

Rapport Seine-Aval 4



BCG

Cartographie de la génotoxicité
en estuaire de Seine et étude
du transfert des contaminants génotoxiques
du milieu vers les organismes



Couteau J., Forget-Leray J., Budzinski H., Cachot J.,
Cuvilliez A.



Seine-Aval
GROUPEMENT D'INTÉRÊT PUBLIC

Octobre 2012



GIP Seine-Aval
Pôle Régional des Savoirs
115 Bd de l'Europe
76 100 - Rouen

tel : 02 35 08 37 64
<http://www.seine-aval.fr>

SOMMAIRE

CARTOGRAPHIE ET IDENTIFICATION DE LA GÉNOTOXICITÉ EN ESTUAIRE DE SEINE

1. INTRODUCTION.....	5
2. MATÉRIELS & MÉTHODES.....	5
2.1. Prélèvements et préparation des échantillons.....	5
2.2. Caractérisation sédimentaire.....	6
2.3. Détermination du potentiel génotoxique.....	6
2.4. Cartographie de la vase.....	7
2.5. Cartographie de la génotoxicité.....	7
2.6. Approche TIE: Identification des molécules génotoxiques	9
3. RÉSULTATS.....	10
3.1. Cartographie de la vase.....	10
3.2. Cartographie de la génotoxicité.....	10
a) Génotoxicité directe.....	11
b) Génotoxicité indirecte.....	11
3.3. Approche TIE.....	16
4. CONCLUSION.....	21

ETUDE DU TRANSFERT DES CONTAMINANTS DU MILIEU VERS LES ORGANISMES

1. INTRODUCTION.....	23
2. MATÉRIELS & MÉTHODES.....	25
2.1. Prélèvements.....	25
2.2. Préparation des échantillons.....	26
2.3. Détermination du potentiel génotoxique: SOS-Chromotest.....	27
2.4. Dosage des adduits à l'ADN.....	27
2.5. Test des comètes.....	29
3. RÉSULTATS.....	30
3.1. Potentiel génotoxique dans les MES au niveau du pont de Tancarville.....	30
3.2. Potentiel génotoxique dans la phase dissoute au niveau du pont de Tancarville.....	31
3.3. Potentiels génotoxiques et effets associées chez <i>E. affinis</i>	32
3.4. Potentiels génotoxiques et effets associées chez <i>P. flesus</i>	34
4. CONCLUSION.....	38

BIBLIOGRAPHIE.....	60
--------------------	----

De part sa position géographique et de part ses caractéristiques physiques, l'estuaire de Seine est un milieu « naturel » présentant de multiples intérêts :

- biologique (nourricerie et frayère où 60 % des poissons à intérêt commercial passent une partie ou la totalité de leur vie).
- ornithologique (zone Natura 2000)
- économique (voie de navigation importante, à l'origine de l'accélération du comblement estuarien et de l'expulsion du système vers la mer).

Le bassin versant de la Seine abrite près de 26% de la population française et 40% de l'activité économique française. La Seine et son estuaire sont donc soumis à une pression anthropique très intense caractérisée notamment par des apports importants de contaminants. L'estuaire de la Seine joue donc un rôle important dans l'épuration, le stockage, la transformation et la régulation des contaminants chimiques et microbiologiques « amonts ». Malgré tout, l'augmentation régulière de ces contaminations ainsi que l'aménagement des rives de la Seine menace l'équilibre instable de cet écosystème.

Depuis la création du programme Seine-Aval en 1994, de nombreuses études ont porté sur la contamination de l'estuaire de Seine et les effets toxiques induits chez plusieurs espèces de l'estuaire. Ces études ont mis en évidence une contamination relativement importante des sédiments et des premiers maillons trophiques que ce soit par des composés métalliques ou par des composés organiques. Certaines études ont même démontré la présence de nombreux résidus médicamenteux dans les sédiments de l'estuaire de Seine (Togola et al., 2006). Parmi les 180000 molécules chimiques présentes dans l'estuaire de la Seine, celles qui sont les plus préoccupantes sont sans nul doute celles qui montrent une persistance, une capacité à être transportées sur de longues distances, une tendance à la bioaccumulation et une toxicité. La plupart des polluants chimiques dans l'environnement sont des molécules mutagènes et/ou cancérogènes qui menacent l'intégrité génomique des espèces potentiellement exposées et donc leur santé.

Dans le cadre de ce projet, nous proposons de réaliser une cartographie de la génotoxicité des sédiments de la vasière de l'estuaire de la Seine afin de compléter les résultats obtenus par **Cachot et collaborateurs** en 2006 qui avaient permis de mettre en évidence un gradient de génotoxicité sédimentaire aval/amont au niveau de l'estuaire fluvial. **BCG** consistait à identifier plusieurs sites de dépôts sédimentaires de l'estuaire de la Seine caractérisés par une contamination organique et à en déterminer le potentiel génotoxique afin d'en réaliser une cartographie.

Cette cartographie du danger génotoxique en estuaire de Seine a été réalisée grâce aux caractéristiques de la couverture sédimentaire obtenues par télédétection haute résolution à basse altitude. Parallèlement à ce travail de cartographie, les sédiments présentant une activité génotoxique marquée ont donné lieu à la mise en place d'une approche **TIE** (Toxicity Identification Evaluation) afin de caractériser les familles chimiques de ces molécules génotoxiques.

BCG est un projet qui avait également pour but d'acquérir des connaissances supplémentaires sur le transfert des contaminants organiques du milieu vers les organismes. Ainsi, nous avons évalué le potentiel génotoxique de la Seine au niveau du bouchon vaseux mais également dans deux organismes représentatifs de ce milieu (*Eurytemora affinis* et *Platichthys flesus*) tout en déterminant les effets associés à cette génotoxicité.

BCG était un programme de recherche collaboratif qui a donné l'occasion à différents partenaires qu'ils soient publics, privés ou associatifs de travailler ensemble.

Équipes associées:

- **TOXEM: Sarl TOXEM (TOXicologie Environnementale et Médicale), Le Havre.**
- **EPOC: Laboratoire d'Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux, Université Bordeaux I.**
- **LEMA: Laboratoire d'Ecotoxicologie-Milieus Aquatiques, Université du Havre.**
- **LOMC: Laboratoire Ondes et Milieux Complexes, Université du Havre.**
- **CSLN: Cellule de Suivi du Littoral Normand.**

Merci à vous tous pour votre participation:

Géraldine Maillet, Géraldine Loppion, Antoine Cuvilliez, Hélène Budzinki, Joelle Leray, Jérôme Cachot, Gwenola de Roton, Bénédicte Morin, Benoit Xuereb, Jérémie Le Goff, Teddy Lesueur, Ludovic Vicquelin, Karyn Le Menach, Caroline Guardia Parege, Marie-Hélène Devier, Christelle Clerandeanu, Anaïk Pichon, Grégory, Cédric ...

CARTOGRAPHIE ET IDENTIFICATION DE LA GENOTOXICITE EN ESTUAIRE DE SEINE

1. INTRODUCTION

Dans le cadre du projet **BCG**, une cartographie estimée de la génotoxicité en estuaire de Seine a été réalisée en juin 2010 et en mai 2011. Les dates de prélèvements nécessaires à la réalisation de ces cartographies ont été conditionnées à la fois par les coefficients de marées ainsi que par les conditions météorologiques. La cartographie estimée de la génotoxicité sédimentaire au niveau de la vasière nord de l'estuaire de Seine a été réalisée par une généralisation selon les faciès sédimentaires de la génotoxicité mesurée à des niveaux ponctuels. Ces faciès sédimentaires ont été déterminés grâce à la télédétection haute résolution à basse altitude.

Sur les échantillons sédimentaires présentant une activité génotoxique marquée, nous avons mis en place une approche **TIE** (Toxicity Identification and Evaluation). Cette approche consiste à déterminer, en combinant les techniques de chimie analytique et les analyses biologiques, les familles chimiques des molécules impliquées dans le potentiel génotoxique mis en évidence.

2. MATÉRIELS & MÉTHODES

2.1. Prélèvements et préparation des échantillons

Les prélèvements sédimentaires sur la vasière nord de l'estuaire de Seine ont été réalisés au niveau de trois radiales représentatives de la couverture sédimentaire (figure 1 page 6):

- **Radiale du Pont:** 4 points de prélèvement en 2010 et 5 points de prélèvement en 2011.
- **Radiale du Banc:** 5 points de prélèvements en 2010 et 6 point de prélèvement en 2011.
- **Radiale de la Dune:** 8 points de prélèvement en 2010 et 2011.

Lors de ces prélèvements, la partie supérieure du sédiment a été soigneusement récupérée en évitant tout prélèvement de sédiments anoxiques (plus profonds). Ces sédiments superficiels ont été prélevés à l'aide de cuillères en inox pyrolysées puis stockés dans des barquettes en aluminium. De retour au laboratoire, chaque sédiment a été homogénéisé puis divisé en 3 lots dans de nouvelles barquettes en aluminium avant d'être congelé à -80°C. Une partie de ces échantillons a servi à la détermination des caractéristiques sédimentaires (teneur en matière organique, granulométrie et calcimétrie), une autre a été utilisée pour la préparation des extraits organiques et la dernière a été conservée comme échantillon de secours.



Figure 1: Localisation des radiales de prélèvement au niveau de la vasière nord de l'estuaire de Seine.

2.2. Caractérisation sédimentaire

Le profil granulométrique des échantillons sédimentaires a été déterminé à l'aide d'un granulomètre laser *Mastersize 5000*. Avant chaque analyse, 1 volume d'eau déminéralisée a été ajouté à 1 volume de sédiment avant d'être soumis à un cycle de 20 secondes d'ultrasons afin de bien homogénéiser l'échantillon.

La teneur en matière organique des échantillons a été estimée par pyrolyse. Pour cela, une certaine quantité de sédiment sec a été pesée puis carbonisée pendant une nuit à 500°C avant d'être pesée à nouveau. La différence de masse correspond à une estimation de la teneur en matière organique.

La calcimétrie des échantillons sédimentaires (charge en CaCO_3) a été déterminée à l'aide d'un calcimètre de *Bernard*. Ce dernier permet d'évaluer la charge en CaCO_3 d'un échantillon en mesurant le volume de CO_2 dégagé par action de l'acide chlorhydrique (HCl) sur le carbonate de calcium (CaCO_3).

2.3. Détermination du potentiel génotoxique

Les molécules organiques présentes dans les différents sédiments collectés ont été extraites à l'aide d'une extraction ASE (Accelerated Solvant Extraction). Après avoir testé plusieurs protocoles d'extraction, le protocole décrit en figure 2 page 7 a été retenu pour l'ensemble des extractions du projet **BCG**.

La génotoxicité des extraits organiques obtenus par ASE a été évaluée avec le **SOS-Chromotest**. Le SOS-Chromotest est un test de génotoxicité bactérien qui permet d'évaluer sur une souche de *E. coli* les capacités de molécules chimiques à induire la réponse « SOS » mise en place chez les bactérie lorsqu'il y a altération du génome.

A l'aide d'un réactif coloré, il est possible de quantifier l'expression d'un gène impliqué dans la mise en place de cette réponse « SOS » dans une souche génétiquement modifiée d'*E. coli* (PQ37) et ainsi d'évaluer la génotoxicité des molécules mises en contact de la bactérie (Quillardet & Hofnung, 1985). Le SOS-Chromotest a été réalisé en microplaque selon le protocole décrit par White et collaborateurs en 1996 (White *et al.*, 1996) hormis le fait que les réactifs colorés utilisés sont ceux mentionnés par Quillardet et Hofnung dans leur publication de 1985. Le SOS-Chromotest est un test largement utilisé pour évaluer la génotoxicité de différentes matrices environnementales comme les eaux, les sols ou les sédiments (Mersch-Sundermann *et al.* 1989; Guzzela *et al.*, 2006; Cachot *et al.*, 2006).

<u>Accelerated Solvant Extraction</u>	
SOLVANT	: Dichlorométhane/Acétone (1/1)
TEMPÉRATURE	: 100°C
PRESSION	: 100 bar
PREHEAT	: 5 min
HEAT	: 8 min
STATIC	: 5 min
Flush	: 75%
Purge	: 60 sec
Nbre Cycles	: 2

Figure 2: Protocole d'extraction ASE retenu pour l'extraction des molécules organiques des sédiments de l'estuaire de Seine.

2.4. Cartographie de la vasière

La résolution fournie par la technique de télédétection haute résolution à basse altitude (*côté du pixel: 4 cm*) permet d'identifier la nature de la couverture sédimentaire au niveau de la vasière nord et ainsi d'en réaliser une cartographie. Depuis maintenant une quinzaine d'année, une voir deux cartographies des faciès sédimentaires de la vasière nord de l'estuaire de Seine sont réalisées chaque année par Antoine Cuvilliez. Ces cartographies de la couverture sédimentaire et de ses faciès sont d'excellents indicateurs de l'importance des apports en sédiments provenant du fleuve et de la mer mais également des conditions hydrodynamiques qui animent les surfaces intertidales lors du flot et du jusant (Reineck & Singh, 1980).

Le travail de cartographie consiste à associer les différents orthoclichés pris lors du survol en hélicoptère de la zone à cartographier.

2.5. Cartographie de la génotoxicité

Dans le cadre du programme **BCG**, nous avons proposé de développer une nouvelle méthodologie pour réaliser une cartographie estimée du danger génotoxique au niveau de la vasière nord. Pour cela, nous avons utilisé les cartographies des faciès sédimentaires pour généraliser à l'ensemble de la vasière la génotoxicité mesurée ponctuellement au niveau des différentes radiales (figure 3 page 8).

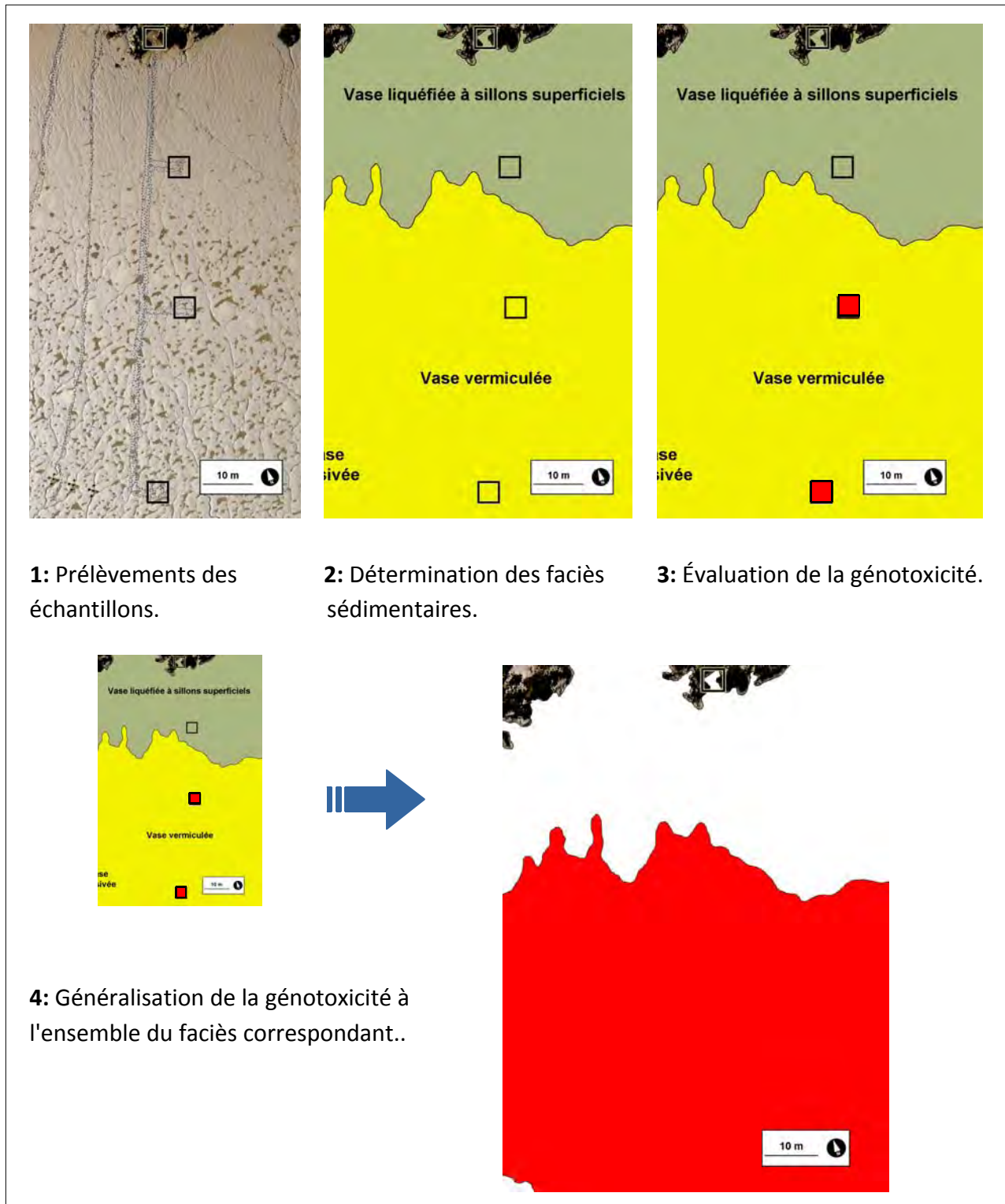


Figure 3: Principe de la méthodologie utilisée pour réaliser la cartographie estimée du danger génotoxique au niveau de la vasière nord de l'estuaire de Seine.

2.6. Approche TIE: Identification des molécules génotoxiques

L'approche TIE est une approche combinant les analyses biologiques et les techniques de chimie analytique dans le but de déterminer les molécules chimiques pouvant être à l'origine d'une activité biologique. Parmi tous les extraits réalisés dans le cadre du programme BCG, 3 extraits présentant un fort potentiel génotoxique ont été retenus pour la mise en place de cette approche.

Les extraits ont été reconcentrés et repris dans de l'heptane. Ils ont ensuite été préfractionnés par extraction sur phase solide (SPE) sur cartouche de silice (Supelclean LC-Si). Un blanc de manipulation a été fractionné en parallèle selon la même procédure. Les extraits ont été déposés sur les cartouches, préalablement conditionnées avec 5mL d'heptane. Quatre fractions de polarité croissante ont été obtenues par éluions successives avec de l'heptane (fraction 1, notée F1), puis un mélange dichlorométhane/heptane (fraction 2, notée F2), puis de l'acétate d'éthyle (fraction 3, notée F3) et enfin un mélange méthanol/eau MilliQ (fraction 4, notée F4). Chaque pré-fraction a alors été aliquotée en deux : une aliquote (0,75ml, soit 25g équivalent sédiment) évaporée à sec destinée aux analyses biologiques et une aliquote de sauvegarde conservée dans du solvant à -20°C.

Chacune de ces 4 fractions a été testée avec le SOS-Chromotest afin de déterminer celle(s) qui présente(nt) un potentiel génotoxique. Ensuite, la ou les pré-fractions génotoxiques ont été aliquotées en deux et une des aliquotes ($\approx 12,5$ g équivalent sédiment) a été reprise dans un mélange eau/acétonitrile (80/20 ; v/v) pour être hyperfractionnée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en mode inverse (colonne greffée C18). 40 hyper-fractions (notées HF1 à HF40) de polarité décroissante ont alors été récupérées en utilisant un gradient eau/acétonitrile (de 20% à 100% d'acétonitrile, à 1 mL/min sur 120 min).

Les 40 hyperfractions collectées ont été reconcentrées à sec sous flux d'argon et reprises dans du méthanol, puis aliquotées en deux, une de sauvegarde et une destinée aux tests de génotoxicité (≈ 6 g équivalent sédiment). Après évaporation à sec, chacune de ces 40 hyper-fractions a été testée avec le SOS-Chromotest.

3. RÉSULTATS

3.1. Cartographie des faciès sédimentaires de la vasière nord

Les prélèvements ont été réalisés de manière synchrone aux survols nécessaires à la télédétection haute résolution à basse altitude, de sorte que tous les points de prélèvements étaient bien visibles sur les orthoclichés. Les cartographies à haute résolution (*non lissée*) de la vasière Nord en 2010 et 2011, obtenues par assemblage des orthoclichés, sont présentées sur les figures 4 et 5 page 12 et 13.

3.2. Cartographie de la génotoxicité

L'ensemble des données concernant les sédiments prélevés en 2010 et en 2011 dans le cadre de ce projet, sont collectées dans le tableau n°1 ci-dessous.

Tableau 1: Tableau récapitulatif des paramètres mesurés sur les différents échantillons de sédiments prélevés dans le cadre du projet BCG.

Année	Radiale	Points	Calcimétrie (% CaCO ₃)	Matière Organique (%)	% de particules <62,5 µm *	Génotoxicité	
						- S9	+ S9
2010	Pont	1	41,52	5,70	29%	-	-
		2	37,90	1,80	4%	-	-
		3	41,25	7,30	98%	++	++
		4	36,39	7,15	94%	++++	++
	Banc	1	39,89	10,69	98%	-	-
		2	39,42	10,24	95%	-	-
		3	41,14	9,51	98%	-	-
		4	42,41	7,54	98%	-	++
		5	40,85	6,25	100%	-	-
	Dune	1	33,48	8,31	36%	-	-
		2	44,64	6,84	94%	++	+
		3	40,58	6,35	90%	-	-
		4	39,89	1,56	34%	++	-
		5	43,22	6,35	78%	-	-
		6	42,78	4,71	71%	-	+
		7	27,55	2,10	25%	+++	+++
8		33,29	9,30	61%	++	-	

Année	Radiale	Points	Calcimétrie (% CaCO ₃)	Matière Organique (%)	% de particules <62,5 µm *	Génotoxicité	
						- S9	+ S9
2011	Pont	1	28,33	3,18	47%	-	-
		2	28,63	13,41	93%	-	-
		3	36,33	4,79	51%	-	+
		4	32,39	8,28	93%	-	+
		5	32,95	7,21	71,4 %	-	-
	Banc	1	37,59	12,10	92%	-	-
		2	35,27	11,28	91%	-	-
		3	31,99	8,68	88%	-	++
		4	32,36	8,83	84%	++	+
		5	29,89	7,8	82%	-	+
		6	31,97	9,73	88%	-	+
	Dune	1	25,76	8,98	81,3%	-	-
		2	29,76	1,56	5%	-	-
		3	32,14	7,15	86%	-	-
		4	31,25	2,97	19%	-	-
		5	36,27	3,26	46%	-	-
		6	31,77	3,84	70%	-	-
		7	26,95	1,91	67%	++	-
		8	28,64	2,46	63%	++	+

* les graphiques présentant les résultats des analyses granulométriques sont collectés en annexe 1 page 41.

a) Génotoxicité directe

La génotoxicité directe est induite par des molécules chimiques qui sont capables d'induire directement des dommages à l'ADN. Les cartographies 2010 et 2011 de la génotoxicité directe estimée au niveau de la vasière nord de l'estuaire de la Seine sont présentées à la figure 6 page 14.

b) Génotoxicité indirecte

La génotoxicité indirecte ou la pro-génotoxicité est induite par des molécules chimiques qui nécessitent une activation métabolique préalable avant de pouvoir exercer leurs effets génotoxiques (bioactivation). Les cartographies 2010 et 2011 de la génotoxicité indirecte estimée au niveau de la vasière nord de l'estuaire de la Seine sont présentées à la figure 7 page 15.

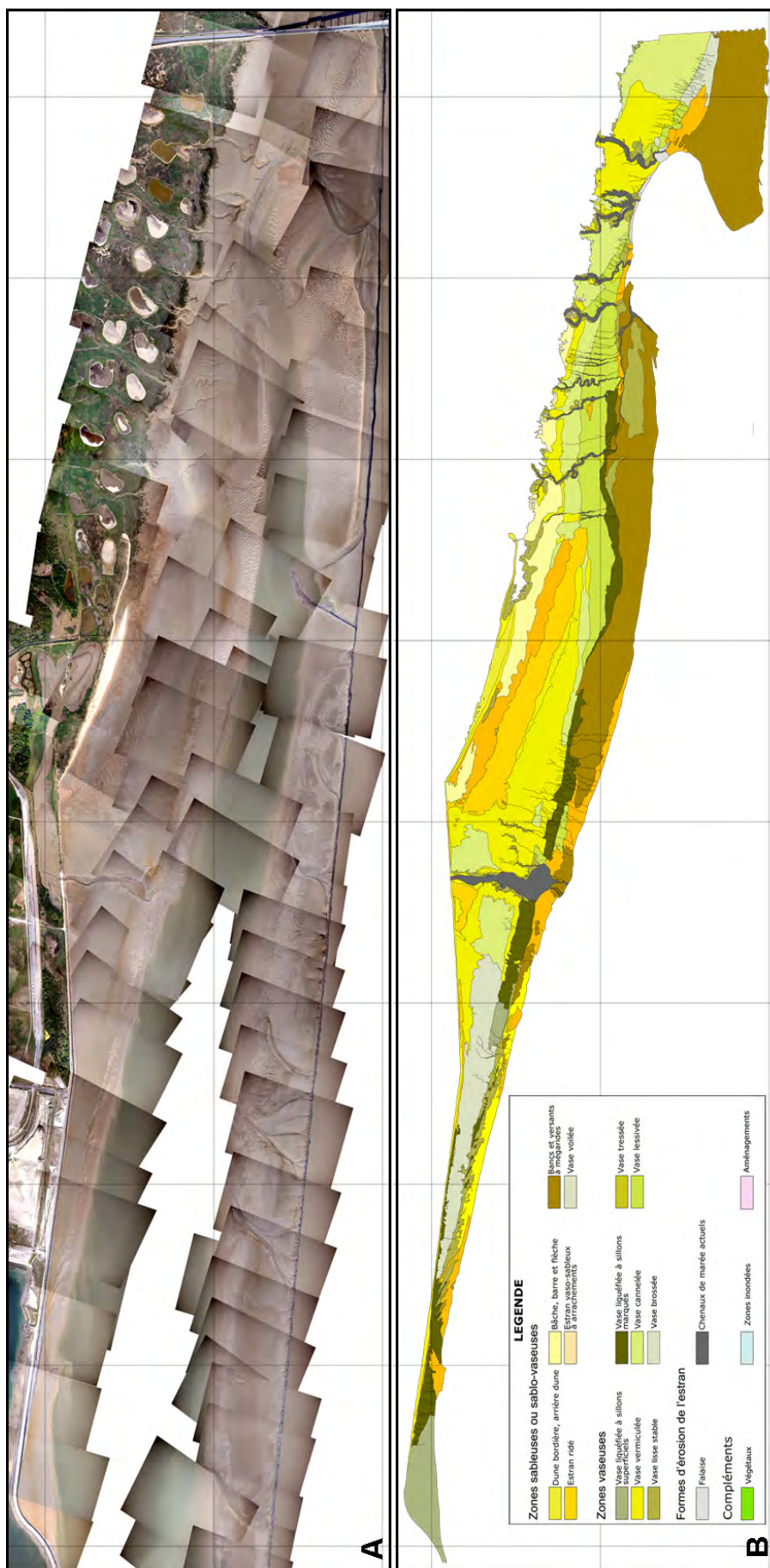


Figure 5: Cartographie à haute résolution (*non lissée*) de la fosse Nord en 2011 (A) et l'interprétation de sa couverture sédimentaire (B).

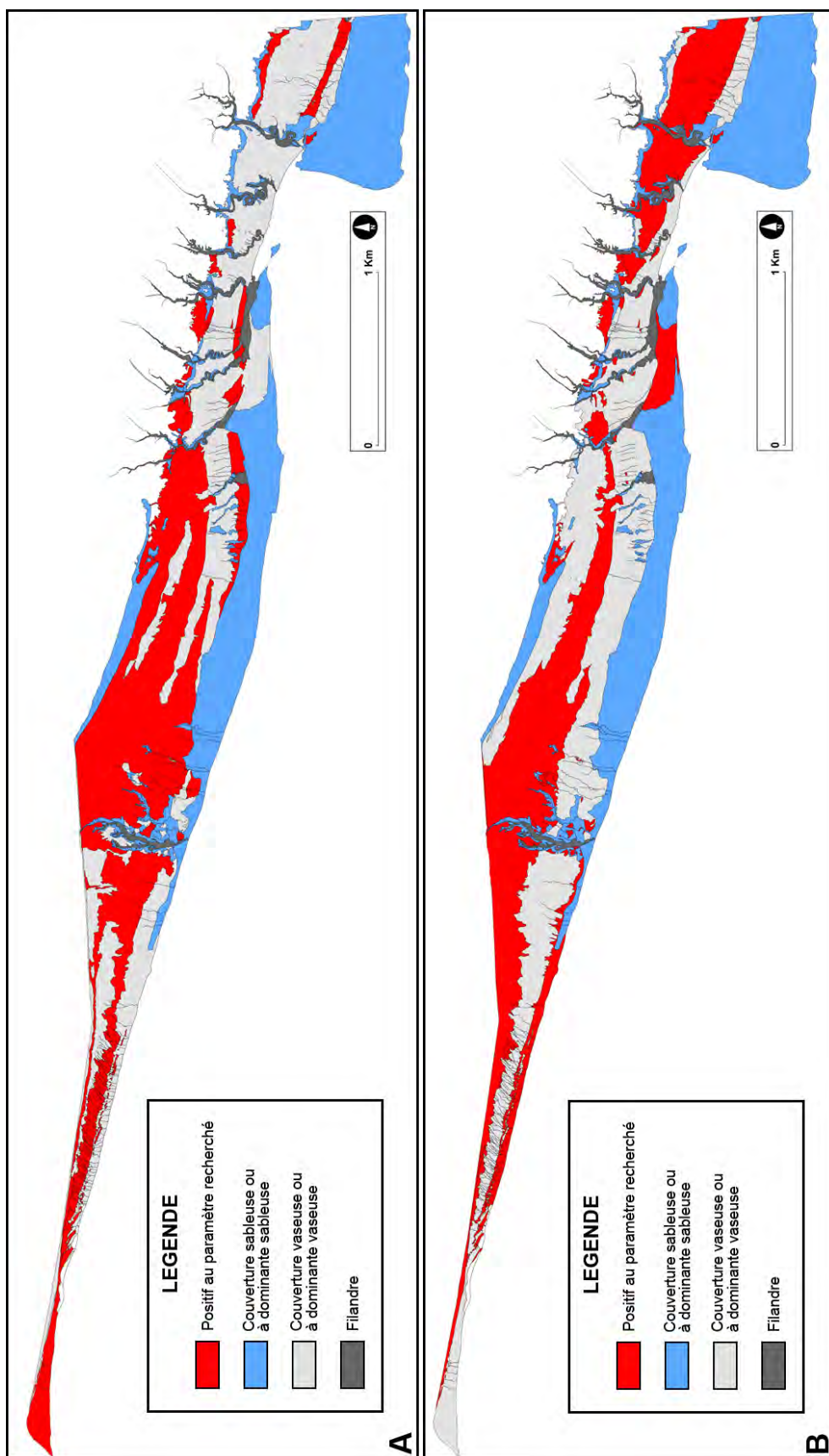


Figure 6: Cartographie de la génotoxicité de la fosse Nord en 2010 sans activation métabolique (A) et avec activation métabolique (B).

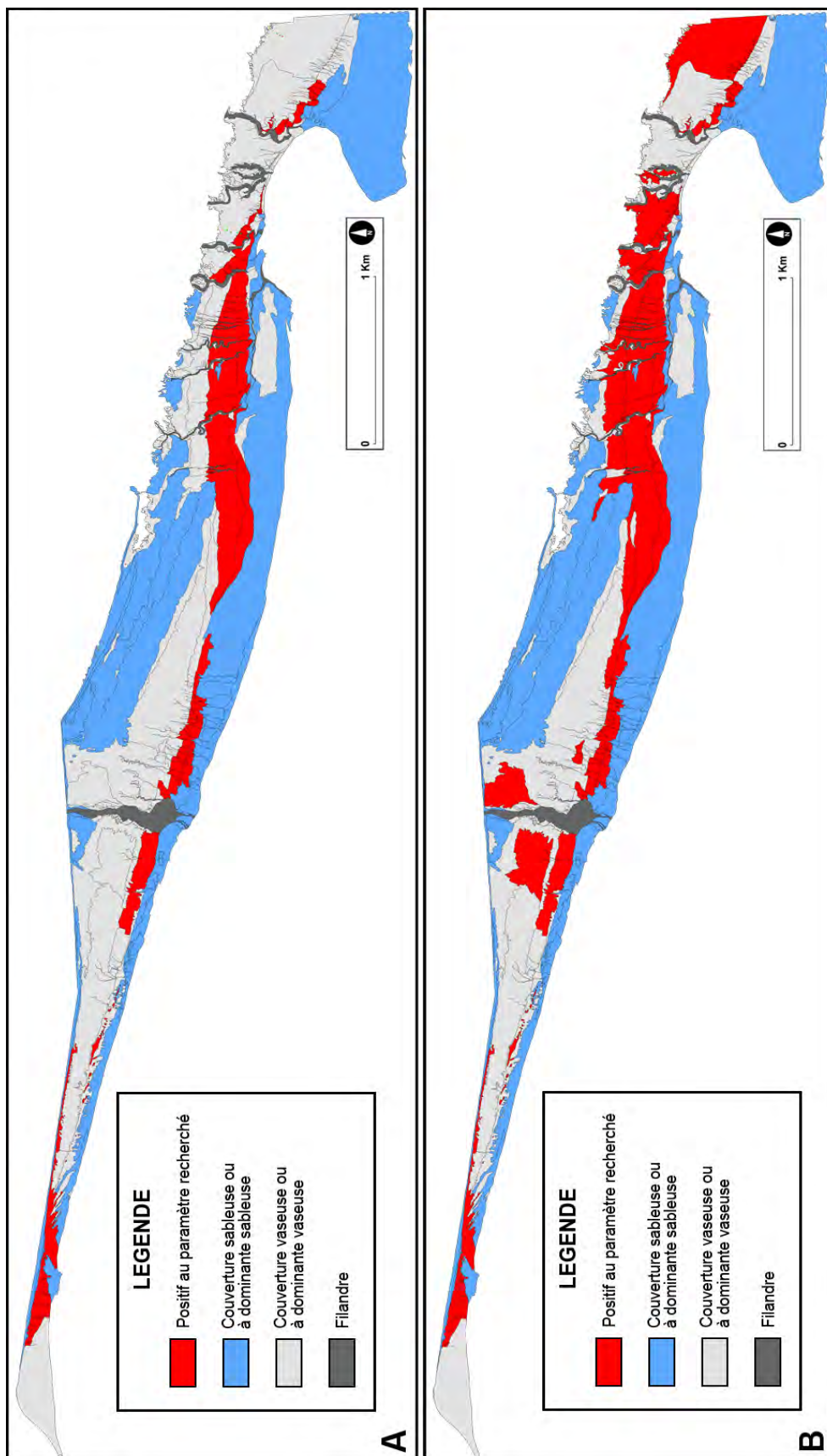


Figure 7: Cartographie de la génotoxicité de la fosse Nord en 2011 sans activation métabolique (A) et avec activation métabolique (B).

3.3. Approche TIE

Les résultats du SOS-Chromotest réalisé sur les différents extraits de sédiment nous ont conduit à mener une approche TIE sur les extraits « Pont 3-2010 » (Avec et Sans activation métabolique) et « Dune 7-2010 » (Sans activation métabolique).

Parmi les 4 préfractions obtenues par SPE (voir section 2.6) pour chacun des extraits, une seule présentait une activité génotoxique importante. Les résultats concernant l'analyse de la génotoxicité des préfractions et des hyperfractions de ces extraits sont collectés dans le tableau 2 page 16.

Tableau 2: Préfractions et hyperfractions positives génotoxiques par la réalisation du SOS-Chromotest.

Extrait	Avec ou sans S9	Préfractions positives	Hyperfractions positives
Pont 3-2010	Sans	F3	HF8-HF26-HF37-HF38
Pont 3-2010	Avec	F1	HF14-HF19- HF21-HF22-HF23-HF24 -HF30
Dune 7-2010	Sans	F4	HF1-HF2-HF5-HF6-HF9-HF10-HF11-HF12- HF13-HF14-HF15-HF16 -HF21-HF24-HF26-HF31- HF37-HF38-HF39-HF40

* Les hyperfractions en **GRAS et EN ROUGE** sont celles qui montrent une activité importante.

Concernant l'extrait de sédiment de Pont 3-2010, la fraction F1 identifiée comme la plus génotoxique avec activation métabolique contient des composés hydrophobes (par exemple, les PCB, pesticides organochlorés, HAP, d'après le fractionnement d'une solution étalon contenant des composés de polarités très variées) alors que sans activation métabolique, c'est la fraction F3 contenant des composés de polarité moyenne (par exemple, les hormones, substances pharmaceutiques) qui montre l'activité génotoxique la plus importante. Il est également intéressant de noter que c'est la fraction 4 de l'extrait du sédiment de Dune 7 (sans activation métabolique) qui présente une activité importante, cette dernière fraction contenant des composés polaires.

Chacune de ces fractions a été ensuite fractionnée plus finement par HPLC (voir section 2.6). Les hyperfractions positives identifiées comme les plus génotoxiques sont indiquées en rouge dans le Tableau 2. A titre d'exemple, le chromatogramme HPLC de la préfraction F4 du sédiment de Dune 7 est représenté à la Figure 8 page 17, en dessous du chromatogramme de la solution étalon utilisée pour calibrer l'appareil (contrôle qualité pour le fractionnement). Parmi les 40 hyperfractions obtenues, l'hyperfraction F4-15 identifiée comme la plus génotoxique est surlignée en orange.

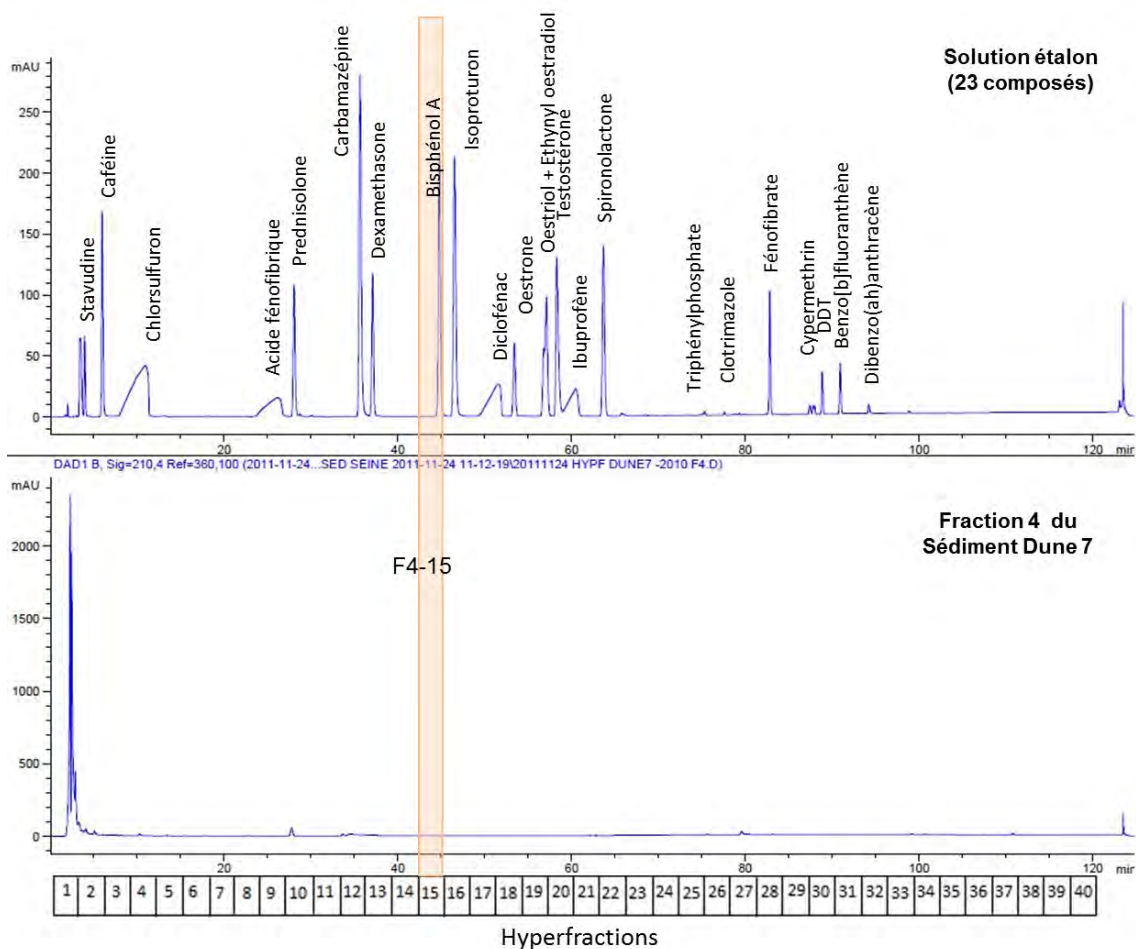


Figure 8: Chromatogrammes HPLC d'une solution étalon de 23 composés appartenant à différentes classes (HAP, pesticides, stéroïdes et glucocorticoïdes, substances pharmaceutiques) et de la préfraction F4 du sédiment de Dune 7 (2010). Le numéro des hyperfractions collectées toutes les 3 min est indiqué sous le chromatogramme. L'hyperfraction F4-15 de la préfraction F4 du sédiment de Dune 7 identifiée comme la plus génotoxique est surlignée en orange.

Les composés potentiellement génotoxiques ont été recherchés dans les hyperfractions Pont 3-2010 (sans S9) HF3-26, Pont 3-2010 (avec S9) HF1-21 et Dune 7-2010 (sans S9) HF4-13, HF4-14, HF4-15 et HF4-16 par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse haute résolution (LC-QTOF).

L'hyperfraction Pont 3-2010 (avec S9) HF1-21 contenant des composés hydrophobes a tout d'abord été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) en mode SCAN. Les spectres de masse des quelques composés observés sur le chromatogramme n'ont pas permis leur identification par recherche dans la banque de spectres du NIST, probablement en raison de la faible sensibilité de ce mode d'analyse utilisé pour rechercher des composés non ciblés. Cette hyperfraction a été également analysée par LC-QTOF.

De façon générale, la démarche d'identification de composés inconnus par LC-QTOF se déroule en deux étapes d'analyse. Une première analyse en MS simple haute résolution (TOF) permet, à partir des spectres de masse, de calculer la composition chimique élémentaire des molécules ionisées pour tous les composés détectés; l'affectation ultime de l'identité du composé est ensuite effectuée grâce à une deuxième analyse en MS en tandem (MS/MS : Q-TOF) ciblée sur les ions précurseurs (molécules ionisées) sélectionnés dans la première analyse.

Chaque hyperfraction de sédiment, ainsi que l'hyperfraction du blanc analytique correspondante, a d'abord été analysée en MS haute résolution (TOF), et ce en testant différents types de sources (ESI, Jet Stream ESI, APCI) dans les deux modes d'ionisation (positif et négatif) de façon à détecter le plus grand nombre de composés possible. Les analyses réalisées en Jet Stream ESI en mode positif (ESI+) se sont avérées les plus adaptées ici. Pour chaque chromatogramme obtenu, le logiciel de traitement de données détecte des composés à partir des masses exactes des ions formés (ainsi que des abondances isotopiques). Il est ensuite possible de comparer les composés détectés dans les hyperfractions positives de sédiment et ceux présents dans les hyperfractions du blanc de procédure correspondantes. A titre d'exemple, le profil des masses des molécules détectées dans l'hyperfraction HF4-15 de Dune 7-2010 et l'hyperfraction HF4-15 du blanc est représenté à la Figure 9 page 18. N'ont été sélectionnés pour la suite de l'étude que les composés présents uniquement dans l'hyperfraction positive de sédiment (ou beaucoup plus abondants que dans le blanc) (en exemple sur la Figure 9, une molécule protonée de masse exacte 500,3797 Da identifiée uniquement dans l'hyperfraction de sédiment).

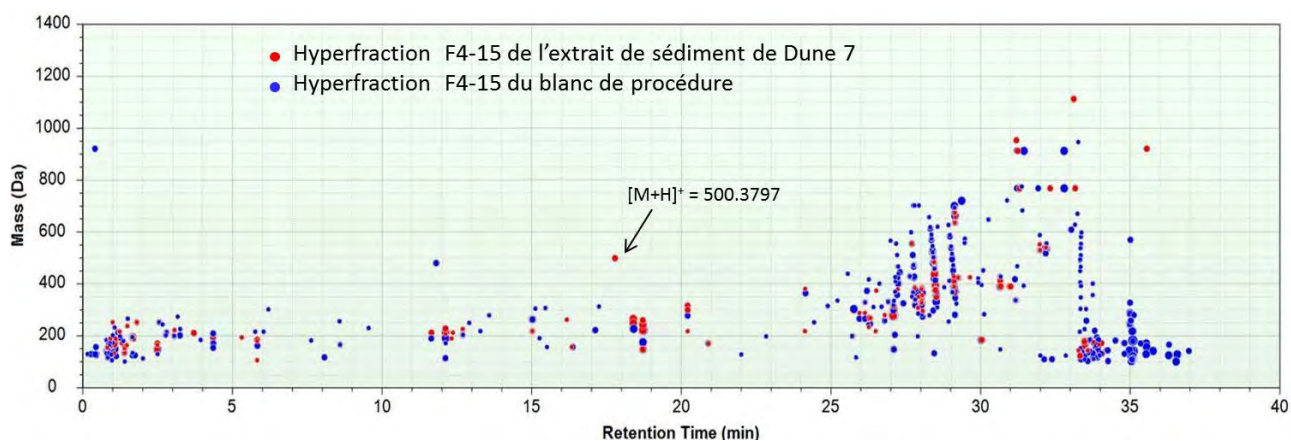


Figure 9: Profils de masse obtenus en fonction du temps de rétention des composés dans les hyperfractions F4-15 de l'extrait de sédiment de Dune 7 (en rouge) et du blanc de procédure analytique (en bleu). Chaque point représente un composé identifié. En exemple, une molécule protonée de masse exacte 500,3797 Da identifiée uniquement dans l'hyperfraction de sédiment.

A partir de leur masse exacte, le logiciel de traitement de données peut également générer une liste de formules moléculaires possibles, à chacune d'entre elles étant assigné un score (probabilité d'adéquation entre la masse mesurée et celle de la formule chimique proposée). Si cette liste peut être encore réduite en appliquant des paramètres choisis par l'utilisateur, des dizaines de formules peuvent malgré tout être proposées pour une masse donnée, sachant de plus que des dizaines voire des centaines de molécules peuvent posséder la même formule brute. Les noms des composés possédant les compositions chimiques les plus probables (ayant le meilleur score) pour une masse donnée ont été recherchés dans différentes bases de données (exemple : Chemspider). Les spectres de masse des composés ciblés ont ensuite été générés de façon à sélectionner les ions clés (les ions précurseurs, c'est-à-dire les molécules protonées) (exemple de l'ion précurseur de masse 500,3797 Da à la Figure 10A).

Afin d'identifier les composés détectés, c'est-à-dire de réduire au maximum la liste des candidats les plus probables, une deuxième analyse de chaque hyperfraction a donc ensuite été réalisée en MS/MS (Q-TOF) sur les ions précurseurs ciblés (ceux uniquement présents dans l'échantillon de sédiment), et ce en faisant varier l'énergie de collision de façon à obtenir un degré de fragmentation suffisant pour l'élucidation structurale (exemple de l'ion précurseur de masse 500,3797 Da à la Figure 10B). Au final, la confirmation est basée sur l'ensemble des données obtenues (masse exacte de la molécule protonée, son profil isotopique, masse exacte des ions produits, le profil de fragmentation ...) par comparaison avec celles attendues pour la formule moléculaire proposée. Plus le score calculé par le logiciel est élevé, plus la formule moléculaire proposée a de probabilité d'être la formule correcte.

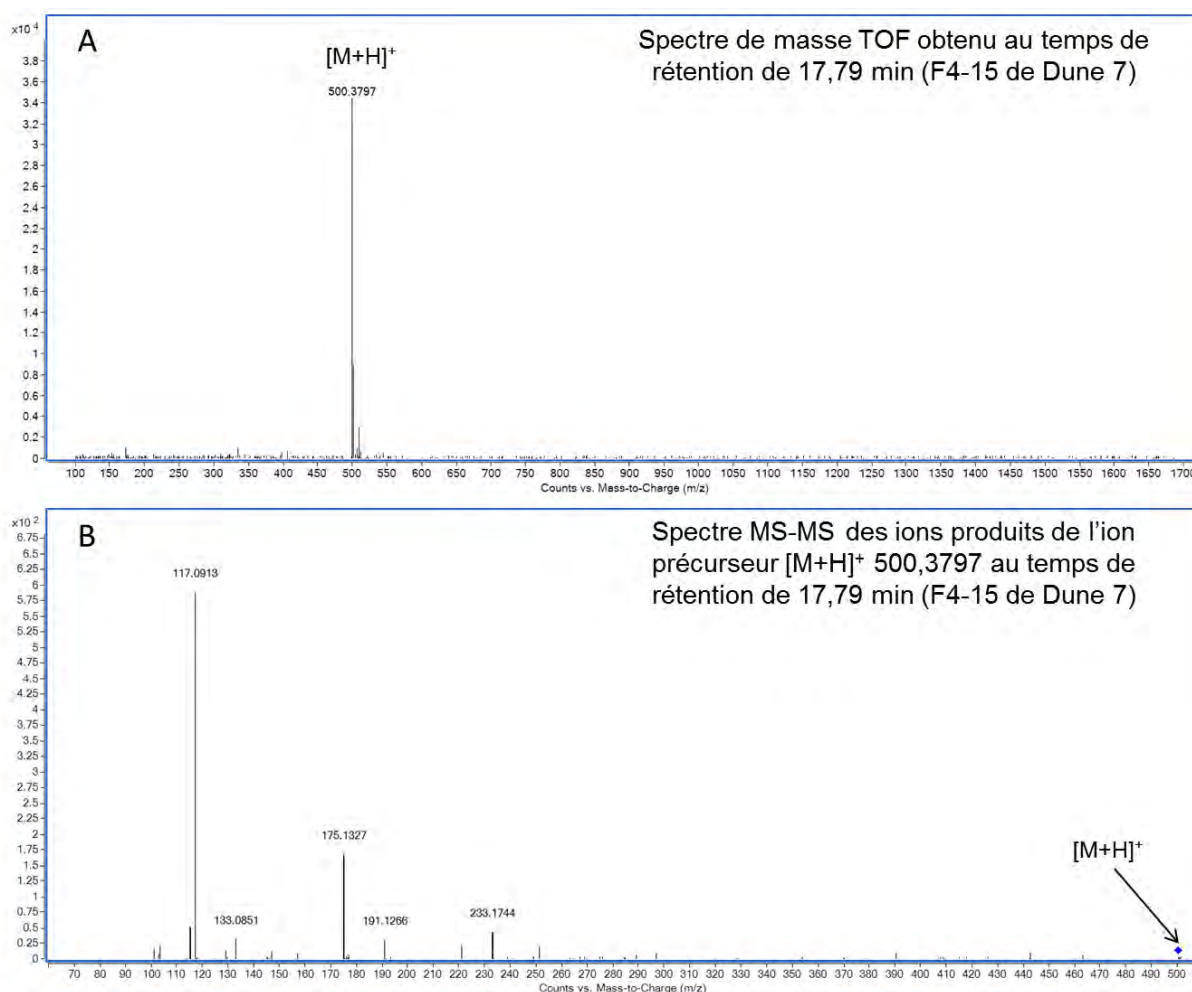


Figure 10: A) Spectre de masse TOF obtenu au temps de rétention de 17,79 min (correspondant à molécule protonée indiquée sur la Figure 8) dans l'hyperfraction F4-15 de l'extrait de sédiment de Dune 7. B) Spectre de masse MS-MS des ions produits issus de la fragmentation de l'ion précurseur [M+H]⁺ 500,3797 au temps de rétention de 17,79 min (F4-15 de Dune 7).

Des recherches en banque de données de masses exactes et en bibliothèque MS/MS ont également été menées mais aucun composé détecté n'a été identifié dans les différentes hyperfractions analysées. Si différentes molécules, pour lesquelles des formules moléculaires ont été proposées avec un score supérieur à 95%, ont été détectées en

mode TOF dans chaque hyperfraction de sédiment (non présentes dans le blanc de procédure), aucune confirmation fiable de ces formules moléculaires n'a été possible en mode MS/MS ; les scores calculés de correspondance entre les spectres de masse des ions produits et ceux des principaux ions attendus pour les formules moléculaires proposées étant généralement inférieurs à 80%, aucun composé n'a donc pu être identifié de façon certaine. Cette étude souligne toute la difficulté de la mise en œuvre d'une telle approche, qui nécessiterait un projet à part entière.

4. CONCLUSION

Dans le cadre du projet **BCG**, nous avons montré que la méthodologie qui consiste à généraliser la génotoxicité mesurée ponctuellement à l'ensemble d'un faciès sédimentaire, est pertinente. En effet, nous avons constaté une très bonne corrélation entre la génotoxicité et la nature du sédiment. Les cartographies 2010 et 2011 de la génotoxicité estimée par excès au niveau de la vasière nord montrent une grande surface de sédiment génotoxique qu'il convient cependant de relativiser car la méthodologie présentée ici demande à être améliorée. En effet, il convient de diminuer la variabilité potentielle induite par la généralisation à l'excès de la génotoxicité à l'ensemble de la vasière. Pour cela, il est nécessaire d'augmenter le nombre de radiales de prélèvements et d'en déterminer le nombre optimum au niveau de la vasière pour obtenir une cartographie précise de la génotoxicité.

Les résultats obtenus montrent que d'une manière générale la génotoxicité au niveau de la vasière nord de l'estuaire de la Seine est associée à des faciès sédimentaires vaseux ou à dominante vaseuse. Même si les coefficients de corrélation entre la génotoxicité et les différents paramètres mesurés (Teneur en MO, Granulométrie et Calcimétrie) ne mettent pas en évidence une quelconque corrélation statistique, il ressort que la génotoxicité est majoritairement associée à des sédiments constitués de particules fine (inférieure à 62,5 μm). En effet, 65% des échantillons sédimentaires qui présentent une génotoxicité, sont des sédiments qui possèdent au minimum 90% de particules de taille inférieure à 62,5 μm . Seulement 15% des échantillons caractérisés par une génotoxicité possèdent moins de 50% de particules inférieures à 62,5 μm . Cela met en évidence que la génotoxicité sédimentaire au niveau de la vasière nord est principalement lié au phénomène d'adsorption qui facilite la liaison des molécules organiques sur la surface des particules solides de petites taille.

D'un point de vue sédimentologique, la génotoxicité directe (-S9) mesurée au niveau de la vasière nord est associée à des sédiments récents (échelle mensuelle), plus ou moins consolidés (vases lisses à sillons marqués) alors que la progénotoxicité (génotoxicité indirecte ou +S9) est associée à des sédiments plus anciens (échelle annuelle). Il faut noter qu'en 2010, la génotoxicité directe se trouve préférentiellement dans les apports de marée (vase fraîche) et sur des zones remaniées par le flot c'est à dire l'estran vaso-sableux à arrachements (zone mixte où la vase fraîche se dépose sur des zones remaniées par la houle). En 2011 cette génotoxicité directe se trouve dans des faciès récents plus ou moins consolidés, comme les vases lisses à sillons marqués et les vases lessivées. Les faciès sédimentaires associés à la progénotoxicité sont différents entre 2010 et 2011. En 2010, la progénotoxicité se retrouve essentiellement sur des zones remaniées (estran vaso-sableux à arrachements) alors qu'en 2011 elle se retrouve sur des sédiments plus récents plus ou moins consolidés comme les vases lisses à sillons marqués et les vases lessivées et cannelées.

Ces observations viennent conforter la question de la rémanence des molécules progénotoxiques, classiquement les HAPs, que l'on retrouve donc dans des sédiments « anciens » mais posent aussi la question d'une plus grande susceptibilité à la dégradabilité des molécules génotoxiques directes qui expliquerait que l'on retrouve ces molécules préférentiellement dans des sédiments « récents ».

Les différences entre les cartographies estimées de la génotoxicité en 2010 et 2011 s'expliquent notamment par le fait que l'estuaire de la Seine est soumis à de grosses variations hydrodynamiques entraînant des différences des faciès sédimentaires d'une année sur l'autre. En effet, les cartographies 2010 et 2011 des faciès sédimentaires de la vasière nord mettent en évidence ces différences.

De plus, depuis quelques années, suite notamment à une diminution des crues du fleuve, le bouchon vaseux a tendance à croître. Cela implique l'apparition de phénomènes de relargages très ponctuels de MES issues du bouchon vaseux qui se déposent sous forme de « patchs » au niveau de la vasière. Ces « patchs » peuvent conduire à l'apparition très localisée (et non représentatifs des faciès sédimentaires de la vasière nord) de sédiments génotoxiques très superficiels. Ainsi, il pourrait être intéressant à l'avenir de corréliser la cartographie estimée de la génotoxicité au niveau de la vasière nord avec un suivi de la génotoxicité réalisé au niveau du bouchon vaseux.

Dans le cadre de BCG, une approche **TIE** (*Toxicity Identification Evaluation*) a été mise en œuvre afin de caractériser les composés ou les familles chimiques des molécules potentiellement à l'origine de l'activité génotoxique observée dans certains sédiments. Aucun des composés détectés les fractions ultimes des extraits de sédiment n'a pu être identifié de façon certaine. Cette étude souligne toute la difficulté de la mise en œuvre d'une telle approche, qui nécessiterait un projet à part entière. Les rares travaux existants sur le fractionnement d'échantillons, basés sur l'activité AhR plus particulièrement, mettent en évidence la présence de composés HAP-like qui génèrent un fond continu de réponses positives dans l'ensemble des fractions, ce qui est également le cas ici (Kinani *et al.*, 2010). Dans nos travaux, la génotoxicité mesurée au niveau des extraits de sédiment ne se retrouve pas avec la même intensité dans les hyperfractions obtenues, mettant *a priori* en évidence un effet de mélange additif et/ou synergique. De manière générale, guidée par le SOS-Chromotest l'approche TIE s'avère plus délicate que lorsque sont utilisés des bioessais qui permettent la détection de composés bien particuliers, comme ceux basés sur le couplage récepteur nucléaire/gène rapporteur comme pour les composés perturbateurs endocriniens (tests *in vitro* PXR, GR, MR ...) (Creusot *et al.*, 2010).

ÉTUDE DU TRANSFERT DES CONTAMINANTS DU MILIEU VERS LES ORGANISMES

1. INTRODUCTION

Le programme de recherche **BCG** consistait dans un deuxième temps à étudier à l'aide d'outils biologiques pertinents, simples et peu coûteux, le transfert du potentiel génotoxique du milieu vers deux organismes représentatifs de l'estuaire de la Seine: *Eurytemora affinis* et *Platichthys flesus*. L'intérêt étant de déterminer les outils adaptés à l'évaluation et au suivi de la génotoxicité au niveau du bouchon vaseux ainsi que ceux adaptés pour déterminer leurs effets potentiels ou avérés sur les organismes vivants.

Ainsi, il était initialement prévu d'évaluer la génotoxicité des molécules organiques dans:

- Eau de Seine (filtrée sur 0,2 µM) prélevée au niveau du pont de Tancarville,
- Matières En Suspension (MES) prélevées au niveau du pont de Tancarville,
- Pool d'organismes entiers d'*E. affinis*,
- Pool de foie de *P. flesus*.

Les effets génotoxiques de ces molécules sur les organismes vivants, devaient être évalués grâce au test des comètes sur:

- des cellules sanguines de *P. flesus*,
- des cellules dissociées de pool d'organismes entiers d'*E. affinis*.

Dans le cadre de projets antérieurs, financés notamment par le **GIPSA**, certaines études ont montré qu'il était possible de réaliser le test des comètes sur des cellules dissociées de foie de flet. Cachot et collaborateurs ont montré également que le test des comètes pouvait être réalisé sur des cellules dissociées d'embryon de medaka (Cachot *et al.* 2008). Cette technique plutôt adaptée aux espèces de petite taille, n'avait jamais été utilisée sur des cellules dissociées d'*E. affinis*.

Ainsi, la première partie de cette étude exploratoire consistait à mettre au point un protocole de dissociation cellulaire sur cet organisme (figure 11-A page 20).

Ce protocole de dissociation a été utilisé pour réaliser le test des comètes sur plusieurs pools d'organismes entiers d'*E. affinis*. Les résultats obtenus ont montrés que les cellules dissociées de cet organisme selon le protocole mis au point, sont trop petites pour que l'on puisse réaliser un test des comètes pertinent. En effet, le noyau de ces cellules est d'environ 3 µm et à cette taille, le logiciel d'analyse d'image ne permet pas de quantifier correctement le niveau d'endommagement de l'ADN. En effet, même s'il est possible de différencier un noyau intact d'un noyau très endommagé, il est plus délicat de discriminer un noyau intact d'un noyau endommagé ou un noyau endommagé d'un noyau très endommagé (voir figure 11-B page 20).

De ce fait, il a été décidé de remplacer le test des comètes par le dosage des adduits à l'ADN. Le dosage des adduits à l'ADN constitue un excellent marqueur d'exposition à des molécules génotoxiques dans la mesure où cela permet d'évaluer leurs capacités à former des adduits encombrants sur la molécule d'ADN. Le dosage des adduits à l'ADN a été réalisé sur différents pools d'ADN d'*E. affinis* ainsi que sur différents pools d'ADN de foie de *P. flesus*. Le test des comètes a été effectué uniquement sur les erythrocytes de flets.

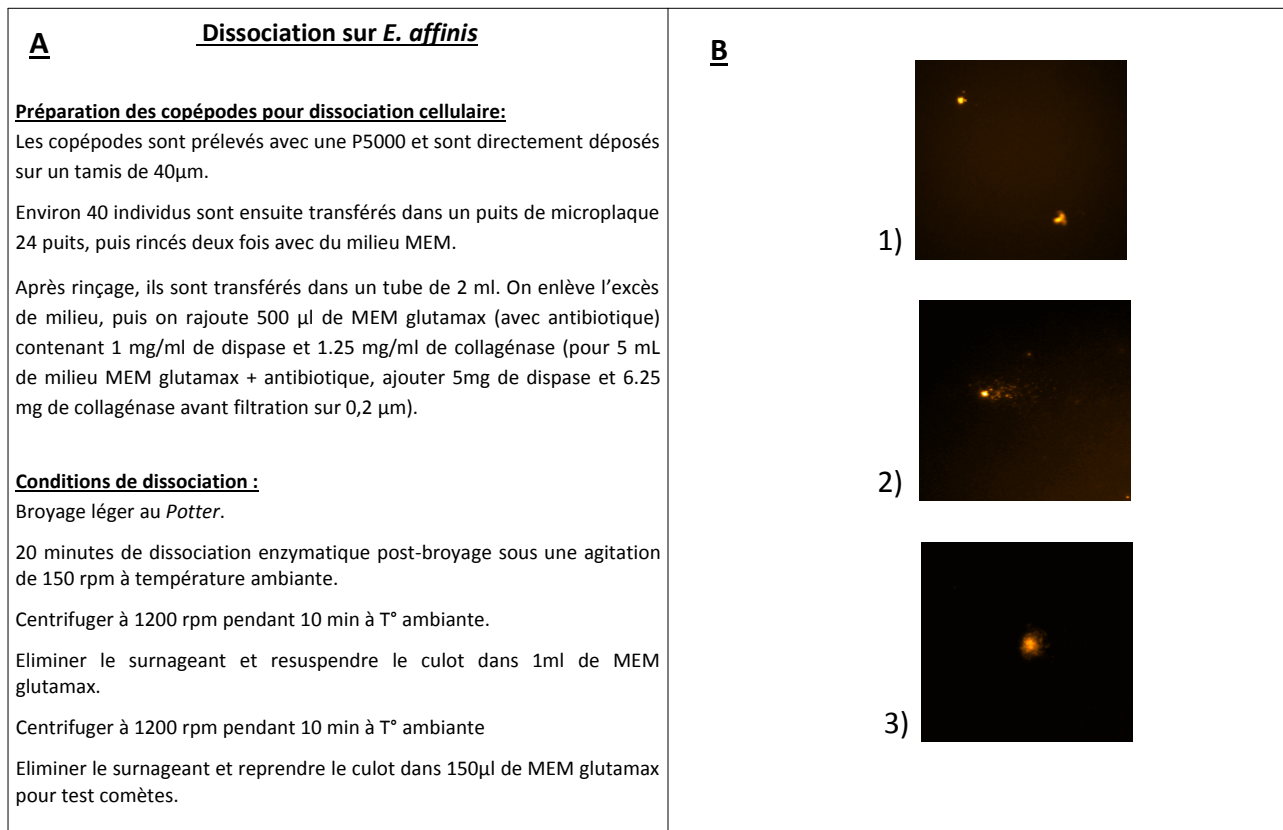


Figure 11: A) Protocole de dissociation mis au point dans le cadre du programme BCG. B) Resultats du test de comètes obtenus sur les cellules d'*E. affinis* issues du protocole de dissociation: 1) Noyaux intacts 2) Noyau endommagé 3) Noyau très endommagé.

2. MATÉRIELS & MÉTHODES

2.1. Prélèvements

Initialement, l'ensemble de ces mesures devaient être réalisées dans le cadre d'un suivi mensuel au cours de l'année 2011. Cependant, du fait d'une sous-estimation du budget nécessaire à la réalisation de ces pêches de flets au niveau de l'estuaire et de l'absence de pêcheurs susceptibles de réaliser ces pêches (curage du port de Honfleur en 2011 conduisant à la mise en cale sèche des bateaux de pêche) un tel suivi n'a pas pu être réalisé.

La réorientation du programme **BCG** nous a donc conduit à réaliser des prélèvements de flets à chaque fois qu'une pêche était organisée par la **Cellule de Suivi du Littoral Normand (CSLN)**. Ces pêches étaient réalisées par chalutage en privilégiant les flets de petites tailles (< 20 cm). En effet, les flets de petites tailles sont plus localisés au niveau de l'estuaire de Seine (moins de déplacements de grande ampleur) et sont donc plus représentatifs d'une exposition continue aux molécules organiques qui y sont présentes.

Au total, cinq pêches de flets ont été réalisées dans le cadre du programme **BCG**. Le nombre de poissons par pêche ainsi que leurs poids et leurs tailles sont indiqués dans le tableau 3 en annexe 2 page 56. Dans le but de réaliser des expérimentations sur des organismes (*E. affinis* et *P. flesus*) prélevés le même jour, chaque pêche de flets a été suivie d'un prélèvement de copépodes au niveau du pont de Tancarville (Figure 12 page 25). Au cours de ces campagnes de prélèvements, le plancton a été prélevé par plusieurs traits horizontaux (sub-surface) de filets WP2 (maille 200 μ m) d'une durée de 5 à 10 minutes contre le courant juste après l'étalement de haute mer. Les échantillons de plancton ont ensuite été ramenés au laboratoire pour y être triés afin de récupérer uniquement *Eurytemora affinis*.

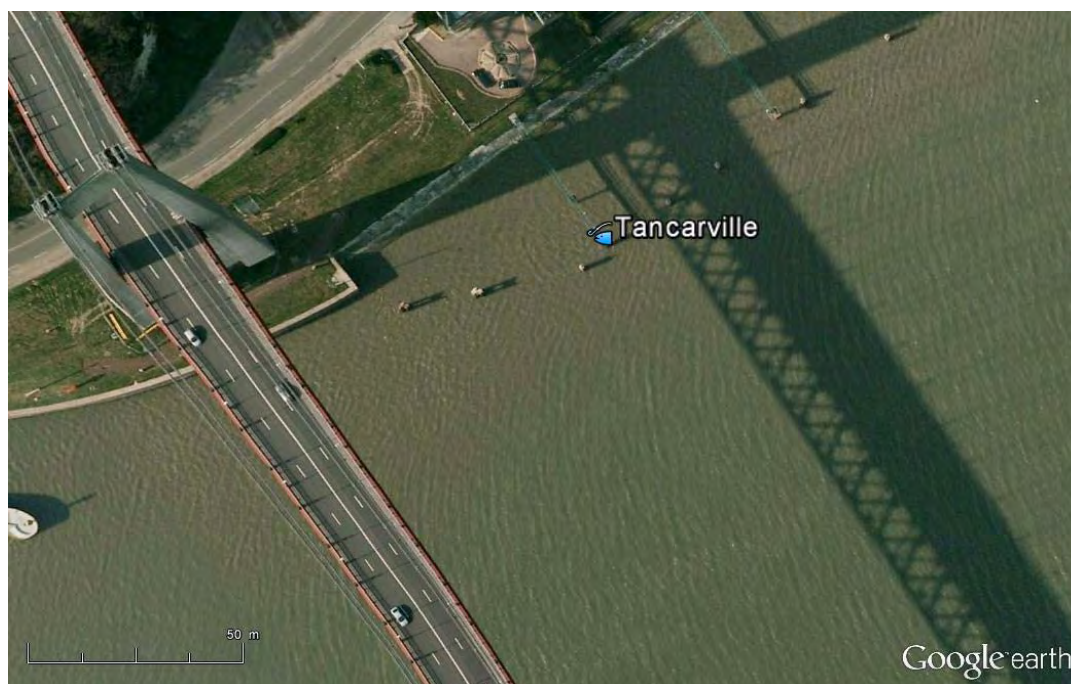


Figure 12: Localisation du point de prélèvement d'*E. affinis*, des MES et de l'eau au niveau du bouchon vaseux.

Des prélèvements d'eau et de MES (Matières En Suspension) ont également été réalisés au cours de ces pêches. Pour cela, nous avons utilisé des bouteilles en verre ambré de 1 L qui ont été nettoyées à l'aide de détergent avant d'être rincées à l'eau ultra pure. Ensuite, ces bouteilles ont été pyrolysées à 450 °C pendant une nuit, puis fermées par du papier aluminium.

2.2. Préparation des échantillons

Les flets ont été ramenés vivants au laboratoire où ils ont été mesurés et pesés. Une prise de sang a été réalisée avant le sacrifice de l'animal nécessaire au prélèvement du foie de l'animal. La prise de sang a été réalisée à l'aide d'une seringue héparinée (solution à 5000 U/mL dans eau stérile) montée d'une aiguille de 0,5x16 mm. Dix micro-litres de sang ont alors été transférés dans un tube cryogénique contenant 1 mL de milieu de cryoconservation. Le tube a été congelé immédiatement dans de l'azote liquide.

Le foie, après avoir été pesé, a été transféré dans un micro-tube de 1,5 mL avant congélation à -80°C. Une partie de chaque foie a servi au dosage des adduits à l'ADN et l'autre partie a servi à la constitution de pools représentatifs de chaque campagne de prélèvement. Sur chacun de ces pools, une extraction ASE, dont les conditions sont décrites en figure 2 page 7, a été réalisée.

Les copépodes ramenés au laboratoire, ont été triés puis concentrés par filtration sur des filtres à café en plastique. Les copépodes ont ensuite été transférés dans des tubes de centrifugation de 15 mL puis immédiatement congelés à -80°C. Une partie des individus a été utilisée pour le dosage des adduits à l'ADN et une autre partie pour la réalisation d'une extraction ASE selon les mêmes conditions que pour les foies de flets.

Les prélèvements d'eau ont été filtrés sur des unités de filtration en verre surmontées de filtres en fibre de verre GFF d'une porosité de 0,2 µm (Whatman). Avant filtration, les échantillons d'eau sont homogénéisés afin de remettre en suspension les particules et d'obtenir ainsi une concentration homogène en particules. Après filtration sur 0,2 µm, une extraction organique a été réalisée par filtration SPE (Solid Phase Extraction) sur une colonne Envi-18 (Sigma Aldrich). Pour cela, après conditionnement de la colonne avec 5 mL de méthanol, le litre d'eau de l'échantillon a été filtré. Ensuite, les molécules organiques fixées sur la matrice solide de la colonne ont été éluées avec 5 mL de méthanol et 5 mL de dichlorométhane dans un flacon en verre brun pyrolysé. Les solvants organiques ont ensuite été évaporés sous un flux d'azote U et les extraits ont été remis en suspension dans du DMSO puis conservés à -20°C jusqu'à analyse du potentiel génotoxique par le SOS-Chromotest.

Les MES ont été récupérées dans un premier temps par décantation dans un bécher d'1 litre d'eau prélevée au niveau du pont de Tancarville. Ensuite, le litre d'eau a été filtré sur 0,2 µm afin de récupérer les particules les plus fines. Après lyophilisation de ces MES, les molécules organiques ont été extraites par extraction ASE selon le protocole décrit en figure 2 page 7.

2.3. Détermination du potentiel génotoxique: SOS-Chromotest

Le **SOS-Chromotest** est un test de génotoxicité bactérien qui permet d'évaluer sur une souche de *E. coli* les capacités de molécules chimiques à induire la réponse « SOS » mise en place chez la bactérie lorsqu'il y a altération du génome. A l'aide d'un réactif coloré, il est possible de quantifier l'expression d'un gène impliqué dans la mise en place de cette réponse « SOS » dans une souche génétiquement modifiée d'*E. coli* (PQ37) et ainsi d'évaluer la génotoxicité des molécules mises en contact de la bactérie (Quillardet & Hofnung, 1985). Le SOS-Chromotest a été réalisé en microplaque selon le protocole décrit par White et collaborateurs en 1996 (White *et al.*, 1996) hormis le fait que les réactifs colorés utilisés sont ceux mentionnés par Quillardet et Hofnung dans leur publication de 1985.

Le SOS-Chromotest est un test largement utilisé pour évaluer la génotoxicité sur différentes matrices environnementales que ce soit des eaux, des sols ou des sédiments (Mersch-Sundermann *et al.* 1989; Guzzela *et al.*, 2006; Cachot *et al.*, 2006)

2.4. Dosage des adduits à l'ADN

Les **adduits à l'ADN** constituent un marqueur précoce de l'interaction entre un génotoxique et le « vivant ». *In situ*, des niveaux d'adduits à l'ADN élevés ont été mesurés chez les poissons vivants dans des zones contaminées aux HAP. Une corrélation entre le niveau d'adduits à l'ADN hépatique et la concentration en HAP totaux du sédiment a même été démontrée (Van der Oost *et al.*, 1994). Leur mesure a été proposée comme biomarqueur de génotoxicité pour la biosurveillance de l'environnement aquatique. La technique de post-marquage au phosphore 32 classiquement utilisée est particulièrement adaptée au dosage des adduits dits encombrants, c'est-à-dire en relation avec l'exposition à des génotoxiques présentant des structures chimiques complexes tels que certains Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) ou certaines amines aromatiques. La figure 13 page 28 présente les différentes étapes du post-marquage conduisant à un radiomarquage spécifique des bases modifiées (ou adduits). Ces dernières sont ensuite séparées par chromatographie sur couche mince, puis repérées soit par autoradiographie, soit par des systèmes d'enregistrement numérisés (appareillage type phosphor-imager®). La radioactivité mesurée au final étant directement proportionnelle à la quantité d'adduits présents, les résultats sont exprimés sous forme de **taux relatifs en adduits** (ou **RAL**, pour Relative Adducts Levels). Ils correspondent au nombre d'adduits dans l'échantillon d'ADN analysé rapporté à une quantité équivalente de nucléotides normaux (généralement pour 10⁸ à 10¹⁰ nucléotides normaux).

Dans **BCG**, le dosage des adduits à l'ADN a été réalisé sur des pools d'organismes entiers d'*E. affinis* et sur des pools de foie de Flet.

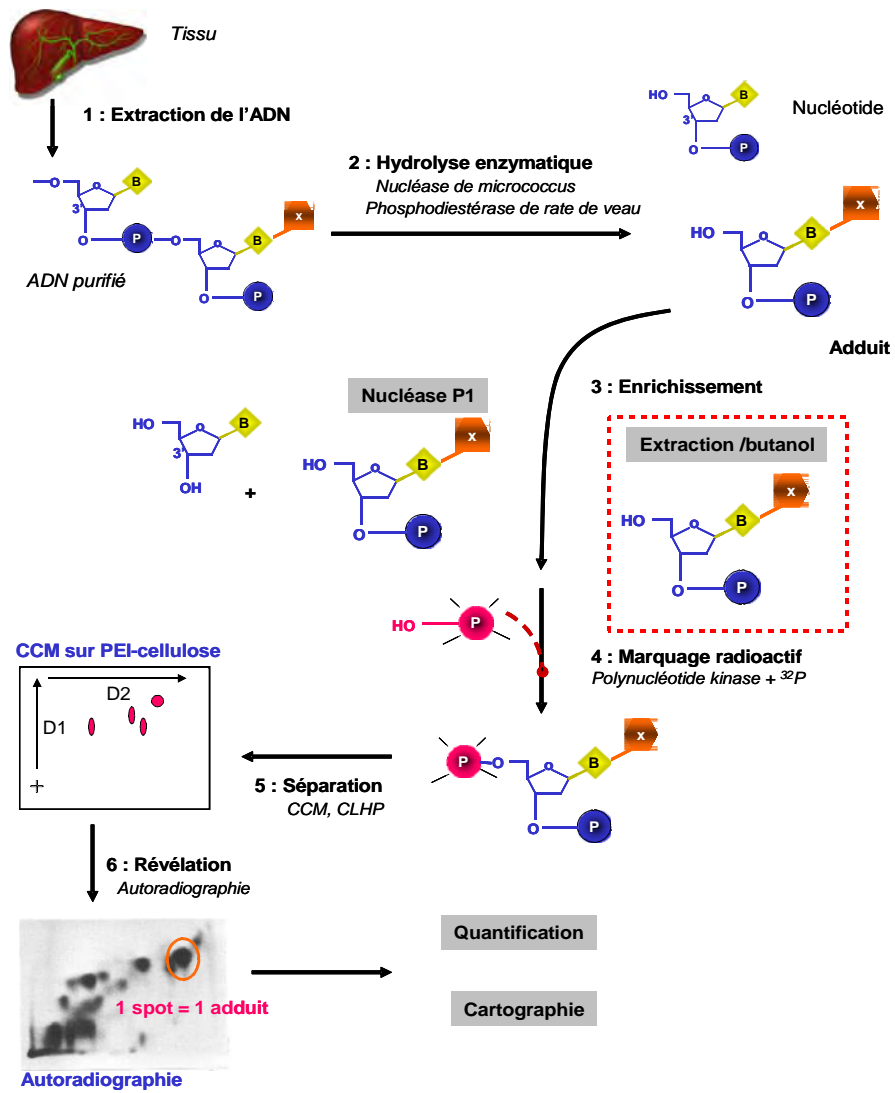


Figure 13: Les différentes étapes de la technique du post-marquage au phosphore 32.

- ▭ Variantes à la technique classique
- CCM: Chromatographie sur Couche Mince
- CLHP: Chromatographie Liquide Haute Performance

2.5. Test des comètes

Le dosage des cassures des brins d'ADN a été réalisé par le **test des comètes** en mesurant le pourcentage d'ADN des érythrocytes de flet ayant migré dans la queue de la comète. Les cassures de l'ADN peuvent se former soit directement après réaction avec les espèces réactives de l'oxygène (ERO) soit indirectement via la réparation incomplète des bases altérées de l'ADN. Les facteurs connus pour déclencher un stress oxydant sont la biotransformation de xénobiotiques organiques (Livingstone, 2001), les chocs thermiques, les phénomènes liés à l'oxygène – anoxie, hypoxie, hyperoxie (Mustafa *et al.*, 2011) et des systèmes de régulation antioxydants défaillants (Hermes-Lima *et al.*, 1998).

Le test des comètes, dans sa version alcaline, décrit par Singh *et al.* (1988) permet de mesurer les cassures « simple brin » de l'ADN et les lésions alcali-labiles. Une fois les cellules incorporées dans un gel, les membranes cytoplasmiques sont lysées en milieu basique. L'ADN des noyaux ainsi libéré est dénaturé lors d'un traitement alcalin. La distorsion de l'hélice et l'exposition des sites alcalis-labiles engendrent des cassures des brins d'ADN. L'étape d'électrophorèse à pH basique (>13) permet la migration des fragments d'ADN dans le gel. L'importance du phénomène de migration, qui dépend du nombre de cassures et de la taille des fragments, reflète l'étendue des dommages. Un volume de 140 µL d'agarose LMP (« Low Melting Point ») à 0,8 % et de 10 µL de suspension cellulaire à 1×10^6 cellules/mL est déposé sur les lames de verre recouvertes d'agarose NMP (« Normal Melting Point ») à 1%. Après polymérisation du mélange à 4°C pendant 5 min, une troisième couche d'agarose LMP à 1% est déposée et laissée polymériser. Les lames sont ensuite placées dans une solution de lyse (2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 0,01 M Tris, pH 10, 1% Triton X-100, 10% DMSO) pendant 1h à l'obscurité. Puis, elles sont incubées pendant 20 min à l'obscurité dans une cuve contenant du tampon à électrophorèse (0,3 M NaOH, 1 mM EDTA) pour permettre le déroulement de l'ADN. La migration des brins d'ADN est effectuée par électrophorèse pendant 20 min à l'obscurité. Après cette étape, les lames sont neutralisées à trois reprises pendant 2 min avec du tampon de neutralisation (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5), puis déshydratées dans l'éthanol absolu pendant 20 min. Enfin, les lames sont marquées avec 20 µL d'une solution de bromure d'éthidium à 20 µg/mL et l'observation est réalisée à $\times 400$ sous un microscope à épifluorescence, équipé d'un filtre d'excitation de 515-560 nm, d'un filtre barrière de 590 nm et d'une caméra CCD ultrasensible.

Les dommages à l'ADN sont exprimés par la mesure du pourcentage d'ADN présent dans la queue de la comète (% Tail DNA) sur 100 cellules choisies aléatoirement grâce à un système d'analyse d'image informatisé (Komet 3.1, Kinetic Imaging Ltd). Les cellules très endommagées qui apparaissent sous la forme d'une tête d'épingle et d'une large queue diffuse (communément appelées cellules hérissons ou « hedgehog ») représentent des cellules potentiellement mortes. Ces cellules sont considérées comme des cellules apoptotiques ou nécrotiques comme décrit précédemment (Olive & Banath, 1995). Ces cellules ne sont pas comptabilisées dans les cassures de l'ADN mais ont été dénombrées comme le recommande le groupe de travail IWGT (Burlinson *et al.*, 2007).

3. RÉSULTATS

3.1. Potentiel génotoxique dans les MES au niveau du pont de Tancarville

Les résultats concernant l'évaluation du potentiel génotoxique des échantillons de MES prélevés au niveau du pont de Tancarville sont représentés par les graphiques des figures 14 et 15 page 30. Ces résultats mettent en évidence la présence d'une génotoxicité direct (-S9) associée à la phase particulière du bouchon vaseux de l'estuaire de Seine.

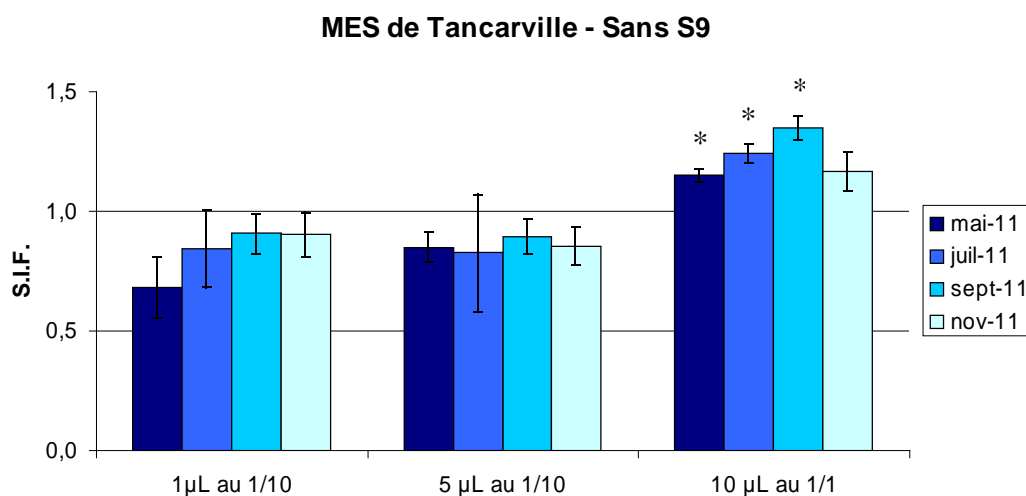


Figure 14: SOS-Induction Factors obtenus sans activation métabolique avec le SOS-Chromotest en testant les extraits organiques obtenus par extraction ASE.

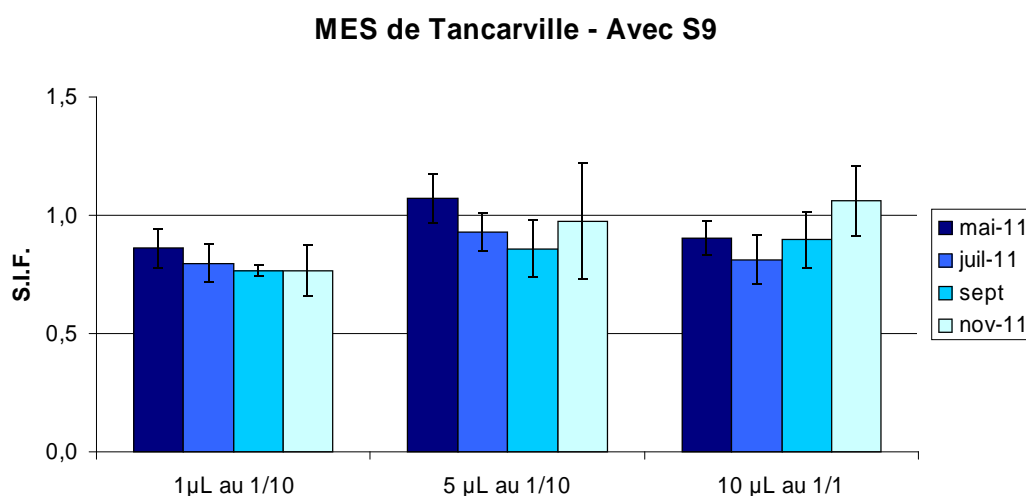


Figure 15: SOS-Induction Factors obtenus avec activation métabolique avec le SOS-Chromotest en testant les extraits organiques obtenus par extraction ASE.

3.2. Potentiel génotoxique dans la phase dissoute au niveau du pont de Tancarville

Les graphiques des figures 16 et 17 page 31 représentent les SIF obtenus en testant les extraits organiques obtenus par SPE sur l'eau de la Seine au niveau du bouchon vaseux. Ainsi, avec une concentration par un facteur 2.10^3 des molécules organiques contenues dans 1 litre d'eau prélevée au niveau du pont de Tancarville, nous avons mis en évidence un potentiel génotoxique à l'aide du SOS-Chromotest. Ce potentiel génotoxique des molécules contenues dans la phase dissoute se caractérise par la présence d'une génotoxicité indirecte (-S9) mais également par la présence d'une génotoxicité directe (+S9). Il est important de noter que la génotoxicité associée aux molécules pro-génotoxiques est sensiblement moins importante que celle associée aux molécules génotoxiques directes.

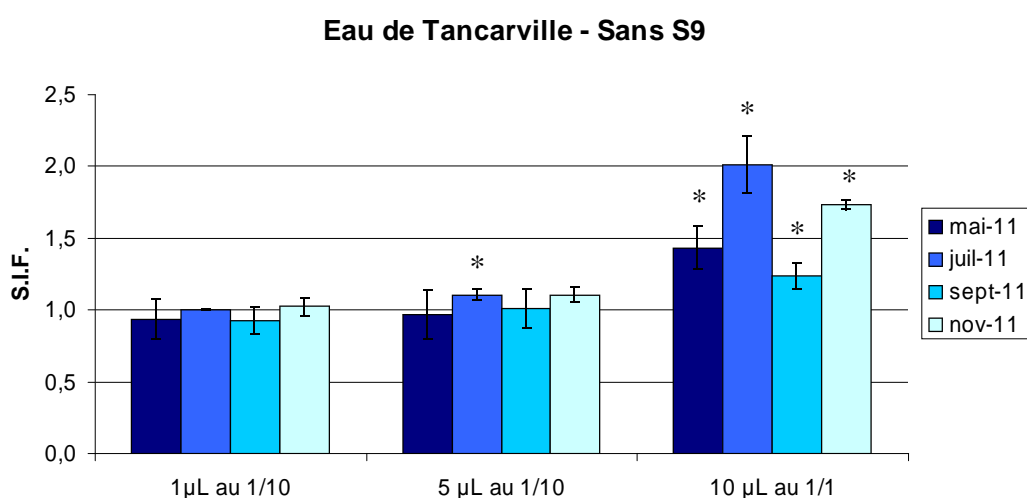


Figure 16: SOS-Induction Factors obtenus sans activation métabolique avec le SOS-Chromotest en testant les extraits organiques obtenus par SPE sur colonnes Envi-18 (Sigma Aldrich).

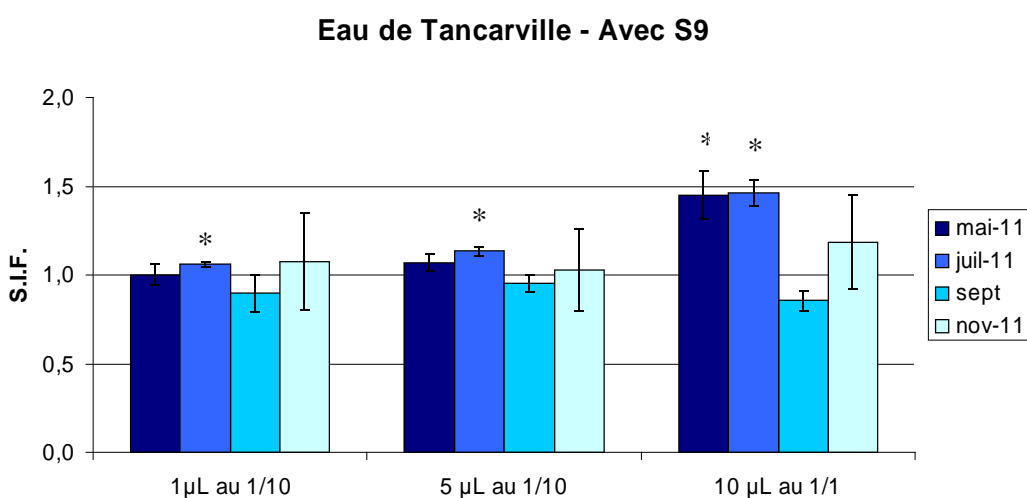


Figure 17: SOS-Induction Factors obtenus avec activation métabolique avec le SOS-Chromotest en testant les extraits organiques obtenus par SPE sur colonnes Envi-18 (Sigma Aldrich).

3.3. Potentiels génotoxiques et effets associées chez *E. affinis*

Les résultats concernant l'évaluation du potentiel génotoxique des molécules extraites des différents pools d'organismes entiers d'*E. affinis* sont présentés par les graphiques des figures 18 et 19 page 32. Quel que soit le pool étudié, le SOS-Chromotest ne met en évidence aucun potentiel génotoxique.

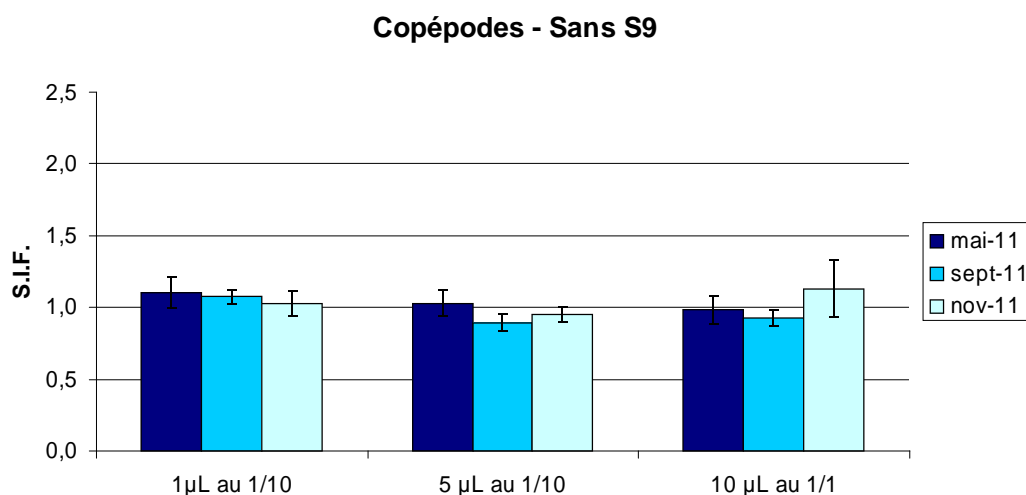


Figure 18: SOS-Induction Factors obtenus sans activation métabolique avec le SOS-Chromotest en testant les extraits organiques obtenus par extraction ASE.

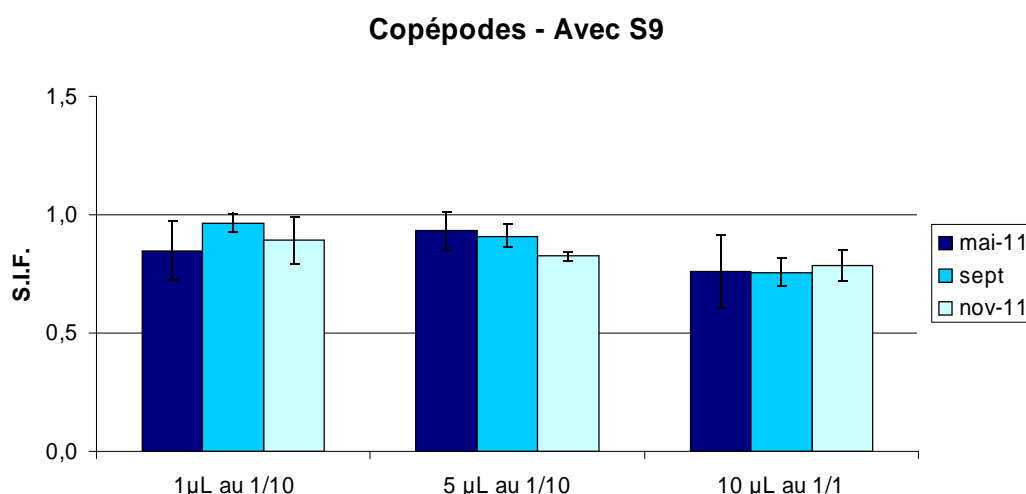


Figure 19: SOS-Induction Factors obtenus avec activation métabolique avec le SOS-Chromotest en testant les extraits organiques obtenus par extraction ASE.

Le taux relatif d'adduits (TRA) mesuré dans les différents pool d'*E. affinis* (figure 20 page 33) révèle une concentration moyenne d'adduits de $0,62 \text{ adduits} \times 10^{-8}$ nucléotides. On remarque une variabilité importante de cette concentration entre les différents pools avec une augmentation croissante du TRA entre les mois de mai et d'octobre 2011.

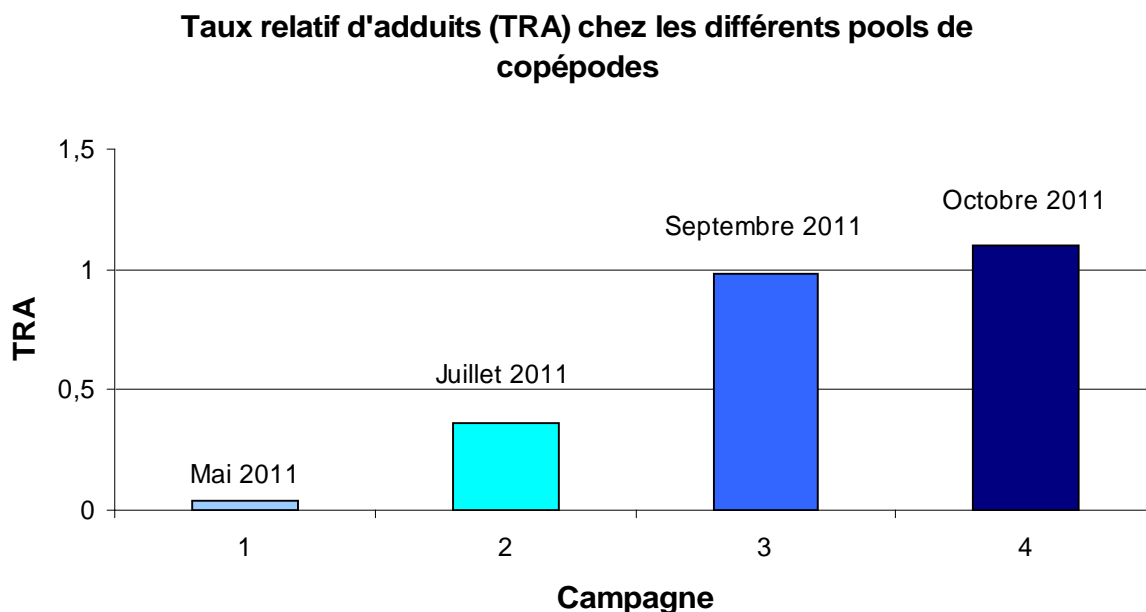


Figure 20: Taux Relatif d'Adduits (TRA) dans les différents pools de copépodes.

Qualitativement, quatre adduits différents ont été détectés. Trois de ces adduits qui sont de petites tailles apparaissant spécifiques chez les copépodes (SA-13) en comparaison des profils obtenus chez le flet (voir par la suite). L'un de ces adduit est retrouvé sur l'ensemble des profils autoradiographiques (figure 21 page 33).

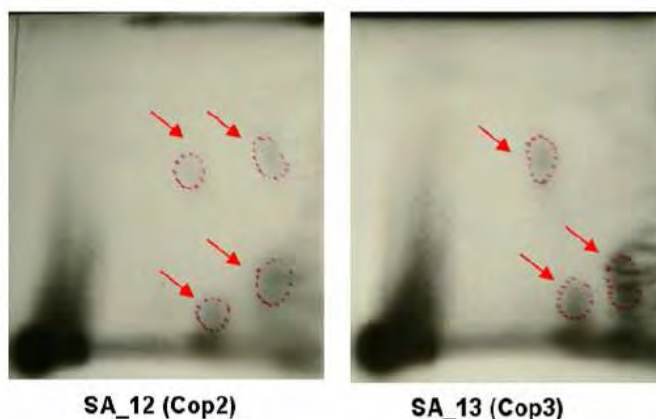


Figure 21: Autoradiographies des profils en adduits obtenus sur l'ADN de copépodes. Les zones entourées sont considérées comme renfermant des adduits radiomarqués. Temps d'exposition : maximum 67 h (films XOMAT-KODAK[®]).

3.4. Potentiels génotoxiques et effets associées chez *P. flesus*

Les résultats concernant l'évaluation du potentiel génotoxique des molécules extraites par ASE sur différents pools de foies de *P. flesus* sont présentés au niveau des figures 22 et 23 page 34. On constate que cette génotoxicité est associée aussi bien à des molécules génotoxiques directes (-S9) qu'à des molécules pro-génotoxiques (+S9). On observe une variabilité des SIF obtenus entre les différents lots de foies que ce soit avec ou sans activation métabolique. Par contre, cette variabilité de la génotoxicité avec ou sans activation métabolique (S9) suit la même tendance au cours des différentes campagnes. La campagne de juillet étant celle qui présente les SIF les plus faibles.

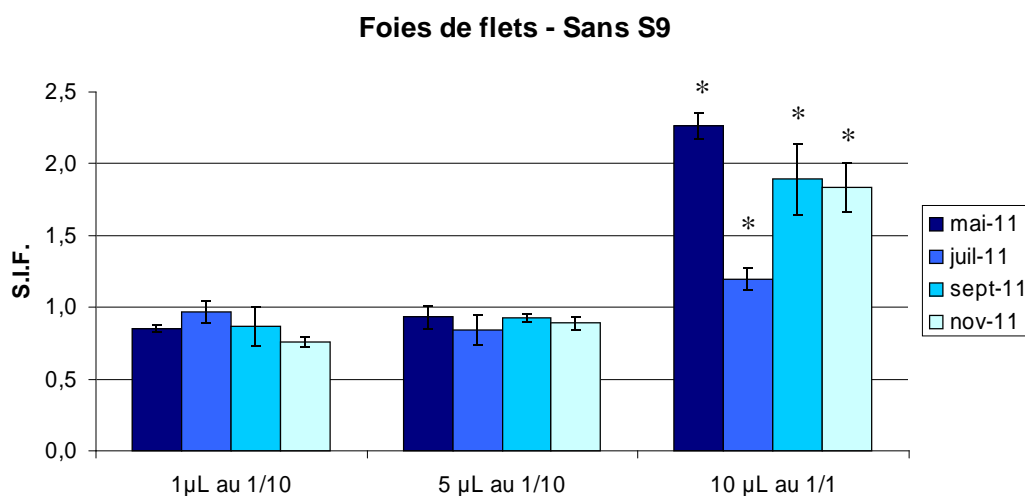


Figure 22: SOS-Induction Factors obtenus avec le SOS-Chromotest sans activation métabolique en testant les extraits organiques obtenus par ASE sur 4 pools de foies de flets (*P. flesus*).

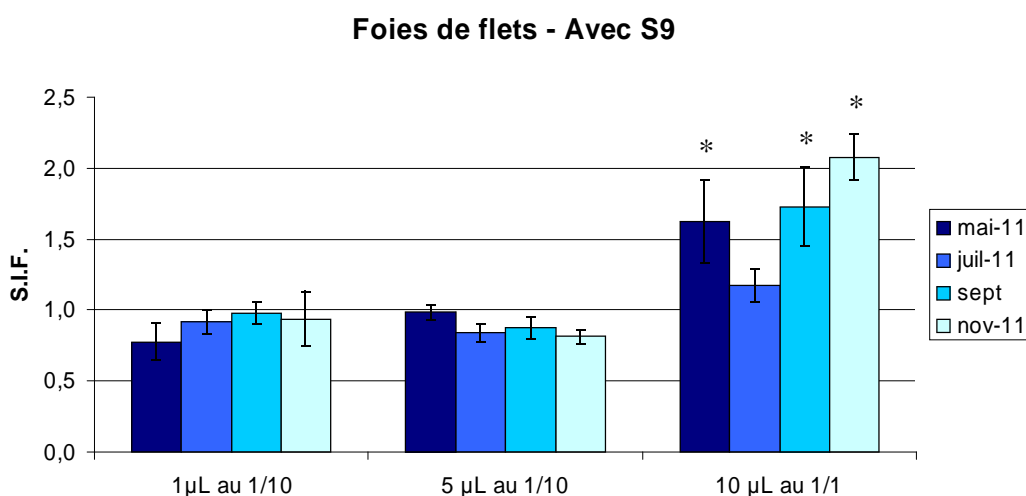


Figure 23: SOS-Induction Factors obtenus avec le SOS-Chromotest avec activation métabolique en testant les extraits organiques obtenus par ASE sur 4 pools de foies de flets (*P. flesus*).

Le taux relatif d'adduits (RAL) mesuré dans les différents foies de flets (figure 24 page 35) révèle une concentration moyenne d'adduits de $1,79$ adduits $\times 10^{-8}$ nucléotides, ce qui représente une valeur relativement élevée chez des organismes prélevés *in situ* reflétant une exposition à des agents génotoxiques. Individuellement, le taux d'adduits atteint une valeur maximale de $4,70$ adduits $\times 10^{-8}$ nucléotides (Flet F33). Même si les niveaux d'adduits détectés sont globalement élevés chez les différents individus, il existe des différences interindividuelles relativement importantes. Cependant, on observe que les moyennes des concentrations d'adduits observées entre les mois de septembre et octobre indiquent une concentration plus importante pour le mois d'octobre (figure 25 page 35): $1,55$ contre $0,64$ adduits $\times 10^{-8}$ nucléotides (différence non significative au risque 0,05%).

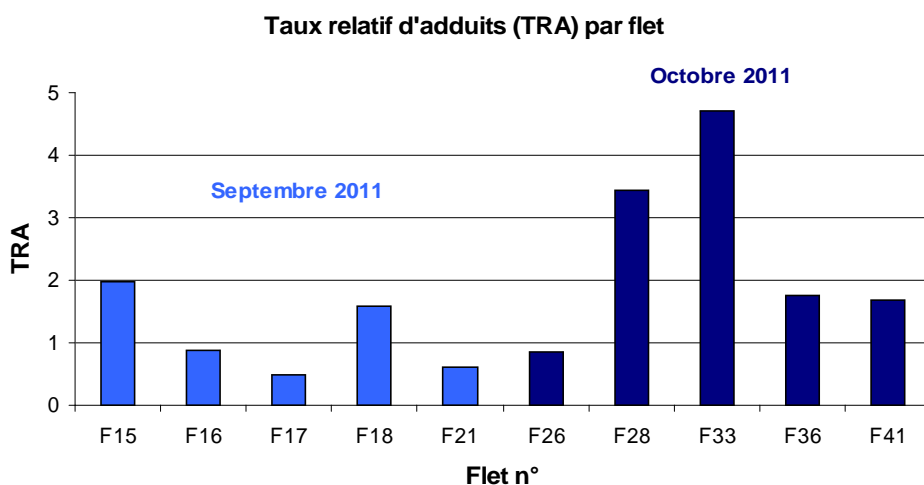


Figure 24: Taux Relatif d'Adduits (TRA) dans les différents foies de flets prélevés au cours des campagnes des mois de septembre et octobre.

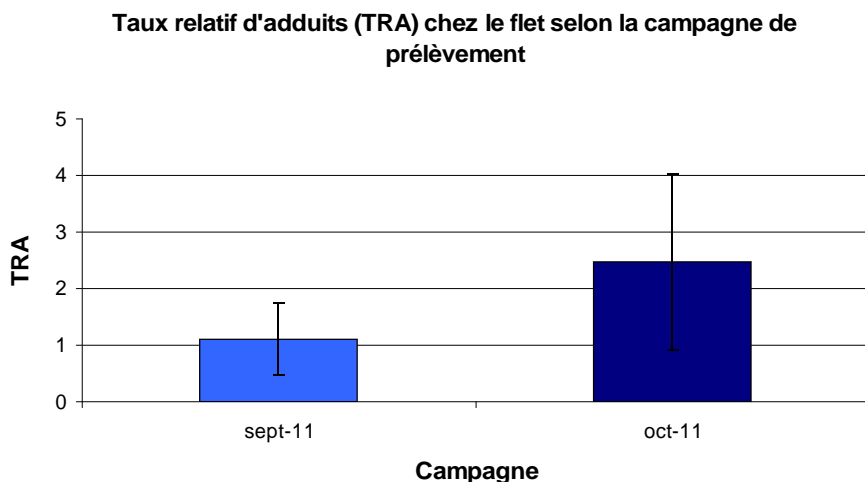


Figure 25: Taux Relatif d'Adduits (TRA) moyens des foies de flets prélevés au cours des campagnes des mois de septembre et octobre.

Contrairement à ce qui est observé chez *E. affinis*, les profils des adduits observés chez *P. flesus* sont plus complexes (nombreux adduits, jusqu'à 5 par profil) et présentent le plus souvent une répartition selon une diagonale de type DRZ (diagonale radioactive zone), décrite comme caractéristique d'une exposition à des HAPs en mélange complexe (figure 26 page 36) (Lyons et al., 1999).

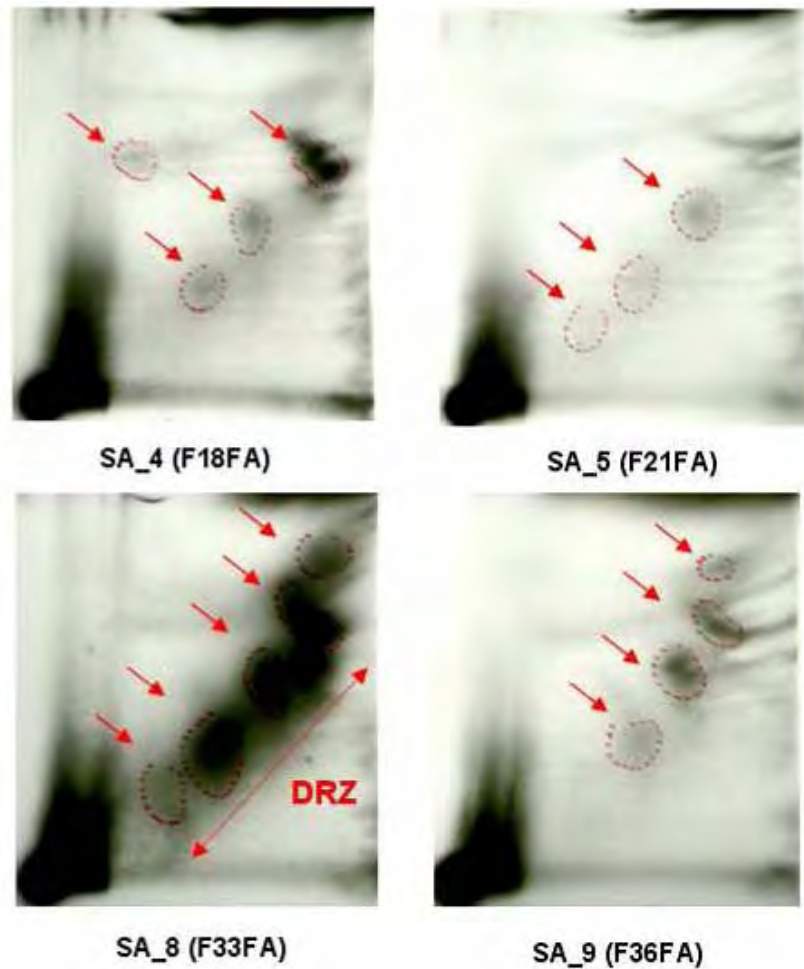


Figure 26: Autoradiographies de quelques profils en adduits obtenus sur l'ADN de foie de flet. Les zones entourées sont considérées comme renfermant des adduits radiomarqués. Temps d'exposition : maximum 67 h (films XOMAT-KODAK[®]).

Les résultats concernant le test des comètes portent sur les échantillons obtenus lors de 4 campagnes de prélèvements réalisées en 2011. Les données brutes obtenues sont reportées dans le tableau 4 de l'annexe 3 page 58. Les érythrocytes de flet présentent globalement des valeurs de dommages à l'ADN supérieures à 10%. Les cellules très endommagées qui apparaissent sous la forme d'une tête d'épingle et d'une large queue diffuse (généralement appelées cellules hérissons ou « hedgehog ») représentent des cellules potentiellement mortes. Ces cellules, considérées apoptotiques ou nécrotiques comme décrit précédemment par Olive & Banath (1995), ne sont pas comptabilisées dans les cassures de l'ADN mais sont dénombrées.

Bien que le test comète dans sa version alcaline ne permette pas d'avoir une estimation parfaitement fiable des cellules apoptotiques (il faudrait pour cela réaliser un test de diffusion de l'ADN (Singh, 2000)), le pourcentage de ces cellules est reportée dans le graphique de la figure 27 page 37.

Le test des comètes ne met en évidence aucune différence significative dans les dommages à l'ADN ni dans le pourcentage de cellules apoptotiques entre les différents prélèvements. Bien qu'une augmentation des lésions ainsi qu'un nombre de cellules à l'ADN très endommagées soit notées en septembre 2011, les fortes variabilités interindividuelles ne permettent pas de différencier les différents échantillons (figure 28 page 37).

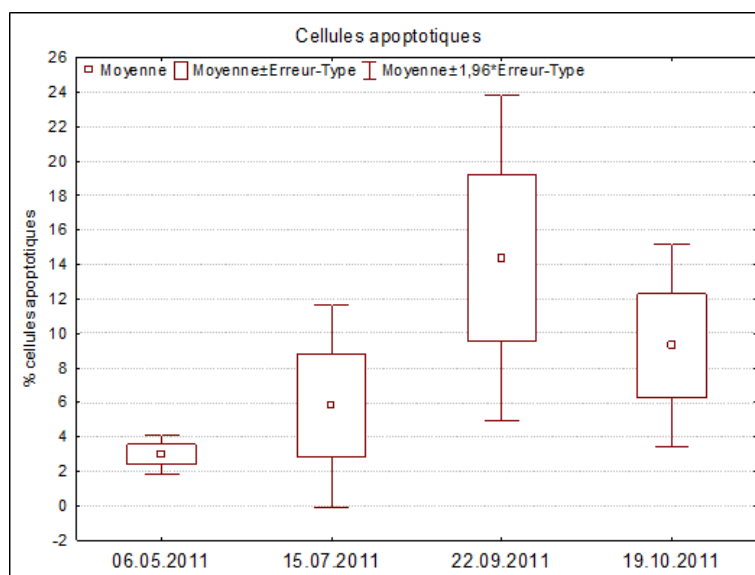


Figure 27: Évolution du pourcentage de cellules « hedgehogs » observées dans les érythrocytes de flets durant l'année 2011.

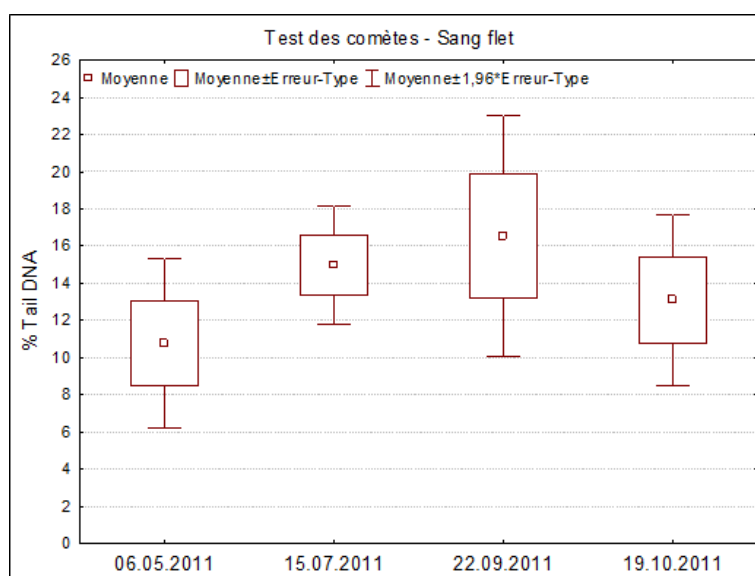


Figure 28: Évolution des dommages à l'ADN observés dans les érythrocytes de flets et exprimée en % Tail DNA (% d'ADN dans la queue de la comète) durant l'année 2011.

4. CONCLUSION

Le projet **BCG**, en ce qui concerne l'étude du transfert du potentiel génotoxique du milieu vers les organismes, visait à démontrer qu'il existe des outils simples pour évaluer et suivre le niveau de pollution de la Seine par des molécules génotoxiques. Les analyses de la génotoxicité par le SOS-Chromotest sur la phase particulaire et sur la phase dissoute au niveau du bouchon vaseux montrent la présence d'une pro-génotoxicité mais également d'une génotoxicité directe.

Les travaux de Cailleaud et collaborateurs avaient estimé la contamination de la phase dissoute de 2 à 21 ng.L-1 pour les PCB et de 3 à 24 ng.L-1 pour les HAPs. BCG a montré qu'il existait bien au niveau de la phase dissoute du bouchon vaseux des molécules génotoxiques et pro-génotoxiques en concentration suffisante pour permettre l'évaluation de leurs effets potentiels par des outils biologiques et notamment par le SOS-Chromotest.

Les résultats obtenus sur les MES au niveau du bouchon vaseux montrent une contamination par des molécules présentant une génotoxicité directe. Les travaux réalisés par Cailleaud et collaborateurs en 2005 montraient une contamination de la phase particulaire du bouchon vaseux importante par des PCB (de 58 à 463 ng.g-1) et très importante par des HAP (499 à 5819 ng.g-1 pour les HAP) qui sont essentiellement des molécules pro-génotoxiques (Cailleaud *et al.*, 2007). Ces résultats montrent que la contamination des MES au niveau du bouchon vaseux n'est pas exclusivement réservée aux molécules génotoxiques directs.

Les différences observées entre la génotoxicité des MES et de la phase particulaire peuvent s'expliquer par l'existence même du bouchon vaseux. Les molécules organiques ont tendance à s'adsorber sur les MES qui restent concentrées au niveau du bouchon vaseux qui depuis plusieurs années maintenant ne cesse de croître du fait d'une diminution du débit du fleuve. Ainsi, les molécules organiques adsorbées présentent une plus grande susceptibilité à la thermo et la photo-dégradation. Au contraire, les molécules génotoxiques de la phase dissoute sont moins soumises à ces formes de dégradation car elles ne restent pas localisées au niveau du bouchon vaseux.

Ainsi, le SOS-Chromotest est un test particulièrement adapté pour surveiller des effluents spécifiques suspectés d'être à l'origine de contamination de la Seine par des molécules génotoxiques. Il pourrait d'ailleurs être intéressant de croiser ces résultats avec ceux obtenus dans le cadre du programme MEDSEINE afin d'avoir une idée de la nature des molécules sortant de la STEP (station d'épuration) de la Cerlangue, de Lillebonne et de Gruchet-le-Valasse. Certaines des molécules médicamenteuses qui ressortent de ces STEP sont susceptibles d'être impliquées dans le potentiel génotoxique direct mis en évidence au niveau du pont de Tancarville. En ce qui concerne le suivi général du niveau de contamination par des molécules génotoxiques, il convient de réaliser les prélèvements en amont du bouchon vaseux.

Le projet BCG devait permettre également de déterminer si le potentiel génotoxique observé au niveau du milieu se retrouvait au niveau des organismes.

Les résultats obtenus avec le SOS-Chromotest, montrent que les molécules organiques contenues dans les foies de flet présentent un potentiel génotoxique que ce soit avec ou sans activation métabolique. Chez les vertébrés supérieurs, le foie est un organe où l'on retrouve beaucoup de xénobiotiques car c'est le siège de la détoxification où a lieu l'induction de l'expression des enzymes intervenant dans leurs métabolisations mais également parce que les molécules chimiques (métabolites et/ou molécules mères) les plus lipophiles ont tendance à s'y accumuler. Le flet accumule donc dans son foie des molécules dont certaines présentent un potentiel génotoxique pouvant avoir un effet génotoxique avéré au niveau de son organisme. Le dosage des adduits à l'ADN au niveau des différents pools de foie de flets montre un TRA (Taux Relatif d'Adduits) relativement importants avec un profil caractéristique d'une contamination par les HAPs. L'analyse des adduits confirme donc que parmi les molécules présentant un potentiel génotoxique certaines ont la capacité de se fixer à l'ADN de cet organisme et former des adduits, point de départ d'un processus de mutagenèse. Cela se confirme par les taux également élevés de cassures à l'ADN qui sont détectés chez les érythrocytes de flet par le test des comètes. Ces cassures de l'ADN ont été initialement proposés chez les vertébrés supérieurs après exposition aux HAPs suite la réparation incomplète des adduits stables et dépurinables de l'ADN par les systèmes de réparation (Tarantini *et al.*, 2009).

Contrairement à ce qui peut être observé chez le flet, le SOS-Chromotest ne met pas en évidence de potentiel génotoxique que ce soit avec ou sans activation métabolique des molécules organiques extraites des différents pools d'organismes entiers d'*E. affinis*. Par contre, le dosage des adduits à l'ADN de ces différents pools montre un TRA moyen non négligeable ($0,62 \times 10^{-8}$ nucléotides). Ces résultats montrent que le SOS-Chromotest ne met pas en évidence une accumulation des molécules organiques présentant un potentiel génotoxique après une extraction ASE sur organismes entiers. Ces molécules ont pourtant la capacité de se fixer à l'ADN de ces organismes et d'y former des adduits. Par contre, ces adduits ne présentent pas le même profil que ceux observés chez le flet et semble spécifique de l'espèce.

L'absence de réponse positive avec le SOS-Chromotest sur des extraits ASE de pools d'organismes d'*E. affinis* peut s'expliquer par:

- E. affinis* est une espèce avec une teneur lipides relativement faible par rapport à celle des foies de flet (10% du poids sec pour le copépode contre 3 à 50% de poids frais pour différentes espèces de poisson) ce qui diminuent le phénomène de bio-accumulation des composés lipophiles (Bechtel & Oliveira, 2006; der Meerena *et al.*, 2008).
- Les systèmes de détoxification chez les copépodes (et plus largement chez les crustacés) intervenant dans la métabolisation des xénobiotiques, présentent des spécificités de substrat différentes pouvant induire une excrétion très rapide des molécules génotoxiques de l'organisme. Des travaux ultérieurs avaient également mis en évidence cette rapidité d'élimination (Cailleaud *et al.*, 2009).

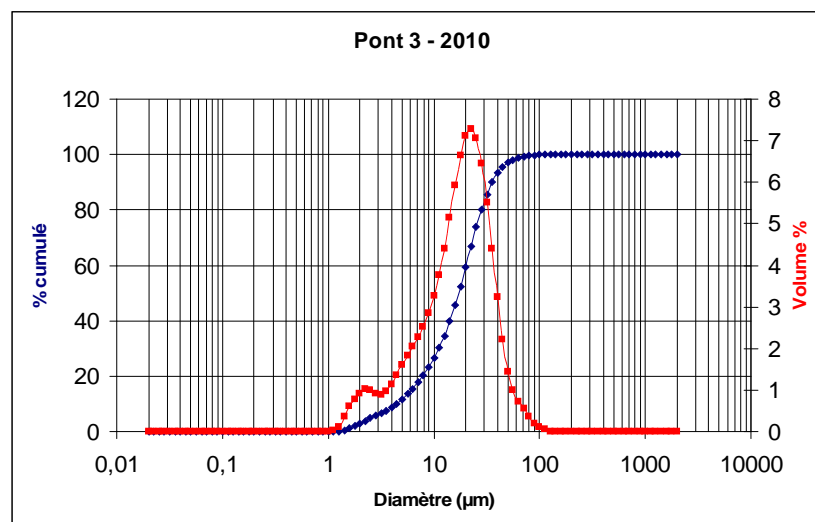
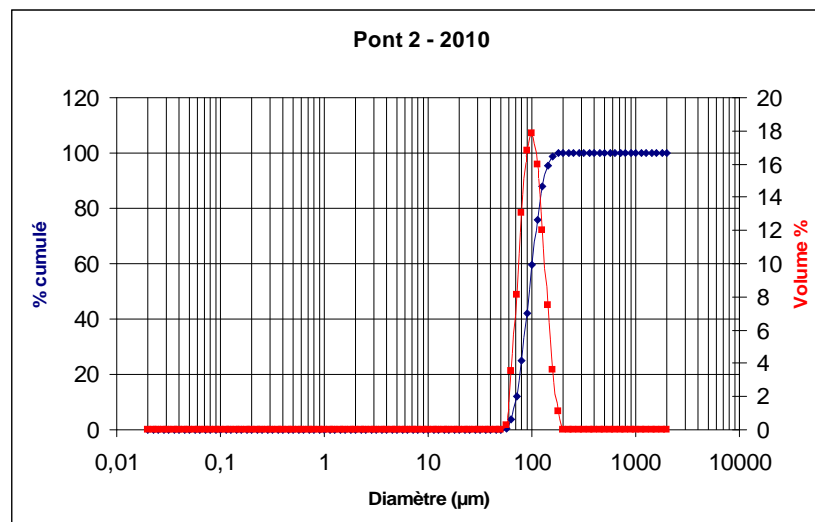
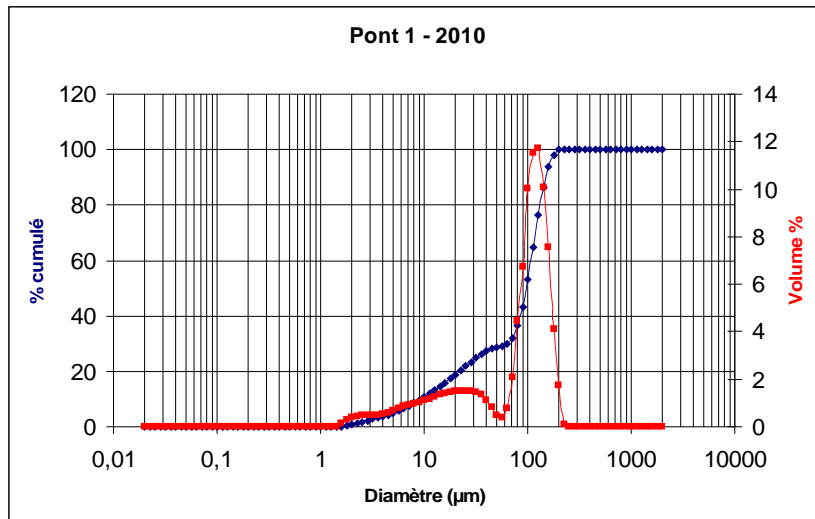
Les différences entre les profils d'adduits chez *E. affinis* et le flet, mettent en évidence une différence majeure dans la métabolisation des xénobiotiques et notamment des HAPs entre ces deux espèces et peut être plus largement entre les crustacés et les vertébrés supérieurs. Les molécules susceptibles de former des adduits chez le flet ne sont pas celle qui peuvent former des adduits chez *E. affinis*.

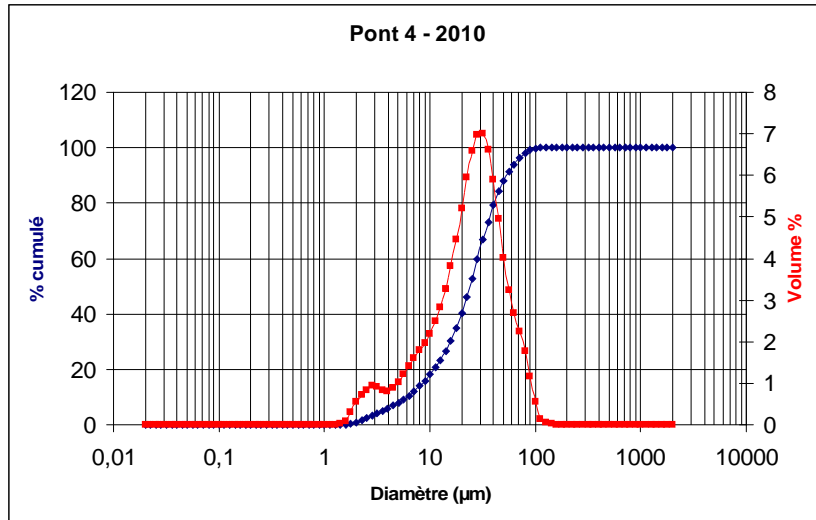
Ainsi, soit il existe des molécules autres que les HAPs expliquant la présence d'adduits chez *Eurytemora* soit les enzymes de détoxification chez les crustacés conduisent à la formation de métabolites différents de ceux des vertébrés supérieurs expliquant l'obtention de profils d'adduits différents.

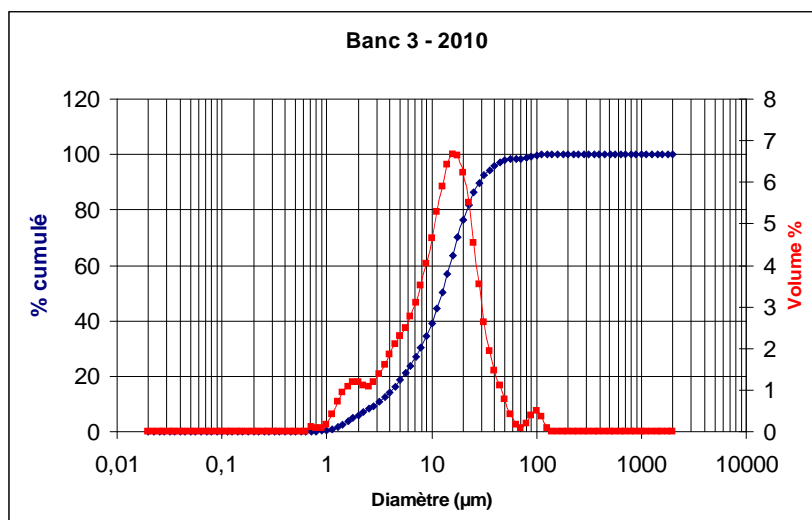
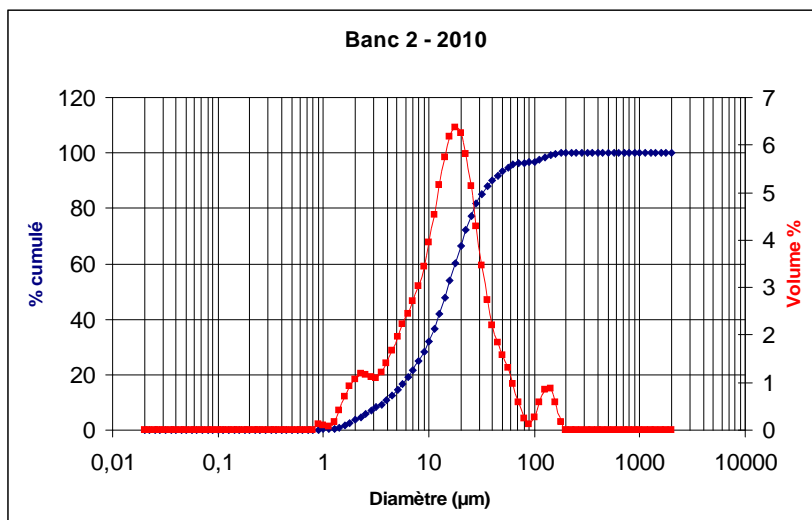
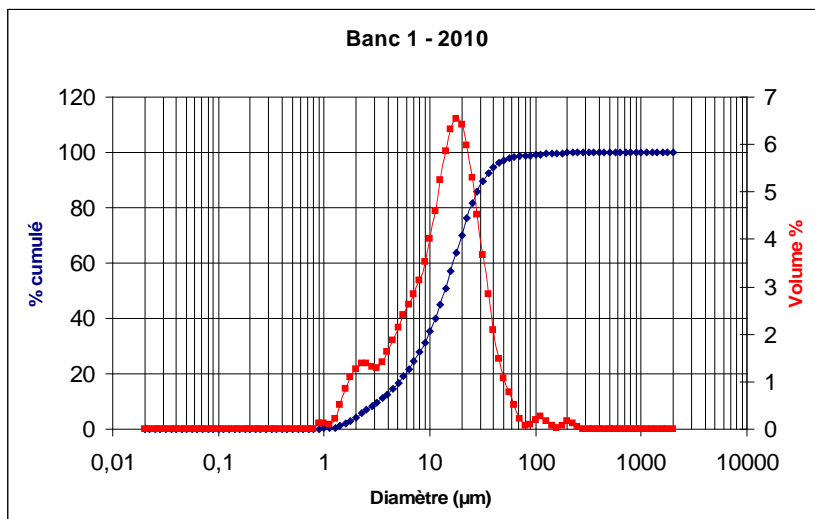
Il ressort de ces résultats que le choix des espèces d'intérêt est primordial par rapport aux outils biologiques utilisés. Le SOS-chromotest, test particulièrement adapté pour les études environnementales, peut ainsi être utilisé sur des extraits ASE de foies de vertébrés supérieurs. Son utilisation sur des organismes comme les crustacés n'est pas forcément pertinente, où nécessite une adaptation vis à vis des enzymes de métabolisation utilisées pour mimer les phénomènes de bioactivation potentiels chez ces organismes.

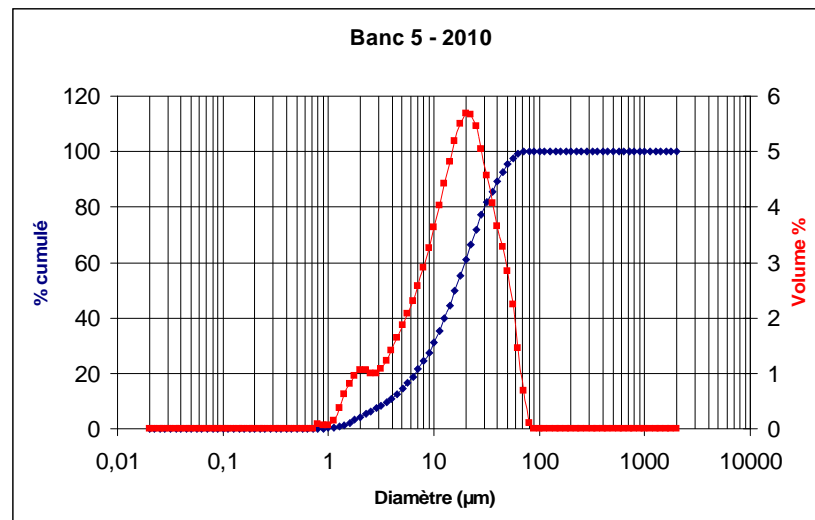
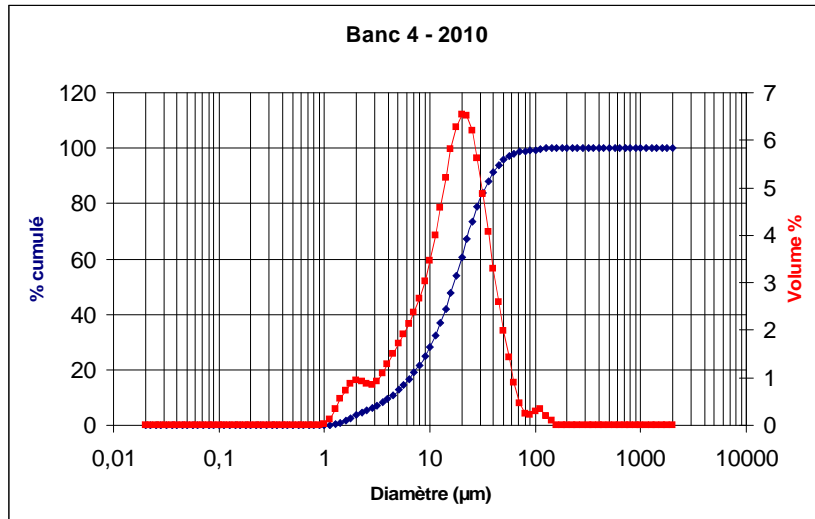
ANNEXE 1

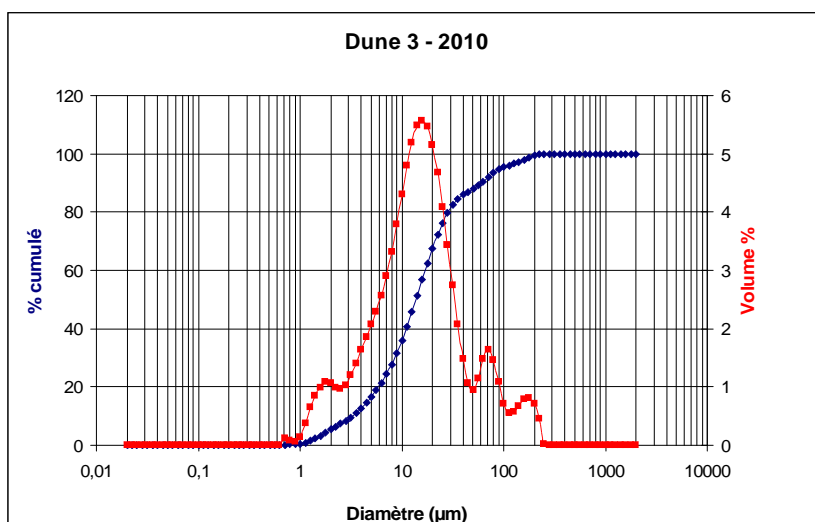
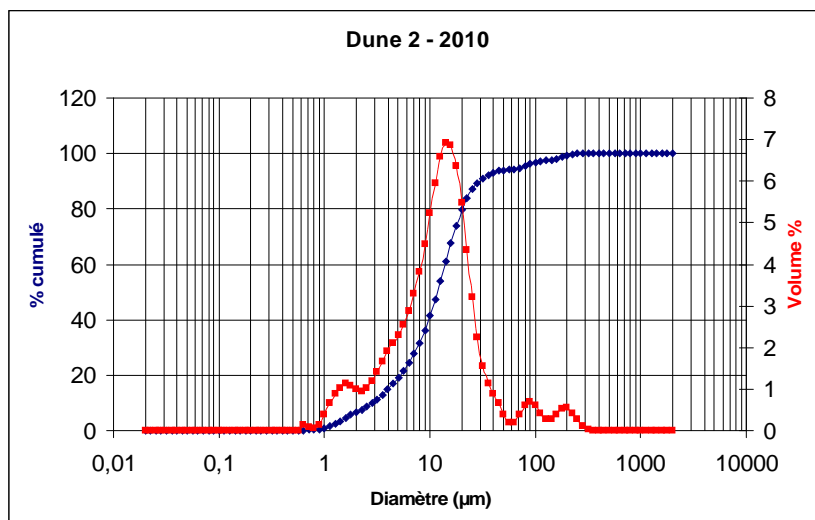
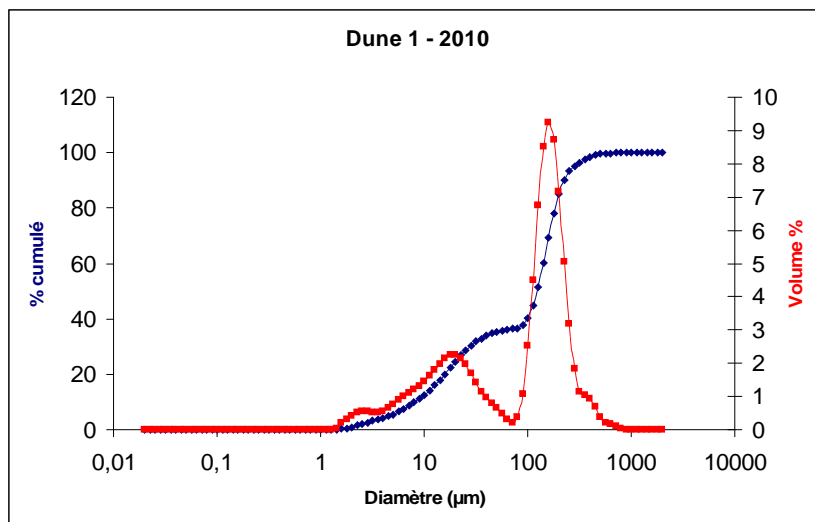
Analyses granulométriques

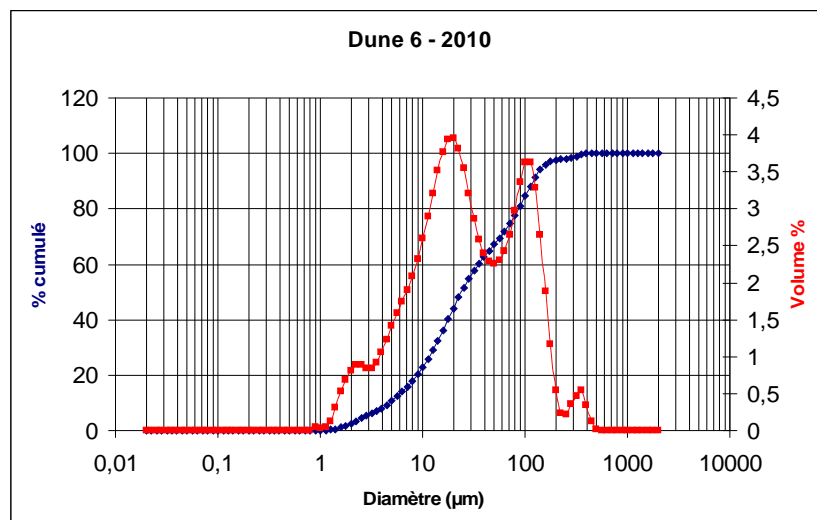
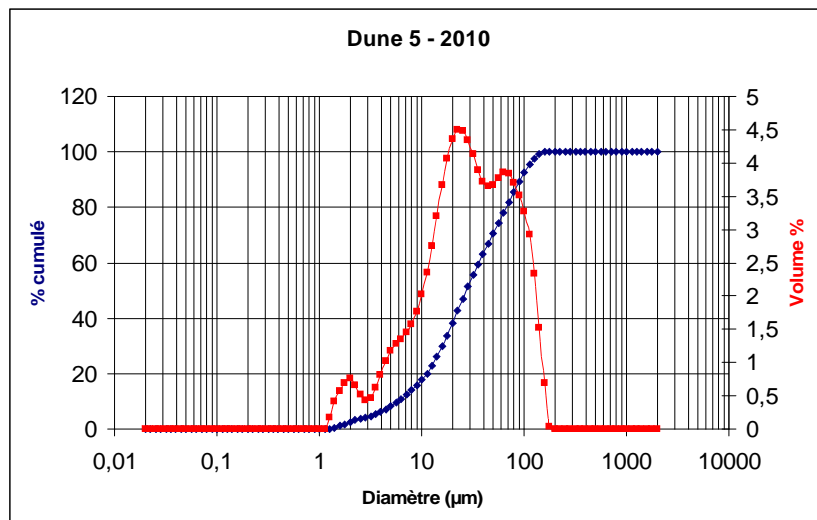
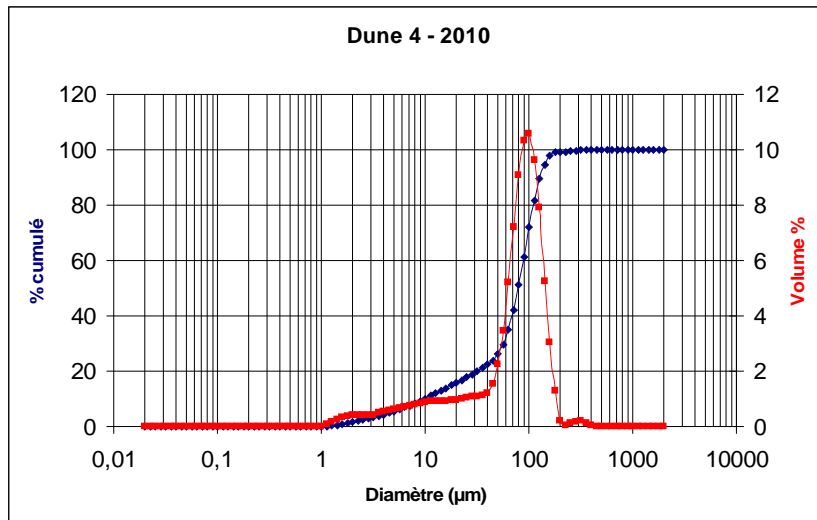


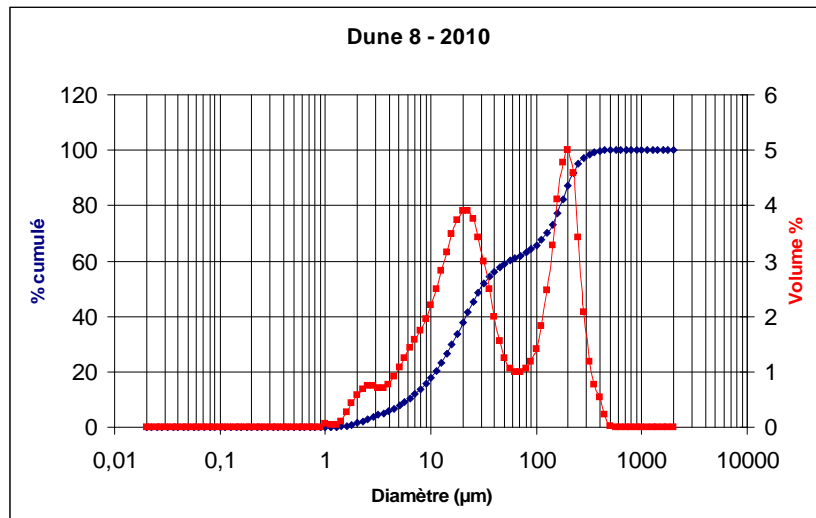
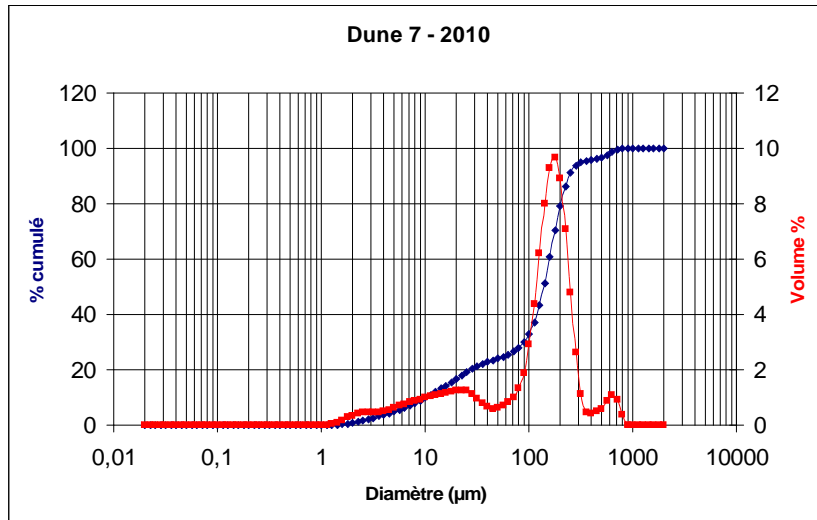


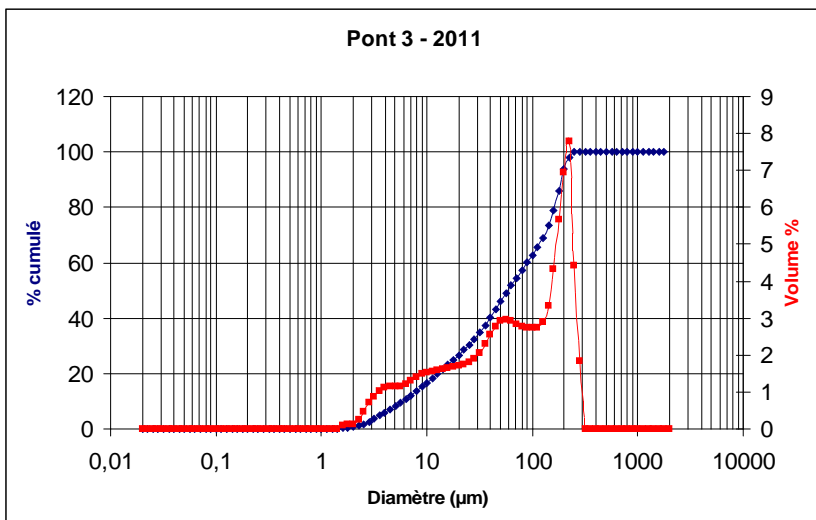
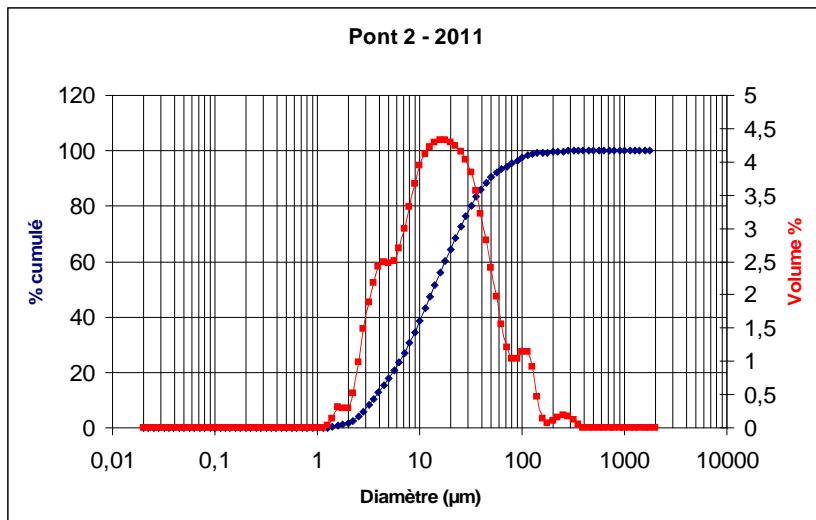
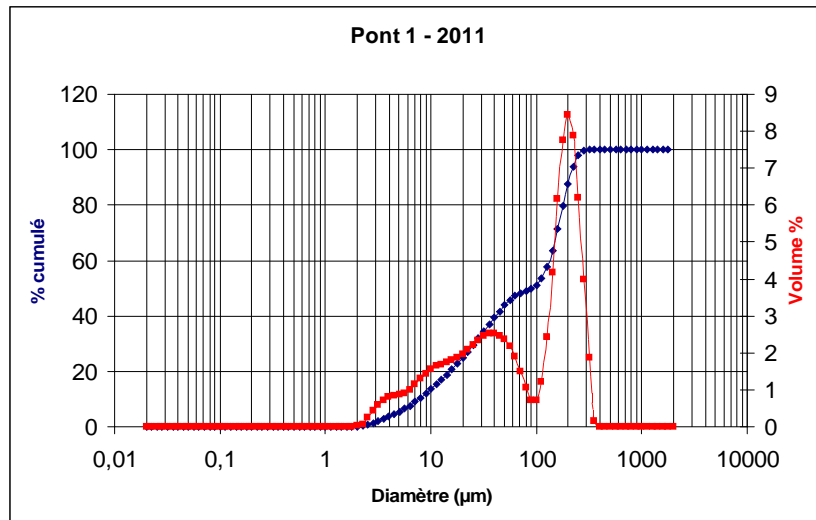


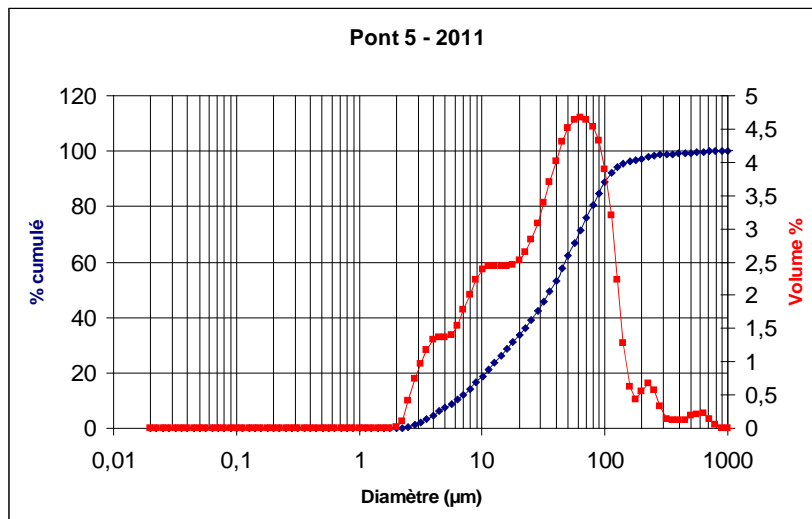
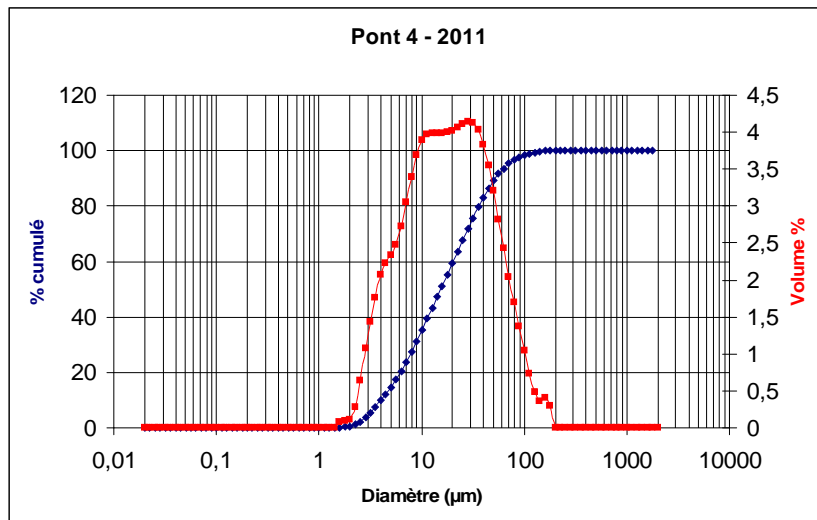


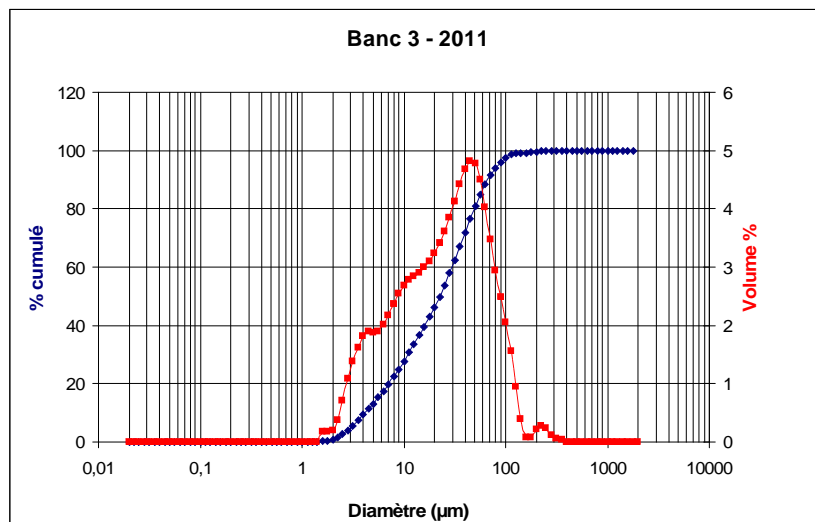
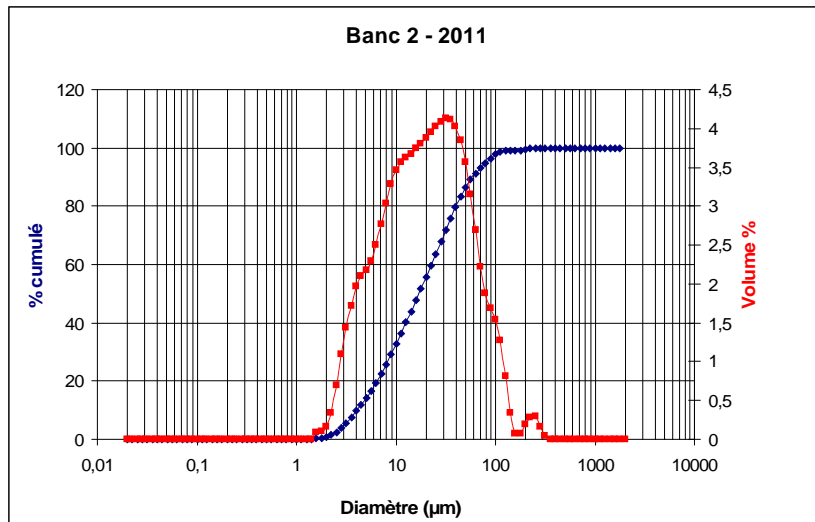
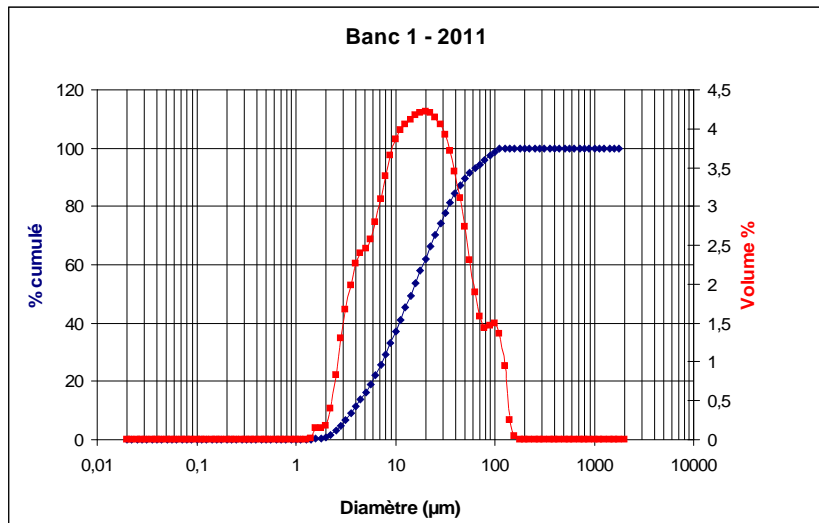


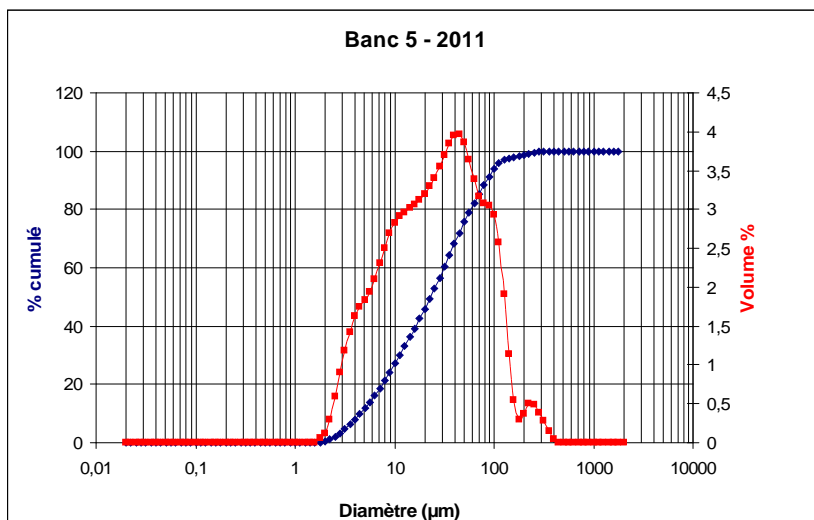
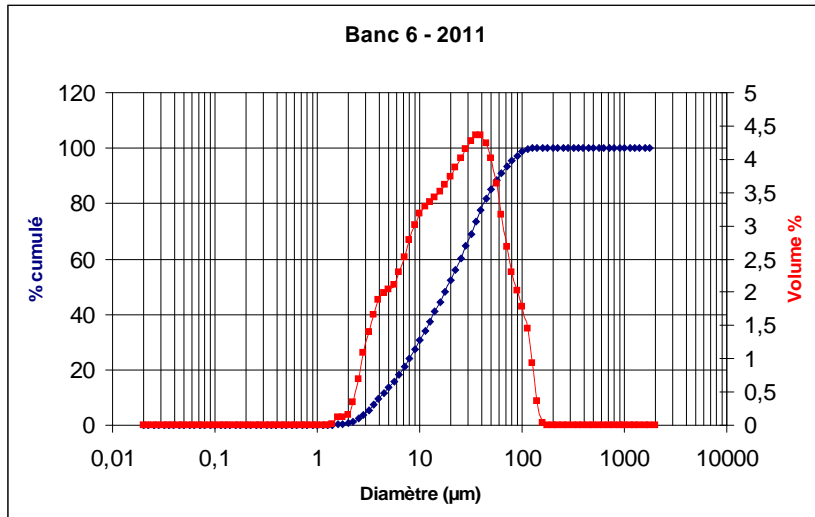
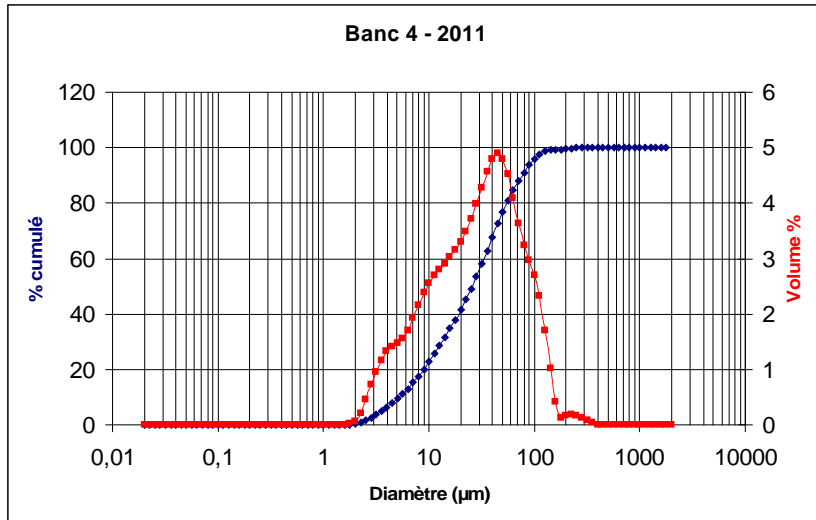


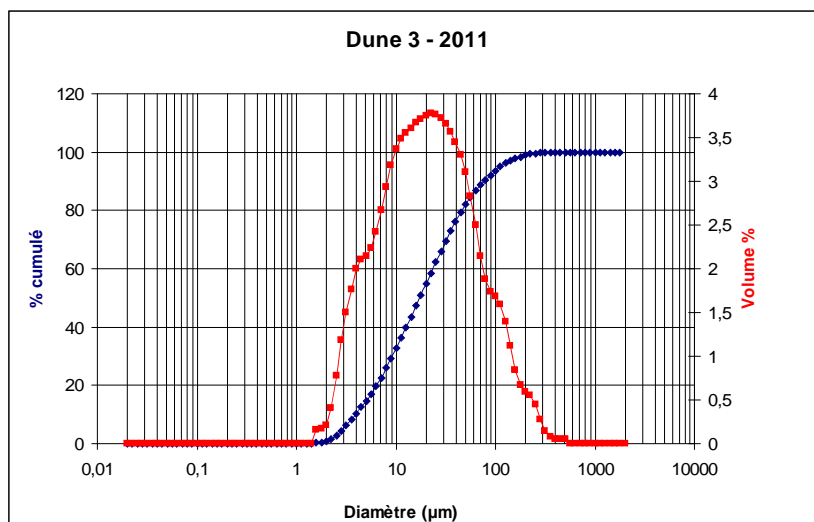
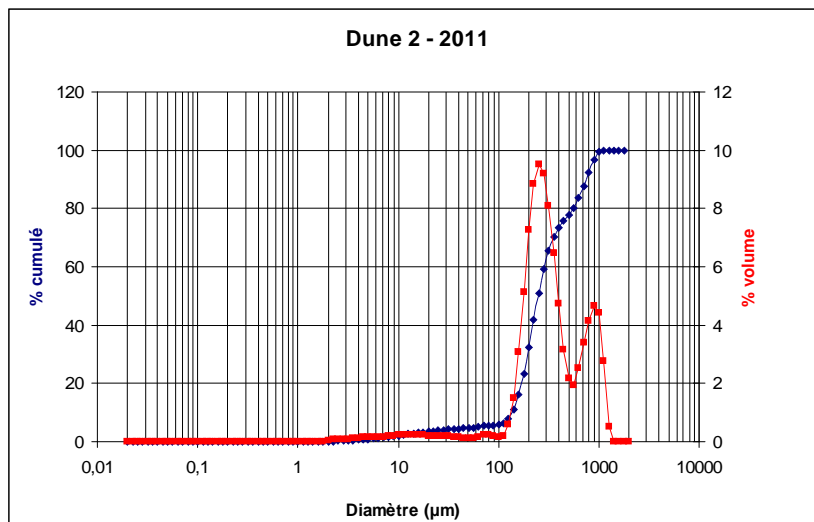
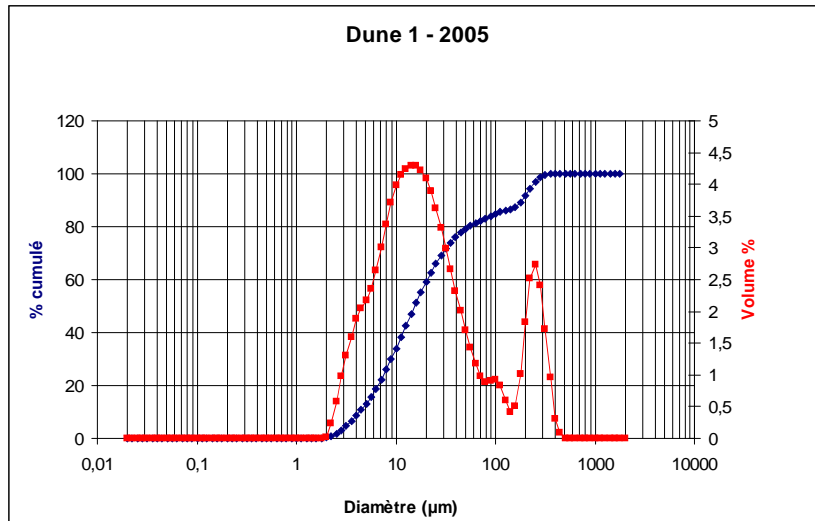


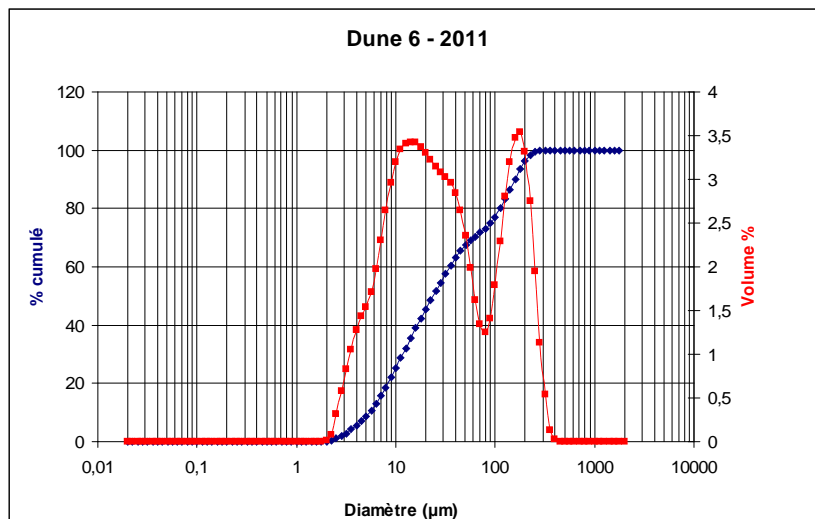
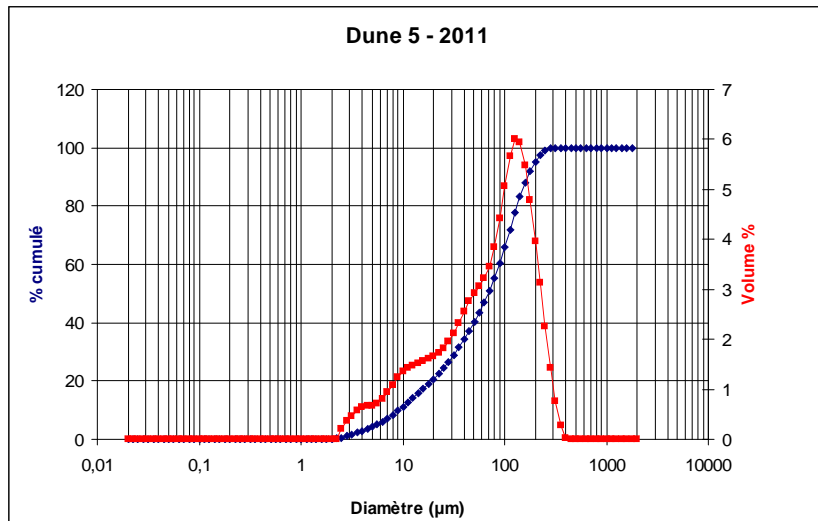
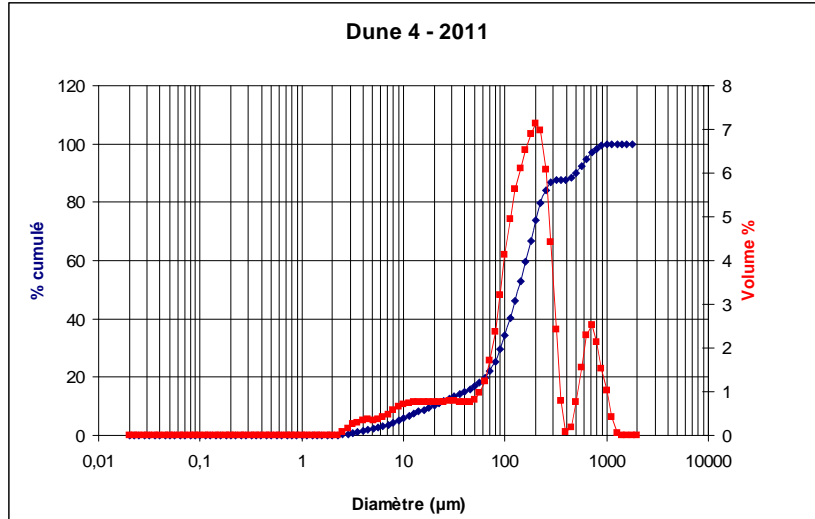


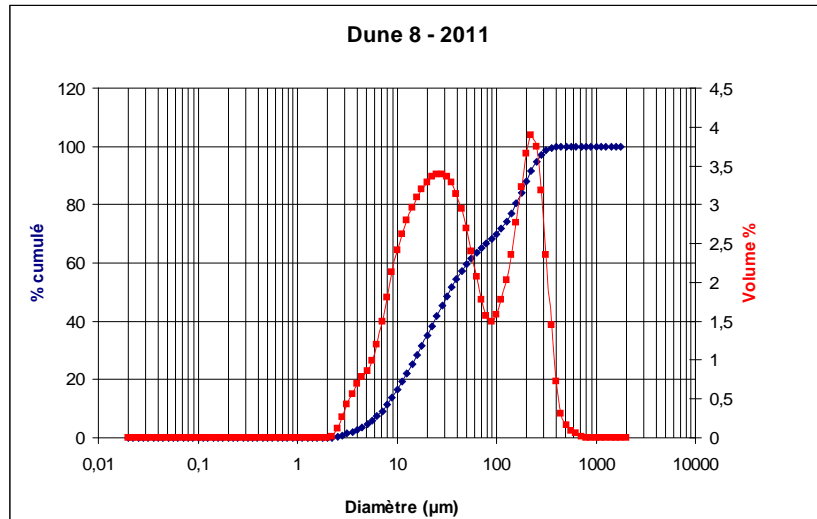
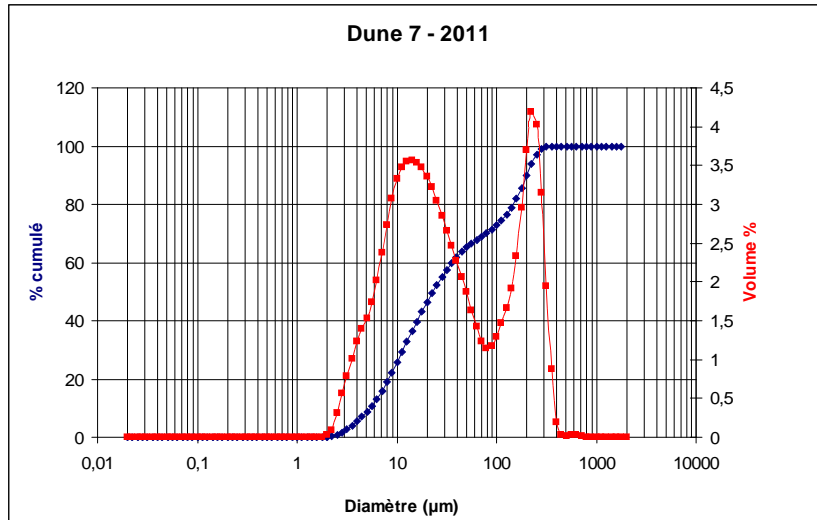












ANNEXE 2

Tableau des prélèvements de flets

Date de pêche	Copépodes et Biles	Flet N°	Taille (cm)	Poids (g)	Noms des échantillons		Masse du foie (mg)			
					Sang	Foie (Extraction)	TOTAL	Adduits	Extraction	
Campagne 1 06/05/2011		1	11	13,2	F1S	F1FE	ND	-		
		2	19	84,5	F2S	F2FE	882,4	-	882,4	
		3	13,5	25,8	F3S	F3FE	34,5	-	34,5	
		4	13	22,7	F4S	F4FE	79,6	-	79,6	
									996,5	
	Copépodes Biles						468	231	237	
Campagne 2 15/07/2011		5	8,5	7,2	F5S	F5FE	53	-	53	
		6	7,5	3,6	F6S	F6FE	26,2	-	26,2	
		7	8,2	5,4	F7S	F7FE	40,6	-	40,6	
		8	6,8	3,1	F8S	F8FE	30,7	-	30,7	
		9	5,7	1,9	F9S	F9FE	16,2	-	16,2	
		10	6	2	F10S	F10FE	28	-	28	
		11	6,5	2,1	F11S	F11FE	12,1	-	12,1	
		12	5,8	1,9	F12S	F12FE	5,4	-	5,4	
		13	5,9	1,6	F13S	F13FE	15	-	15	
		14	6,5	2,4	F14S	F14FE	6,8	-	6,8	
										234
		Copépodes Biles						190	190	0
	Campagne 3 22/09/2011		15	10,2	13,3	F15S	F15FE	194,8	48,7	146,1
			16	8,5	7,5	F16S	F16FE	79	52	27
		17	8,5	7	F17S	F17FE	97	50,7	46,3	
		18	7,8	5,5	F18S	F18FE	65	46,1	18,9	
		19	7,9	5,5	F19S	F19FE	65	-	65	
		20	7,8	5,3	F20S	F20FE	56	-	56	
		21	8,5	7,2	F21S	F21FE	98	49,5	48,5	
		22	7,9	5,2	F22S	F22FE	56	-	56	
		23	5,5	1,7	F23S	F23FE	15	-	15	
		24	6	2	F24S	F24FE	21,3	-	21,3	
									500,1	
	Copépodes Biles						762	222	540	
Campagne 4 19/10/2011		25	9,5	7,3	F25S	F25FE	33,7	-	33,7	
		26	14,8	29,9	F26S	F26FE	206,9	75,5	131,4	
		27	10	9,7	F27S	F27FE	86,5	-	86,5	
		28	12	16,1	F28S	F28FE	90,5	43,7	46,8	
		29	9	7	F29S	F29FE	42	-	42	
		30	11	12,5	F30S	F30FE	75,6	-	75,6	
		31	10,5	10,8	F31S	F31FE	79,1	-	79,1	
		32	10,5	11,3	F32S	F32FE	51,4	-	51,4	
		33	11	15	F33S	F33FE	120,5	44,9	75,6	
		34	10,5	8,9	F34S	F34FE	51,4	-	51,4	
		35	11	12	F35S	F35FE	57,1	-	57,1	
		36	13	20,4	F36S	F36FE	136,1	60,5	75,6	
		37	9,5	7,7	F37S	F37FE	56,6	-	56,6	
		38	9,5	7,7	F38S	F38FE	32,3	-	32,3	
		39	9	7,1	F39S	F39FE	56,9	-	56,9	
		40	9	7	F40S	F40FE	41,3	-	41,3	
		41	9,5	8,7	F41S	F41FE	78,1	51,8	26,3	
		42	10	8,8	F42S	F42FE	73,3	-	73,3	
		43	9,5	6,8	F43S	F43FE	37,8	-	37,8	
									1130,7	
	Copépodes Biles						1297	225,5	1072	

ANNEXE 3

Données brutes du test des comètes

Tableau 4: Données brutes concernant le test des comètes sur l'ensemble des échantillons de sang des flets prélevés dans le cadre du projet BCG.

	Code	Moyenne Tail DNA	Ecart-type	Cellules apoptotiques	% Tail DNA		Cellules apoptotiques	
					Moyenne	Erreur -type	Moyenne	Erreur -type
Campagne 1 106.05.11	2	11,30	8,07	3	10,76	2,32	3,0	1,73
	3	6,51	5,67	2				
	4	14,48	17,15	4				
Campagne 2 15.07.11	5	11,47	8,66	0	14,98	1,61	5,8	1,83
	6	14,52	10,97	0				
	7	24,74	10,91	1				
	8	14,48	13,27	2				
	9	14,79	13,31	12				
	10	6,13	6,49	30				
	11	13,74	10,43	1				
	12	16,28	14,73	9				
	13	21,13	12,60	3				
Campagne 3 22.09.11	14	12,52	11,01	0	16,55	3,32	14,40	4,6
	15	9,96	10,45	1				
	16	16,77	10,23	6				
	17	9,26	7,85	5				
	18	13,64	12,49	23				
	19	43,40	17,93	1				
	20	18,52	16,12	15				
	21	12,18	8,94	3				
Campagne 4 19.10.2011	22	22,66	15,74	50	13,08	2,33	9,29	2,3
	23	11,37	11,25	24				
	24	7,70	7,87	16				
	25	14,17	12,95	27				
	26	10,77	9,39	46				
	27	6,69	6,35	2				
	28	12,81	7,98	0				
	29	44,62	15,44	8				
	30	15,25	11,70	24				
	31	20,20	10,47	9				
	32	6,20	4,98	1				
	33	6,29	5,85	1				
	34	11,20	14,44	15				
36	22,87	13,38	5					
37	7,89	5,13	0					
38	5,41	7,13	5					
40	15,45	9,78	7					
41	6,22	6,96	4					
42	6,72	9,45	0					
43	9,65	8,31	4					

BIBLIOGRAPHIE

Bechtel PJ. & Oliveira CM. A.; Chemical Characterization of Liver Lipid and Protein from Cold-Water Fish Species, *Journal of food Science* (2006) 71, 481-485.

Burlinson B., Tice RR., Speit G., Agurell E., Brendler-Schwaab SY., Collins AR., Escobar P. & Hartmann A.; Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo comet assay workgroup. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* (2007) 627, 31–35.

Cachot J., Geffard O., Augagneur S., Lacroix S., Le Menach K., Peluhet L., Couteau J., Denier X., Devier MH., Pottier D. & Budzinski H.; Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France); *Aquat Toxicol* (2006) 79(3), 257-267.

Cailleaud K., Budzinski H., Le Menach K., Souissi S. & Forget-Leray J.; Uptake and elimination of hydrophobic organic contaminants in estuarine copepods: an experimental study. *Environmental Toxicology and Chemistry* (2009) 28, 239-246.

Cailleaud K., Forget-Leray J., Souissi S., Hilde D., LeMenach K. & Budzinski H.; Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer on a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoïda, copepoda). Part1: PCBs and PAHs. *Chemosphere* (2007) 70, 270-380.

Creusot, N., Kinani, S., Balaguer, P., Tapie, N., Lemenach, K., Maillot-Maréchal, E., Porcher, J.-M., Budzinski, H., Aït-Aïssa, S. Evaluation of an hPXR reporter gene assay for the detection of aquatic emerging pollutants: Screening of chemicals and application to water samples. *Anal. Bioanal. Chem.* (2010) 396, 569-583.

der Meerena TV., Olsenb RE., Hamrec K. & Fyhnd HJ.; Biochemical composition of copepods for evaluation of feed quality in production of juvenile marine fish, *Aquaculture* (2008), 274, 375-397.

Guzzella L., Di Caterino F., Monarca S., Zani C., Feretti D., Zerbini I., Nardi G., Buschini A., Poli P., & Rossi C.; Detection of mutagens in water-distribution systems after disinfection; *Mutat Res* (2006) 608(1), 72-81.

Hermes-Lima M., Storey JM. & Storey KB.; Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* (1998) 120, 437-448.

Kinani, S., Bouchonnet, S., Creusot, N., Bourcier, S., Balaguer, P., Porcher, J.-M., Aït-Aïssa, S. Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers. *Environ. Pollut.* (2010) 158, 74-83.

Livingstone DR. ; Contaminant-stimulate reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* (2001) 42, 656-666.

Lyons BP., Stewart C., Kirby MF.; The detection of biomarkers of genotoxin exposure in the European flounder (*Platichthys flesus*) collected from the River Tyne Estuary. *Mutat Res.* (1999) 446, 111-119.

Mersch-Sundermann V., Hofmeister A., Muller G. & Hof H.; The mutagenicity of organic microcontamination in the environment. III. The mutagenicity of selected herbicides and insecticides in the SOS chromotest; *Zentralbl Hyg Umweltmed* (1989) 189(2), 135-46.

Mustafa SA., Al-Subia SN., Davies SJ., Jha AN.; Hypoxia-induced oxidative DNA damage links with higher level biological effects including specific growth rate in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Ecotoxicology* (2011) 20, 1455–1466.

Olive PL. & Banath JP.; Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the comet assay and a DNA crosslinking agent. *Exp Cell Res* (1995) 221, 19–26.

Quillardet P. & Hofnung M., The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins : procedures, *Mutation Research* 147 (1985), 65-78.

Singh NP.; A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. *Exp Cell Res.* (2000) 256,328–337.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. & Schneider, E.L.; A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp Cell Res* (1988) 175(1), 184-191.

Tarantini A., Maitre A., Lefebvre E., Marques M., Marie C., Ravanat JL. & Douki T.; Relative contribution of DNA strand breaks and DNA adducts to the genotoxicity of benzo[a]pyrene as a pure compound and in complex mixtures. *Mutation Res.* (2009) 671, 67-75.

Van der Oost R., Van Schooten FJ., Ariese F., Heida H., Satumalay K. & Vermeulen NPE.; Bioaccumulation, biotransformation and DNA binding of PAHs in feral eel (*Anguilla anguilla*) exposed to polluted sediments: a field survey; *Environ. Toxicol. Chem.*, 13 (1994), pp. 859–870.

White P., Rasmussen J. & Blaise C., A semi-automated, microplate version of the SOS Chromotest for the analysis of complex environmental extracts, *Mutation Research* 360 (1996),51-74.

Crédit photo couverture : A. Cu villiez, Université du Havre
Pour tout renseignement, veuillez contacter la coordination scientifique : cdegremont@seine-aval.fr

Le GIP Seine-Aval ne saurait être tenu responsable d'évènements pouvant résulter de l'utilisation et de l'interprétation des informations mises à disposition.

Le GIP Seine-Aval est financé par :

