

Contaminants étudiés

Au cours de cette thèse, le cadmium a été utilisé comme contaminant modèle car la toxicité de ce métal a été démontrée chez les stades embryonnaires de nombreux organismes (cf I.2.2). Les propriétés génotoxiques du Cd sont également connues chez certains organismes (cf I.3) ainsi que son lien étroit avec les processus de détoxification chez les escargots via l'intervention des métallothionéines (MTs). Le Cd est donc apparu comme étant un contaminant adapté pour la recherche de paramètres de mesure des effets toxiques, la mise au point d'une méthode de mesure de la génototoxicité (RAPD) et l'étude des MTs chez l'embryon d'escargot *H. aspersa*.

I.6.1. Cadmium

Le Cd est un élément chimique de numéro atomique 48 et de masse atomique 112,4 g/mol. Il fait partie du groupe 12 du tableau périodique des éléments. Dans la croûte terrestre, le Cd est naturellement présent à des quantités comprises entre 0.1 et 0.5 ppm. C'est un métal non-essentiel, c'est-à-dire sans rôle biologique chez les organismes vivants. Sa toxicité fait de lui un métal considéré comme un des plus problématiques en termes de santé environnementale (Eisler, 2000). Il est classé par l'*U.S. Environmental Protection Agency* comme polluant prioritaire.

Le Cd est utilisé à près de 80%, dans la fabrication des accumulateurs et des piles Ni-Cd. Cet élément chimique intervient dans divers procédés comme le cadmiage (revêtement protecteur pour l'acier), ou encore en tant que pigments (jaune ou rouge) dont l'utilisation est fortement réglementée par l'Union Européenne. Il intervient également comme stabilisant (anti-UV) dans les plastiques comme le PVC (Figure I-20).

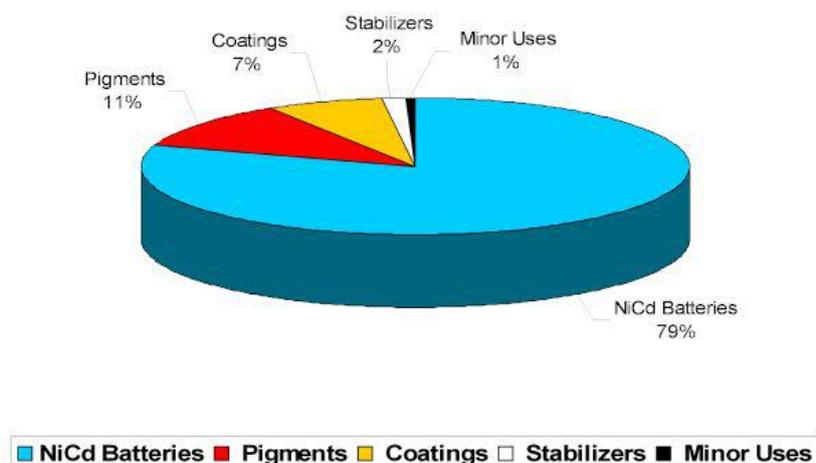


Figure I-20 : Principales utilisations du cadmium

(<http://www.cadmium.org>)

Les niveaux de Cd dans l'environnement ont augmenté de façon drastique entre les années 1800 et 1960. Cette augmentation étant la résultante du fort développement de l'industrialisation (mines d'extraction de métaux primaires, usines rejetant des combustibles fossiles, fabrication de piles...). Les niveaux mesurés dans l'environnement ont diminué depuis la fin des années 1960 du fait de la législation très stricte dans les pays les plus industrialisés. Ainsi en Europe, la Directive 2002/96/EC RoHS (*Restriction of the use of certain Hazardous Substances in electrical and electronic equipment*) limite son usage dans certains produits commercialisés (éclairage et électronique par exemple).

Les activités agricoles sont également émettrices de Cd via les engrais et les fertilisants (Schutze et al., 2003) ou encore via l'épandage de boues parfois issues de stations d'épuration (Bliefert et Perraud, 2001). Les émissions de Cd d'origine anthropique sont estimées entre 8 et 10 kilotonnes par an au niveau mondial soit 90% des émissions totales de Cd dans l'environnement (WHO, 1992).

Toutes ces activités humaines sont donc à l'origine de rejet de Cd engendrant une contamination des écosystèmes. Le Cd est non dégradable et se retrouve le plus souvent dans l'environnement sous sa forme divalente Cd^{2+} (ATSDR, 1993). Ses propriétés physiques et chimiques, proches de celles du Zn et du Ca, lui permettent de traverser les barrières biologiques et de s'accumuler dans les tissus ou encore d'activer les systèmes de détoxification (MT par exemple) des organismes vivants. En cas de saturation des mécanismes de détoxification, l'accumulation du Cd dans les tissus peut conduire à l'apparition d'effets toxiques.

I.6.1.1. Effets toxiques

Une présentation exhaustive de tous les effets toxiques du Cd chez les vertébrés et invertébrés serait difficilement réalisable car ils sont très documentés. Les paragraphes suivants se limitent donc à des généralités sur les principaux effets.

I.6.1.2. Effets généraux sur les organismes

Chez l'homme une exposition chronique au Cd peut engendrer la survenue d'effets sur les reins, les systèmes respiratoire (dûs principalement à l'inhalation de fumée de cigarette), squelettique, digestif, et reproducteur (Figure I-21 ; Godt et al., 2006).

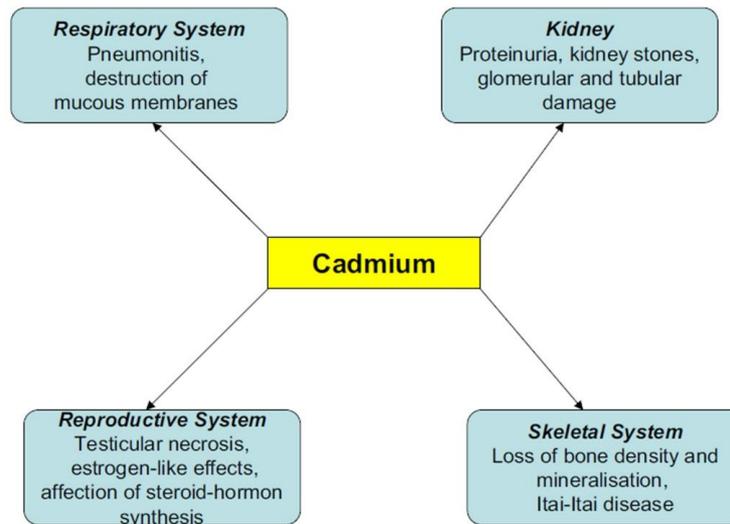


Figure I-21 : Effets du cadmium chez l'homme
(d'après Godt et al. 2006)

Dès 1932, Prodan détecte des dommages sur des organes cibles du Cd (foie, poumons et rein) chez des chats exposés *in vivo* à des fumées contenant des hauts niveaux d'oxydes de cadmium. Chez la souris, le Cd peut induire de phénomènes d'apoptose dans le foie (Habeebu et al., 1998). *In vitro*, des données sont également disponibles, comme chez des lignées cellulaires de truite arc-en-ciel, où le Cd est capable de provoquer des nécroses (Krumschnabel et al., 2010).

I.6.1.3. Effets cancérigènes et mutagènes

L'IARC (*International Agency for Research on Cancer*) classe le Cd comme un agent cancérigène et génotoxique du groupe I. Chez l'homme, le développement de cancers de la prostate, des reins, du foie, du système hématopoïétique (processus permettant la création et le renouvellement des cellules sanguines) et de l'estomac sont causés par des expositions environnementales ou professionnelles au Cd. Chez le rat, l'inhalation de Cd provoque des effets cancérigènes sur les poumons ainsi que l'induction de tumeurs cancéreuses au niveau de la prostate. L'ingestion de Cd par le rat augmente la survenue de leucémies (Waalkes, 2000).

Le Cd peut entraîner un stress oxydatif via l'augmentation des ROS. La production de ROS est normale pour tous les organismes aérobies. Les cellules possèdent un système de détoxification des ROS assuré par des enzymes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase...) et des molécules dites antioxydantes (vitamine E, C...). Lors d'exposition au Cd, un déséquilibre se crée entre la génération de ROS et la production d'antioxydants chez le rat (Ikediobi et al., 2004). Les ROS ont un fort potentiel d'oxydation des molécules type

protéines, ADN, ou lipides constituant les membranes cellulaires. Les effets génotoxiques du Cd ne seraient, à priori, pas dus à des effets directs sur l'ADN mais plutôt indirects via le stress oxydatif (Figure I-22 ; Filipič, 2012).

Une exposition au Cd peut générer une instabilité génomique par l'intermédiaire de dérèglement des systèmes de réparation de l'ADN, des phénomènes d'apoptose et de prolifération cellulaire ainsi que des mécanismes épigénétiques (hyper ou hypo-méthylation des bases de l'ADN) (Filipič, 2012). Ainsi le Cd peut moduler de façon indirecte l'expression de certains gènes.

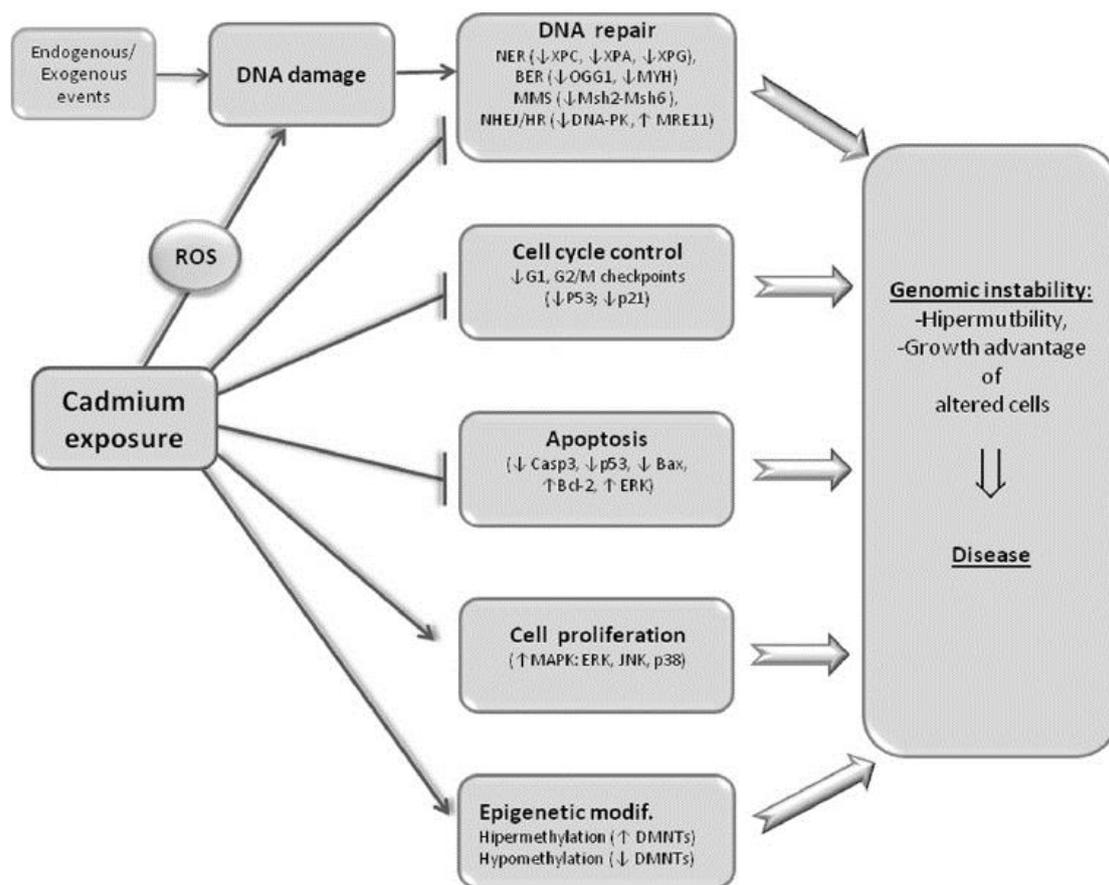


Figure I-22 : Effets toxiques directs et indirects d'une exposition au cadmium (Filipič, 2012)

L'inhibition des mécanismes de réparation de l'ADN engendrée par le Cd et l'augmentation de l'apoptose conduisent à une augmentation du nombre de cellules présentant des dommages à l'ADN (non réparés). La probabilité de développer un cancer ou d'autres maladies associées à l'instabilité génomique est donc elle aussi accrue (Filipič, 2012).

I.6.1.4. Effets chez les embryons

Les effets embryotoxiques du Cd sont connus chez des nombreux organismes : poissons (poisson zèbre, médaka), reptile (lézard), invertébrés aquatiques (gastéropodes, moules, oursins) (cf I.2.3.2). Des données de toxicité sont disponibles au niveau individuel (succès

d'éclosion, malformations embryonnaires) chez l'escargot terrestre *H. aspersa* en fin d'exposition (cf I.2.3.2). Cependant, la cinétique d'apparition des effets du Cd au cours du développement (effets précoces ou tardifs, cibles physiologiques...) au niveau individuel n'est pas connue de même, que la toxicité du Cd aux niveaux d'organisation cellulaire et moléculaire chez l'embryon d'*H. aspersa*.

I.6.2. Produits phytosanitaires

Les travaux de recherche ont été étendus à 3 pesticides classiquement utilisés dans le traitement de la vigne : un herbicide, le Round Up[®] Flash (450 g/L de glyphosate) ; 2 fongicides : le Corail[®] (250 g/L de tébuconazole) et la Bouillie Bordelaise (20% de Cuivre). L'embryotoxicité de ces 3 pesticides a été caractérisée chez les escargots au niveau individuel par Druart et al. (2010, 2012). Ces produits phytosanitaires ont donc été retenus pour approfondir l'étude des mécanismes impliqués dans leur toxicité aux échelles d'organisation infra-individuelles.

I.6.2.1. Le Round Up[®]

Le Round Up[®] (RU[®]) est un herbicide commercialisé depuis 1975 par la firme américaine Monsanto. Son principe actif est le glyphosate (à 450 g/L pour le RU[®] flash) auquel sont ajoutés des additifs appelés surfactants comme le polyoxyéthylène amine (POEA) ainsi que des composés inertes (WHO, 1994). Le glyphosate est considéré comme modérément persistant : entre 2 à 140 jours suivant les types de sol (EC et ECB 2000). Son métabolite, l'acide aminométhylphosphonique (AMPA), est par contre beaucoup plus persistant que la molécule mère avec un temps de dégradation compris entre 131 et 958 jours selon Monsanto (EC et ECB 2000). C'est un herbicide à large spectre, systémique et non sélectif. Ses caractéristiques ont conduit à une forte augmentation de son utilisation dans les zones agricoles et non agricoles dans le monde entier (WHO, 1994).

I.6.2.2. Le Corail[®]

Le Corail[®] est un fongicide de la famille des triazoles, utilisé lors du traitement de la vigne de façon préventive et curative. Il est utilisé pour le traitement de l'oïdium (parasite fongique), le rougeot parasitaire (ou Brenner) et le black-rot de la vigne (champignon phytopathogène). Son principe actif est le tébuconazole (250 g/L). Il est commercialisé par BAYER CropScience.

I.6.2.3. La Bouillie Bordelaise

La BB est un pesticide (algicide et fongicide) composé de sulfate de cuivre et de chaux. Elle est utilisée de façon préventive principalement contre le mildiou sur les arbres fruitiers (pêcher, pommier...), dans les jardins potager (pomme de terre, tomates...) et également sur la vigne. Elle est vendue sous forme de poudre de couleur bleue verdâtre composée de 20% de cuivre. Un agent mouillant est ajouté pour mettre la poudre en solution afin de pulvériser la BB sur les végétaux. Un usage répété de la BB conduit à une accumulation du Cu dans le sol parfois très forte (ex : 3200 mgCu/kg ; Mirlean et al., 2007).

I.6.2.4. Effets toxiques de ces 3 pesticides chez les embryons

Des effets toxiques des 3 pesticides cités ci-dessus sur la faune non-cible sont connus. Les paragraphes suivant présentent certains de ces effets.

- Round Up[®] et ses composés

Des effets embryotoxiques du RU[®] ont été rapportés chez des organismes aquatiques et terrestres (amphibiens). Les études s'intéressent souvent à l'effet du RU[®] mais aussi à ses différents composés.

Par exemple, Marc et al. (2002) ont démontré qu'une exposition à une solution de RU[®] contenant 8 mM de glyphosate affecte les cycles de division chez l'embryon d'oursin *S. granularis*. Chez cette même espèce, Marc et al. (2005) ont étudié l'effet de 4 formulations de pesticides contenant du glyphosate dont 2 types de RU[®] (RU[®] 3 plus à 170 g/L ; RU[®] Biovert 360 g/L). Des retards d'éclosion ont été démontrés dès 2 mM de glyphosate contenus dans le RU[®] 3 plus.

Chez les embryons de moules (*L. siliquoides*) une EC_{50 48h} basée sur la survie à 2,9 mg/L a été estimée pour le RU[®] (Bringolf et al., 2007). Le glyphosate a été rapporté comme embryotoxique ce qui permet de supposer que la toxicité du RU[®] ne peut pas être attribuée seulement aux additifs. Chez l'huitre (*C. gigas*) deux formulations ont été testées, le RU[®] Express (RU[®] EX) et le RU[®] Allées et Terrasses (RU[®] AT) ainsi que le glyphosate et l'AMPA seuls. Une EC₅₀ de 1133 µg/L basée sur le pourcentage de malformations après 48 heures d'exposition a été rapportée pour le RU[®] EX contre 1675 µg/L pour le RU[®] AT. Pour le glyphosate et l'AMPA seuls, les EC₅₀ rapportées sont respectivement de 27,1 et 46,1 µg/L (Mottier et al., 2013).

Chez les amphibiens, les embryons de salamandre (*Chioglossa lusitanica*) ont été exposés à la formulation commerciale du RU[®] plus (2,8 et 5,6 mg/L) ce qui a permis de

démontrer un effet positif du RU[®] sur la taille des jeunes éclos (Ortiz-Santaliestra et al., 2010).

Les travaux de Druart et al. (2010) via le LPB et les embryons d'*H. aspersa* ont montré que chez cette espèce le RU[®] est plus toxique que son principe actif le glyphosate (EC₅₀ de 18 mg/L pour le RU[®] et 1300 mg/L pour le glyphosate basé sur le taux d'éclosion). Les effets sur le développement embryonnaire du glyphosate et du RU[®] semblent apparaître tardivement au cours de l'embryogenèse avec des embryons bien développés mais n'arrivant pas à éclore.

Génotoxicité du RU[®]

La seule publication sur la génotoxicité du RU[®] chez des embryons concerne les reptiles. En effet, chez le caïman (*Caiman latirostris*), le MN et l'essai comète ont permis de mettre en évidence un effet génotoxique du RU[®] à partir de 500 µg/œufs (dommage à l'ADN) chez des érythrocytes d'embryons (Poletta et al., 2009).

- Corail[®] et Bouillie Bordelaise

Seuls les travaux de Druart et al. (2012) sur l'escargot petit-gris concernent des effets embryotoxiques du Corail[®] et de la BB chez des organismes terrestres. Une EC₅₀ proche de 0,1 mg/L de Corail[®] a été rapportée. Ce fongicide est le plus toxique des pesticides testés lors de cette étude avec des effets très prononcés dès l'application de faibles concentrations comparativement à la dose recommandée en application au champs (700 mg/L). Une EC₅₀ d'environ 8 g/L de BB (1,6 g/L de Cu) a été également déterminée, avec, encore une fois, la survenue d'un effet embryotoxique à des concentrations bien inférieures aux concentrations recommandées en application aux champs (38,2 g/L de BB).