* un stress oxydant, ou des dommages à l'ADN qui seraient majoritairement réparés sauf lorsque les altérations sont trop nombreuses comme semble l'indiquer le taux de cellules hedgehog. Cependant, cette hypothèse n'est pas confirmée par une induction du gène *ogg1*, spécialisé dans les réparations des lésions oxydatives de l'ADN.

### 3.5.4. Conclusion sur les expositions au Pyr et au MePyr et proposition de LOEC dans le sédiment

Au vu des résultats obtenus au cours de ces deux séries d'expositions, le Pyr et le MePyr ont montré des spectres et des seuils de toxicité relativement équivalents évoquant une similitude dans les mécanismes d'action de ces deux composés. Les LOEC dérivées des différents paramètres suivis au cours des expositions sont synthétisées dans le **Tableau 4.14**.

En considérant les marqueurs qui se sont avérés les plus sensibles, notamment l'expression génique et l'apparition des malformations, les LOEC calculées sur les embryons et larves de Medaka sont respectivement de **248 ng/g** et de **183 ng/g** pour le Pyr et le MePyr. Ces valeurs indiquent une toxicité similaire du Pyr et du MePyr. Inversement, une toxicité plus importante des dérivés alkylés en comparaison des composés parents a déjà été mise en évidence dans la littérature (Turcotte *et al.*, 2011). Ainsi, d'autres tests utilisant des concentrations plus faible que celles testées jusqu'alors, sont nécessaires pour établir l'existence ou non d'une différence de toxicité entre les deux composés. Par ailleurs, les dérivés alkylés peuvent représenter jusqu'à 95 % des HAP totaux des mélanges complexes environnementaux (Billiard *et al.*, 2008) et peuvent contribuer de manière importante au pouvoir embryotoxique de mélanges (Rhodes *et al.*, 2005).

**Tableau 4.14. LOEC établies en fonction des différents marqueurs de toxicité suivis lors de l'exposition des embryons de Medaka à des sédiments dopés en Pyr et en MePyr**

Marqueurs suivis	LOEC (ng/g)	
	Pyr	MePyr
Viabilité larvaire/embryonnaire	2 769	> 2 586
Taux d'éclosion	> 2 769	> 2 586
Durée du développement	> 2 769	> 2 586
Rythme Cardiaque	> 2 769	> 2 586
Données biométriques	2 769	2 586
Malformations	248	183
Expressions géniques	248	202
Dommmages ADN (Test Comète)	> 2 769	2 586

Ces observations soulignent tout l'intérêt d'étudier plus précisément la toxicité de ces composés qui peuvent se retrouver dans l'environnement dans des concentrations loin d'être négligeables. Les valeurs de LOEC établies sont relativement basses, indiquant une bonne sensibilité du test, et soulèvent la question du risque potentiel de sédiments contaminés par le Pyr ou le MePyr pour les espèces aquatiques. En effet, de telles valeurs sont atteintes voire dépassées pour le Pyr dans les sédiments de milieux anthropisés comme le Bassin d'Arcachon qui peuvent atteindre des concentrations supérieures à 1 000 ng/g (Crespo, 2009). Certains sédiments du système Lot-Garonne peuvent même dépasser ce seuil et approcher les 3 000 ng/g de Pyr dans les sédiments (voir *Chapitre 5 paragraphe 2.2.2* pour plus de détails). Par conséquent, il semblerait, au vu des résultats obtenus dans la présente étude, que le Pyr et le MePyr puissent représenter un risque non-négligeable pour les espèces benthiques vivant au contact du sédiment. Bien entendu et comme discuté précédemment, ces conclusions doivent être considérées avec toutes les précautions nécessaires à l'extrapolation des données acquises en laboratoire avec des sédiments artificiellement dopés vers des situations réelles environnementales.

---

*Chapitre 5. CARACTERISATION DE LA  
TOXICITE DE SEDIMENTS  
NATURELS ISSUS DE DIFFERENTS  
ECOSYSTEMES AQUITAINS SUR LE  
DEVELOPPEMENT DU MEDAKA  
JAPONAIS*

---



## Chapitre 5. Caractérisation de la toxicité de sédiments naturels issus de différents écosystèmes aquitains sur le développement du Medaka japonais

Les études portant sur les substances modèles présentées dans les deux chapitres précédents ont permis de développer plusieurs marqueurs phénotypiques et moléculaires sur les embryons et larves de Medaka. Ces observations et analyses se sont montrées pour la plupart sensibles et pertinentes dans le cadre de l'étude des effets toxiques induits par les métaux et les HAP. Ils ont également permis de mettre en évidence un certain nombre de mécanismes et/ou de voies d'action des composés testés. Le chapitre suivant propose une application de la double approche phénotypique et biomoléculaire à l'évaluation de la toxicité de sédiments naturels prélevés dans deux milieux aquatiques emblématiques de la région Aquitaine : le système Lot-Garonne et le Bassin d'Arcachon. Avant de présenter les résultats obtenus au cours de cette série de bioessais, la première partie de ce chapitre propose un bref rappel des sites d'étude.

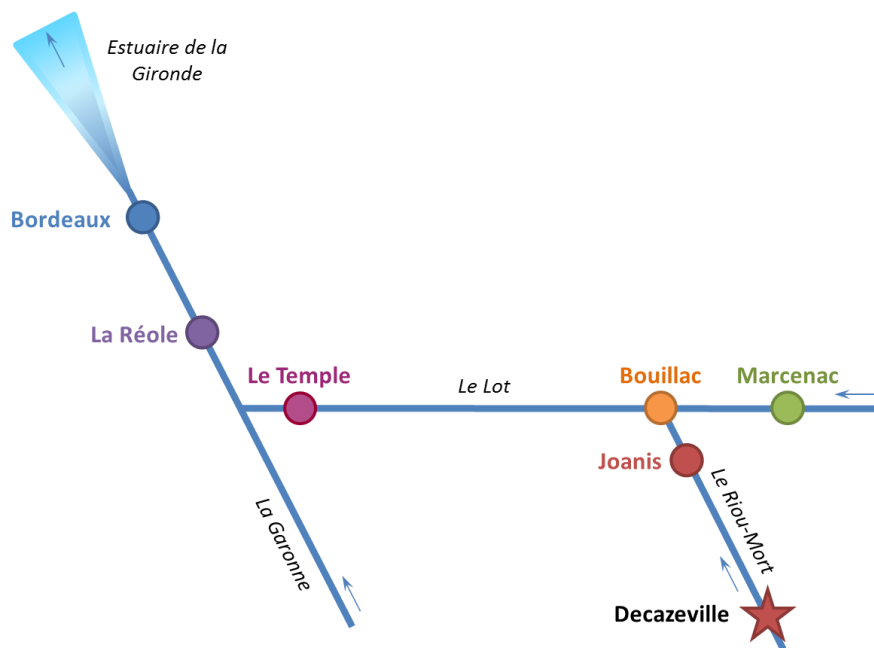
### 1. RAPPEL DES DIFFERENTS SITES DE PRELEVEMENTS DES SEDIMENTS ETUDIES

---

#### 1.1. Sites du système fluvial Lot-Garonne

Le système Lot-Garonne est marqué par une contamination polymétallique issue des rejets d'une ancienne usine d'extraction de minerai de Zn, située à proximité de Decazeville, en Aveyron. Les principaux contaminants identifiés comme responsables de cette pollution sont le Cd, le Pb, le Zn et le Cu. Six sites de prélèvement ont été retenus tout au long du continuum, entre Decazeville, source de la contamination, et Bordeaux, juste avant l'estuaire de la Gironde. L'ensemble de ces sites est représenté sur la *Figure 5.1* qui illustre également les niveaux de contamination métallique (et donc de toxicité) attendus. Les sédiments du système Lot-Garonne ont été prélevés en avril 2011, à l'exception de celui de Marcenac (mars 2008). Les sites de prélèvement ont été précédemment détaillés dans le *Chapitre 1* (*paragraphes 2.1, 3.1 et 3.3*) et sont brièvement rappelés ci-dessous :

- ✓ MARCENAC : situé sur le Lot, en amont de la confluence avec le Riou-Mort. Ce point servira, comme au cours de l'ensemble de ce travail de thèse, de site de référence (témoin négatif).
- ✓ JOANIS : situé sur le Riou-Mort, à environ 2 km de la source de la pollution métallique. C'est théoriquement le point chaud de la contamination en termes de concentrations en éléments métalliques dans le sédiment.
- ✓ BOUILLAC : situé à l'exacte confluence du Riou-Mort et du Lot, qui entraîne théoriquement une dilution de la pollution métallique. Ce site est représentatif de la contamination du Lot en aval du Riou-Mort.



**Figure 5.1. Schématisation des sites de prélèvements des sédiments naturels sur le système Lot-Garonne**

Les sites de prélèvements sont représentés par un cercle. La couleur des cercles illustre les niveaux de contamination métallique attendus depuis le rouge (plus fortement contaminé) au bleu (le moins contaminé). Le point vert représente le site de référence. Remarque : pour plus de lisibilité, l'échelle des distances n'est pas respectée sur ce schéma.

- ✓ LE TEMPLE : situé sur le Lot, à environ 200 km en aval de la confluence avec le Riou-Mort. Ce point est représentatif de la contamination de la partie basse du Lot.
- ✓ LA REOLE : situé sur la Garonne, à environ 50 km en aval de sa confluence avec le Lot. Ce point est représentatif de la contamination dans la partie médiane de la Garonne.
- ✓ BORDEAUX : situé à environ 25 km en amont de l'estuaire de la Gironde et déjà soumis au gradient de salinité. Ce point intègre à la fois la contamination métallique potentielle issue du Lot ainsi qu'un éventuel apport en contaminants provenant de l'agglomération bordelaise.

## 1.2. Sites sur le Bassin d'Arcachon

Le Bassin d'Arcachon en tant que haut-lieu d'activité ostréicole, nautique et touristique est soumis à une pression anthropique grandissante depuis plusieurs décennies. Cinq sites de prélèvements échantillonnés au cours de la campagne de mars 2009 (projet ASCOBAR) ont été retenus en fonction du degré de contamination en HAP mesuré dans les sédiments (selon le rapport du projet ASCOBAR, 2010 ; et les travaux de thèse de A. Crespo, 2009). En plus des cinq sédiments de la lagune, le sédiment de Marcenac a été ajouté en tant que matrice de référence. Les sites de prélèvements sur le Bassin d'Arcachon ont été décrits dans le *Chapitre 1 (paragraphe 2.2, et 3.2.2)* et sont brièvement rappelés ci-dessous :

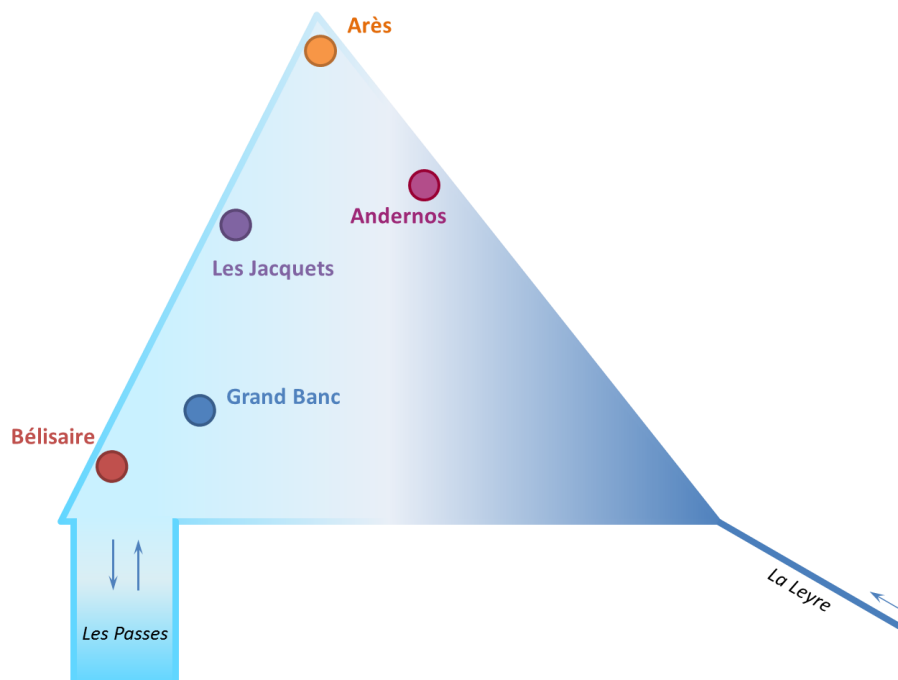
- ✓ GRAND BANC : situé dans l'angle sud-ouest du Bassin, face aux passes dont la concentration en HAP totaux est faible (< 300 ng/g p.s.).
- ✓ LES JACQUETS : situé sur la face Ouest du Bassin, proche de la côte, présentant une contamination moyenne en HAP totaux évaluée à environ 4 000 ng/g p.s.
- ✓ ANDERNOS : situé au nord-est du bassin, proche de la côte et en sortie de port. La concentration en HAP totaux pour ce point est proche de 5 000 ng/g p.s.
- ✓ ARES : situé à la pointe Nord du bassin, en zone côtière, également en sortie de port et dont la concentration en HAP totaux est mesurée à environ 7 000 ng/g p.s.
- ✓ BELISAIRE : situé sur la zone côtière du Cap Ferret, dans l'angle Sud-Ouest du Bassin. presque en face du site de Grand Banc. La concentration en HAP totaux avoisine les 10 000 ng/g p.s. dénotant une contamination forte en HAP.

L'ensemble de ces points de prélèvements est représenté sur la *Figure 5.2* qui illustre également les niveaux de contamination en HAP (et donc de toxicité attendue) mesurés dans les sédiments.

## 2. ÉVALUATION DE L'EMBRYOTOXICITE DES SEDIMENTS DU SYSTEME LOT-GARONNE ET DU BASSIN D'ARCACHON

---

Les sédiments ont été prélevés respectivement en mars 2009 et en avril 2011 sur le Bassin d'Arcachon et sur le système Lot-Garonne. Les sédiments ont ensuite été conditionnés et stockés comme mentionné dans le *Chapitre 2 paragraphe 1.2*. L'enjeu de cette première expérience est d'étudier le potentiel embryotoxique global des différents sédiments naturels sélectionnés. En plus



**Figure 5.2. Schématisation des sites de prélèvements des sédiments naturels sur le Bassin d'Arcachon (campagne de mars 2009 effectuée dans le cadre du projet ASCOBAR)**  
Les sites de prélèvements sont représentés par un cercle. La couleur des cercles illustre les niveaux de contamination en HAP attendus depuis le rouge (plus fortement contaminé) au bleu (le moins contaminé).  
Remarque : pour plus de lisibilité, l'échelle des distances n'est pas respectée sur ce schéma.



de la caractérisation de la toxicité de ces matrices sédimentaires vis-à-vis des SPD du Medaka japonais, cette série d'expositions (une par environnement d'étude) doit permettre de choisir les sites qui seront ensuite étudiés lors de l'analyse croisée des effets embryotoxiques et des réponses biomoléculaires induits par ces sédiments.

## 2.1. Protocole expérimental

### 2.1.1. Conditions d'exposition

La toxicité des sédiments provenant du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon a été évaluée à l'aide du test MELA, au cours de deux séries d'expositions indépendantes. Les embryons de Medaka âgés de 1 j pf (fourni par le GIS-AMAGEN) ont été mis au contact des différents sédiments sous leur forme « brute » après un léger tamisage sur une grille Nytex® de 1 mm de maille. Le protocole d'exposition utilisé est globalement similaire à ce qui a été entrepris lors de l'étude des sédiments dopés. Les conditions d'exposition sont rappelées dans le **Tableau 5.1**. Les deux séries d'exposition ont été mises en œuvre selon le protocole décrit dans le *Chapitre 2, paragraphe 6.1* avec un renouvellement de l'ERS quotidien. Le volume de milieu renouvelé correspond au volume d'ERS nécessaire pour immerger les embryons ( $V_i$  dans le **Tableau 5.1**), soit 1 mL par réplicat au cours de ces séries d'exposition.

**Tableau 5.1. Conditions d'exposition appliquées lors de l'exposition des embryons de Medaka aux sédiments naturels du système Lot-Garonne et du bassin d'Arcachon**

Nb. sédiments traités	Nb. Réplicats par condition	Ø BP (mm)	Nb. Emb.	Stade	$M_{sed}$ (g p.h.)	$V_h$ ERS (mL)	$V_i$ ERS (mL)	$T_{incub}$ (°C)	Photop. (h j/n)
6	3	35	27	pré-morula (1 j pf)	5	0	1	26 °C	12 h/12 h

Ø BP : diamètre de la boîte de Pétri d'exposition ; Nb. Emb. : nombre d'embryons exposés par réplicat ;  $M_{sed}$  : masse de sédiment par réplicat en gramme de poids humide ;  $V_h$  ERS : volume d'ERS ajouté pour humidifier le sédiment de chaque réplicat ;  $V_i$  ERS : volume d'ERS ajouté dans un réplicat pour immerger les embryons ;  $T_{incub}$  : température d'incubation des embryons pour toute la durée du test ; Photop. : photopériode appliquée pour toute la durée du test en h de jour/h de nuit.

### 2.1.2. Paramètres suivis

Les marqueurs de toxicité suivis au cours des expositions des embryons de Medaka aux sédiments naturels sont identiques à ceux utilisés lors des expositions « phénotypiques » précédentes et sont rappelés dans le **Tableau 5.2**.

Les différents sédiments ont été caractérisés globalement avant exposition ( $T_0$ ) selon les méthodes décrites dans la *partie 2 du Chapitre 2*. Les profils granulométriques et le carbone organique particulaire ont été analysés respectivement par l'équipe de Michel Cremer (CR-CNRS HDR ; équipe Sédimentologie) et l'équipe d'Henri Etcheber (CR-CNRS HDR ; équipe Écologie et Biogéochimie des Systèmes Côtiers) du laboratoire EPOC (UMR CNRS 5805). Le dosage des HAP a été effectué par l'équipe d'Hélène Budzinski (DR1, équipe « Contaminants Organiques » du LPTC) du laboratoire EPOC. L'analyse des éléments métalliques a été entreprise au sein du Centre Commun d'Analyses du laboratoire CNRS 3097 FREDD de l'Université de La Rochelle sous la responsabilité de Michel Robert.

Au moment de l'arrêt de l'exposition ( $T_{10}$ ), les sédiments sont conservés dans les barquettes en aluminium (pour le dosage des HAP) ou directement dans les boîtes de Pétri d'exposition (dosage métaux). Les échantillons sont stockés à -20 °C jusqu'à pour une analyse ultérieure.

**Tableau 5.2. Paramètres suivis lors de l'exposition des embryons de Medaka aux sédiments naturels du système Lot-Garonne et du bassin d'Arcachon**

Paramètre/Analyse	Matrice concernée	Cinétique de mesure	Donnée dérivée
Caractérisation chimique	Sédiment	T0 (avant exposition) T10 (arrêt exposition)	Suivi de la contamination
Viabilité	Embryons Larves	Tous les jours	Viabilité embryonnaire Viabilité larvaire Viabilité cumulée
Rythme Cardiaque*	Embryons	Jour 6 et 7 pf	Activité Cardiaque
Éclosions	Embryons Larves	Tous les jours	Taux d'éclosion Durée du développement
Données biométriques	Larves	Jour d'éclosion	Longueur totale Taille de la tête Rapport T/L
Malformations	Larves	Jour d'éclosion	Occurrence des malformations
Dommages ADN (Test Comète)**	Larves	2j post-éclosion	Pourcentage d'ADN dans la queue

*N.B. : Toutes les observations sont effectuées sur l'ensemble des individus (embryons et/ou larves) de chaque réplicat sauf indication contraire ci dessous.*

*\* Mesure effectuée sur 5 embryons par réplicat*

*\*\* Analyse effectuée sur un pool de 5 larves par réplicat*

Les prélèvements de larves destinées à l'analyse des dommages à l'ADN par le test comète ont été effectués comme décrits dans le *Chapitre 3, paragraphe 2.1.2.*

Par ailleurs, un suivi de l'oxygène dissous à l'interface ERS-sédiment a été effectué durant toute la période d'exposition des embryons (soit environ 10 j pf) à l'aide d'une sonde de type Clark munie d'une cathode de garde.

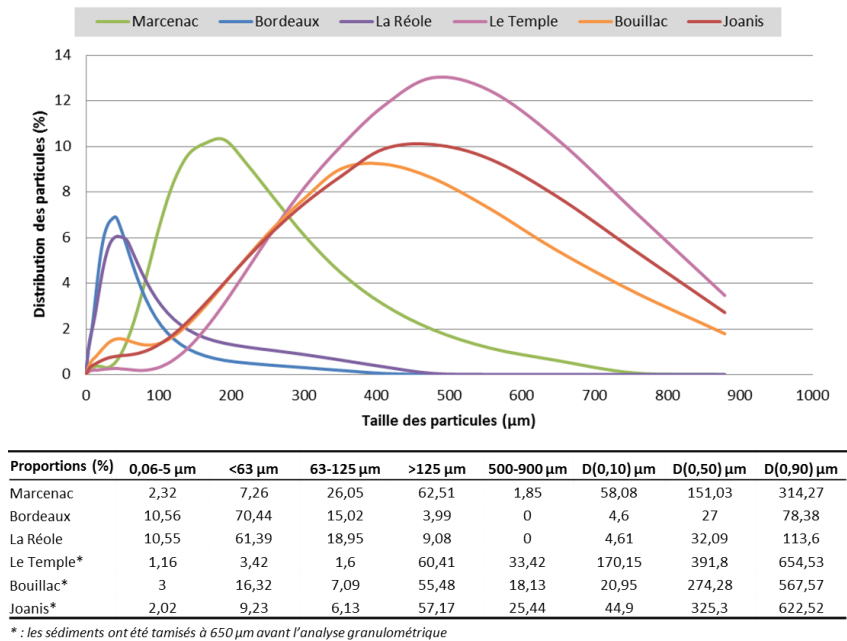
## 2.2. Caractérisation physico-chimique des sédiments

### 2.2.1. Granulométrie et carbone organique

La distribution des tailles des particules des sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon sont présentées respectivement sur la *Figure 5.3* et la *Figure 5.4.*

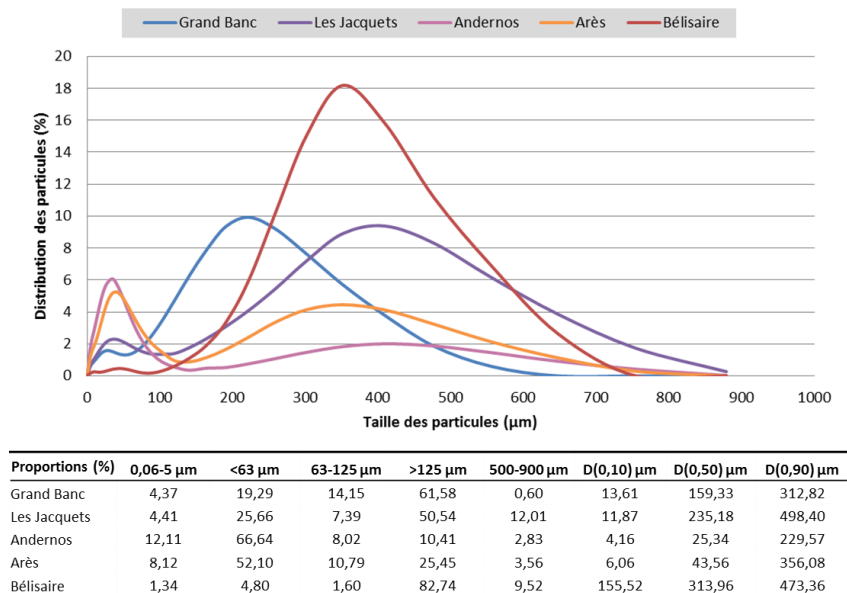
Le profil granulométrique de la taille des particules permet de distinguer trois groupes de sédiments parmi ceux prélevés dans le système Lot-Garonne. Le premier est composé des sédiments de Bordeaux et de La Réole présentant une granulométrie majoritairement très fine (<63  $\mu\text{m}$ ). Selon l'échelle de Wentworth modifiée, ces deux sédiments appartiennent respectivement à la classe des limons (silt) moyens et des limons grossiers (médianes de la taille des particules respectives de 27  $\mu\text{m}$  et 32,1  $\mu\text{m}$ ). Le second groupe de sédiments est uniquement constitué du site de Marcenac dont la taille médiane des grains de 151  $\mu\text{m}$  le place dans la classe des sables fins comme mentionné précédemment (voir le *Chapitre 3, paragraphe 2.2.1*). Le troisième groupe comprend des sédiments d'une granulométrie plus grossière provenant de Joanis, Bouillac et Le Temple. La taille médiane des grains sont respectivement de 325,3  $\mu\text{m}$ , 274,3  $\mu\text{m}$  et 391,8  $\mu\text{m}$  ce qui classe ces sédiments dans la catégorie des sables moyens.

Concernant les sites du Bassin d'Arcachon, il est également possible de séparer les sédiments en trois groupes distincts en fonction de leur distribution granulométrique. Le premier groupe comprend les matrices sédimentaires d'Andernos et d'Arès, majoritairement constituées de particules très fines (<63  $\mu\text{m}$ ) représentant respectivement environ 67 % et 52 % de l'ensemble des grains. En se basant sur leur médiane de taille de particules, les sédiments d'Andernos (25,34  $\mu\text{m}$ ) et



**Figure 5.3. Distribution granulométrique de la taille des particules des sédiments du système Lot-Garonne**

La figure propose une représentation graphique (en haut) de la distribution des particules (en %) en fonction de leur taille (en µm) et un tableau (en bas) qui synthétise les grandes classes de taille de particules selon leur présence (en %) au sein de chaque sédiment, ainsi que le 10ème centile D(0,10) ; la médiane D(0,50) et le 90ème centile D(0,90) de la distribution (en µm).



**Figure 5.4. Distribution granulométrique de la taille des particules des sédiments du Bassin d’Arcachon**

La figure propose une représentation graphique (en haut) de la distribution des particules (en %) en fonction de leur taille (en µm) et un tableau (en bas) qui synthétise les grandes classes de taille de particules selon leur présence (en %) au sein de chaque sédiment, ainsi que le 10ème centile D(0,10) ; la médiane D(0,50) et le 90ème centile D(0,90) de la distribution (en µm). Données issues des analyses effectuées dans le cadre du projet ASCOBAR.

d'Arès (43,56  $\mu\text{m}$ ) peuvent être respectivement classés dans les limons moyens et les limons grossiers. Les deux groupes de sédiment suivants sont relativement proches l'un de l'autre. Il est possible de regrouper les sites de Grand Banc et des Jacquets dont les sédiments présentent une proportion non négligeable de particules très fines représentant près de 19 % et 26 % respectivement. Ces deux matrices sont cependant majoritairement constituées de particules plus grossières (>125  $\mu\text{m}$ ) qui représentent respectivement 62 % et 51 % de la distribution. Les médianes de la taille des particules de 159,3  $\mu\text{m}$  pour le site de Grand Banc et de 235,2  $\mu\text{m}$  pour Les Jacquets les classent dans la famille des sables fins selon l'échelle de Wentworth modifiée, tout comme le sédiment de Marcenac. Enfin, le sédiment de Bélisaire est constitué dans sa quasi-totalité de grains de taille supérieure à 125  $\mu\text{m}$  qui représentent environ 83 % de l'ensemble des particules. La taille médiane de grains de ce sédiment est donc plus élevée que celle des autres sites du bassin avec une valeur avoisinant 314  $\mu\text{m}$  le plaçant dans la classe des sables moyens.

Les teneurs en carbone organique particulaire (COP) des différents sédiments naturels sont regroupés dans le **Tableau 5.3**.

**Tableau 5.3. Teneurs en carbone organique particulaire des sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon**

Teneur en carbone organique particulaire (%)			
Marcenac	0,1		
<i>Système Lot-Garonne</i>		<i>Bassin d'Arcachon*</i>	
Bordeaux	1,21	Grand Banc	0,72
La Réole	2,15	Les Jacquets	0,81
Le Temple	0,08	Andernos	3,85
Bouillac	0,79	Arès	3,62
Joanis	0,30	Bélisaire	0,24

\* : Les données concernant les sédiments du Bassin d'Arcachon sont issues des analyses effectuées dans le cadre du projet ASCOBAR.

Les sédiments du système Lot-Garonne présentent des teneurs en COP très variables. Le sédiment du Temple présente une valeur de 0,08 % pour ce paramètre, très proche de celle du sédiment de référence de Marcenac. Les sites de Bouillac et Joanis sont sensiblement plus chargés en COP avec des valeurs comprises entre 0,3 % et 0,8 %. Enfin, les sédiments de Bordeaux et La Réole, qui appartiennent à la classe granulométrique la plus fine observée parmi les sites du système Lot-Garonne, s'avèrent également les plus riches en matière organique avec des pourcentages respectifs en COP de 1,21 % et 2,15 %.

Concernant les sédiments du Bassin d'Arcachon, ceux-ci présentent tous des teneurs en COP supérieures à celle du sédiment de Marcenac. Le site de Bélisaire affiche la valeur la plus basse (0,24 %) pour ce paramètre parmi les différents sédiments du Bassin. Les sédiments de Grand Banc et des Jacquets sont légèrement plus chargés en COP avec des pourcentages compris entre 0,7 % et 0,8 % pour ce paramètre. Enfin, les sédiments d'Andernos et d'Arès sont plus riches en matière organique avec des concentrations relatives en COP proches de 4 %, en relation avec la proportion importante de particules fines par rapport aux autres matrices sédimentaires étudiées.

Pour l'ensemble des sédiments, la teneur en COP est positivement corrélée au pourcentage de particules fines de taille inférieure à 63  $\mu\text{m}$ . En effet, les coefficients de corrélation  $R^2$  de la droite de régression linéaire liant ces deux paramètres sont respectivement de 0,75 et de 0,94 pour les sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon.

### 2.2.2. Concentration en HAP

Les concentrations en HAP (16 HAP prioritaires) mesurées dans les sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon sont détaillées dans le **Tableau 5.4**.

De manière inattendue, certains sédiments du système Lot-Garonne présentent des concentrations extrêmement élevées en HAP. En effet, alors que le site de Marcenac est très faiblement contaminé par cette classe de composés avec une teneur en HAP totaux (27 composés dosés) de 6 ng/g, les sédiments du Temple et de Joanis présentent des concentrations très élevées d'environ 24 200 ng/g et 25 000 ng/g respectivement (*Figure 5.5.a*). Il est intéressant de noter que les profils moléculaires observés sont différents pour ces deux sites. En effet, le site de Joanis est plus fortement contaminé en HAP de faible poids moléculaire (2 à 3 cycles : du naphthalène au phénanthrène) par rapport au sédiment du Temple, qui s'avère particulièrement contaminé en anthracène et en phénanthrène (concentrations respectives de 7 896 ng/g et 6 289 ng/g). Le sédiment du Temple présente également des concentrations en HAP de haut poids moléculaire (3 à 6 cycles : du fluoranthène à l'indénopyrène) plus importantes que le site de Joanis. Ces différences de profils moléculaires entre ces deux sites pourraient indiquer des sources de contamination différentes.

Les autres sites du système Lot-Garonne présentent des teneurs moindres en HAP totaux avec des valeurs de 1 200 ng/g, 914 ng/g et 1 030 ng/g respectivement pour les sédiments de Bordeaux, La Réole et Bouillac. Au vu de ces concentrations, ces sites peuvent être considérés comme globalement faiblement impactés par cette classe de composés. Cette présence en HAP est néanmoins clairement visible par rapport au site témoin de Marcenac pour l'ensemble des 16 HAP prioritaires (**Tableau 5.4**). Les écarts de concentrations entre le site le plus contaminé (Joanis) et celui de Marcenac peuvent représenter jusqu'à un facteur supérieur à 30 000 pour le fluorène et proche de 14 000 pour le phénanthrène.

Concernant les sédiments du bassin, un gradient de contamination croissant escompté entre Grand Banc, Les Jacquets, Andernos, Arès et Bélisaire est visible pour la quasi-totalité des 16 HAP prioritaires (**Tableau 5.4**). Les écarts des concentrations en HAP individuels entre le site de Grand Banc et de Bélisaire peuvent atteindre un facteur de 80 pour l'anthracène, par exemple. Ce facteur est généralement compris entre 20 et 50 pour l'ensemble des autres HAP. Les teneurs des sédiments en HAP totaux pour ce site d'étude ne seront pas détaillés à nouveau ici puisqu'ils ont été présentés précédemment (voir *Chapitre 1 paragraphe 3.2.2* et le *paragraphe 1.2* de ce chapitre). La *Figure 5.5.b* propose une illustration des concentrations totales en HAP et en métaux de l'ensemble des sédiments du Bassin, et met bien en évidence le gradient de concentrations entre les différents sites échantillonnés sur le Bassin.

Au vu des concentrations en HAP individuels et totaux, tous les sites du Bassin montrent des teneurs pour cette classe de composés supérieures à celles observées pour le sédiment de Marcenac.

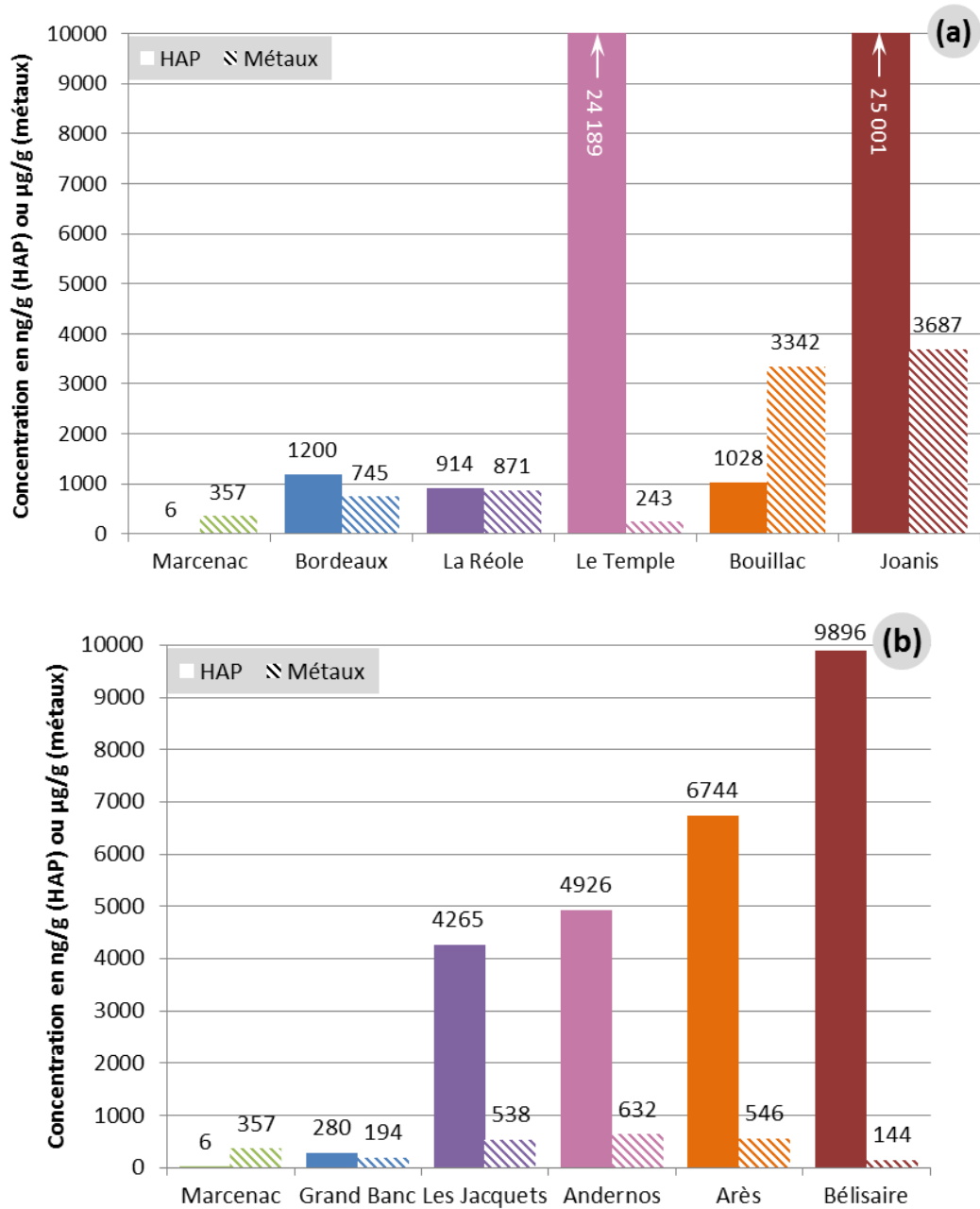
### 2.2.3. Concentration en éléments métalliques

Les concentrations en métaux retrouvées dans le sédiment de Marcenac ont déjà été décrites dans le *Chapitre 3, paragraphe 2.2.3.1*. Les teneurs en principaux éléments traces métalliques des sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon sont détaillées dans le **Tableau 5.5**.

Tableau 5.4. Concentrations en HAP individuels des sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon

	Concentration en ng/g p.s.														
	N	Acty	Acte	Fle	An	Phe	Fluo	Pyr	B[a]A	Chrys + Triph	B[a]P	B[b]F + B[k]F	D[a,h]A + D[a,c]A	BPe	IP
Marcenac	n.d.	n.d.	n.d.	0,03	n.d.	0,5	0,4	0,4	0,3	0,3	0,8	1,3	n.d.	0,5	0,5
<i>Système Lot-Garonne</i>															
Bordeaux	14	10	3	5	15	38	104	97	85	102	142	169	19	84	83
La Réole	19	4	4	5	12	83	138	105	53	81	76	131	14	56	58
Le Temple	n.d.	n.d.	32	137	626	1809	3852	2920	2191	2009	2331	3313	379	1282	1493
Bouillac	68	4	8	10	48	78	150	122	81	84	76	128	12	44	52
Joanis	364	4	195	901	7896	6289	2144	1307	856	1091	843	1257	160	450	551
<b>Facteur (J/M)</b>	-	-	-	<b>30834</b>	-	<b>13884</b>	<b>5492</b>	<b>3263</b>	<b>3151</b>	<b>3445</b>	<b>1114</b>	<b>945</b>	-	<b>893</b>	<b>1209</b>
<i>Bassin d'Arcachon *</i>															
Grand Banc	8	1	3	3	3	17	34	28	15	18	19	40	5	17	29
Les Jacquets	43	46	3	12	51	225	661	519	245	302	302	608	55	242	348
Andernos	16	37	7	19	42	294	744	587	281	350	353	714	67	293	443
Arès	93	54	15	48	95	365	954	742	459	505	504	957	96	390	563
Bélisaire	19	68	4	35	232	597	1593	1156	708	827	729	1365	125	446	618
<b>Facteur (GB/B)</b>	<b>2</b>	<b>49</b>	<b>1</b>	<b>12</b>	<b>80</b>	<b>36</b>	<b>48</b>	<b>41</b>	<b>48</b>	<b>45</b>	<b>38</b>	<b>34</b>	<b>23</b>	<b>26</b>	<b>21</b>

N : naphtalène ; Acty : acénaphthylène ; Acte : acénaphthène ; Fle : fluorène ; An : anthracène ; Phe : phénanthrène ; Fluo : fluoranthène ; Pyr : pyrène ; B[a]A : benzo[a]anthracène ; Chys + Triph : chrysène + triphénylène ; B[a]P : benzo[a]pyrène ; B[b]F + B[k]F : benzo[b]fluoranthène + benzo[k]fluoranthène ; D[a,h]A + D[a,c]A : dibenzo[a,h]anthracène + dibenzo[a,c]anthracène ; BPe : benzo[g,h,i]pérylène ; IP : indéno[1,2,3-c,d]pyrène. Facteur (J/M) ou (GB/B) : rapport entre les concentrations dosées à Joanis versus Marcenac ou Grand Banc versus Bélisaire. \* Données issues des analyses effectuées dans le cadre du projet ASCOBAR. N.d. : non déterminé.



**Figure 5.5. Concentrations totales en HAP et en métaux mesurées dans les sédiments du système Lot-Garonne (a) et du Bassin d'Arcachon (b)**

Les concentrations en HAP totaux (27 composés dosés et cumulés, barres pleines) sont indiquées en ng/g et celles des éléments métalliques (10 métaux dosés et cumulés, barres hachurées) sont mentionnées en µg/g.

**Tableau 5.5. Teneurs en principaux éléments traces métalliques des sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d’Arcachon**

	Concentration en µg/g									
	Co	Mn	Ni	Zn	Cr	Cu	As	Ag	Cd	Pb
Marcenac	5,6	261	9,5	35	10,0	6,2	17,5	0,04	0,14	12,5
<i>Système Lot-Garonne</i>										
Bordeaux	8,9	535	16,6	103	24,1	16,6	8,9	0,13	1,26	30,2
La Réole	8,3	649	16,9	115	23,7	20,1	10,7	0,11	1,54	25,8
Le Temple	5,1	183	16,2	16,8	10,2	4,1	3,0	0,03	0,44	3,9
Bouillac	10,4	843	22,8	2040	11,3	78,7	42,6	1,05	17,9	273
Joanis	9,8	883	17,5	2293	23,2	96,7	28,5	2,41	14,6	318
<b>Facteur (J/M)</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>66</b>	<b>2</b>	<b>16</b>	<b>2</b>	<b>56</b>	<b>104</b>	<b>26</b>
<i>Bassin d’Arcachon</i>										
Grand Banc	2,6	129	6,10	27,3	10,0	4,40	6,30	0,02	0,04	8,29
Les Jacquets	8,1	295	18,0	117	26,1	13,0	20,1	0,10	0,31	40,2
Andernos	9,8	307	23,6	145	34,8	20,0	28,3	0,14	0,48	62,9
Arès	9,6	241	21,7	143	31,7	19,6	26,6	0,13	0,49	52,8
Bélisaire	1,9	90,3	4,05	26,1	6,27	2,55	4,98	0,02	0,05	7,68
<b>Facteur (GB/An)</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>8</b>

Co : cobalt ; Mn : Manganèse ; Ni : nickel ; Zn : zinc ; Cr : chrome ; Cu : cuivre ; As : arsenic ; Ag : argent ; Cd : cadmium ; Pb : plomb. Facteur (J/M) ou (GB/An) : rapport entre les concentrations dosées à Joanis versus Marcenac ou Grand Banc versus Andernos.

Concernant le système Lot-Garonne, le gradient de concentrations est principalement marqué pour le Zn, le Cu, l’As, le Cd et le Pb ce qui milite en faveur d’une contamination polymétallique provenant de la région de Decazeville. De façon surprenante, le sédiment du Temple s’avère le moins contaminé, avec une teneur totale en éléments métalliques de 243 µg/g environ, valeur inférieure à celle mesurée pour le sédiment de référence de Marcenac qui se situe aux alentours de 357 µg/g. À l’exception de ce site, un gradient décroissant de concentrations amont-aval est observé tout au long du système Lot-Garonne, comme l’illustre la [Figure 5.5.a](#) avec des teneurs totales de 3 687 µg/g, 3 342 µg/g, 871 µg/g et 745 µg/g respectivement pour Joanis, Bouillac, La Réole et Bordeaux. De manière également inattendue, certains éléments métalliques (comme le Ni, l’As et le Cd) sont présents en concentrations supérieures au site de Bouillac en comparaison du site de Joanis. Cependant, ce dernier site reste globalement le plus contaminé en métaux au sein du système Lot-Garonne avec des écarts de concentrations par rapport à Marcenac pouvant atteindre un facteur de 104 pour le Cd. Ces facteurs sont également très élevés pour le Zn et l’Ag (66 et 56 respectivement) et dans une moindre mesure pour le Cu et le Pb (16 et 26 respectivement, **Tableau 5.5**). En se référant à la charge totale en éléments métalliques, les sédiments de Joanis sont 10 fois plus contaminés que ceux du site de référence.

Globalement, les sédiments du Bassin d’Arcachon sont moins chargés en éléments métalliques que ceux provenant du système Lot-Garonne, avec des teneurs totales d’environ 194 µg/g, 538 µg/g, 632 µg/g, 546 µg/g et 144 µg/g respectivement pour les sites de Grand Banc, Les Jacquets, Andernos, Arès et Bélisaire ([Figure 5.5.b](#)). Les sites les plus contaminés en éléments métalliques sont ceux des Jacquets, d’Andernos et d’Arès pour lesquels les concentrations individuelles pour l’ensemble des métaux dosés sont plus fortes en comparaison des deux autres sites étudiés. Le sédiment le plus fortement contaminé par cette classe de composés est celui d’Andernos dont les écarts de concentration par rapport au site de référence interne au Bassin (Grand Banc) représentent un facteur compris entre 2 et 5 pour la majorité des éléments métalliques. Ces facteurs peuvent



cependant atteindre une valeur de 8 pour l'Ag et le Pb et de 12 pour le Cd (**Tableau 5.5**). Globalement, le niveau de contamination du sédiment d'Andernos pourrait être comparé à celui observé pour le site de La Réole sur la Garonne. Enfin, le sédiment de Grand Banc est moins chargé en éléments métalliques que celui de Marcenac. Il en résulte une concentration totale en métaux deux fois moindre environ pour le site de référence du Bassin en comparaison de celui du système Lot-Garonne.

#### 2.2.4. Suivi de l'oxygène dissous

La mesure de l'oxygène dissous a été effectuée quotidiennement sur toute la durée de l'exposition c'est-à-dire jusqu'au pic d'éclosion. Lors de l'exposition aux sédiments du système Lot-Garonne, le taux d'oxygène dissous est resté relativement stable tout au long de l'expérience avec des valeurs moyennes comprises entre 82 % et 100 % air sat. (*Figure 5.6.a*). Les profils en oxygène obtenus pour les sédiments du Bassin d'Arcachon sont plus variables, notamment lors des trois premiers jours d'exposition. En effet, trois sédiments (Les Jacquets, Arès et Andernos) montrent des teneurs en oxygène dissous moyennes inférieures à 80 % (comprises entre 68 % et 76 %) sur cette période (*Figure 5.6.b*). Cependant, l'ensemble des traitements retrouve des valeurs moyennes supérieures ou proches de 80 % air sat. dès le jour 3 pf et se stabilisent alors jusqu'à la fin de l'exposition. Ces observations semblent reliées aux teneurs en COP plus élevées ainsi qu'une granulométrie plus fine pour ces sédiments (voir *paragraphe 2.2.1* de ce chapitre)

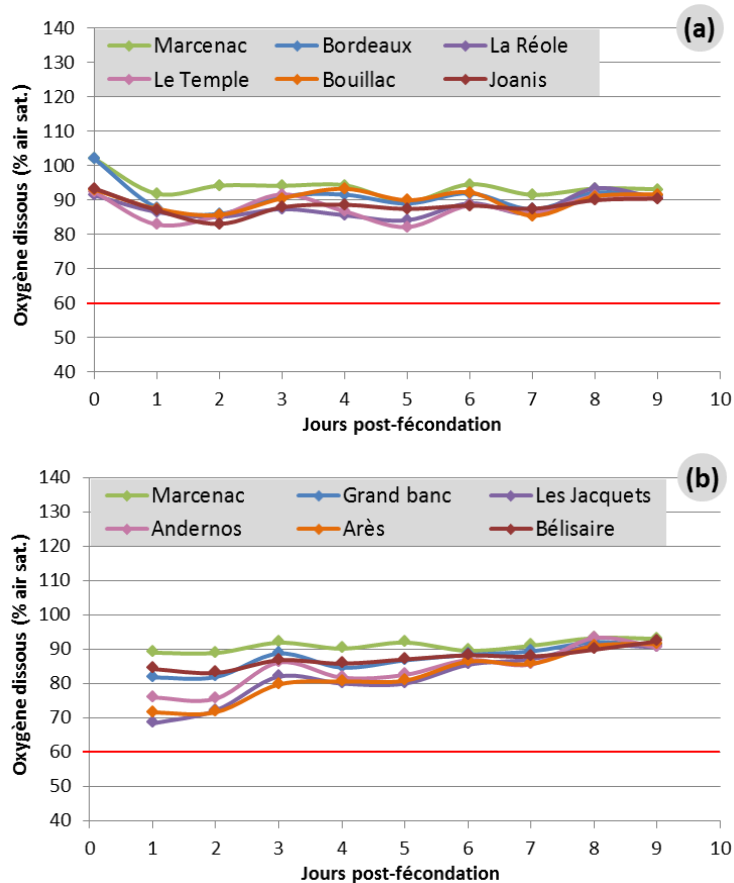
Quoiqu'il en soit, pour les deux séries d'expériences, le taux de saturation en oxygène reste largement au-delà du seuil minimum de 60 % air sat. préconisé par les lignes directrices de l'OCDE concernant les tests embryo-larvaires poissons (LD 212 OCDE, 1998 ; LD 210 OCDE, 1992b).

### 2.3. Résultats du test MELA

#### 2.3.1. Toxicité aigüe

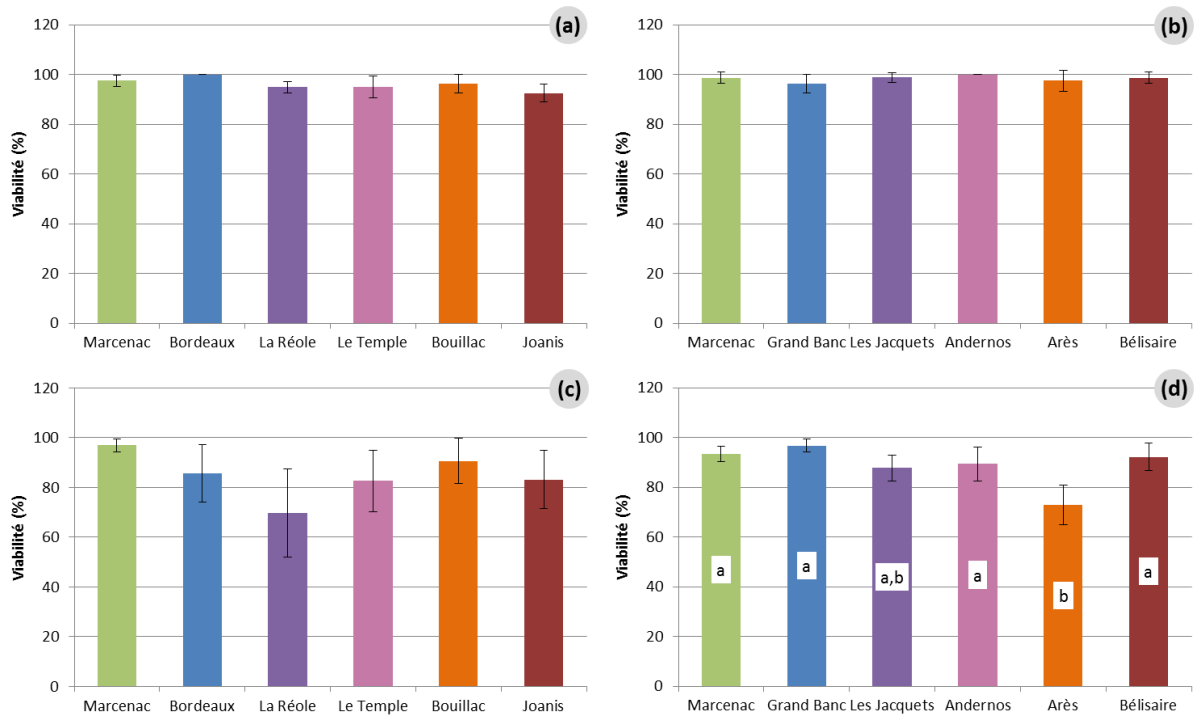
L'exposition aux différents sédiments du système Lot-Garonne n'a pas induit d'effets létaux chez les embryons de Medaka (*Figure 5.7.a*). En effet, les taux de survie embryonnaire sont élevés et compris entre 92,3 % et 100 % selon les traitements ; aucune différence significative n'est observée. L'analyse statistique des données de viabilité larvaire ne met en évidence aucune différence statistique entre le sédiment de Marcenac et les autres sites du système (*Figure 5.7.c*). Cependant, les valeurs moyennes observées pour les sédiments de Bordeaux, Le Temple et Joanis sont comprises entre 82,6 % et 85,6 % alors que le site de Marcenac affiche une viabilité larvaire moyenne de  $97,5 \pm 2,22$ . Enfin, la valeur moyenne la plus basse est observée après exposition des embryons au sédiment de La Réole avec seulement  $69,7 \pm 17,7$  de survie larvaire. Cette réduction de la viabilité larvaire particulièrement marquée pour ce site induit une diminution significative de la viabilité cumulée des individus exposés au sédiment de La Réole en comparaison du site témoin de Marcenac (*Figure 5.8*).

De même, l'exposition aux sédiments du Bassin d'Arcachon n'altère pas le taux de survie embryonnaire qui reste compris entre 96,3 % et 100 % (*Figure 5.7.b*). Par contre, la viabilité larvaire des individus exposés au sédiment d'Arès est significativement réduite en comparaison des sites de référence de Marcenac (externe au Bassin) et Grand Banc (interne au Bassin) avec des valeurs respectives moyennes de  $72,9 \pm 7,98$  %,  $93,6 \pm 3,09$  % et  $96,8 \pm 2,75$  % (*Figure 5.7.d*). Les pourcentages de survie larvaire observés pour les autres sédiments du Bassin sont relativement



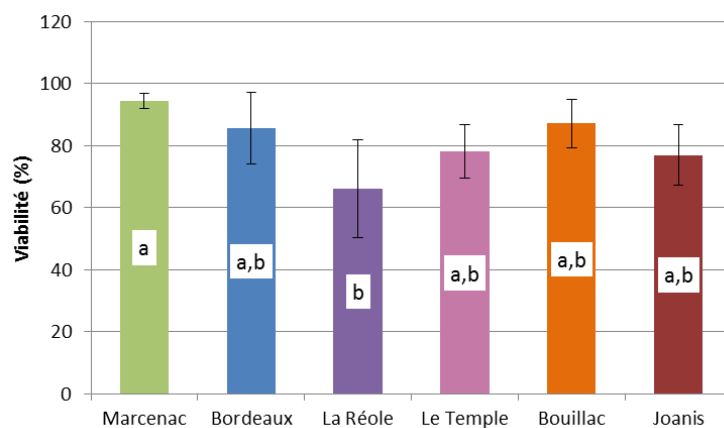
**Figure 5.6. Suivi de l'oxygène dissous lors des expositions aux sédiments du système Lot-Garonne (a) et du Bassin d'Arcachon (b)**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition. La ligne rouge marque le seuil d'oxygène dissous minimal préconisé par les lignes directrices de l'OCDE pour les tests embryo-larvaires poissons (LD 212 OCDE, 1998 ; LD 210 OCDE, 1992b).



**Figure 5.7. Viabilités embryonnaire (a, b) et larvaire (c, d) des embryons et larves de Medaka après exposition aux sédiments du système Lot-Garonne (a, c) et du Bassin d'Arcachon (b, d)**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type (N = 3). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres au centre des barres : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey).



**Figure 5.8. Viabilité cumulée des embryons et larves de Medaka après exposition aux sédiments du système Lot-Garonne**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type (N = 3). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres au centre des barres : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey).

hauts et compris entre 87,7 % et 92,2 %. Les viabilités cumulées moyennes présentant des profils de réponses identiques et n'apportant pas d'informations supplémentaires, ne sont pas présentées ici.

### 2.3.2. Tératogénicité & autres effets sublétaux

#### 2.3.2.1. Développement embryonnaire

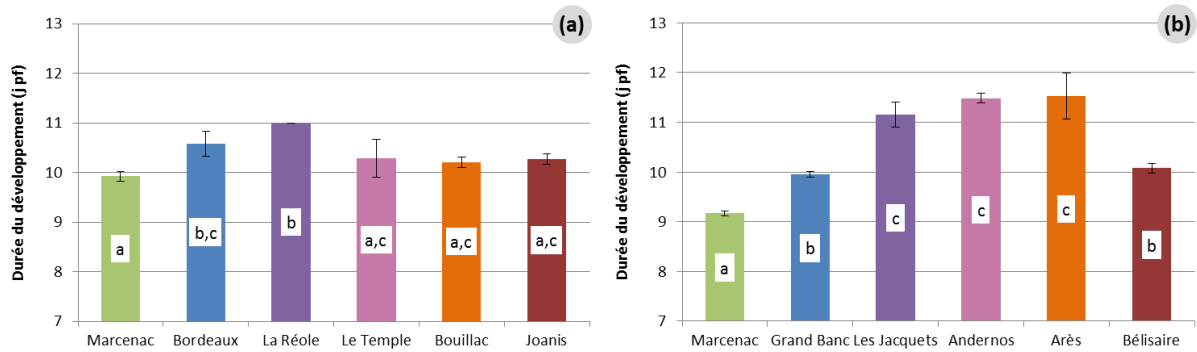
À l'exception d'un ou deux embryons par série d'expositions, l'ensemble des individus exposés aux sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon ont réussi à éclore pendant les 20 j pf de l'expérience. Les taux d'éclosion moyens qui en découlent sont donc extrêmement similaires aux viabilités embryonnaires présentées dans le paragraphe précédent (*i.e.* compris entre 92,6 % et 98,7 % pour les sédiments du système Lot-Garonne et entre 96,3 % et 100 % pour le Bassin d'Arcachon) et ne montrent aucune différence significative par rapport aux traitements témoins. Ils ne sont donc pas détaillés ici.

L'exposition des embryons de Medaka aux sédiments de Joanis, Bouillac et Le Temple n'a pas induit de modification de la durée moyenne du développement embryonnaire en comparaison de celle observée pour le sédiment de Marcenac. Pour ces quatre traitements, l'âge moyen des embryons à l'éclosion est compris entre 9,9 j pf et 10,3 j pf (*Figure 5.9.a*). Cependant, les embryons exposés aux sédiments de Bordeaux et de La Réole présentent un retard d'éclosion significatif par rapport au groupe de référence avec des durées moyennes de développement de  $10,6 \pm 0,25$  j pf et  $11,0 \pm 0,00$  j pf respectivement. Ceci pourrait s'expliquer par un colmatage partiel du chorion par des particules fines de ces sédiments.

L'ensemble des sédiments du Bassin d'Arcachon ont induit un allongement significatif de la durée moyenne du développement embryonnaire d'environ 24 h minimum par rapport au sédiment de référence externe de Marcenac (*Figure 5.9.b*). En effet, alors que pour ce dernier, l'âge moyen des embryons à l'éclosion est de  $9,2 \pm 0,05$  j pf, les embryons exposés au sédiment de référence interne au Bassin (Grand Banc) ont éclos en moyenne au bout de  $9,9 \pm 0,06$  j pf. Cependant, même en utilisant ce dernier sédiment comme point de comparaison, les embryons exposés aux sédiments des Jacquets, d'Andernos et d'Arès présentent un retard de développement significatif avec des âges moyens à l'éclosion compris entre 11,2 j pf et 11,5 j pf. En revanche, la durée moyenne du développement embryonnaire des embryons exposés au sédiment de Bélisaire, le plus fortement contaminé en HAP, n'est pas significativement modifiée en comparaison de ceux mis au contact du sédiment de Grand Banc.

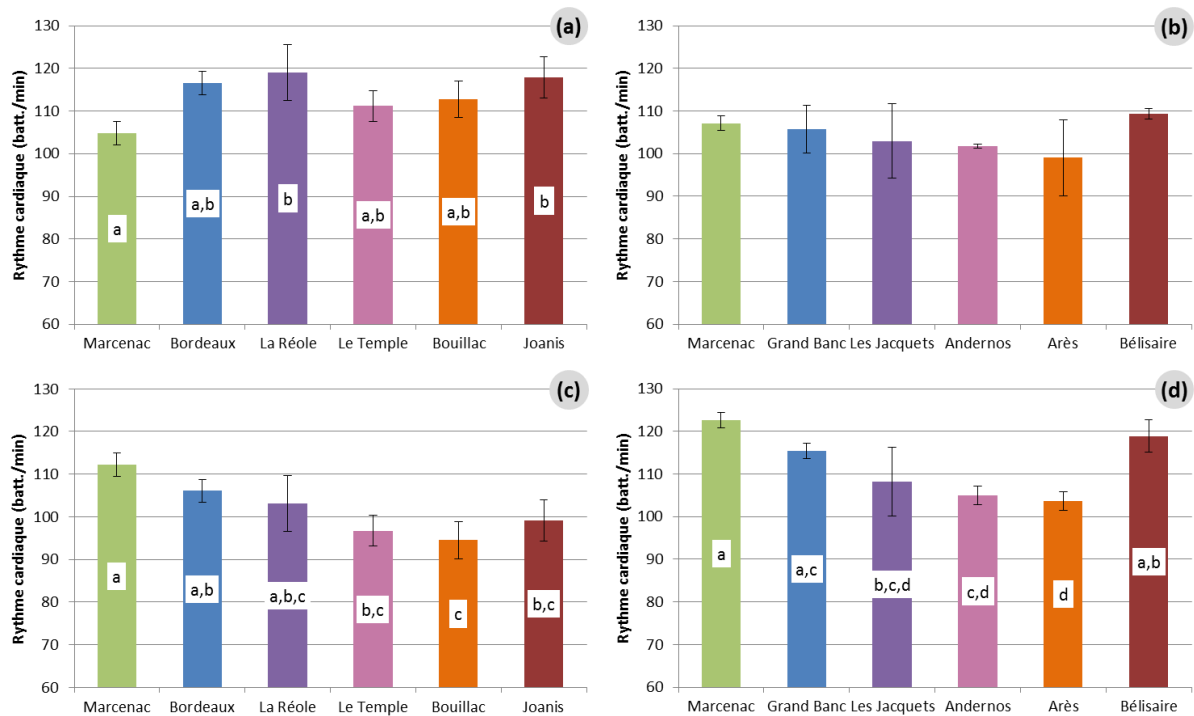
#### 2.3.2.2. Activité cardiaque ( $23 \pm 1$ °C)

De manière générale, le rythme cardiaque moyen des embryons âgés de 6 j pf est plus élevé (compris entre 113 batt./min et 119 batt./min) pour les sédiments du système Lot-Garonne en comparaison du groupe témoin de Marcenac ( $105 \pm 2,75$  batt./min), comme illustré sur la *Figure 5.10.a*. Cette augmentation de l'activité cardiaque par rapport au contrôle n'est significative que pour les individus exposés aux sédiments de La Réole et de Joanis. Cependant, la valeur moyenne obtenue chez les embryons exposés au sédiment de Bordeaux est également proche du seuil de significativité ( $p = 0,054$  selon le test *post-hoc* de Tukey) par rapport au groupe de Marcenac. De façon similaire à ce qui a été observé lors de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par le Cd, la tendance est inversée chez les embryons âgés de 7 j pf. En effet, alors que le rythme cardiaque moyen des embryons exposés aux sédiments de Marcenac est de  $112 \pm 5,01$  batt./min, les activités cardiaques des individus exposés aux autres sédiments du système



**Figure 5.9. Durée du développement embryonnaire des individus exposés aux sédiments du système Lot-Garonne (a) et du Bassin d'Arcachon (b)**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type (N = 3). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres au centre des barres : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey).



**Figure 5.10. Activité cardiaque des embryons âgés de 6 j pf (a, b) et 7 j pf (c, d) pendant leur exposition aux sédiments du système Lot-Garonne (a, c) et du Bassin d'Arcachon (b, d)**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type (N = 3). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres au centre des barres : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey).

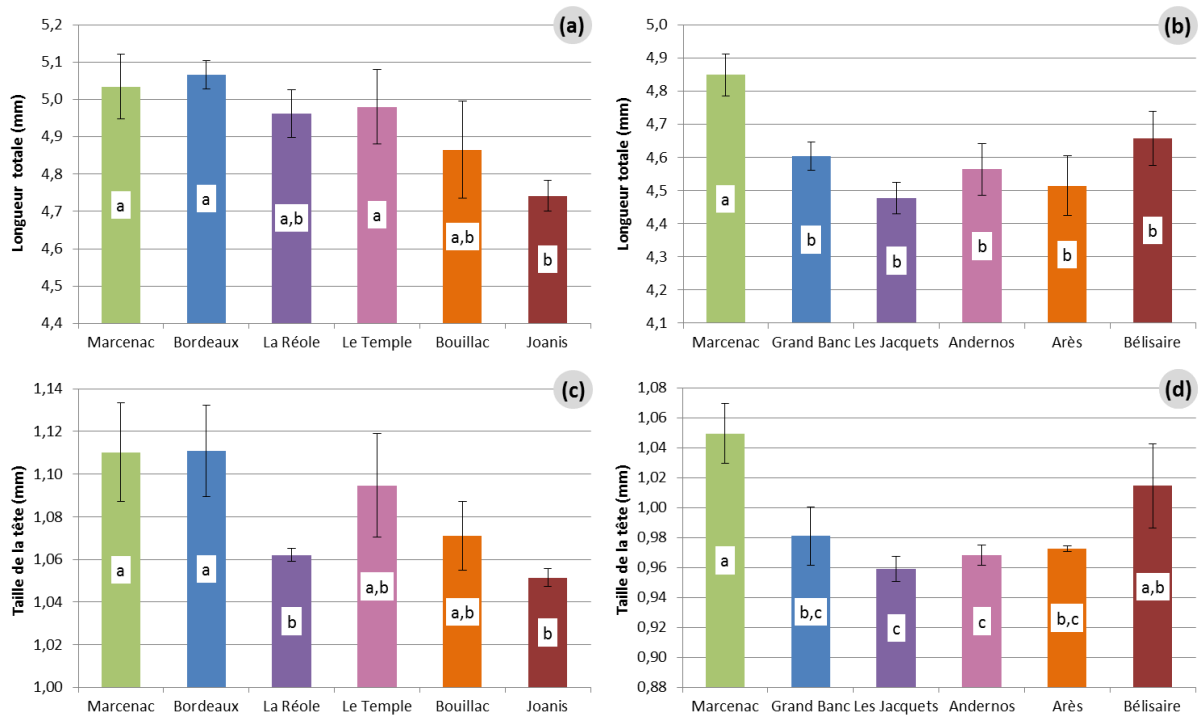
Lot-Garonne sont, en moyenne, comprises entre 94,5 batt./min et 106 batt./min (*Figure 5.10.c*). Cette bradycardie observée en comparaison du groupe de référence est significative pour les sédiments du Temple, de Bouillac et de Joanis.

L'exposition des embryons aux sédiments du Bassin d'Arcachon tend également à réduire l'activité cardiaque moyenne des individus au jour 6 pf en comparaison du sédiment de Marcenac à l'exception du site de Bélisaire pour lequel les embryons montrent un rythme cardiaque similaire au groupe de référence externe au Bassin (*Figure 5.10.b*). Cependant, l'analyse statistique ne permet pas de discriminer les résultats obtenus. Toujours à l'exception du site de Bélisaire, la tendance à la réduction de l'activité cardiaque des embryons exposés aux sédiments du Bassin est accentuée au jour 7 pf (*Figure 5.10.d*). En effet, le rythme cardiaque des individus exposés aux sédiments des Jacquets, d'Andernos et d'Arès est significativement plus bas, avec des valeurs moyennes comprises entre 103 batt./min et 108 batt./min, que celui mesuré chez les embryons de référence externe (Marcenac,  $123 \pm 1,80$  batt./min). En utilisant le site de Grand Banc comme référence, pour lequel le rythme cardiaque moyen est de  $115 \pm 1,74$  batt./min, seul le sédiment d'Arès induit une bradycardie significative. Cependant, les valeurs recueillies pour le site d'Andernos sont également proches du seuil de significativité avec une valeur de  $p = 0,068$  (test *post-hoc* de Tukey) par rapport au site de Grand Banc.

### 2.3.2.3. Données biométriques

La longueur totale moyenne des larves nouvellement écloses issues de l'exposition aux sédiments du système Lot-Garonne décroît graduellement à partir du site de La Réole et jusqu'au site de Joanis (*Figure 5.11.a*). Cette tendance n'est cependant statistiquement significative par rapport au groupe référence de Marcenac que pour ce dernier sédiment. Ainsi, la longueur totale moyenne des individus du groupe de Joanis représente une diminution d'environ 6 % par rapport au groupe témoin. La taille de la tête des larves à l'éclosion présente un profil de réponse similaire à celui observé pour la longueur totale, à l'exception du site de La Réole pour lequel la réduction de la taille de la tête est du même ordre de grandeur que pour le sédiment de Joanis (*Figure 5.11.c*). Pour ces deux sites, les tailles moyennes de la tête des larves, respectivement de  $1,06 \pm 0,00$  mm et  $1,05 \pm 0,00$  mm, sont significativement plus petites que celle mesurée pour Marcenac ( $1,11 \pm 0,02$  mm). Ces valeurs représentent une réduction respective d'environ 4 % et 5 % par rapport au témoin. Ces deux mesures biométriques présentant des profils de réponse similaires, le rapport T/L moyen qui en découlent reste relativement constant pour les différents sédiments (valeurs comprises entre 22,0 % et 22,2 %) à l'exception du site de La Réole. En effet, pour ce dernier, le rapport T/L moyen est évalué à  $21,45 \pm 0,33$  %. Néanmoins, aucune différence significative entre les sites n'est mise en évidence lors de l'analyse statistique.

A l'inverse de ce qui a été observé avec les sédiments du système Lot-Garonne, la diminution de la longueur totale des larves exposées aux sédiments du Bassin d'Arcachon ne suit pas le gradient de contamination en HAP (*Figure 5.11.b*). En effet, les valeurs moyennes obtenues pour ce paramètre sont comprises entre 4,48 mm et 4,66 mm pour les cinq sites du Bassin et ne sont pas statistiquement différentes les unes des autres. La longueur moyenne des larves exposées au sédiment de Marcenac est significativement plus élevée, se situant à environ  $4,85 \pm 0,06$  mm. Cette réduction de la taille des individus exposés aux sédiments du bassin représente une baisse de 4 % à 8 % par rapport au groupe de Marcenac. À l'exception du site de Bélisaire, la taille moyenne de la tête des larves observée pour les sédiments du Bassin est également significativement plus faible



**Figure 5.11. Mesures biométriques acquises sur les larves nouvellement écloses au cours de l'exposition aux sédiments du système Lot-Garonne (a, c) et du Bassin d'Arcachon (b, d)**

Les données biométriques acquises au cours du MELA incluent la longueur totale des larves (a, b) et la taille de la tête (c, d). Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type ( $N = 3$ ). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres au centre des barres : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey).

avec des valeurs moyennes comprises entre 0,96 mm et 0,98 mm en comparaison du site de Marcenac pour lequel la valeur moyenne est de  $1,05 \pm 0,02$  mm (*Figure 5.11.d*). Pour ces quatre sites du Bassin, la réduction de la taille de la tête représente une diminution de 7 % à 9 % par rapport au groupe de référence externe. Cependant, les valeurs moyennes de la taille de la tête des larves exposées aux sédiments des Jacquets, d'Andernos, d'Arès et de Bélisaire ne sont pas significativement différentes de celle obtenue pour le site de référence interne de Grand Banc. À noter tout de même que les valeurs obtenues pour les sites des Jacquets et d'Andernos sont significativement plus faibles que celle observée pour le site de Bélisaire. Les rapports T/L observés pour cette série d'exposition ne montre aucune variation notable entre les différents sites, avec des valeurs moyennes comprises entre 21,2 % et 21,8 %.

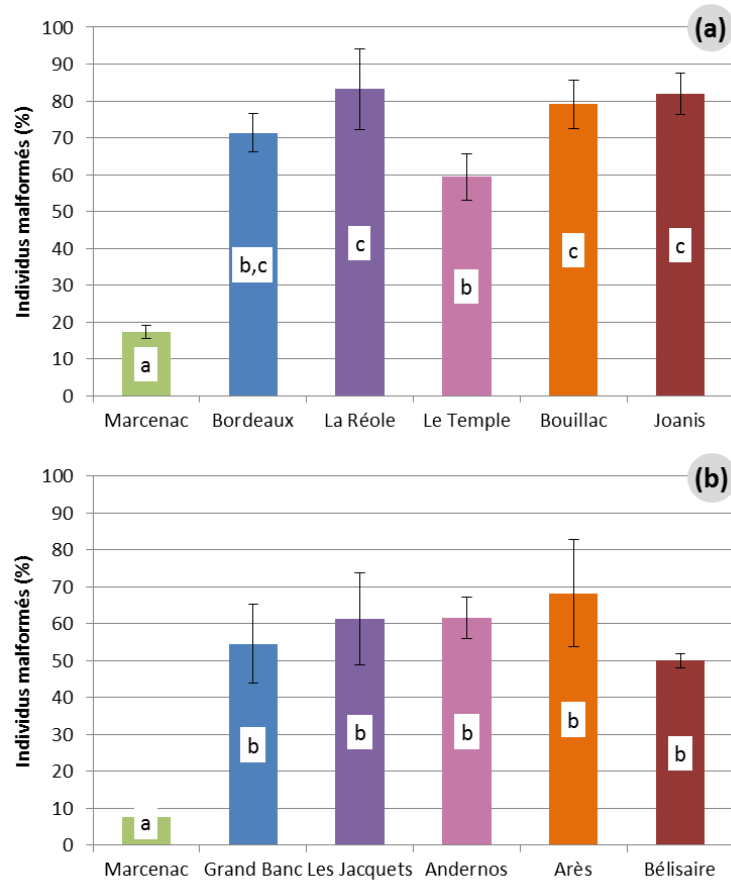
#### 2.3.2.4. Tératogénicité

L'ensemble des sédiments du système Lot-Garonne a engendré un accroissement significatif du taux de malformations chez les individus exposés en comparaison du groupe témoin de Marcenac (*Figure 5.12.a*). Le pourcentage d'individus malformés avoisine en moyenne les 60 % pour le site du Temple, 70 % pour le site de Bordeaux et 80 % pour les sites de La Réole, Bouillac et Joanis. Le groupe de Marcenac est, pour ce paramètre de  $17,3 \pm 1,68$  %. Le taux d'individus malformés pour le sédiment du Temple est significativement plus bas que ceux observés pour les sites de La Réole, Bouillac et Joanis.

Les pourcentages d'individus impactés par les différentes catégories de malformations prises en compte sont détaillés dans le **Tableau 5.6**. L'exposition des embryons au sédiment de Joanis induit une augmentation significative des malformations appartenant à toutes les catégories étudiées par rapport au groupe contrôle de Marcenac, à l'exception des anomalies oculaires. Les malformations les plus fréquemment retrouvées concernent le squelette axial (lordose, cyphose, corps arqué en forme de C et quelques scolioses) et le système cardio-vasculaire (défauts de courbure et de positionnement du cœur, dystrophie ou hypertrophie cardiaques) qui impactent plus de 50 % des individus. Les œdèmes (très majoritairement péricardiques), les malabsorptions du sac vitellin et les malformations cranio-faciales (notamment des mâchoires) sont moins représentés et affectent entre 14 % et 16 % des larves à l'éclosion. À l'exception du site de La Réole pour lequel la formation d'œdèmes (principalement péricardiques) est significativement induite chez 18 % des individus, les trois types de malformations précédemment citées ne sont pas accrus de manière significative au sein des autres traitements. A l'inverse, l'ensemble des sédiments testés augmentent significativement le taux de malformations cardio-vasculaires (défaut de courbure et de positionnement du cœur, dystrophie, hypo- ou hypertrophie cardiaques) en comparaison de Marcenac. Ce type d'effet tératogène peut concerner jusqu'à 60 % des individus éclos pour le site de La Réole. Les déformations du squelette axial sont observées de manière significative par rapport au site de Marcenac pour les sédiments de La Réole (54 % des individus) et de Bouillac (41 % des larves écloses). Par ailleurs, les données obtenues avec le sédiment de Bordeaux pour ce type de malformation est proche du seuil de significativité ( $p = 0,059$ ).

L'exposition des embryons aux cinq sédiments du Bassin d'Arcachon induit l'augmentation significative des malformations chez les larves nouvellement écloses, en comparaison du site de référence externe de Marcenac, pour lequel seul  $7,70 \pm 0,30$  % des individus présentent des anomalies développementales. Les taux d'individus malformés augmentent graduellement entre Grand Banc, Les Jacquets, Andernos et Arès avec des valeurs moyennes comprises entre environ





**Figure 5.12. Pourcentage d'individus présentant des malformations après exposition aux sédiments du système Lot-Garonne (a) et du Bassin d'Arcachon (b)**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type ( $N = 3$ ). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres au centre des barres : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey).

55 % et 68 %, puis redescendent de manière inattendue à 50 % pour le site de Bélisaire (Figure 5.12.b), sans que l'analyse statistique ne parvienne à discriminer les traitements entre eux.

**Tableau 5.6. Pourcentages d'individus impactés par les différents types de malformations après exposition aux sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon**

	Œdèmes	Squelette axial	Cranio-faciale	Œil	Cardio-vasculaire	Sac Vitellin
<i>Système Lot-Garonne</i>						
Marcenac	1 ± 2,22 % a	12 ± 4,30 % a	0 ± 0,00 % a	0 ± 0,00 %	12 ± 3,59 % a	0 ± 0,00 % a
Bordeaux	0 ± 0,00 % a	39 ± 8,54 % a,b	8 ± 0,47 % a,b	0 ± 0,00 %	<b>50 ± 11,09 % b,c</b>	1 ± 2,14 % a,b
La Réole	<b>18 ± 4,12 % b</b>	<b>54 ± 14,76 % b</b>	5 ± 2,13 % a,b	1 ± 2,22 %	<b>60 ± 10,53 % c</b>	13 ± 5,80 % a,b
Le Temple	4 ± 0,23 % a	35 ± 1,91 % a,b	10 ± 9,81 % a,b	0 ± 0,00 %	<b>37 ± 4,26 % b</b>	4 ± 4,17 % a,b
Bouillac	3 ± 2,23 % a	<b>41 ± 16,24 % b</b>	<b>9 ± 6,24 % a,b</b>	1 ± 2,14 %	<b>57 ± 8,24 % b,c</b>	13 ± 6,23 % a,b
Joanis	<b>16 ± 3,11 % b</b>	<b>51 ± 7,92 % b</b>	<b>14 ± 4,76 % b</b>	0 ± 0,00 %	<b>53 ± 5,70 % c</b>	<b>16 ± 10,66 % b</b>
<i>Bassin d'Arcachon</i>						
Marcenac	0 ± 0,00 %	1 ± 2,31 % a	0 ± 0,00 % a	0 ± 0,00 %	6 ± 2,05 % a	0 ± 0,00 % a
Grand Banc	0 ± 0,00 %	14 ± 8,79 % a,b	9 ± 2,14 % a,b	0 ± 0,00 %	<b>38 ± 9,41 % b</b>	<b>16 ± 6,53 % b,c</b>
Les Jacquets	8 ± 6,54 %	14 ± 5,97 % a,b	<b>19 ± 0,41 % b,c</b>	0 ± 0,00 %	<b>41 ± 16,86 % b</b>	<b>15 ± 13,99 % b,c</b>
Andernos	7 ± 0,00 %	<b>27 ± 11,32 % b</b>	<b>25 ± 7,71 % c,d</b>	1 ± 2,14 %	<b>36 ± 5,66 % b</b>	<b>19 ± 6,42 % c</b>
Arès	5 ± 5,89 %	<b>27 ± 14,30 % b</b>	<b>21 ± 2,98 % c,d</b>	1 ± 2,31 %	<b>48 ± 12,51 % b</b>	<b>18 ± 2,36 % c</b>
Bélisaire	0 ± 0,00 %	25 ± 2,48 % a,b	3 ± 2,18 % a	0 ± 0,00 %	<b>32 ± 1,48 % b</b>	4 ± 6,66 % a,b

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition ± écart-type (N = 3). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres à droite des valeurs concernées : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey)

Les pourcentages d'individus impactés par les différentes catégories de malformations prises en compte sont détaillés dans le **Tableau 5.6**. Comme pour les sédiments du système Lot-Garonne, les malformations du système cardio-vasculaire (défauts de courbure et de positionnement du cœur, dystrophie ou hypertrophies cardiaques) sont significativement induites pour tous les sites du Bassin en comparaison du groupe de Marcenac, avec des pourcentages de larves affectées compris entre 32 % et 48 %, sans différence statistique entre les sites. Pour ce type de malformations, les plus forts taux d'individus présentant des malformations sont observés pour les sédiments des Jacquets et d'Arès. Des malabsorptions des réserves vitellines sont également observées de façon significative par rapport à Marcenac pour tous les sites du Bassin d'Arcachon à l'exception de Bélisaire, et concernent entre 15 % et 19 % des larves nouvellement écloses. Chez 19 % à 25 % des individus, des malformations cranio-faciales, principalement localisées au niveau des mâchoires sont observées pour les individus issus de l'exposition aux sédiments des Jacquets, d'Andernos et d'Arès. Pour ces trois sites, cette augmentation du pourcentage de larves affectées par ce type de malformations est significative par rapport à Marcenac. Lorsque le site de référence interne de Grand Banc est utilisé comme référence, seuls les sédiments d'Andernos et d'Arès donnent une réponse significative. Enfin, environ 27 % des larves issues de l'exposition aux sédiments d'Andernos et d'Arès présentent des déformations du squelette axial (cyphose, lordose, corps arqué en forme de C et quelques scolioses) significatives par rapport à Marcenac. Les données observées pour le site de Bélisaire concernant ce type de malformations sont également proches du seuil de significativité en comparaison du site de référence de Marcenac ( $p = 0,053$ ).

## 2.4. Génotoxicité (test comète)

Malheureusement, suite à un problème technique au cours de la préparation des échantillons pour l'application du Test Comète, la génotoxicité potentielle des sédiments du Bassin d'Arcachon n'a pas pu être déterminée. Seuls les résultats obtenus avec les sédiments du système Lot-Garonne

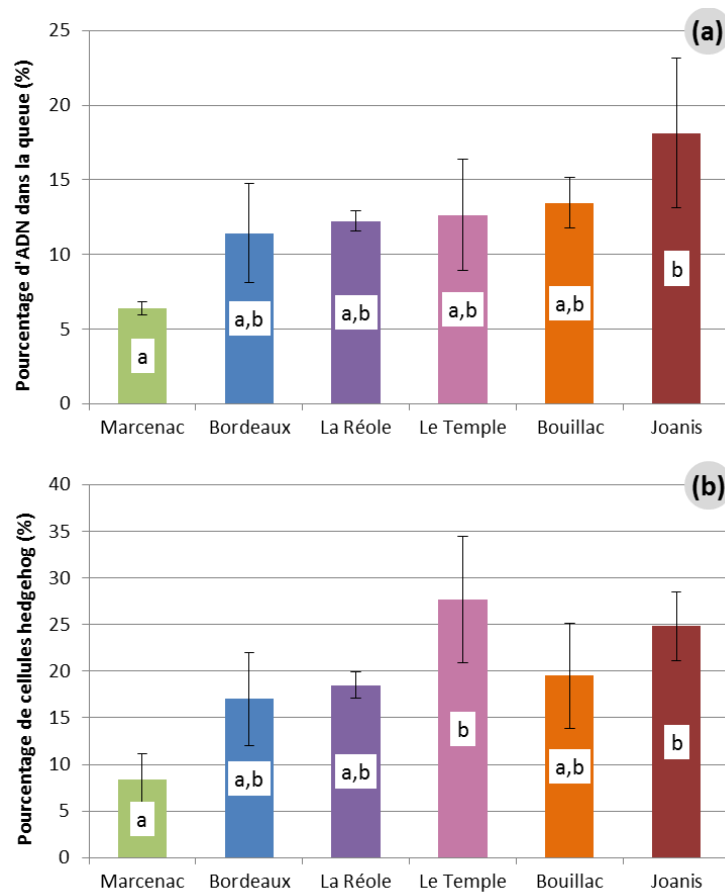
seront donc présentés ici. Comme précédemment, le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète et le taux de cellules hedgehog ont été mesurés. Les résultats obtenus pour ces deux paramètres sont présentés sur la *Figure 5.13.a* et *b* respectivement.

Le taux d'endommagement de l'ADN des cellules de larves de Medaka, représenté par le pourcentage d'ADN dans la queue, augmente graduellement entre les sites de Bordeaux et de Joanis, avec des valeurs moyennes comprises entre 11 % et 18 %, alors que la moyenne obtenue pour le contrôle Marcenac est de  $6,39 \pm 0,41$  % (*Figure 5.13.a*). Cette augmentation des dommages à l'ADN n'est cependant significative que pour le site de Joanis. Alors qu'au cours des expériences précédentes, le taux de cellules hedgehog présentait un profil de réponse très similaire à celui obtenu avec le pourcentage d'ADN dans la queue, les résultats observés ici concernant ces cellules très fortement endommagées sont quelque peu différents. En effet, le pourcentage de cellules hedgehog augmente bien graduellement entre les sites de Bordeaux, La Réole, Bouillac et Joanis, avec des valeurs moyennes variant de 17 % à 25 % (*Figure 5.13.b*). En revanche, le sédiment du Temple montre un taux moyen de cellules hedgehog supérieur d'environ 28 %. Seuls les sites de Joanis et du Temple sont significativement différents du témoin Marcenac pour ce paramètre. Ceci pourrait être le résultat de la contamination en HAP particulièrement importante de ces sédiments.

## 2.5. Synthèse des principaux résultats

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude est synthétisé dans le **Tableau 5.7**. Au cours des deux séries d'expositions seuls les sédiments de La Réole et d'Arès ont induit des effets létaux significatifs chez les individus exposés. De plus, l'ensemble des matrices sédimentaires a conduit à des effets tératogènes notables en induisant un large spectre de malformations par rapport au sédiment de référence de Marcenac. Toujours en utilisant ce site comme référence, le développement *in ovo*, décrit par l'âge embryonnaire à l'éclosion et les mesures biométriques, a été significativement altéré chez les individus exposés aux sédiments de Bordeaux, La Réole et Joanis ainsi que pour l'ensemble des sédiments du Bassin d'Arcachon. L'activité cardiaque des embryons est également perturbée de manière notable suite à l'exposition aux sédiments du système Lot-Garonne, à l'exception du site de Bordeaux. Les trois matrices sédimentaires du Bassin, Les Jacquets, Andernos et Arès, induisent également une altération du rythme cardiaque des embryons en comparaison du sédiment de Marcenac. Enfin, l'application du test Comète a permis de mettre en évidence un potentiel génotoxique modéré des sédiments du Temple et de Joanis chez les SPD du Medaka.

En considérant le nombre de paramètres ayant répondu significativement, les sédiments du système Lot-Garonne peuvent être classés par ordre croissant de toxicité de la manière suivante (le chiffre entre parenthèses représente le nombre de marqueurs significativement modulés) : Bordeaux et Bouillac (2) < Le Temple (3) < Joanis (4) < La Réole (5). Au vu de ce classement, il semble délicat de relier directement les réponses toxiques aux concentrations en métaux ou en HAP. Il semblerait plutôt que les effets observés soient le résultat combiné des deux types de contamination, à l'exception du site de La Réole pour lequel les niveaux de contamination mesurés ne semblent pas justifier de l'intensité des effets observés. Selon le même principe de classification, les sédiments du Bassin d'Arcachon peuvent être ordonnés de la manière suivante : Bélisaire (2) < Grand Banc (3) < Les Jacquets et Andernos (4) < Arès (5). Ce classement semble globalement suivre le gradient de concentration en HAP, exception faite du site de Bélisaire pour lequel le sédiment n'induit que des



**Figure 5.13. Dommages à l'ADN évalués par le test Comète chez des larves âgées de 2 j post-éclosion après exposition aux sédiments du système Lot-Garonne**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type ( $N = 3$ ). Le pourcentage d'ADN dans la queue d'une comète (a) a été mesuré sur 150 cellules par réplicat. Le pourcentage de cellules hedgehog (b) a été déterminé sur un total de 200 cellules par réplicat. Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres à droite des valeurs concernées : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey)

effets toxiques limités chez les SPD de Medaka en dépit d'une forte concentration en HAP totaux. Il se pourrait que les réponses obtenues à l'aide du test MELA puissent être influencées par la teneur en carbone organique.

**Tableau 5.7. Synthèse des résultats obtenus à l'aide des différents marqueurs étudiés au cours de l'évaluation de la toxicité des sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon**

	Viab.	DD	RC	Biom.	Malf.	Génotox.	[HAP tot]	[Mét. tot]	COP	Granulo.
<i>Système Lot-Garonne</i>										
Bordeaux	●	●	●	●	●	●	1 200	745	1,21	27,0
La Réole	●	●	●	●	●	●	914	871	2,15	32,1
Le Temple	●	●	●	●	●	●	24 189	243	0,08	392
Bouillac	●	●	●	●	●	●	1 028	3 342	0,79	274
Joanis	●	●	●	●	●	●	25 001	3 687	0,30	325
<i>Bassin d'Arcachon</i>										
Grand Banc	●	●	●	●	●	-	280	194	0,72	159
Les Jacquets	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	-	4 265	538	0,81	235
Andernos	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	-	4 926	632	3,85	25,3
Arès	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	-	6 744	546	3,62	43,6
Bélisaire	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	-	9 896	144	0,24	314

Les données sont synthétisées en fonction des résultats obtenus lors de leur analyse statistique : un point *vert* symbolise l'absence de différence significative par rapport au sédiment de Marcenac ; un point *orange* marque une différence significative par rapport à ce sédiment de référence ; un point *bleu* symbolise l'absence de différence significative par rapport au sédiment de Grand Banc ; un point *rouge* marque une différence significative par rapport à ce sédiment de référence. Viab. : viabilité ; DD : durée du développement embryonnaire ; RC : rythme cardiaque ; Biom. : mesures biométriques ; Malf. : malformations développementales ; Génotox. : effets génotoxiques. Dans la partie droite du tableau, les concentrations totales en HAP ([HAP tot], en ng/g) et en éléments métalliques ([Mét. Tot], en µg/g) ainsi que les teneurs en carbone organique particulaire (COP, en %) et la médiane de la taille des particules (Granulo., en µm) des différents sédiments sont mentionnées. Un code couleur a été appliqué afin de classer les différents sédiments en fonction des valeurs mesurées pour des paramètres : de la plus faible à la plus forte, les couleurs attribuées sont *bleu*, *violet*, *rose*, *orange* et *rouge*. Remarque : les données respectives pour ces trois caractéristiques sont de 6 ng/g p.s., 357 µg/g, 0,1 % et 151 µm pour le sédiment de Marcenac.

Lorsque les effets embryotoxiques induits par les matrices sédimentaires du Bassin d'Arcachon sont évalués en comparaison du site de référence de Grand Banc, les réponses observées sont moins marquées. En effet, seuls les sédiments d'Arès et d'Andernos révèlent alors une réelle tératogénicité. La réduction de la viabilité ainsi que l'altération de l'activité cardiaque des embryons observées pour le site d'Arès restent également significatives. Aucune modification des données biométriques acquises sur les larves nouvellement écloses n'est visible. Cependant, le retard d'éclosion indique toujours une altération du développement *in ovo* chez les individus exposés aux sédiments des Jacquets, d'Arès et d'Andernos. En utilisant ces profils de réponses par rapport au site de Grand Banc, le classement des sédiments du Bassin devient : Bélisaire (0) < Les Jacquets (1) < Andernos (2) < Arès (4). Ce classement semble globalement refléter la contamination en HAP des sédiments, toujours à l'exception du site de Bélisaire qui n'induit aucun effet significatif chez les individus exposés en comparaison du groupe de référence interne au Bassin. Il est intéressant de noter que ce site est également celui dont la teneur en COP est la plus faible.

### 3. ANALYSE CROISEE DES EFFETS EMBRYOTOXIQUES ET DES REPONSES BIOMOLECULAIRES APRES EXPOSITION AUX SEDIMENTS NATURELS DU SYSTEME LOT-GARONNE ET DU BASSIN D'ARCACHON

---

L'objectif de cette étude est de caractériser plus finement les réponses adaptatives ou toxiques des embryons et larves de Medaka exposés à une sélection de sédiments naturels provenant du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon. Pour cela, nous proposons une étude croisée des effets embryotoxiques et des réponses biomoléculaires à l'aide de la technique de RT-PCR. La bioaccumulation des métaux et des HAP a également été suivie au cours de l'exposition. L'analyse des profils d'expression génique et la mesure de la bioaccumulation ont été entreprises sur stade embryonnaire (au jour 7 pf, T7) et larvaire (à l'éclosion, T9), conformément au protocole utilisé pour les substances pures.

Les sédiments ont été sélectionnés en fonction des résultats des séries d'expositions présentées dans la partie précédente. Concernant le système Lot-Garonne, les trois sédiments ayant démontré le plus d'effets toxiques sont ceux de La Réole, Le Temple et Joanis. Le site de La Réole a été écarté au vu de la mortalité induite sur les embryons exposés. Le sédiment de **Joanis** a finalement été retenu en raison de sa teneur élevée en éléments métalliques et le large spectre d'effets induits chez les individus exposés. Les réponses obtenues après exposition à cette matrice sédimentaire seront comparées à celles observées pour le sédiment de **Marcenac**. Parmi les sédiments prélevés dans le Bassin d'Arcachon, les sites des Jacquets, d'Andernos et d'Arès se sont avérés les plus toxiques vis-à-vis des SPD de Medaka. Le site d'Arès n'a pas été retenu au vu de la mortalité observée chez les larves exposées à ce sédiment. La quantité de sédiment d'Andernos disponible ne nous a pas permis d'envisager son utilisation au cours de cette étude. Par conséquent, les réponses phénotypiques et biomoléculaires ont été analysées chez les embryons et larves de Medaka exposés aux sédiments des **Jacquets** et ont été comparées à celles observées pour les sites de référence de Marcenac et de **Grand Banc**.

#### 3.1. Choix des gènes étudiés

Les gènes dont l'expression a été modulée de manière notable au cours des expositions aux substances pures ont été sélectionnés pour la présente étude. L'ensemble des gènes étudiés ainsi que les mécanismes sous-jacents ciblés sont rappelés ci-dessous :

- ✓ La chaîne respiratoire mitochondriale : cytochrome c oxydase sous-unité I du complexe IV (*coxI*).
- ✓ Les mécanismes de détoxification et de métabolisation : le gène codant pour les métallothionéines (*mt*), impliquées dans la séquestration des métaux et le gène codant pour la biotransformation des xénobiotiques par la voie du cytochrome P450-1A (*cyp1A*).
- ✓ Les systèmes antioxydants : superoxyde dismutase cytosolique à cofacteur Cu et Zn (*sodCu*) et mitochondriale à cofacteur Mn (*sodMn*)
- ✓ Les mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire et d'apoptose : le gène suppresseur de tumeur *p53* et le gène codant la protéine pro-apoptotique de la famille Bcl (*bax*).

- ✓ Les processus du développement embryonnaire : le gène *wnt1* impliqué dans la somitogénèse et la prolifération cellulaire de manière générale.
- ✓ Les systèmes de réparation de l'ADN : le gène *rad51* impliqué dans les réparations des lésions double-brin de l'ADN par recombinaison homologue (homologue de *recA*) et le gène *ogg1* spécifique des réparations des lésions oxydatives des bases de l'ADN telle que la 8-oxodG.
- ✓ Le métabolisme de la vitamine A : le gène *raldh2* (Rétinaldéhyde déshydrogénase 2, également appelé *aldh1a2*, aldéhyde déshydrogénase famille 1 membre A2) codant pour l'enzyme nécessaire à la production d'acide rétinoïque à partir de rétinol ou de vitamine A ; les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque *rara1* et des rétinoïdes *rxra1*.

Le gène *β-actine* a été utilisé comme gène de référence.

## 3.2. Protocole expérimental

Le protocole expérimental appliqué au cours de la présente étude est globalement similaire à ce qui a précédemment été décrit dans le *Chapitre 3, paragraphe 4.2.* et le *Chapitre 4, paragraphe 3.2.* L'ensemble du matériel utilisé (boîtes d'exposition, quantités de sédiment et de milieu...) a été adapté au nombre d'embryons exposés conformément à ce qui a été fait lors des expériences précédentes.

### 3.2.1. Conditions d'exposition

Les quantités de matériel biologique nécessaires aux analyses biomoléculaires sur les sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon sont synthétisées dans le **Tableau 5.8**.

**Tableau 5.8.** Quantités de matériel biologique nécessaires aux analyses moléculaires entreprises après exposition des embryons de Medaka aux sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon

Analyse	Nb. d'individus par prélèvement	Nb. de prélèvement par réplicat	Nb. d'individus total
RT-PCR	8	3	24
Bioaccumulation métaux	15	1	15
Bioaccumulation HAP	39-48	1	39-48
		<b>TOTAL</b>	<b>87</b>

Les embryons ont été fournis par le GIS-AMAGEN (Gif-sur-Yvette). Une fois triés, les embryons âgés de 1 j pf ont été répartis en six réplicats par condition et exposés selon le protocole décrit dans le *Chapitre 2 au paragraphe 6.1*, avec un renouvellement complet de l'ERS quotidien. Le volume de milieu renouvelé correspond au volume d'ERS nécessaire pour immerger les embryons ( $V_i$  dans le **Tableau 5.9**). L'ensemble des conditions d'exposition appliquées au cours de cette étude sont présentées dans le **Tableau 5.9**.

**Tableau 5.9. Conditions d'exposition appliquées lors de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires après exposition des embryons de Medaka aux sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon**

Nb. Conditions traitées	Nb. Réplicats par condition	Ø BP (mm)	Nb. Emb.	Stade	M <sub>sed</sub> (g p.h.)	V <sub>h</sub> ERS (mL)	V <sub>i</sub> ERS (mL)	T <sub>incub</sub> (°C)	Photop. (j/n)
4	6	65	87	1 j pf	152	0	3	26 °C	12 h/12 h

Ø BP : diamètre de la boîte de Pétri d'exposition ; Nb. Emb. : nombre d'embryons exposés par réplicat ; M<sub>sed</sub> : masse de sédiment par réplicat en gramme de poids humide ; V<sub>h</sub> ERS : volume d'ERS ajouté pour humidifier le sédiment de chaque réplicat ; V<sub>i</sub> ERS : volume d'ERS ajouté dans un réplicat pour immerger les embryons ; T<sub>incub</sub> : température d'incubation des embryons pour toute la durée du test ; Photop. : photopériode appliquée pour toute la durée du test en h de jour/12 h de nuit.

### 3.2.2. Paramètres suivis et prélèvements

L'ensemble des paramètres suivis et des analyses effectuées au cours de cette expérience, ainsi que les cinétiques de mesure sont présentés dans le **Tableau 5.10**.

**Tableau 5.10. Paramètres étudiés lors de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires après exposition des embryons de Medaka aux sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon**

Paramètre/Analyse	Matrice concernée	Cinétique de mesure	Donnée dérivée
Caractérisation chimique (HAP et métaux)	Sédiment ERS	T0 (avant exposition) T7 (prélèvement) T9 (fin exposition)	Suivi de la contamination
Bioaccumulation en HAP* et métaux**	Embryons Larves	T7 (prélèvement) T9 (fin exposition)	Contamination des organismes
RT-PCR***	Embryons Larves	T7 (prélèvement) T9 (fin exposition)	Expression génique
Viabilité	Embryons	Tous les jours	Viabilité embryonnaire
Éclosions****	Embryons Larves	Tous les jours	Taux d'éclosion Durée du développement
Données biométriques*****	Larves	Jour d'éclosion	Longueur totale Taille de la tête Rapport T/L
Malformations*****	Larves	Jour d'éclosion	Occurrence des malformations

N.B. : Toutes les observations sont effectuées sur l'ensemble des individus (embryons et/ou larves) de chaque réplicat sauf indication contraire ci dessous.

\* Analyse effectuée sur 1 pool de 39-48 individus par réplicat (N=3) et par temps de prélèvement

\*\* Analyse effectuée sur 1 pool de 15 individus par réplicat (N=3) et par temps de prélèvement

\*\*\* Analyse effectuée sur 3 pools de 8 individus par réplicat (N=3) et par temps de prélèvement

\*\*\*\* Observation effectuée sur l'ensemble des individus de 3 réplicats par condition

\*\*\*\*\* Mesure effectuée sur 20 larves par réplicat (N=3)

N.B. : l'arrêt de l'exposition a lieu au moment du pic d'éclosion et l'expérience prend fin dès que l'ensemble des prélèvements a été effectué.

La caractérisation chimique à T0 des sédiments correspond en réalité aux dosages effectués au cours des séries d'exposition précédentes. Les prélèvements à T7 et T9 de sédiments et d'ERS sont effectués sur 3 réplicats à chaque fois. La quantité de matériel prélevé est ensuite divisée en deux parts égales, l'une destinée au dosage des HAP et l'autre à l'analyse des éléments métalliques. Les aliquotes de sédiments réservées aux dosages des HAP et des métaux sont traitées et stockées conformément à ce qui a été décrit respectivement dans le *Chapitre 4, paragraphe 2.1.2* et dans le *Chapitre 3, paragraphe 3.1.2*. De même, les échantillons d'ERS destinés à ces analyses sont traités et stockés comme mentionné précédemment dans le *Chapitre 4, paragraphe 3.2.2* et le *Chapitre 3, paragraphe 4.2.2* respectivement.

Les pools d'individus destinés à l'analyse de la bioaccumulation en métaux et en HAP sont traités de manière identique selon les indications figurant dans le *Chapitre 3, paragraphe 4.2.2*. Les



prélèvements destinés à la RT-PCR ainsi que le suivi des différents marqueurs phénotypiques sont effectués comme décrit dans le *Chapitre 3, paragraphe 4.2.2*.

Par ailleurs, un suivi de l'oxygène dissous a été effectué quotidiennement dans les mêmes conditions que pour les expositions aux sédiments naturels (voir *paragraphe 2.1.2* de ce chapitre).

### 3.3. Concentrations en principaux contaminants dans les sédiments et l'ERS

Les concentrations en HAP et en éléments métalliques des sédiments à T0 ont déjà été décrites dans les *paragraphe 2.1.2* et 0 de ce chapitre et ne seront donc pas à nouveau mentionnées ici. Les analyses des sédiments à T7 et T9 et de l'ERS sont en cours au sein de l'équipe « AQUA » du LPTC sous la direction du DR1 H. Budzinski et de l'équipe « Écotoxicologie Aquatique » de la Station Marine d'Arcachon, sous la responsabilité du PR Magalie Baudrimont.

### 3.4. Suivi de l'oxygène dissous

La mesure de l'oxygène dissous a été effectuée quotidiennement sur toute la durée de l'exposition, c'est-à-dire jusqu'au pic d'éclosion. Au cours de cette expérience, le taux d'oxygène dissous s'est avéré très stable au cours du temps, avec des valeurs moyennes supérieures à 85 % air sat. pour l'ensemble des sédiments testés (*Figure 5.14*). Selon ces résultats, une bonne oxygénation du milieu ERS a été assurée sur toute la durée de l'exposition, avec une concentration en oxygène dissous supérieure au seuil minimum de 60 % air sat. préconisé par les lignes directrices de l'OCDE concernant les tests embryo-larvaires poissons (LD 212 OCDE, 1998 ; LD 210 OCDE, 1992b).

### 3.5. Bioaccumulation en HAP et en métaux chez les embryons et larves

Les dosages des contaminants dans les tissus des individus exposés sont toujours en cours au sein de l'équipe « AQUA » du LPTC sous la direction du DR1 H. Budzinski et de l'équipe « Écotoxicologie Aquatique » de la Station Marine d'Arcachon, sous la responsabilité du PR Magalie Baudrimont.

### 3.6. Toxicité et modification du profil d'expression génique

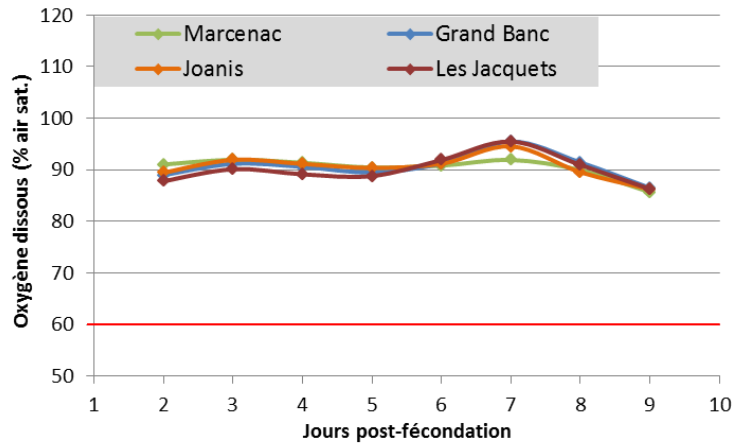
#### 3.6.1. Toxicité aigüe

Les taux moyens de survie des embryons de Medaka exposés aux différents sédiments étudiés sont supérieurs à 95 % pour tous les traitements (*Figure 5.15*). Néanmoins, la valeur moyenne obtenue pour le site des Jacquets ( $97,3 \pm 2,17$  %) s'avère significativement plus basse que celle du site de référence de Marcenac ( $99,6 \pm 0,59$ %) d'après le test statistique *post-hoc* de Tukey ( $p < 0,05$ ) mais pas par rapport au groupe témoin du Bassin de Grand Banc ( $99,4 \pm 1,39$  %).

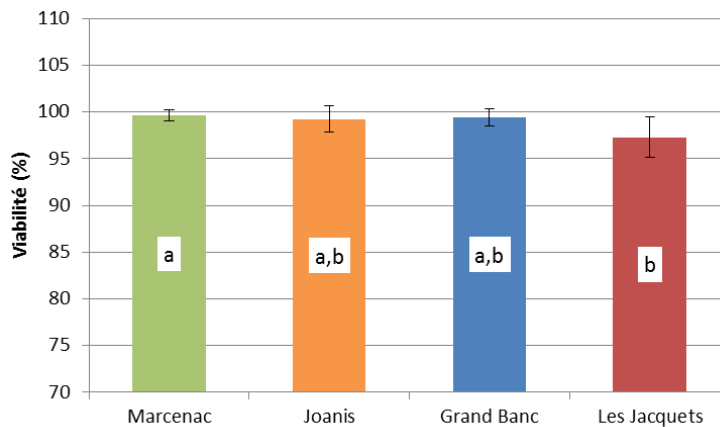
#### 3.6.1. Tératogénicité & autres effets sublétaux

##### 3.6.1.1. Développement embryonnaire

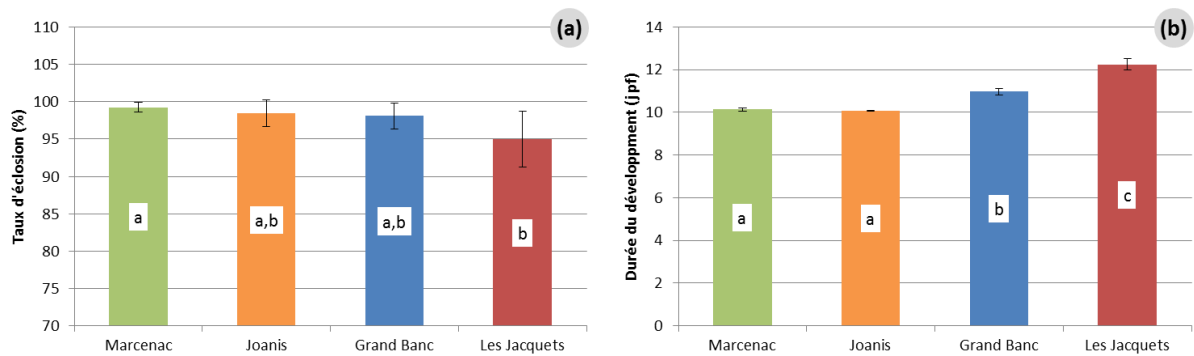
Les taux d'éclosion observés au cours de cette expérience sont élevés avec des valeurs moyennes comprises entre  $99,2 \pm 0,66$  % et  $95,0 \pm 3,75$  % respectivement pour les sites de Marcenac et des Jacquets (*Figure 5.16.a*). Ces deux valeurs sont par ailleurs significativement différentes l'une de l'autre. Cependant, une fois encore, aucune différence significative n'est observée entre Grand



**Figure 5.14. Suivi de l'oxygène dissous lors de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par les sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon**  
 Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition. La ligne rouge marque le seuil d'oxygène dissous minimal préconisé par les lignes directrices de l'OCDE pour les tests embryo-larvaires poissons (LD 212 OCDE, 1998 ; LD 210 OCDE, 1992b).



**Figure 5.15. Viabilité embryonnaire observée lors de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par les sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon**  
 Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type (N = 6). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres au centre des barres : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey).



**Figure 5.16. Taux d'éclosion (a) et durée du développement (b) des embryons lors de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par les sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type ( $N = 3$ ). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres au centre des barres : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey).

Banc et les Jacquets. Le taux d'éclosion et la durée du développement embryonnaire ont été calculés sur une période de 14 j pf (date à laquelle l'ensemble des prélèvements est effectué, utilisant tous les individus disponibles), plus courte donc que ce qui a été mis en œuvre lors de l'étude précédente de ces mêmes sédiments.

Les durées du développement embryonnaire des individus exposés aux deux sédiments du Lot ne présentent pas de différence significative entre elles, avec des valeurs moyennes aux alentours de 10,1 j pf (*Figure 5.16.b*). Un retard d'éclosion significatif est observé par rapport à ces deux sites chez les embryons exposés aux sédiments de Grand Banc et des Jacquets, qui présentent des âges moyens à l'éclosion de  $11,0 \pm 0,15$  j pf et  $12,2 \pm 0,27$  j pf respectivement. Ces deux valeurs sont également significativement différentes l'une de l'autre selon le test *post-hoc* de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Ces observations sont en accord avec celles obtenues lors des deux séries d'expositions précédentes.

### 3.6.1.2. Données biométriques

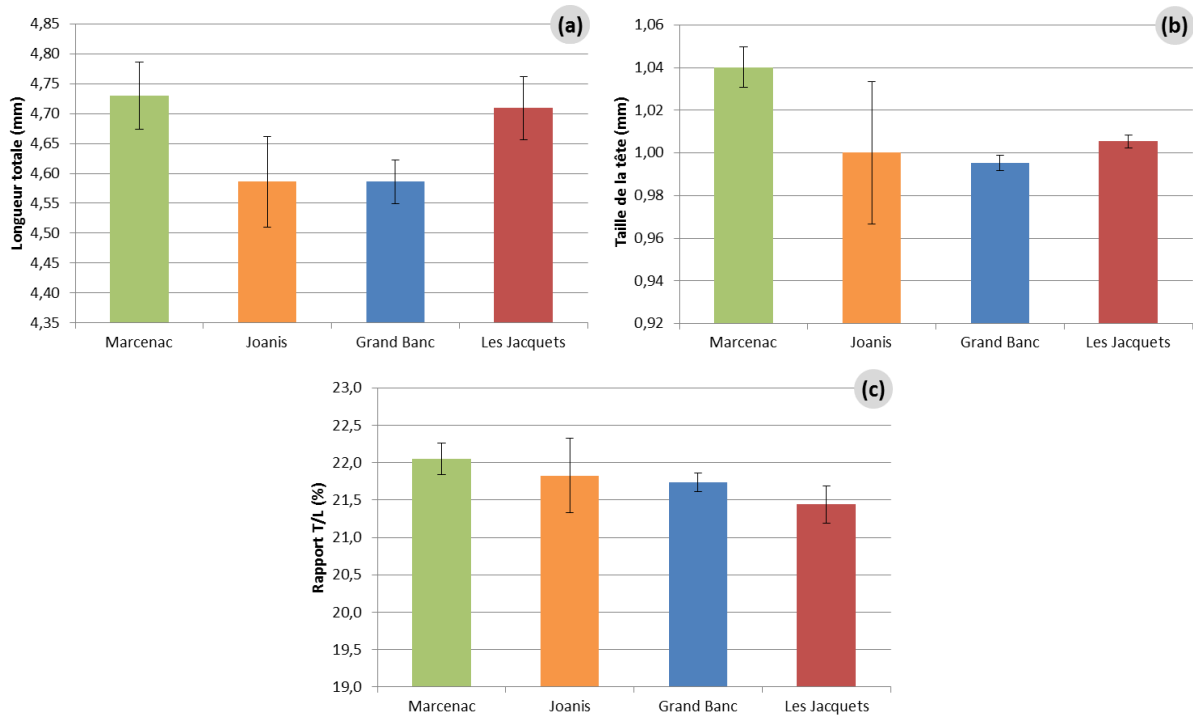
Les analyses biométriques ainsi que l'observation d'éventuelles anomalies développementales ont été réalisées chez 20 larves nouvellement écloses par réplicat. Les données biométriques issues de ces analyses sont présentées sur la *Figure 5.17*. Aucune différence significative entre les différents sites étudiés n'a été mise en évidence pour différents les paramètres étudiés.

Les longueurs totales moyennes des larves issues des groupes de Marcenac et des Jacquets sont similaires et proches de 4,7 mm. Cependant, les valeurs moyennes obtenues pour cette mesure chez les individus issus de l'exposition aux sédiments de Joanis et de Grand Banc sont légèrement plus basses, proches de 4,6 mm (*Figure 5.17.a*). Cette réduction d'environ 3 % par rapport au groupe témoin (Marcenac) est proche du seuil de significativité avec une valeur de  $p = 0,060$  environ (test *post-hoc* de Tukey) pour ces deux sites. Une tendance similaire est observable pour la taille de la tête des larves concernant cette fois-ci les trois sites de Joanis, Grand Banc et Les Jacquets. Suite à l'exposition à ces sédiments, la taille moyenne de la tête des larves avoisine 1,00 mm alors que les individus du groupe témoin de Marcenac présentent une valeur moyenne de  $1,04 \pm 0,01$  mm (*Figure 5.17.b*). Une fois encore, les sites de Joanis et de Grand Banc sont proches du seuil de significativité pour ce paramètre avec des valeurs de  $p$  de 0,089 et 0,056 respectivement.

Le rapport T/L décroît légèrement entre Marcenac, Joanis, Grand Banc et Les Jacquets avec des valeurs allant d'environ 22,1 % à 21,4 % sans discrimination statistique entre les différents sites (*Figure 5.17.c*).

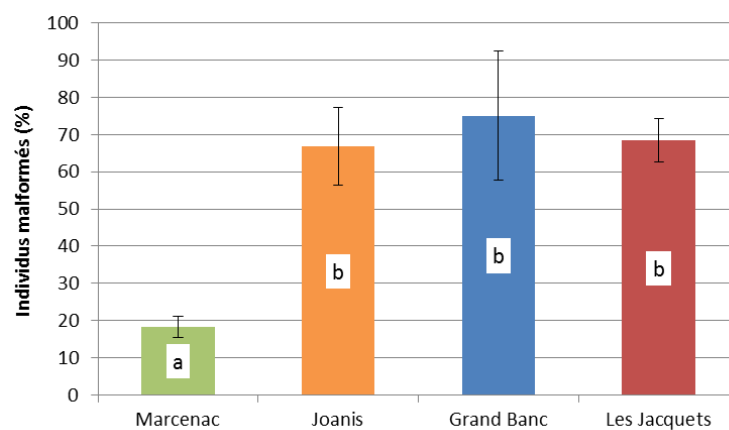
### 3.6.1.3. Tératogénicité

L'exposition des embryons de Medaka aux sédiments de Joanis, Grand Banc et Les Jacquets a induit l'apparition d'effets tératogènes notables chez les larves nouvellement écloses en comparaison du site de Marcenac. En effet, le taux moyen d'individus présentant des anomalies développementales avoisine les 67 % à 68 % pour les groupes de Joanis et des Jacquets et le site de Grand banc affiche une valeur maximale de  $75,0 \pm 10,4$  % (*Figure 5.18*). Le pourcentage d'individus malformés pour le sédiment de Marcenac est significativement inférieur avec une valeur moyenne de  $18,3 \pm 2,89$  %. Les taux d'individus affectés par les différentes catégories de malformations phénotypiques étudiées sont détaillés dans le **Tableau 5.11**.



**Figure 5.17. Mesures biométriques acquises sur les larves nouvellement écloses au cours de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par les sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon**

Les données biométriques acquises au cours du MELA incluent la longueur totale des larves (a), la taille de la tête (b) et le rapport T/L (c) et sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type (N = 3). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres au centre des barres : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey).



**Figure 5.18. Pourcentage de larves malformées observées au cours de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par les sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon**

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition  $\pm$  écart-type (N = 3). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres au centre des barres : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$  selon le test post-hoc de Tukey).

**Tableau 5.11. Pourcentages d'individus impactés par les différents types de malformations après exposition aux sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon dans le cadre de l'analyse croisée des réponses phénotypiques et biomoléculaires induites**

	Œdèmes	Squelette axial	Cranio-faciale	Œil	Cardio-vasculaire	Sac Vitellin
Marcenac	0 ± 0,00 %	7 ± 2,89 %	2 ± 2,89 % a	0 ± 0,00 %	12 ± 5,77 % a	0 ± 0,00 % a
Joanis	5 ± 5,00 %	18 ± 7,64 %	<b>20 ± 5,00 % b</b>	0 ± 0,00 %	40 ± 15,0 % a,b	12 ± 2,89 % a,b
Grand Banc	10 ± 5,00 %	20 ± 8,66 %	<b>28 ± 2,89 % b</b>	0 ± 0,00 %	<b>57 ± 14,3 % b</b>	<b>30 ± 5,00 % b</b>
Les Jacquets	15 ± 10,0 %	20 ± 15,0 %	<b>23 ± 2,89 % b</b>	3 ± 2,89 %	<b>53 ± 10,4 % b</b>	22 ± 16,1 % a,b

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition ± écart-type (N = 3). Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres à droite des valeurs: des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ( $p < 0,05$ ) selon le test post-hoc de Tukey.

L'exposition au sédiment de Joanis accroît de façon significative la fréquence des malformations cranio-faciales (principalement au niveau des mâchoires), par rapport au groupe témoin de Marcenac. Le pourcentage d'individus affectés par les anomalies du système cardio-vasculaire (défauts de courbure et de positionnement du cœur, dystrophie ou hypotrophie cardiaques) est proche du seuil de significativité ( $p = 0,077$ ) en comparaison du groupe de référence.

Les profils de malformations observés après exposition aux sédiments de Grand Banc et des Jacquets sont globalement similaires à ceux observés au cours de la première série d'expériences. En effet, l'exposition au sédiment des Jacquets induit une augmentation significative des malformations cranio-faciales et cardio-vasculaires (identiques à celles décrites ci-dessus) par rapport au sédiment de Marcenac. De plus, environ 22 % des larves exposés à ce sédiment présentent des signes de malabsorption des réserves vitellines. Cette valeur est proche du seuil de significativité par rapport au sédiment de Marcenac ( $p = 0,057$ ).

De façon similaire, l'exposition au sédiment de Grand Banc accroît significativement le pourcentage de malabsorptions du sac vitellin ainsi que des malformations cranio-faciales et cardiovasculaires par rapport au sédiment de Marcenac, avec des valeurs respectives de 28 %, 57 % et 30 %. Aucune différence statistique n'est mise en évidence entre les deux sites du Bassin.

### 3.6.2. Altération du profil d'expression génique

L'expression de 13 gènes d'intérêt impliqués dans différentes voies métaboliques a été analysée à l'aide de la technique de qRT-PCR chez les embryons en fin d'organogénèse (T7) et les larves à l'éclosion (T9), après exposition aux sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon. Les expressions géniques différentielles ont été déterminées en utilisant la  $\beta$ -actine comme gène de ménage. Le détail des expressions géniques moyennes obtenues pour chaque réplicat sont rapportées dans l'Annexe 4. Les résultats de cette analyse sont synthétisés dans le **Tableau 5.12**, sous la forme de facteurs d'induction FI calculés comme décrit dans le *Chapitre 3, paragraphe 4.5.4*. Les FI ont été déterminés pour l'ensemble des sédiments en utilisant le groupe de Marcenac comme témoin. De plus, des FI complémentaires ont été calculés pour le site des Jacquets en utilisant Grand Banc comme référence.

L'exposition des embryons de Medaka au sédiment de Joanis conduit à une induction significative ( $p < 0,05$  selon le test  $t$ ) du gène *cyp1A*, impliqué dans la biotransformation des xénobiotiques, par rapport au sédiment de Marcenac. De façon surprenante, l'expression du gène *mt* intervenant dans l'élimination des métaux est fortement réprimée pour ce sédiment. Nous noterons également une inhibition de l'expression du gène *bax*, impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire, pour

le sédiment de Joanis, avec une valeur proche de significativité en comparaison de Marcenac ( $p = 0,054$  selon le test  $t$ ).

**Tableau 5.12. Expression différentielle des gènes d'intérêt chez les embryons de Medaka au cours de l'analyse croisée des effets phénotypiques et biomoléculaires induits par les sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon**

	Métabolisme mitochondrial			Métabolisation / Détoxication		Défense stress oxydant		Arrêt cycle cellulaire / apoptose		Développement	Réparation ADN		Métabolisme de la vitamine A	
	<i>cox1</i>	<i>cyp1A</i>	<i>mt</i>	<i>sod</i> (Mn)	<i>sod</i> (Cu)	<i>p53</i>	<i>bax</i>	<i>wnt1</i>	<i>ogg1</i>	<i>rad51</i>	<i>raldh2</i>	<i>rara1</i>	<i>rxra1</i>	
<b>Stade embryonnaire (T7)</b>														
Joanis	/	2,9*	0,1*	/	/	/	0,5 <sup>b</sup>	/	/	/	/	/	/	/
Grand Banc	0,5 <sup>a</sup>	2,3*	0,3*	/	0,5	/	0,5*	0,4 <sup>c</sup>	0,4*	/	/	/	/	/
Les Jacquets	0,4*	2,2*	0,3*	0,4	0,4	/	/	0,5	0,5 <sup>d</sup>	/	/	/	/	/
FI LJ/GB	/	/	/	/	/	/	/	/	/	2,4	/	/	/	/
<b>Stade larvaire (T9)</b>														
Joanis	2,0	2,9 <sup>e</sup>	1,4 <sup>f</sup>	0,4	0,4	0,4	/	2,3 <sup>i</sup>	/	2,6	/	/	/	/
Grand Banc	/	2,1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Les Jacquets	/	/	0,4 <sup>g</sup>	0,5 <sup>h</sup>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
FI LJ/GB	/	0,5	0,4*	/	/	/	2,0	/	/	2,1	/	/	/	/

Les résultats sont mentionnés sous la forme de facteurs d'induction ( $>1$ ) ou de répression ( $<1$ ) par rapport au contrôle. Un astérisque (\*) symbolise une différence significative par rapport au groupe témoin selon le test  $t$  pour échantillons indépendants ( $p < 0,05$ ). Le signe / signifie l'absence de variation notable de l'expression génique par rapport au contrôle ( $0,5 < FI < 2$  et test  $t$  non-significatif). (a)  $p = 0,066$  par rapport au groupe Marcenac ; (b)  $p = 0,054$  ; (c)  $p = 0,093$  ; (d)  $p = 0,056$  ; (e)  $p = 0,077$  ; (f)  $p = 0,088$  ; (g)  $p = 0,052$  ; (h)  $p = 0,086$  ; (i)  $p = 0,084$ .

L'exposition au sédiment des Jacquets induit une répression significative de l'expression du gène *cox1* de la chaîne respiratoire mitochondriale, par rapport au sédiment de Marcenac, chez les embryons exposés. De plus, l'inhibition de ce gène est également proche du seuil de significativité pour le site de Grand Banc ( $p = 0,066$ ). Les deux gènes impliqués dans la biotransformation des xénobiotiques (*cyp1a*) et l'élimination des métaux (*mt*) s'avèrent respectivement surexprimés et réprimés, pour les deux sédiments du Bassin par rapport au site de référence de Marcenac. De plus, une répression significative du gène *bax* et du gène de réparation des lésions oxydatives de l'ADN *ogg1*, est observé chez pour le sédiment de Grand Banc. L'inhibition de ce dernier gène est également proche du seuil de significativité ( $p = 0,056$ ) pour le sédiment des Jacquets en comparaison de Marcenac. Comme le montrent les résultats ci-dessus, l'expression de cinq gènes est significativement modulée par l'exposition des embryons de Medaka aux sédiments du Bassin par rapport au sédiment de Marcenac. Cependant, aucune modulation significative de l'expression génique n'est observée en comparant les réponses obtenues pour le sédiment des Jacquets à celles du site de référence de Grand Banc.

De façon similaire à ce qui a été observé au stade embryonnaire, le gène *cyp1a* tend à être surexprimé chez les larves exposées au sédiment Joanis et de Grand banc même si ces différences ne sont pas significatives. Pour le sédiment des Jacquets, le gène *mt* est toujours réprimé par rapport à l'expression observée chez les larves exposées au sédiment de Marcenac, avec une valeur de  $p$  très proche du seuil de significativité ( $p = 0,053$ ). Enfin, les larves exposées au sédiment des Jacquets montrent une inhibition significative de l'expression du gène *mt* en comparaison du sédiment de référence de Grand Banc.

### 3.7. Synthèse des principaux résultats

Chez les embryons âgés de 7 j pf, un total de cinq gènes différents, impliqués dans la chaîne respiratoire mitochondriale, la biotransformation et la séquestration des xénobiotiques, l'arrêt du

cycle cellulaire ainsi que la réparation des lésions oxydatives de l'ADN, ont vu leur expression significativement modulée par rapport au groupe de référence de Marcenac. Cependant, lorsque le profil d'expression génique des embryons exposés au sédiment des Jacquets est comparé à celui obtenu pour le site de Grand Banc, aucune différence statistique n'est mise en évidence. Par ailleurs, aucune modification significative de l'expression des gènes d'intérêt n'est observée chez les larves exposées aux différents sédiments étudiés en comparaison de Marcenac. Néanmoins, l'expression différentielle de quatre gènes, prenant part à la biotransformation et la détoxification des xénobiotiques, la lutte contre le stress oxydant ainsi que la différenciation et la prolifération cellulaire, est proche du seuil de significativité par rapport au témoin Marcenac avec des valeurs de  $p$  comprises entre 0,052 et 0,088 (selon le test  $t$ ). De manière surprenante, le gène *mt* est significativement réprimé suite à l'exposition des individus au sédiment des Jacquets en comparaison du site de Grand Banc. Par conséquent, quel que soit le site de référence utilisé, l'expression d'au moins un gène est significativement modulée à la suite de l'exposition des SPD de Medaka à des sédiments polycontaminés en éléments métalliques et/ou en HAP.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude sont synthétisés dans le **Tableau 5.13**. Qualitativement, les réponses obtenues pour la durée du développement et l'apparition de malformations phénotypiques sont similaires à celles mises en évidence précédemment (voir *partie 2* de ce chapitre). Par contre, la réduction de la taille des larves n'est plus observée pour les différents sédiments testés en comparaison de Marcenac. Inversement, l'exposition au sédiment des Jacquets induit une réduction de la survie embryonnaire (très faible mais significative) ainsi que du succès d'éclosion. Cependant, ces effets ne sont plus significatifs lorsque Grand Banc est pris pour témoin.

**Tableau 5.13. Synthèse des résultats obtenus à l'aide des différents marqueurs étudiés au cours de l'étude des effets phénotypiques et moléculaires induits par les sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon**

	Viab.	TE	DD	Biom.	Malf.	Génèt.	[HAP tot]	[Mét. tot]	COP	Granulo.
Joanis	●	●	●	●	●	●	25 001	3 687	0,30	325
Grand Banc	●	●	●	●	●	●	280	194	0,72	159
Les Jacquets	●●	●●	●●	●●	●●	●●	4 265	538	0,81	235

Les données sont synthétisées en fonction des résultats obtenus lors de leur analyse statistique : un point **vert** symbolise l'absence de différence significative par rapport au sédiment de Marcenac ; un point **orange** marque une différence significative par rapport à ce sédiment de référence ; un point **bleu** symbolise l'absence de différence significative par rapport au sédiment de Grand Banc ; un point **rouge** marque une différence significative par rapport à ce sédiment de référence. Viab. : viabilité ; TE : taux d'éclosion ; DD : durée du développement embryonnaire ; Biom. : mesures biométriques ; Malf. : malformations développementales ; Génèt. : expression génique. Dans la partie droite du tableau, les concentrations totales en HAP ([HAP tot], en ng/g) et éléments métalliques ([Mét. Tot], en µg/g) ainsi que les teneurs en carbone organique particulaire (COP, en %) et la médiane de la taille des particules (Granulo., en µm) des différents sédiments sont mentionnées. Un code couleur a été appliqué afin de classer les différents sédiments en fonction des valeurs mesurées pour des paramètres : de la plus faible à la plus forte, les couleurs attribuées sont **bleu**, **orange** et **rouge**. Remarque : les données respectives pour ces trois caractéristiques sont de 6 ng/g, 357 µg/g, 0,1 % et 151 µm pour le sédiment de Marcenac.

## 4. DISCUSSION

Après avoir été appliqué à la caractérisation de la toxicité de substances modèles individuelles comprenant des HAP et des éléments métalliques, le test MELA a été employé pour l'évaluation du potentiel toxique de matrices sédimentaires naturelles provenant du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon. Le bioessai a été utilisé dans des conditions en tous points similaires à ce qui avait



été mis en place pour les sédiments dopés. Les différents sédiments des deux sites d'étude ont été analysés au cours de deux séries d'expositions indépendantes au cours desquelles les matrices sédimentaires ont été utilisées sans lyophilisation préalable (*i.e* sous leur forme « brute »). Le sédiment de Marcenac a logiquement servi de contrôle négatif lors de l'évaluation de la toxicité des sédiments du système Lot-Garonne puisque précédemment décrit comme marginalement contaminé en éléments métalliques (Audry *et al.*, 2010 ; Audry *et al.*, 2004b) et n'induisant pas de réponses toxiques notables chez les SPD du Medaka selon les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse (voir *Chapitre 3, partie 2*). Par ailleurs, pour la seconde série d'expositions aux sédiments de la lagune arcachonnaise, un second sédiment de référence potentiel a été inclus (Grand Banc) dans le but de proposer un autre point de comparaison interne au Bassin, donc plus représentatif de la nature des matrices sédimentaires de ce milieu. Dans un premier temps, le test MELA dans sa version « classique » a été appliqué à l'évaluation du potentiel toxique global des différents sédiments de ces deux sites d'étude. Par la suite, l'analyse de la modification du profil d'expression génique et de la bioaccumulation en HAP et en éléments métalliques a été entreprise sur une sélection de matrices sédimentaires du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon.

#### **4.1. Réponses biomoléculaires et embryotoxicité induites par les sédiments du Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon**

L'exposition des embryons de Medaka aux différents sédiments naturels a principalement conduit à des effets sublétaux. Cependant, deux sédiments, ceux d'Arès et de La Réole appartenant respectivement au Bassin d'Arcachon et au système Lot-Garonne, ont induit une réduction significative du taux de survie des individus exposés. Les matrices sédimentaires de ces deux stations sont caractérisées par une granulométrie fine (classe des limons) associée à une teneur en COP élevée et une contamination métallique globalement modérée. Par ailleurs, le sédiment d'Arès est relativement fortement contaminé en HAP par rapport aux autres sites du Bassin avec des teneurs de l'ordre de 7 000 ng/g p.s. pour cette classe de composés.

L'ensemble des sédiments naturels étudiés a induit un large spectre d'effets sublétaux en comparaison du site de référence de Marcenac. En effet, chacun des marqueurs de toxicité étudiés a répondu significativement pour au moins l'un des sédiments testés au cours de deux séries d'expositions.

Le profil de malformations observé après exposition des embryons de Medaka aux sédiments du continuum Lot-Garonne est particulièrement marqué au niveau du squelette axial et du système cardio-vasculaire, ce qui semble rappeler les observations effectuées lors de la caractérisation de la toxicité du Cu et du Cd. Pour le site de Joanis, le plus fortement contaminé en métaux, le spectre des malformations est plus large incluant également des œdèmes, des malformations cranio-faciales et des malabsorptions des réserves vitellines. Ces deux derniers symptômes ont également été induits chez les individus exposés au Pyr et au MePyr. La perturbation de l'utilisation des réserves vitellines chez les individus exposés au sédiment de Joanis pourrait expliquer l'inhibition de la croissance *in ovo* mise en évidence par une réduction de la taille des larves issues de l'exposition à cette matrice sédimentaire. Il est également intéressant de noter que, de façon similaire à ce que nous avons observé pour la plus forte concentration de Cd, l'activité cardiaque des embryons montre successivement une tachycardie puis une bradycardie suite à l'exposition au sédiment de Joanis. De plus, l'exposition à ce sédiment a engendré une augmentation significative des dommages à l'ADN

chez les larves âgées de 2 j post-éclosion. Des effets génotoxiques ont également été mis en évidence pour le site du Temple et pourraient être le résultat de la forte contamination du sédiment de ce site en HAP qui, par ailleurs, renferme peu de métaux. Certaines similitudes dans les profils d'expression génique induite par le Cd et le sédiment de Joanis sont observées, notamment en ce qui concerne les gènes *bax*, *wnt1* et *rad51*. Plusieurs autres gènes voient leur expression modulée particulièrement ceux impliqués dans la métabolisation et la détoxification des xénobiotiques. La surexpression du gène *cyp1a* pourrait être la conséquence de la très forte contamination du sédiment de Joanis en HAP. L'induction de ce gène pourrait donc constituer une réponse adaptative des embryons et larves de Medaka afin de permettre la biotransformation et l'élimination de ces xénobiotiques lipophiles. Une surexpression du gène *cox1* a également été observée après l'exposition des embryons de Medaka aux HAP modèles et ce gène tend également à être surexprimé chez les larves issues de l'exposition au sédiment de Joanis. La surexpression de ce gène pourrait traduire la réponse mitochondriale des cellules face au stress oxydant engendré par les contaminants présents dans ce sédiment (Achard-Joris *et al.*, 2006). De façon inattendue, l'expression du gène *mt* est fortement réprimée chez les embryons exposés au sédiment de Joanis ainsi d'ailleurs qu'aux deux sédiments du Bassin d'Arcachon. Wang et Wang (2010) rapportent une inhibition de la synthèse de MT chez les copépodes *Tigriopus japonicus* dans les premiers temps de leur exposition au Ni. Cependant, cette inhibition est suivie d'une augmentation du niveau de MT au 12<sup>ème</sup> jour d'exposition. D'autres études expérimentales ont montré que l'exposition à de fortes concentrations en métaux pouvait conduire à une réduction de la synthèse de MT chez le turbo et l'amphipode (Mouneyrac *et al.*, 2002 ; George *et al.*, 1992). Selon ces auteurs, ces observations pourraient être le résultat d'un effet toxique des métaux qui altérerait la fonction détoxifiante des MT. Dans le cas de notre étude, l'inhibition de l'expression du gène *mt* par les métaux ou d'autres substances présentes dans les sédiments reste inexpliquée. Cet effet peut néanmoins être interprété comme une réponse toxique des organismes exposés dans la mesure où la répression de ce mécanisme de détoxification peut engendrer une augmentation de la sensibilité des organismes vis-à-vis d'autres effets toxiques induits par la contamination des sédiments étudiés (Coyle *et al.*, 2002).

Ainsi, les profils de réponses obtenus avec les sédiments du système Lot-Garonne, dont la contamination en éléments métalliques est avérée, sont en partie similaires à ceux induits par le Cu et le Cd. Cependant, pour certains sites comme celui de Joanis, le spectre d'effets est plus complexe et pourrait résulter de la présence d'un cocktail de contaminants.

Les sédiments du Bassin d'Arcachon ont engendré des effets plus marqués chez les SPD de Medaka lorsque les réponses sont comparées au site de référence de Marcenac. En effet, l'ensemble des matrices sédimentaires testées pour ce milieu a induit une augmentation significative du taux d'individus malformés ainsi que de la durée du développement embryonnaire. À l'exception du site de Bélisaire, ces effets sont accompagnés d'une réduction de la taille des larves à l'éclosion et de l'apparition du syndrome de malabsorption des réserves vitellines. Ces résultats indiquent une altération importante de la croissance et du développement *in ovo* des individus exposés. Le système cardiaque a également été largement impacté par l'exposition des SPD de Medaka aux différents sédiments du Bassin. Par ailleurs, les sédiments d'Andernos et d'Arès ont conduit à l'apparition de malformations cranio-faciales et du squelette axial. Ces spectres de malformations sont relativement similaires à celui observé à l'issue de l'exposition aux HAP modèles. En revanche, les profils d'expression génique observés chez les embryons et les larves exposés aux sédiments de Grand Banc

et des Jacquets sont globalement très différents de ceux obtenus par l'exposition au Pyr et au MePyr, à l'exception de l'induction du gène *cyp1a*. La surexpression de ce gène est sans doute à mettre en relation avec la présence de teneurs élevées en agonistes du récepteur AhR dans les sédiments du Bassin, parmi lesquels des HAP. Cette réponse pourrait donc constituer une réponse adaptative des embryons et larves de Medaka vis-à-vis de ces composés, de façon similaire à ce qui a été proposé pour le sédiment de Joanis. Contrairement à ce qui a été mis en évidence avec les deux HAP modèles, le gène mitochondrial *cox1* est réprimé lors de l'exposition aux sédiments du Bassin. L'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale pourrait être le résultat de la formation d'une microcouche hypoxique à l'interface eau-sédiment de ces matrices sédimentaires chargée en matière organique (Strecker *et al.*, 2011 ; Wheaton & Chandel, 2011).

Par ailleurs, au cours de la présente étude, aucun effet notable n'est visible sur l'expression des gènes de l'apoptose et du métabolisme ou de la voie de signalisation des rétinoides alors que ceux-ci étaient surexprimés lors de l'exposition au Pyr et/ou au MePyr. Cependant, une fois encore, le spectre des effets toxiques induits par les sédiments naturels dépasse ceux observés avec les substances pures. La diversité des réponses induites démontre une nouvelle fois toute la complexité des effets toxiques pouvant être engendrés par l'exposition des SPD de poisson à un mélange environnemental de polluants. Ces séries d'expériences montrent également que malgré de grandes similitudes dans les effets phénotypiques observés, les modes d'action sous-jacents peuvent faire appel à des mécanismes moléculaires variés.

Ne serait-ce qu'en considérant leur provenance, les sédiments du système Lot-Garonne (environnement d'eau douce à saumâtre) et du Bassin d'Arcachon (milieu marin) sont de nature très différente. Dans ce contexte, l'utilisation du sédiment de Marcenac comme point de référence peut induire un biais dans l'évaluation de la toxicité des matrices sédimentaires de la lagune en mettant en évidence des différences qui peuvent tout autant être liées à des variations de la nature des sédiments étudiés qu'à la présence de contaminants. Afin de pallier à ce biais potentiel, nous avons donc choisi d'inclure un sédiment de référence interne au bassin, le site de Grand Banc. En utilisant ce sédiment comme référence, le spectre d'effets toxiques induits par l'exposition aux autres sédiments du Bassin est moins important que lorsque le sédiment de Marcenac est pris comme témoin. En effet, seuls les sites d'Arès, d'Andernos et des Jacquets répondent positivement pour au moins un marqueur de toxicité. L'exposition aux sédiments de ces trois sites induit un retard d'éclosion chez les embryons par rapport au site de Grand Banc. L'exposition aux sédiments d'Arès et d'Andernos augmente également significativement l'apparition de malformations cranio-faciales. Enfin, l'accroissement de la mortalité larvaire observé pour le site d'Arès reste significatif par rapport au site de référence de Grand Banc. À noter que lorsque l'on compare les niveaux d'expression génique entre Les Jacquets et Grand Banc, il apparaît que le gène *mt* est significativement réprimé après exposition au sédiment des Jacquets et une tendance à l'inhibition de l'expression de *cyp1a* et à la surexpression de *bax* et *rad51* est observée. Cette inhibition des mécanismes de biotransformation et de détoxification couplée à la surexpression des gènes pro-apoptotique et de réparation des dommages à l'ADN semblent aller dans le sens d'un effet cytotoxique global induit par le sédiment des Jacquets. Ce phénomène peut également être proposé comme explication du grand nombre de gènes dont l'expression est réprimée de manière plus ou moins importante chez les embryons exposés aux sédiments de Grand Banc et des Jacquets en comparaison du sédiment de Marcenac. L'inhibition de l'expression de nombreux gènes a très certainement un impact néfaste sur

la synthèse de nombreuses protéines dépendantes de ces voies transcriptionnelles. Par conséquent, ceci pourrait impacter l'équilibre physiologique des organismes exposés à moyen et/ou long terme. Cette cytotoxicité potentielle pourrait résulter de la polycontamination des sédiments mais également d'autres paramètres comme la présence d'une microcouche hypoxique, par exemple.

Cependant, on peut néanmoins se poser la question de la validité du sédiment de Grand Banc comme référence en raison du fort pourcentage de larves présentant des malformations (supérieur à 50 %) et d'un effet de ce sédiment sur la croissance des embryons (taille des larves à l'éclosion de 5 % plus petites par rapport aux individus du groupe de Marcenac). La comparaison des spectres de toxicité obtenus pour les sédiments du Bassin en fonction du site témoin considéré soulève la question du choix d'une matrice de référence adaptée et représentative du milieu étudié afin de ne mettre en évidence que des effets liés à la contamination chimique et non aux caractéristiques intrinsèques des sédiments. Cette distinction est d'autant plus difficile à mettre en œuvre que, comme il a été largement discuté dans les différents chapitres de ce manuscrit, la biodisponibilité des polluants et donc les effets toxiques induits vont dépendre de certaines caractéristiques du sédiment comme la nature des particules et la teneur en matière organique (par exemple, Di Toro *et al.*, 2005 ; Belfroid *et al.*, 1996).

## 4.2. Evaluation de la toxicité de sédiments naturels : résultats du test MELA et approche TEC/PEC

Au vu des précédentes observations, il semblerait que l'effet « cocktail de contaminants » joue un rôle important dans les profils de réponses obtenus au cours des différentes expérimentations réalisées. Nous avons donc souhaité comparer l'évaluation de la toxicité obtenue à l'aide du test MELA au potentiel toxique attendu issu de la comparaison des concentrations dosées dans les sédiments en HAP et en métaux aux valeurs TEC (threshold effect concentration, en dessous de laquelle les effets toxiques sont très peu probables) et PEC (probable effect concentration, au-dessus de laquelle des effets toxiques sont très probables) établies par MacDonald *et al.* (2000). Pour cela, les quotients TEC et PEC (respectivement qTEC et qPEC) ont été calculés pour chaque composé dosé dans les sédiments pour lesquels ces valeurs seuil sont disponibles, c'est-à-dire 7 éléments métalliques, 10 HAP individuels et la somme des HAP. Les qTEC et qPEC sont obtenues en divisant la concentration mesurée dans le sédiment par la valeur TEC ou PEC spécifique de la substance considérée. Pour chaque sédiment, la valeur maximum des qTEC (qTEC max) a été retenue et la moyenne des qPEC (qPEC moy) a été calculée pour avoir une évaluation globale du mélange de contaminants présents dans le sédiment (MacDonald *et al.*, 2000). Ces données sont présentées dans le **Tableau 5.14** pour chaque sédiment étudié. Le détail des qPEC et des qTEC calculés pour chaque sédiment est présenté dans l'*Annexe 5*.

L'ensemble des sédiments du système Lot-Garonne présente des qTEC max supérieurs à 1, y compris le sédiment de Marcenac. Cependant, pour ce sédiment, la valeur seuil TEC n'est dépassée que pour un seul composé (As), les autres polluants présentant tous des valeurs qTEC largement inférieures à 1. De la même manière, les sédiments de Bordeaux et de La Réole ne dépassent le seuil TEC que pour respectivement un (Cd) et deux composés (As, Cd). A l'inverse, pour le sédiment de Joanis, l'ensemble des éléments métalliques à l'exception de deux (Cr et Ni) et des HAP étudiés ici présente des qTEC supérieurs à 1. Selon les valeurs moyennes de qPEC calculées pour les différents sites du système Lot-Garonne, les sédiments du Temple, de Bouillac et de Joanis sont

potentiellement toxiques (qPEC moy >0,5). Inversement aucun des sédiments du Bassin d’Arcachon ne semble présenter un danger potentiel pour les organismes aquatiques avec des qPEC moy inférieurs à 0,5. Par ailleurs, à l’exception du site de Grand Banc, tous les autres sites du Bassin présentent une valeur maximale de qTEC largement supérieure à 1. Pour ces sites, la valeur seuil TEC est dépassée pour une majorité de HAP individuels (ainsi que pour leur teneur totale en HAP) et pour certains métaux comme l’As et le Pb. Nous noterons également que le sédiment de Bélisaire ne franchit cette valeur seuil que pour les composés organiques.

**Tableau 5.14. Valeurs qTEC et qPEC calculés pour les sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d’Arcachon**

	qTEC max	qPEC moy		qTEC max	qPEC moy
Marcenac	<b>1,79</b>	0,07			
<i>Système Lot-Garonne</i>			<i>Bassin d’Arcachon</i>		
Bordeaux	<b>1,28</b>	0,13	Grand Banc	0,64	0,04
La Réole	<b>1,55</b>	0,13	Les Jacquets	<b>2,66</b>	0,22
Le Temple	<b>29,9</b>	<b>0,89</b>	Andernos	<b>3,06</b>	0,28
Bouillac	<b>18,1</b>	<b>0,80</b>	Arès	<b>4,25</b>	0,33
Joanis	<b>138</b>	<b>2,09</b>	Bélisaire	<b>6,55</b>	0,30

*qTEC max : valeur maximale du quotient TEC obtenue pour chaque sédiment ; qPEC moy : moyenne des quotients PEC calculée pour chaque sédiment. Une valeur de qTEC inférieure à 1 prédit une absence probable d’effet toxique. Inversement, une valeur de qPEC moy supérieure à 0,5 signale des effets toxiques très probables chez les organismes (MacDonald et al., 2000).*

Selon les valeurs de qPEC moy calculées, les sédiments du système Lot-Garonne peuvent être classés par ordre croissant de toxicité potentielle de la manière suivante : Marcenac < Bordeaux et La Réole < Bouillac < Le Temple < Joanis. Globalement, ce classement suit le gradient de contamination métallique escompté le long du continuum, à l’exception du site du Temple qui se retrouve « surclassé » en raison de sa forte contamination en HAP. Par ailleurs, ce classement reprend globalement celui obtenu avec le test MELA, à savoir du moins au plus toxique : Bordeaux et Bouillac < Le Temple < Joanis < La Réole. Une nouvelle fois, le site de La Réole se distingue par des effets toxiques marqués chez les SPD de Medaka qui viennent « contredire » la prédiction de « non-toxicité probable » basée sur les niveaux de contamination du sédiment en HAP et en métaux. Il convient également de rappeler que le calcul des qTEC et des qPEC ne prend en compte qu’un nombre limité de substances présentes dans le sédiment. Il est possible que certaines réponses toxiques mises en évidence par le test MELA intègrent également les effets d’une contamination en d’autres composés non analysés dans la présente étude, comme par exemple, les pesticides.

En considérant les valeurs qPEC moyenne, les matrices sédimentaires du Bassin d’Arcachon pourraient être classées comme suit, par ordre de toxicité croissante : Grand Banc < Les Jacquets < Andernos < Bélisaire < Arès. L’ordre de toxicité des sédiments suit globalement bien le gradient de contamination en HAP, à l’exception des sites d’Arès et de Bélisaire dont la position est inversée, ce qui pourrait refléter une contamination métallique plus importante à Arès qu’à Bélisaire. Ce classement coïncide néanmoins relativement bien avec celui obtenu avec le test MELA (Bélisaire < Grand Banc < Les Jacquets et Andernos < Arès avec Marcenac comme référence ou Bélisaire < Les Jacquets < Andernos < Arès avec Grand Banc comme témoin). Un site fait une nouvelle fois exception : Bélisaire. Cette fois-ci, la contamination chimique du sédiment de ce site laissait attendre des effets plus marqués chez les SPD de Medaka par rapport aux autres points de prélèvements. À l’inverse, ce sédiment s’est avéré le moins toxique des sites du Bassin, ne conduisant à aucun effet

significatif en comparaison du sédiment de référence interne au Bassin (Grand Banc). Une faible biodisponibilité des composés présents dans le sédiment de Bélisaire en comparaison des autres sites du Bassin pourrait être une explication à ces observations.

### 4.3. Quel(s) lien(s) entre les réponses biologiques et la contamination chimique des sédiments ?

Afin de tenter de mettre en évidence des liens entre les caractéristiques physico-chimiques des matrices sédimentaires et les réponses embryotoxiques observées, des coefficients de Pearson ont été déterminés entre chaque paramètre. Dans un premier temps, nous avons cherché à corrélérer les niveaux de contamination des sédiments à leurs caractéristiques physico-chimiques. Les résultats obtenus pour les sédiments du Bassin d'Arcachon et du système Lot-Garonne sont présentés dans le **Tableau 5.15**.

**Tableau 5.15.** Coefficients de corrélation de Pearson entre les différentes caractéristiques physico-chimiques des sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon

	COP (%)	[Métaux] totaux	[HAP] totaux	Médiane granulométrique	Fraction fine < 63µm	qTEC max	qPEC moy
<i>Système Lot-Garonne (6 sédiments)*</i>							
COP (%)	1						
[Métaux] totaux	-0,089	1					
[HAP] totaux	-0,539	0,236	1				
Médiane granulométrique	<u>-0,749</u>	0,387	<u>0,789</u>	1			
Fraction fine < 63µm	<b>0,868</b>	-0,264	-0,543	<b>-0,866</b>	1		
qTEC max	-0,391	0,691	<u>0,772</u>	0,579	-0,437	1	
qPEC moy	-0,447	<u>0,746</u>	<b>0,816</b>	<u>0,741</u>	-0,537	<b>0,962</b>	1
<i>Bassin d'Arcachon (5 sédiments)**</i>							
COP (%)	1						
[Métaux] totaux	<u>0,784</u>	1					
[HAP] totaux	0,047	-0,050	1				
Médiane granulométrique	<b>-0,933</b>	-0,694	0,297	1			
Fraction fine < 63µm	<b>0,970</b>	<u>0,867</u>	-0,107	<b>-0,936</b>	1		
qTEC max	-0,025	-0,153	<b>0,995</b>	0,355	-0,188	1	
qPEC moy	0,488	0,455	<u>0,861</u>	-0,145	0,376	<u>0,806</u>	1

\* : seuil de significativité à  $\pm 0,8114$  selon la table de Bravais-Pearson ; \*\* seuil de significativité à  $\pm 0,8763$  selon cette même table ; les valeurs soulignées sont proches des seuils de significativité indiqués précédemment.

La teneur en carbone organique s'avère logiquement positivement corrélée à la fraction fine des sédiments des deux environnements d'étude (et donc inversement corrélée à la médiane granulométrique). La concentration en métaux totaux des sédiments du système Lot-Garonne ne montre pas de relation particulière avec les caractéristiques de la matrice sédimentaire. La teneur en HAP totaux de ces sédiments montre une corrélation positive, proche du seuil de significativité, avec la médiane granulométrique du sédiment. Ce résultat est surprenant puisque cette classe de composés, comme les métaux d'ailleurs, est le plus souvent associée à la fraction fine des sédiments (Crespo, 2009 ; Ghosh *et al.*, 2000 ; Bertin & Bourg, 1995). La valeur qPEC moyen montre également un lien positif significatif avec la concentration des sédiments en HAP, suggérant que cette classe de composé est le principal acteur du potentiel toxique évalué par cette approche. Concernant les sédiments du Bassin d'Arcachon, la concentration en éléments métalliques semble être corrélée à la teneur en carbone organique du sédiment (coefficient de Pearson de 0,78) ainsi qu'à la fraction fine du sédiment ( $r = 0,87$ ), en accord avec les résultats de Bertin et Bourg (1995). Aucune corrélation n'est mise en évidence entre cette classe de composés et les valeurs qTEC max et qPEC moy. Par contre, la concentration en HAP montre une corrélation proche du seuil de significativité avec le

qPEC moy, suggérant une nouvelle fois que cette classe de composés participe majoritairement au potentiel toxique des sédiments établi par cette démarche.

L'ensemble de ces caractéristiques physico-chimiques a ensuite été comparé aux réponses obtenues par le test MELA avec les sédiments du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon. Les coefficients de Pearson calculés pour les sédiments du système Lot-Garonne entre les caractéristiques physico-chimiques et l'embryotoxicité globale (nombre de marqueurs de toxicité ayant répondu significativement), la tératogénicité (pourcentage de larves malformées à l'éclosion) et les effets génotoxiques (pourcentage d'ADN dans la queue selon le test Comète) sont présentés dans le **Tableau 5.16**.

**Tableau 5.16. Coefficients de corrélation de Pearson entre les différentes caractéristiques physico-chimiques et les réponses toxiques observées pour les sédiments du système Lot-Garonne**

	Système Lot-Garonne*			Sans le site de La Réole**		
	Embryotoxicité globale	Térato.	Génotox.	Embryotoxicité globale	Térato.	Génotox.
COP (%)	0,395	0,533	-0,494	-0,760	0,294	-0,498
[Métaux] totaux	-0,052	0,629	<u>0,784</u>	0,317	<u>0,925</u>	<u>0,763</u>
[HAP] totaux	0,210	-0,384	0,640	<u>0,915</u>	-0,237	0,599
Médiane granulométrique	-0,137	-0,382	0,544	0,609	-0,152	0,487
Fraction fine < 63µm	0,080	0,262	-0,595	-0,595	0,025	-0,547
qTEC max	0,281	0,255	<b>0,978</b>	<u>0,930</u>	0,507	<b>0,978</b>
qPEC moy	0,149	0,144	<b>0,958</b>	<u>0,913</u>	0,466	<b>0,975</b>

\* : seuil de significativité à  $\pm 0,8763$  selon la table de Bravais-Pearson ; \*\* seuil de significativité à  $\pm 0,95$  selon cette même table ; les valeurs soulignées sont proches des seuils de significativité indiqués précédemment. Embryotoxicité globale : nombre de marqueurs ayant répondu significativement ; Térato. : tératogénicité évaluée par le pourcentage de larves malformées à l'éclosion ; Génotox. : génotoxicité évaluée par le pourcentage d'ADN dans la queue (test Comète).

Lorsque l'ensemble des sédiments du système est pris en compte, aucune corrélation n'est mise en évidence entre les caractéristiques physico-chimiques des matrices sédimentaires et l'embryotoxicité globale ou la tératogénicité. En revanche, la génotoxicité montre une corrélation positive significative avec la valeur qTEC max et qPEC moy. Ces résultats suggèrent que les effets génotoxiques induits chez les larves exposées sont bien reliés à la contamination chimique globale des sédiments. D'autre part, il semblerait que cette génotoxicité puisse être correctement prédite par les valeurs qTEC max et qPEC moy. Par ailleurs, le coefficient de corrélation calculé entre la concentration totale en métaux et la génotoxicité des sédiments est proche du seuil de significativité ( $r=0,78$ ), ce qui semble suggérer que cette classe de contaminants est spécifiquement impliquée dans l'induction de cette réponse toxique. L'exclusion du site de La Réole, dont le profil de toxicité n'est pas en adéquation avec les contaminants dosés dans le sédiment, permet de mettre évidence d'autres corrélations intéressantes. En effet, l'embryotoxicité globale des sédiments est corrélée (non significativement,  $r$  compris entre 0,91 et 0,93) positivement à la teneur totale en HAP des sédiments ainsi qu'aux valeurs qTEC max et qPEC moy. Ces résultats suggèrent que les effets embryotoxiques observés seraient, du moins en partie, liés à la présence de cette classe de composés organiques et que la toxicité des sédiments pourrait la encore être prédite de façon fiable par le calcul des qTEC et qPEC moy. La tératogénicité des sédiments semble être principalement liée à la présence d'éléments métalliques dans les sédiments ( $r = 0,925$ , proche du seuil de significativité de 0,95). Ces réponses toxiques n'apparaissent aucunement liées aux valeurs qPEC max et qPEC moy, indiquant une mauvaise prédiction des effets tératogènes par ces indices. Enfin, la génotoxicité des sédiments montre les mêmes corrélations avec ou sans prise en compte du site de La Réole.

Les mêmes relations ont été recherchées pour les sédiments du Bassin d’Arcachon et les coefficients de corrélation de Pearson concernant cet environnement d’étude sont présentés dans le **Tableau 5.17**.

**Tableau 5.17. Coefficients de corrélation de Pearson entre les différentes caractéristiques physico-chimiques et les réponses toxiques observées pour les sédiments du Bassin d’Arcachon**

	Bassin d’Arcachon*			Sans le site de Bélisaire**		
	Embryotoxicité globale	Térato.	Durée Dev.	Embryotoxicité globale	Térato.	Durée Dév.
COP (%)	<u>0,772</u>	<u>0,791</u>	<u>0,823</u>	0,689	0,707	0,754
[Métaux] totaux	<u>0,865</u>	<u>0,869</u>	<b>0,974</b>	0,742	0,753	<b>0,974</b>
[HAP] totaux	-0,180	-0,094	0,128	<b>0,968</b>	<b>0,973</b>	<b>0,966</b>
Médiane granulométrique	<u>-0,769</u>	<u>-0,759</u>	<u>-0,682</u>	-0,475	-0,494	-0,491
Fraction fine < 63µm	<u>0,790</u>	<u>0,795</u>	<u>0,855</u>	0,602	0,622	0,782
qTEC max	-0,266	-0,181	0,026	<b>0,981</b>	<b>0,985</b>	<u>0,947</u>
qPEC moy	0,306	0,386	0,611	<u>0,930</u>	<u>0,938</u>	<b>0,988</b>

\* : seuil de significativité à  $\pm 0,8763$  selon la table de Bravais-Pearson ; \*\* seuil de significativité à  $\pm 0,95$  selon cette même table ; les valeurs soulignées sont proches des seuils de significativité indiqués précédemment. Embryotoxicité globale : nombre de marqueurs ayant répondu significativement ; Térato. : tératogénicité évaluée par le pourcentage de larves malformées à l’éclosion ; Durée Dév. : durée du développement embryonnaire.

Lorsque l’ensemble des sédiments du Bassin est pris en compte, l’embryotoxicité globale et la tératogénicité des sédiments présentent des coefficients de corrélation très similaires pour les mêmes paramètres. Pour ces deux réponses toxiques, une corrélation positive proche du seuil de significativité est visible avec la teneur en carbone organique et en éléments métalliques du sédiment ainsi qu’avec la proportion de particules fines (inversement corrélée à la médiane granulométrique). Par ailleurs, aucun lien particulier n’est mis en évidence entre ces paramètres de toxicité et les valeurs qTEC max et qPEC moy. La durée du développement embryonnaire, qui avait été significativement allongée en comparaison du site de Marcenac pour l’ensemble des sédiments de cet environnement d’étude, est également significativement corrélée avec la teneur en éléments métalliques du sédiment. Comme pour les deux marqueurs de toxicité évoqués précédemment, une corrélation positive, proche du seuil de significativité est retrouvée entre l’âge embryonnaire à l’éclosion et les teneurs en COP et en particules fines du sédiment. Ces observations semblent suggérer que ces trois caractéristiques physico-chimiques (teneurs en éléments métalliques, en COP et en particules fines) de la matrice sédimentaire sont impliquées dans l’apparition des effets toxiques chez les SPD du Medaka. Il est cependant difficile d’établir avec certitude lequel de ces paramètres physico-chimiques est réellement impliqué dans les réponses toxiques observées étant donné que ces différentes caractéristiques sont très fortement liés les uns aux autres, au vu des coefficients de corrélations calculés (**Tableau 5.15**). Pour ce jeu de données, les valeurs qTEC max et qPEC moy ne semblent pas adaptées à la prédiction du potentiel toxique des sédiments du Bassin d’Arcachon. Cependant lorsque le site de Bélisaire, n’ayant induit que des réponses toxiques limitées malgré une forte contamination chimique, est exclu du jeu de données, les réponses sont mieux corrélées. L’embryotoxicité globale, la tératogénicité et la durée du développement sont alors positivement corrélés (significativement ou proche du seuil de significativité) avec les deux indices de prédiction de la toxicité. De manière intéressante, ces trois marqueurs de toxicité sont également significativement corrélés à la concentration en HAP totaux des sédiments même si la durée du développement embryonnaire montre également une corrélation significative avec la teneur en éléments métalliques.



La prédiction du potentiel toxique des sédiments à l'aide des qTEC max correspond relativement bien aux résultats issus du test MELA bien que ces valeurs soient généralement conseillées pour identifier les sédiments dont la contamination représente un danger peu probable pour les organismes aquatiques (MacDonald *et al.*, 2000). Inversement, les moyennes de qPEC calculées pour les différentes matrices sédimentaires sous-estiment les effets induits par la contamination chimique en comparaison des résultats obtenus par le test MELA, alors que l'utilisation de ces valeurs est préconisé pour identifier les sédiments potentiellement toxiques pour les espèces aquatiques vivants à leur contact (MacDonald *et al.*, 2000). En revanche, alors que, selon les prédictions issues de cette approche, des effets toxiques n'étaient attendus que pour les sédiments du Temple, de Bouillac et de Bélisaire, le test MELA a mis en évidence des effets toxiques pour l'ensemble des sédiments des deux environnements étudiés. Höss *et al.* (2010) rapportent également que des effets liés à la présence d'une pollution anthropogénique ne sont pas à exclure pour des sédiments dont les qPEC moy sont pourtant inférieurs à 0,3. Dans ces travaux, cette conclusion ne concerne néanmoins que deux sédiments dans un groupe de dix matrices sédimentaires dont le potentiel toxique a été analysé par toute une batterie de tests. Il semblerait donc que l'approche empirique proposée par MacDonald *et al.* (2000) soit globalement adaptée à une première évaluation du potentiel toxique des sédiments mais qu'il reste important de confirmer les prédictions obtenues par des mesures de toxicité *in vivo*. En effet, nous venons de voir que pour certains sédiments « atypiques », le niveau de contamination et donc les qTEC max et les qPEC moy ne permettent pas de prévoir les réponses toxiques chez les organismes aquatiques. Comme évoqué notamment dans le Chapitre 1 de ce manuscrit, de nombreux facteurs conditionnent la biodisponibilité des contaminants au sein des sédiments, dont la teneur en carbone organique et en AVS, la présence d'hydroxydes métalliques et d'autres contaminants, l'âge de la contamination et la taille des particules (Ankley *et al.*, 1996 ; Belfroid *et al.*, 1996 ; Landrum *et al.*, 1992). Il est donc probable que les variations dans les caractéristiques physico-chimiques des matrices sédimentaires expliquent certains effets toxiques inattendus observés lors de de l'évaluation de la toxicité des sédiments par le test MELA, en modifiant la biodisponibilité des contaminants présents. Cette hypothèse pourra être appuyée en partie par les analyses de la bioaccumulation en métaux et en HAP effectuées au cours de la seconde série d'expositions présentée dans la *partie 3* de ce chapitre.

Par ailleurs, les résultats de l'étude d'Höss *et al.* (2010) suggèrent qu'en plus de la contamination chimique, la proportion de particules fines et la teneur en matière organique peuvent influencer les réponses des organismes exposés aux sédiments naturels. Ces observations sont en accord avec les coefficients de corrélation déterminés pour les sédiments du Bassin d'Arcachon entre les caractéristiques physico-chimiques et les effets observés avec le test MELA. Plus précisément, les auteurs signalent l'existence d'une relation significative entre la présence de matière organique et le taux de mortalité des embryons de *D. rerio* (Höss *et al.*, 2010). Il est donc possible que les effets létaux (et certaines réponses sublétales) observés pour les sédiments d'Arès ou de La Réole soient directement attribuables à leur forte charge en carbone organique, respectivement de 36 fois et 21 fois plus élevée que celle du sédiment de Marcenac (ou 5 fois plus forte pour le site d'Arès en comparaison de Grand Banc). En effet, les sédiments naturels riches en matière organique peuvent présenter des microcouches de forte hypoxie à l'interface eau-sédiment (<500 µm de la surface du sédiment) pouvant engendrer une augmentation drastique de la toxicité aiguë (Strecker *et al.*, 2011 ; Kuster & Altenburger, 2008). Cependant, le suivi de l'oxygène dissous entrepris sur toute la durée des expositions des embryons de Medaka aux sédiments naturels a confirmé une bonne oxygénation

du milieu à l'interface eau-sédiment bien qu'il ne soit pas possible de certifier que la mesure ait été prise dans la couche critique comprise entre 0 et 500  $\mu\text{m}$  de l'interface eau-sédiment. Enfin, il est également possible que les sédiments d'Arès et de La Réole contiennent d'autres contaminants non analysés dans la présente étude et responsables de la toxicité aigüe observée. Ceci pourrait également expliquer l'absence de corrélation parfaite entre les réponses embryotoxiques et l'analyse chimique des sédiments. Cet aspect représente néanmoins un intérêt supplémentaire pour le test MELO dans le cadre de l'évaluation de la toxicité de matrices environnementales puisque ce bioessai permet de prendre en compte uniquement la fraction biodisponible des polluants mais ceci pour l'ensemble des contaminants présents dans le milieu. Par ailleurs, cette analyse est réalisée sur sédiments natifs uniquement congelés c'est-à-dire en minimisant au maximum les traitements qui pourraient modifier la qualité de la matrice sédimentaire et donc la biodisponibilité des contaminants.

---

*CONCLUSION GENERALE &  
PERSPECTIVES*

---



## *Conclusion Générale & Perspectives*

L'objectif final de ces travaux de thèse était de proposer un test embryo-larvaire poisson applicable à l'évaluation de la toxicité des polluants associés aux particules sédimentaires. Le compartiment sédimentaire est constitué de matrices complexes polycontaminées pouvant représenter une source de contamination secondaire non négligeable à la fois pour les organismes benthiques et pélagiques. Dans un premier temps, le test a été employé à l'évaluation de la toxicité et à l'étude des modes d'action de deux polluants organiques et deux polluants métalliques modèles chez les SPD du Medaka japonais. Dans un second temps, le bioessai a été appliqué à l'évaluation du potentiel toxique de sédiments naturels collectés dans deux milieux emblématiques de la région Aquitaines : le système Lot-Garonne et le Bassin d'Arcachon.

Le bioessai consiste à incuber les embryons de Medaka en contact direct avec le sédiment, en conditions statiques ou semi-statiques, durant tout leur développement embryonnaire puis à mesurer les effets létaux et sublétaux induits chez les embryons et les larves à l'éclosion. Les différents marqueurs suivis tout au long du test permettent d'évaluer la toxicité aiguë induite chez les individus exposés ainsi qu'un large spectre de réponses sublétales, phénotypiques et moléculaires. Ce bioessai permet de se rapprocher des conditions naturelles d'exposition des embryons de poissons qui se développent au contact du sédiment tout en contrôlant un certain nombre de facteurs. L'application de ce test permet d'étudier les effets toxiques induits par l'ensemble de la fraction biodisponible des contaminants présents dans les sédiments sans procéder à une extraction préalable qui modifie nécessairement la biodisponibilité des substances et risque d'introduire des solvants organiques dans le milieu. Il convient toutefois de garder à l'esprit certaines limites du bioessai liées au caractère expérimental de la procédure lors de l'extrapolation des résultats à des situations environnementales réelles. La faible hauteur d'eau présente dans les enceintes expérimentales ainsi que les conditions statiques ou semi-statiques du test sont propices à l'apparition d'une microcouche hypoxique à l'interface eau-sédiment, notamment lorsque la matrice sédimentaire présente une forte teneur en matière organique. Le suivi de la teneur en oxygène au niveau de l'interface eau-sédiment apparaît donc primordial afin de ne pas attribuer à tort des effets toxiques à la contamination chimique alors qu'ils peuvent être le résultat d'une déplétion en oxygène dans le milieu. Par ailleurs, le renouvellement quotidien de la colonne d'eau peut également contribuer à augmenter artificiellement la désorption des polluants et leur passage dans la phase dissoute, augmentant ainsi leur biodisponibilité. Néanmoins, ce type de processus s'opère sans doute dans tous les milieux aquatiques d'eaux courantes où les masses d'eau sont renouvelées continuellement. En revanche, dans le milieu naturel, la colonne d'eau empêche naturellement la photodégradation des contaminants piégés dans le sédiment en limitant la pénétration des rayons lumineux jusqu'à ce compartiment, ce qui n'est pas le cas dans nos enceintes expérimentales dans lesquelles la hauteur d'eau n'est que de quelques millimètres. Les limites citées ici ne sont pas propres à ce bioessai et sont pour la plupart applicables à de nombreux autres tests y compris ceux préconisés par l'OCDE dans le cadre de l'évaluation de la toxicité de substances chimiques. Les nombreux avantages pratiques (la taille réduite des enceintes expérimentales, la production aisée des embryons en conditions de laboratoire, le grand nombre de marqueurs non-invasifs utilisés, l'utilisation de SPD de poisson qui facilite la manipulation des organismes et représente une

alternative aux expérimentations animales...) et économiques associées de cet essai en font un outil utile et pertinent notamment dans le cadre de la caractérisation des effets toxiques et des modes d'action des contaminants hydrophobes ou métalliques ainsi que pour l'évaluation de la toxicité de sédiments naturels.

Au cours des présents travaux de thèse, la caractérisation du spectre de toxicité des polluants présents dans les sédiments a pu être abordée grâce à un large panel de marqueurs de toxicité aigüe et subaigüe, dont un certain nombre se sont avérés très sensibles à la présence de polluants purs ou en mélange. Parmi les marqueurs phénotypiques, le taux de larves à l'éclosion présentant des anomalies de développement s'est avéré le plus sensible. De plus, l'analyse du spectre de malformations induites peut renseigner sur la nature et l'intensité de la contamination, certains types de pathologies apparaissant spécifiquement pour certains types de contaminants (par exemple, les malformations cranio-faciales induites par les HAP) avec un spectre d'effet de plus en plus large en fonction de la dose reçue. Cependant, les différentes expositions menées au cours de ce travail ont montré que des malformations (squelette axial, certaines malformations cardiovasculaires, œdèmes) pouvaient survenir après une contamination à des substances de nature très différente. Ceci semble indiquer que des mécanismes d'action a priori différents, notamment mis en évidence par l'étude des profils d'expression génique, peuvent engendrer *in fine* des effets phénotypiques semblables. Il conviendrait de développer une approche plus standardisée munie d'une grille de lecture très précise pour le suivi des malformations de façon à limiter l'aspect subjectif lié à l'observation des anomalies phénotypiques et donc la variabilité inter-études et/ou inter-expérimentateurs. En plus des malformations, la durée du développement embryonnaire et les mesures biométriques des larves à l'éclosion se sont révélées être des paramètres tout à fait pertinents pour caractériser globalement les effets sur le développement *in ovo*, notamment dans le cas des matrices environnementales polycontaminées. En effet, ces deux paramètres peuvent traduire des perturbations métaboliques induites directement par le composé toxique ou résultant d'un effet indirect lié à l'allocation d'une partie des réserves énergétiques aux mécanismes de lutte et de protection face aux xénobiotiques, aux dépens de la croissance et du développement embryonnaire. Inversement, bien que la mesure de l'activité cardiaque ait fourni des résultats intéressants notamment lors de la caractérisation des effets des éléments métalliques chez les SPD du Medaka, celle-ci n'est probablement pas très adaptée à nos conditions expérimentales. En effet, le rythme cardiaque des embryons répond très fortement aux variations de température et aux manipulations par l'expérimentateur, malgré toutes les précautions prises : climatisation des salles, lumière froide, pinces extra-souples d'entomologie et limitation de la manipulation des embryons, stabulation des individus avant mesure. Par ailleurs, bien que le suivi de la viabilité se soit avéré peu sensible au cours de nos expérimentations, il semble tout de même important de conserver ce critère afin de pouvoir évaluer les effets létaux ou non d'une contamination. De plus, ce paramètre procure des informations cruciales sur le devenir à court terme des organismes exposés et peut être extrapolé, par la suite, au niveau populationnel. Les différents marqueurs phénotypiques présentés ci-dessus sont particulièrement intéressants dans le cadre des tests embryo-larvaires puisqu'ils permettent de recueillir de nombreuses informations complémentaires sur différents aspects de la toxicité des polluants, et ce de manière non-invasive.

L'application du test Comète à l'évaluation du pouvoir génotoxique des contaminants s'est avérée très pertinente dans le cas des métaux modèles étudiés. Cependant, ce marqueur ne s'est pas

montré particulièrement sensible à la présence d'autres composés potentiellement génotoxiques comme les HAP pourtant parfois présents de manière importante dans les sédiments (naturellement ou par dopage). En outre, le test comète ne permet pas de mettre en évidence certaines formes d'atteintes génotoxiques spécifiques comme la formation d'adduits à l'ADN, par exemple. Il est également possible que l'absence de réponse après exposition à des HAP soit liée aux mécanismes de biotransformation des xénobiotiques moins performants chez les SPD que chez les adultes, limitant la bioactivation des composés pro-génotoxiques. Par ailleurs, on ne peut pas exclure qu'une partie des dommages à l'ADN ait été prise en charge par les mécanismes de réparation de l'ADN. La forte induction du gène *cyp1a* ainsi que l'absence de surexpression significative des gènes impliqués dans la réparation des dommages de l'ADN ne nous permettent pas de confirmer ces hypothèses. Il est également envisageable qu'une partie des cellules fortement endommagées ait été perdue au cours du protocole de dissociation cellulaire et/ou lors de la mise en œuvre du test Comète. Inversement, l'analyse par qRT-PCR de l'expression de gènes impliqués dans un large panel de mécanismes physiologiques s'est avérée très sensible à tous les types de contaminations étudiés (métallique ou organique, naturelle ou artificielle). L'utilisation de ces marqueurs moléculaires au cours de l'étude des effets des substances modèles a permis de décrire et de mieux comprendre certains modes d'action des composés modèles retenus. La complexité des profils d'expression génique et du cocktail de contaminants n'a pas permis d'approfondir cette approche mécanistique dans le cas des sédiments naturels. Cette étude aura néanmoins permis de mettre en évidence certaines cibles moléculaires particulièrement sollicitées ou impactées en présence d'un mélange complexe de polluants environnementaux. Enfin, le suivi de la bioaccumulation en contaminants chez les embryons et/ou les larves semble très pertinente à la fois pour la caractérisation de la toxicité de substances pures et pour l'évaluation du potentiel toxique de sédiments naturels. En effet, ce paramètre permet d'apprécier quantitativement la fraction biodisponible des substances présentes ainsi que la cinétique de contamination des individus. Cette mesure peut également être appliquée au suivi de la dépuración des organismes et renseigner ainsi sur la persistance des substances au sein de l'organisme. Néanmoins, l'application de la RT-PCR et de la mesure de la bioaccumulation restent des procédures invasives gourmandes en matériel biologique en dépit d'améliorations techniques importantes notamment au niveau de la sensibilité des appareils d'analyse. Des efforts devraient continuer dans cette voie afin de tendre à améliorer les techniques d'extraction et de pouvoir minimiser au mieux la taille de l'échantillon biologique. Ceci permettrait de limiter le nombre d'individus nécessaires aux analyses mais également de multiplier le nombre de réplicats analytiques dans le but de réduire une variabilité pouvant être forte pour ce genre de mesures.

Cet ensemble de marqueurs phénotypiques et moléculaires a été appliqué à la caractérisation de la toxicité et des modes d'action de différentes substances emblématiques de la contamination en Aquitaine. Le Cu et le Cd ont montré une toxicité relativement similaire dont les principaux effets se sont traduits par l'apparition de malformations au niveau du système cardio-vasculaire et du squelette axial ainsi que l'induction de dommages à l'ADN. En choisissant les marqueurs les plus sensibles face à la contamination métallique des LOEC ont pu être évaluées à **1,31 µg/g p.s.** et **1,50 µg/g p.s.** respectivement pour le Cu et le Cd (valeurs mentionnées après soustraction du background en Cu et en Cd). La valeur obtenue pour le Cd est inférieure à la concentration maximale admissible (PNEC) de 2,3 µg/g p.s. établie pour les sédiments d'eau douce dans le cadre de la DCE (UE, 2005b). La LOEC Cu établie au cours de la présente étude est également largement inférieure aux valeurs TEC

et PEC respectivement de 31,6  $\mu\text{g/g}$  p.s. et 149  $\mu\text{g/g}$  p.s. préconisées par MacDonald *et al.* (2000). Néanmoins, ces LOEC devront être confirmées et validées par l'étude des effets toxiques induits à des concentrations inférieures. Le suivi de la contamination en Cd des différents compartiments biotiques et abiotiques a permis de confirmer une contamination effective des embryons et des larves de Medaka exposés dès la plus faible concentration testée. Les résultats semblent également indiquer qu'une large part de la charge en Cd est fixée sur l'enveloppe externe du chorion des embryons. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en mesurant la bioaccumulation chez des embryons déchorionés, ce qui permettrait également de connaître l'accumulation réelle en Cd à ce stade de développement. Par ailleurs, nous avons pu montrer que le Cd peut affecter l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial, la régulation du cycle cellulaire (apoptose, arrêt du cycle cellulaire, prolifération cellulaire) et la réparation des dommages à l'ADN. Les profils d'expression géniques se sont avérés différents selon le stade de vie (embryons ou pro-larves) et la concentration considérés. Ces observations semblent indiquer une modification des effets induits par le Cd au niveau moléculaire selon le stade de développement, la durée et/ou l'intensité de l'exposition. Par ailleurs, l'induction de mécanismes parfois antagonistes révèle toute la complexité des mécanismes de toxicité du Cd qui semblent comprendre de multiples interactions plus ou moins directes à différents niveaux de régulation de l'expression des gènes (génique, transcriptionnel ou post-traductionnel). Ces effets peuvent également, pour certains, traduire une réponse adaptative des organismes face à la contamination en Cd. La plupart des mécanismes d'action du Cd mis en évidence au cours de ce travail ont déjà été rapportés dans la littérature, principalement chez des organismes adultes ou lors d'études *in vitro*. La présente étude a permis de démontrer que les mêmes modes d'action de ce composé pouvaient être activés *in vivo* chez les SPD de poisson et compromettre ainsi le bon déroulement du développement embryonnaire des individus exposés.

Le test MELA a ensuite été appliqué à l'analyse de la toxicité de deux HAP relativement peu étudiés dans la littérature. Les deux études menées dans le cadre de cette thèse ont permis de démontrer, à notre connaissance pour la première fois, les effets tératogènes du MePyr chez les SPD de poisson. Seul le Pyr a induit une toxicité aigüe chez les embryons de Medaka. Cependant, les deux composés ont exercé un fort pouvoir tératogène. La majorité des pathologies observées, incluant des déformations de la colonne vertébrale, des anomalies cardio-vasculaires, des malformations de la mâchoire et un syndrome de malabsorption des réserves vitellines, a préalablement été rapportée chez des SPD de poissons exposés à la TCDD, suggérant un mécanisme d'action commun. L'analyse des profils d'expression génique induits par ces deux HAP soutient cette hypothèse en mettant en évidence une activation de la voie CYP1A. En parallèle, une activation de la voie de signalisation et de biotransformation des rétinoïdes est observée. Ces résultats rejoignent ceux de précédentes études montrant l'existence d'interconnexions entre les voies métaboliques de l'Ahr et des rétinoïdes (Hayashida *et al.*, 2004). Par ailleurs, différents auteurs rappellent les similitudes des effets toxiques induits par des composés agonistes de l'Ahr et des modulateurs de l'homéostasie de la vitamine A (Novak *et al.*, 2008 ; Rolland, 2000). En outre, des indices d'une perturbation de la chaîne respiratoire mitochondriale semblent indiquer la génération d'un stress oxydant par ces composés, probablement lors de leur métabolisation par le CYP1A. Les différences de profils d'expression génique entre le stade embryonnaire et larvaire suggèrent une nouvelle fois que la toxicocinétique et la toxicodynamique de ces composés ainsi que le stade de développement conditionnent la nature des effets observés. Le Pyr et le MePyr ont montré des spectres et des seuils de toxicité relativement



proches évoquant une similitude dans les mécanismes d'action. Les valeurs de LOEC établies sont relativement basses, respectivement de **248 ng/g p.s.** et de **183 ng/g p.s.** pour le Pyr et le MePyr (après soustraction du background en Pyr et en MePyr), et soulèvent la question du risque potentiel de sédiments contaminés par ces composés pour les espèces aquatiques. En effet, ces valeurs peuvent être atteintes voire mêmes dépassées dans les sédiments de milieux anthropisés comme le Bassin d'Arcachon ou le système Lot-Garonne.

Les différentes LOEC établies pour les polluants modèles étudiés qu'ils soient de nature métallique ou organique démontrent une bonne sensibilité du bioessai. Ces valeurs devront néanmoins être validées par de nouvelles séries d'exposition employant les mêmes concentrations dans le sédiment ainsi que des teneurs moindres, afin de préciser les LOEC et d'étudier la fiabilité, la variabilité et la reproductibilité du bioessai. Les données issues de ce genre de test pourraient alors venir enrichir les bases de données toxicologiques dans le but d'affiner la détermination des PNEC et des NQE pour le compartiment sédimentaire. Actuellement, les  $PNEC_{\text{sédiment}}$  sont bien souvent dérivées des  $PNEC_{\text{eau}}$ . Le genre de bioessai que nous proposons ici pourrait être utilisé pour établir des  $PNEC_{\text{sédiment}}$  directement à partir de  $NOEC_{\text{sédiment}}$ . Il est cependant important de garder à l'esprit que les valeurs de LOEC ont été établies à partir de sédiments dopés, ce qui peut engendrer une surestimation de la toxicité des composés en raison de la biodisponibilité plus importante des substances artificiellement fixées aux particules en comparaison des sédiments « naturellement » contaminés.

L'application du test MELA à l'évaluation de la toxicité des sédiments naturels du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon a permis de mettre en évidence des effets toxiques significatifs chez les SPD du Medaka pour l'ensemble des sédiments étudiés. Ces matrices sédimentaires ont principalement induit des effets sublétaux avec notamment une forte augmentation du pourcentage d'individus malformés, ainsi qu'un ralentissement global du développement *in ovo*. Le spectre des malformations est en partie commun aux sédiments des deux systèmes notamment concernant les malformations cardiaques, squelettiques et cranio-faciales. L'analyse biomoléculaire a mis en évidence des altérations de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la chaîne respiratoire mitochondriale, la biotransformation et la séquestration des xénobiotiques, la régulation du cycle cellulaire et la réparation des lésions oxydatives de l'ADN. Seuls les sédiments d'Arès et de La Réole ont induits des effets létaux chez les individus exposés. Ces matrices sédimentaires s'avèrent également relativement chargées en matière organique, ce qui suggère que ce paramètre pourrait intervenir dans les réponses toxiques observées chez les SPD de Medaka. Par ailleurs, alors que tous les sites du Bassin induisent des effets toxiques significatifs en comparaison du site de Marcenac, une toxicité notable n'est mise en évidence que pour les sédiments d'Arès, d'Andernos et des Jacquets par rapport au site de référence interne au Bassin de Grand Banc. Ces observations rappellent toute l'importance de considérer les effets observés chez les organismes tests en comparaison d'un site témoin représentatif de l'environnement d'étude puisque certaines caractéristiques du sédiment telles que la teneur en carbone organique ainsi que la taille et la nature des particules peuvent influencer les réponses des organismes exposés. Des résultats inattendus ont été révélés au cours de cette étude. En effet, certains sédiments faiblement chargés en contaminants comme La Réole ont induit un large spectre d'effets létaux et sublétaux chez les SPD de Medaka et inversement, certains sites présentant une forte contamination comme Bélisaire et Le Temple n'ont engendré que des réponses toxiques limitées. Des variations dans la biodisponibilité des contaminants entre ces sites

pourraient expliquer ces différences de toxicité observées. L'analyse des substances bioaccumulées chez les embryons et les larves devrait permettre d'apporter des éléments de réponse aux interrogations suscitées par ces sites « atypiques ». Par ailleurs un nombre limité de substances chimiques ayant été dosé, il n'est pas exclu que d'autres polluants puissent être à l'origine des effets observés. À l'exception de ces sites particuliers, la toxicité des différents sédiments mesurée par le test MELA est globalement bien corrélée à la contamination des sédiments en éléments métalliques et/ou en HAP. L'ensemble de ces observations confirme néanmoins tout l'intérêt de coupler l'analyse chimique et les bioessais dans le cadre de l'estimation du risque écotoxique des sédiments naturels, afin d'identifier d'éventuels « faux-positifs » ou « faux-négatifs » au cours de l'une ou l'autre des approches.

L'ensemble de ces travaux a démontré la puissance et la pertinence de l'utilisation d'un test embryo-larvaire poisson, utilisant le Medaka japonais comme modèle et le sédiment-contact comme voie d'exposition, pour caractériser les effets toxiques phénotypique et moléculaire chez les SPD de poisson induits par des composés de natures différentes et à des concentrations environnementales. Cette double approche a permis d'appréhender à la fois les aspects mécanistiques et les conséquences en terme de risque environnemental. L'utilisation d'une batterie de marqueurs de toxicité sublétaux s'est avérée très pertinente dans ce type de démarche et devrait être systématiquement intégrée dans les bioessais visant à évaluer la toxicité de matrices environnementales. D'autres marqueurs pourraient être ajoutés tels que des analyses comportementales, protéomiques et/ou métabolomiques afin d'appréhender d'autres aspects de la toxicité des polluants environnementaux. Par ailleurs, nous avons vu que la sensibilité des différents marqueurs varie en fonction de la nature et de l'intensité de la contamination chimique. Ceci confirme tout l'intérêt de conserver une approche multi-marqueurs dans le cadre de l'évaluation du risque environnemental de matrices complexes. Toujours dans ce contexte, l'ajout de tests embryo-larvaires poisson similaires à celui utilisé dans les présents travaux au sein d'une batterie d'autres bioessais, utilisant par exemple des bactéries, des amphipodes, des crustacés et des plantes supérieures, permettrait de cribler les effets toxiques induits par une contamination chimique sur plusieurs taxons. La transposition du test MELA à d'autres espèces autochtones pourrait également permettre de gagner en pertinence environnementale et de mieux appréhender les différences de sensibilité interspécifiques.

L'utilisation d'un poisson modèle tel que le Medaka japonais présente néanmoins de nombreux avantages liés à son maintien et sa reproduction aisés en laboratoire ainsi qu'à la bonne connaissance de sa biologie (dont la biologie de son développement) et de son génome. Ces aspects présentent un intérêt tout particulier dans le cadre d'études plus fondamentales comme, par exemple, l'analyse de la cinétique de la mise en place et de réponse des mécanismes de biotransformation des xénobiotiques. Le suivi des métabolites durant le développement *in ovo* et après éclosion ainsi que dans le milieu abiotique pourrait apporter des éléments de réponse sur le devenir des contaminants dans l'organisme ainsi que sur l'efficacité et la cinétique de dépuración. D'un point de vue toxicologique, le développement et l'utilisation de lignées transgéniques telles que celles développées par Winn *et al.* (2000) ou d'autres outils tels que l'injection de morpholinos, pourraient permettre d'étudier précisément les mécanismes d'action de différentes substances et notamment des polluants émergents. Les lignées transgéniques pourraient également être utilisées dans un cadre environnemental. Par exemple, nous pourrions imaginer l'utilisation d'une lignée

transgénique AhR-GFP (Green fluorescent protein) qui permettrait de mettre en évidence la présence de composés agonistes de ce récepteur dans des matrices environnementales, telles que les sédiments, les eaux de surfaces et les rejets d'usine ou de stations d'épuration. Enfin, en tant qu'espèce de laboratoire, le Medaka japonais pourrait être utilisé pour suivre les effets des contaminants sur toute la durée de vie de l'organisme voire même sur sa descendance (effets transgénérationnels). Ceci permettrait d'extrapoler les observations obtenues au niveau individuel à la population et augmenter ainsi les connaissances en termes d'effets de la contamination chimique sur la structure et la dynamique des populations.

Lors de l'évaluation du potentiel toxique des matrices environnementales, le principal problème repose souvent sur l'identification d'un site de référence adéquat à la fois en termes de contamination mais également du point de vue de la représentativité de ce site par rapport à l'environnement étudié. Cette démarche est particulièrement délicate dans le cas des sédiments dont la composition et la nature peuvent varier de manière importante au sein d'un même système. Ce problème pourrait être contourné en utilisant un sédiment de référence artificielle confectionnée à l'aide de grains de silice de granulométrie connue, enrichis en argile, en calcite et en matière organique. En modifiant les proportions de sables de différentes granulométries ainsi que les quantités d'argile, de matière organique etc..., il serait possible de reconstituer une (ou plusieurs) matrice sédimentaire vierge correspondant aux caractéristiques physiques et chimiques des sédiments de l'environnement à étudier. Ce sédiment pourrait alors être utilisé comme contrôle négatif sans crainte qu'une contamination non-identifiée ou inattendue vienne parasiter les résultats du bioessai. Enfin, le test MELA pourrait également être adapté à l'analyse de la toxicité d'autres échantillons environnementaux des matières en suspensions, des boues de dragages ou de station d'épuration, des sols... Ce test peut également être mis à profit pour évaluer la toxicité d'élutriats (ce qui permettrait de mimer la remise en suspension des sédiments), de lixiviats et d'effluents urbains ou industriels. En jouant sur la quantité de sédiment éluutrié et la dilution des différentes phases aqueuses, il serait alors possible de représenter différentes situations environnementales telles que des crues, des étiages, des déversements accidentels ou des opérations d'aménagement des cours d'eau, par exemple.

La liste des publications, des communications orales et des posters présentés au cours de ces travaux de thèse est rapportée dans l'*Annexe 6*.



## Références bibliographiques

- Achard-Joris M., Gonzalez P., Marie V., Baudrimont M. & Bourdineaud J.P. (2006) Cytochrome c oxydase subunit I gene is up-regulated by cadmium in freshwater and marine bivalves. *BioMetals* 19, 237-44.
- Ahmad I., Oliveira M., Pacheco M. & Santos M.A. (2005) *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers responses to copper exposure with or without beta-naphthoflavone pre-exposure. *Chemosphere* 61, 267-75.
- Akcha F., Vincent Hubert F. & Pfol-Leszkowicz A. (2003) Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 534, 21-32.
- Alsop D., Brown S. & Van der Kraak G. (2007) The effects of copper and benzo[a]pyrene on retinoids and reproduction in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 82, 281-95.
- Alsop D. & Wood C.M. (2011) Metal uptake and acute toxicity in zebrafish: Common mechanisms across multiple metals. *Aquat. Toxicol.* 105, 385-93.
- Ankley G.T., Di Toro D.M., Hansen D.J. & Berry W.J. (1996) Technical basis and proposal for deriving sediment quality criteria for metals. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 2056-66.
- Antkiewicz D.S., Burns C.G., Carney S.A., Peterson R.E. & Heideman W. (2005) Heart malformation is an early response to TCDD in embryonic zebrafish. *Toxicol. Sci.* 84, 368-77.
- Arabi M. (2004) Analyses of impact of metal ion contamination on carp (*Cyprinus carpio* L.) gill cell suspensions. *Biol. Trace Elem. Res.* 100, 229-45.
- Arcand-Hoy L.D. & Metcalfe C.D. (1999) Biomarkers of exposure of brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*) to contaminants in the lower Great Lakes, North America. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 740-9.
- Arukwe A. & Nordbo B. (2008) Hepatic biotransformation responses in Atlantic salmon exposed to retinoic acids and 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB congener 77). *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 147, 470-82.
- ASCOBAR (2010) Projet région "Apports scientifiques face à la problématique conchyicole du Bassin d'Arcachon" - Volet 2 : Apports continentaux. p. 53.
- Auby I., Bocquene G., Quiniou F. & Drenon J.-P. (2007) Etat de la contamination du Bassin d'Arcachon par les insecticides et les herbicides sur la période 2005-2006 - Impact environnemental. *Rapport Ifremer RST/LER/AR/07.003*, p. 108.
- Audry S. (2003) Bilan géochimique du transport des éléments traces métalliques dans le système fluvial anthropisé Lot-Garonne-Gironde. *Biogéochimie de l'Environnement*, p. 441. Université de Bordeaux 1, Bordeaux.
- Audry S., Schafer J., Blanc G., Bossy C. & Lavaux G. (2004a) Anthropogenic components of heavy metal (Cd, Zn, Cu, Pb) budgets in the Lot-Garonne fluvial system (France). *Appl. Geochem.* 19, 769-86.
- Audry S., Schafer J., Blanc G. & Jouanneau J.M. (2004b) Fifty-year sedimentary record of heavy metal pollution (Cd, Zn, Cu, Pb) in the Lot River reservoirs (France). *Environ. Pollut.* 132, 413-26.
- Audry S., Grosbois C., Bril H., Schafer J., Kierczak J. & Blanc G. (2010) Post-depositional redistribution of trace metals in reservoir sediments of a mining/smelting-impacted watershed (the Lot River, SW France). *Appl. Geochem.* 25, 778-94.
- Auslander M., Yudkovski Y., Chalifa-Caspi V., Herut B., Ophir R., Reinhardt R., Neumann P.M. & Tom M. (2008) Pollution-affected fish hepatic transcriptome and its expression patterns on exposure to cadmium. *Mar. Biotechnol.* 10, 250-61.
- Bang A., Gronkjaer P. & Lorenzen B. (2008) The relation between concentrations of ovarian trace elements and the body size of Atlantic cod *Gadus morhua*. *ICES J. Mar. Sci.* 65, 1191-7.
- Barron M.G., Carls M.G., Short J.W. & Rice S.D. (2003) Photoenhanced toxicity of aqueous phase and chemically dispersed weathered Alaska North Slope crude oil to Pacific herring eggs and larvae. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 650-60.
- Barron M.G., Carls M.G., Heintz R. & Rice S.D. (2004a) Evaluation of fish early life-stage toxicity models of chronic embryonic exposures to complex polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *Toxicol. Sci.* 78, 60-7.

- Barron M.G., Heintz R. & Rice S.D. (2004b) Relative potency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon receptor agonists in fish. *Mar. Environ. Res.* 58, 95-100.
- Barsiene J., Dedonyte V., Rybakovas A., Andreikenaite L. & Andersen O.K. (2006) Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. *Aquat. Toxicol.* 78, S99-S104.
- Basu A. & Haldar S. (1998) The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol. Human Reprod.* 4, 1099-109.
- Baudrimont M., Metivaud J., MauryBrachet R., Ribeyre F. & Boudou A. (1997) Bioaccumulation and metallothionein response in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2096-105.
- Baudrimont M., Schäfer J., Marie V., Maury-Brachet R., Bossy C., Boudou A. & Blanc G. (2005) Geochemical survey and metal bioaccumulation of three bivalve species (*Crassostrea gigas*, *Cerastoderma edule* and *Ruditapes philippinarum*) in the Nord Médoc salt marshes (Gironde estuary, France). *Sci. Total Environ.* 337, 265-80.
- Baulig A., Garlatti M., Bonvallot V., Marchand A., Barouki R., Marano F. & Baeza-Squiban A. (2003) Involvement of reactive oxygen species in the metabolic pathways triggered by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 285, L671-L9.
- Bauman J.W., Liu J., Liu Y.P. & Klaassen C.D. (1991) Increase in metallothionein produced by chemicals that induce oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 110, 347-54.
- Baumard P., Budzinski H. & Garrigues P. (1998) PAHs in Arcachon Bay, France: Origin and biomonitoring with caged organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 36, 577-86.
- Belfroid A.C., Sijm D.T.H.M. & Van Gestel C.A.M. (1996) Bioavailability and toxicokinetics of hydrophobic aromatic compounds in benthic and terrestrial invertebrates. *Environ. Rev.* 4, 276-99.
- Benaduce A.P.S., Kochhann D., Flores E.M.M., Dressler V.L. & Baldisserotto B. (2008) Toxicity of cadmium for silver catfish *Rhamdia quelen* (Heptapteridae) embryos and Larvae at different alkalinities. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 274-82.
- Bentivegna C.S. & Piatkowski T. (1998) Effects of tributyltin on medaka (*Oryzias latipes*) embryos at different stages of development. *Aquat. Toxicol.* 44, 117-28.
- Bertin C. & Bourg A.C.M. (1995) Trends in the heavy-metal content (Cd, Pb, Zn) of river sediments in the drainage-basin of smelting activities. *Water Res.* 29, 1729-36.
- Bertin G. & Averbeck D. (2006) Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* 88, 1549-59.
- Besselink H.T., Flipsen E., Eggens M.L., Vethaak A.D., Koeman J.H. & Brouwer A. (1998) Alterations in plasma and hepatic retinoid levels in flounder (*Platichthys flesus*) after chronic exposure to contaminated harbour sludge in a mesocosm study. *Aquat. Toxicol.* 42, 271-85.
- Beyer J., Jonsson G., Porte C., Krahn M.M. & Ariese F. (2010) Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 30, 224-44.
- Billiard S.M., Querbach K. & Hodson P.V. (1999) Toxicity of retene to early life stages of two freshwater fish species. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2070-7.
- Billiard S.M., Hahn M.E., Franks D.G., Peterson R.E., Bols N.C. & Hodson P.V. (2002) Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to teleost aryl hydrocarbon receptors (AHRs). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 133, 55-68.
- Billiard S.M., Timme-Laragy A.R., Wassenberg D.M., Cockman C. & Di Giulio R.T. (2006) The role of the aryl hydrocarbon receptor pathway in mediating synergistic developmental toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to zebrafish. *Toxicol. Sci.* 92, 526-36.
- Billiard S.M., Meyer J.N., Wassenberg D.M., Hodson P.V. & Di Giulio R.T. (2008) Nonadditive effects of PAHs on early vertebrate development: Mechanisms and implications for risk assessment. *Toxicol. Sci.* 105, 5-23.
- Black J.A., Birge W.J., Westerman A.G. & Francis P.C. (1983) Comparative aquatic toxicology of aromatic hydrocarbons. *Fundam. Appl. Toxicol.* 3, 353-8.
- Blanc G., Lapaquellerie Y., Maillet N. & Anschutz P. (1999) A cadmium budget for the Lot-Garonne fluvial system (France). *Hydrobiologia* 410, 331-41.

- Blanc G., Schafer J., Audry S., Robert S., Bossy C., Lavaux G., Lissalde J.-P. & Maneux E. (2006) La ballade du cadmium dans le système Lot-Garonne-Gironde : flux naturels et anthropisation. In: *Système fluvio-estuarien de la Gironde*. ECOBAG Programme de recherche - Cahier technique N°4/4.
- Blechinger S.R., Kusch R.C., Haugo K., Matz C., Chivers D.P. & Krone P.H. (2007) Brief embryonic cadmium exposure induces a stress response and cell death in the developing olfactory system followed by long-term olfactory deficits in juvenile zebrafish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 224, 72-80.
- Blumer M. (1976) Polycyclic aromatic compounds in nature. *Sci. Am.* 234, 35-45.
- Boily M., Bisson M. & Spear P.A. (2004) Rétinoïdes - Biomarqueurs et base moléculaire d'effets de substances toxiques. In: *Ecotoxicologie Moléculaire - Principes fondamentaux et perspectives de développement*. Pelletier E, Campbell PGC & Denizeau F (eds.), pp. 197-256. Presses de l'Université du Québec, Sainte-Foy, Québec.
- Bopp S.K., Abicht H.K. & Knauer K. (2008) Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. *Aquat. Toxicol.* 86, 197-204.
- Botta A. (2001) Biotransformation des HAP et des nitro-HAP - Influence du polymorphisme génétique des enzymes métaboliques. p. 21. Service de médecine et santé du travail - Laboratoire de biogénotoxicité - Faculté de Médecine.
- Braunbeck T., Böttcher M., Hollert H., Kosmehl T., Lammer E., Leist E., Rudolf M. & Seitz N. (2005) Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species - An update. *Altex* 22, 87-102.
- Bridges C.C. & Zalups R.K. (2005) Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204, 274-308.
- Brinkworth L.C., Hodson P.V., Tabash S. & Lee P. (2003) CYP1A induction and blue sac disease in early developmental stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to retene. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A* 66, 627-46.
- Budzinski H., Jones I., Bellocq J., Piérard C. & Garrigues P. (1997) Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Mar. Chem.* 58, 85-97.
- Budzinski H. & Togola A. (2006) Présence des résidus de médicaments dans les différents compartiments du milieu aquatique *Environnement, Risques & Santé* 5, 248-53.
- Burlinson B., Tice R.R., Speit G., Agurell E., Brendler-Schwaab S.Y., Collins A.R., Escobar P., Honma M., Kumaravel T.S., Nakajima M., Sasaki Y.F., Thybaud V., Uno Y., Vasquez M. & Hartmann A. (2007) Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: Results of the *in vivo* Comet assay workgroup. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 627, 31-5.
- Burnison B.K., Meinelt T., Playle R., Pietrock M., Wienke A. & Steinberg C.E.W. (2006) Cadmium accumulation in zebrafish (*Danio rerio*) eggs is modulated by dissolved organic matter (DOM). *Aquat. Toxicol.* 79, 185-91.
- Burton G.A., Jr (1991) Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1585-627.
- Cachot J., Couteau J., Frebourg T., Leboulenger F. & Flaman J.M. (2004) Functional analysis of chemically-induced mutations at the flounder TP53 locus, the FACIM assay. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag.* 552, 51-60.
- Cachot J., Geffard O., Augagneur S., Lacroix S., Le Menach K., Peluhet L., Couteau J., Denier X., Devier M.H., Pottier D. & Budzinski H. (2006) Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquat. Toxicol.* 79, 257-67.
- Cachot J., Law M., Pottier D., Peluhet L., Norris M., Budzinski H. & Winn R. (2007) Characterization of toxic effects of sediment-associated organic pollutants using the lambda transgenic medaka. *Environ. Sci. Technol.* 41, 7830-6.
- Cailleaud K., Forget-Leray J., Souissi S., Hilde D., LeMenach K. & Budzinski H. (2007) Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoïda, copepoda). Part 1: PCBs and PAHs. *Chemosphere* 70, 270-80.
- Campbell P.G.C., Errecalde O., Fortin C., Hiriart-Baer W.R. & Vigneault B. (2002) Metal bioavailability to phytoplankton - applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 133, 189-206.
- Campbell P.G.C. & Couillard Y. (2004) Prise en charge et détoxification des métaux chez les organismes aquatiques. In: *Ecotoxicologie Moléculaire - Principes fondamentaux et perspectives de développement*. Pelletier E, Campbell PGC & Denizeau F (eds.), pp. 197-256. Presses de l'Université du Québec, Sainte-Foy, Québec.

- Cao L., Huang W., Shan X., Xiao Z., Wang Q. & Dou S. (2009) Cadmium toxicity to embryonic-larval development and survival in red sea bream *Pagrus major*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1966-74.
- Carls M.G., Rice S.D. & Hose J.E. (1999) Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasii*). *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 481-93.
- Carls M.G., Holland L., Larsen M., Collier T.K., Scholz N.L. & Incardona J.P. (2008) Fish embryos are damaged by dissolved PAHs, not oil particles. *Aquat. Toxicol.* 88, 121-7.
- Carney S.A., Peterson R.E. & Heideman W. (2004) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin activation of the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator pathway causes developmental toxicity through a CYP1A-independent mechanism in zebrafish. *Mol. Pharmacol.* 66, 512-21.
- Carney S.A., Chen J., Burns C.G., Xiong K.M., Peterson R.E. & Heideman W. (2006) Aryl hydrocarbon receptor activation produces heart-specific transcriptional and toxic responses in developing zebrafish. *Mol. Pharmacol.* 70, 549-61.
- Carreau N.D. & Pyle G.G. (2005) Effect of copper exposure during embryonic development on chemosensory function of juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 1-6.
- Cassadou S. & Pouey J. (2002) Evaluation des risques sanitaires liés à la présence de cadmium dans la rivière Lot, entre Boisse-Penchot et Aiguillon. *Rapport final*. Observatoire Régional de la santé Midi-Pyrénées.
- Castelle S., Schafer J., Blanc G., Audry S., Etcheber H. & Lissalde J.P. (2007) 50-year record and solid state speciation of mercury in natural and contaminated reservoir sediment. *Appl. Geochem.* 22, 1359-70.
- Chakraborty P.K., Scharner B., Jurasovic J., Messner B., Bernhard D. & Thevenod F. (2010) Chronic cadmium exposure induces transcriptional activation of the Wnt pathway and upregulation of epithelial-to-mesenchymal transition markers in mouse kidney. *Toxicol. Lett.* 198, 69-76.
- Chapman P.M., Wang F.Y., Janssen C., Persoone G. & Allen H.E. (1998) Ecotoxicology of metals in aquatic sediments: binding and release, bioavailability, risk assessment, and remediation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55, 2221-43.
- Chapman P.M., Ho K.T., Munns W.R., Solomon K. & Weinstein M.P. (2002) Issues in sediment toxicity and ecological risk assessment. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 271-8.
- Chen D.S. & Chan K.M. (2011) Differentially expressed proteins in zebrafish liver cells exposed to copper. *Aquat. Toxicol.* 104, 270-7.
- Cheng S.H., Wai A.W.K., So C.H. & Wu R.S.S. (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 3024-31.
- Cheng S.H., Chan P.K. & Wu R.S.S. (2001) The use of microangiography in detecting aberrant vasculature in zebrafish embryos exposed to cadmium. *Aquat. Toxicol.* 52, 61-71.
- Chodjaï D. (2008) Etude de la contamination du Bassin d'Arcachon par les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP). *Rapport Master 2*, p. 38. ISM - Laboratoire de Physico-Chimie de l'Environnement, Université de Bordeaux 1, France.
- Choucroun P., Gillet D., Dorange G., Sawicki B. & Dewitte J.D. (2001) Comet assay and early apoptosis. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag.* 478, 89-96.
- Chow E.S.H. & Cheng S.H. (2003) Cadmium affects muscle type development and axon growth in zebrafish embryonic somitogenesis. *Toxicol. Sci.* 73, 149-59.
- Chow E.S.H., Hui M.N.Y., Lin C.C. & Cheng S.H. (2008) Cadmium inhibits neurogenesis in zebrafish embryonic brain development. *Aquat. Toxicol.* 87, 157-69.
- Claisse D. (1989) Chemical contamination of french coasts - The results of a 10 years mussel watch. *Mar. Pollut. Bull.* 20, 523-8.
- Clerandau C. (2007) Evaluation de substances CMR pures ou en mélange chez la truite. *Rapport industriel CCOLL/PRDML 2006-2007*.
- Cline J.D. (1969) Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* 14, 454-8.
- Collins A.R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair - Principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* 26, 249-61.
- Cotten A. (1996) La Gironde, un écosystème estuarien. p. 17. *Conservatoire de l'Estuaire de la Gironde*.
- Coyle P., Philcox J.C., Carey L.C. & Rofe A.M. (2002) Metallothionein: The multipurpose protein. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 627-47.



- Coyne A., Schafer J., Dabrin A., Girardot N. & Blanc G. (2007) Groundwater contributions to metal transport in a small river affected by mining and smelting waste. *Water Res.* 41, 3420-8.
- Crespo A. (2009) Présence et sources des Hydrocarbures aromatiques Polycycliques dans le Bassin d'Arcachon. *Sciences de l'Environnement - Ecotoxicologie et Géochimie*, p. 458. Université de Bordeaux 1, Bordeaux.
- Cui X.Y., Hunter W., Yang Y., Chen Y.X. & Gan J. (2011) Biodegradation of pyrene in sand, silt and clay fractions of sediment. *Biodegradation* 22, 297-307.
- Dave G. & Xiu R.Q. (1991) Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21, 126-34.
- Deflandre B. & Duchêne J.-C. (2010) PRO2FLUX - A software program for profile quantification and diffusive O<sub>2</sub> flux calculations. *Environ. Model. Software* 25, 1059-61.
- DeForest D.K., Brix K.V. & Adams W.J. (2007) Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. *Aquat. Toxicol.* 84, 236-46.
- Dégremont C. & Cachot J. (2009) La génotoxicité : quel risque pour les espèces aquatiques ? *Fascicules Seine-Aval*. Seine-Aval - Groupement d'intérêt public.
- Denison M.S. & Heath-Pagliuso S. (1998) The Ah receptor: A regulator of the biochemical and toxicological actions of structurally diverse chemicals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 557-68.
- Devaux A., Pesonen M. & Monod G. (1997) Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. *Toxicol. In Vitro* 11, 71-8.
- Dewitt T.H., Hickey C.W., Morrissey D.J., Nipper M.G., Roper D.S., Williamson R.B., Dam L.V. & Williams E.K. (1999) Do amphipods have the same concentration-response to contaminated sediment in situ as in vitro? *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1026-37.
- Di Toro D.M., Mahony J.D., Hansen D.J., Scott K.J., Hicks M.B., Mayr S.M. & Redmond M.S. (1990) Toxicity of cadmium in sediments: The role of acid volatile sulfide. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 1487-502.
- Di Toro D.M. & McGrath J.A. (2000) Technical basis for narcotic chemicals and polycyclic aromatic hydrocarbon criteria. II. Mixtures and sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1971-82.
- Di Toro D.M., McGrath J.A. & Hansen D.J. (2000) Technical basis for narcotic chemicals and polycyclic aromatic hydrocarbon criteria. I. Water and tissue. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1951-70.
- Di Toro D.M., McGrath J.A., Hansen D.J., Berry W.J., Paquin P.R., Mathew R., Wu K.B. & Santore R.C. (2005) Predicting sediment metal toxicity using a sediment biotic ligand model: Methodology and initial application. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2410-27.
- Ditoro D.M., Mahony J.D., Hansen D.J., Scott K.J., Carlson A.R. & Ankley G.T. (1992) Acid volatile sulphide predicts the acute toxicity of cadmium and nickel in sediments. *Environ. Sci. Technol.* 26, 96-101.
- Djomo J.E., Garrigues P. & Narbonne J.F. (1996) Uptake and depuration of polycyclic aromatic hydrocarbons from sediment by the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1177-81.
- Dupree C. & Ahrens A. (2007) Polycyclic aromatic hydrocarbons in Auckland's aquatic environment: source concentrations and potential environmental risks. *Auckland Regional Council Technical Prepared by NIWA for Auckland Regional Council*.
- Durrieu G., Maury-Brachet R., Girardin M., Rochard E. & Boudou A. (2005) Contamination by heavy metals (Cd, Zn, Cu, and Hg) of eight fish species in the Gironde estuary (France). *Estuaries* 28, 581-91.
- ECOBAG (2006) Système fluvio-estuarien de la Gironde. *ECOBAG - Programme de Recherche Cahier technique n°4/4*.
- Elonen G.E., Spehar R.L., Holcombe G.W., Johnson R.D., Fernandez J.D., Erickson R.J., Tietge J.E. & Cook P.M. (1998) Comparative toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to seven freshwater fish species during early life-stage development. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 472-83.
- Embry M.R., Belanger S.E., Braunbeck T.A., Galay-Burgos M., Halder M., Hinton D.E., Leonard M.A., Lillicrap A., Norberg-King T. & Whale G. (2010) The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquat. Toxicol.* 97, 79-87.
- Engst W., Landsiedel R., Hermersdorfer H., Doehmer J. & Glatt H. (1999) Benzylic hydroxylation of 1-methylpyrene and 1-ethylpyrene by human and rat cytochromes P450 individually expressed in V79 Chinese hamster cells. *Carcinogenesis* 20, 1777-85.
- Etcheber H., Relexans J.-C., Beliard M., Weber O., Buscail R. & Heussner S. (1999) Distribution and quality of sedimentary organic matter on the Aquitanian margin (Bay of Biscay). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 46, 2249-88.

- Etcheber H., Abril G., Sottolichio A., Castaing P. & Anschutz P. (2006) Dynamique du bouchon vaseux et oxygénation des eaux. In: *Système fluvio-estuarien de la Gironde*. ECOBAG Programme de recherche - Cahier technique N°4/4.
- Eyckmans M., Tudorache C., Darras V.M., Blust R. & De Boeck G. (2010) Hormonal and ion regulatory response in three freshwater fish species following waterborne copper exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology & Pharmacology* 152, 270-8.
- Fairbairn D.W., Walburger D.K., Fairbairn J.J. & O'Neill K.L. (1996) Key morphologic changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells: Discriminating apoptosis from necrosis. *Scanning* 18, 407-16.
- Farwell A., Nero V., Croft M., Bal P. & Dixon D.G. (2006) Modified Japanese medaka embryo-larval bioassay for rapid determination of developmental abnormalities. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 600-7.
- Förstner U. & Wittmann G.T. (1979) *Metal pollution in the aquatic environment*. Springer-Verlag, New-York.
- Francis P.C., Birge W.J. & Black J.A. (1984) Effects of cadmium-enriched sediment on fish and amphibian embryo-larval stages. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 8, 378-87.
- Frayse B., Mons R. & Garric J. (2006) Development of a zebrafish 4-day toxicity of embryo-larval bioassay to assess chemicals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 253-67.
- Gabbianelli R., Lupidi G., Villarini M. & Falcioni G. (2003) DNA damage induced by copper on erythrocytes of gilthead sea bream *Sparus aurata* and mollusk *Scapharca inaequivalvis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 350-6.
- Gale S.A., King C.K. & Hyne R.V. (2006) Chronic sublethal sediment toxicity testing using the estuarine amphipod, *Melita plumulosa* (Zeidler): Evaluation using metal-spiked and field-contaminated sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 1887-98.
- Garcia-Santos S., Vargas-Chacoff L., Ruiz-Jarabo I., Varela J.L., Mancera J.M., Fontainhas-Fernandes A. & Wilson J.M. (2011) Metabolic and osmoregulatory changes and cell proliferation in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) exposed to cadmium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 270-8.
- Geffard O. (2001) Toxicité potentielle des sédiments marins et estuariens contaminés : évaluation chimique et biologique, biodisponibilité des contaminants sédimentaires. *Ecotoxicologie*, p. 376. Université Bordeaux 1, Bordeaux, France.
- Geffard O., Geffard A., His E. & Budzinski H. (2003) Assessment of the bioavailability and toxicity of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals applied to *Crassostrea gigas* embryos and larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 481-90.
- George S., Burgess D., Leaver M. & Frerichs N. (1992) Metallothionein induction in cultured fibroblasts and liver of a marine flatfish, the turbot, *Scophthalmus maximus*. *Fish Physiol. Biochem.* 10, 43-54.
- GEREA (2010) Profil environnemental de la Région Aquitaine. *Préfecture de la région Aquitaine*, 234.
- Ghosh U., Gillette J.S., Luthy R.G. & Zare R.N. (2000) Microscale location, characterization and association of polycyclic aromatic hydrocarbons on harbor sediment particles. *Environmental Science and Technology* 34, 1729-36.
- Giaginis C., Gatzidou E. & Theocharis S. (2006) DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 213, 282-90.
- Glatt H., Henschler R., Frank H., Seidel A., Yang C., Abu-Shqara E. & Harvey R.G. (1993) Sulfotransferase-mediated mutagenicity of 1-hydroxymethylpyrene and 4H-cyclopenta[def]chrysen-4-ol and its enhancement by chloride anions. *Carcinogenesis* 14, 599-602.
- Glatt H., Rost K., Frank H., Seidel A. & Kollock R. (2008) Detoxification of promutagenic aldehydes derived from methylpyrenes by human aldehyde dehydrogenases ALDH2 and ALDH3A1. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 477, 196-205.
- Glickman N.S. & Yelon D. (2002) Cardiac development in zebrafish: coordination of form and function. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13, 507-13.
- Gonzalez-Doncel M., de la Pena E., Barrueco C. & Hinton D.E. (2003a) Stage sensitivity of medaka (*Oryzias latipes*) eggs and embryos to permethrin. *Aquat. Toxicol.* 62, 255-68.
- Gonzalez-Doncel M., Larrea M., Sanchez-Fortun S. & Hinton D.E. (2003b) Influence of water hardening of the chorion on cadmium accumulation in medaka (*Oryzias latipes*) eggs. *Chemosphere* 52, 75-83.
- Gonzalez-Doncel M., Okihira M.S., Villalobos S.A., Hinton D.E. & Tarazona J.V. (2005) A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrianichthyidae). *J. Appl. Ichthyol.* 21, 39-52.
- Gonzalez-Doncel M., Gonzalez L., Fernandez-Torija C., Navas J.M. & Tarazona J.V. (2008) Toxic effects of an oil spill on fish early life stages may not be exclusively associated to PAHs: Studies with *Prestige* oil and medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 87, 280-8.

- Gonzalez J.-L., Chiffolleau J.-F., Miramand P. & Thouvenin B. (1999) Le cadmium : comportement d'un contaminant métallique dans l'estuaire. *Fascicule SA 1.10*. Groupement d'Intérêt Public Seine-aval.
- Gonzalez P., Dominique Y., Massabuau J.C., Boudou A. & Bourdineaud J.P. (2005) Comparative effects of dietary methylmercury on gene expression in liver, skeletal muscle, and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Technology* 39, 3972-80.
- Gonzalez P., Baudrimont M., Boudou A. & Bourdineaud J.P. (2006) Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *BioMetals* 19, 225-35.
- Griffin T.S., He Z. & Honeycutt C.W. (2005) Manure composition affects net transformation of nitrogen from dairy manures. *Plant Soil* 273, 29-38.
- Grosell M., Nielsen C. & Bianchini A. (2002) Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 133, 287-303.
- Grosell M., Blanchard J., Brix K.V. & Gerdes R. (2007) Physiology is pivotal for interactions between salinity and acute copper toxicity to fish and invertebrates. *Aquat. Toxicol.* 84, 162-72.
- Grosell M. (sous presse) Copper. In: *Homeostasis and Toxicology of Essential Metals*. Wood CM, Farrell AP & Brauner CJ (eds.). Elsevier Inc.
- Grousset F.E., Jouanneau J.M., Castaing P., Lavaux G. & Latouche C. (1999) A 70 year record of contamination from industrial activity along the Garonne River and its tributaries (SW France). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 48, 401-14.
- Hallare A.V., Kosmehl T., Schulze T., Hollert H., Kohler H.R. & Triebkorn R. (2005a) Assessing contamination levels of Laguna Lake sediments (Philippines) using a contact assay with zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Sci. Total Environ.* 347, 254-71.
- Hallare A.V., Schirling M., Luckenbach T., Kohler H.R. & Triebkorn R. (2005b) Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J. Therm. Biol.* 30, 7-17.
- Hano T., Oshima Y., Kim S.G., Satone H., Oba Y., Kitano T., Inoue S., Shimasaki Y. & Honjo T. (2007) Tributyltin causes abnormal development in embryos of medaka, *Oryzias latipes*. *Chemosphere* 69, 927-33.
- Hartmann A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V. & Tice R.R. (2003) Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18, 45-51.
- Hayashida Y., Kawamura T., Hori-e R. & Yamashita I. (2004) Retinoic acid and its receptors are required for expression of aryl hydrocarbon receptor mRNA and embryonic development of blood vessel and bone in the medaka fish, *Oryzias latipes*. *Zool. Sci.* 21, 541-51.
- He C., Zuo Z., Shi X., Li R., Chen D., Huang X., Chen Y. & Wang C. (2011) Effects of benzo(a)pyrene on the skeletal development of *Sebastiscus marmoratus* embryos and the molecular mechanism involved. *Aquat. Toxicol.* 101, 335-41.
- Heintz R.A., Short J.W. & Rice S.D. (1999) Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part II. Increased mortality of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) embryos incubating downstream from weathered Exxon Valdez crude oil. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 494-503.
- Hellou J., Leonard J., Collier T.K. & Ariese F. (2006) Assessing PAH exposure in feral finfish from the Northwest Atlantic. *Mar. Pollut. Bull.* 52, 433-41.
- Helmstetter M.F. & Alden R.W. (1995a) Passive trans-chorionic transport of toxicants in topically treated Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs. *Aquat. Toxicol.* 32, 1-13.
- Helmstetter M.F. & Alden R.W. (1995b) Toxic responses of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs following topical and immersion exposures to pentachlorophenol. *Aquat. Toxicol.* 32, 15-29.
- Hendon L.A., Carlson E.A., Manning S. & Brouwer M. (2008) Molecular and developmental effects of exposure to pyrene in the early life-stages of *Cyprinodon variegatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 147, 205-15.
- Hernandez P.P., Moreno V., Olivari F.A. & Allende M.L. (2006) Sub-lethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (*Danio rerio*). *Hearing Res.* 213, 1-10.
- Hjorth T. (2004) Effects of freeze-drying on partitioning patterns of major elements and trace metals in lake sediments. *Anal. Chim. Acta* 526, 95-102.

- Hodson P.V., Qureshi K., Noble C.A.J., Akhtar P. & Brown R.S. (2007) Inhibition of CYP1A enzymes by alpha-naphthoflavone causes both synergism and antagonism of retene toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 81, 275-85.
- Hollert H., Keiter S., König N., Rudolf M., Ulrich M. & Braunbeck T. (2003) A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J. Soils Sed.* 3, 197-207.
- Hollis L., McGeer J.C., McDonald D.G. & Wood C.M. (1999) Cadmium accumulation, gill Cd binding, acclimation, and physiological effects during long term sublethal Cd exposure in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 46, 101-19.
- Hong F., Wu C., Liu C., Wu K., Gao F. & Yang F. (2006) Interaction mechanism between Cd<sup>2+</sup> ions and DNA from the kidney of the silver crucian carp. *Biol. Trace Elem. Res.* 110, 33-42.
- Honkanen J.O., Wiegand C. & Kukkonen J.V.K. (2008) Humic substances modify accumulation but not biotransformation of pyrene in salmon yolk-sac fry. *Aquat. Toxicol.* 86, 239-48.
- Hornung M.W., Spitsbergen J.M. & Peterson R.E. (1999) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters cardiovascular and craniofacial development and function in sac fry of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol. Sci.* 47, 40-51.
- Hornung M.W., Cook P.M., Flynn K.M., Lothenbach D.B., Johnson R.D. & Nichols J.W. (2004) Use of multi-photon laser-scanning microscopy to describe the distribution of xenobiotic chemicals in fish early life stages. *Aquat. Toxicol.* 67, 1-11.
- Hornung M.W., Cook P.M., Fitzsimmons P.N., Kuehl D.W. & Nichols J.W. (2007) Tissue distribution and metabolism of benzo[a]pyrene in embryonic and larval medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicol. Sci.* 100, 393-405.
- Höss S., Ahlf W., Fahnenstich C., Gilberg D., Hollert H., Melbye K., Meller M., Hammers-Wirtz M., Heining P., Neumann-Hensel H., Ottermann R., Ratte H.T., Seiler T.B., Spira D., Weber J. & Feiler U. (2010) Variability of sediment-contact tests in freshwater sediments with low-level anthropogenic contamination - Determination of toxicity thresholds. *Environ. Pollut.* 158, 2999-3010.
- Hove J.R., Koster R.W., Forouhar A.S., Acevedo-Bolton G., Fraser S.E. & Gharib M. (2003) Intracardiac fluid forces are an essential epigenetic factor for embryonic cardiogenesis. *Nature* 421, 172-7.
- Huggett D.B., Gillespie W.B. & Rodgers J.H. (1999) Copper bioavailability in Steilacoom Lake sediments. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 120-3.
- Hutchinson T.H., Solbé J. & Kloepper-Sams P.J. (1998) Analysis of the ECETOC Aquatic Toxicity (EAT) database. III - Comparative toxicity of chemical substances to different life stages of aquatic organisms. *Chemosphere* 36, 129-42.
- Ifremer (2008) Qualité du Milieu Marin Littoral - Bulletin de la surveillance. Juin 2008 - RST/LER/AR/08.004, p. 83.
- Ifremer & LPTC (2008) Impact potentiel des activités nautiques sur la qualité des eaux du Bassin d'Arcachon. *Laboratoire Environnement et Ressources, Arcachon ; Laboratoire de Physico-Toxico-Chimie de l'environnement, Université de Bordeaux 1 ; à la demande du Groupe de Travail "Plaisance et Environnement"*.
- Ifremer (2011) Qualité du Milieu Marin Littoral - Bulletin de la surveillance. Juin 2011 - RST/LER/AR/11.001, p. 100.
- Incardona J.P., Collier T.K. & Scholz N.L. (2004) Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196, 191-205.
- Incardona J.P., Carls M.G., Teraoka H., Sloan C.A., Collier T.K. & Scholz N.L. (2005) Aryl hydrocarbon receptor-independent toxicity of weathered crude oil during fish development. *Environ. Health Perspect.* 113, 1755-62.
- Incardona J.P., Day H.L., Collier T.K. & Scholz N.L. (2006) Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 217, 308-21.
- INERIS (2005a) Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques - Données d'entrée des modèles analytiques ou numériques de transferts dans les sols et les eaux souterraines : synthèse bibliographique relative aux paramètres Kd (sorption) et T1/2 (biodégradation). *Rapport d'étude N°66244-DESP-R02*.
- INERIS (2005b) Pyrène. *Fiches de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques* Version N° 1-3 février 20054, 1-36.
- INERIS (2006) HAP. *Données technico-économiques sur les substances chimiques en France* Mise à jour du 03/04/2006, 1-45.

- Ingersoll C.G., Haverland P.S., Brunson E.L., Canfield T.J., Dwyer F.J., Henke C.E., Kemble N.E., Mount D.R. & Fox R.G. (1996) Calculation and evaluation of sediment effect concentrations for the amphipod *Hyaella azteca* and the midge *Chironomus riparius*. *J. Great Lakes Res.* 22, 602-23.
- Islam M.S. & Tanaka M. (2004) Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 624-49.
- ISO (2007) Water quality - Determination of the Acute toxicity of Waste Water to Zebrafish Eggs (*Danio rerio*). *ISO 15088:2007*.
- Ivanina A.V., Habinck E. & Sokolova I.M. (2008) Differential sensitivity to cadmium of key mitochondrial enzymes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 148, 72-9.
- Ivnitski-Steele I.D., Friggens M., Chavez M. & Walker M.K. (2005) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) inhibition of coronary vasculogenesis is mediated, in part, by reduced responsiveness to endogenous angiogenic stimuli, including vascular endothelial growth factor A (VEGF-A). *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology* 73, 440-6.
- Iwamatsu T. (2004) Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mechanisms of Development* 121, 605-18.
- Jacobs L.E., Weavers L.K. & Chin Y.P. (2008) Direct and indirect photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in nitrate-rich surface waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1643-8.
- Jeziarska B., Lugowska K., Witeska M. & Sarnowski P. (2000) Malformations of newly hatched common carp larvae. *Electronic journal of polish agricultural universities* 3.
- Jeziarska B., Lugowska K. & Witeska M. (2009) The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). *Fish Physiol. Biochem.* 35, 625-40.
- JOCE (2004) Commission Directive 2004/73/EC, 29th time Council directive 67/548EEC. *Official Journal of the European Communities*.
- Johnson A., Carew E. & Sloman K.A. (2007) The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol.* 84, 431-8.
- Joseph P. (2009) Mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 272-9.
- Kamunde C., Grosell M., Higgs D. & Wood C.M. (2002) Copper metabolism in actively growing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): interactions between dietary and waterborne copper uptake. *J. Exp. Biol.* 205, 279-90.
- Karaytug S., Erdem C. & Cidik B. (2007) Accumulation of cadmium in the gill, liver, kidney, spleen, muscle and brain tissues of *Cyprinus carpio*. *Ekoloji* 16, 16-22.
- Kennedy C.J. & Law F.C.P. (1990) Toxicokinetics of selected polycyclic aromatic hydrocarbons in rainbow trout following different routes of exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 133-9.
- Kennedy C.J. & Farrell A.P. (2008) Immunological alterations in juvenile Pacific herring, *Clupea pallasii*, exposed to aqueous hydrocarbons derived from crude oil. *Environ. Pollut.* 153, 638-48.
- Kilemade M.F., Hartl M.G.J., Sheehan D., Mothersill C., van Pelt F., O'Halloran J. & O'Brien N.M. (2004) Genotoxicity of field-collected inter-tidal sediments from Cork Harbor, Ireland, to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) as measured by the Comet assay. *Environ. Mol. Mutag.* 44, 56-64.
- Kim Y. & Cooper K.R. (1999) Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in the embryos and newly hatched larvae of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 39, 527-38.
- King C.K., Gale S.A. & Stauber J.L. (2006) Acute toxicity and bioaccumulation of aqueous and sediment-bound metals in the estuarine amphipod *Melita plumulosa*. *Environ. Toxicol.* 21, 489-504.
- Kleinow K.M., James M.O., Tong Z. & Venugopalan C.S. (1998) Bioavailability and biotransformation of benzo(a)pyrene in an isolated perfused in situ catfish intestinal preparation. *Environ. Health Perspect.* 106, 155-66.
- Kocan R.M., Matta M.B. & Salazar S.M. (1996) Toxicity of weathered coal tar for shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*) embryos and larvae. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 161-5.
- Kollock R., Frank H., Seidel A., Meinel W. & Glatt H. (2008) Oxidation of alcohols and reduction of aldehydes derived from methyl- and dimethylpyrenes by cDNA-expressed human alcohol dehydrogenases. *Toxicology* 245, 65-75.
- Kosmehl T., Hallare A.V., Reifferscheid G., Manz W., Braunbeck T. & Hollert H. (2006) A novel contact assay for testing genotoxicity of chemicals and whole sediments in zebrafish embryos. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2097-106.

- Kosmehl T., Krebs F., Manz W., Braunbeck T. & Hollert H. (2007) Differentiation between bioavailable and total hazard potential of sediment-induced DNA fragmentation as measured by the comet assay with zebrafish embryos. *J. Soils Sed.* 7, 377-87.
- Kosmehl T., Hallare A.V., Braunbeck T. & Hollert H. (2008) DNA damage induced by genotoxicants in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after contact exposure to freeze-dried sediment and sediment extracts from Laguna Lake (The Philippines) as measured by the comet assay. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 650, 1-14.
- Krasnov A., Koskinen H., Rexroad C., Afanasyev S., Molsa H. & Oikari A. (2005) Transcriptome responses to carbon tetrachloride and pyrene in the kidney and liver of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 74, 70-81.
- Kumar P. & Singh A. (2010) Cadmium toxicity in fish: An overview. *GERF Bulletin of Biosciences* 1, 41-7.
- Kumaravel T.S., Vilhar B., Faux S.P. & Jha A.N. (2009) Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biol. Toxicol.* 25, 53-64.
- Kusch R.C., Krone P.H. & Chivers D.P. (2008) Chronic exposure to low concentrations of waterborne cadmium during embryonic and larval development results in the long-term hindrance of antipredator behavior in zebrafish. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 705-10.
- Kuster E. & Altenburger R. (2008) Oxygen Decline in Biotesting of Environmental Samples-Is There a Need for Consideration in the Acute Zebrafish Embryo Assay? *Environ. Toxicol.* 23, 745-50.
- L'Allemain G. (2006) Rôle des voies Wnt dans l'oncogénèse (*Role of the Wnt pathway in oncogenesis*). *Bulletin du Cancer* 93, 88-97.
- Lacoue-Labarthe T., Warnau M., Oberhänsli F., Teyssié J.L., Koueta N. & Bustamante P. (2008) Differential bioaccumulation behaviour of Ag and Cd during the early development of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Aquat. Toxicol.* 86, 437-46.
- Lacroix A. & Hontela A. (2004) A comparative assessment of the adrenotoxic effects of cadmium in two teleost species, rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and yellow perch, *Perca flavescens*. *Aquat. Toxicol.* 67, 13-21.
- Lag M., Westly S., Lerstad T., Bjornsrud C., Refsnes M. & Schwarze P.E. (2002) Cadmium-induced apoptosis of primary epithelial lung cells: Involvement of Bax and p53, but not of oxidative stress. *Cell Biol. Toxicol.* 18, 29-42.
- Lammer E., Carr G.J., Wendler K., Rawlings J.M., Belanger S.E. & Braunbeck T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 149, 196-209.
- Landrum P.F., Eadie B.J. & Faust W.R. (1992) Variation in the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons to the amphipod *Diporeia* (spp.) with sediment aging. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1197-208.
- Lapaquellerie Y., Jouanneau J.M., Maillet N. & Latouche C. (1995) Cadmium pollution in sediments of the Lot river (France). Estimate of the mass of cadmium. *Environ. Technol.* 16, 1145-54.
- Lee R.F. (2003) Photo-oxidation and Photo-toxicity of Crude and Refined Oils. *Spill Science and Technology Bulletin* 8, 157-62.
- Letellier M., Budzinski H., Bellocq J. & Connan J. (1999) Focused microwave-assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes from sediments and source rocks. *Org. Geochem.* 30, 1353-65.
- Li D., Lu C.L., Wang J., Hu W., Cao Z.F., Sun D.G., Xia H.F. & Ma X. (2009) Developmental mechanisms of arsenite toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquat. Toxicol.* 91, 229-37.
- Li J., Lock R.A.C., Klaren P.H.M., Swarts H.G.P., Stekhoven F., Bonga S.E.W. & Flik G. (1996) Kinetics of Cu<sup>2+</sup> inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Toxicol. Lett.* 87, 31-8.
- Li R., Zuo Z., Chen D., He C., Chen R., Chen Y. & Wang C. (2011a) Inhibition by polycyclic aromatic hydrocarbons of ATPase activities in *Sebastiscus marmoratus* larvae: Relationship with the development of early life stages. *Mar. Environ. Res.* 71, 86-90.
- Li Z.H., Li P. & Randak T. (2011b) Protective Roles of Calcium Channel Blocker Against Cadmium-Induced Physiological Stress in Freshwater Teleost *Oncorhynchus mykiss*. *Water, Air and Soil Pollution*, 1-7.
- Lippold H., Gottschalch U. & Kupsch H. (2008) Joint influence of surfactants and humic matter on PAH solubility. Are mixed micelles formed? *Chemosphere* 70, 1979-86.
- Lizardo-Daudt H.M. & Kennedy C. (2008) Effects of cadmium chloride on the development of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* early life stages. *J. Fish Biol.* 73, 702-18.
- Long E.R., Macdonald D.D., Smith S.L. & Calder F.D. (1995) Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environ. Manage.* 19, 81-97.

- Long E.R., Field L.J. & MacDonald D.D. (1998) Predicting toxicity in marine sediments with numerical sediment quality guidelines. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 714-27.
- LPO-Aquitaine (2004) Mise à jour des inventaires ZICO en Aquitaine. *Ligue pour la Protection des Oiseaux*.
- Lugowska K. & Witeska M. (2004) The effect of copper exposure during embryonic development on deformations of newly hatched common carp larvae, and further consequences. *Electronic journal of polish agricultural universities* 7.
- Lugowska K. (2007) The effect of cadmium and cadmium/copper mixture during the embryonic development of common carp larvae. *Electronic journal of polish agricultural universities* 10.
- Luoma S.N. & Rainbow P.S. (2005) Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Environmental Science and Technology* 39, 1921-31.
- MacDonald D.D., Carr R.S., Calder F.D., Long E.R. & Ingersoll C.G. (1996) Development and evaluation of sediment quality guidelines for Florida coastal waters. *Ecotoxicology* 5, 253-78.
- MacDonald D.D., Ingersoll C.G. & Berger T.A. (2000) Development and Evaluation of Consensus-Based Sediment Quality Guidelines for Freshwater Ecosystems. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 20-31.
- Machella N., Regoli F. & Santella R.M. (2005) Immunofluorescent detection of 8-oxo-dG and PAH bulky adducts in fish liver and mussel digestive gland. *Aquat. Toxicol.* 71, 335-43.
- Manaud F., Bouchet J.-M., Deltreil J.-P., Maurer D. & Trut G. (1997) Etude intégrée du Bassin d'Arcachon. *Documentation Ifremer*, Tome 1 à 5.
- Manzl C., Ebner H., Kock G., Dallinger R. & Krumschnabel G. (2003) Copper, but not cadmium, is acutely toxic for trout hepatocytes: short-term effects on energetics and ion homeostasis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 191, 235-44.
- Manzl C., Enrich J., Ebner H., Dallinger R. & Krumschnabel G. (2004) Copper-induced formation of reactive oxygen species causes cell death and disruption of calcium homeostasis in trout hepatocytes. *Toxicology* 196, 57-64.
- Marinkovic M., Verweij R.A., Nummerdor G.A., Jonker M.J., Kraak M.H.S. & Admiraal W. (2011) Life cycle responses of the midge *Chironomus riparius* to compounds with different modes of action. *Environmental Science and Technology* 45, 1645-51.
- Marty G.D., Cech Jr J.J. & Hinton D.E. (1990) Effect of incubation temperature on oxygen consumption and ammonia production by Japanese medaka, *Oryzias latipes*, eggs and newly hatched larvae. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 1397-403.
- Masson M., Blanc G. & Schafer J. (2006) Geochemical signals and source contributions to heavy metal (Cd, Zn, Pb, Cu) fluxes into the Gironde Estuary via its major tributaries. *Sci. Total Environ.* 370, 133-46.
- Masson M., Schafer J., Blanc G. & Pierre A. (2007) Seasonal variations and annual fluxes of arsenic in the Garonne, Dordogne and Isle Rivers, France. *Sci. Total Environ.* 373, 196-207.
- Mathew R., McGrath J.A. & Toro D.M.D. (2008) Modeling polycyclic aromatic hydrocarbon bioaccumulation and metabolism in time-variable early life-stage exposures. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1515-25.
- Matz C.J., Treble R.G. & Krone P.H. (2007) Accumulation and elimination of cadmium in larval stage zebrafish following acute exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66, 44-8.
- McElroy A.E., Farrington J.W. & Teal J.M. (1989) Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. In: *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*. Varanasi U (ed.), p. 40. CRC, Boca Raton, FL, USA.
- McElroy A.E., Bogler A., Weisbaum D., Norris M., Mendelman L.V., Setlow R. & Winn R. (2006) Uptake, metabolism, mutant frequencies and mutational spectra in [ $\lambda$ ] transgenic medaka embryos exposed to benzo[a]pyrene dosed sediments. *Mar. Environ. Res.* 62, S273-S7.
- McGeer J.C., Brix K.V., Skeaff J.M., DeForest D.K., Brigham S.I., Adams W.J. & Green A. (2003) Inverse relationship between bioconcentration factor and exposure concentration for metals: Implications for hazard assessment of metals in the aquatic environment. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 1017-37.
- McGeer J.C., Niyogi S. & Smith D.S. (sous presse) Cadmium. In: *Homeostasis and Toxicology of Non-Essential Metals*. Wood CM, Farrell AP & Brauner CJ (eds.). Elsevier Inc.
- Meinelt T., Playle R.C., Pietrock M., Burnison B.K., Wienke A. & Steinberg C.E.W. (2001) Interaction of cadmium toxicity in embryos and larvae of zebrafish (*Danio rerio*) with calcium and humic substances. *Aquat. Toxicol.* 54, 205-15.
- Meintieres S., Nesslany F., Pallardy M. & Marzin D. (2003) Detection of ghost cells in the standard alkaline comet assay is not a good measure of apoptosis. *Environ. Mol. Mutag.* 41, 260-9.

- Meteyer M.J., Wright D.A. & Martin F.D. (1988) Effect of cadmium on early developmental stages of the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Environ. Toxicol. Chem.* 7, 321-8.
- Mhadhbi L., Boumaiza M. & Beiras R. (2010) A standard ecotoxicological bioassay using early life stages of the marine fish *Psetta maxima*. *Aquat. Living Resour.* 23, 209-16.
- Michel P., Boutier B. & Chiffolleau J.F. (2000) Net fluxes of dissolved arsenic, cadmium, copper, zinc, nitrogen and phosphorus from the Gironde Estuary (France): Seasonal variations and trends. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 51, 451-62.
- Michibata H. (1981) Uptake and distribution of cadmium in the egg of the teleost, *Oryzias latipes*. *J. Fish Biol.* 19, 691-6.
- Michibata H., Sahara S. & Kojima M.K. (1986) Effects of calcium and magnesium ions on the toxicity of cadmium to the egg of the teleost, *Oryzias latipes*. *Environ. Res.* 40, 110-4.
- Middaugh D.P. & Dean J.M. (1977) Comparative sensitivity of eggs, larvae and adults of the estuarine teleosts, *Fundulus heteroclitus* and *Menidia menidia* to cadmium. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 17, 645-52.
- Minghetti M., Leaver M.J. & George S.G. (2010) Multiple Cu-ATPase genes are differentially expressed and transcriptionally regulated by Cu exposure in sea bream, *Sparus aurata*. *Aquat. Toxicol.* 97, 23-33.
- Mis J. & Bigaj J. (1997) Hatching glands of carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos from the eggs incubated at various concentrations of zinc or copper. *Polskie Archiwum Hydrobiologii* 44, 153-5.
- Mitchelmore C.L. & Chipman J.K. (1998) DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 399, 135-47.
- Monien B.H., Muller C., Bakhiya N., Donath C., Frank H., Seidel A. & Glatt H. (2009) Probenecid, an inhibitor of transmembrane organic anion transporters, alters tissue distribution of DNA adducts in 1-hydroxymethylpyrene-treated rats. *Toxicology* 262, 80-5.
- Monteiro S.M., dos Santos N.M.S., Calejo M., Fontainhas-Fernandes A. & Sousa M. (2009) Copper toxicity in gills of the teleost fish, *Oreochromis niloticus*: Effects in apoptosis induction and cell proliferation. *Aquat. Toxicol.* 94, 219-28.
- Morel Y., Mermod N. & Barouki R. (1999) An autoregulatory loop controlling CYP1A1 gene expression: Role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NFI. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6825-32.
- Morin B., Filatreau J., Vicquelin L., Barjhoux I., Guinel S., Leray-Forget J. & Cachot J. (2011) Detection of DNA damage in yolk-sac larvae of the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, by the comet assay. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 2235-42.
- Mouchet F., Baudrimont M., Gonzalez P., Cuenot Y., Bourdineaud J.P., Boudou A. & Gauthier L. (2006) Genotoxic and stress inductive potential of cadmium in *Xenopus laevis* larvae. *Aquat. Toxicol.* 78, 157-66.
- Mouneyrac C., Amiard J.C., Amiard-Triquet C., Cottier A., Rainbow P.S. & Smith B.D. (2002) Partitioning of accumulated trace metals in the talitrid amphipod crustacean *Orchestia gammarellus*: a cautionary tale on the use of metallothionein-like proteins as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 57, 225-42.
- Muijs B. & Jonker M.T.O. (2009) Temperature-dependent bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Technology* 43, 4517-23.
- Nagel R. (2002) DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* - a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex-Alternativen Zu Tierexperimenten* 19, 38-48.
- Nassef M., Kim S.G., Seki M., Kang I.J., Nano T., Shimasaki Y. & Oshima Y. (2010) *In ovo* nanoinjection of triclosan, diclofenac and carbamazepine affects embryonic development of medaka fish (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 79, 966-73.
- Nebeker A.V., Onjukka S.T., Cairns M.A. & Krawczyk D.F. (1986) Survival of *Daphnia magna* and *Hyalella azteca* in cadmium-spiked water and sediment. *Environ. Toxicol. Chem.* 5, 933-8.
- Neff J.M. (1979) *Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. Sources, fates and biological effects*. Applied science publishers Ltd., Ripples road, Barking, Essex, England.
- Nguyen L.T.H. & Janssen C.R. (2002) Embryo-larval toxicity tests with the African catfish (*Clarias gariepinus*): Comparative sensitivity of endpoints. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 256-62.
- Northcott G.L. & Jones K.C. (2000) Spiking hydrophobic organic compounds into soil and sediment: A review and critique of adopted procedures. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2418-30.
- Notar M., Leskovsek H. & Faganeli J. (2001) Composition, distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of the Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 36-44.



- Novak J., Benisek M. & Hilscherova K. (2008) Disruption of retinoid transport, metabolism and signaling by environmental pollutants. *Environ. Int.* 34, 898-913.
- OCDE (1992a) Fish, Acute Toxicity Test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, p. 9. Organization for Economic Cooperation and Development.
- OCDE (1992b) Section 2: Effects on Biotic systems test No. 210: Fish, Early-Life Stage Toxicity Test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, pp. 1-18. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- OCDE (1998) Section 2: Effects on Biotic systems test No. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, pp. 1-20. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- OCDE (2006) Draft Proposal for a New Guideline, Fish Embryo Toxicity (FET) Test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, pp. 1-11. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- OECD (1992) Section 2: Effects on Biotic systems test No. 210: Fish, Early-Life Stage Toxicity Test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, pp. 1-18. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- OECD (1998) Section 2: Effects on Biotic systems test No. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, pp. 1-20. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- Olive P.L. & Banath J.P. (1995) Sizing Highly Fragmented DNA in Individual Apoptotic Cells Using the Comet Assay and a DNA Crosslink Agent. *Exp. Cell Res.* 221, 19-26.
- Outridge P.M., MacDonald D.D., Porter E. & Cuthbert I.D. (1994) An evaluation of the ecological hazards associated with cadmium in the Canadian environment. *Environmental Reviews* 2, 91-107.
- Oxendine S.L., Cowden J., Hinton D.E. & Padilla S. (2006) Vulnerable windows for developmental ethanol toxicity in the Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 80, 396-404.
- Ozkan F., Gunduz S.G., Berkoz M. & Ozluer Hunt A. (2009) Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, following exposure to sublethal cadmium doses. *Turkish Journal of Zoology* 35, 585-92.
- Pancirov R.J. & Brown R.A. (1977) Polynuclear aromatic hydrocarbons in marine tissues. *Environ. Sci. Technol.* 11, 989-92.
- Pasteris A., Vecchi M., Reynoldson T.B. & Bonomi G. (2003) Toxicity of copper-spiked sediments to *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae): A comparison of the 28-day reproductive bioassay with a 6-month cohort experiment. *Aquat. Toxicol.* 65, 253-65.
- Paul-Pont I. (2010) Sensibilité et adaptation de populations de bivalves marins soumis à des stress multiples : infestation parasitaire, contamination microbienne et pollution métallique. *Biogéochimie et Ecosystèmes*, p. 358. Université Bordeaux 1, Bordeaux, France.
- Petersen G.I. & Kristensen P. (1998) Bioaccumulation of lipophilic substances in fish early life stages. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1385-95.
- Plus M., Maurer D., Stanisière J.-Y. & Dumas F. (2006) Caractérisation des composantes hydrodynamiques d'une lagune mésotidale, le Bassin d'Arcachon. *Rapport Ifremer RST/LER/AR/06.007*, p. 54.
- Prozialeck W.C., Edwards J.R., Nebert D.W., Woods J.M., Barchowsky A. & Atchison W.D. (2008) The vascular system as a target of metal toxicity. *Toxicol. Sci.* 102, 207-18.
- Revsbech N.P. (1989) An oxygen microelectrode with a guard cathode. *Limnol. Oceanogr.* 34, 472-6.
- Reynaud S., Duchiron C. & Deschaux P. (2003) 3-methylcholanthrene inhibits lymphocyte proliferation and increases intracellular calcium levels in common carp (*Cyprinus carpio* L). *Aquat. Toxicol.* 63, 319-31.
- Rhodes S., Farwell A., Hewitt L.M., MacKinnon M. & Dixon D.G. (2005) The effects of dimethylated and alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons on the embryonic development of the Japanese medaka. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 247-58.
- Riggio M., Filosa S., Parisi E. & Scudiero R. (2003) Changes in zinc, copper and metallothionein contents during oocyte growth and early development of the teleost *Danio rerio* (zebrafish). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 135, 191-6.
- Risso-de Faverney C., Devaux A., Lafaurie M., Girard J.P., Bailly B. & Rahmani R. (2001) Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygene species. *Aquat. Toxicol.* 53, 65-76.

- Risso-de Faverney C., Orsini N., de Sousa G. & Rahmani R. (2004) Cadmium-induced apoptosis through the mitochondrial pathway in rainbow trout hepatocytes: involvement of oxidative stress. *Aquat. Toxicol.* 69, 247-58.
- RNO (2006) Surveillance du Milieu Marin - Travaux du Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin - Edition 2006. (ed. by Ifremer), p. 56.
- Rodríguez-Cea A., Fernández de la Campa M.R., Sanz-Medel A., Paul W., Alan T. & Colin P. (2005) Cadmium. In: *Encyclopedia of Analytical Science*, pp. 315-23. Elsevier, Oxford.
- Roesijadi G. (1992) Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 22, 81-113.
- Roesijadi G. (1994) Metallothionein induction as a measure of response to metal exposure in aquatic animals. *Environ. Health Perspect.* 102, 91-5.
- Rolland R.M. (2000) A review of chemically-induced alterations in thyroid and vitamin A status from field studies of wildlife and fish. *J. Wildl. Dis.* 36, 615-35.
- Roman Y.E., De Schampelaere K.A.C., Nguyen L.T.H. & Janssen C.R. (2007) Chronic toxicity of copper to five benthic invertebrates in laboratory-formulated sediment: Sensitivity comparison and preliminary risk assessment. *Sci. Total Environ.* 387, 128-40.
- Rombough P.J. (1985) The influence of the zona radiata on the toxicities of zinc, lead, mercury, copper and silver ions to embryos of steelhead trout *Salmo gairdneri*. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* 82, 115-7.
- Ryan A.C., Van Genderen E.J., Tomasso J.R. & Klaine S.J. (2004) Influence of natural organic matter source on copper toxicity to larval fathead minnows (*Pimephales promelas*): Implications for the biotic ligand model. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1567-74.
- Safe S. (1993) Development of bioassays and approaches for the risk assessment of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds. *Environ. Health Perspect.* 101, 317-25.
- Sanchez W., Palluel O., Meunier L., Coquery M., Porcher J.M. & Ait-Aissa S. (2005) Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 177-83.
- Sandrini J.Z., Bianchini A., Trindade G.S., Nery L.E.M. & Marins L.F.F. (2009) Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair-related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells. *Aquat. Toxicol.* 95, 285-91.
- Sarnowski P. & Witeska M. (2008) The effects of Copper and Cadmium in single exposure or Co-exposure on growth of common carp (*Cyprinus Carpio* L.) Larvae. *Polish Journal of Environmental Studies* 17, 791-6.
- Schmidt C.K., Hoegberg P., Fletcher N., Nilsson C.B., Trossvik C., Hakansson H. & Nau H. (2003) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters the endogenous metabolism of all-trans-retinoic acid in the rat. *Arch. Toxicol.* 77, 371-83.
- Scott G.R., Sloman K.A., Rouleau C. & Wood C.M. (2003) Cadmium disrupts behavioural and physiological responses to alarm substance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 206, 1779-90.
- Shima A. & Mitani H. (2004) Medaka as a research organism: Past, present and future. *Mechanisms of Development* 121, 599-604.
- Shimada T. (2006) Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug metabolism and pharmacokinetics* 21, 257-76.
- Shinn C., Dauba F., Grenouillet G., Guenard G. & Lek S. (2009) Temporal variation of heavy metal contamination in fish of the river lot in southern France. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1957-65.
- Sidi S. & Rosa F.M. (2004) Mechanotransduction of hemodynamic forces regulates organogenesis. *M S-Medecine Sciences* 20, 557-61.
- Simpson S., Batley G., Chariton A., Stauber J., King C., Chapman J., Hyne R., Gale S., Roach A. & Maher W. (2005) Handbook for Sediment Quality Assessment. (ed. by CSIRO), Bangor, NSW, Australia.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R. & Schneider E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-91.
- Stalker M.J., Kirby G.M., Kocal T.E., Smith I.R. & Hayes M.A. (1991) Loss of glutathione S-transferases in pollution-associated liver neoplasms in white suckers (*Catostomus commersoni*) from Lake Ontario. *Carcinogenesis* 12, 2221-6.
- Sternecker K. & Geist J. (2010) The effects of stream substratum composition on the emergence of salmonid fry. *Ecol. Freshwat. Fish* 19, 537-44.

- Strady E., Blanc G., Baudrimont M., Baudrimont J., Schafer J., Robert S. & Lafon V. (2011) Roles of regional hydrodynamic and trophic contamination in cadmium bioaccumulation by Pacific oysters in the Marennes-Oleron Bay (France). *Chemosphere* 84, 80-90.
- Straus D.L. (2003) The acute toxicity of copper to blue tilapia in dilutions of settled pond water. *Aquaculture* 219, 233-40.
- Strecker R., Seiler T.-B., Hollert H. & Braunbeck T. (2011) Oxygen requirements of zebrafish (*Danio rerio*) embryos in embryo toxicity tests with environmental samples. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 153, 318-27.
- Strickland J.D.H. & Parsons T.R. (1972) *A practical handbook of seawater analysis*. Canada Bulletin, Ottawa.
- Sundberg H., Ishaq R., Akerman G., Tjarnlund U., Zebühr Y., Linderoth M., Broman D. & Balk L. (2005) A bio-effect directed fractionation study for toxicological and chemical characterization of organic compounds in bottom sediment. *Toxicol. Sci.* 84, 63-72.
- Sundberg H., Hanson M., Liewenborg B., Zebühr Y., Broman D. & Balk L. (2007) Dredging associated effects: Maternally transferred pollutants and DNA adducts in feral fish. *Environmental Science and Technology* 41, 2972-7.
- Sverdrup L.E., Nielsen T. & Krogh P.H. (2002) Soil ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in relation to soil sorption, lipophilicity, and water solubility. *Environmental Science and Technology* 36, 2429-35.
- Sybarval (2008) SCOT - Bassin d'arcachon Val de l'Eyre - Etat initial de l'environnement. *Rapport d'étude provisoire* Décembre 2008, 22.
- Templeton D.M., Ariese F., Cornelis R., Danielsson L.G., Muntau H., Van Leeuwen H.P. & Lobinski R. (2000) Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and Applied Chemistry* 72, 1453-70.
- Ten Hulscher T., Vrind B., Van den Heuvel H., Van Noort P. & Govers H. (2003) Influence of desorption and contact time on sediment-water distribution of spiked polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons: Relation with in situ distribution. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 1208-13.
- Teraoka H., Dong W., Ogawa S., Tsukiyama S., Okuhara Y., Niiyama M., Ueno N., Peterson R.E. & Hiraga T. (2002) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity in the zebrafish embryo: Altered regional blood flow and impaired lower jaw development. *Toxicol. Sci.* 65, 192-9.
- Teraoka H., Dong W., Okuhara Y., Lwasa H., Shindo A., Hill A.J., Kawakami A. & Hiraga T. (2006) Impairment of lower jaw growth in developing zebrafish exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and reduced hedgehog expression. *Aquat. Toxicol.* 78, 103-13.
- Thevenod F. (2009) Cadmium and cellular signaling cascades: To be or not to be? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 221-39.
- Thompson S., Budzinski H., LeMenach K., Letellier M. & Garrigues P. (2002) Multi-residue analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorobiphenyls, and organochlorine pesticides in marine sediments. *Anal. Bioanal. Chem.* 372, 196-204.
- Timme-Laragy A.R., Cockman C.J., Matson C.W. & Di Giulio R.T. (2007) Synergistic induction of AHR regulated genes in developmental toxicity from co-exposure to two model PAHs in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 85, 241-50.
- Topper J.N. & Gimbrone M.A. (1999) Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Mol. Med. Today* 5, 40-6.
- Tuikka A.I., Schmitt C., Hoss S., Bandow N., von der Ohe P.C., de Zwart D., de Deckere E., Streck G., Mothes S., van Hattum B., Kocan A., Brix R., Brack W., Barcelo D., Sormunen A.J. & Kukkonen J.V.K. (2011) Toxicity assessment of sediments from three European river basins using a sediment contact test battery. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 123-31.
- Turcotte D., Akhtar P., Bowerman M., Kiparissis Y., Brown R.S. & Hodson P.V. (2011) Measuring the toxicity of alkyl-phenanthrenes to early life stages of medaka (*Oryzias latipes*) using partition-controlled delivery. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 487-95.
- UE (2000) Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. pp. 1-72. *Official Journal of the European Communities*.
- UE (2001a) Décision N°2455/2001/CE du Parlement européen et du Conseil du 20 novembre 2001 établissant la liste des substances prioritaires dans le domaine de l'eau et modifiant la Directive 2000/60/CE. pp. 1-5. *Journal Officiel des Communautés européennes*.

- UE (2001b) Règlement (CE) N°466/2001 de la Commission du 8 mars 2001 portant sur la teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires. *L 77*, p. 13. *Journal Officiel des Communautés européennes*.
- UE (2004) Commission Directive 2004/73/EC of 29 April 2004 adapting to technical progress for the 29th time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. p. 308. *Official Journal of the European Union*.
- UE (2005a) Common implementation strategy for the Water Framework Directive: Environmental Quality Standards (EQS). *Substance datasheet - Priority substance No.28: Polycyclic Aromatic Compounds*. European Union, Brussels, Belgium.
- UE (2005b) Common implementation strategy for the Water Framework Directive: Environmental Quality Standards (EQS). *Substance datasheet - Priority substance No.6: Cadmiu mand its Compounds*. European Union, Brussels, Belgium.
- UE (2006) Règlement (CE) N°1907/2006 du Parlement européen et du Conseil concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CEE) n° 793/93 du Conseil et le règlement (CE) n° 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission. *CE N°1907/2006*, p. 849. *Journal officiel de l'Union européenne*.
- UE (2008) Directive 2008/105/CE du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau, modifiant abrogeant les directives du Conseil 82/176/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE, 86/280/CEE et modifiant la directive 2000/60/CE. pp. 1-14. *Journal Officiel de l'Union européenne*
- UE (2010) Directive 2010/36/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. *L 276*, p. 47. *Journal Officiel de l'Union européenne*.
- Valko M., Morris H. & Cronin M.T.D. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12, 1161-208.
- van der Oost R., Beyer J. & Vermeulen N.P.E. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.
- Van Kessel J.S., Reeves J.B. & Meisinger J.J. (1999) Storage and handling can alter the mineralization characteristics of manure. *Journal of Environmental Quality* 28, 1984-90.
- Varanasi U., Stein J.E. & Nishimoto M. (1987) Chemical carcinogenesis in feral fish: Uptake, activation, and detoxication of organic xenobiotics. *Environ. Health Perspect.* Vol. 71, 155-70.
- Varanasi U. & Stein J.E. (1991) Disposition of xenobiotic chemicals and metabolites in marine organisms. *Environ. Health Perspect.* 90, 93-100.
- Venkatesan B., Prabhu S.D., Venkatachalam K., Mummidi S., Valente A.J., Clark R.A., Delafontaine P. & Chandrasekar B. (2010) WNT1-inducible signaling pathway protein-1 activates diverse cell survival pathways and blocks doxorubicin-induced cardiomyocyte death. *Cell. Signal.* 22, 809-20.
- Viamajala S., Peyton B.M., Richards L.A. & Petersen J.N. (2007) Solubilization, solution equilibria, and biodegradation of PAH's under thermophilic conditions. *Chemosphere* 66, 1094-106.
- Vicquelin L. (2011) Caractérisation fine de la toxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques vis-à-vis des embryons et larves de medaka japonais, *Orizias latipes*. Contribution à l'évaluation des risques environnementaux associés à la pollution chimique des sédiments de l'estuaire de Seine. *Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement*, p. 319. Université du Havre, Le Havre.
- Vicquelin L., Leray-Forget J., Peluhet L., LeMenach K., Deflandre B., Anschutz P., Etcheber H., Morin B., Budzinski H. & Cachot J. (2011) A new spiked sediment assay using embryos of the Japanese medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. *Aquat. Toxicol.* 105, 235-45.
- Vosyliene M.Z., Kazlauskienė N. & Svecevičius G. (2003) Effect of a heavy metal model mixture on biological parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Environmental Science and Pollution Research* 10, 103-7.
- Waisberg M., Joseph P., Hale B. & Beyersmann D. (2003) Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192, 95-117.

- Wang M.H. & Wang G.Z. (2010) Oxidative damage effects in the copepod *Tigriopus japonicus* Mori experimentally exposed to nickel. *Ecotoxicology* 19, 273-84.
- Wang R., Wang X.T., Wu L.Y. & Mateescu M.A. (1999) Toxic effects of cadmium and copper on the isolated heart of dogfish shark, *Squalus acanthias*. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A* 57, 507-19.
- Wang Y.D., Fang J., Leonard S.S. & Rao K.M.K. (2004) Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radical Biol. Med.* 36, 1434-43.
- Wassenberg D.M. & Di Giulio R.T. (2004) Synergistic embryotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon aryl hydrocarbon receptor Agonists with cytochrome P4501A inhibitors in *Fundulus heteroclitus*. *Environ. Health Perspect.* 112, 1658-64.
- Wassenberg D.M., Nerlinger A.L., Battle L.P. & Di Giulio R.T. (2005) Effects of the polycyclic aromatic hydrocarbon heterocycles, carbazole and dibenzothiophene, on *in vivo* and *in vitro* CYP1A activity and polycyclic aromatic hydrocarbon-derived embryonic deformities. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2526-32.
- Welsh P.G., Lipton J., Chapman G.A. & Podrabsky T.L. (2000) Relative importance of calcium and magnesium in hardness-based modification of copper toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1624-31.
- Wessel N., Santos R., Menard D., Le Menach K., Buchet V., Lebayon N., Loizeau V., Burgeot T., Budzinski H. & Akcha F. (2010) Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*). *Mar. Environ. Res.* 69, S71-S3.
- Wheaton W.W. & Chandel N.S. (2011) Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 300, C385-C93.
- White P.A., Robitaille S. & Rasmussen J.B. (1999) Heritable reproductive effects of benzo[a]pyrene on the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1843-7.
- Wilson R.W. & Taylor E.W. (1993) The physiological responses of freshwater rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during acutely lethal copper exposure. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 163, 38-47.
- Winn R.N., Norris M.B., Brayer K.J., Torres C. & Muller S.L. (2000) Detection of mutations in transgenic fish carrying a bacteriophage  $\lambda$  cII transgene target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 12655-60.
- Winter M.J., Day N., Hayes R.A., Taylor E.W., Butler P.J. & Chipman J.K. (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 - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552, 163-75.
- Wirgin I. & Waldman J.R. (1998) Altered gene expression and genetic damage in North American fish populations. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 399, 193-219.
- Wittbrodt J., Shima A. & Schartl M. (2002) Medaka - A model organism from the Far East. *Nature Reviews Genetics* 3, 53-64.
- Wolz J., Engwall M., Maletz S., Takner H.O., van Bavel B., Kammann U., Klempt M., Weber R., Braunbeck T. & Hollert H. (2008) Changes in toxicity and Ah receptor agonist activity of suspended particulate matter during flood events at the rivers Neckar and Rhine - a mass balance approach using *in vitro* methods and chemical analysis. *Environmental Science and Pollution Research* 15, 536-53.
- Wong C.K.C. & Wong M.H. (2000) Morphological and biochemical changes in the gills of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. *Aquat. Toxicol.* 48, 517-27.
- Woo S., Son S.H., Park H.S., Vulpe C.D., Ryu J.C. & Yum S. (2008) Differentially Expressed Genes in Marine Medaka Fish (*Oryzias javanicus*) Exposed to Cadmium. *Molecular & Cellular Toxicology* 4, 293-9.
- Worms I., Simon D.F., Hassler C.S. & Wilkinson K.J. (2006) Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake. *Biochimie* 88, 1721-31.
- Yadav K.K. & Trivedi S.P. (2009a) Chromosomal aberrations in a fish, *Channa punctata* after *in vivo* exposure to three heavy metals. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 678, 7-12.
- Yadav K.K. & Trivedi S.P. (2009b) Sublethal exposure of heavy metals induces micronuclei in fish, *Channa punctata*. *Chemosphere* 77, 1495-500.
- Yamamoto T. (1975) Medaka (Killifish): Biology and Strains. (ed. by Yamamoto T), p. 365. Keigaku Pub. Co., Tokyo. <http://www.bio.nagoya-u.ac.jp:8000/Yamabook.html>.

- Yoon J.H., Lee C.S. & Pfeifer G.P. (2003) Simulated sunlight and benzo[a]pyrene diol epoxide induced mutagenesis in the human p53 gene evaluated by the yeast functional assay: lack of correspondence to tumor mutation spectra. *Carcinogenesis* 24, 113-9.
- You L., He B., Uematsu K., Xu Z., Mazieres J., Lee A., McCormick F. & Jablons D.M. (2004) Inhibition of Wnt-1 signaling induces apoptosis in beta-catenin-deficient mesothelioma cells. *Cancer Res.* 64, 3474-8.
- Yunker M.B., Macdonald R.W., Vingarzan R., Mitchell R.H., Goyette D. & Sylvestre S. (2002) PAHs in the Fraser River basin: A critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Org. Geochem.* 33, 489-515.
- Zalups R.K. & Ahmad S. (2003) Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 186, 163-88.
- Zeilstra J., Joosten S.P.J., Wensveen F.M., Dessing M.C., Schutze D.M., Eldering E., Spaargaren M. & Pals S.T. (2011) WNT signaling controls expression of pro-apoptotic BOK and BAX in intestinal cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 406, 1-6.
- Zhang L.H., Xu C.B., Chen Z.L., Li X.M. & Li P.J. (2010) Photodegradation of pyrene on soil surfaces under UV light irradiation. *J. Hazard. Mater.* 173, 168-72.
- Zhao Q., Li P., Stagnitti F., Ye J., Dong D., Zhang Y. & Li P. (2009) Effects of aging and freeze-thawing on extractability of pyrene in soil. *Chemosphere* 76, 447-52.

---

# *ANNEXES*

---





---

# *Annexe 1*

---

## **Detection of DNA damage in yolk-sac larvae of the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, by the comet assay**

*Bénédicte Morin, Julien Filatreau, Ludovic Vicquelin, Iris Barjhoux, Sylvain Guinel,  
Joelle Leray-Forget & Jérôme Cachot*

Published in Analytical & Bioanalytical Chemistry (2011) 399:2235-42: DOI 10.1007/s00216-010-4602-y



## Detection of DNA damage in yolk-sac larvae of the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, by the comet assay

Bénédicte Morin · Julien Filatreau · Ludovic Vicquelin · Iris Barjhoux · Sylvain Guinel · Joëlle Leray-Forget · Jérôme Cachot

Received: 22 July 2010 / Revised: 19 November 2010 / Accepted: 13 December 2010 / Published online: 9 January 2011  
 # Springer-Verlag 2011

**Abstract** This study was set up to determine the suitability of the early life stage (ELS) alkaline comet assay for the detection of DNA strand breaks induced by genotoxicants in whole organism. This assay was performed on cells of medaka 2 days posthatch (dph). An efficient procedure for cell dissociation using enzymatic and mechanical digestion was developed. This protocol ensures 80% viability of cells and low DNA damage background. Cells from 2 dph medaka larvae were exposed *in vitro* to model genotoxicants, hydrogen peroxide, cadmium, and fluoranthene, followed by comet assay analysis. Results show a significant increase in the percentage of DNA damage of dissociated cells by all the tested compounds when compared to controls. The assay was also performed *in vivo* on medaka larvae (2 dph) exposed for 24 h to waterborne cadmium or fluoranthene. Significant induction of DNA damage levels were observed following larvae exposure to cadmium and fluoranthene at concentrations of 0.1 and 50  $\mu\text{M}$ , respectively. This study demonstrates that cells of embryo life stage medaka respond to known DNA damaging agents and that the ELS comet assay may be a useful biomarker to detect DNA strand breakage in whole body of pluricellular organism induced by a range of agents. This technique may provide a sensitive,

nonspecific endpoint of genotoxicity as part of ELS toxicity test.

**Keywords** DNA damage · Medaka larvae · Early life-stage (ELS) · Comet assay

### Introduction

Numerous studies have shown that the fish embryo toxicity test [1, 2] is an attractive test system that could be an alternative to the conventional acute fish test [3, 4]. Early life stage (ELS) toxicity tests have been recommended for toxicity assessment of chemicals or environmental samples [5–7]. Embryos and/or larvae have consistently been shown to be the most sensitive life stage of a variety of fish species to chemical stressors [8]. In addition, fish embryos are usually easy to produce and to take care of. Finally, embryos and eleutheroembryos (sac fry) are not regulated by the EU legislation concerning animal health and welfare (European Council Directive 86/609/EEC). Within this context, it appears reasonable to search for possibilities to incorporate additional endpoints such as genotoxicity. The aim of this study was then to develop an early marker of genotoxicity in parallel to lethal and embryonic larval development endpoints. The comet assay [9] is one of the most commonly used techniques to detect DNA strand breaks in fish cells. This method detects single- and/or double-strand breaks as well as alkali labile sites and excision/repair or single strand DNA damage in the process of the repair mechanism. The available literature on the application of the comet assay on whole embryos or larvae is scarce. Most of the studies were focused on the zebrafish *Danio rerio* [2, 10–13]. One study has monitored DNA breakage in embryonic stages of the African catfish *Clarias*

B. Morin (\*) · J. Filatreau · L. Vicquelin · I. Barjhoux · S. Guinel · J. Cachot  
 Institute of Molecular Sciences (ISM), University Bordeaux 1,  
 UMR 5255 CNRS, Group LPTC,  
 33405 Talence Cedex, France  
 e-mail: b.morin@ism.u-bordeaux1.fr

L. Vicquelin · J. Leray-Forget  
 Laboratory of Ecotoxicology (LEMA), University of Le Havre,  
 UPRES EA 3222, IFRMP 23,  
 76058 Le Havre Cedex, France

garipepinus exposed to lead nitrate [14]. The Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) serves as an excellent fish model for early life-stage tests for the following reasons: (1) easily cultured in the laboratory and small; and (2) under proper conditions females produce eggs daily [15]. Medaka offer several advantages for developmental toxicity testing, including high sensitivity of early life stages to various toxicants, rapid embryonic development and a clear chorion allowing observation, without damage, of the developing embryo under a light microscope. Finally, the embryological and larval stages of medaka development have already been well documented [16].

Thus, the objective of the present study was to examine the suitability of the ELS comet assay for the detection of DNA strand breaks induced by various genotoxicants hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), cadmium ( $CdCl_2$ ), and fluoranthene (Flu) in the whole body of medaka and then to include this biomarker as a nonspecific endpoint of genotoxicity in ELS toxicity test.

## Materials and methods

### Chemicals

General reagents and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France) unless otherwise specified.

### Fish care and medaka yolk-sac larvae production

Adults medaka were maintained in static 40 l tanks containing one third of dechlorinated tap water and two thirds of purified water by reverse osmosis with the following characteristics: temperature, 26 °C; pH 7.5; hardness, 54 mg/L  $CaCO_3$ ; 16/8-h light/dark photoperiod and a density of one fish per liter with a sex ratio of 1:2. Ammonia, nitrite and nitrate were kept in the range of 0–0.1, 0.025–0.05, and 0–10 mg/L, respectively. Dechlorinated water was renewed (30%) every 3 days. Medaka were fed three times a day, once with *Artemia* sp. nauplii and twice with dry food (tetraMin Tropical, TetraSale, Blacksburg, Virginia). Egg collection was performed 2 h after the beginning of the day for 2 h. Females were isolated and egg rosaries were removed from their belly. Rosaries were placed in homemade egg rearing solution (ERS—NaCl 85.6 mM, KCl 0.4 mM,  $CaCl_2$  0.4 mM, and  $MgSO_4$  1.4 mM). Eggs were then isolated from each other and unfertilized and unsynchronized eggs were removed. They were then maintained in ERS in a thermostated chamber (Snijders Scientific, Tilburg, Netherlands) in the same condition than adults until day 10. Dead embryos were removed daily. Hatched animals at day 10 were placed

in stalling water in the thermostated chamber for 2 days. Yolk-sac larvae were not fed. Supernumerary animals were euthanized in MS222 solution (Tricaine methanesulfonate).

### Acute toxicity

Two days after hatching, 20 larvae were placed in a 50-mL reaction tube containing 15 mL stalling water and exposed to various concentration of  $CdCl_2$  (0.1, 1, 10, and 100  $\mu M$ ) or Flu (2, 10 and 50  $\mu M$ ) for 24 h at 26 °C in the dark. Flu was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to a final concentration of 0.5% in the reaction tube. Control larvae were treated in the same way but received only 0.5% DMSO. Three replicates were performed for each condition tested.

Dead larvae were counted after 24 h. Lethal concentrations  $LC_{50}$  and  $LC_{10}$  after 24 h was calculated by PRISM 5 software (GraphPad Software, California, USA).

### In vivo exposure of medaka yolk-sac larvae

Two days after hatching, 20 larvae were placed in a 50-mL reaction tube containing 15 mL stalling water and exposed to various concentration of  $CdCl_2$  (0.03, 0.1, 0.3, and 1  $\mu M$ ) or Flu (2, 10, and 50  $\mu M$ ) for 24 h at 26 °C in the dark. Flu was dissolved in DMSO to a final concentration of 0.5% in the reaction tube. Control larvae were treated in the same way but received only 0.5% DMSO. Three replicates were performed for each condition tested. After exposure, larvae were transferred to clean water and the cell isolation was performed.

### Cell isolation

Cells for the comet assay were isolated from the whole body medaka larvae. For each preparation, groups of five 2 dph larvae were anesthetized on ice. Larvae were transferred to petri dishes, gently minced using disposable scalpels. Sections of tissues were then placed in 2-mL reaction tubes containing 1 mL 1.25% (w/v) collagenase (collagenase from *Clostridium histolyticum* type IV; Sigma Aldrich) in minimum essential medium (MEM, Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and incubated at 37 °C for 45 min with gentle shaking. After centrifugation at 100×g for 10 min at room temperature, the pellet containing the cells was washed with 200  $\mu L$  of MEM. Enzymatic cells dissociation was completed by vigorous mechanical up and down of the cells suspension with a pipette. The cells were subjected to another centrifugation at 100×g for 10 min at room temperature and the supernatant was removed. Depending on its size, the resulting pellet was resuspended in 30 to 150  $\mu L$  MEM to immediately conduct the alkaline comet assay (for the in vivo experiment) or to

400  $\mu\text{L}$  MEM to perform the *in vitro* exposure. The described protocol revealed an efficient cell dissociation of the larvae tissues with resulting cell concentration between 5 and  $10 \times 10^5$  cells/mL with high cells viability. Optimisation of enzymatic cells isolation protocol was performed (data not shown) using various incubation times (15, 30, 45, and 60 min) and/or trypsin digestion instead of collagenase. These modifications resulted in insufficient cell yield or in high level of dead cells and therefore were not selected in our study. The best conditions (45-min incubation with collagenase) were selected and used in our protocol as described above.

Cell viability was measured by trypan blue exclusion and comet assay experiments were only carried out with cell suspension preparations of >80% cell viability.

#### *In vitro* exposure using dissociated medaka cells

Freshly dissociated medaka cells (pool of five 2 dph larvae; i.e., about  $2 \times 10^5$  cells) were treated *in vitro* with 1, 10, and 100  $\mu\text{M}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 0.03, 0.1, 0.3, and 1  $\mu\text{M}$  of  $\text{CdCl}_2$  in 400  $\mu\text{L}$  of MEM medium at room temperature for 30 min in darkness to prevent UV-induced damage and photooxidation [17]. For the control, isolated cells without the addition of the contaminant solution but incubated in the same conditions were used. Flu was dissolved in DMSO and added to the medium at concentrations of 2, 10, and 50  $\mu\text{M}$ . The final concentration of DMSO in the medium was 0.5%. The controls received the same amount of DMSO. The cells were exposed to Flu at room temperature in the dark for 1 h. After exposure, 1 mL of MEM medium was added and the cells were pelleted by gentle centrifugation ( $100 \times g$ ) for 10 min. The cell pellet was resuspended in MEM at a final cell density of  $10^6$  cells/ml.

#### Alkaline comet assay

The comet assay was conducted following the procedure described by Singh et al. [9] with slight modifications. Fully frosted slides were precoated by dipping in a solution of 1% normal melting point agarose in distilled water and drying; 20  $\mu\text{L}$  of cell suspension (about 20,000 cells) was added to 80  $\mu\text{L}$  of 1% low melting point agarose (LMPA) and two gels of 50  $\mu\text{L}$  were laid down on a precoated slide and covered with a  $18 \times 18$  mm glass coverslip. Gels were left to set at 4  $^\circ\text{C}$  for 5 min. The coverslip were then gently slid off and a third layer of 50  $\mu\text{L}$  of 1% LMPA without cells was applied as before. After removal of the coverslips, the slides were placed in a freshly prepared lysing solution at 4  $^\circ\text{C}$  for 1 h (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 0.01 M Tris; pH set to 10 with NaOH). One percent of Triton X-100 was added to the lysing solution before used. The slides were drained of lysing solution, placed on a

horizontal gel electrophoresis tray and covered with freshly made electrophoresis buffer (0.3 M NaOH, 1 mM EDTA; pH>13) for 15 min to allow the DNA to unwind. Electrophoresis was carried out at 25 V, 300 mA for 15 min. After electrophoresis, the slides were placed on a staining tray and covered with neutralising solution (0.4 M Tris; pH=7.5) for 5 min at 4  $^\circ\text{C}$  and repeated three times. They were then drained and dehydrated in absolute ice-cold ethanol for 20 min and left at room temperature to dry. The prepared slides were stained with 20  $\mu\text{L}$  of ethidium bromide (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and were analyzed at  $\times 400$  magnification using an Olympus epi-fluorescent microscope equipped with an excitation filter of 515–560 nm, a barrier filter of 590 nm, and a grayscale CCD camera (Zeiss, Germany) and the Komet 5.5 software (Kinetic Imaging, Liverpool, UK). DNA damage was expressed as percentage tail DNA, which is the percentage of DNA that has migrated from the head [18], and 150 randomly selected nucleoids were analyzed on two replicated gels. The damaged DNA appears in the form of a comet shape nucleus and the undamaged form appears as a round shape nucleus. Heavily damaged cells exhibiting a specific microscopic image (commonly referred to as hedgehogs or ghost cells) consisting of small or non-existent head and large and diffuse tail (potentially represent dead or dying cells) are considered to be apoptotic or necrotic cells as previously described [19]. These cells were excluded from data collection.

#### Statistical analysis

A total of 450 nuclei per treatment were analyzed i.e., 75 nuclei per gel; two gels per replicate; three replicates per condition. The significance of the mean average differences of percentage of tail DNA between various experimental groups was determined by one-way analysis of variance. If significant differences were found then treatments were compared with controls using post hoc Dunnett's test. The Levene's test was applied to check the equality of variances. Significance was accepted when  $p < 0.05$ . All statistical analyses were conducted with Statistica 7.1 (StatSoft, France). The lowest observed-effect concentration (LOEC) was determined as the lowest tests concentration, which caused significant DNA damage compared with the corresponding control.

## Results

### *In vitro* exposure

DNA damage (expressed as % tail DNA) in the control is low and relatively constant ( $5.4 \pm 1.4\%$ ).

2238

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure

The highest induction of DNA strand breaks was observed after cells exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as shown by the significant elevation of percent tail DNA over the control at all the doses investigated. This chemical is widely used as a model compound in mutagenic studies or as a positive control in comet assay studies [9, 20, 21]. Figure 1a shows the concentration-dependent increase in percent tail DNA after exposure of isolated cells from larvae to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The lowest concentration studied (1 μM) led to a significant increase in DNA strand breaks compared with the control. Exposure to 100 μM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> led to a three- to fourfold increase in comparison to negative control.

### CdCl<sub>2</sub> exposure

CdCl<sub>2</sub> exposure led to a moderate but significant DNA damage induction in the cells of medaka larvae at the highest dose investigated (Fig. 1b).

### Fluoranthene exposure

Only the highest Flu concentration (50 μM) caused an increase in DNA strand breaks relative to controls (Fig. 1c).

### In vivo exposure

The background level of DNA damage in non exposed larvae is low and the response variability between replicates is low (4.2±1.2%)

### Acute toxicity

A wide range of concentrations of contaminant (CdCl<sub>2</sub> and Flu) was first used in order to choose the highest non lethal concentration required to conduct the comet assay properly. No sign of acute toxicity was observed for medaka larvae exposed to fluoranthene whatever the dose (2, 10, and 50 μM). In contrast, dose-dependent increase of mortality of 10%, 80%, and 100% was observed for larvae exposed to 1, 10, and 100 μM of CdCl<sub>2</sub>, respectively. Calculated LC<sub>50</sub> and LC<sub>10</sub> 24-h values of CdCl<sub>2</sub> was 4.5 and 1 μM, respectively. The LC<sub>10</sub> was chosen as the maximal for genotoxicity analysis.

### Exposure to CdCl<sub>2</sub>

Higher value of DNA strand breaks were observed for all the cadmium exposed groups compared with control. However, significant differences were obtained only for 0.1 and 1 μM CdCl<sub>2</sub> exposed groups (p<0.05) (Fig. 2a).

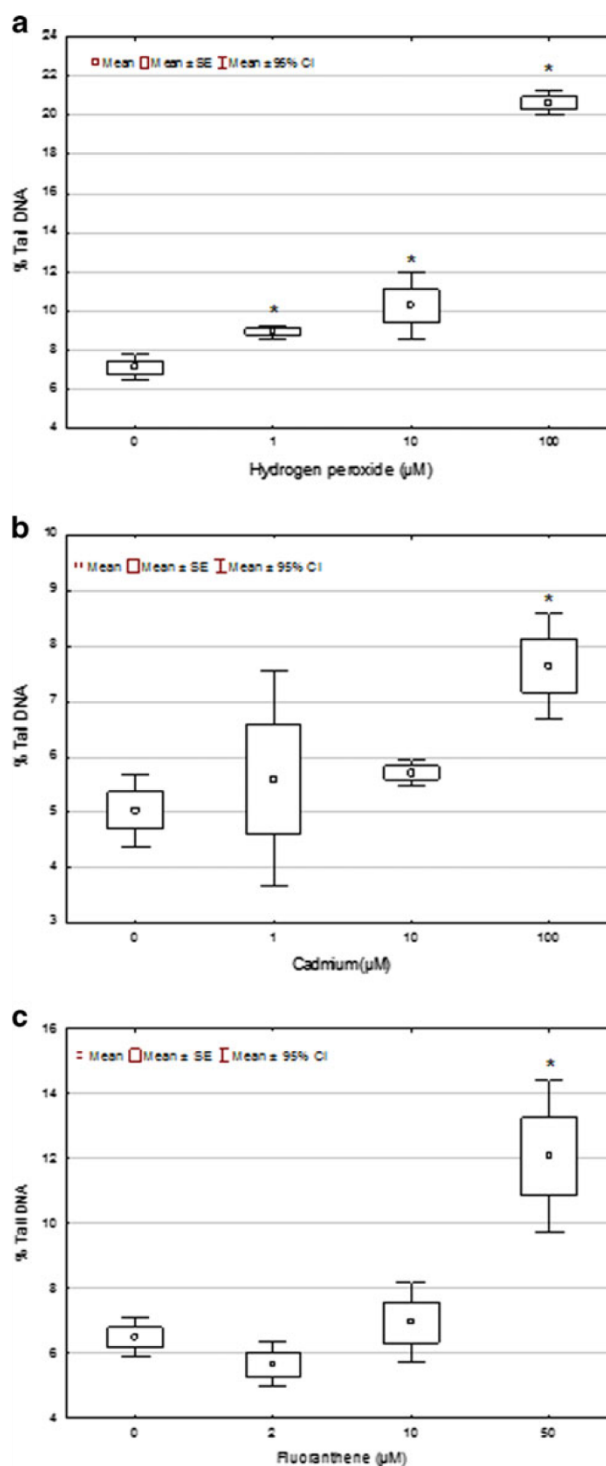


Fig. 1 DNA strand breaks (% tail DNA) in dissociated cells from medaka larvae exposed in vitro to a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, b CdCl<sub>2</sub>, or c Flu (n=3 replicates/450 nuclei). \*p<0.05, significantly different from control (Dunnett's test)

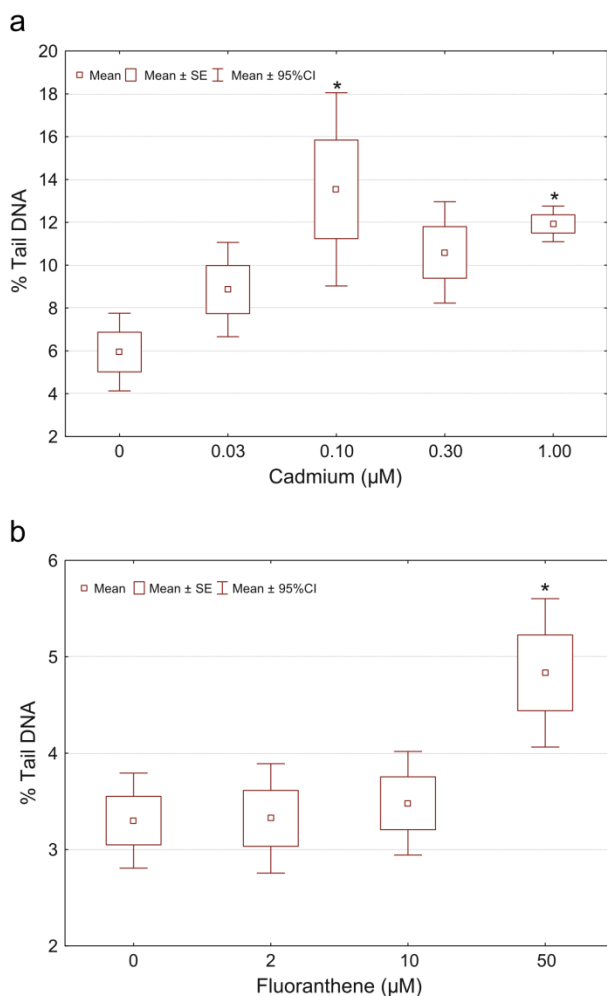


Fig. 2 DNA strand breaks (% tail DNA) in 2 dph medaka larvae exposed for 24 h to a  $\text{CdCl}_2$ , or b Flu ( $n=3$  replicates/450 nuclei) \* $p<0.05$ , significantly different from control (Dunnett's test)

#### Exposure to fluoranthene

Only the highest Flu concentration (50  $\mu\text{M}$ ) caused an increase in DNA strand breaks relative to controls (Fig. 2b).

#### Discussion

In the present work, the comet assay was successfully applied to ELS of medaka. To our knowledge it is the first attempt to measure the effect of genotoxins in dissociated cells of whole medaka larvae.

Comet assay performs on ELS organisms instead of cells culture or dissociated cells from an adult organism tissue has many advantages (1) the test is performed on a multicellular organism and gives an integrated genotoxicity response taking into account the toxicokinetic of the

compound at the organism scale and possible repair of certain DNA damage; (2) the test is performed at an early stage of development when cell growth is at the maximum and the repair systems are less efficient (3) embryos or sac fry are not concerned by the EU regulation concerning animal health and welfare.

The recent adoption and implementation of the REACH legislation promotes non-animal testing and alternative strategies. The fish embryo toxicity test has been proposed as an animal alternative method and in this context it will be important to have additional endpoint beyond simple lethality and developmental or phenotypic responses.

Single cells or single nuclei are needed for the comet assay, thus an isolation technique that does not injure DNA is required. Cell viability, as determined by the trypan blue exclusion test, was consistently above 80% and DNA damage in control cell did not exceeded 6% DNA in tail, indicating that the enzymatic and mechanical cell isolation procedure described herein has a minimal effect on cell survival and DNA integrity, at least in the short term. In this study, we did not measure and cannot estimate the contribution of apoptosis to the effects we observed. An important issue when performing the comet assay is to distinguish severely damage cells from apoptotic cells. Although it was recommended by the IWGT working group to record the apoptotic cells frequency [22], the standard alkaline comet assay as used in this study was shown to be not suitable to evaluate apoptosis [23]. To obtain a reliable estimation of apoptotic cells, a specific test called the neutral "DNA diffusion" assay [24] has to be performed. However, in the microscopic images, headless and teardrop-shaped comets were observed mainly for in vitro experiments at high concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $61\pm 11\%$  hedgehogs) or fluoranthene ( $62\pm 3\%$  hedgehogs) which suggests the cytotoxicity (necrosis) or apoptosis caused by these compounds to contribute to DNA fragmentation induced at these high concentrations.

Since the period of exposure to alkali buffer is important for detecting DNA damage [25], we preliminarily evaluated the DNA integrity induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  with alkali treatment for 10, 15, and 20 min at 4 °C (data not shown). As a result, we found that an adequate alkali treatment time for all dissociation of 2 dph medaka larvae was 15 min, because the percent tail DNA was low (4.9%) in the control group and increased concentration dependently (4.9%, 8.9%, 10.2%, and 20.6% at a concentration of 0, 0.1, 10, and 100  $\mu\text{mol/L}$ , respectively).

The comet assay performs on the whole organism is expected to give a high intra-individual variability due to the presence of different cell type. This could limit the statistical power and then the sensitivity of the analysis. In another hand, the significant advantage when performing a test with a whole-body organism is to obtain an integrated

medaka and indeed if they are capable of metabolizing fluoranthene to genotoxic metabolites, although it has been shown that the cellular machinery necessary for xenobiotic metabolism in fish is both present and inducible at early stage of development [42]. Using multi-photon laser-scanning microscopy, Hornung and coworkers have described Flu distribution among tissues in medaka ELS. They suggested that upon entering the liver, the Flu was transferred to the biliary system. But it was unknown whether the fluorescence signal was in part contributed by metabolites [45]. In this study, we observed that Flu induced significant increase in DNA strand breaks at the highest investigated dose for both in vitro and in vivo studies. In in vitro Flu exposure, percent tail DNA in 50  $\mu\text{M}$  exposed group increased compared with the control group. However, percent tail DNA of the 50  $\mu\text{M}$  Flu exposure in vitro was higher than those of cells from medaka exposed to 50  $\mu\text{M}$  Flu for 1 day in vivo (Figs. 1 and 2). The results indicate that the in vitro comet assay could be more sensitive for this type of compound than the in vivo system for short-term exposure experiments. Recently, Woo et al. [46] reported significant DNA damage induction in flounder blood cells exposed in vitro for 2 h to 0.25  $\mu\text{M}$  of Flu. The lower sensitivity of medaka larvae towards Flu can be explained by a less efficient metabolizing system in early life stage than in adult. Nevertheless, these data strongly suggested that medaka cells in vitro and in vivo are able to metabolizing Flu and to induce genotoxic effect either through the production of genotoxic metabolites or/and through the generation of reactive oxygen species [47].

## Conclusions

This study demonstrates that the ELS comet assay can be used successfully to detect DNA damage in isolated cells from whole larvae and can be easily associated with an ELS test. Our results provide the first description of the use of the comet assay to detect DNA damage in early life stage of medaka cells. Future experiments will be conducted to assess the genotoxicity not only of well-defined chemicals towards medaka but mixture of pollutants and also environmental samples. The combination of the comet assay with a new bioassay developed to assess toxicity of bioavailable pollutants in sediment will be investigated. This assay consists of direct exposure of embryos of the Japanese medaka *O. latipes* to artificially or naturally contaminated sediments. The acute ELS toxicity test associated with a genotoxicity test can then be performed with no additional animals required. Beyond toxicity assessment of chemicals, the ELS comet assay could also bring insights about the mode of action of chemicals.

**Acknowledgments** This study was supported by the GIP Seine-Aval, Haute-Normandie, and Aquitaine regions.

## References

1. Sun LW, Qu MM, Li YQ, Wu YL, Chen YG, Kong ZM, Liu ZT (2004) Toxic effects of aminophenols on aquatic life using the zebrafish embryo test and the comet assay. *Bull Environ Contam Toxicol* 73:628–634
2. Kosmehl T, Hallare AV, Reifferscheid G, Manz W, Braunbeck T, Hollert H (2006) A novel contact assay for testing genotoxicity of chemicals and whole sediments in zebrafish embryos. *Environ Toxicol Chem* 25:2097–2106
3. Lange M, Gebauer W, Markl J, Nagel R (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to acute fish test. *Chemosphere* 30:2087–2102
4. Lammer E, Carr GJ, Wendler JM, Rawlings JM, Belanger SE, Braunbeck T (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp Biochem Physiol C* 149:196–209
5. OECD (1992) OECD guidelines for the testing of chemicals. Section 2: effects on biotic systems test no. 210: fish, early-life stage toxicity test. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris
6. Nagel R (2002) DarT: the embryo test with the zebrafish *danio rerio*—a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX* 19:38–48
7. Braunbeck T, Bottcher T, Hollert H, Kosmehl T, Lammer E, Leist E, Rudolf M, Seitz N (2005) Towards an alternative for the acute fish  $\text{LC}_{50}$  test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species—an update. *ALTEX* 22:87–102
8. McKim JM (1985) Early life stage toxicity tests. In: Rand GM, Petrocelli SR (eds) *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*. Hemisphere Publishing Corporation, New York
9. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184–191
10. Jarvis RB, Knowles JF (2003) DNA damage in zebrafish larvae induced by exposure to low-dose rate  $\gamma$ -radiation: detection by the alkaline comet assay. *Mutat Res* 541:63–69
11. Kammann U, Biselli S, Huhnerfuss H, Reineke N, Theobald N, Vobach M, Wosniok W (2004) Genotoxic and teratogenic potential of marine sediment extracts investigated with comet assay and zebrafish test. *Environ Pollut* 132:279–287
12. Kosmehl T, Krebs F, Braunbeck T, Hollert H (2007) Differentiation between bioavailable and total hazard potential of sediment-induced DNA fragmentation as measured by the comet assay with zebrafish embryos. *J Soil Sediment* 7:377–387
13. Kosmehl T, Hallare AV, Braunbeck T, Hollert H (2008) DNA damage induced by genotoxicants in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after contact exposure to freeze-dried sediment and sediment extracts from Laguna Lake (The Philippines) as measured by the comet assay. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 650:1–14
14. Osman AGM, Mekki IA, Verreth J, Wuertz S, Kloas W, Kirschbaum F (2008) Monitoring of DNA breakage in embryonic stages of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) after exposure to lead nitrate using alkaline comet assay. *Environ Toxicol* 23:679–687
15. Hyodo-Taguchi Y, Egami N (1989) Use of small fish in biomedical research, with special reference to inbred strains of medaka. In: Woodhead A (ed) *Non mammalian animal models for biomedical research*. CRC Press, Boca Raton



16. Iwamatsu T (1994) Stages of normal development in the Medaka (*Oryzias latipes*). *Zool Sci* 11:825–839
17. Mauthe RJ, Cook VM, Coffing SL, Baird WM (1995) Exposure of mammalian cell cultures to benzo(a)pyrene and light results in oxidative DNA damage as measured by 8-hydroxydeoxyguanosine formation. *Carcinogenesis* 16:133–137
18. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR (2003) Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18:45–51
19. Olive PL, Banath JP (1995) Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the comet assay and a DNA crosslinking agent. *Exp Cell Res* 221:19–26
20. Devaux A, Pesonen M, Monod G (1997) Alkaline comet-assay in rainbow trout hepatocytes. *Toxicol Vitro* 11:71–79
21. Lee RF, Steinert S (2003) Use of single cell gel electrophoresis/comet assay for detection DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat Res* 544:43–64
22. Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, Escobar P, Hartmann A et al (2007) Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo comet assay workgroup. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 627:31–35
23. Meintieres S, Nesslany F, Pallardy M, Marzin D (2003) Detection of ghost cells in the standard alkaline comet assay is not a good measure of apoptosis. *Environ Mol Mutat* 41:260–269
24. Singh NP (2000) A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. *Exp Cell Res* 256:328–337
25. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutat* 35:206–221
26. Akcha F, Vincent Hubert F, Pfohl-Leszkowicz A (2003) Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. *Mutat Res* 534:21–32
27. De Miranda Cabral Gontijo AM, Barreto RE, Speit G, Valenzuela Reyes VA, Volpato GL, Favero Salvadori DM (2003) Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 534:165–172
28. Babson JR, Russo-Rodriguez SE, Wattleley RV, Bergstein PL, Rastetter WH, Liber HL, Andon BM, Thilly WG, Wogan GN (1986) Microsomal activation of fluoranthene to mutagenic metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol* 85:355–366
29. Willett KL, Wassenberg D, Lienesch L, Reichert W, Di Giulio RT (2001) In vivo and in vitro inhibition of CYP1A-dependent activity in *Fundulus heteroclitus* by the polynuclear aromatic hydrocarbon fluoranthene. *Toxicol Appl Pharmacol* 177:264–271
30. Mitchelmore CI, Chipman JK (1998) Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Aquat Toxicol* 41:161–182
31. Hook SE, Lee RF (2004) Genotoxicant induced DNA damage and repair in early and late developmental stages of the grass shrimp *Palaemonetes pugio* embryo as measured by the comet assay. *Aquat Toxicol* 66:1–14
32. IARC (1997) Supplement: cadmium and cadmium compounds. IARC, Lyon
33. Cambier S, Gonzalez P, Durrieu G, Bourdineaud JP (2010) Cadmium induced genotoxicity in zebrafish at environmentally relevant doses. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:312–319
34. Wang Y, Fang J, Leonard SS, Rao KM (2004) Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Rad Biol Med* 36:1434–1443
35. Liu J, Qu W, Kadiiska MB (2009) Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 238:209–214
36. Risso-de Faverney C, Devaux A, Lafaurie M, Girard JP, Bailly B, Rahmani R (2001) Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygen species. *Aquat Toxicol* 53:65–76
37. Hartwing A (1994) Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium-induced genotoxicity: a review. *Environ Health Perspect* 102:45–50
38. Schwerdtle T, Ebert F, Thuy C, Mullenders L, Hartwing A (2010) Genotoxicity of soluble and particulate cadmium compounds: Impacts on oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. *Chem Res Toxicol* 23:432–442
39. Mouchet F, Gauthier L, Baudrimont M, Gonzalez P, Mailhes C, Ferrier V, Devaux A (2007) Comparative evaluation of the toxicity and genotoxicity of cadmium in amphibian larvae (*Xenopus laevis* and *Pleurodeles waltl*) using the comet assay and the micronucleus test. *Environ Toxicol* 22:422–435
40. Jia X, Zhan H, Liu X (2010) Low levels of cadmium exposure induce DNA damage and oxidative stress in the liver of Oujiang colored common carp *Cyprinus carpio* var. color. *Fish Physiol Biochem* (in press)
41. Lacaze E, Geffard O, Bony B, Devaux A (2010) Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay. *Mutat Res* 700:32–38
42. Hornung MW, Cook PM, Fitzsimmons PN, Kuehl DW, Nichols JW (2007) Tissue distribution and metabolism of benzo[a]pyrene in embryonic and larval medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicol Sci* 100:393–405
43. Palmqvist A, Selck H, Rasmussen LJ, Forbes V (2003) Biotransformation and genotoxicity of fluoranthene in the deposit-feeding polychaete *Capitella* sp.1. *Environ Toxicol Chem* 22:2977–2985
44. Sepic E, Bricelj M, Leskovsek H (2003) Toxicity of fluoranthene and its biodegradation metabolites to aquatic organism. *Chemosphere* 52:1125–1133
45. Hornung MW, Cook PM, Flynn KM, Lothenbach DB, Johnson RD, Nichols JW (2004) Use of multi-photon laser-scanning microscopy to describe the distribution of xenobiotic chemicals in fish early life stage. *Aquat Toxicol* 67:1–11
46. Woo S, Kim S, Yum S, Yim UH, Lee TK (2006) Comet assay for the detection of genotoxicity in blood cells of flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to sediments and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar Pol Bull* 52:1768–1775
47. Billiard SM, Meyer JN, Wassenberg DM, Hodson PV, Di Giulio RT (2008) Nonadditive effects of PAHs on early vertebrate development: mechanisms and implications for risk assessment. *Toxicol Sci* 105:5–23



---

## *Annexe 2*

---

### **Séquences codantes des gènes étudiés**



Les séquences des différents gènes étudiés ont été rapatriées à partir des bases de données GenBank (via pubmed-NCBI) et HGNC (Ensembl, EMBL – EBI). Seules les séquences CDS (CoDing Sequence) des gènes ont été utilisées lors du design des amorces et sont rapportées ci-dessous. Chaque gène est suivi de son numéro d'accès dans les banques de données utilisées ainsi que de son nom complet ou de la famille de gènes à laquelle ils sont rattachés.

#### 18S (AB105163) – Acide ribonucléique ribosomique de la petite sous-unité 18S

AGCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCAAGTCTAAGTACACACGGCCGTACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTA  
TGGTTCCTTTGATCGCTCAAACGTTACTTGGATAACTGTGGCAATTCTAGAGCTAATACATGCAAACGAGCGCTGACCCTTGGGGGATG  
CGTGCATTTATCAGACCCAAAACCCATGCGGGGCTGCTCCTCCGGGGCGCCCGCCGCTTTGGTGACTCTAGATAACCTGGAGCCGAT  
CGCTGGCCCCCGTGGCGGCGACGCTCTTTTGAATGTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTACTTTCTGTGCCTACCATGGTGACAACGG  
GTAACGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGAAATTACCCAC  
TCCCGACTCGGGGAGGTAGTGACGAAAAAACAATACAGGACTCTTTCGAGGCCCTGTAATTGGAATGAGTACACTTTAAATCCTTTAA  
CGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATCTTAAAGTTGCTGCAGTAAAAAGC  
TCGTAGTTGGATCTCGGGATCGAGCTGGCGGTCCGCGAAAGGCGAGCTACCGCTGTCCAGCCCTGCCTCTCGGCGCCCCCTCGATG  
CTCTTAGCTGAGTGTCCCGGGGTCGAAGCGTTTACTTTGAAAAATTAGAGTGTCAAAGCAGGCCCGTGCCTGAATACCCGAGC  
TAGGAATAATGGAATAGGACTCCGGTTCTATTTTGTGGTTTTTCTTCTGAAGTGGGGCCATGATTAAGAGGGACGGCCGGGGCATTTCG  
TATTGTGCCCTAGAGGTGAAATTCCTGGACCGGCCAAGACGGACGAAAGGCGAAAGCATTGCAAGAATGTTTTCTTAATCAAGAA  
CGAAAGTCGGAGGTTTGAAGACGATCAGATACCGTCTGATGTCGACCATAAACGATGCCAACTAGCGATCCGGCGGCTTATTCCCATG  
ACCCGCCGGCAGCGTCCGGGAAACCAAGTCTTTGGTTCGGGGGAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGG  
GCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCCGGCCCGACACGAAAGGATTGACAGATTGATA  
GCTCTTCTCGATTCTGTGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTGTGGTGGAGCGATTTGCTGGTTAATTCGATAACGAACGAGACTC  
CGGCATGCTAACTAGTTACGCGGCCCGTGCAGTCCGCTCAACTTCTAGAGGGACAAGTGGCGTTCAGCCACACGAGATTGAGCAAT  
AACAGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCGGGCTGCAGCGGCCACACTGAGTGGATCAGCGTGTGTCTACCCTGCGCCGAGAGGCGTG  
GGTAACCCGCTGAACCCACTCGTATAGGGATTGGGACTGCAATTTTCCCATCAACGAGGAATCCAGTAAGCGGGTTCATAAG  
CTCGGTTGATTAAGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCGTCGCTACTACCGATTGGATGGTTTAGTGAGGTCCTCGGATCGGCCCGC  
CGGGTCCGCCACGGCCCTGGCGGAGCGCCGAGAAGACGATCAAACCTGACTATTCTAGAGGAAGTAAAGTCGT

#### $\beta$ -actine (S74868) – Bêta-actine

ATGGATGATGACATTGCCGCACTGGTTGTTGACAACGGATCTGGCATGTGCAAAGCTGGATTCGCTGGAGACGATGCCCTCGTGCTGTC  
TTTCCCTCCATCGTTGGTCCGCCAGGCACCAGGGTGTATGGTGGGATGGGCCAGAAAGACAGCTACGTAGGTGATGAAGCCACAGAC  
AAGAGGGTATCCTGACCCTGAAGTATCCATTGAGCACGGTATTGTTACCAACTGGGATGACATGGAGAAGATCTGGACCACACCTTC  
TACAATGAGCTGAGAATTGCCCTGAGGAGCACCTGTCTGCTCACTGAAGCCCCCTGAACCCAAAGCCAAACAGGGAGAAGATGACC  
CAGATCATGTTTGAAGCTTTCAACAGCCCTGCCATGTACGTTGCCATCCAGGCTGTGCTGTCCCTGTATGCCTCTGGTCTGACTGGT  
ATCGTCATGGACTCTGGTATGGTGTGACCCACACAGTGCCATCTACGAGGGCTACGCTGTGCCCCACGCCATCCTGCGTCTGGACTTG  
GCCGGCCGACCTTACAGACTACCTCATGAAGATCCTGACGAGCGTGGCTACTCCTTACCACCACAGCCGAGAGGGAAATGTCCGT  
GACATCAAGGAGAAGCTGTGCTACGTCGCCCTGGACTTCGAGCAGGAGATGGCACCGCTGCCTCCTTCTCCCTGGAGAAGAGCTAT  
GAGCTGCCTGACGGACAGGTCATACCAATGGCAATGAGAGGTTCCGTTGCCAGAGGCCCTTCCAGCCTTCCCTTGGTATGGAG  
TCCTGCGGTATCCATGAGACCACCTACAACAGCATCATGAAGTGTGATGTTGATATCCGTAAGGATCTGTACGCCAACACTGTGCTGTCT  
GGAGTACCACCATGTACCCCGAATCGCAGACAGAATGCAGAAGGAGATCACAGCCCTGGCCCATCCACCATGAAGATCAAGATCATT  
GCCACCACAGAGCGTAAATACTCTGTCTGGATTGGAGGCTCCATCCTGGCCTCTCTGTCCACCTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAG  
GAGTACGATGAGTCTGGCCCTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAA

#### Bax (ENSORLG000000456) – Bcl-2-associated X protein

ATGGCATCGACCCCGGAGGAGGCGATCAAGAAAAATCAAAGAGCTACTGGATGTGGGCACCAAGTTGCTGAAGAATTCATCTGTGAA  
CGGGTCAGGAGAAACCTGCAGGATGACTCTGAAGTGGTCCAGACAGCAGCTGGGTGCAGAGGAGCTGGTTGACCCAAACCACAAGAGACTT  
GCTCAATGCCTCCAGCAGATTGGAGATGAGCTGGATGGAAATGTAGAGCTCAAAGATTGATTGATGACTCTTCGCTCAGTCCCTCCAAA  
GAAGTGTCTTAAAAGTGGCCCTCGAGATTTTTTCTGATGGGGTATACAACCTGGGGCCGGTGGTTACACTTTTCTACTTCGCTGTGCG  
CTGGTCATAAAGGCTCTCATCAGAAAAGTACCAGACATCATTAGAACTATATTACCTGGACCATAGATTACCTTCGGGATTATGTGATT  
GCCTGGATAAGAGAGCAAGCGGCTGGGATGGCATCTTTGGCACTCCTGGCTGGCAGACGTTGGCCGCTTTGTTGCAGGCGTTCTCACC  
GCTGCGGTGGTCAATTCGAAGATGTGA

#### Cox I (NC\_004387, gene ID 805432) – Cytochrome c oxidase sous-unite I

GTGGCAATCACGGATGATTCTTCTCAACTAATCACAAGATATCGGCACCCTATATTTAATCTTCGGTGTGAGCGGGCATGGTGGGT  
ACTGCCTTAAGCCTGCTAATTCGGGCTGAATTAAGTCAGCCCGGCTCTATTAGGTGACGACCAAATCTATAATGTAATTGTAACCCG  
CATGCCTTCGTAATAATTTCTTTATAGTAATACCAATCATGATTGGGGGCTTTGGCAACTGATTAATTCCTTAATGATCGGGGCCCT  
GATATGGCCTTCTCGAATAAACAACATGAGCTTCTGACTACTTCCCCCTCCTTCTTATTGTTAGCTTCTCTGGCGTGGAGGCG

GGTGCGGGGACAGGATGGACCGTGTACCCGCCTCTATCAGGCAACCTAGCGCATGCGGGAGCATCCGTGGATTTAACCATCTTTCCCTC  
 CATCTGGCAGGTATCTCCTCTATCTTAGGGGCTATTAATTTTATTACAACAATTATTAATATAAAAACCCCGGCCATCTCTCAGTATCAG  
 ACCCTTTATTCGTGTGAGCTGTACTAATTACCGCAGTACTTCTACTCTCCCTCCCTGTGCTCGCTGCAGGTATCAGTATGCTCCTA  
 ACGGACCGAAACCTAAATACAACATTCTTTGACCCTGCAGGGGGAGGGGACCCTATTCTCTACCAGCACCTGTTCTGATTTTTTGGTCAC  
 CCCGAAGTTTATATTTAATTCTCCCCGGCTCGGAATAATTTACATATTGTGGCCTATTATTCGGGTAAAAAAGAACCTTTCCGGGTAC  
 ATGGGTATGGTCTGAGCCATAATGGCAATTGGGCTTCTAGGGTTATTGTATGAGCCACCACATATTCACCGTAGGGATAGATGTGGAT  
 ACTCGGCTTACTTCACATCTGCAACAATAATCATCGCAATTCACAGCGTTAAAGTATTAGCTGGCTGGCTACTTTACATGGGGGC  
 TCTATTAATGAGAAACCCACTATTATGGGCCCTTGGTTTCATCTTCTCTTTACAGTAGGCGGTCTGACAGGAATTGTCTTAGCCAAC  
 TCATCTTTAGATATCATACTCCATGACACTTACTATGTAGTAGCCACTTCCACTACGTTCTCTATGGGGCCGATTTGCTATTATG  
 GGGCATTTCGTTTATTGATTCCTCTATTTTCGGGCTATACTTTACACGGAACGTGAACAAAAATCCACTTCGGGGTAATGTTTGTAGGA  
 GTAAACCTAACCTTCTCCCCAACACTTCTTAGGCTAGCAGGAATACCACGACGCTACTCTGATTACCCAGACGCCTATACATTATGA  
 AACACTATCTCATCCCTAGGTTCCCTTATTTCACTAATTGCTGTAATTATTCCTTTTCTCTGAGAAGCGTTTGCAGCTAAGCGT  
 GAAGTTCTGTCAGTGAACCTAACAGCCACAAATGTGGAATGACTACAGGATGCCCTCCCCCTACCACACATTTGAAGAACCCGCATTT  
 GTTCAAATTAACAACCTAAGTTTTAA

#### Cyp1A (AY297923) – Cytochrome P450 1A

ATGGCATTAAATGGTACTGCCATTTCATCGGTCCTCTGTCAGTACTTGAGGGTTTGATTGCTCTGACTACAGTGTGTGGTCTATCTACTC  
 CTCAAGCATTTTAAACAAGAGATCCCTGGAGGCTTCGTCAGCTGCCGGGCCCCACACCACTCCCATCATTGGGAATCTACTGGAGCTG  
 GGTAGCAAACCTACCTGAGCCTACCGAAATGAGCAAGCGATTTGGAGATGTGTTTCAAATCCAGATCGGCATGCGTCTGTGTCGTT  
 TTGAGTGGTAATGAAACGGTGTGACAGGCTCTCATCAACAAGGAGATGACTTTTCTGGCAGGCCGACTTGTATAGCTTCCAGTTTATC  
 AATGACGGCAAGAGTTTGGCTTTCAGCACAGACCAAGCAGGGGTTTGGCGGGCTCGCAGAAAGTTGGCCTACAGTGCATTGCGCTCTTTC  
 TCAAGCCTAGAGGGCAGCAATGCAGAACTCATGCATGCTGGAGGAACACATCTGCAAAGAGACAGACACCTGGTCAAAGAGATAGAA  
 AAAGTAATGAAGACAGAAGGCAAAATTTGACCCCTATCGATACATTGTTGTGCTGTGGCCAATGTTATCTGTGGCATGTGCTTTGGACGA  
 CGCTATGACCACCATGACCAGGAGCTGGTAGGCTGGTAAACCTCAGTGAAGATTTTGTCCAAGTGACGGGCAGCGGCAACCCTGCAGAC  
 TTATCCCTGCCCTGCGGTATCTACCCAGCAAAGCAATGAAAAAGTTTGTGAAATCAACAACCGCTTCCAGTGTGTTGTTCAAAGATC  
 GTCAATGAGCATTATGCCACGTATGATAAGGACAACATCCGTGACATTACAGACTCCCTTATTGATCACTGTGAAGACAGGAAGCTAGAT  
 GAAAATCCAACATCCAGATGTCGGATGAAAAAGTAGTCGGCATCGTCAATGATCTCTTTGGAGCAGGTTTTGACACAATCTCTACTGCT  
 CTGTCTGGGCAGTGGGGTATTTGGTGGCCTACCCAGACATAGAAAAGAGACTTTTGAAGAAATAAAGGAAAACATCGGCTGAACCGA  
 AATCCTACCATACTGACAGAAGCAACTTACCTTTAACGGAGGCTTTTATCTGGAGATCTTTCGCCATTCTTCAATTTCTCCCTTTCACA  
 ATTCCACTGCACAACAAGGGACACATCTCTGAATGGTACTATATCCCAAAGACAGTGTGCTTTATCAACCAGTGGCAAATAAAC  
 CATGACCCGAACTGTGGCAGGATCCATCATCTTTAACCCAGATCGTTTCTGAGTGAAGATGGAAGTGAAGTTAATCGGCTAGACGGA  
 GAGAAAGTGTGTTTTTGGTCTGGGAAAGCGGCTTGCATTGGCGAGGTATAGCAGCAATGAAGTTTTCTCTTTTTGGCAATCATG  
 ATTCAGAAATTGTGCTTTGAGGAGATGCCAGGAGAGCCTTTGGACTTGACCCAGAGTACGGGCTCACAATGAAGCACAAGCGCTGCAAT  
 GTTAGAGCATCACTGAGGCTAAAGGATGGATGCTGA

#### Emx2 (ENSORLG00000014157) – Empty spiracles homolog 2

ATGTTTCAACCCACACCAAGAGGTGTTTTACGATAGAGTCTTTAGTGGCGAAGGATAATCCGGTTCGGGTGTCCGTTCCGAGGAACCC  
 ATCAGGCCCGCGCTCTCAGCTATGCAAATCCGGCCAGATGAACCCGTTTCTCAACGGCTTCCACTCCGGCAGCAGGGGCGTACTCA  
 AACCCGGACTTGGTGTTCGCGGAGGCGGTGTCTATCCGCCAACTCCGCGGTGCCGGTGCATCCGGTGGCCCGCCGCACGCGTGGCC  
 GCACACCCGCTTTCCTCTTACACAGCCCGCACCCGCTTTTCGCGAGCCAGCAAAGGGACCCCTCGACGTTTACCCCTGGTTGTTACAC  
 AGATATAGGTAATTTGGTTCACAGATTTCAAGGAAACGAAACGAGTCCAGAAAGTTTCTTTTGCAACAACGCGCTGGCCAGAAAGCCAAAG  
 AGAATCCGGACAGCGTTTTCCCGTGCAGCTGCTGCCGCTCGAGCAGCGTTTTGAGAAGAACCATTACGTGGTGGGAGCAGAAAGGAAG  
 CAGCTCGGCACAGCCTTAGCCTCACGAAACTCAGGTAAGTCTGGTTTTCAGAACCGGAGAACGAAGTTCAAGCGTCAGAAGTTGGAG  
 GAGGAGGGCTCCGAGTCTCAGCAGAAGAAGAAAGGATCGCATCACATAAACAGGTGGAGACTGGCGACTAAACAGGCGAGCCCCGAGGAG  
 ATTGACGTCACCTCGGACGAT

#### MT (AY466516) – Métallothionéine

ATGGACCCCTGCGACTGCTCCAAAACCTGGAAAATGCAACTGCGGCGGCTCTTGACCTGCACAAACTGCTCTGCACCAGCTGCAAGAAA  
 AGCTGCTGTGCATGCTGCCATCCGGCTGCACTAAGTGCATCTGGCTGCGTGTGCAAAGGGAAGACCTGCGACACTACTTGTGTCAG  
 TGA

#### Nd5 (NC\_004387, gene ID 805441) – NADH-déshydrogénase sous-unité 5

ATGCACCTTACCACTATAGTCTCTCCTCAAGCCTATTAACGATTTTTTCGATCCTTATTCTGCCTGTCTTGGAACTTAACCCGAGC  
 CCCCAGGAAGCCTGTGGGCTACAAACAGCGTGAAGACCGCAGTTAAAGTAGCCTTTTTGTAAGCCTTCTACCCCTCTTCACTTCCCTC  
 AATGAGGGGTGCAAGCCATTATACAAACTGGGAATGGATAAACACATTAATATTTAATATTAATATAGTTTTAAATTTGACCTGTAC  
 TCTATCGTTTTTACCCAGTGGCGCTCTATGTACATGATCTATTCTAGAATTTGCATCCTGGTATATACACGACGACCCCAACATAAAT  
 CGATTCTTAAGTACCTTCTATTTTCTAATTGCCATGATCGTCTGTTACAGCTAACACATATTTCAACTTTTTATTGGCTGAGAA

GGTGTAGGCATTATATCTTTCCTACTAATCGGCTGGTGGTTTGGACGAGCGGACGCCAACACTGCAGCCCTACAAGCCGTAGTGTACAAC  
 CGAGTCGGGGATATCGGCTTAATTTTGGCCATAGCCTGGATGGCGGTAACCTTAACTCCTGGGATATAACAACACTATTCTCCATAACT  
 ACAAACCAAGACATGACCCTCCCCTACTCGGCTGTCTTAGCTGCAACTGGTAAGTCTGCCAGTTTGGTCTCACCATGGCTCCCC  
 TCAGCTATAGAGGGTCCACACCGGTCTCTGCCCTACTGCATTCTAGCACTATGGTCGTCGCCGGCATTTCCTCCTTATCCGACTAAAC  
 CCCCTGATAGACAACAACCTTTGGTTCTGTCCACCTGCCTTTGCTTAGGGGCTTACTACGGTTTTTACAGCAACATGCGCTCTAAC  
 CAAAACGACATTAAAAAATCATCGGTTTTCAACATCAAGCCAAGTAAATAATAGTCACCATTGGGTTGAACCAACCCCAACTG  
 GCTTCTACACATCTGCACCCATGCCTTCTCAAAGCAACTTTTCTTATGTTCCGGCTCCATCATTACAGCCTAACGACGAGCAG  
 GACATCCGAAAAATGGGGGGCTTACCACCTGCTTCCATTTACCTCTTCTGTTAACTATCGGAAGCCTGGCTTTAACTGGGACCCCA  
 TTTCTAGCAGGCTTCTTTCTAAAGACGCTATTATTGAAGCCTTAAACACATCCTACCTCAAGCCTGAGCCCTGGTCTTAAACCTCGTG  
 GCTACGTCGTTACAGCAGTCTATAGCCTCGTGTAGTATTCTTTGTCTCCATGGGCCACCCCGATTAATCCAATTTCCCCATCAAT  
 GAAAACAACCTAACAGTCATAAACCCATTAACGACTCGCCTGGGGAAGTATTTGGCAGGACTTCTCATCAGCTAATATTTCCCT  
 CTTAAACCCCTCTCATAACAATACCTTTGTTCTCAAATAGCCGCCCTAACAGTAACAATCGTTGGACTATTAATGGCCCTAGAATTA  
 GCATCACTCGCCTACAACAATCAAATCAAGCCGCATCGCCCCCACTTCTCAAACATATTGGGATTCTACCCGTCTGTGGTT  
 CACCGATTAGCCCTAAGACTAACCTGGTTTTAGGTCAACTAATTGCTAATCAAACAATTGATCAAACATGGCTAGAGAAAACAGGACCT  
 AAAATAACAGCCTCTGTTAATTTACCTTTAATTTCTCAACTAGCAACCTTCAACAAGGTGTGATCAAACCTATTTCTTGATATTTTC  
 TTTACTATAATCCTGGCAGTCCTTATCCTTGAATCTAA

**Ogg1 (ENSORLG0000010758) – 8-Oxoguanine glycosylase 1 (BER family)**

ATGGCTAGTAGTCACGTGGTTTTAACATCGGGGGCCAAACTATGGAGATCTTGCCTTGCCTCACTTCAGAGCTACGTCTGGATCTCACT  
 CTTGCCTGTGGACAATCTTCCGCTGGAAGGAAACCGCAGAGGGACACTGGACTGGAGTGATGGGAGGGCGGGTGTGGACTCTGACTCAA  
 ACCGATGACCGACTGTGGTATCATGTCTACACAACCAAAGAAACGGGGAGGAAGGAAAACAGAGCTGAGGAGAAACCTGAAGTGTT  
 CCGAATGTGGAAGAGGAGCACCAGCTGTACGGATGAGCAGCAAAGCACCATGGAAGCAGAGATGCTGAGAGACTACTCCAGCTGCAT  
 GTGAAGATGGAGGATTTATGCAGGCACTGGGAGCAGCAGACCCTCACTTCAAAAACACTGCAGATGTTTTCACTGGTGTGAGGATGCTG  
 CGCCAGGATCCACAGAGTGTCTGTTCTCCTTCACTGCACCTCCAACAACCACATCTCTCGTATTCAGGGCATGGTGGAGAGACTGTGC  
 CAGGCTTTGGGGGCTCCACTCTGCCAGCTTGATCAAACCTTACCACGATTTTCCAACATTGTCAGCTCTTGACAGCAGCAGTGTAGAG  
 GCTCGTCTTAGGGATCTTGGTTTTGGATACAGGGCAGATACCTCCAGCAGAGTGCTAAAATGATCTTAGACAGCCACGGGTCCCAATGG  
 ATCGAAGTTTTACGAGAGTCCCTATCTGGAGGCTCGTGAGGCTCTCCGGACACTCCCTGGGGTTGGAGCAAAGGTGGCAGATTGTGTG  
 TGTTTGATGTCCCTGGATAAGCCAGAAGCTGTGCCGTTGACACACATGTCTGGCAGATTGCAAGCGGGACTATAAGTATGCTGTGAT  
 AATGGACAAAAGAGCTTGACAGATAAACTTTACAAAGACATCGGAGATTTCTTTAGAAAGCTGTGGGGCCGTATGCTGGTTGGGGCCAG  
 TCGGTGCTGTTCTGTGAGATCTCAAGAAGTTCAAACCTCAAAGAAATGGACACATGAAGCAGCAAAGAAGGAAAAGAAACACAG  
 AAAAGG

**P53 (AF212997) – Suppresseur de tumeur P53**

ATGGATCCTGTACCGACTGCCCGAGAGCCAAGGTTCTTTTCAAGAAGCTCTGGGAGACTGTTTATCCTCCGTTGGAAACTTTATCACTT  
 CCAACTGTAAATGAGCCACCGGGTCATGGGTGCGAACGGGGATATGTTTCTTGGATCAAGACCTCAGTGGGACCTTCGATGACAAG  
 ATCTTTGACATACCGATTGAGCCAGTTCCACCAACGAAGTAAACCCGCCACTACCACCGTCCCGTGACCACCGACTACCCGGGAAGC  
 TACGAACTGGAACCTCGTTTTTCAAAAATCTGGCACTGCAAAGTCTGTGACGTCCACATACTCTGAACTTTAAATAAGCTGTACTGCCAG  
 CTTGCAAAAACAGCCCATAGAAGTCCGGGTGAGCAAGGAGCCTCAAAGGGCGCCATTCTCAGGGCCACTGCGGTCTACAAGAAGACG  
 GAGCAGTGGCGGACGTGGTGGAGGAGGTGTCCCACCACAAAACGAGGACTCTGTGGAGCACCAGCCATCTGATTCCGGGTGGAGGGC  
 AGCCAGCTGGCCAGTATTTGAAGACCTTATACAAAAGGAGAGTGTACAGTTCCTTATGAGCCCCGACGCGGGCTCTGAGATG  
 ACCACCATCCTGCTCAGCTACATGTGTAACAGCTCGTGCATGGGGGGATGAACCGCAGACCCATCCTCACCATCCTCACTCTGAAAACC  
 GAGGGTCTGGTTCTTGGCCGAGGTGTTTCGAGGTGAGAATCTGTGCTTGCCTGGGGCGGGACCGCAAAACGGAGGAGGAAAGCCGGCAG  
 AAAACGCAGCCAAAAAAGGAAGGTGACACCAACACCTCCTCCTAAGAGGAAGAAGTCCCACTCAAGTGGAGAGGAGGAGGACAAC  
 AGAGAAGTCTTTCATTTGAGGTTTATGGGAGGGAGCGCTACGAGTTCCTTAAAGAAGATAAACGATGGCCTTGAAGTGTGAAAAGGAG  
 AGCAAAAGTAAAAACAAGATTCTGGGATGGTCCCCCAGTGGGAAGAAGCTGAAGAGCAATTA

**Rad51 (ENSORLG0000017821) – Homologous recombination (HR) family (homologue RecA)**

ATGGCCATGAGGAGCGAGGCTCGGGTGGAGGCGAGAAGTGGCGGTGGAGGAGGAGGAGAATTTGGGCCCGCAGCCTCTTAGCAGACTGGAG  
 CAGTGTGGAATCAGCTCCAGCGACATCAAGAACTGGAGGACGAGGCTTCCACACCATTGAGGCCGTGGCGTACGCTCCCAAGAAGGAG  
 CTGCTCAACATCAAAGGCATCAGCGAGGCCAAAGCCGACAAGATCCTAACTGAAGCTGCCAAGCTAGTACCGATGGGTTTCACTACAGCC  
 ACAGAGTTCACAGAGAAGGTGCGAGATCATCCAGATCTCCACAGGATCAAAGAGCTGGACAACTCCTGCAGGGTGGTATTGAGACA  
 GGCTCCATCACAGAGATGTTTGGGGAGTTTCGCACGGGGAAGACGAGCTGTGCCACACCCTCGCTGTACAGTGTACAGCTGCCATCGAT  
 CAAGGGGGAGGAGAAGGAAAGCGATGTACATCGACACAGAGGGGACCTTCAAGCCAGAGAGGCTCCTCGTGTGGCAGAGAGGTACGGT  
 CTGGTGGCAGTGACGTCTGGACAACGTGGCGTACGCCCGCGCCTTCAACACCGACCATCAGACCCAACTGCTGTACCAAGCTTACGCC  
 ATGATGGCAGAGTCCAGGTATGCCCTGCTGATCGTGGATAGCGCCACTGCTCTGTACAGAACCAGCTACTCGGGTGGAGGAGAGCTGTCG

GCCCGGACGGGACCTGGGCCGGTTCCTGCGCATGCTGCTGCGACTGGCAGACGAGTTTGGCGTTGCCGTGGTGATAACCAACCAGGTG  
 GTTGCACAAGTGGACGGGACGGCCATGTTTTCTGCGGATCCTAAGAAACCCATCGGAGGGAACATCCTGGCGACGCCTCCACCACAGTT  
 GTATCTGAGGAAAGTTCGAGGGGAAACCCGGATCTGCAAGATCTACGACTCGCTTGCCTGCCTGAGGCCGAGGCCATGTTGCGCATCAA  
 CGCCGACGGCGTGGGCGACGCCAAGGACTGA

**Raldh2 (NM\_001104821) – Rétinaldéhyde déshydrogénase 2 (aussi appelée ald1a2)**

ATGACTCCAGTAAGATCGAGATCCCCGGAGAGGTGAAGAGTGACCCGGCTGCCCTCATGGCATCCCTCCAGCTGATGCCCTCACCAGGTG  
 CCCAACCTGAGCTCAAGTACACAAAGATTTTCATCAACAATGAGTGGCATGTCTGTGTGAGTGGGAAGGTCTTCCCTGTCTACAACCCA  
 GCAACTGGAGAGCAGATCTGTGAAGTCCAGGAGGCTGATAAAGGCTGATGTTGATAAAGCAGTGCAGGCAGCTCGCCTTGCCTTCTCTTTA  
 GGTTCAGTTTGGCGCAGAATGGATGCCTCTGAAAGAGGAAAACCTGCTAGCCAAACTGGCTGACCTGGTGGAGAGGGACAGCGTCTACCTA  
 GCAACAATTGAGTCTCTGAACAGCGGGAAGCCGTTTTCTGCCAACACTGTTTGTGACCTCCAAGGAACATAAAGACTCTCAGATACTTT  
 GCTGGATATGCAGACAAAATCCATGGCACTTCTATCCAATGGATGGAGAGTATCTGACATTTACCAGATATGAACCTATTGGAGTTTGT  
 GGACAAATCATTCTTGGAACTTCCCCCTGATGATGGCTGCGTGGAAAGCTGGCCCCGCACTGGCATGTGGCAACACTGTGGTCTCAA  
 CCATCTGAAGAGACGCCGCTCACCTGTCTCTATGTGGCAGCTCTCGTGAAGGAGGCTGGGTTTCCACCAGGAGTTGTCAATATTTGCCA  
 GGATTTGGGCCAACAGCAGGAGCTGCCATTGCTTCGCACATGGGCATCGATAAAGTGGCTTTCACAGGATCAACTGAGGTGCGCAAGCTT  
 ATCCAAGAGGCGCAGGGAGGAGTAACCTGAAGAGAGTGACGCTGGAGATGGGAGGCAAAACCCCAACATCATATTTGCAGATGCAGAT  
 TTGGATCTGGCAGTGGACCAGGCCCCAGGGTGTGTTTTCAATGCGGGCCAGTGTGCACTGCAGGCTCTCGCATCTATGTGGAGGAG  
 CCCATTTATGATGAGTTTGTTCGCCGAGTGTGGAGCGAGCCCAGAGGAGGATAGTTGGCAGTCCTTTGAACCCACAACGAACAGGGT  
 CCTCAGATCAGCCGGGAGCATCAGAATCGTGTGCTAGAATAATCCAGAGTGAATCCAGGAAGGAGCCAAACTGGAGTGTGGAGGCAAA  
 GCTCTGGGCTTGAAGGGTTCTTCAATGAACCCACAGTTTTCTGACGTGAAGGATGACATGAGAATTGCCAAGGAGGAGATTTTTGGA  
 CCAGTTCAGCAGATTATGAAGTTCAAAACTGTTGAAGAAGCGATTGAAGAGGCCAACAACTCTGATTACGGTTTGACTGCTGCTGTGTT  
 ACCACTGACATCAACAAAGCCATGACCGTCTCCACAGCCATGCAGGCCGCACTGTCTGGTAAACTGCTTCAATGCTCTCAGCACACAG  
 TGTCTTTTGGAGGATACAAAATGTCTGGGAATGGACGTGAATTAGGAGAAAGCGGCTTGAAGGAGTACTTAGAAATAAAGACCATCACC  
 ATGAAAACAGTACCAAGAAGCTCTTAA

**Rarα1 (EF546452) – Récepteur de l'acide rétinoïque Alpha 1 (CDS partiel)**

CTGTGGGACAAGTTCAGCGAGCTCTCCACCAAGTGCATCATCAAGACGGTGGAGTTTGCAAAGCAGCTGCCCGGCTTACCACGCTCACC  
 ATCGCTGACCAGATCACTCTGCTCAAGGCCGCTGTCTGGACATTTCTGATTCTGCGGATCTGCACACGCTACACGCCGAACAGGACACC  
 ATGACCTTCTCCGACGGACTCACGTTAAACCCGGACCCAGATGCACAACGCCGGCTTCGGCCCGCTCACGGACCTGGTTTTCGCTTTCGCC  
 AACCAACTCCTCCTCTGGAGATGGACGATGCAGAGACGGGACTGCTGAGCGCCATCTGCCTGCTGTGTGGAGATCGGCAGGACTTGGAA  
 GAGGCAGACAAAGTGGACGCTCTGCAGGAGCCACTTCTGGAGGCGTGAAGATTTACGTGAGGAAGAGAAGGCCCCACAAACCGCACATG  
 TTCCCCAAGATGTTGATGAAGATCACCGACCTGAGAAGCATCAGCGCTAAAGGAGCCGAGCGCGTCATCACCTGAAGATGGAGATCCCC  
 GGCTCCATGCCGCTCTCATCCAGGAGATGCTTGAGAACTCGGAGGGCCTGGA

**Rary1 (EF546454) – Récepteur de l'acide rétinoïque Gamma 1 (CDS partiel)**

ATGTTTACTGTATGAGGCTCTGGGAATGGGCCCCATCAGCTCTATGATGTCACCAGTCTGTGGGCATGCATGCTGCGCAAGGGCAGC  
 CCTTCTTTCCGAGGCTGGACCCCTTCGCCTGGACGAGCAGTGCAGTGTTCAGTCCGTGGAGACCCAGAGTACCAGCTCAGAGGAGATG  
 GTACCCAGCTCCTCGTCTCCACCTCCTCCACCTCGTGTCTACAAACCTGCTTTGTGTGTCAGGACAAGTCTCGGGTACCACTATGGG  
 GTTAGCTCCTGTGAGGGCTGCAAGGGTTTCTTCCGTCGCAATCCAGAAAACATGGTGTACACTTGCCATAGAGACAAGAACTGT CAG  
 ATTAACAAAGTACACGCAACCGCTGTGACTGCAAGGCTGCAGAAGTGTTCGAGGTCCGCATGTCCAAGGAAGCAGTACGTAACGAT  
 AGAAACAAAAGAAGAAGGATGTCAAGGAGGAGATGGTGCTTCCCGAGAGCTATGAGCTTAGTGGAGAGCTCGAGGAGTTGGTCAACAAA  
 GTCAGCAAAGTCCACAGGAAACCTTCCATCACTTTGCCAACTTGAAAAATACACAACAACTCCAGCTCAGACCACCGTGTTCAGCTG  
 GATCTGGGACTTTGGGACAAGTTCAGCGAGCTCTCCACCAAATGCATCATTAAAGATTGTGGAATTTGCCAAGCGGCTCCAGGTTTACC  
 ACCCTCACCATCGCTGACCAAATCACCTTACTCAAGTACGCTGCTGGACATTCT

**Rpl7 (NM\_001104870) – Protéine ribosomale L7**

ATGGCGGACGCAGAAAAAAGTTCGGCGGTCCTGAGAGCCTTTTGAAGGCGAAAGGCCTATGCAGCAATGAAGGCCATGCGTGTG  
 AAGAAGTTGCTGGCTGAGAAAAAGGCCGTAAGGTGACCAGGAACTCATATACAAGAGGGCTGAGAAGTACCACAAGGAGTACAGGCAG  
 ATGGAGAGGCGTGAAGTCCGCTGCTGATGGCTCGCAAAGTCCGGAACATTTATGTGCCAGTGAACCCAAACTGGCCTTTGTCATC  
 AGGATCCGAGGTATCAACGGAGTACGCCCCAAGTCCGCAAAGTTCTGCAAGTCTTCCGCTGCGCCAGATCTTCAACGGTGTATTTGTC  
 AAGCTGAACAAGGCTTCAATCAACATGCTGAGGATTGCTGAGCCTTACATTTGCTTGGGATACCCCAACTTGAAGTCTGTGCGAGAGCTC  
 ATCTACAAACGTGGCTACGGCAGGATGAGGAAGCAGCGCATCGCNCTCACAGACAATGCTTTGGTGGAGAAAGCTCTCGGCAAAATATGGC  
 ATCATCTGTGTTGAGGACCTCATCCATGAAATCTACACTGTTGGAAAGAACTTCAAGCCTGCCAACAACTTCTGTGGCCCTTCAAGCTG  
 TCGTACCTCGTGGAGGAATGAACAAGAAGACCACACTTTGTGGAGGGAGGCGACGCCGGAACAGGGAGGACCAGATCAACAGAATG  
 ATCCGAAGGATGAACTAA



**Rxra1 (EF537036) – Récepteur X rétinol Alpha 1 (CDS partiel)**

CAGGAGGAGCGTCAGCGAGCGAAGGAAAAAACGAGAATGAGGTTGAGTCCACCAGCTGTGTAAACGAGGACATGCCGGTGGAGAAGATC  
 CTGGAGGCCGAAGAAGCGGTGGAACCCAAAACCTGAGACCTACATCGAGACCAATCTAAGCGTGCCATCTAACTCGCCAACGACCCAGTG  
 ACAAATATCTGTCAAGCAGCTGACAAGCAGCTATTTACCCTGGTGGAGTGGGCCAAAAGGATTCCTCACTTCTCTGACCTGCCGCTAGAT  
 GATCAGGTCATCCTGCTCCGAGCAGGTTGGAATGAACTCCTCATTGCATCATTCTCACACCGTTCATAGCAGTGAAAGACGGGATTCTG  
 CTGGCGACGGGGCTGCACGTCCACCGCAACAGCGCTCATAGCGCCGGAGTCGGAGCCATCTTTGACAGAGTTCTGACAGAGCTGGTGTCA  
 AAGATGAGGGACATGCAGATGGACAAGACAGAAGCTGGGGTGCCTTCGAGCCATTGTTCTTTTCAACCCAGACTCTAAAGGTCTTTCTAAC  
 CCTGGTGAAGTAGAAGCCTTGAGAGAGAAAGTCTACGCATCCTTAGAGGCCTACTGCAAACAAAAGTACCCTGAGCAGCCGGGCAGGTTT  
 GCCAACTGTTGCTGCGGTTACCGCGCTGCGCTCCATCGGCCTCAAGTGTCTGGAGCACTTGTCTCTTTAAGCTTATCGGGGACACG  
 CCCATTGACACCTTCTCATGGAGATGCT

**Sod(Cu) (ENSORLG0000008041) – Superoxyde dismutase cytosolique (co-facteur Cu et Zn)**

ATGGTGCTGAAAGCAGTTTGTGTGTTGAAAGGAACAGGAGAAACCAACGGCGTGGTTAATTTTGAACAGGAGAGCGATTACGCCCTGTG  
 AAGGTGACTGGAGAAATCAAAGGCCTCACACCAGGCAAGCAGCGCTTCCACATCCACGTGTATGGAGATAACACCAATGGGTGCGTCAGT  
 GCAGGGCCTCACTTCAACCCATACAACAAGAACCACGGGGTCTGAAGATGCAGAAAGACAGTTGGGGACCTGGGAAATGTGACCGCA  
 GGAGATAATAACGTTGCTAAAATAGATATCACGGACAACTTATCAGACTCTCAGGTCCAGACTCTATTGTTGGCAGAAGTGTGGTGGTC  
 CATGAGAAAGTTGATGATCTTGGAAAAGGTGGAAATGATGAAAGCCTTAAAACCTGGAAATGCTGGAGCGGTTTGGCCTGCGGCGTGATC  
 GGCATCGCTCAGTAA

**Sod(Mn) (ENSORLG00000013261) – Superoxyde dismutase mitochondriale (co-facteur Mn)**

ATGCTTTGCAAAGTCTGGCAAATGCGCAGTTGTGCATCAATCCTGCACCAAACCTGTTTCTTGGAAAGTCCGATCATCAAGGCAGAAACAC  
 AACTTCTGACCTGACCTATGATTACGGCGCCCTGGAGCCCCACATCTGTGCAGAGATAATGCAGCTGCACCACAGCAAAACATCATGCT  
 ACATATGTCAACAACCTCAATGTTACAGAGGAGAAGTATCAGGAGGCCTTGCAAAGGGAGATGTGACTGCACAGGTTACCCTTACGCCT  
 GCTCTGAAGTTTAAATGGAGGAGTACATTAACCACACTATCTTCTGGACAAACCTTTCTCCAATGGTGGAGCGGAGCCGCAAGGGGAG  
 CTGATGGAGGCCATCAAACGAGACTTTGGCTCCTTCCAAAAGATGCAAGAGAAGTCTCTGCTGCTACTGTGGCTGTGCAGGGCTCAGGA  
 TGGGGATGGCTGGGCTATGACAAAGAGAGTGGGAGGTTACGCGTTGCTGCTTGTGCTAACCAAGACCCCTGCAGGGAACAACAGGTCTC  
 ATCCCTCTCCTCGGTATTGACGTTTGGGAGCATGCTTACTATCTTCAAGTATAAAAATGTGCGTCTGACTATGTAAAGGCTATTTGGAAT  
 GTAGTAACTGGGAAAATGTGAGTGAGCGTCTTCCAGATAGCCAAAAGTA

**Wnt1 (AJ243208) – Wingless integration site 1 (CDS partiel)**

GCAGTTCAGGAACAGGCGGTGGAATTGCCCGACCACCCACAGCCCGCAATTTTTGGCAAATTTGTCAATCGTGGTTGCCGTGAGACGGC  
 ATTTGTATTTGCCATTACCAGCGCAGGAGTGACCCATGCTGTGGCCGATCCTGCTCAGAGGGCTCCATTGAGTCGTGTACATGCGATTA  
 TCGTCGTGAGGTTCCCGGTGGCCAGACTGGCATTGGGGGGCTGCAGTGACAACGTGGAGTTTGGTCGGGTGTTTCCAGCCGTGAGTTTGT  
 GGACTCTAGTGAGAGGGGAGAGATCTGCGCTACCTCACAACCTGCACAACAATGAAGCAGGCCGAATGATTGTGTCAACAGAGATGCA  
 TCAGGAGTGTAAATGCCATGGCATGTCAAGCTTTGCACCGTGCACATGTTGGATGCGCCTACCCAGCTTTCGCACAGTGGGAGATTT  
 CCTCAAGGACCGCTTTGACGGAGCATCCAGAGTTGTTTATGCCAACAAGGGCAGCAACCGGGCTCTCACCGAGCTGACCCAAGACATCT  
 AGAGCCAGAAAACCCAGCTCACAAGCCTCCTTCCACAATGGACCTAGTCTATTTTGAAGAAGTCCAAAACCTTCTGCTCCACAACAGTTAA  
 AACCGGCACTTTAGGAACCTCTGGAAGAAGTGAACAGTTCTCTCCAGGCTGGACGGGTGTGAGTTGTTATGCTGTGGGCGTGGGTT  
 CAAGACTCGTAGTGAGGCTGTGACTGAACGTTGCCACTGCACCTTCCACTGGTGTGCCATGTGAGCTG



---

## *Annexe 3*

---

### **Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*)**

*Iris Barjhoux, Magalie Baudrimont, Bénédicte Morin, Laure Landi, Patrice Gonzalez, Jérôme Cachot*

Published in *Ecotoxicology and Environmental Safety* (2012) 79:272-82: DOI 10.1016/j.ecoenv.2012.01.011





ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ecoenv](http://www.elsevier.com/locate/ecoenv)Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*)Iris Barjhoux<sup>a</sup>, Magalie Baudrimont<sup>b</sup>, Bénédicte Morin<sup>a</sup>, Laure Landi<sup>a</sup>, Patrice Gonzalez<sup>b</sup>, Jérôme Cachot<sup>a,n</sup><sup>a</sup> Univ. Bordeaux, EPOC/LPTC, UMR 5805, F-33400 Talence, France<sup>b</sup> Univ. Bordeaux, EPOC/EA, UMR 5805, F-33400 Talence, France

## a r t i c l e i n f o

## Article history:

Received 8 August 2011

Received in revised form

11 January 2012

Accepted 11 January 2012

Available online 31 January 2012

## Keywords:

Medaka embryo-larval assay

Sediment

Teratogenicity

Genotoxicity

Heavy metals

## a b s t r a c t

Because of their high capacity to accumulate contaminants such as persistent organic pollutants and heavy metals, aquatic sediments are considered as a long-term source of contamination for aquatic organisms. In compliance with the increasing interest both for sediment quality evaluation and the use of fish early life stage (ELS) toxicity assays, we proposed an embryo-larval test to evaluate embryotoxicity and genotoxicity of sediment-bound contaminants. Pre-blastula stage medaka (*Oryzias latipes*) embryos were exposed by static sediment contact to two model heavy metals (cadmium and copper) at environmental concentrations during the whole 10-day embryonic development. Lethal and sub-lethal effects were recorded in both embryos and larvae for 20 days post fertilisation (dpf) using several global toxicity and phenotypic endpoints. The comet assay was also performed on medaka prolarvae to evaluate genotoxic effects of the tested chemicals. Environmental concentrations of cadmium (Cd) and copper (Cu) did not affect embryo and larval survival. However, both heavy metals significantly induced morphological abnormalities, particularly spinal and cardiovascular deformities. Cd but not Cu induced tachycardia. Both heavy metals induced a significant increase in DNA damage at all tested concentrations. Resulting LOEC values for Cd and Cu corresponded to 1.9 and 8.5  $\mu\text{g/g}$  d.w. sediment, respectively. Although metal bioavailability is probably lower for naturally contaminated sediments, the relatively low toxicity thresholds for both Cd and Cu raise the question of possible risk for fish embryos developing in direct contact to sediments. This study demonstrates the applicability, sensitivity and relevance of the Japanese medaka embryo-larval assay (MELA) to evaluate sediment hazardous potency at environmental concentrations of heavy metals.

&amp; 2012 Published by Elsevier Inc.

## 1. Introduction

The European Water Framework Directive (WFD) aims to reach a good ecological and chemical status in all European surface waters by 2015 (EC, 2000). However, chemical characterisation and toxicity evaluation of sediments are not clearly required by the WFD. Actually, sediments are well-known to be

important secondary sources of contamination for aquatic environment because of their high capacity to sequester and then to release a great number of persistent chemicals such as persistent organic pollutants (POPs) and heavy metals (Burton, 1991). For benthic organisms, exposure can occur via both aqueous phase (water column and porewater) and direct contact to or ingestion of contaminated particles (Kosmehl et al., 2006). For these reasons, sediments play a non-negligible role in the pollutants' bioavailability and route of exposure especially for benthic organisms. Consequently, they represent key compartments that have to be taken into account in risk assessment approaches recommended by the WFD.

Several test phases have been used for sediment toxicity testing (Burton, 1991) as for instance extractable phase, pore water and in situ assays (sediment test chamber, in situ mesocosm, etc.). However, whole sediment exposure is generally considered as the most realistic integrative method to mimic in situ contamination of organisms because the uptake route (including sediment-contact and aqueous phase exposure) is very

Abbreviations: dpf, days post fertilization; d.w., dry weight; els, early life stages; ERS, egg rearing solution; hpf, hours post fertilization; LMP, low melting point agarose; LOEC, lowest observed effect concentration; MELA, Medaka Embryo-Larval Assay; MEM, minimum essential medium; MS222, tricaine methylsulfonate; NMP, normal melting point agarose; NOEC, no observed effect concentration; PBS, phosphate buffered-saline; PNEC, predicted no effect concentration; POPs, persistent organic pollutants; w.w., wet weight

<sup>n</sup> Corresponding author. Postal address: UMR 5805 EPOC, CNRS, LPTC group, University of Bordeaux, 351 cours de la Libération, 33405 Talence Cedex, France. Fax: +33 5 40 00 22 67.

E-mail addresses: [jerome.cachot@u-bordeaux1.fr](mailto:jerome.cachot@u-bordeaux1.fr), [j.cachot@epoc.u-bordeaux1.fr](mailto:j.cachot@epoc.u-bordeaux1.fr) (J. Cachot).

0147-6513/\$ - see front matter &amp; 2012 Published by Elsevier Inc.

doi:10.1016/j.ecoenv.2012.01.011

similar to that in environmental conditions, taking sediment characteristics and chemical properties into account (Hollert et al., 2003; Kosmehl et al., 2006; Mages et al., 2008).

In recent years, fish embryos have gained interest in risk assessment procedures because of their high sensitivity to pollutants and their ecological relevance (e.g. recruitment, population wellness, Burton, 1991; Cao et al., 2009) and also because of the new European regulation on the protection of animals used for scientific purpose (EC, 2010). Considering that sediments are putative spawning substrates for many pelagic and benthic organisms including fish, the use of fish early life stage (ELS) to evaluate sediment contamination would enable effects on hatchability, development and growth, which are considered as critical endpoints, to be monitored (Burton, 1991).

In this context, an increasing number of studies proposed whole sediment-contact bioassays using fish embryos (Hollert et al., 2003, 2005a; Kosmehl et al., 2006). In these studies, the potentially lethal and teratogenic effects of the tested sediments were assessed using classical endpoints such as embryonic survival, hatching rate, growth retardation, heart rate and developmental abnormalities. An adaptation of the comet assay was also proposed to evaluate the genotoxicity of whole sediments (Kosmehl et al., 2006, 2008). All these works clearly demonstrate the suitability of such embryo-larval assays for natural sediment testing as it enables complex environmental matrices containing several chemicals in mixture to be analysed and the sole bioavailable fraction of particle-bound pollutants to be evaluated. However, to our knowledge, very few studies used this approach to measure the toxicity of single compounds artificially coated onto sediments and only hydrophobic organic pollutants were concerned (Vicquelin et al., 2011).

Japanese medaka embryos offer the same advantages than zebrafish embryos for developmental toxicity testing, i.e. transparent chorion, lack of pigments in embryos which facilitates non-invasive observations during the development; sensitivity to toxicant exposure (e.g. Gonzalez-Doncel et al., 2003a; Farwell et al., 2006; Gonzalez-Doncel et al., 2008); well-described stages of development (Iwamatsu, 2004; Gonzalez-Doncel et al., 2005); small size; adaptability to various environmental conditions (Carlson et al., 2002; Wittbrodt et al., 2002; Yao et al., 2010); low maintenance cost; short maturation time (Wittbrodt et al., 2002) and spawning all over the year in good breeding conditions (Iwamatsu, 2004). However, whereas zebrafish embryos hatch after 2–3 days of development, medaka embryos development extends up to 9 days at 26 °C. This longer embryo development in the egg provides the possibility to extend the duration of embryonic exposure up to 9–10 days instead of 48 h, which can mimic a more chronic exposure to contaminants. Furthermore, Japanese medaka is tolerant to a wide range of temperatures and salinities allowing experiments in very contrasted thermal and salinity conditions. Finally, one of the major advantages of the Japanese medaka is the low baseline embryo and larval mortality.

Heavy metals are among the most widespread pollutants in environment and have a high potency to accumulate in sediments (Burton, 1991; Chapman et al., 1998). It has been well documented that excessive aqueous cadmium (Cd) or copper (Cu) exposure could lead to dramatic effects on fish embryos such as high mortality, low hatchability, delay in time to hatch, reduced length, weight and head height, cardiac activity disturbances and numerous developmental impairments including craniofacial alterations, yolk sac abnormalities, spinal deformities, oedemata, cardiovascular disturbances and lack of pigmentation (reviewed by Jezierska et al., 2009). In addition, both heavy metals have been reported as potent genotoxicants in several fish cell lines, generating reactive oxygen species (ROS) that can induce DNA strand breaks and trigger apoptosis and/or cell death (Risso-de Faverney et al., 2001; Manzl et al., 2004; Sandrini et al., 2009).

However, to our knowledge, there is a lack of data on the bioavailability and effects of sediments specifically contaminated by heavy metals on fish embryos development. Furthermore, this kind of approach could be extremely useful to calculate toxicity thresholds (LOEC) of particle-bound pollutants in fish and to derive sediment quality guidelines (PNEC).

The objective of the present work is to characterise both the teratogenic and genotoxic effects of Cd and Cu using a modified version of the Japanese medaka embryo-larval assay (MELA) (Helmstetter and Aiden, 1995) and spiked sediments as source of contaminants. Medaka embryos were exposed to spiked sediments during their whole embryonic development. In the course of the exposure several lethal and sublethal endpoints were followed at both embryonic and larval stages, including cardiac activity, hatching, developmental impairments and survival. In addition, a comet assay was performed on 2-days-old larvae to evaluate DNA damage induced by heavy metals.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

CdCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, phosphate-buffered saline (PBS), nitric acid 65% and normal melting point agarose (NMP) were purchased from Fluka Chemie (Buchs, CH). Cu standard 1000 mg Titrisol<sup>®</sup> (CuCl<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O) was purchased from Merck (Darmstadt, DE). Tricaine methanesulfonate (MS222), low melting point agarose (LMP) and collagenase (Collagenase from *Clostridium histolyticum* Type IV) were purchased from Sigma Aldrich (Lyon, FR). Minimum essential medium (MEM) was purchased from Gibco (Invitrogen, Cergy Pontoise, FR).

### 2.2. Reference sediment characterisation

The reference sediment was collected in the Lot river, on Marcenac site (December 2008, SW France), which is considered as a pristine site for heavy metal contamination in the Lot/Garonne/Gironde continuum (Audry et al., 2004, 2010). The reference sediment was stored at 20 °C, then freeze-dried and finally slightly crushed using a mortar and a pestle to eliminate larger particles and homogenise particle size before use.

The particle-size distribution and particulate organic carbon concentration of the freeze-dried crushed sediment were determined by diffractometry and infrared spectroscopy (Etcheber et al., 1999), respectively. Dissolved ammonium and sulphide were measured in pore waters extracted from the sediment using colorimetric procedures (Strickland and Parsons, 1972) and spectrophotometrical analyses with the methylene blue method (Cline, 1969), respectively. Detailed protocols used for the forementioned analyses are described by Vicquelin et al. (2011).

### 2.3. Sediment spiking

Four spiking concentrations were determined using Cd contents recorded in sediments along the Lot-Garonne-Gironde continuum (Table 1). A 0.3 Å -concentration (2 µg/g d.w. sediment) mimicked a low Cd-impacted area (e.g. La Reole on Garonne river), a 1 Å -concentration (6.5 µg/g d.w.) was selected as a mean Cd-level present in the fluvial-estuarine system and a 3 Å -concentration (20 µg/g d.w.) was not set to represent the highest concentration but a moderate Cd content as measured along the Lot river (e.g. Cajarc site). A control treatment (0 µg/g d.w.) was also added to the conditions cited above. The same concentrations were tested for the Cu treatment to allow comparison of effects between the two metals.

The 30 Å Cd-stock solution (2.5 mg Cd/mL) was obtained by adding 48.79 mg of CdCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O to 10 mL of ultrapure water (Milli-Q Maxima, Elga Labwater, Veolia water, Blagnac FR). The Cu-stock solution was made by diluting Cu standard 1000 mg (CuCl<sub>2</sub>) in 1 L of ultrapure water. Dilutions of these Cd and Cu stock solutions were performed in ultrapure water to obtain the three contamination solutions used for sediment spiking.

For each treatment, 25 g d.w. of sediment was spiked by adding 2 mL of contamination solution (or ultrapure water for control treatment) and 11 mL of ultrapure water as homogenising solvent. The whole mixture was kept under agitation for 1 h then, once supernatant removed at most, kept all night at room temperature for partial drying. The spiked-sediment moisture content was gravimetrically determined to calculate the wet weight (w.w.) equivalent to 5 g d.w. for each condition. After manual homogenisation, the sediment of a same spiking-concentration was divided into five aliquots of 5 g d.w. equivalent. Three

Table 1  
Reported Cd and Cu concentrations in sediments along the Lot-Garonne-Gironde continuum.

Studied area	Sampling site	Cadmium (ng/g d.w.)	Copper (ng/g d.w.)	Reference
Gironde	Le Verdon	0.43	–	Blanc et al. (1999)
	Cheyzin	0.67	33	Geffard (2001)
Garonne river	Bordeaux	0.7	29.5	Grousset et al. (1999)
	La Réole	2.6	–	Blanc et al. (1999)
	Tonneins	0.93	9.6	Grousset et al. (1999)
	Saint Léger	0.44	17.1	Grousset et al. (1999)
	Port Pascau	1.44	–	Blanc et al. (1999)
	Thouars	0.41	10.3	Grousset et al. (1999)
Lot river	Annual mean Temple/Luzech/Carjac 2006	14.8	24.4	Shinn et al. (2009)
	Annual mean Temple/Luzech/Carjac 1987	41.7	31.7	Shinn et al. (2009)
	Temple	20.4	30.7	Audry et al. (2004)
	Saint Radegonde	17	22.8	Grousset et al. (1999)
	Cajarc	125	97.7	Audry et al. (2004)
	Bouillac	26.4	–	Blanc et al. (1999)
	Riou	16.1	25.4	Grousset et al. (1999)
	Decazeville/Riou-Mort	460	–	Blanc et al. (1999)
	Marcenac	0.17	7.18	This study

aliquots were kept for embryo-toxicity testing, another one was used for chemical analysis (T0 measurement) and the last one was saved as a supplement.

#### 2.4. Fish breeding and embryos collection

Mature Japanese medakas were reared and maintained in 40 L tanks with a male:female ratio of 1:2, at a temperature of 26 °C with a photoperiod of 12 h light:12 h dark. Tanks were cleaned using a siphon and 30% was renewed with stalling water (1/3 24 h-dechlorinated tap water and 2/3 purified water by reverse osmosis; pH 7.5; 53.4 ppm CaCO<sub>3</sub>; 0.025 ppm NO<sub>2</sub>; 1.5 ppm PO<sub>4</sub>; 5 ppm NO<sub>3</sub>; 0.1 ppm NH<sub>4</sub>) twice a week. Fishes were fed once a day with dry flakes (Tetramin<sup>®</sup> Tropical, Tetra, Melle, Germany) and once a day with brine shrimp *Artemia* sp. nauplii (Ocean Nutrition, Assen, Belgium). It was visually checked daily and unhealthy fish individuals were removed and euthanized using MS222 solution at 1 g/L. During the spawning stimulation period, medaka genitors were reared at 28 °C under a 16 h:8 h light:dark photoperiod and fed four times a day. Females were examined for eggs 1 h after onset of light and egg clusters were gently removed by hand and placed in Egg Rearing Solution (ERS; 17.11 mM NaCl; 0.4 mM KCl; 0.36 mM CaCl<sub>2</sub>; 1.36 mM MgSO<sub>4</sub>; pH 7.0). Harvested eggs were pooled and then individualised by rolling them softly to sever attaching filaments. Finally, they were staged according to Iwamatsu (2004) and Gonzalez-Doncel et al. (2005) under a stereomicroscope (Leica MZ75, Leica Microsystems, Nanterre, France) and cold light source (Intralux<sup>®</sup> 4100, Volpi AG, Schlieren, Switzerland) to discard unfertilised or dead individuals and only pre-morula stage embryos (2–4 hours post fertilisation (hpf)) were selected for the study. Animal breeding and experiments on embryos and larvae were conducted in accordance to the EU directive 210/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.

#### 2.5. Embryos exposure by sediment-contact

Two distinct experiments were performed for Cd and Cu toxicity analysis. Both experiments followed the same general protocol, which consisted of three independent replicates for each condition. As mentioned above, 5 g d.w. sediment were placed in a 35 mm diameter plastic Petri dish for each replicate and each concentration. Sediment was then covered with 1 mL of ERS buffer at pH 7 and then maintained at 26 °C for 4–5 h before the beginning of the experiment.

Immediately after sorting, 30 embryos per replicate were randomly placed on a Nitex<sup>®</sup> mesh (mesh opening 1000 nm, Sefar Filtration Inc., Depew, NY, USA), which was then slightly sunk into the sediment to allow a good contact between the embryos and the sediment without any risk that embryos might get entirely buried into the sediment and die from hypoxia. ERS levels in exposure dishes were daily checked and topped in case of evaporation. Dissolved oxygen was measured daily throughout the 10-day exposure period in the reference sediment (Marcenac freeze-dried sediment) using a Clark-type sensor equipped with a guard cathode (Unisense, Aarhus, DK) and connected to a high sensitivity picoammeter (PA2000, Unisense). Good oxygenation of the medium was confirmed with values always superior to 80% saturation in the water column and at the water–sediment interface (data not shown).

Embryos were maintained in contact to the sediment during their whole embryonic development until 'hatching peak' usually around day 9–10 post-fertilisation (dpf) in control condition. Afterwards, unhatched embryos were transferred to new Petri dishes with 3 mL of clean ERS and sediments were collected at T10 for heavy metal analysis. Once hatched, larvae were placed in

beakers containing 50 mL of clean stalling water which was renewed (100% every 2 days. 48 hours post-hatching (hph) larvae were fed twice a day with TetraMin<sup>®</sup> Baby (Tetra, Melle, DE) flake food until 20 dpf.

During the whole experiment, embryos and larvae were maintained in a climate cabinet (Economic Delux, Snijders Scientific, Tilburg, NL) at 26 °C 0.3 with a 12 h:12 h photoperiod and 5000 lx white light.

#### 2.6. Lethal and sub-lethal endpoints

Viability was checked daily at embryonic and larval stages, during the whole experiment (day 1 to 20 pf). Dead embryos (whitish opaque appearance or absence of cardiac contraction after 3 dpf) were counted and removed from each replicate.

Cardiac activity was assessed at day 6 and 7 pf. Five randomly selected embryos per replicate were taken into account for this parameter. Heartbeats were counted in three 20 s-intervals per individual using Leica MZ75 stereomicroscope (Leica Microsystems, Nanterre, France) and a cold light source (Intralux<sup>®</sup> 4100, Volpi AG, Schlieren, Switzerland). Room temperature was maintained at 23.7 °C. These three measurements were then added to obtain cardiac activity in beats per minute. The five individual measurements were finally averaged to determine the mean cardiac activity for a replicate.

Time to hatch and hatching success were checked daily from the day of first hatching to the end of the experiment at day 20 pf. Only embryos able to fully exit chorions were considered as 'hatched', others were counted as 'not hatched'. Successfully hatched larvae were taken into account for time to hatch determination, noting the date of hatching and considering that the day of fertilisation was day 0.

Biometric measurements at hatching were performed every day on all newly hatched larva. Larvae were observed under a stereomicroscope (MZ75) equipped with a colour CCD camera (Leica DFC 420C), connected to a computer. A picture of whole body larvae was taken, and total body length (from the end of lower jaw to the end of caudal fin) as well as head size (from the end of lower jaw to pectoral fin attachment level) were assessed thanks to an image analysis software programme (Leica Application Suite v2.8.1). The ratio between head size and total body length (called further 'head/length ratio', expressed in percentage) was also calculated to follow possible changes in larva proportions.

Development abnormalities were observed every day on each newly hatched larva. Six different categories of abnormalities were recorded including: pericardial, perivitelline and cranial oedemata; spinal deformities (scoliosis, lordosis, kyphosis, C-shaped larvae and tail malformations); craniofacial deformities (skull and jaw deformities including underdevelopment); eye anomalies (hyper- hypo- or dystrophia, pigmentation alteration, hypopigmentation, absence of eye); cardio-vascular anomalies (hyper- hypo- or dystrophia, positioning abnormality, incomplete or abnormal heart looping, tubular heart characterised by an absence of chamber differentiation, anaemia resulting in an absence of blood circulating cells, haemorrhage, local accumulation of motionless blood cell) and yolk-sac anomalies (mainly yolk malabsorption).

#### 2.7. Comet assay

The comet assay was performed at 12 dpf on a pool of 5 larvae per replicate. Pools of larvae were digested in a MEM-Collagenase IV 0.125% (w/v) medium, and after cell viability (superior to 80%) evaluation using a trypan blue exclusion test,

Table 2  
Physico-chemical characteristics of the reference sediment (Marcenac, Lot river, France).

POC (%) <sup>a</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mM)	H <sub>2</sub> S <sup>b</sup> (mM)	D(v,0.10) <sup>a</sup> mm	D(v,0.50) <sup>a</sup> mm	D(v,0.90) <sup>a</sup> mm	r 65 mm (%)
0.11	62.3	16.8	14.75	111.49	224.74	25.82

<sup>a</sup> POC: particulate organic carbon; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: dissolved ammonia; H<sub>2</sub>S: dissolved sulphur; D(v,x): 10, 50 and 90 respective quantiles of granulometric distribution.

the comet assay was carried out following Morin et al. (2011) protocol. Ethidium bromide (20 mg/L) was used as DNA fluorescent tag and all coded-slides were randomly analysed for 75 nuclei per gel (two gels per experimental replicate) using an Olympus epi-fluorescent microscope (400 Å magnification) equipped with a grayscale CCD camera (Zeiss, DE) and Komet 5.5 software programme (Kinetic Imaging, Liverpool, UK). As recommended by Hartmann et al. (2003), tail DNA (percentage of DNA which migrates from the nucleus i.e. the head of the comet) was the selected parameter to be used for DNA damage measurement. Heavily DNA damaged nuclei displaying small or inexistent head and large diffuse tail and known as hedgehogs, were not taken into account in the comet measurement as recommended by Kumaravel et al. (2009). However, the percentage of hedgehogs which have been reported as apoptotic or necrotic cells (Olive and Banath, 1995) was visually scored on a total of 100 cells per gel.

### 2.8. Heavy metals analysis

For each sample, ERS buffer was separated from sediment by a 15 min centrifugation at 4000 rpm at room temperature.

About 1 g ww of each sediment sample was dried for 48 h at 60 °C and then digested with 3 mL 65% nitric acid for 3 h at 100 °C. Each batch of samples included method blanks and certified reference materials (Tort-2, lobster hepatopancreas, NRCC-CNRC, Ottawa, CA) and measured values were consistently within certified ranges (data not shown). After mineralisation, samples were diluted by addition of 15 mL ultrapure water (MilliQ, Bedford, MA, USA) and metal determinations were performed using an atomic absorption spectrophotometer (Varian SpectraAA 220 FS, Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

For ERS buffer analysis, about 3 mL of each sample was acidified with 1% final v/v 65% nitric acid. Samples were then analysed for Cd and Cu contents by ICP-AES (Varian Vista ProAxial, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) under standard conditions. Method blanks were added to each set of samples. The quality of the analytical method was checked by analysing the certified international reference water—(BCR403).

### 2.9. Statistical analysis

The data is expressed as mean ± standard deviation (SD). Statistical analyses were conducted using Statistica 7.1 software programme (Statsoft, Maisons-Alfort, FR). Results were initially tested for normality (Shapiro–Wilk test on residues with 1% risk) and equality of variance (Levene test, 5% risk). If necessary, data were log-transformed to fulfil normality and equality of variance criteria. Afterwards, significant differences between treatments were tested with one way ANOVA—Variance analysis followed by post-hoc Tukey test (p < 0.05). If data transformation was not sufficient to perform parametric analysis, non-parametric Kruskal–Wallis ANOVA and its post-hoc test (analogous to Bonferroni–Dunn's test) were used (p < 0.05).

## 3. Results

### 3.1. Reference sediment characterisation

Particle sizes of Marcenac sediment ranged from very fine sand to silt with a median value of 111.5 μm. The particulate organic carbon content was low (0.11%) and dissolved ammonium and sulphide in pore water reached 62 mM and 17 mM, respectively (Table 2).

### 3.2. Heavy metal content in water and sediments

Table 3 shows Cd and Cu concentrations determined in the sediments at the beginning (T0) and at the end (T10) of the embryos' exposure. Heavy metal natural background (mean of control measurement) in sediment was evaluated at 0.177 ± 0.04 μg/g d.w. for Cd and 7.187 ± 0.49 μg/g d.w. for Cu. In addition, several other trace metals were present in the reference sediment (Table 3) including

Table 3  
Heavy metal concentrations in spiked- and reference sediment at T0 and T10. T10 data are mentioned as mean ± SD (n = 3).

	Cd concentration (μg/g d.w.)		Cu concentration (μg/g d.w.)	
	T0	T10	T0	T10
Cd-spiked sediment				
Control	0.18	0.157 ± 0.00 <sup>a</sup>	8.05	7.357 ± 0.14
Cd-0.3 Å	1.91	1.837 ± 0.02 <sup>b</sup>	7.62	7.457 ± 0.11
Cd-1 Å	6.67	5.827 ± 1.69 <sup>c</sup>	7.36	7.437 ± 0.19
Cd-3 Å	19.80	17.137 ± 1.35 <sup>d</sup>	7.10	8.097 ± 0.52
Cu-spiked sediment				
Control	0.25	–	6.95	7.137 ± 0.08 <sup>a</sup>
Cu-0.3 Å	0.19	–	8.49	8.947 ± 0.51 <sup>b</sup>
Cu-1 Å	0.14	–	12.70	13.037 ± 0.13 <sup>c</sup>
Cu-3 Å	0.21	–	23.11	28.437 ± 0.64 <sup>d</sup>
Other heavy metals contents in reference sediment (μg/g d.w.)				
Co	Mn	Ni	Zn	
5.6	261	10	35	
Cr	As	Ag	Pb	
10	17.5	0.04	12.5	

Table 4  
Concentrations of heavy metal in ERS buffer from Cu- and Cd-spiked and control sediment one day (T1) and 9 days (T9) after the beginning of the exposure.

	Cd concentration (μg/L)		Cu concentration (μg/L)	
	T1	T9	T1	T9
Cadmium exposure				
Control buffer	0.1	–		
Control sediment	0.1	0.1		
Cd-0.3 Å	8.0	11.0		
Cd-1 Å	43.0	50.0		
Cd-3 Å	266.0	212.0		
Copper exposure				
Control buffer			0.1	–
Control sediment			14.2	8.7
Cu-0.3 Å			29.0	16.0
Cu-1 Å			55.0	28.0
Cu-3 Å			60.0	44.0

Co, Mn, Ni, Zn, Cr, As, Ag and Pb. In contrast, PAHs, PCBs and organochlorinated pesticides were detected at extremely low concentrations (data not shown).

A clear dose-dependent increase of Cu and Cd contents was observed for Cu- and Cd-spiked sediments, respectively. Measured Cd concentrations were very close to nominal values while Cu concentrations were slightly above, likely because of the natural background level of Cu in Marcenac sediment. The comparison between T0 and T10 values showed that more than 80% of the initial Cu or Cd concentrations were still present in the sediments at the end of the exposure (Table 3). These results indicate that sediment contamination remained stable over time and that treatments are significantly different from one another.

Cd and Cu concentrations were also measured in the ERS buffer from the reference and spiked sediments (Table 4). The Cd



content of the ERS buffer was below the quantification limit in both ERS and sediment controls but increased in a dose-dependent manner from 8 to 266  $\mu\text{g/L}$  for the three Cd-spiked sediments. Cu content was below the quantification limit for the control ERS but it reached 14.2  $\mu\text{g/L}$  for the control sediment. This unexpected contamination was likely issued from the desorption of particle-bound Cu in the control sediment. A slight increase of Cu content from 29 to 60  $\mu\text{g/L}$  was noticeable for the three Cu-spiked sediments. Data comparison between T1 and T9 showed that Cd concentrations remained globally constant while Cu concentrations decreased with time from 30% to 45%. The pH of the ERS buffer only slightly varied from 7.0 to 7.7 in the course of the experiment.

### 3.3. Embryonic and larval survivals

Cd and Cu tested concentrations did not induce lethal effects on both embryos and larvae. Viability for Cd-exposed fish ranged from 81% to 91% at the embryonic stage (Fig. 1a) and from 80% to 85% at the larval stage (Fig. 1b) according to exposure conditions. Similarly, Cu-exposed embryos' viability ranged from 93% to 99% (Fig. 1a) and larval survival ranged from 71% to 81% (Fig. 1b) for the various treatments.

### 3.4. Hatching rate and time to hatch

Almost all viable embryos hatched before the end of the experiment for both heavy metal exposures. As a result, hatching rates were very close to embryonic viability and no significant difference was observed in the treatments. Indeed, mean hatching success ranged from 80% to 91% for Cd-exposed embryos and from 93% to 99% for Cu-exposed embryos (Fig. 2a).

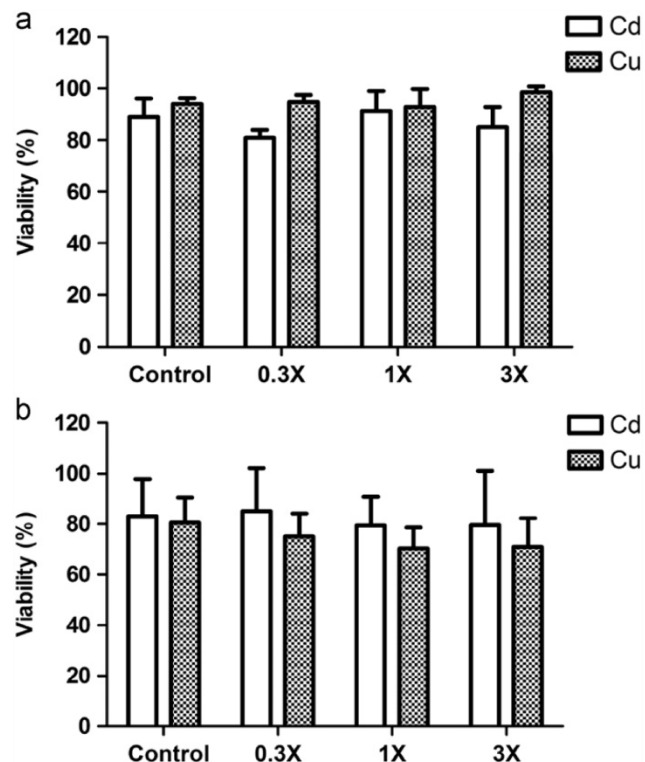


Fig. 1. Embryonic (a) and larval (b) viabilities following medaka embryos exposure to Cd or Cu-spiked sediments. Values represent the mean response (7 SD) from three replicates. No significant difference was observed between treatments for both heavy metals.

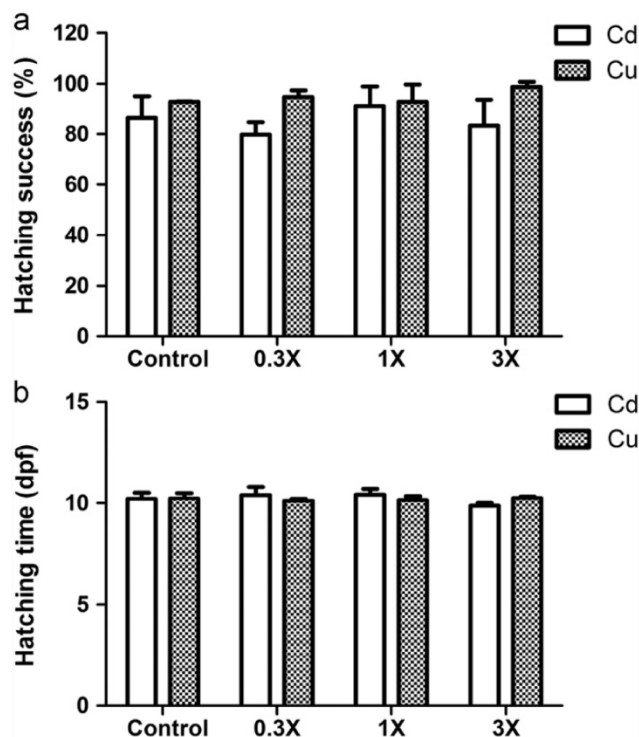


Fig. 2. Hatching success (a) and time to hatch (b) following medaka embryos exposure to Cd or Cu-spiked sediments. Values represent the mean response (7 SD) from three replicates. No significant difference was observed between treatments for both heavy metals.

Embryonic developmental time, corresponding to the time to hatch, was not affected by heavy metal exposures. Actually, for both experiments, mean time to hatch was around 10.27  $\pm$  0.17 dpf (Fig. 2b) for treatment groups.

### 3.5. Cardiac activity

Cu exposure did not affect the embryos' cardiac activity in comparison to that of the control group, neither at 6 dpf nor at 7 dpf. Conversely, heartbeats of 6 dpf-embryos were significantly increased at Cd-3  $\text{\AA}$  concentration compared to those of the control group (156 and 131 beats/min on average, respectively, Fig. 3a). This result was confirmed at 7 dpf, with a significant increase of cardiac activity in embryos exposed to Cd-1  $\text{\AA}$  and Cd-3  $\text{\AA}$  in comparison to the control group (156, 160 and 137 beats/min on average respectively; Fig. 3b).

### 3.6. Biometric measurements

Neither Cd nor Cu exposure induced modifications of larval biometric parameters, as compared to the respective control groups. Total body length of Cd-exposed larvae ranged from 4.95 to 5.00 mm on average (Fig. 4a), head size from 1.05 to 1.07 mm on average (Fig. 4b) and head/length ratio from 21.5% to 22.1% on average (Fig. 4c).

Interestingly, a slight significant increase of the three biometric parameters was observed on larvae from the Cu-3  $\text{\AA}$  group in comparison to Cu-0.3  $\text{\AA}$  group (average total length, 5.03 mm and 4.90 mm, respectively; average head size, 1.11 mm and 1.05 mm, respectively; average head/length ratio, 22.0% and 21.5% respectively; Fig. 4a–c).

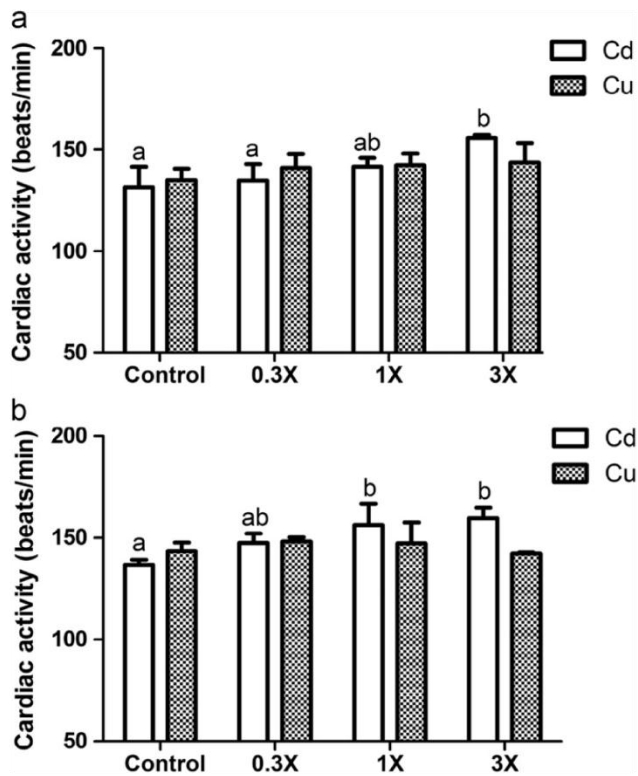


Fig. 3. Cardiac activity measured in 6 dpf- (a) and 7 dpf-embryos (b) following Cd- or Cu-spiked sediment exposures. Values represent the mean response (7 SD) from three replicates. For each condition, means with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) according to the results of one-way ANOVA followed by Tukey's test.

Average values for these measurements were very similar in control groups of Cd and Cu exposures.

### 3.7. Morphological abnormalities

Morphological abnormalities on medaka larvae were recorded on hatching day for each individual and summarised in Table 5. Percentages of abnormal larvae in control groups were around 20%. Larval abnormalities in Cd-exposed groups were superior to 60% and significantly different ( $p < 0.01$ ) from those of the control treatment. More precisely, Cd exposure significantly increased the percentage of larvae developing spinal deformities (mainly kyphosis, lordosis and C-shaped larvae) and cardio-vascular anomalies (mainly abnormal positioning and heart looping) at 0.3 Å and 3 Å concentrations (for 1 Å group,  $p < 0.074$ ).

Cu exposure had overall the same effect as Cd. The percentage of deformed larvae significantly increased ( $p < 0.04$ ) up to 50% for each contaminated groups in comparison to control treatment (17% of deformed larvae). As observed during the Cd experiment, developmental abnormalities mainly concerned spinal column (kyphosis and lordosis) and cardiovascular system (abnormal positioning and heart looping). Percentage of individuals affected by this kind of deformities was significantly higher in Cu-3 Å ( $p < 0.049$ ) and Cu-1 Å ( $p < 0.020$ ) groups, respectively, in comparison to control treatment. Average percentage of individuals with spinal deformities in Cu-0.3 Å treatment was close to significance threshold with  $p < 0.077$ . Moreover, yolk malabsorptions were significantly increased by Cu-1 Å treatment compared to control (23% and 9% respectively).  $p$ -value between Cu-3 Å - and control groups was not far from significance threshold ( $p < 0.061$ ).

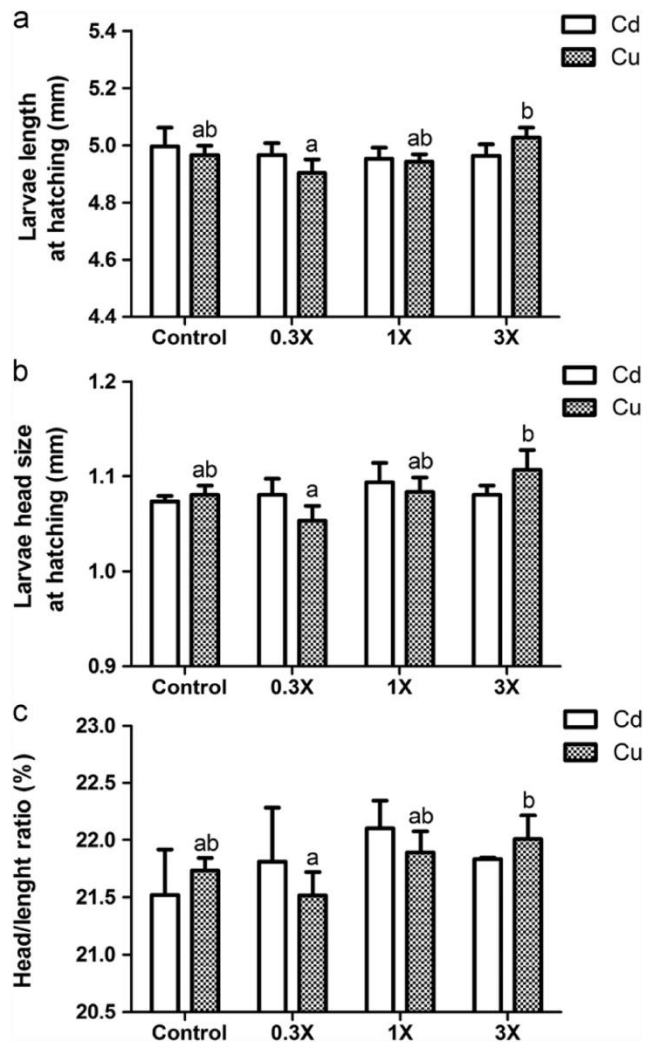


Fig. 4. Total body length (a), head length (b) and head/length ratio (c) of medaka larvae at hatching following Cd- or Cu-spiked sediment exposures. Values represent the mean response (7 SD) from three replicates. For each experiment, means with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) according to the results of one-way ANOVA followed by Tukey's test.

### 3.8. Genotoxic effects

The mean percentage of tail DNA measured in control groups was inferior to 10% which confirmed that cells, even after dissociation treatment, were in satisfactory conditions for comet assay analysis (Collins, 2004).

Cd exposure led to a significant DNA damage induction ( $p < 0.001$ ) from the lowest concentration as shown by the significant increase in the percentage of tail DNA from 7% for the control group up to 48–60% in average for contaminated groups (Fig. 5a). The percentage of 'hedgehog cells' showed the same response pattern as it raised to 25–28% for Cd-exposed group against only 12% in the control group (Fig. 5b).

Only Cu-0.3 Å and Cu-3 Å concentrations induced significant DNA damage increase in comparison to control group (5% of tail DNA in control versus 16% in Cu exposed groups in average, Fig. 5a). As noticed in the Cd experiment, similar results were observed with the percentage of 'hedgehog cells', which was significantly increased at the lowest, and at the highest Cu doses (30% and 25% respectively, Fig. 5b) compared to control (11% in average).

Table 5

Developmental deformities observed on larvae at hatching following Cd or Cu exposures. Results are expressed in percentage of impaired larvae among overall hatched individuals. Data are mentioned as mean  $\pm$  SD (N/43)<sup>a</sup>.

	Deformed larvae	Oedemata	Spinal deformities	Craniofacial malformations	Eye abnormalities	Cardio-vascular anomalies	Yolk-sac malabsorption
Cadmium exposure							
Control	20.37 4.5 <sup>a</sup>	4.27 0.7	6.27 5.6 <sup>a</sup>	2.57 2.2	0.07 0.0	10.97 1.0 <sup>a</sup>	14.17 6.0
Cd-0.3 Å	72.17 19.4 <sup>b</sup>	11.47 3.2	56.27 23.4 <sup>b</sup>	1.77 2.9	1.77 2.9	25.67 5.9 <sup>b</sup>	19.47 1.0
Cd-1 Å	62.27 6.3 <sup>b</sup>	7.17 3.5	40.77 8.5 <sup>ab</sup>	0.07 0.0	0.07 0.0	22.17 3.9 <sup>ab</sup>	18.47 7.4
Cd-3 Å	68.07 18.4 <sup>b</sup>	7.97 3.2	58.67 23.0 <sup>b</sup>	1.37 2.2	0.07 0.0	24.37 6.0 <sup>b</sup>	8.77 3.4
Copper exposure							
Control	16.57 5.2 <sup>a</sup>	2.57 4.3	7.57 6.5 <sup>a</sup>	3.77 6.4	2.57 4.3	9.07 2.6 <sup>a</sup>	8.87 5.5 <sup>a</sup>
Cu-0.3 Å	51.27 16.2 <sup>b</sup>	2.87 2.5	32.47 11.3 <sup>ab</sup>	0.07 0.0	0.07 0.0	11.57 6.7 <sup>a</sup>	13.67 4.0 <sup>ab</sup>
Cu-1 Å	47.67 2.6 <sup>b</sup>	5.47 4.7	18.67 12.8 <sup>ab</sup>	1.37 2.3	0.07 0.0	29.27 4.8 <sup>b</sup>	23.07 1.9 <sup>b</sup>
Cu-3 Å	51.97 6.6 <sup>b</sup>	2.47 4.1	35.27 10.4 <sup>b</sup>	1.27 2.1	0.07 0.0	17.97 9.3 <sup>ab</sup>	21.47 7.2 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup> Means with different letters on each column are significantly different (po 0.05) according to the results of one-way ANOVA followed by Tukey's test

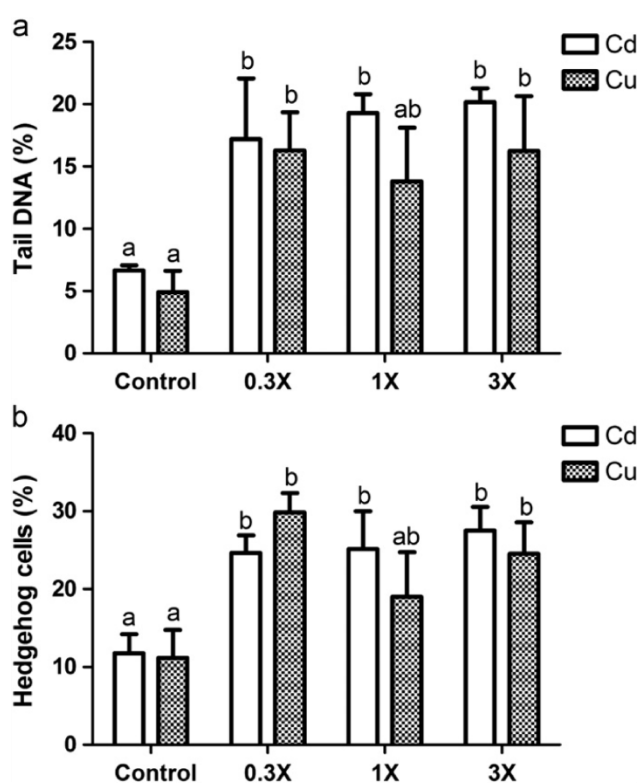


Fig. 5. Impact of Cd and Cu treatments on DNA integrity of medaka larvae assessed with the comet assay. Percentage of tail DNA (a) was recorded as an indicator of global genotoxic potency of chemicals and the percentage of 'hedgehog' cells (b) was determined to illustrate the presence of necrotic or apoptotic cells. Values represent the mean response ( $\pm$  SD) from three replicates. For each experiment, means with different letters are significantly different (po 0.05) according to the results of one-way ANOVA followed by Tukey's test.

#### 4. Discussion

Medaka embryos that were allowed to develop in direct contact to control sediment in our test conditions showed survival rates around 90% and 80% at embryonic and larval stages, respectively, and hatching success superior to 85%. These results are in compliance with the guidelines for ELS assays which set minimum hatching success and survival rate after hatching at 80% each (OECD, 1992, 1998).

Average times to hatch observed in control treatment were very similar in both experiments (10.2 dpf for both Cd and Cu exposures) with more than 70% of embryos hatching at 10 dpf.

These results are in compliance with observations reported in the literature which describe hatching as usually occurring between 9 and 12 dpf at 25–26 °C for the Japanese medaka (Gonzalez-Doncel et al., 2003a; Farwell et al., 2006; Gonzalez-Doncel et al., 2008).

Similarly, biometric measurements average values were very close to those of the control groups of both experiments. Several authors reported total body length of Japanese medaka larvae at hatching between 3.8 and 4.7 mm in average (Iwamatsu, 2004; Farwell et al., 2006; Oxendine et al., 2006). With an average total body length nearby 5 mm for both experiments, unexposed larvae from our stockbreeding are a bit longer in comparison with the data reported above. These biometric variations in unexposed individuals between experiments and laboratories might be closely linked to breeding conditions of genitors and embryos development environment.

During both experiments, baseline cardiac activity in control embryos ranged between 130 and 140 beats per minute. This data is quite inferior to that reported by Gonzalez-Doncel et al. (2005) who measured a cardiac rhythm stabilised at 180 beats per minutes in 7 dpf-embryos but very similar to the results obtained by Nassef et al. (2010) in 6 dpf-control embryos.

Developmental abnormalities are currently used as sensitive endpoints in embryo-larval bioassays. In this study, many kinds of defects were recorded from the optimal development (as described by Iwamatsu, 2004; Gonzalez-Doncel et al., 2005) and the baseline level of abnormal larvae ranged from 16% to 20% depending on the considered experiment. Such a percentage of larval abnormalities have already been reported in unexposed larvae for various fish species including medaka (Farwell et al., 2006; Benaduce et al., 2008) but was almost twice higher than the previously reported baseline data (Vicquelin et al., 2011). It may be partly explained by the metal content differences between the two reference sediments. Indeed, the reference sediment from Marcenac which was used in the present study contained detectable levels of certain metal species including Cu (Table 3) and it was shown that at least a fraction of the particle-bound Cu was released in the water column within 24 h after the beginning of the experiment (Table 4). Moreover, deformity categories (types of deformity and number of categories) recorded and recognition criteria (severity, minimum score for healthy/deformed classification) are variable between studies and strongly influence the number of individuals considered as 'deformed' or not. In this study, we selected a wide range of malformations categories and even weak abnormalities were taken into account.

Both lethal and sub-lethal endpoints observed in control groups enable this sediment-contact assay to be validated as it provides with acceptable conditions for medaka embryo development. As a result, natural Cu background level of 7 ng/g d.w.

in sediment corresponding in our test conditions to about 14  $\mu\text{g/L}$  of Cu released in the water column seems to have limited effects on medaka embryo survival and development.

Spiked Cu- or Cd-concentrations up to 20  $\mu\text{g/g}$  of d.w. sediment (up to 266  $\mu\text{g/L}$  Cd and 60  $\mu\text{g/L}$  Cu in water) neither affected medaka survival nor hatching success or time to hatch. Absence of acute effects using the same endpoints was also reported after waterborne exposure of medaka late morula staged embryos (5 hpf) to Cd at concentrations from 2.5 to 80  $\mu\text{g/L}$ . In a second experiment, Cd exposure was initiated during fertilisation and led to a significant reduction of hatching success from 20  $\mu\text{g/L}$  of Cd (Gonzalez-Doncel et al., 2003b). In rainbow trout embryos, premature or delayed hatching was observed following exposure to 0.05–2.5  $\mu\text{g/L}$  Cd depending on the concentration level (Lizardo-Daudt and Kennedy, 2008).

Although no acute effect was observed in medaka embryos, a significant increase in morphological deformities was induced in newly hatched larvae at concentrations as low as 1.9  $\mu\text{g/g}$  Cd or 8.5  $\mu\text{g/g}$  Cu in sediment (1.9  $\mu\text{g/L}$  Cd and 29  $\mu\text{g/L}$  Cu in water). More precisely, Cu significantly enhanced spinal deformities (kyphosis and lordosis mainly), cardiac anomalies (in particular abnormal positioning and heart looping) and yolk-sac malabsorption while Cd only affected the vertebral column and cardiovascular system.

Numerous studies documented developmental effects of heavy metals and more specifically Cd and Cu in fish species. For instance, *Pagrus major* embryos exposed to 0.8 up to 3.2  $\text{mg/L}$  of Cd led to 42–100% of morphological abnormalities (Cao et al., 2009). Lugowska and Witeska (2004) reported a high percentage of deformed larvae, sometimes superior to 60% among common carp individuals exposed to 0.2  $\text{mg/L}$  of Cu. Several categories of abnormalities have been reported including blastodermal lesions, yolk-sac and heart oedemata, haemorrhages, damaged blood vessels, hypopigmentation, craniofacial deformities including head and eye hypoplasia, cardiac abnormalities, deformed yolk sac and vertebral deformities including C-shaped larvae, shortened body and altered axial curvature (Cheng et al., 2000, 2001; Lugowska and Witeska, 2004).

Skeletal deformities are commonly observed after Cu and Cd exposures of fish embryos and are generally one of the predominant observed malformations (Chow and Cheng, 2003; Lugowska and Witeska, 2004), sometimes representing more than 80% of all recorded defects (Jęzierska et al., 2000). It had been reported that Cd exposure induces a reduction of myosin heavy chain production in the trunk which is correlated to a disorganisation of myotomes in the somites and results in altered spinal curvature (Cheng et al., 2000; Chow and Cheng, 2003).

As previously mentioned, fish cardiovascular system is also a target of heavy metal toxicity. Indeed various cardiovascular pathologies were described following exposures to heavy metals including haemorrhages, hypertension, oedemata (a result of an alteration of vascular permeability), megalocardiases, circulatory collapse, tubular heart, heart rate alteration, red blood cells accumulation, atrium/ventricle morphology alteration, abnormal heart looping and aberrant vascular patterning (Cheng et al., 2001; Gonzalez-Doncel et al., 2003b; Cao et al., 2009; Li et al., 2009). Although these pathologies are frequently reported in the literature, little is known about the exact mechanisms involved in such cardiovascular dysfunctions. Several works previously showed an alteration of the cardiac functions following Cu or Cd exposure. For instance, zebrafish embryo heart rate was significantly increased by Cu exposure (Johnson et al., 2007) whereas Cd reduced the cardiac activity of the red sea bream (Cao et al., 2009) and zebrafish embryo (Hallare et al., 2005b). An explanation proposed by the authors for the alteration of cardiac functions is a perturbation of ionic channels such as  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases

following Cd treatment or  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases following Cu exposure (Wong and Wong, 2000; Eyckmans et al., 2010). The respective results of such ionoderegulation would be a reduced  $\text{Ca}^{2+}$  uptake leading to the observed bradycardia and stress response increasing heart rate (Johnson et al., 2007; Cao et al., 2009). It also had been shown that cardiac function and hemodynamic conditions strongly influence cardiac morphogenesis and vascular endothelium modelling (Glickman and Yelon, 2002; Sidi and Rosa, 2004). Moreover, cardiac morphologic alterations described by Hove et al. (2003) following artificial perturbations of blood flow are very similar to those observed in the present study (abnormal positioning and heart looping) after Cu and Cd exposures. These observations seemed to confirm the strong relationship existing between cardiac functions and cardiac morphogenesis as mentioned by Incardona et al. (2004).

In the present study, yolk-sac malabsorptions were significantly increased following embryonic Cu exposure to 23  $\mu\text{g/g}$  d.w. sediment (60  $\mu\text{g/L}$  in water). Lugowska and Witeska (2004) recorded yolk-sac resorption defects in common carp larvae after exposure to 0.2  $\text{mg/L}$  of Cu. Yolk sac area in zebrafish larvae exposed to 190–464  $\mu\text{g/L}$  of Cu was significantly larger in comparison to control larvae (Johnson et al., 2007). A concomitant decrease of zebrafish length was also observed and the authors concluded that Cu induced a reduction of yolk utilisation and embryonic rate of development impairment. However, in our study, no diminution of larvae size was observed after Cu exposure.

Another aspect of heavy metal toxicity that was highlighted during the medaka embryo exposure to Cd and Cu was the genotoxic potency of these compounds. Actually, DNA damage was significantly increased in 2 dph-larvae following Cu and Cd exposure from the lowest concentration (1.9  $\mu\text{g/g}$  Cd and 8.5  $\mu\text{g/g}$  Cu). DNA damage assessed with the comet assay has already been reported in fish cells following Cu and Cd during in vivo or in vitro exposures (Risso-de Faverney et al., 2001; Bopp et al., 2008; Morin et al., 2011). It has been hypothesised and partially demonstrated that both heavy metals indirectly generate DNA strand breaks via reactive oxygen species production which could lead to cell death and/or apoptosis (Risso-de Faverney et al., 2001; Manzi et al., 2004; Bopp et al., 2008). The significant increase of 'hedgehog cells' observed in the present study seems to confirm this conclusion. However, the origin of such heavily damaged cells is still unclear. Previous works have demonstrated that apoptotic cells did not systematically result in 'hedgehog cells' after comet assay performing (Meintieres et al., 2003). Moreover, it has been reported that these comets, characterised with a small or inexistent head with a highly diffused tail physically separate from the head, could be the result of apoptosis or necrosis but also of high radiation doses or potent mutagen exposures (Burlinson et al., 2007; Kumaravel et al., 2009).

Overall observed effects of Cd and Cu were very comparable which seems to indicate similar mode of actions, probably based on oxidative stress generation and/or ionoregulation alteration as mentioned above. It had already been reported that equivalent concentrations of Cu and Cd caused similar teratogenic impairments in common carp larvae (Lugowska and Witeska, 2004; Lugowska, 2007). The results of the present study are used to establish the Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) values for sedimentary compartment as regards the two tested heavy metals using the most sensitive endpoints. Indeed, both percentages of abnormal larvae and tail DNA were significantly increased following the medaka embryo exposure to even the weakest tested concentration of Cd and Cu, resulting in LOEC values of 1.9  $\mu\text{g/g}$  (8  $\mu\text{g/L}$ ) and 8.5  $\mu\text{g/g}$  (29  $\mu\text{g/L}$ ), respectively. The values take into account the overall metal content of sediment and indicate a higher toxicity of Cd compared to that of Cu.

Table 6  
Toxicity of cadmium to different aquatic organisms using Cd-spiked sediments.

Organism	Endpoint	Test duration (days)	LOEC <sub>Cd</sub> (ng/g d.w.)	References
Consensus-based TEC <sup>a</sup>	–	–	0.99	MacDonald et al. (2000)
<b>Amphipods</b>				
Melita plumulosa (adult)	Survival	10	4 260	King et al. (2006)
Melita plumulosa (juvenile)	Survival	10	820	King et al. (2006)
Chaetocorophium cf. lucasi	Survival	10	748 (in situ)	Dewitt et al. (1999)
Hyalella azteca	Survival	4	128 <sup>b</sup>	Nebeker et al. (1986)
<b>Gastropods</b>				
Helisoma sp.	Survival	10	340 <sup>b</sup>	Ditoro et al. (1992)
<b>Insect larvae</b>				
Chironomus riparius	Emergence	28	0.5	Marinkovic et al. (2011)

<sup>a</sup> TEC: threshold effect concentration.

<sup>b</sup> NOEC value.

Table 7  
Toxicity of copper to different aquatic organisms using Cu-spiked sediments.

Organism	Endpoint	Test duration	LOEC <sub>Cu</sub> (ng/g d.w.)	Reference
'Consensus-based TEC <sup>a</sup>	–	–	31.6	MacDonald et al. (2000)
<b>Amphipods</b>				
Hyalella azteca	Survival	14 days	180	Roman et al. (2007)
Hyalella azteca	Growth	28 days	95.4	Roman et al. (2007)
Gammarus pulex	Survival/growth	35 days	176	Roman et al. (2007)
Melita plumulosa (adult)	Survival	10 days	550	King et al. (2006)
Melita plumulosa (juvenile)	Survival	10 days	820	King et al. (2006)
<b>Insect larvae</b>				
Chironomus riparius	Survival	14 days	180	Roman et al. (2007)
Chironomus riparius	Growth	28 days	188	Roman et al. (2007)
Chironomus riparius	Emergence	28 days	89.2	Roman et al. (2007)
Chironomus riparius	Emergence	28 days	17.2	Marinkovic et al. (2011)
<b>Oligochaetes</b>				
Lumbriculus variegatus	Survival	28 days	140	Roman et al. (2007)
Lumbriculus variegatus	Biomass	28 days	103	Roman et al. (2007)
Lumbriculus variegatus	Reproduction	28 days	103	Roman et al. (2007)
Tubifex tubifex	Survival	28 days	158	Roman et al. (2007)
Tubifex tubifex	Growth	28 days	102	Roman et al. (2007)
Tubifex tubifex	Reproduction	28 days	102	Roman et al. (2007)
Tubifex tubifex	Reproduction	28 days	92–166	Pasteris et al. (2003)

<sup>a</sup> TEC: Threshold effect concentration.

Present LOEC values are generally much lower than those reported in the literature, which varied from 0.5 ng/g to 861 ng/g for Cd (Table 6) and from 17.2 ng/g to more than 820 ng/g for Cu (Table 7). In fact, most of the LOEC were obtained in invertebrates. It can be hypothesised that fish ELS are much more sensitive to metals such as Cu and Cd. This implies that Cd and Cu accumulated in natural sediments may represent a threat for wild fish embryos developing in direct contact to sediments. Indeed, most of the sediments along the Lot-Garonne-Gironde fluvial system present Cd and/or Cu contents superior to the LOEC determined in the present study (Table 1). However, it should be kept in mind that metal bioavailability likely differs between 'naturally' and artificially contaminated sediments in particular for freshly spiked sediments. In the present study, embryo exposure was performed within 4–5 h following sediment spiking. This probably results in a maximisation of Cd and Cu availability and thus to an overestimation of Cd and Cu toxic potencies. However, since sediment spiking was performed by simply adding metal-contaminated water to sediment under agitation, this may mimic an accidental and recent release of Cu or Cd in aquatic environment (Burton, 1991). Sediment ageing could be performed to better mimic chronic contamination of sediments.

Several sublethal endpoints were significantly induced following Cd or Cu exposures and the most sensitive were the percentages of deformed larvae and tail DNA measurement. This kind of sensitive, integrative, low-cost and easy handling endpoints could be really useful in future normalised bioassays to assess the toxicity of sediments.

Finally, the present study demonstrated a successful application of MELA to the evaluation of the toxicity of metals accumulated in sediments. A standardisation of the spiking matrix, using an artificial sediment and ageing process, could improve MELA's sensitivity and applicability. Moreover, the MELA could also be enriched by a mechanistic approach using molecular tools for instance, gene expression monitoring, enzymatic activity measurements and/or proteomics analysis performed on embryos and larvae.

## 5. Conclusion

Observations on control embryos demonstrate that the sediment-contact exposure protocol performed in this study provides acceptable conditions for medaka embryo development. Results

obtained in contaminated groups showed obvious sublethal effects of both Cu and Cd on medaka development. Developmental defects mainly included spinal deformities, yolk-sac malabsorption and cardio-vascular injuries. Moreover, genotoxic effects were induced by both metals in 2-day-old larvae. Consequently, the percentage of deformed larvae and tail DNA measurements appeared as relevant markers in sediment toxicity assessment. This study demonstrates the applicability of MELA to the evaluation of sediment hazardous potency at environmental concentrations of metals. Moreover, it confirms the importance of performing both chemical analyses and pertinent toxicity tests to evaluate hazards of pollutants accumulated in sediments since low concentrations of heavy metals could result in non-negligible deleterious effects on early developmental stages of various fish species.

#### Acknowledgments

This study was supported by the Aquitaine region, the Seine-Aval programme and University of Bordeaux 1.

#### References

- Audry, S., Grosbois, C., Bril, H., Schafer, J., Kierczak, J., Blanc, G., 2010. Post-depositional redistribution of trace metals in reservoir sediments of a mining/smelting-impacted watershed (the Lot River, SW France). *Appl. Geochem.* 25, 778–794.
- Audry, S., Schafer, J., Blanc, G., Juanneau, J.M., 2004. Fifty-year sedimentary record of heavy metal pollution (Cd, Zn, Cu, Pb) in the Lot River reservoirs (France). *Environ. Pollut.* 132, 413–426.
- Benaduce, A.P.S., Kochhann, D., Flores, E.M.M., Dressler, V.L., Baldisserotto, B., 2008. Toxicity of cadmium for silver catfish *Rhamdia quelen* (Heptapteridae) embryos and larvae at different alkalinities. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 274–282.
- Blanc, G., Lapaquellerie, Y., Maillet, N., Anschutz, P., 1999. A cadmium budget for the Lot-Garonne fluvial system (France). *Hydrobiologia* 410, 331–341.
- Bopp, S.K., Abicht, H.K., Knauer, K., 2008. Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. *Aquat. Toxicol.* 86, 197–204.
- Burlinson, B., Tice, R.R., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, S.Y., Collins, A.R., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, T.S., Nakajima, M., Sasaki, Y.F., Thybaud, V., Uno, Y., Vasquez, M., Hartmann, A., 2007. Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutagenesis* 627, 31–35.
- Burton Jr, G.A., 1991. Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1585–1627.
- Cao, L., Huang, W., Shan, X., Xiao, Z., Wang, Q., Dou, S., 2009. Cadmium toxicity to embryonic-larval development and survival in red sea bream *Pagrus major*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1966–1974.
- Carlson, E.A., Li, Y., Zelikoff, J.T., 2002. Exposure of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to benzo[a]pyrene suppresses immune function and host resistance against bacterial challenge. *Aquat. Toxicol.* 56, 289–301.
- Chapman, P.M., Wang, F.Y., Janssen, C., Persoone, G., Allen, H.E., 1998. Ecotoxicology of metals in aquatic sediments: binding and release, bioavailability, risk assessment, and remediation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55, 2221–2243.
- Cheng, S.H., Chan, P.K., Wu, R.S.S., 2001. The use of microangiography in detecting aberrant vasculature in zebrafish embryos exposed to cadmium. *Aquat. Toxicol.* 52, 61–71.
- Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H., Wu, R.S.S., 2000. Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 3024–3031.
- Chow, E.S.H., Cheng, S.H., 2003. Cadmium affects muscle type development and axon growth in zebrafish embryonic somitogenesis. *Toxicol. Sci.* 73, 149–159.
- Cline, J.D., 1969. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* 14, 454–458.
- Collins, A.R., 2004. The comet assay for DNA damage and repair - principles, applications and limitations. *Mol. Biotechnol.* 26, 249–261.
- Dewitt, T.H., Hickey, C.W., Morrissey, D.J., Nipper, M.G., Roper, D.S., Williamson, R.B., Dam, L.V., Williams, E.K., 1999. Do amphipods have the same concentration-response to contaminated sediment in situ as in vitro? *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1026–1037.
- Ditoro, D.M., Mahony, J.D., Hansen, D.J., Scott, K.J., Carlson, A.R., Ankley, G.T., 1992. Acid volatile sulphide predicts the acute toxicity of cadmium and nickel in sediments. *Environ. Sci. Technol.* 26, 96–101.
- EC, 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy, vol. L327. *Off. J. Eur. Communities*, 1–72.
- EC, 2010. Directive 2010/63/EC of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes, vol. L273. *Off. J. Eur. Communities*, 33–79.
- Etcheber, H., Relexans, J.-C., Beliard, M., Weber, O., Buscail, R., Heussner, S., 1999. Distribution and quality of sedimentary organic matter on the Aquitanian margin (Bay of Biscay). *Deep-Sea Res.* 46, 2249–2288.
- Eyckmans, M., Tudorache, C., Darras, V.M., Blust, R., De Boeck, G., 2010. Hormonal and ion regulatory response in three freshwater fish species following waterborne copper exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C* 152, 270–278.
- Farwell, A., Nero, V., Croft, M., Bal, P., Dixon, D.G., 2006. Modified Japanese medaka embryo-larval bioassay for rapid determination of developmental abnormalities. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 600–607.
- Geffard, O., 2001. Toxicité potentielle des sédiments marins et estuariens contaminés: évaluation chimique et biologique, biodisponibilité des contaminants sédimentaires. *Ecotoxicology, Thesis. University Bordeaux 1, Bordeaux, France*, p. 376.
- Glickman, N.S., Yelon, D., 2002. Cardiac development in zebrafish: coordination of form and function. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13, 507–513.
- Gonzalez-Doncel, M., de la Pena, E., Barrueco, C., Hinton, D.E., 2003a. Stage sensitivity of medaka (*Oryzias latipes*) eggs and embryos to permethrin. *Aquat. Toxicol.* 62, 255–268.
- Gonzalez-Doncel, M., Larrea, M., Sanchez-Fortun, S., Hinton, D.E., 2003b. Influence of water hardening of the chorion on cadmium accumulation in medaka (*Oryzias latipes*) eggs. *Chemosphere* 52, 75–83.
- Gonzalez-Doncel, M., Okihira, M.S., Villalobos, S.A., Hinton, D.E., Tarazona, J.V., 2005. A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrianichthyidae). *J. Appl. Ichthyol.* 21, 39–52.
- Gonzalez-Doncel, M., Gonzalez, L., Fernandez-Torija, C., Navas, J.M., Tarazona, J.V., 2008. Toxic effects of an oil spill on fish early life stages may not be exclusively associated to PAHs: studies with Prestige oil and medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 87, 280–288.
- Grousset, F.E., Juanneau, J.M., Castaing, P., Lavaux, G., Latouche, C., 1999. A 70 year record of contamination from industrial activity along the Garonne River and its tributaries (SW France). *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* 48, 401–414.
- Hallare, A.V., Kosmehl, T., Schulze, T., Hollert, H., Kohler, H.R., Triebkorn, R., 2005a. Assessing contamination levels of Laguna Lake sediments (Philippines) using a contact assay with zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Sci. Total Environ.* 347, 254–271.
- Hallare, A.V., Schirling, M., Luckenbach, T., Kohler, H.R., Triebkorn, R., 2005b. Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J. Therm. Biol.* 30, 7–17.
- Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R.R., 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18, 45–51.
- Helmstetter, M.F., Alden III, R.W., 1995. Toxic responses of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs following topical and immersion exposures to pentachlorophenol. *Aquat. Toxicol.* 32, 15–29.
- Hollert, H., Keiter, S., König, N., Rudolf, M., Ulrich, M., Braunbeck, T., 2003. A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J. Soils Sediments* 3, 197–207.
- Hove, J.R., Koster, R.W., Forouhar, A.S., Acevedo-Bolton, G., Fraser, S.E., Gharib, M., 2003. Intracardiac fluid forces are an essential epigenetic factor for embryonic cardiogenesis. *Nature* 421, 172–177.
- Incardona, J.P., Collier, T.K., Scholz, N.L., 2004. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196, 191–205.
- Iwamatsu, T., 2004. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mech. Dev.* 121, 605–618.
- Jęzierska, B., Lugowska, K., Witeska, M., 2009. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). *Fish Physiol. Biochem.* 35, 625–640.
- Jęzierska, B., Lugowska, K., Witeska, M., Sarnowski, P., 2000. Malformations of newly hatched common carp larvae. *J. Pol. Agric. Univ.*
- Johnson, A., Carew, E., Soman, K.A., 2007. The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol.* 84, 431–438.
- King, C.K., Gale, S.A., Stauber, J.L., 2006. Acute toxicity and bioaccumulation of aqueous and sediment-bound metals in the estuarine amphipod *Meleta plumulosa*. *Environ. Toxicol.* 21, 489–504.
- Kosmehl, T., Hallare, A.V., Braunbeck, T., Hollert, H., 2008. DNA damage induced by genotoxicants in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after contact exposure to freeze-dried sediment and sediment extracts from Laguna Lake (The Philippines) as measured by the comet assay. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 650, 1–14.
- Kosmehl, T., Hallare, A.V., Reifferscheid, G., Manz, W., Braunbeck, T., Hollert, H., 2006. A novel contact assay for testing genotoxicity of chemicals and whole sediments in zebrafish embryos. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2097–2106.
- Kumaravel, T.S., Vilhar, B., Faux, S.P., Jha, A.N., 2009. Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biol. Toxicol.* 25, 53–64.
- Li, D., Lu, C.L., Wang, J., Hu, W., Cao, Z.F., Sun, D.G., Xia, H.F., Ma, X., 2009. Developmental mechanisms of arsenite toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquat. Toxicol.* 91, 229–237.
- Lizardo-Daudt, H.M., Kennedy, C., 2008. Effects of cadmium chloride on the development of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* early life stages. *J. Fish Biol.* 73, 702–718.

- Lugowska, K., 2007. The effect of cadmium and cadmium/copper mixture during the embryonic development of common carp larvae, 10. *Electron. J. Pol. Agric. Univ.*
- Lugowska, K., Witeska, M., 2004. The effect of copper exposure during embryonic development on deformations of newly hatched common carp larvae, and further consequences, 7. *Electron. J. Pol. Agric. Univ.*
- MacDonald, D.D., Ingersoll, C.G., Berger, T.A., 2000. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 20–31.
- Mages, M., Bandow, N., Kuster, E., Brack, W., von Tumpling, W., 2008. Zinc and cadmium accumulation in single zebrafish (*Danio rerio*) embryos—a total reflection X-ray fluorescence spectrometry application. *Spectrochim. Acta B* 63, 1443–1449.
- Manzi, C., Enrich, J., Ebner, H., Dallinger, R., Krumschnabel, G., 2004. Copper-induced formation of reactive oxygen species causes cell death and disruption of calcium homeostasis in trout hepatocytes. *Toxicology* 196, 57–64.
- Marinkovic, M., Verweij, R.A., Nummerdor, G.A., Bnker, M.J., Kraak, M.H.S., Admiraal, W., 2011. Life cycle responses of the midge *Chironomus riparius* to compounds with different modes of action. *Environ. Sci. Technol.* 45, 1645–1651.
- Meintieres, S., Nesslany, F., Pallardy, M., Marzin, D., 2003. Detection of ghost cells in the standard alkaline comet assay is not a good measure of apoptosis. *Environ. Mol. Mutag.* 41, 260–269.
- Morin, B., Filatreau, J., Vicquelin, L., Barjhoux, I., Guinel, S., Leray-Forget, J., Cachot, J., 2011. Detection of DNA damage in yolk-sac larvae of the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, by the comet assay. *Anal. Bioanal. Chem.*, 1–8.
- Nassef, M., Kim, S.G., Seki, M., Kang, I.J., Nano, T., Shimasaki, Y., Oshima, Y., 2010. In ovo nanoinjection of triclosan, diclofenac and carbamazepine affects embryonic development of medaka fish (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 79, 966–973.
- Nebeker, A.V., Onjukka, S.T., Cairns, M.A., Krawczyk, D.F., 1986. Survival of *Daphnia magna* and *Hyalella azteca* in cadmium-spiked water and sediment. *Environ. Toxicol. Chem.* 5, 933–938.
- OECD, Section 2: Effects on Biotic Systems Test no. 210: Fish, Early-Life Stage Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 1992, pp. 1–18.
- OECD, Section 2: Effects on Biotic Systems Test No. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 1998, pp. 1–20.
- Olive, P.L., Banath, J.P., 1995. Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the comet assay and a DNA crosslink. *Agent. Exp. Cell Res.* 221, 19–26.
- Oxendine, S.L., Cowden, J., Hinton, D.E., Padilla, S., 2006. Vulnerable windows for developmental ethanol toxicity in the Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 80, 396–404.
- Pasteris, A., Vecchi, M., Reynoldson, T.B., Bonomi, G., 2003. Toxicity of copper-spiked sediments to *Tubifex tubifex* (*Oligochaeta*, *Tubificidae*): a comparison of the 28-day reproductive bioassay with a 6-month cohort experiment. *Aquat. Toxicol.* 65, 253–265.
- Risso-de Faverney, C., Devaux, A., Lafaurie, M., Girard, J.P., Bailly, B., Rahmani, R., 2001. Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygen species. *Aquat. Toxicol.* 53, 65–76.
- Roman, Y.E., De Schampelaere, K.A.C., Nguyen, L.T.H., Janssen, C.R., 2007. Chronic toxicity of copper to five benthic invertebrates in laboratory-formulated sediment: sensitivity comparison and preliminary risk assessment. *Sci. Total Environ.* 387, 128–140.
- Sandrini, J.Z., Bianchini, A., Trindade, G.S., Nery, L.E.M., Marins, L.F.F., 2009. Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair-related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells. *Aquat. Toxicol.* 95, 285–291.
- Shinn, C., Dauba, F., Grenouillet, G., Guenard, G., Lek, S., 2009. Temporal variation of heavy metal contamination in fish of the river lot in southern France. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1957–1965.
- Sidi, S., Rosa, F.M., 2004. Mechanotransduction of hemodynamic forces regulates organogenesis. *M S-Med. Sci.* 20, 557–561.
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Fisheries Research Board, Canada Bulletin, Ottawa., p. 310.
- Vicquelin, L., Leray-Forget, J., Peluhet, L., LeMenach, K., Deflandre, B., Anschutz, P., Etcheber, H., Morin, B., Budzinski, H., Cachot, J., 2011. A new spiked sediment assay using embryos of the Japanese medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. *Aquat. Toxicol.* 105, 235–245.
- Wittbrodt, J., Shima, A., Scharf, M., 2002. Medaka—a model organism from the Far East. *Nat. Rev. Genet.* 3, 53–64.
- Wong, C.K.C., Wong, M.H., 2000. Morphological and biochemical changes in the gills of *Tilapia* (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. *Aquat. Toxicol.* 48, 517–527.
- Yao, Z.L., Lai, Q.F., Zhou, K., Rizalita, R.E., Wang, H., 2010. Developmental biology of medaka fish (*Oryzias latipes*) exposed to alkalinity stress. *J. Appl. Ichthyol.* 26, 397–402.





---

## *Annexe 4*

---

**Expressions géniques différentielles observées au cours des expositions d'embryons de Medaka à des sédiments dopés ou naturellement contaminés**



Les tableaux suivants présentent les expressions géniques différentielles moyennes obtenues pour chaque réplicat expérimental. Le gène  $\beta$ -actine a été utilisé comme gène de référence. Les résultats sont présentés sous la forme 2- $\Delta$ Ct selon les calculs présentés dans le *chapitre 2, paragraphe 6.2.4.3*.

## Exposition au CADMIUM

Code	<i>coxI</i>	<i>nd5</i>	<i>p53</i>	<i>mt</i>	<i>cyp1a</i>	<i>rad51</i>	<i>wnt1</i>	<i>sod</i> (Mn)	<i>sod</i> (Cu)	<i>bax</i>	<i>ogg1</i>	<i>emx2</i>
Control T7	9,231	0,078	0,005	0,022	0,003	0,012	0,001	0,039	0,098	0,054	0,004	0,006
Control T7	4,532	0,049	0,019	0,015	0,004	0,014	0,001	0,024	0,053	0,056	0,001	0,005
Control T7	5,172	0,031	0,005	0,017	0,002	0,010	0,001	0,032	0,073	0,045	0,002	0,003
Cd-0,3X T7	3,498	0,033	0,009	0,019	0,007	0,011	0,001	0,020	0,042	0,050	0,006	0,004
Cd-0,3X T7	5,747	0,044	0,006	0,019	0,005	0,011	0,002	0,028	0,080	0,067	0,004	0,005
Cd-0,3X T7	3,829	0,026	0,006	0,011	0,002	0,007	0,001	0,029	0,048	0,040	0,001	0,003
Cd-3X T7	4,468	0,031	0,003	0,009	0,001	0,001	0,001	0,029	0,047	0,012	0,001	0,003
Cd-3X T7	10,853	0,040	0,008	0,048	0,004	0,008	0,002	0,119	0,244	0,039	0,003	0,004
Cd-3X T7	5,774	0,066	0,015	0,012	0,005	0,006	0,001	0,029	0,071	0,026	0,007	0,006

Code	<i>coxI</i>	<i>nd5</i>	<i>p53</i>	<i>mt</i>	<i>cyp1a</i>	<i>rad51</i>	<i>wnt1</i>	<i>sod</i> (Mn)	<i>sod</i> (Cu)	<i>bax</i>	<i>ogg1</i>	<i>emx2</i>
Control T9	6,637	0,080	0,003	0,006	0,010	0,002	0,000	0,038	0,062	0,014	0,001	0,001
Control T9	4,792	0,056	0,007	0,019	0,006	0,012	0,001	0,041	0,075	0,036	0,005	0,003
Control T9	4,668	0,062	0,003	0,003	0,007	0,003	0,000	0,030	0,059	0,019	0,001	0,001
Cd-0,3X T9	4,993	0,029	0,011	0,008	0,013	0,013	0,002	0,104	0,090	0,061	0,003	0,002
Cd-0,3X T9	3,248	0,038	0,006	0,007	0,005	0,005	0,000	0,025	0,055	0,023	0,002	0,002
Cd-0,3X T9	4,166	0,048	0,004	0,021	0,009	0,005	0,001	0,045	0,083	0,034	0,002	0,002
Cd-3X T9	3,381	0,047	0,002	0,005	0,006	0,005	0,001	0,023	0,056	0,022	0,001	0,002
Cd-3X T9	5,311	0,071	0,009	0,009	0,014	0,002	0,001	0,030	0,068	0,080	0,009	0,003
Cd-3X T9	5,343	0,055	0,016	0,011	0,007	0,028	0,001	0,036	0,066	0,065	0,013	0,002

## Exposition au PYRENE & METHYLPYRENE

Code	<i>coxI</i>	<i>cyp1a</i>	<i>sod</i> (Mn)	<i>sod</i> (Cu)	<i>p53</i>	<i>bax</i>	<i>wnt1</i>	<i>ogg1</i>	<i>raldh2</i>	<i>rara1</i>	<i>rarg1</i>	<i>rxra1</i>
Control T7	2,233	0,006	0,025	0,040	0,002	0,008	0,001	0,001	0,009	0,003	0,016	0,003
Control T7	1,974	0,003	0,020	0,029	0,002	0,006	0,001	0,001	0,006	0,003	0,012	0,002
Control T7	2,212	0,004	0,034	0,071	0,002	0,011	0,001	0,001	0,009	0,002	0,018	0,003
Pyr-0,3X T7	2,259	0,004	0,023	0,041	0,002	0,009	0,001	0,001	0,008	0,001	0,014	0,002
Pyr-0,3X T7	1,917	0,004	0,013	0,031	0,003	0,007	0,001	0,001	0,006	0,003	0,013	0,003
Pyr-0,3X T7	2,094	0,006	0,015	0,026	0,003	0,006	0,001	0,001	0,005	0,003	0,014	0,003
Pyr-3X T7	4,112	0,009	0,028	0,060	0,004	0,022	0,003	0,003	0,008	0,004	0,015	0,006
Pyr-3X T7	2,641	0,009	0,021	0,039	0,003	0,010	0,001	0,001	0,007	0,004	0,017	0,004
Pyr-3X T7	3,130	0,011	0,026	0,033	0,002	0,010	0,001	0,001	0,008	0,003	0,022	0,004
MePyr-0,3X T7	2,973	0,010	0,037	0,058	0,003	0,012	0,001	0,002	0,015	0,003	0,015	0,006
MePyr-0,3X T7	2,974	0,003	0,018	0,030	0,003	0,006	0,001	0,001	0,007	0,004	0,016	0,004
MePyr-0,3X T7	3,310	0,004	0,022	0,038	0,001	0,008	0,001	0,001	0,007	0,002	0,015	0,003
MePyr-3X T7	4,098	0,006	0,027	0,043	0,003	0,008	0,001	0,001	0,008	0,004	0,016	0,004
MePyr -3X T7	3,043	0,016	0,028	0,042	0,004	0,007	0,001	0,001	0,010	0,003	0,024	0,007
MePyr -3X T7	4,315	0,012	0,026	0,052	0,003	0,018	0,004	0,003	0,011	0,005	0,025	0,004

Code	<i>coxI</i>	<i>cyp1a</i>	<i>sod</i> (Mn)	<i>sod</i> (Cu)	<i>p53</i>	<i>bax</i>	<i>wnt1</i>	<i>oggl</i>	<i>raldh2</i>	<i>rara1</i>	<i>raryl</i>	<i>rxra1</i>
Control T9	2,035	0,013	0,025	0,044	0,002	0,014	0,001	0,002	0,010	0,002	0,015	0,007
Control T9	2,018	0,016	0,031	0,051	0,003	0,023	0,003	0,003	0,012	0,001	0,017	0,010
Control T9	2,219	0,007	0,025	0,049	0,001	0,010	0,000	0,001	0,008	0,001	0,013	0,003
Pyr-0,3X T9	2,993	0,027	0,031	0,046	0,001	0,013	0,001	0,002	0,016	0,001	0,016	0,003
Pyr-0,3X T9	1,846	0,015	0,034	0,044	0,002	0,015	0,001	0,002	0,014	0,002	0,014	0,004
Pyr-3X T9	2,403	0,022	0,030	0,044	0,001	0,011	0,001	0,002	0,010	0,001	0,013	0,003
Pyr-3X T9	2,261	0,033	0,034	0,049	0,002	0,016	0,000	0,003	0,010	0,002	0,013	0,007
Pyr-3X T9	1,770	0,016	0,024	0,036	0,001	0,010	0,001	0,001	0,007	0,001	0,012	0,003
MePyr-0,3X T9	1,736	0,006	0,026	0,039	0,002	0,012	0,001	0,002	0,010	0,001	0,014	0,004
MePyr-0,3X T9	2,706	0,016	0,028	0,046	0,002	0,011	0,001	0,001	0,013	0,001	0,019	0,005
MePyr-0,3X T9	2,404	0,025	0,028	0,043	0,002	0,014	0,002	0,002	0,011	0,002	0,015	0,004
MePyr-3X T9	2,659	0,014	0,033	0,045	0,003	0,013	0,001	0,002	0,010	0,001	0,022	0,011
MePyr -3X T9	2,261	0,012	0,035	0,044	0,002	0,014	0,002	0,002	0,013	0,002	0,017	0,007
MePyr -3X T9	1,833	0,014	0,034	0,044	0,002	0,012	0,002	0,002	0,012	0,001	0,015	0,005

## Exposition aux SEDIMENTS NATURELS

Code	<i>coxI</i>	<i>cyp1a</i>	<i>mt</i>	<i>sod</i> (Mn)	<i>sod</i> (Cu)	<i>p53</i>	<i>bax</i>	<i>wnt1</i>	<i>oggl</i>	<i>rad51</i>	<i>raldh2</i>	<i>rara1</i>	<i>rxra1</i>
Marcenac T7	11,16	0,003	0,121	0,104	0,207	0,003	0,043	0,002	0,005	0,014	0,018	0,005	0,002
Marcenac T7	5,418	0,001	0,200	0,030	0,062	0,003	0,032	0,001	0,002	0,005	0,011	0,002	0,001
Marcenac T7	9,264	0,002	0,218	0,032	0,084	0,003	0,025	0,002	0,004	0,009	0,010	0,003	0,001
Joanis T7	3,990	0,006	0,018	0,031	0,063	0,003	0,021	0,001	0,002	0,005	0,009	0,003	0,001
Joanis T7	4,511	0,005	0,027	0,036	0,073	0,002	0,020	0,001	0,002	0,006	0,008	0,002	0,001
Joanis T7	7,393	0,007	0,009	0,037	0,136	0,002	0,011	0,001	0,003	0,004	0,005	0,003	0,001
Grand Banc T7	3,602	0,005	0,086	0,036	0,059	0,002	0,020	0,001	0,002	0,006	0,009	0,003	0,001
Grand Banc T7	3,059	0,005	0,027	0,027	0,051	0,003	0,013	0,001	0,001	0,004	0,011	0,002	0,001
Grand Banc T7	5,410	0,004	0,032	0,024	0,049	0,003	0,012	0,001	0,001	0,005	0,013	0,003	0,001
Les Jacquets T7	3,309	0,005	0,059	0,026	0,043	0,002	0,030	0,001	0,001	0,010	0,017	0,002	0,001
Les Jacquets T7	3,051	0,003	0,034	0,024	0,045	0,003	0,009	0,001	0,002	0,006	0,011	0,004	0,001
Les Jacquets T7	4,472	0,005	0,053	0,022	0,052	0,002	0,019	0,001	0,002	0,022	0,020	0,002	0,001

Code	<i>coxI</i>	<i>cyp1a</i>	<i>mt</i>	<i>sod</i> (Mn)	<i>sod</i> (Cu)	<i>p53</i>	<i>bax</i>	<i>wnt1</i>	<i>oggl</i>	<i>rad51</i>	<i>raldh2</i>	<i>rara1</i>	<i>rxra1</i>
Marcenac T9	4,931	0,004	0,083	0,071	0,097	0,001	0,019	0,000	0,002	0,008	0,019	0,001	0,002
Marcenac T9	9,626	0,009	0,043	0,113	0,167	0,003	0,025	0,001	0,003	0,010	0,044	0,001	0,001
Marcenac T9	5,287	0,004	0,062	0,051	0,077	0,002	0,008	0,000	0,001	0,001	0,016	0,001	0,002
Joanis T9	21,21	0,024	0,096	0,025	0,046	0,001	0,012	0,001	0,004	0,011	0,011	0,001	0,003
Joanis T9	21,41	0,033	0,090	0,088	0,150	0,001	0,014	0,001	0,005	0,011	0,026	0,000	0,002
Joanis T9	5,206	0,010	0,084	0,030	0,038	0,001	0,013	0,001	0,001	0,023	0,017	0,001	0,001
Grand Banc T9	4,798	0,011	0,073	0,024	0,044	0,002	0,017	0,001	0,002	0,004	0,016	0,003	0,006
Grand Banc T9	7,132	0,023	0,078	0,051	0,098	0,001	0,018	0,001	0,004	0,007	0,018	0,000	0,001
Grand Banc T9	8,261	0,003	0,042	0,043	0,065	0,001	0,012	0,000	0,001	0,001	0,012	0,001	0,000
Les Jacquets T9	12,86	0,007	0,032	0,033	0,065	0,002	0,044	0,001	0,002	0,007	0,032	0,001	0,001
Les Jacquets T9	7,167	0,007	0,017	0,035	0,050	0,001	0,034	0,000	0,002	0,013	0,028	0,001	0,006
Les Jacquets T9	3,855	0,004	0,034	0,042	0,058	0,001	0,016	0,000	0,001	0,005	0,016	0,001	0,002

---

## *Annexe 5*

---

**Quotients TEC et PEC calculés pour les différents sédiments naturel du système Lot-Garonne et du Bassin d'Arcachon**



Les quotients TEC (qTEC) et PEC (qPEC) ont été calculés pour les éléments métalliques et les HAP dont les valeurs seuils TEC et PEC sont décrites par MacDonald *et al.* (2000). Les quotients sont obtenus en divisant la concentration dosée dans les sédiments étudiés par la valeur seuil TEC ou PEC correspondant au composé considéré. Par la suite, le qTEC maximum (qTEC max) et la moyenne des qPEC (qPEC moy) sont retenus pour décrire le potentiel toxique global d'un sédiment donné. Une valeur de qTEC max inférieur à 1 identifie un sédiment dont la contamination chimique présente un danger peu probable pour les organismes aquatiques. À l'inverse, un qPEC moy supérieur à 0,5 identifie un sédiment pouvant très probablement conduire à des effets toxiques chez les organismes aquatiques (MacDonald *et al.* 2000).

qTEC	TEC	Marcenac	Bordeaux	La Réole	Le Temple	Bouilliac	Joanis	Grand Banc	Les Jacquets	Andernos	Arès	Bélisaire
<i>Éléments métalliques (TEC en µg/g p.s.)</i>												
As	9,79	1,79	0,91	1,09	0,31	4,35	2,91	0,64	2,05	2,90	2,72	0,51
Cd	0,99	0,14	1,28	1,55	0,45	18,11	14,78	0,04	0,31	0,48	0,49	0,05
Cr	43,4	0,23	0,56	0,55	0,23	0,26	0,54	0,23	0,60	0,80	0,73	0,14
Cu	31,6	0,20	0,52	0,64	0,13	2,49	3,06	0,14	0,41	0,63	0,62	0,08
Pb	35,8	0,35	0,84	0,72	0,11	7,63	8,88	0,23	1,12	1,76	1,47	0,21
Ni	22,7	0,42	0,73	0,75	0,72	1,00	0,77	0,27	0,79	1,04	0,96	0,18
Zn	121	0,29	0,85	0,95	0,14	16,86	18,95	0,23	0,97	1,19	1,18	0,22
<i>HAP individuels (TEC en ng/g p.s.)</i>												
Anthracène	57,2	-	0,27	0,20	10,94	0,84	138,04	0,05	0,88	0,73	1,65	4,05
Fluorène	77,4	0,00	0,07	0,06	1,77	0,13	11,64	0,04	0,16	0,25	0,62	0,45
Naphtalène	176	-	0,08	0,11	-	0,38	2,07	0,05	0,24	0,09	0,53	0,11
Phénanthrène	204	0,00	0,19	0,41	8,87	0,38	30,83	0,08	1,10	1,44	1,79	2,93
Benzo[a]anthracène	108	0,00	0,78	0,49	20,29	0,75	7,93	0,14	2,26	2,60	4,25	6,55
Benzo[a]pyrène	150	0,01	0,94	0,50	15,54	0,50	5,62	0,13	2,02	2,35	3,36	4,86
Chrysène	166	0,00	0,61	0,49	12,10	0,50	6,57	0,11	1,82	2,11	3,04	4,98
Dibenz[a,h]anthracène	33	-	0,56	0,41	11,49	0,37	4,86	0,16	1,68	2,03	2,91	3,80
Fluoranthène	423	0,00	0,24	0,33	9,11	0,35	5,07	0,08	1,56	1,76	2,26	3,77
Pyrène	195	0,00	0,50	0,54	14,97	0,63	6,70	0,15	2,66	3,01	3,81	5,93
<i>HAP totaux</i>	1610	0,27	0,39	0,51	29,90	5,77	27,27	0,17	2,65	3,06	4,19	6,15
<b>qTEC max</b>	-	<b>1,79</b>	<b>1,28</b>	<b>1,55</b>	<b>29,90</b>	<b>18,11</b>	<b>138,04</b>	<b>0,64</b>	<b>2,66</b>	<b>3,06</b>	<b>4,25</b>	<b>6,55</b>

qPEC	PEC	Marcenac	Bordeaux	La Réole	Le Temple	Bouilliac	Joanis	Grand Banc	Les Jacquets	Andernos	Arès	Bélisaire
<i>Éléments métalliques (PEC en µg/g p.s.)</i>												
As	33	0,53	0,27	0,32	0,09	1,29	0,86	0,19	0,61	0,86	0,81	0,15
Cd	4,98	0,03	0,25	0,31	0,09	3,60	2,94	0,01	0,06	0,10	0,10	0,01
Cr	111	0,09	0,22	0,21	0,09	0,10	0,21	0,09	0,24	0,31	0,29	0,06
Cu	149	0,04	0,11	0,13	0,03	0,53	0,65	0,03	0,09	0,13	0,13	0,02
Pb	128	0,10	0,24	0,20	0,03	2,13	2,48	0,06	0,31	0,49	0,41	0,06
Ni	48,6	0,20	0,34	0,35	0,33	0,47	0,36	0,13	0,37	0,49	0,45	0,08
Zn	459	0,08	0,22	0,25	0,04	4,45	5,00	0,06	0,25	0,32	0,31	0,06
<i>HAP individuels (PEC en ng/g p.s.)</i>												
Anthracène	845	-	0,02	0,01	0,74	0,06	9,34	0,00	0,06	0,05	0,11	0,27
Fluorène	536	0,00	0,01	0,01	0,25	0,02	1,68	0,01	0,02	0,04	0,09	0,06
Naphtalène	561	-	0,02	0,03	-	0,12	0,65	0,01	0,08	0,03	0,17	0,03
Phénanthrène	1170	0,00	0,03	0,07	1,55	0,07	5,38	0,01	0,19	0,25	0,31	0,51
Benzo[a]anthracène	1050	0,00	0,08	0,05	2,09	0,08	0,82	0,01	0,23	0,27	0,44	0,67
Benzo[a]pyrène	1450	0,00	0,10	0,05	1,61	0,05	0,58	0,01	0,21	0,24	0,35	0,50
Chrysène	1290	0,00	0,08	0,06	1,56	0,06	0,85	0,01	0,23	0,27	0,39	0,64
Dibenz[a,h]anthracène	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluoranthène	2230	0,00	0,05	0,06	1,73	0,07	0,96	0,02	0,30	0,33	0,43	0,71
Pyrène	1520	0,00	0,06	0,07	1,92	0,08	0,86	0,02	0,34	0,39	0,49	0,76
<i>HAP totaux</i>	22800	0,02	0,03	0,04	2,11	0,41	1,93	0,01	0,19	0,22	0,30	0,43
<b>qPEC moy</b>	-	<b>0,07</b>	<b>0,13</b>	<b>0,13</b>	<b>0,89</b>	<b>0,80</b>	<b>2,09</b>	<b>0,04</b>	<b>0,22</b>	<b>0,28</b>	<b>0,33</b>	<b>0,30</b>





---

## *Annexe 6*

---

**Liste des publications, communications orales et posters**



## Liste des commutations orales ou écrites effectués au cours des travaux de thèse (2008-2011)

### POSTERS :

#### ✓ ICAW 2011 – Kusadasi, Turquie (13-16 septembre 2011)

*Genotoxicity as an additional endpoint in early life stage toxicity test with aquatic organism*

Bénédicte Morin<sup>a</sup>, Huong Mai<sup>a</sup>, Iris Barjhoux<sup>a</sup>, Justine Brune<sup>a</sup>, Ludovic Vicquelin<sup>ab</sup> and Jérôme Cachot<sup>a</sup>

<sup>a</sup> University Bordeaux 1 – UMR 5805 EPOC, CNRS, team LPTC, Talence, France

<sup>b</sup> University of Le Havre, Laboratory of Ecotoxicology (LEMA) EA3222, Le Havre, France

#### ✓ PRIMO 16th – Long Beach, Californie, USA (15-18 mai 2011)

*Relationship between metal bioaccumulation, gene expression and toxic responses in early life stages of Japanese Medaka exposed to cadmium-spiked sediments*

Iris Barjhoux<sup>1</sup>, Magalie Baudrimont<sup>2</sup>, Bénédicte Morin<sup>1</sup>, Patrice Gonzalez<sup>2</sup> and Jérôme Cachot<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University Bordeaux EPOC UMR 5805, LPTC group, 33405 Talence, France

<sup>2</sup> University Bordeaux 1, EPOC UMR 5805, GEMA group, 33120 Arcachon, France

#### ✓ SETAC Europe 2010 – Séville, Espagne (23-27 mai 2010)

*Development and application of the Medaka Embryo-Larval Assay (MELA) to characterize toxicity and effects of pollutants*

Iris Barjhoux<sup>1</sup>, Magalie Baudrimont<sup>2</sup>, Bénédicte Morin<sup>1</sup>, Hélène Budzinski<sup>1</sup> and Jérôme Cachot<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University Bordeaux 1, ISM UMR 5255, LPTC group, Talence, France

<sup>2</sup> University Bordeaux 1, EPOC UMR 5805 - OASU, GEMA group, Station Marine d'Arcachon, Arcachon, France

#### ✓ ECOBim GDR-I-EXECO 2010 – Nantes, France (18-19 mai 2010) :

*Développement du test embryo-larvaire Medaka (MELA) : Application à l'évaluation de la toxicité de polluants environnementaux*

Iris Barjhoux<sup>1</sup>, Magalie Baudrimont<sup>2</sup>, Patrice Gonzalez<sup>2</sup>, Bénédicte Morin<sup>1</sup>, Hélène Budzinski<sup>1</sup> et Jérôme Cachot<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université Bordeaux 1, Institut des Sciences Moléculaires (ISM) UMR 5255, groupe LPTC, 33405 Talence, France

<sup>2</sup> Université Bordeaux 1, EPOC UMR 5805, groupe GEMA, 33120 Arcachon, France

#### ✓ PRIMO 15th – Bordeaux, France (17-20 mai 2009)

*Biotransformation and genotoxicity of model aquatic pollutants in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)\**

Iris Barjhoux<sup>1</sup>, Christelle Clérandeau<sup>1</sup>, Michèle Daubèze<sup>1</sup>, Jean-François Narbonne<sup>1</sup>, Jean-Luc Ravanat<sup>2</sup>, Véronique André<sup>3</sup> and Bénédicte Morin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Molecular Sciences (ISM) UMR CNRS 5255, University Bordeaux 1, 33405 Talence, France

<sup>2</sup> Nucleic Acids Lesions Laboratory (LLAN), INAC/SCIB (UMR-E-3 CEA-UJF), CEA Grenoble, France

<sup>3</sup> GRECAN, University of Caen-Basse-Normandie, 14076 Caen Cedex 05, France

\* : travaux de stage de Master 2

### COMMUNICATIONS ORALES :

#### ✓ PRIMO 16th – Long Beach, Californie, USA (15-18 mai 2011)

*Phenotypical and genetic responses of Japanese Medaka embryos exposed to pyrene and methylpyrene contaminated sediments*

Iris Barjhoux<sup>1</sup>, Magalie Baudrimont<sup>2</sup>, Bénédicte Morin<sup>1</sup>, Patrice Gonzalez<sup>2</sup>, Hélène Budzinski<sup>1</sup> and Jérôme Cachot<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University Bordeaux EPOC UMR 5805, LPTC group, 33405 Talence, France

<sup>2</sup> University Bordeaux 1, EPOC UMR 5805, GEMA group, 33120 Arcachon, France

### ✓ SETAC Europe 2011 – Milan, Italie (15-19 mai 2011)

*Relationship between metal bioaccumulation, gene expression and toxic responses in early life stages of Japanese Medaka exposed to cadmium-spiked sediments*

Iris Barjhoux<sup>1</sup>, Magalie Baudrimont<sup>2</sup>, Bénédicte Morin<sup>1</sup>, Patrice Gonzalez<sup>2</sup> and Jérôme Cachot<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University Bordeaux EPOC UMR 5805, LPTC group, 33405 Talence, France

<sup>2</sup> University Bordeaux 1, EPOC UMR 5805, GEMA group, 33120 Arcachon, France

### ✓ Colloque EXECO 2011 – Arcachon, France (7-8 avril 2011)

*Étude des réponses moléculaires et phénotypiques d'embryons et larves de Médaka japonais (Oryzias latipes) exposés à des doses environnementales de cadmium*

Iris Barjhoux<sup>1</sup>, Patrice Gonzalez<sup>2</sup>, Bénédicte Morin<sup>1</sup>, Magalie Baudrimont<sup>2</sup> et Jérôme Cachot<sup>1</sup>

<sup>1</sup> LPTC-Toxicologie Environnementale, UMR EPOC 5805, Talence

<sup>2</sup> Ecotoxicologie Aquatique, UMR EPOC 5805, Arcachon

### ✓ PRIMO 15th – Bordeaux, France (17-20 mai 2009) – Flash presentation

*Biotransformation and genotoxicity of model aquatic pollutants in Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)\**

Iris Barjhoux<sup>1</sup>, Christelle Clérandeau<sup>1</sup>, Michèle Daubèze<sup>1</sup>, Jean-François Narbonne<sup>1</sup>, Jean-Luc Ravanat<sup>2</sup>, Véronique André<sup>3</sup> and Bénédicte Morin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Molecular Sciences (ISM) UMR CNRS 5255, University Bordeaux 1, 33405 Talence, France

<sup>2</sup> Nucleic Acids Lesions Laboratory (LLAN), INAC/SCIB (UMR-E-3 CEA-UJF), CEA Grenoble, France

<sup>3</sup> GRECAN, University of Caen-Basse-Normandie, 14076 Caen Cedex 05, France

\* : travaux de stage de Master 2

## ARTICLES SCIENTIFIQUES

### ✓ Publié dans Analytical & Bioanalytical Chemistry 399 (6) en février 2011 (Annexe 1)

*Detection of DNA damage in yolk-sac larvae of the Japanese Medaka, Oryzias latipes, by the comet assay*

Bénédicte Morin<sup>a</sup>, Julien Filatreau<sup>a</sup>, Ludovic Vicquelina<sup>b</sup>, Iris Barjhoux<sup>a</sup>, Sylvain Guinel<sup>a</sup>, Joelle Leray-Forget<sup>b</sup> and Jérôme Cachot<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Molecular Sciences (ISM), University Bordeaux 1, UMR 5255 CNRS, Group LPTC, 33405 Talence Cedex, France

<sup>b</sup> Laboratory of Ecotoxicology (LEMA), University of Le Havre, UPRES EA 3222, IFRMP 23, 76058 Le Havre Cedex, France

### ✓ Publié dans Ecotoxicology and Environmental Safety en janvier 2012 (Annexe 3)

*Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (Oryzias latipes)*

Iris Barjhoux<sup>a</sup>, Magalie Baudrimont<sup>b</sup>, Bénédicte Morin<sup>a</sup>, Laure Landi<sup>a</sup>, Patrice Gonzalez<sup>b</sup>, Jérôme Cachot<sup>a</sup>

<sup>a</sup> University Bordeaux 1 – UMR 5805 EPOC, CNRS, LPTC group, Talence, France

<sup>b</sup> University Bordeaux 1 – UMR 5805 EPOC, CNRS, EA group, Station Marine d'Arcachon, Arcachon, France

