



Réponses de populations de poissons au stress chimique en milieux estuariens : intégration des réponses moléculaires, biochimiques et immunotoxicologiques

Célie Dupuy

► To cite this version:

Célie Dupuy. Réponses de populations de poissons au stress chimique en milieux estuariens : intégration des réponses moléculaires, biochimiques et immunotoxicologiques. Sciences agricoles. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2012. Français. NNT : 2012BRES0063 . tel-00951704

HAL Id: tel-00951704

<https://theses.hal.science/tel-00951704>

Submitted on 25 Feb 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



université de bretagne
occidentale



THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Biologie Marine

École Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par

Célie DUPUY

Préparée à l'IUEM - Laboratoire des sciences de
l'environnement marin - UMR 6539 (France) et
l'INRS-Institut Armand Frappier (Québec, Canada)

Réponses de populations
de poissons au stress
chimique en milieux
estuariens :
*Intégration des réponses
moléculaires, biochimiques
et immunotoxicologiques*

Thèse soutenue le 20 décembre 2012

devant le jury composé de :

Magalie BAUDRIMONT

Professeur, Université de Bordeaux / *Rapporteur*

Jean-Marc LEBEL

Professeur, Université de Caen Basse-Normandie / *Rapporteur*

Patrice COUTURE

Professeur, INRS-ETE / *examineur*

Michel AUFFRET

Professeur, Université de Bretagne Occidentale / *examineur*

Jean LAROCHE

Professeur, Université de Bretagne Occidentale / *co-directeur de thèse*

Michel FOURNIER

Professeur, INRS-IAF / *co-directeur de thèse*

Ce travail a bénéficié du soutien financier du programme européen INTERREG IV – DIESE (Détermination d'Indicateurs Environnementaux pertinents : un Stratégie pour l'Europe), de la Chaire de recherche canadienne en immunotoxicologie environnementale (Dr. Michel Fournier) et du CIRÉ (Centre Institutionnel de Recherche en Écotoxicologie). Il a également obtenu le soutien financier du Collège Doctoral International de l'Université européenne de Bretagne et des programmes suivants : INERIS – DEVIL et ANR VMCS - EVOLFISH



REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail. Merci notamment au Pr. Magalie Baudrimont et au Pr. Jean-Marc Lebel qui ont accepté de prendre sur leur temps pour rapporter cette étude. Je remercie également le Pr. Patrice Couture et le Pr. Michel Auffret qui ont accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes deux directeurs qui m'ont permis de réaliser cette thèse en co-tutelle : le Pr. Jean Laroche en France et le Pr. Michel Fournier au Québec. Ils m'ont tous les deux fourni un encadrement scientifique exceptionnel, m'ont aidé de leurs précieux conseils et de leurs remarques pertinentes. Ils m'ont énormément apporté et m'ont permis de progresser, je les remercie vraiment pour tout.

Un grand merci à tous les membres des deux laboratoires qui m'ont accueilli : le LEMAR en France et le laboratoire du Pr. Fournier à l'INRS-IAF au Québec. Lors de cette thèse, j'ai passé presque autant de temps dans ces deux laboratoires ce qui m'a permis de rencontrer de multiples personnes et je les remercie tous de leur aide, de leur bonne humeur et de leur soutien.

Au LEMAR, un immense merci à Louis Quiniou dont la porte est toujours ouverte. Louis est un mélange entre Géo Trouvetou et Mac Gyver, grâce à qui, tout problème a sa solution. Merci à lui pour son aide précieuse, sa bonne humeur, son soutien et son écoute. Je remercie également Nelly Le Goïc, Christophe Lambert, Caroline Fabioux, Fabienne Guerard, Ricardo Riso, Alain Marhic, Michel Auffret, Olivier Gauthier et Vianney Pichereau pour leur aide, leurs conseils et pour avoir toujours été disponibles pour répondre à mes questions. Sans oublier les indispensables : Gene, Anne-So, Marie-Line, Agnès, Yannick, Sophie, Pascal et Elisabeth, merci pour votre efficacité et votre gentillesse.

Je remercie également les autres thésards du laboratoire LEMAR et mes collègues de bureau. Merci à Rossana, Manu, Estérine et Isa, les premiers à avoir partagé ce bureau avec moi, à m'avoir aidé et fait découvrir le laboratoire. Merci à Camille, Edouard, Seb et Claire H. qui les ont suivi et m'ont permis de décompresser lors de la phase finale de cette thèse. Merci aux nouveaux, Romain et Nicolas (qui ne sont pas si nouveaux que ça !) pour leur bonne humeur et pour leurs discussions qui permettent de décompresser autour d'un délicieux repas au RU ! Merci à Cindy qui m'a apporté son soutien technique et grâce à qui c'est devenu presque amusant de passer sa soirée (voir sa nuit) à regarder passer des tubes de cytométrie.

Merci à Carole, qui pipette plus vite que son ombre (en tout cas plus vite que moi) et qui m'a aidée aussi bien en laboratoire que sur le terrain (je suis sûre qu'elle se souviendra longtemps de la pêche aux flets) et qui est devenue une amie. Merci à ma siamoise de thèse, Claire qui a une approche totalement complémentaire à la mienne aussi bien dans le travail que dans la vie. Merci pour ton soutien, tes longues discussions, tes explications pour m'aider à comprendre la subtilité des processus physiologique et merci pour ton éternel optimisme... Enfin, merci aux autres thésards et membre du laboratoire : Claire S., Virginie, Marion, JP, Tony, Morgana, Adeline et tous les autres...

Merci aux personnes des autres laboratoires qui m'ont aidée à la réalisation de cette thèse. Je pense notamment au personnel de l'ANSES et particulièrement à Claire Quentel, Fanch et Morgane. Ils m'ont apporté leur aide et leurs connaissances sur le système immunitaire des poissons et ont pris soins de mes flets. Merci pour votre gentillesse et pour votre disponibilité. Merci à Bruno Guinand pour m'avoir tout appris lors de mon premier stage et pour m'avoir mis en contact avec celui qui est devenu un de mes directeurs de thèse. Je tiens également à remercier Aline Amerand pour ses conseils avisés lors de mes présentations orales, Mickael Théron pour m'avoir appris la mesure CCO et être resté à l'écoute de mes questions, Béatrice Gagnaire pour ses conseils en immunotoxicité, Maylis Labonne et le personnel de l'IRD pour leurs analyses des otolithes et des muscles de flets, Véronique Loizeau pour ses dosages et les longues discussions qui s'en sont suivies pour les comprendre, Wilfried Sanchez pour sa collaboration et Alain Devaux et son laboratoire pour ses analyses comètes et pour ses conseils avisés. Enfin, merci à Bill Langston, Christophe Minier et Rachid Amara pour m'avoir ouvert leur laboratoire lors des campagnes d'échantillonnages et merci à leurs étudiant(e)s pour nous avoir tenu compagnie lors des soirées de dissection et d'analyse et notamment un grand merci à Elodie Kerambrun pour nous avoir aidées à disséquer des flets (désolé pour ces multiples et longues soirées au labo).

De la même manière, je remercie les membres du laboratoire qui m'ont accueillie au Québec et tout particulièrement Pauline Brousseau qui m'a soutenue, encadrée, aidée et qui m'a ouvert la porte de sa maison. Un grand merci pour ton aide scientifique précieuse et également pour m'avoir fait découvrir le Québec et certaines de ses traditions. Et merci également à Claude qui a animé nos trajets et nos soirées à Mont-Joli.

Mes remerciements vont également à Marlène Fortier pour son aide technique et à mes collègues de bureau : Audrey, Jocelyne, Sophie, Hayet, Nadjat, Meriem, Cécile, Christine et Laurie. Je les remercie pour leur sourire, leur bonne humeur et leur soutien. Un merci tout

particulier à Cécile qui a bravé le froid québécois afin de disséquer quelques poulamons, et a gardé le moral jusqu'au bout. Je remercie infiniment Audrey qui est devenue une grande amie, qui m'a apporté son aide, son expérience et m'a également hébergée pendant de longues semaines, vraiment merci pour tout.

Je remercie le Pr. Catherine Couillard et son assistant de recherche, Benoît Légaré qui m'ont accueillie à plusieurs reprises à l'institut Maurice Lamontagne, et pour qui la technique EROD n'a pas de secret. Merci de m'avoir fait connaître le poulamon et surtout merci d'avoir toujours été disponibles pour répondre à mes multiples questions.

A l'institut Maurice Lamontagne, je remercie également Pierre Nellis qui m'a emmenée pêcher mes premiers poulamons. Je le remercie pour son aide technique, pour sa sympathie et pour m'avoir fait visiter une bonne partie du Québec. Je remercie également toutes les autres personnes qui ont participé à l'échantillonnage de poulamons dans les différents sites étudiés. Donc un grand merci aux personnes du Parc Forillon qui m'ont permis de participer à leur suivi à Penouille. Merci à Sophie Gauthier-Clerc qui m'a ouvert son laboratoire et m'a accueilli chez elle alors que je n'avais plus d'essence. Merci à Soazig Le Breton et aux autres membres de l'association AMIK qui m'ont non seulement permis de pêcher avec eux, mais m'ont également ouvert leurs locaux et ont mis la main à la pâte pour m'aider à disséquer. Merci également au professeur Francis Turcotte du cégep de La Pocatière et à ses étudiants qui ont grandement facilité l'échantillonnage à Cacouna. Merci à Geneviève Bourget du Ministère des Ressources naturelles et de la Faune et au pêcheur local qui m'ont aidés à Rivière-Ouelle et m'ont fait découvrir la pêche à l'anguille. De plus, je remercie François Gagné et les membres de son laboratoire qui m'ont laissé utiliser leur matériel et m'ont permis de réaliser mes expériences.

Bien évidemment, je remercie tout particulièrement mes ami(e)s pour leur oreille attentive, leur soutien, leur compréhension. Merci à Marion qui garde toujours le moral et le sourire et qui m'a permis de décompresser et de relativiser plus d'une fois. Merci à Anouck et à ses poussins, rien que de penser à vous j'ai le sourire. Virginie, un énorme énorme merci pour tout (faire la liste serait trop long !).

Et pour finir un merci à mes parents, ma sœur, ma famille pour être là, toujours. Merci !

Trois ans de thèse dans deux pays, c'est long et ça permet de rencontrer énormément de monde, alors merci à tous ceux qui m'ont aidée durant ces années, de prêt ou de loin. Merci à tous.

« Aucun de nous ne s'est élevé à la seule force de son poignet. Nous sommes arrivés parce quelqu'un s'est baissé pour nous aider. » - Thurgood Marshall

« L'art de vivre est un subtil mélange entre lâcher prise et tenir bon. » - Henry Ellis

« La souris est un animal qui, tué en quantité suffisante et dans des conditions contrôlées, produit une thèse de doctorat. » - Woody Allen

TABLE DES MATIÈRES

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES:	XIX
COMMUNICATIONS ORALES	XX
COMMUNICATIONS PAR AFFICHES	XXI
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE	1
1 INTRODUCTION	2
2 LES PERTURBATIONS EN MILIEUX COTIERS	3
2.1 LES PERTURBATIONS ANTHROPIQUES	3
2.2 LES PRINCIPAUX POLLUANTS	3
2.2.1 Les métaux	4
2.2.2 Les pesticides	4
2.2.3 Les Polychlorobiphényles	5
2.2.4 Les Hydrocarbures aromatiques polycycliques	6
2.2.5 Que sont les POPs ?	7
2.2.6 Autres polluants	8
3 MODELES ET SITES D'ETUDES	9
3.1 LES NOURRICERIES COTIERES	9
3.2 NOTION D'ESPECE SENTINELLE	10
3.3 LE FLET, <i>PLATICHTHYS FLESUS</i>	11
3.4 LE POULAMON, <i>MICROGADUS TOMCOD</i>	13
4 LES BIOMARQUEURS	16
4.1 BIOMARQUEURS, DEFINITION	16
4.2 DOMMAGES A L'ADN	17
4.3 REPONSES MOLECULAIRES, L'EXPRESSION DE GENES	17
4.4 SYSTEME IMMUNITAIRE	18
4.4.1 Le système immunitaire des poissons	18
4.4.2 Le C3 et le TNF-R	19
4.4.3 Dosages du lysozyme	21
4.4.4 Capacité de phagocytose	22
4.5 MECANISMES DE DETOXICATION	23
4.5.1 Ethoxyresorufin-O-deethylase, EROD	23
4.5.2 Métallothionéine	23

4.6	METABOLISME ENERGETIQUE	24
4.7	INDICES DE CONDITION	24
4.8	APPROCHE PROTEOMIQUE 2D	25
5	OBJECTIFS DE L'ETUDE	27

CHAPITRE 2 : REPONSES DU FLET, *PLATICHTHYS FLESUS*, EN PRESENCE D'UN MELANGE COMPLEXE DE HAPS ET PCBS EN CONDITIONS EXPERIMENTALES **29**

1	INTRODUCTION	30
2	RESULTATS ET DISCUSSION	32
	ARTICLE	35

CHAPITRE 3 : APPROCHE MULTIMARQUEURS SUR LE FLET, *PLATICHTHYS FLESUS*, DANS LA MANCHE **59**

1	INTRODUCTION	60
2	RESULTATS ET DISCUSSION	61
	ARTICLE	65

CHAPITRE 4 : APPROCHE MULTIMARQUEURS SUR LE POULAMON, *MICROGADUS TOMCOD*, DANS L'ESTUAIRE DU ST. LAURENT **83**

1	INTRODUCTION	84
2	RESULATS ET DISCUSSION	85
	ARTICLE	88

CHAPITRE 5 : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES **109**

1	QUELS LIENS EXISTENT ENTRE LES DIFFERENTS BIOMARQUEURS ET QUELS MECANISMES SONT MIS EN JEUX ?	110
1.1	LE CAS DES REPONSES DU SYSTEME IMMUNITAIRE	110
1.2	LE CAS DU COUPLAGE : BIOTRANSFORMATION – DOMMAGES A L'ADN	111
2	QUELS BIOMARQUEURS A PRIVILEGIER ?	112
2.1	LES MARQUEURS QUI N'ONT PAS MONTRE DE MODULATIONS DANS UNE OU PLUSIEURS ETUDES DOIVENT-ILS ETRE RECONSIDERES ?	112
2.2	LES MARQUEURS DU SYSTEME IMMUNITAIRE SONT-ILS PERTINENTS ?	115

2.3	IMPORTANCE ET COMPLEXITE DES MARQUEURS DE DETOXICATION ET DE GENOTOXICITE	118
2.4	BIOMARQUEURS DE LA VARIABILITE GENETIQUE	119
3	QUEL TYPE DE CONTAMINATION EXPERIMENTALE A PRIVILEGIER ?	120
4	QUELS SITES D'ETUDES, PERIODES ET MODELES CHOISIR EN MILIEU NATUREL ?	122
5	PERSPECTIVES	125
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		129
ANNEXE 1 : REPONSES DU FLET, <i>PLATICHTHYS FLESUS</i>, EN PRESENCE D'UN MELANGE COMPLEXE DE HAPS ET PCBS EN CONDITIONS EXPERIMENTALES - APPROCHE 2D		165
ANNEXE 2 : APPROCHE MULTIMARQUEURS SUR LE FLET, <i>PLATICHTHYS FLESUS</i>, DANS LA MANCHE - APPROCHE 2D		205

LISTE DES TABLEAUX (HORS ARTICLES)

Chapitre 2

Tableau 1. Nombre de poissons prélevés pour chaque temps et chaque condition lors de l'expérience de contamination. _____ 31

Tableau 2. Récapitulatif des résultats des différents biomarqueurs et indicateurs utilisés au cours de cette étude. _____ 32

Chapitre 3

Tableau 3. Récapitulatif des résultats des différents biomarqueurs et indicateurs utilisés au court de cette étude. _____ 61

Chapitre 4

Tableau 4. Récapitulatif des résultats des différents biomarqueurs et indicateurs utilisés au court de cette étude.. _____ 85

Chapitre 5

Tableau 5. Résultats des différents biomarqueurs et indicateurs mis en œuvre au cours de cette étude. _____ 113

LISTE DES FIGURES (HORS ARTICLES)

Chapitre 1

Figure 1 : poulamon, <i>M. tomcod</i> (à gauche) ; flet, <i>P. flesus</i> (à droite)	11
Figure 2 : aire de répartition du Flet, <i>P. flesus</i> (en jaune) et du poulamon, <i>M. tomcod</i> (en rouge)	12
Figure 3 : Cycle de vie du flet, <i>P. flesus</i> (Evrard, 2009)	13
Figure 4 : Cycle de vie du poulamon, <i>M. tomcod</i>	14
Figure 5 : Représentation schématique des réponses biologiques séquentielles à un stress. Les marqueurs utilisés dans ce projet sont indiqués entre parenthèse.	16
Figure 6 : Schéma des 3 voies d'activation du système du complément et fonctions impliquées (Boshra, Li et Sunyer, 2006)	20
Figure 7 : les différentes étapes de la phagocytose (adapté de Bado-Nilles (2008))	22
Figure 8. Exemple de gel 2D obtenu à partir d'un foie de flet.	26

Chapitre 5

Figure 9 : Synthèse générale des questionnements et perspectives de recherche, sur l'impact du stress chimique sur les poissons.	127
--	-----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2D, 2DE, 2-DE : en 2 dimensions

Ah (Récepteur): aryl-hydrocarbure (Récepteur)

AMPD1 : adénosine 5' monophosphate désaminase

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire

ARNm : acide ribonucléique messager

ATP : adénosine triphosphate

B(a)P : benzo(a)pyrène

BHMT : betaine homocystéine méthyle transférase

BPCs : biphényles polychlorés ou polychlorobiphényles (PCBs)

BPDE : benzo(a)Pyrène-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde

C3 : complexe 3 du système du complément

CAT : catalase

CF : indice de condition somatique

CCO : cytochrome c oxydase

COP4 : conférence des parties

CYP1A1 : cytochrome P450 1A1

CYP450 : Cytochrome P450

DDT : dichlorodiphényl-trichloroéthane

EDPB : éthers diphenyliques polybromés

e.g. : par exemple (*exempli gratia*)

ENO : enolase

EPA : US Environmental Protection Agency

EROD : ethoxyresorufin-O-deethylase

FBPA : fructose biphosphate aldolase

GAPDH : glyceraldehyde 3 phosphate

GPx : glutathion peroxydase

GSH, GSSG : glutathion oxydé, glutathion réduit

GSI : gonadosomatic index (RGS en français)

GST : glutathion-S-transférase

HAPs : hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAHs en anglais)

HSI : hepatosomatic index (RHS en français)

IARC : agence International de Recherche sur le Cancer

i.e. : c'est-à-dire (*id est*)

IRD : Institut de Recherche pour le Développement

LEMAR : Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin
MDH: malate deshydrogenase
MT : métallothionéine
NDPK : nucleoside diphosphate kinase
PAHs : hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs en français)
PBDEs : polybromodiphényléthers
PCBs : polychlorobiphényles ou biphényles polychlorés (BPCs)
PCB-dl : PCBs de type dioxine, ou dioxine-like
PCBi : PCBs indicateurs
PCB-ndl : PCBs non dioxine-like
PCR : polymerisation chain reaction
POPs : polluants organiques persistants,
RGS : rapport gonadosomatique
RHS : rapport hépatosomatique
ROS : espèces réactives de l'oxygène
RT-PCR : reverse transcriptase – polymerisation chain reaction
SHMT : sérine hydroxy méthyle transférase
SOD : superoxyde dismutase
TBT : tributylétain
TNF- α : tumor necrosis factor α ou facteur de nécrose tumorale α
TNF-R : tumor necrosis factor – receptor
vs : *versus*

VALORISATION DES TRAVAUX

Publications scientifiques:

Accepté

- C. Dupuy, C. Couillard, J. Laroche, P. Nellis, P. Brousseau, M. Fournier. A multibiomarker approach on the Atlantic tomcod (*Microgadus tomcod*) in the St. Lawrence Estuary. Environmental Science and Pollution Research. DOI: 10.1007/s11356-012-1285-2 (accepté dans le numéro special *ecotoxicology of estuaries in France and Québec, Canada*)
- C. Galland, C. Dupuy, C. Capitaine, M. Auffret, L. Quiniou, J. Laroche, V. Pichereau, Comparisons of liver proteomes in the European flounder *Platichthys flesus* from three contrasted estuaries. Journal of sea research.(2012) DOI:10.1016/j.scares.2012.05.009 (sous presse)

En préparation

- C. Dupuy, C. Galland, A. Devaux, S. Bony, V. Loizeau, M. Danion, M. Auffret, M. Fournier, L. Quiniou, J. Laroche. Responses of the European flounder (*Platichthys flesus*) to a mixture of PAHs and PCBs in experimental conditions (en préparation).
- C. Dupuy, C. Galland, W. Sanchez, R. Riso, M. Waeles, V. Pichereau, M. Fournier, L. Quiniou, J. Laroche. Assessment of the European flounder responses to chemical stress in the British Channel, by a multiparametric approach (en préparation).
- C. Galland, C. Dupuy, V. Loizeau, A. Devaux, M. Danion M. Auffret, L. Quiniou, J. Laroche, V. Pichereau. Proteomic analysis of the European flounder *Platichthys flesus* after experimental PAH/PCB contamination. (en préparation)
- C. Galland, C. Dupuy, V. Loizeau, M. Danion, M. Auffret, L. Quiniou, J. Laroche, V. Pichereau. Towards tissue proteome maps in the European flounder (*Platichthys flesus*). (En préparation)

Communications orales

(Le nom souligné correspond à la personne ayant fait la présentation)

C. Dupuy, C. Calvès, N. Pedron, S. França, R. Vasconcelos, M. Auffret, N. Cabral, M. Fournier, L. Quiniou, J. Laroche. Cellular and molecular responses of the European flounder (*platichthys flesus*) to the effects of climate change, hypoxia and chemical, in estuaries from France to Portugal. 28th Congress of the New European-Society-for-Comparative-Physiology-and-Biochemistry (ESCPB) on Cellular and Molecular Mechanisms for Physiological Adaptation to Multiple Stress. Bilbao, Espagne, 02-05 septembre 2012

C. Galland, **C. Dupuy**, L. Quiniou, M. Auffret, L. Laroche, V. Pichereau. 2012 Response of the European flounder *Platichthys flesus* to experimental and in situ contaminations: A proteomic approach. 28th Congress of the New European-Society-for-Comparative-Physiology-and-Biochemistry (ESCPB) on Cellular and Molecular Mechanisms for Physiological Adaptation to Multiple Stress. Bilbao, Espagne, 02-05 septembre 2012

C. Dupuy, C. Galland, I. Calves, M. Auffret, M. Labonne, L. Quiniou, V. Pichereau, J. Laroche. 2011. Responses of flounder populations to multi-stress in estuaries : immunotoxicity, biochemical biomarkers, isotopes, life-history traits and population genetics. Joint meeting CHRONEXPO/DIESE at the University of Caen, INTERREG IV. 30-31 August 2011

C. Galland, **C. Dupuy**, M. Auffret, L. Quiniou, J. Laroche, V. Pichereau 2011 Responses of the European flounder *Platichthys flesus* to contamination : a proteomic approach. Joint meeting CHRONEXPO/DIESE at the University of Caen, INTERREG IV. 30-31 August 2011

C. Dupuy, I. Calves, W. Sanchez, M. Fournier, M Auffret, L. Quiniou, J. Laroche. Réponses aux stress chimiques de deux espèces sentinelles de la qualité des milieux estuariens en France et au Québec : le flet et le poulamon. GDR-I-EXECO, Arcachon, France, 7 avril 2011

C. Dupuy, J. Laroche, M. Fournier, Réponses de populations de poissons à la contamination chimique en milieux estuariens : Intégration des réponses physiologiques, génétiques et immunotoxicologiques. Workshop Biotechnologie Marines et Aquaculture, Québec, Canada, 13 avril 2010.

C. Dupuy, J. Laroche, M. Fournier. Approche multipopulationnelle de la réponse des poissons au stress chimique. ECOBIM, L'Anse-Saint-Jean, Québec, Canada, 2 au 4 juin 2009.

Communications par affiches

(Le nom souligné correspond à la personne ayant fait la présentation)

C. Dupuy, C. Couillard, S. Gauthier Clerc, J. Laroche, M. Fournier. Réponses de populations de poulamons aux stress le long du Saint Laurent : biomarqueurs au niveau cellulaire, biochimique et physiologique. ECOBIM 2012. Université de Champagne Ardenne, Reims, France, 5-8 juin 2012

C. Dupuy, M. Auffret, I. Calves, G. Claireaux, M. Theron, A. Amerand, C. Galland, F. Guérard, V. Loizeau, L. Quiniou, W. Sanchez, M. Fournier, J. Laroche. Étude de populations naturelles de flets le long d'un gradient latitudinal : utilisation de biomarqueurs au niveau cellulaire, biochimique et physiologique. Congrès armand-frappier, Esterel, Québec (Canada), 17-19 novembre 2011.

C. Galland, **C. Dupuy**, C. Capitaine, I. Calves, M. Auffret, L. Quiniou, J. Laroche, V. Pichereau 2011. Comparisons of liver proteomes in European flounder *Platichthys flesus* from three contrasted estuaries. 8th international flatfish symposium, IJmuiden, Pays-Bas, 5-11 novembre 2011

J. Laroche, I. Calves, **C. Dupuy**, C. Galland, M. Auffret, V. Pichereau, C. Capitaine, M. Labonne, E. Dabas, JM. Munaron, F. Guérard, L. Quiniou, G. Claireaux, M. Theron, A. Amerand, V. Loizeau, D. Mazurais, J. Zambonino, N. Le Bayon, H. Cabral, R. Vasconcelos, S. Franca, M. Fournier, C. Couillard. 2011. Approche intégrative de la réponse de populations de poissons aux multi-stress en milieu estuarien. ECOBIM. Institut Maurice-Lamontagne, Mont-Joli, Québec, 6-9 juin 2011

C. Galland, **C. Dupuy**, C. Capitaine, I. Calves, M. Auffret, L. Quiniou, J. Laroche, V. Pichereau. 2011. Réponse du flet européen *Platichthys flesus* à la contamination par les HAP/PCB : approche par électrophorèse 2D. ECOBIM 2011. Institut Maurice-Lamontagne, Mont-Joli, Québec, 6-9 juin 2011

C. Dupuy, M. Auffret, I. Calves, G. Claireaux, M. Theron, A. Amerand, C. Galland, F. Guérard, V. Loizeau, L. Quiniou, W. Sanchez, M. Fournier, J. Laroche. Étude de

populations naturelles de flets le long d'un gradient latitudinal : utilisation de biomarqueurs au niveau cellulaire, biochimique et physiologique. ECOBIM 2011. Institut Maurice-Lamontagne, Mont-Joli, Québec, 6-9 juin 2011

C. Galland, **C. Dupuy**, C. Capitaine, I. Calves, M. Auffret, L. Quiniou, J. Laroche, V. Pichereau. 2011. Proteomic analysis of the European flounder *Platichthys flesus* response to PAH/PCB contamination. SETAC Europe Annual meeting, Milan, Italy, 15-19 May 2011

Autres

C. Dupuy, C. Galland, E. Lavergne, L. Quiniou, stand de vulgarisation sur « les poissons stressés », village des sciences, Fête maritime internationale - Les Tonnerres de Brest 2012, 13-14 juillet 2012

C. Galland., **C. Dupuy**, M. Auffret, L. Quiniou, J. Laroche, V. Pichereau 2011 Réponses des organismes aux contraintes environnementales : adaptation et acclimatation. L'exemple du flet européen en milieu estuarien. Forum des doctorants de l'association Merscidoc. Brest, 10 février 2011

Chapitre 1 :

Introduction générale

1 INTRODUCTION

Le milieu aquatique est un vecteur majeur pour la dispersion des polluants au niveau planétaire. La quantité et la diversité des xénobiotiques présents dans les eaux n'ont cessé d'augmenter ces dernières décennies. La convention de Stockholm, signée en mai 2001, a été ratifiée par plus de 150 pays à ce jour, montrant ainsi l'importance de prendre en compte cette pollution chimique et de la contrôler. Cette convention vise à interdire un certain nombre de polluants considérés comme particulièrement dangereux pour les écosystèmes et pour l'homme. La France et le Québec se sont également engagés dans des plans de gestion visant à surveiller la qualité des eaux et à protéger les écosystèmes aquatiques, en France à travers la directive cadre sur l'eau (directive 2000/60/CE), et au Québec avec une politique nationale de l'eau.

Le dosage des polluants dans les eaux ou organismes, l'utilisation d'espèces sentinelles et de biomarqueurs sont autant de méthodes permettant d'évaluer l'état des milieux aquatiques. Le suivi en tandem espèce sentinelle-biomarqueurs conduit à une vision intégrée, sur une période pouvant être longue, de l'impact du stress chimique sur les écosystèmes.

Cette étude a pour objectifs d'évaluer à différentes échelles d'organisation biologique (moléculaire, cellulaire, individuelle et populationnelle), l'impact de la pollution sur deux poissons estuariens, le flet (*Platichthys flesus*) en France et le poulamon (*Microgadus tomcod*) au Québec. Une expérience de contamination a été réalisée en laboratoire sur le flet afin de mettre en évidence des marqueurs sensibles à une contamination aux PCBs (Polychlorobiphényles) et HAPs (Hydrocarbures aromatiques polycycliques). L'utilisation de ces marqueurs sur des populations naturelles de flet et de poulamon en milieux estuariens nous ont permis d'évaluer, au final, dans quelles mesures ces marqueurs peuvent être considérés comme des outils pertinents pour évaluer la qualité des eaux côtières. De plus, ce suivi de différents biomarqueurs sur deux espèces inféodées aux estuaires en France et au Québec, doit nous permettre de mieux comprendre dans quelle mesure les réponses biologiques obtenues sont convergentes, ou au contraire contrastées, par l'espèce et/ou les lieux de vie.

2 LES PERTURBATIONS EN MILIEUX COTIERS

2.1 Les perturbations anthropiques

Le milieu marin est aujourd'hui un milieu particulièrement impacté par l'homme à travers des perturbations biologiques, physiques ou encore chimiques.

Les **modifications biologiques** sont souvent la conséquence de la surpêche ou de l'arrivée d'une espèce invasive qui entraînent une modification du réseau trophique perturbant ainsi tout le fonctionnement d'un écosystème (Coleman et Williams, 2002). Les constructions humaines le long du littoral peuvent perturber de manière **physique** l'environnement en détruisant partiellement ou totalement les habitats des espèces, comme les zones de nurseries côtières ou encore les frayères de certains poissons (Travis, 2003). Le bruit des bateaux est également considéré comme un changement physique qui pourrait avoir un impact notamment sur le comportement de certains mammifères marins (Nowacek *et al.*, 2007). Enfin, le milieu marin est un environnement très sensible à la pollution **chimique**. Cette pollution est non seulement dangereuse pour le milieu marin mais également pour l'homme. Qu'il s'agisse d'une pollution accidentelle comme une marée noire, ou d'une pollution chronique, la présence de toxiques dans l'eau peut avoir un impact direct sur la santé humaine (Corsolini *et al.*, 2005). Les zones potentiellement exposées aux stress chimiques doivent donc être particulièrement suivies par l'analyse systématique des teneurs en contaminants dans les eaux, les sédiments et les organismes. Quand les risques de contamination sont connus, des mesures peuvent alors être prises comme l'interdiction de la pêche de certains poissons du Rhône en 2007, liée à la forte teneur en polychlorobiphényles (PCBs) dans leurs tissus (Bodiguel, 2008).

2.2 Les principaux polluants

Aujourd'hui les **xénobiotiques** présents dans l'environnement marin sont très nombreux (métaux, pesticides, PCBs, hydrocarbures polycycliques, médicaments,...) et les sources de ces pollutions sont elles aussi diverses (rejets domestiques, rejets d'usine, déversements liés au transport maritime...). Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons aux polluants majeurs présents dans les sites que nous allons étudier : les métaux, les pesticides, les hydrocarbures polycycliques (HAPs) et les PCBs.

2.2.1 Les métaux

Historiquement, les mines, exploitées ou non, conduisent souvent à des rejets de cuivre, d'étain, de plomb, d'argent ou encore de mercure qui aboutissent dans les eaux fluviales par le ruissellement. Les rejets métalliques des usines métallurgiques telles que les alumineries, sont également une source de contamination importante, de même que les eaux de ruissellement sur les toitures et les routes, ou tout simplement l'érosion des sols. Des suivis de teneurs en métaux réalisés sur plus de 10 ans montrent parfois une diminution des concentrations détectées dans les eaux de certaines rivières (Dobson, 2000; Harmens *et al.*, 2007, 2008) et dans les tissus des poissons (Maes, Belpaire et Goemans, 2008; Polak-Juszczak, 2009). Néanmoins, Maes et al (2008) montrent également que si la teneur en plomb diminue dans la chair d'anguilles capturées en Belgique de 1994 à 2005, la concentration en mercure et en cadmium reste stable. Le problème majeur des métaux est qu'ils ne sont pas biodégradables et qu'ils peuvent donc se stabiliser dans les sédiments, en rivière comme en estuaire. Ils peuvent être ingérés par les organismes, plus ou moins éliminés ou concentrés dans certains tissus. Les métaux peuvent ainsi être bioaccumulés tout au long des réseaux trophiques et atteindre des niveaux toxiques pour les espèces situées au sommet de la chaîne alimentaire, tels que les poissons (Zhou *et al.*, 2008).

La présence de métaux dans l'environnement peut donc, à certaines doses, devenir dangereuse pour les organismes vivant dans les milieux côtiers et pour l'homme situé en fin de chaîne alimentaire. Il a été montré, par exemple, que des niveaux élevés de métaux pouvaient perturber le mécanisme de phagocytose chez les cellules immunitaires de bivalves (Maes, Belpaire et Goemans, 2008; Sauvé *et al.*, 2002). La catastrophe de Minamata est devenue un cas d'école, démontrant à quel point les métaux lourds peuvent être extrêmement toxiques (Ekino *et al.*, 2007); les effluents du méthyl-mercure rejetés par une usine ayant conduit à une accumulation de mercure dans le réseau trophique provoquant la mort de plus de 800 personnes et handicapant des milliers d'autres (paralysie, déficience neuronale).

2.2.2 Les pesticides

Les pesticides sont de par leur fonction première des biocides, c'est-à-dire des molécules utilisées pour détruire différents types d'organismes (ravageurs, compétiteurs ou pathogènes) considérés comme nuisibles par les agriculteurs. Néanmoins, une partie de ces toxiques est dispersée dans l'atmosphère ou bien lessivée par les eaux de pluie et va alors se

retrouver dans les eaux souterraines ou fluviales (Belfroid *et al.*, 1998). Les insecticides, les fongicides et les herbicides sont les 3 catégories regroupant ces composés phytosanitaires.

Il a été montré que certains pesticides pouvaient perturber le système immunitaire de la truite arc-en-ciel (Shelley *et al.*, 2009). Ces composés ont des effets immunosuppresseurs sur les poissons, diminuant ainsi leur capacité à se défendre face à une maladie (Dunier et Siwicki, 1993). Ils peuvent aussi être à l'origine de malformations chez les fœtus d'amphibiens (LeBlanc et Bain, 1997). Akcha *et al.* (2012) ont observé que le diuron (un herbicide) pouvait avoir un effet génotoxique sur les spermatozoïdes d'huîtres, perturber leur développement embryo-larvaire, et affecter le taux de recrutement des huîtres en milieu naturel. Les pesticides peuvent avoir un impact sur de nombreuses fonctions biologiques chez les poissons : modulation du système immunitaire, du métabolisme des méthionines et des lipides, du métabolisme énergétique (Dunier et Siwicki, 1993; Evrard *et al.*, 2010b; Marchand *et al.*, 2006). Par exemple, des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) soumises à une contamination de 28 jours avec un herbicide (pendimethalin ou Prowl 400) présentent une diminution de l'activité de phagocytose et du système du complément, deux éléments essentiels du système immunitaire ; cette contamination conduit à une augmentation de la sensibilité des poissons aux infections virales (Danion *et al.*, 2012b). Pour l'homme, certains pesticides tel que le dichlorodiphényl-trichloroéthane, couramment appelé DDT, sont considérés comme cancérogènes par l'Agence International de Recherche sur le Cancer (IARC).

2.2.3 Les Polychlorobiphényles

Les Polychlorobiphényles (PCBs), appelés au Québec Biphényles polychlorés (BPCs), sont des composés aromatiques organochlorés utilisés depuis des décennies pour leur stabilité technique et chimique ; ce qui en fait de bons isolants, notamment utilisés dans l'industrie par exemple pour la fabrication de transformateurs électriques. Ils sont aussi présents dans la composition de nombreux vernis et peintures. C'est une famille qui comprend 209 congénères regroupés en 2 classes selon leur mode d'action. Les PCBs de type dioxine, ou dioxine-like (PCB-DL), agissent de manière similaire aux dioxines en se fixant au récepteur Ah (Aryl-hydrocarbène) tandis que les PCBs non dioxine-like (PCB-NDL) n'ont pas d'affinité avec ce récepteur Ah (Giesy et Kannan, 1998). Sept des 209 congénères identifiés représentent près de 50% de l'ensemble des PCBs retrouvés dans les aliments d'origine animale. Ces 7 PCBs qui regroupent 6 PCB-NDL (PCB 28, 52, 101, 138, 153 et 180) et un

PCB-DL (PCB 118) sont considérés comme des PCBs indicateurs (PCBi). Ce sont ces PCBi qui sont dosés pour s'assurer du niveau de contamination d'un produit. Les effets toxiques des PCBs ont conduit à leur interdiction dans de nombreux pays depuis une vingtaine d'années ; par conséquent leur concentration dans le milieu marin est en diminution. Néanmoins les PCBs ne sont pas pour la plupart biotransformables, ils vont donc en partie s'accumuler dans les tissus adipeux des organismes et sont alors bioamplifiés le long des réseaux trophiques (Ross, 2004).

Il a été montré qu'à fortes doses les PCBs pouvaient causer des tumeurs chez le rat. Suite à ces résultats les PCBs ont été classés comme potentiellement cancérogènes pour l'homme par l'EPA (US Environmental Protection Agency, 1988). Du fait de leur position au sommet de la chaîne trophique, les poissons accumulent de grandes quantités de PCBs ce qui peut avoir des impacts sur leur système immunitaire, entraîner des lésions hépatiques et perturber leur condition physiologique (Khan, 2003). Des études réalisées sur des personnes consommant du poisson contenant des PCBs ont montré que la quantité de PCBs dans leur sang était corrélée avec la quantité de PCBs dans les poissons ingérés, et apparemment dépourvue de liens avec l'état de santé des consommateurs (Flynn, 1997). Par ailleurs, il semblerait qu'une exposition prénatale répétée à des PCBs puisse avoir un effet neurologique sur les fœtus (Jacobson et Jacobson, 1996), entraînant par la suite chez les enfants des retards d'apprentissage et des problèmes de mémoire (Schantz *et al.*, 2001).

2.2.4 Les Hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les HAPs détectés dans l'environnement sont la conséquence de la combustion incomplète d'hydrocarbures ou de produits dérivés de ces hydrocarbures (issus d'incinérateurs, de moteurs d'automobiles, de feux de cheminée,...). Ils sont présents sous des centaines de formes différentes et largement répandus sur l'ensemble de la planète. Seize HAPs sont considérés comme polluants prioritaires par l'EPA (US Environmental Protection Agency) et sont le plus souvent mesurés pour évaluer l'état d'un environnement. Comme la plupart des PCBs, les HAPs sont hydrophobes et ont donc tendance à s'associer à la matière particulaire présente dans les eaux. Associés à ces particules, les HAPs vont alors sédimenter ou rentrer dans les réseaux trophiques. Mais contrairement aux xénobiotiques précédents, les HAPs peuvent être métabolisés par de nombreux organismes. Les métabolites alors produits sont souvent plus toxiques en eux-mêmes que les HAPs mères dont ils sont issus (Salas et Burchiel, 1998).

L'un des HAPs les plus toxiques est le Benzo(a)pyrène (B(a)P) qui est reconnu comme cancérigène par l'IARC. La toxicité du B(a)P est en partie directement liée à l'un de ses métabolites, le Benzo(a)Pyrène-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde (BPDE), qui, une fois présent dans les cellules peut entraîner des mutations pouvant conduire à long terme au développement de cancers (Salas et Burchiel, 1998). De manière plus générale, il a été montré que la présence de HAPs dans l'environnement marin pouvait entraîner des lésions hépatiques, des problèmes de reproduction et de croissance chez le carlottin anglais, *Parophrys vetulus*, (Johnson *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 1998) ou encore diminuer la capacité de saumon quinnat, *Oncorhynchus tshawytscha*, à résister à un virus (Arkoosh *et al.*, 2001a). La contamination par les HAPs entraîne chez les poissons une perturbation de différentes fonctions immunitaires telle que l'activité du lysozyme, les capacités de phagocytoses, la régulation de l'apoptose ou encore la prolifération cellulaire (Reynaud et Deschaux, 2006). Par exemple, Danion *et al.* (2011a) observe chez des bars commun (*Dicentrarchus labrax* L.) une diminution du nombre de lymphocytes, une augmentation de la mortalité des leucocytes et une diminution des capacités de phagocytose après 21 jours de contamination aux hydrocarbures.

2.2.5 Que sont les POPs ?

Aujourd'hui, quand on aborde la question des polluants en milieu marin, l'abréviation POPs revient assez régulièrement. Selon la convention de Stockholm les POPs, pour « Polluants Organiques Persistants », sont des polluants organiques qui se dégradent « lentement », sont bioaccumulés dans les organismes et le long des réseaux trophiques, sont toxiques et peuvent se répandre sur de grandes distances (www.pops.int). La convention de Stockholm ratifiée en 2004 vise à interdire et restreindre l'utilisation de ces composés dans le monde. A l'origine les POPs sont définis par la convention de Stockholm au nombre de 12 : neuf pesticides (DDT, aldrine, chlordane, dieldrine, endrine, heptachlore, mirex, toxaphène, et hexachlorobenzène), tous les PCBs et deux sous-produits indésirables de la combustion et des processus industriels (les dioxines et les furanes). En mai 2009, lors de la conférence des parties (COP4), neuf POPs sont ajoutés (United Nations Environment Program, 2009): deux pesticides (le chlordécone et les hexachlorocyclohexanes y compris le lindane) et sept produits chimiques industriels : hexabromobiphényle, pentachlorobenzène, tétrabromodiphényléther, pentabromodiphényléther, hexabromodiphényléther, heptabromodiphényléther et les sulfonates de perfluorooctane et leurs dérivés. Enfin, en mai 2011 lors de la conférence

des Parties, un nouvel amendement est adopté pour ajouter à la liste l'endosulfan et ses isoformes associées (United Nations Environment Program, 2011). Les POPs regroupent les substances considérées comme les plus préoccupantes pour l'environnement et la santé humaine du fait de leur forte toxicité et de leur persistance dans les milieux naturels. Notons que les HAPs n'en font pas partie, car ils ne sont pas bioaccumulés dans les organismes mais biotransformés et par conséquent non considérés comme persistants.

2.2.6 Autres polluants

De nombreux autres polluants, non abordés lors de ce travail de thèse, sont présents dans les eaux telles que les **PBDEs** (polybromodiphényléthers) ou **EDPBs** (éthers diphéniques polybromés). Il s'agit de composés utilisés dans la fabrication de nombreux produits de consommation (pièce automobile, mousse d'ameublement, plastique...) pour leur propriété ignifuge. Certains de ces produits étant particulièrement toxiques, leur production est interdite dans de nombreux pays dont la France et le Canada. Les PBDEs sont peu solubles dans les eaux et liposolubles, ils sont donc facilement bioaccumulables et bioamplifiés le long du réseau trophique. Du fait de leur forme chimique très proche d'une hormone thyroïdienne, ces xénobiotiques peuvent interférer avec le système endocrinien et entraîner des perturbations dans la reproduction, des malformations et des cancers (Hale *et al.*, 2003; Kester *et al.*, 2002).

De plus en plus de **composés pharmaceutiques** sont également retrouvés dans les eaux telles que des anti-inflammatoires, des antibiotiques ou encore des composés hormonaux (Christen *et al.*, 2010). Ces composés sont fabriqués afin d'avoir un effet spécifique sur les humains ou les animaux; par conséquent, leur présence dans les milieux aquatiques, pourrait se traduire par des effets similaires sur les organismes marins, et donc perturber leurs fonctions immunitaires ou hormonales (Christen *et al.*, 2010). Ainsi les œstrogènes peuvent conduire à des altérations sévères des fonctions endocrines et du système immunitaire des poissons (Cabas *et al.*, 2012; Wenger *et al.*, 2011).

Les **nanoparticules** forment un groupe de substances émergentes de plus en plus étudiées pour leur éventuel effet toxique (Moore, 2006). Ces xénobiotiques sont le plus souvent définis comme des particules de taille inférieure à 100 nanomètres de diamètre. Les nanoparticules peuvent être d'origine naturelle, voire produites de manière non intentionnelle lors de processus industriels (ingénierie pétrolière, processus métallurgiques) ou créées de manières spécifiques (Bruneau, 2011). Ces dernières particules, appelées points quantiques

(quantum dots) sont synthétisées afin d'être utilisées en médecine pour des techniques d'imagerie médicale ou encore en ingénierie et informatique. Du fait de leur faible taille et de la grande diversité de type de nanoparticules existantes, elles sont difficilement quantifiables dans les milieux naturels. Des expériences réalisées *in vitro* montrent une diminution de la viabilité cellulaire en présence de points quantiques (Derfus, Chan et Bhatia, 2004). Bruneau (2011) a observé que des cellules immunitaires de Truite arc-en-ciel, *Onchorynchus mykiss*, exposées à des nanoparticules d'argents présentaient une diminution de viabilité, une augmentation de leur capacité de phagocytose et une diminution de la transformation lymphoblastique.

A tous ces composés d'origine majoritairement anthropique peuvent s'ajouter des toxiques produits par des **cyanobactéries**. Les cyanobactéries sont des procaryotes que l'on peut trouver dans les lacs et rivières qui sécrètent différents types de toxines (neurotoxines alcaloïdes, endotoxines lipopolysaccharide, cytotoxines et hépatotoxines). Ces toxines peuvent causer chez l'homme des problèmes gastriques, de l'asthme, des conjonctivites et des réactions allergiques cutanées (Hunter, 1998). Chez les poissons, les toxines de cyanobactéries peuvent avoir des effets allant d'une augmentation du stress oxydatif au niveau cellulaire (Jos *et al.*, 2005), jusqu'à une perturbation du comportement natatoire (Baganz, Staaks et Steinberg, 1998).

Il apparaît donc que les milieux aquatiques sont soumis fréquemment à de multiples contaminations (métaux, HAP, PCB, pesticides...) ainsi qu'à divers pressions anthropiques comme la destruction de certains habitats et la surpêche. A ces perturbations s'ajoute de pressions qui ne sont pas directement liées aux actions anthropiques, mais indirectement comme le réchauffement climatique, l'acidification des eaux, l'hypoxie en tant que conséquence de l'eutrophisation...

3 MODELES ET SITES D'ETUDES

3.1 Les nourriceries côtières

Les **estuaires** sont parmi les systèmes les plus productifs du monde; ils sont également les réceptacles de multiples activités humaines (domestiques, industrielles, agricoles) et donc caractérisés par des cocktails polluants complexes. Les facteurs environnementaux

(profondeur de la colonne d'eau, intensité des courants de marée, débit, salinité, température, concentration en oxygène dissout, charge en nutriments) et biologiques (traits de vie et activités métaboliques des organismes) caractérisant ces environnements estuariens, peuvent influencer la qualité chimique des eaux et des sédiments (Cotano et Villate, 2006).

Or les estuaires et les zones côtières sont généralement considérés comme des **nourriceries** essentielles pour de nombreuses espèces de poissons marin (Cabral *et al.*, 2007; Lazzari et Stone, 2006); *i.e.* des sites où de fortes densités de juvéniles sont rencontrées et expliquées par la présence de conditions trophiques favorables à la croissance et l'existence de refuges vis à vis de la prédation (Pihl *et al.*, 2002). Dans ce travail, nous nous sommes intéressés particulièrement au flet (*P. flesus*) et au poulamon (*M. tomcod*) qui sont des espèces inféodées à ces nourriceries côtières.

En considérant la complexité des cocktails polluants en milieux estuariens, il est délicat de vouloir estimer la qualité des eaux de ces systèmes par le seul **dosage chimique** de quelques molécules polluantes considérées comme toxiques, dans les eaux ou organismes. En effet, la multiplicité des polluants présents à des concentrations individuelles considérées comme non toxiques, peut se traduire par des effets toxiques synergiques et peut donc impacter sérieusement le fonctionnement de l'écosystème. De plus, les mesures chimiques dans l'eau donnent une image à un instant t de l'état de l'environnement, et ne tiennent donc pas compte d'éventuelles variations temporelles fortes dans les teneurs en polluants, ni de l'effet potentiel de la bioaccumulation sur les organismes (Amiard et Amiard-Triquet, 2008). Enfin, il faut noter que l'on ne peut détecter dans l'environnement que ce que l'on y recherche par chimie analytique et que les molécules effectivement détectées ne constituent généralement qu'une infime partie des multiples polluants présents dans les milieux naturels. Afin de développer une vision intégrée sur une période assez longue de l'impact du stress chimique sur les écosystèmes, l'utilisation d'espèces sentinelles et de biomarqueurs semble donc nécessaire, en complément des analyses chimiques.

3.2 Notion d'espèce sentinelle

Une espèce sentinelle est une espèce qui permet de déclencher une alerte quand une situation présente un risque pour l'environnement ou pour la santé humaine. Elle peut se définir comme « un organisme dont les changements de caractéristiques connues peuvent être mesurés afin d'évaluer l'ampleur d'une contamination environnementale et ses implications

pour la santé humaine et ainsi prévenir tôt ses implications » (O'Brien, Kaneene et Poppenga, 1993).

Les critères sont nombreux pour définir une espèce sentinelle et font l'objet de nombreux débats. L'espèce doit pouvoir être facilement capturée, avoir une taille permettant de multiples analyses et doit présenter une aire de répartition connue et assez étendue (Bélanger, 2009). Elle ne doit pas être une espèce migratrice mais au contraire vivre dans une zone limitée, au moins durant une partie de son cycle biologique, ceci pour refléter l'état d'une zone naturelle précise. Afin de prendre en compte les effets de la bioaccumulation, l'espèce doit être située assez haut dans la chaîne alimentaire et être considérée comme aussi sensible que l'homme face à une contamination chimique (Bélanger, 2009; Fouqueray, 2008; Lower et Kendall, 1990; O'Brien, Kaneene et Poppenga, 1993). Les poissons de hauts niveaux trophiques sont ainsi souvent considérés comme de bonnes espèces candidates en écotoxicologie, particulièrement celles présentant des migrations limitées durant leur phase de vie juvénile ou tout au long de leur vie (Berthet, 2008).

3.3 Le flet, *Platichthys flesus*

Le flet, *P. flesus* (Figure 1 - droite), de la famille des pleuronectidés est un poisson plat euryhalin vivant préférentiellement sur les fonds sablo-vaseux et vaseux des zones estuariennes et côtières (Dénier, 1981). Il est largement réparti le long des côtes de l'Atlantique Occidental, de la Mer Blanche jusqu'au Sud du Portugal et dans quelques zones de la Méditerranée et de la Mer Noire (Figure 2 ; Borsa et al. (1997)).

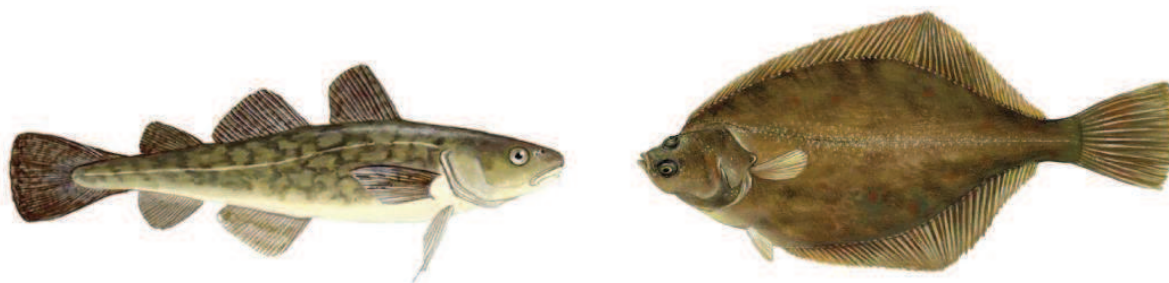


Figure 1 : poulamon, *M. tomcod* (à gauche) ; flet, *P. flesus* (à droite)

Le flet est un poisson catadrome, vivant la majeure partie de l'année dans les zones estuariennes et les fleuves, il va rejoindre l'océan à l'âge adulte pour se reproduire (Figure 3 : Cycle de vie du flet, *P. flesus* (Evrard, 2009)). Le long des côtes françaises la reproduction a lieu au cours de l'hiver (janvier à mars). Les œufs pondus sont pélagiques; après 7 jours, les larves éclosent et présentent une symétrie bilatérale. Elles vont alors dériver passivement dans les masses d'eau dans un premier temps, puis se rapprocher ensuite plus activement vers les zones de dessalure. Les larves subissent ensuite une métamorphose en juvéniles ; ces derniers présentent les caractéristiques des poissons plats benthiques et vont alors se diriger très activement vers les estuaires qui sont pour eux des aires naturelles de nourricerie. Le recrutement des juvéniles dans ces nourriceries a lieu au mois de mai alors qu'ils mesurent entre 15 et 30mm. Les nourriceries, zones de grandes importances écologiques, sont des sites qui présentent de grandes abondances en juvéniles de poissons qui y trouvent des conditions favorables à leur croissance, une grande disponibilité de proies et un refuge vis à vis des prédateurs (Beck *et al.*, 2001; Martinho *et al.*, 2007). Les flets vont rester de 2 à 3 ans dans les estuaires jusqu'à atteindre une taille entre 110 et 250mm lors du second automne, présentant ainsi une grande variabilité inter-individuelle dans leur taux de croissance (Masson, 1987). Au cours de l'hiver, les flets devenus sexuellement matures iront rejoindre les adultes pour se reproduire à l'embouchure des fleuves ou en mer, et donner ainsi naissance à la génération suivante.

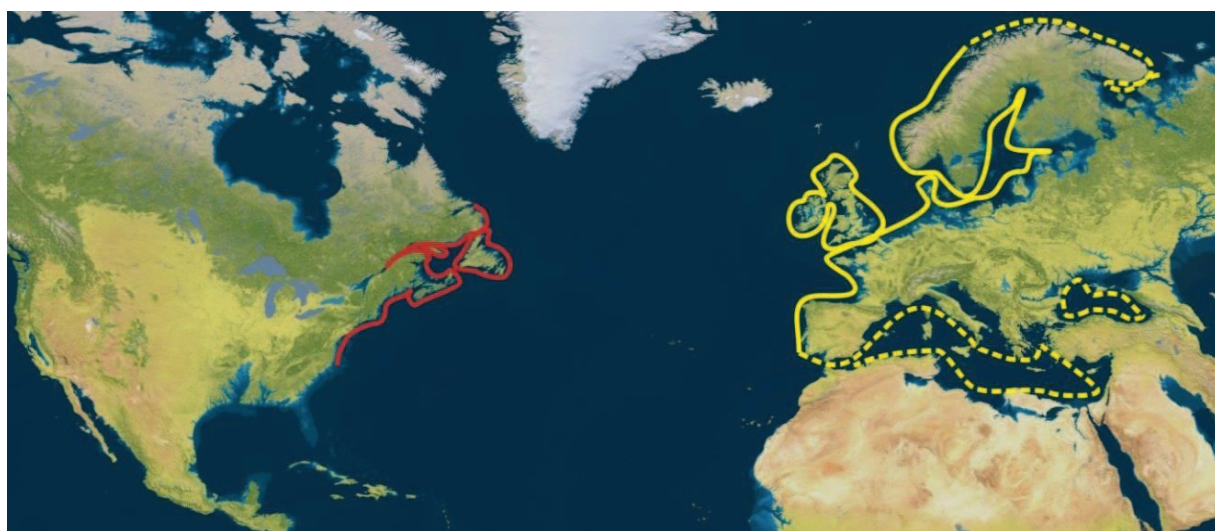


Figure 2 : aire de répartition du Flet, *P. flesus* (en jaune) et du poulamon, *M. tomcod* (en rouge)

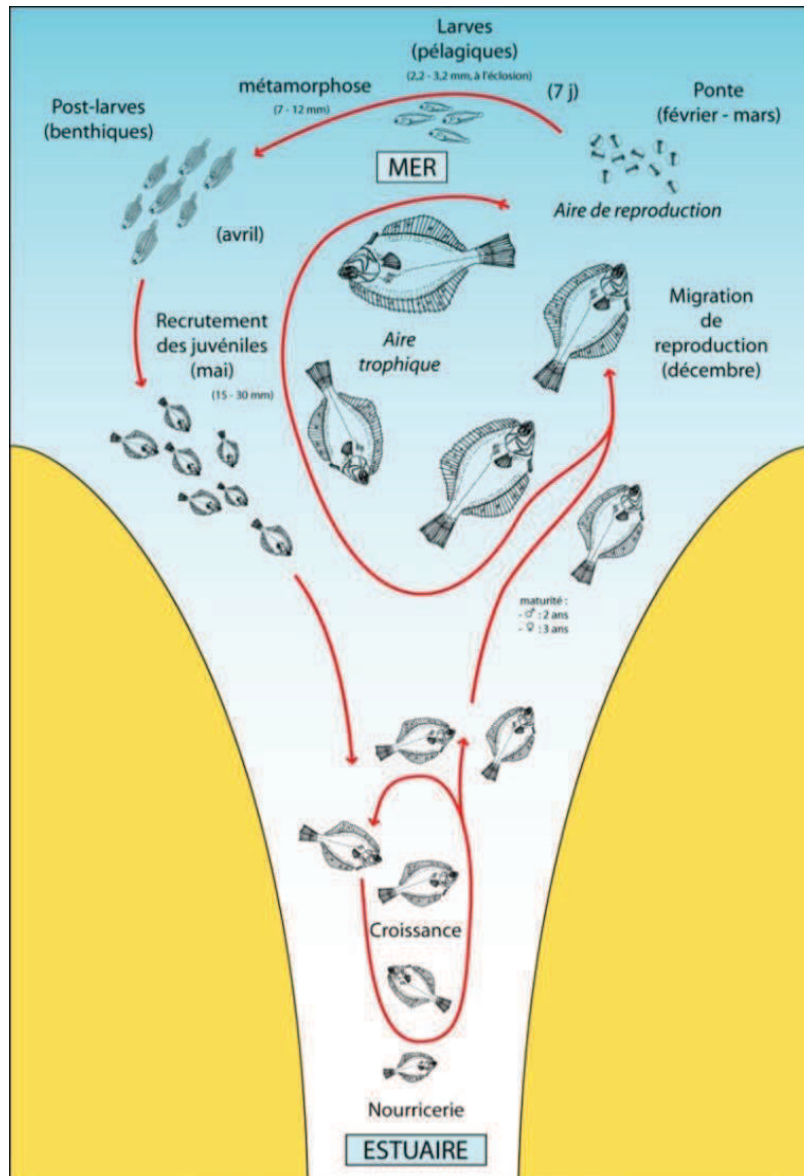


Figure 3 : Cycle de vie du flet, *P. flesus* (Evrard, 2009)

3.4 Le poulamon, *Microgadus tomcod*

Le poulamon (Figure 1Figure 2 – gauche) est un gadidé (famille des morues). C'est un poisson anadrome qui, à l'âge adulte, vit dans les eaux saumâtres ou plus salées des zones estuariennes à de faibles profondeurs. Il va migrer en eau douce en hiver (entre le mois de décembre et février) pour se reproduire. Cette migration est bien connue au Québec essentiellement près de Sainte-Anne de la Pérade, où le "petit poisson de chenaux" (nom local) fait l'objet d'une pêche sous la glace. Le poulamon est en réalité présent de la côte Sud du Labrador (Canada) jusqu'en Virginie (USA) (Figure 2 ; Dunbar (1970)), mais à ce jour, seule sa migration dans la rivière Sainte-Anne (Fortin *et al.*, 1990) et dans le fleuve Hudson

(Dew et Hecht, 1994) est bien documentée. Au Québec, les œufs éclosent au printemps et les larves vont dériver vers la partie estuarienne de l'hydrosystème (Figure 4). Les juvéniles colonisent alors les côtes du Saint Laurent et notamment les herbiers à zostères de mai à juillet, ils mesurent alors entre 50 et 100mm. Ces herbiers sont pour le poulamon des zones de nurseries (Lazzari et Stone, 2006). Les poissons vont y rester pendant deux ans, se déplaçant peu. Lors du second automne qu'ils vont passer dans l'herbier la plupart des poulamons vont devenir sexuellement matures, mesurant alors entre 200mm et 270mm. Devenus adultes, ils vont alors quitter le site pour rejoindre les sites de reproduction.

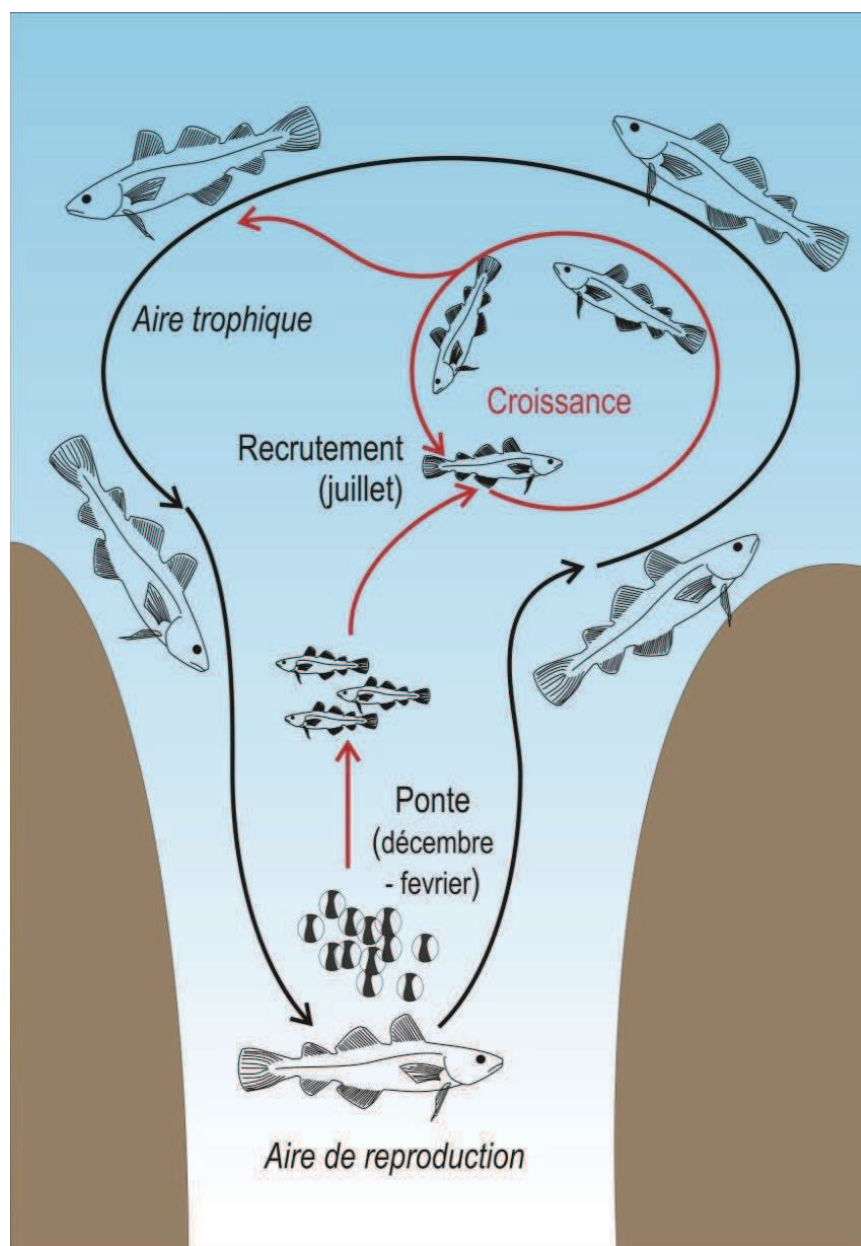


Figure 4 : Cycle de vie du poulamon, *M. tomcod*

Le flet et le poulamon présentent donc les caractéristiques nécessaires pour être des espèces sentinelles. Ce sont des poissons qui sont, au stade juvénile, peu mobiles, liés à leur zone de nourricerie, ils reflètent donc l'état de cet écosystème. De plus, ce sont des espèces benthique (flet) ou démersale (poulamon) en contact ou à proximité immédiate avec des sédiments potentiellement contaminés. Ces deux espèces sont placées suffisamment haut dans les réseaux trophiques pour bioaccumuler potentiellement les contaminants. Le flet, tout comme le poulamon, a fait l'objet de nombreuses études centrées sur les réponses du poisson au stress chimique. Le poulamon, présent dans le fleuve Hudson, a été très étudié pour mieux comprendre l'impact potentiel de fortes teneurs en PCBs et HAPs présents dans ce fleuve sur le fonctionnement et l'état de santé d'un poisson estuarien. Des études ont ainsi montré que les populations de l'Hudson présentaient des modifications dans l'expression du gène du cytochrome P4501A, ainsi que des lésions hépatiques sévères (Courtenay et al. 1999; Wirgin and Waldman 1998; Yuan et al. 2001). Des modifications dans l'expression du gène du cytochrome P4501A ont aussi été démontrées chez le flet face à une exposition au HAPs et PCBs (Besselink et al. 1998; Beyer et al. 1996). Par ailleurs, de nombreux travaux menés sur le flet ont mis en évidence un effet de la contamination chimique sur les réponses moléculaires et génétiques de ce poisson, ainsi que des altérations de ses traits d'histoire de vie (Evrard et al. 2010; Laroche et al. 2002; Marchand et al. 2010; Marchand et al. 2006; Marchand et al. 2003).

4 LES BIOMARQUEURS

Nous avons analysé dans ce travail la réponse du poisson au stress chimique, en considérant différents niveaux d'organisation biologique : moléculaire, biochimique, cellulaire et individuelle (Figure 5).

4.1 Biomarqueurs, définition

Un biomarqueur peut être défini comme « un changement biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental qui peut être mesuré dans des tissus ou des fluides corporels ou au niveau de l'organisme entier, et qui met en évidence l'exposition à (/ou les effets d') un ou plusieurs polluants chimiques » (Amiard et Amiard-Triquet, 2008). La distinction est généralement faite entre les biomarqueurs d'exposition, d'effet et de susceptibilité. Certains biomarqueurs sont dits "spécifiques" car ils répondent a priori préférentiellement à certains types de contaminants.

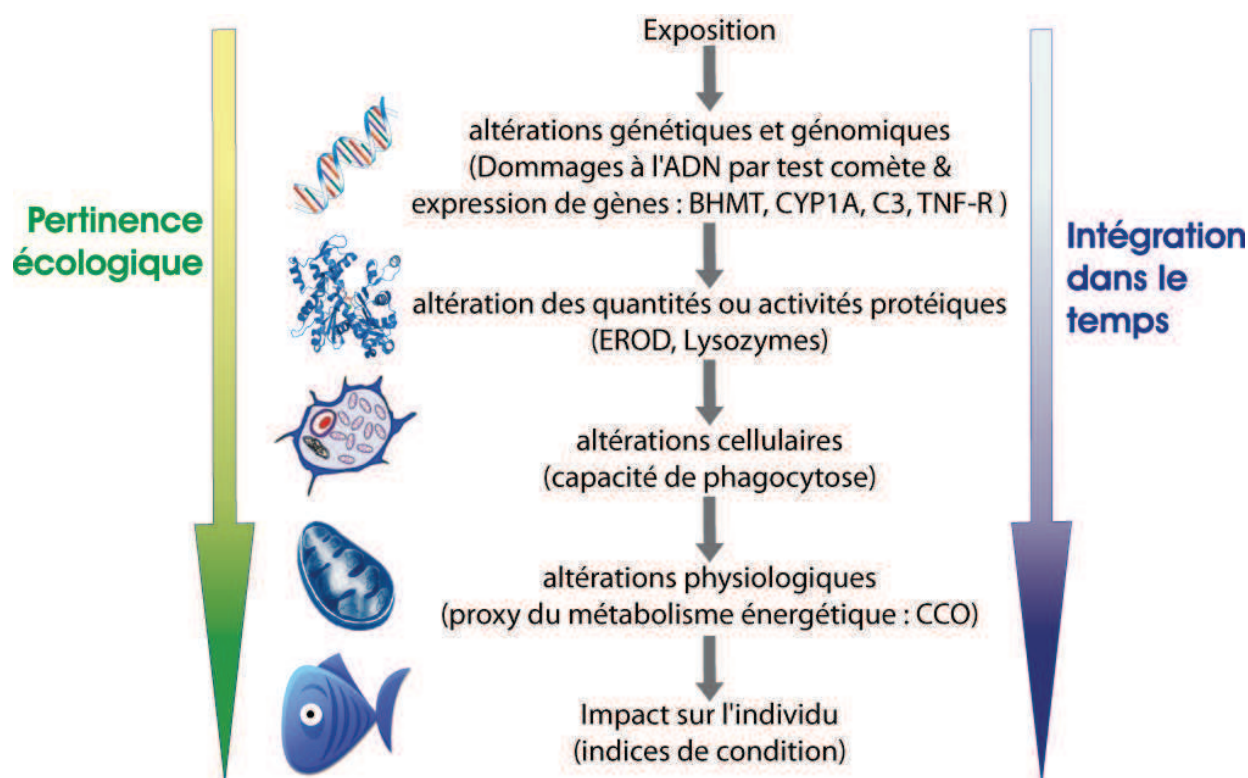


Figure 5 : Représentation schématique des réponses biologiques séquentielles à un stress. Les marqueurs utilisés dans ce projet sont indiqués entre parenthèse.

4.2 Dommages à l'ADN

En collaboration avec Alain Devaux et Sylvie Bony (INRA, Vaulx en Velin - UMR LEHNA, Université Claude Bernard Lyon I), le test des comètes a été réalisé sur les hématies de flets avec d'évaluer la génotoxicité des polluants. Le test des comètes permet d'évaluer les cassures simples et doubles brins de l'ADN. Les contaminants agissant sur l'intégrité de l'ADN peuvent être regroupés en 4 classes (Lee et Steinert, 2003) :

- Les contaminants agissant directement sur l'ADN
- Les contaminants donc les métabolites engendrent des dommages à l'ADN
- Les contaminants donc la présence peut entraîner la production d'espèce réactive de l'oxygène (ROS), ces derniers pouvant causer des dommages à l'ADN
- Les contaminants qui inhibent la synthèse et la réparation de l'ADN.

Le test des comètes peut donc être utilisé comme un indicateur de l'action génotoxique des contaminants. Plusieurs études ont démontré que les HAPs et que certains PCBs pouvaient produire un effet génotoxique (*e.g.* Costa *et al.*, 2008; Curtis *et al.*, 2011; Wessel *et al.*, 2010).

4.3 Réponses moléculaires, l'expression de gènes

Face à une contamination, un organisme peut modifier l'expression de ses gènes pour s'acclimater (au sens physiologique du terme) à cette nouvelle situation. Cette modification est souvent considérée comme une réponse précoce de l'organisme soumis à un stress chimique.

Parmi les différents gènes dont l'expression est modifiée lors d'une contamination, le cytochrome P450 1A (CYP1A) est l'un des plus étudié. Il intervient dans la transformation des xénobiotiques hydrophobes en métabolites hydrosolubles, participant ainsi au processus de biotransformation de certains polluants organiques toxiques tel que les HAPs (Sarasquete et Segner, 2000). De manière simplifiée, la présence de contaminants dans l'organisme déclenche des processus de détoxification et donc une augmentation de l'expression du gène CYP1A. Ce processus a été démontré chez de nombreuses espèces de poissons dont le flet (Evrard *et al.*, 2010a) et le poulamon (Wirgin and Waldman 1998).

L'un des objectifs de ce travail étant d'ajouter une approche immunotoxicologique aux précédentes études réalisées sur le flet, l'analyse de l'expression de gènes liés au système immunitaire a été privilégiée. Nous avons donc choisi d'étudier l'expression de 2 gènes impliqués dans le système immunitaire : le TNF-R, « Tumor Necrosis Factor Receptor» et le Complement C3 (leur rôle dans l'immunité sera décrite dans le paragraphe suivant : 4.3).

De plus, une analyse protéomique sans a priori (par électrophorèses en 2 dimensions) réalisée lors de l'expérience de contamination expérimentale de flets (Chapitre 1) a montré une augmentation de Betaine Homocysteine S-MethylTransferase (BHMT) en présence de HAPs et PCBs (voir Annexe 1). La BHMT est une protéine qui contribue à la régulation des niveaux d'homocystéines (Pajares et Pérez-Sala, 2006). Des études ont montré une régulation du gène de la BHMT en présence de contaminants chez les téléostéens (*e.g.* Lu *et al.*, 2012; Yum *et al.*, 2005). La BHMT pourrait intervenir dans les processus de détoxification de phase II (Marchand *et al.*, 2006). Des populations naturelles de flet vivant dans des environnements contrastés ont montré des différentiels d'expression du gène BHMT (Evrard *et al.*, 2012; Marchand *et al.*, 2006).

4.4 Système immunitaire

4.4.1 Le système immunitaire des poissons

Le système immunitaire est un ensemble de facteurs humoraux et cellulaires qui a pour fonction de maintenir l'homéostasie, de protéger l'organisme des parasites, infections et proliférations malignes. Il ne répond donc pas directement à la présence de polluants. Néanmoins, la présence de xénobiotiques peut affaiblir le système immunitaire d'un organisme, diminuant ainsi ses capacités de défense par exemple vis-à-vis des parasites (Dunier 1996; Dunier and Siwicki 1993). Le système immunitaire des poissons est assez proche de celui des vertébrés supérieurs (Zelikoff, 1998). Les poissons possèdent des mécanismes de défenses spécifiques et non spécifiques, tous deux incluant des réponses humorales et cellulaires.

La réponse non spécifique fait intervenir des cellules circulantes, les leucocytes, aussi appelés cellules blanches par opposition aux globules rouges. Les leucocytes sont classés en trois grandes familles : les lymphocytes, les granulocytes et les monocytes/macrophages. Les lymphocytes peuvent intervenir dans la réponse non spécifique de par leur activité cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales ou infectées par des organismes (Secombes,

1996), les deux autres populations cellulaires jouant quant à elles un rôle important dans l'inflammation et la phagocytose. Chez les poissons, ce sont les monocytes/macrophages qui participent le plus activement à la phagocytose permettant ainsi la destruction des corps étrangers (Kemenade *et al.*, 1994). A cette réponse à médiation cellulaire s'ajoute une réponse non spécifique à médiation humorale par l'intermédiaire de nombreuses enzymes et protéines tel que le lysozyme, les lectines ou encore le système du complément (Kollner *et al.* 2002).

La réponse immunitaire spécifique chez les poissons est assez proche de celle des vertébrés supérieurs. Le phénomène de rejet face à une greffe chez le bar commun, *Dicentrarchus labrax*, confirme l'existence d'une réponse à médiation cellulaire cytotoxique chez les poissons (Romano *et al.*, 2005). A cela s'ajoute une réponse de type humorale par la production d'anticorps. Les poissons possèdent ainsi, tout comme les vertébrés supérieurs, des cellules capables de reconnaître un antigène et de développer une réponse immunitaire spécifique. De plus, des protéines appelées cytokines sont présentes dans les milieux cellulaires et acellulaires afin de servir de messagers intercellulaires. Leur rôle est de contrôler, d'induire ou d'inhiber la réponse immunitaire (Secombes *et al.*, 2001).

De multiples marqueurs peuvent être utilisés pour analyser le fonctionnement du système immunitaire en présence de xénobiotiques : proportion des différents types cellulaires, de leucocytes, niveaux de protéines et enzymes détectés dans le plasma (cytokines, lysozyme ou encore lectines), capacité de phagocytose des cellules, niveau de production d'espèces réactives de l'oxygène, résistance face à un pathogène,...(Dunier and Siwicki 1993; Zelikoff 1998). En complément de l'analyse du C3 et du TNF-R par expression de gènes, nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement à l'impact de la pollution sur la réponse immunitaire non spécifique à médiation humorale, par l'analyse des lysozymes, et à médiation cellulaire, par l'étude de la phagocytose.

4.4.2 Le C3 et le TNF-R

Le système du complément, souvent appelé simplement complément, a un rôle important dans le système immunitaire inné et fait intervenir environ 35 protéines membranaires ou soluble (Holland et Lambris, 2002). Les fonctions du complément sont multiples : il participe à la lise des pathogènes, à la réaction inflammatoire, il peut stimuler la phagocytose ou encore participer à la modulation de la production d'anticorps (DeFranco, Robertson et Locksley, 2009). Trois voies d'activation du complément existe chez les

humains et ont été retrouvées chez les poissons : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines (Figure 6) (Holland et Lambris, 2002). La composante C3 du complément est la protéine centrale du système du complément puisque les 3 voies vont conduire à son activation (Qi *et al.*, 2011). Récemment des travaux sur des souris C3-déficiente suggèrent l'existence d'une 4^{ème} voie : la thrombine, une molécule impliquée dans la voie de coagulation, pourrait générer des C5a (Amara *et al.*, 2008; Huber-Lang *et al.*, 2006). Les poissons sont assez uniques dans le sens où pour une même espèce, plusieurs isoformes d'un même composant peuvent exister. Ainsi Sunyer *et al.* (1997) ont identifié chez la dorade royale (*Sparus aurata*) 5 isoformes du Complement C3.

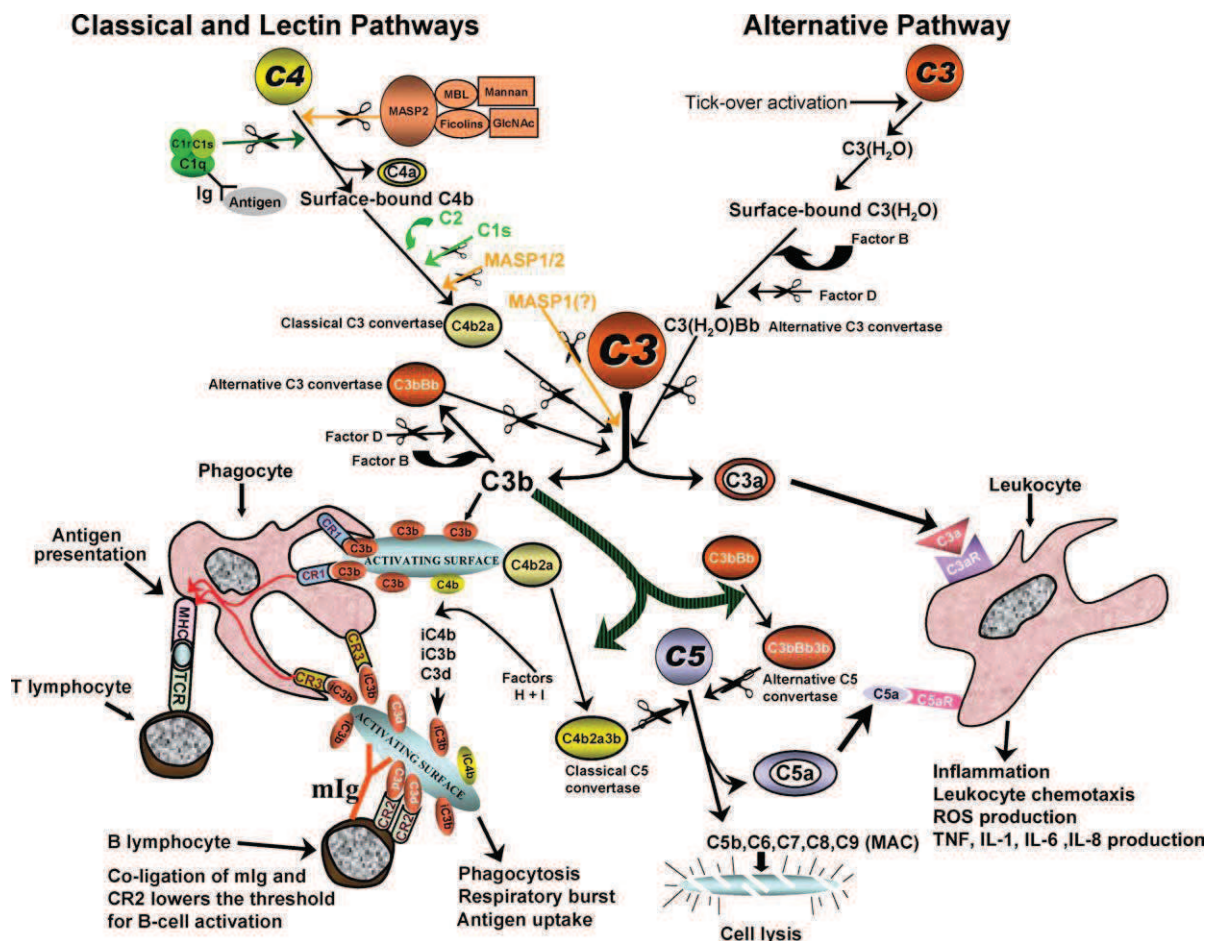


Figure 6 : Schéma des 3 voies d'activation du système du complément et fonctions impliquées (Boshra, Li et Sunyer, 2006)

Le TNF- α appartient à la famille des cytokines. Ces dernières sont des protéines produites par de nombreuses cellules immunitaires et qui ont pour rôle de contrôler : (1) l'intensité et la durée de la réponse immunitaire et (2) certains processus de différenciation et proliférations tissulaires (DeFranco, Robertson et Locksley, 2009). Le TNF doit son nom à

ses effets cytotoxiques sur les cellules tumorales. La séquence du TNF- α n'ayant pas encore été identifiée chez nos espèces modèles, nous avons choisis d'étudier l'expression du TNF-R qui est le récepteur membranaire du TNF (Smith, Farrah et Goodwin, 1994). Le TNF-R intervient dans la régulation de l'apoptose et de l'inflammation (Wiens et Glenney, 2011). La mesure de son expression permet indirectement d'évaluer la modulation du système du TNF. Si une modulation de l'expression du TNF- α n'est pas forcément associée à une modulation de l'expression de son récepteur, on peut tout de même supposer qu'une modulation du TNF-R suggère une modulation du système du TNF dans son ensemble.

Il a été démontré que, parmi les multiples éléments intervenant dans la réponse immunitaire, certains d'entre eux pouvaient être modulés par la présence de contaminants (Bols *et al.*, 2001a). Des bars communs, *Dicentrarchus labrax*, soumis à une contamination ponctuelle forte aux hydrocarbures ont montré une surexpression du TNF α mais pas de modulation de l'expression du C3 (Bado-Nilles, 2008). D'autres études ont montré sur la même espèce une modulation de la voie alterne du complément en présence de HAPs (Bado-Nilles *et al.*, 2009; Danion *et al.*, 2011b). L'expression du gène C3 semble elle aussi modulée par la présence de polluants. Par exemple Holth *et al.* (2010) observent une sur-expression du C3 chez la morue Atlantique, *Gadus morhua*, exposée à des eaux contenant des HAPs. L'expression de ces gènes pourrait donc devenir de bons marqueurs d'exposition à des HAPs. De plus, si les polluants peuvent agir sur le système immunitaire, à l'inverse le système immunitaire pourrait avoir un effet sur les phénomènes de détoxification (*e.g.* CYP1A). Reynauld *et al.* (2005) observent que l'injection de cytokines (TNF et interleukin 1) inhibe la réponse EROD chez des carpes, *Cyprinus carpio*, contaminées au HAPs. Ainsi la mesure de l'expression du TNF-R pourrait aider à comprendre le lien qui existe entre le système immunitaire et les phénomènes de détoxification.

4.4.3 Dosages du lysozyme

Le lysozyme est une enzyme présente notamment dans les lysosomes des neutrophiles et macrophages, libérée dans le sang. Il intervient dans la destruction des bactéries gram positif, avec un effet moindre sur les bactéries gram négatif, en s'attaquant au peptidoglycane présent dans la membrane de ces cellules (Skouras *et al.* 2003). Il va ainsi provoquer une lyse cellulaire. Des études ont montré que l'activité du lysozyme était sensible à la présence de contaminants dans l'environnement (Bols *et al.*, 2001a). Cette activité est stimulée chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, lors d'une contamination aux

métaux lourds tels que le cadmium et le zinc (Sanchez-Dardon et al. 1999), ainsi que pour *Paralichthys olivaceus* en présence de phénanthrène (Jee, Kim et Kang, 2004) ; à l'inverse une diminution de cette activité a été observée chez la carpe, *Cyprinus carpio*, face à une contamination aux pesticides (Dunier, 1996). Les mécanismes expliquant ces différences de réponses selon le type de contamination restent à définir.

4.4.4 Capacité de phagocytose

La phagocytose est l'un des mécanismes clef du système immunitaire. Elle se déroule en plusieurs étapes (Figure 7). Dans un premier temps le microorganisme est reconnu par les phagocytes par chimiotactisme ; une cellule immunitaire va alors y adhérer. Des pseudopodes vont ensuite englober totalement le corps étranger jusqu'à ce qu'il soit internalisé puis dégradé entraînant la formation d'espèces réactives de l'oxygène.

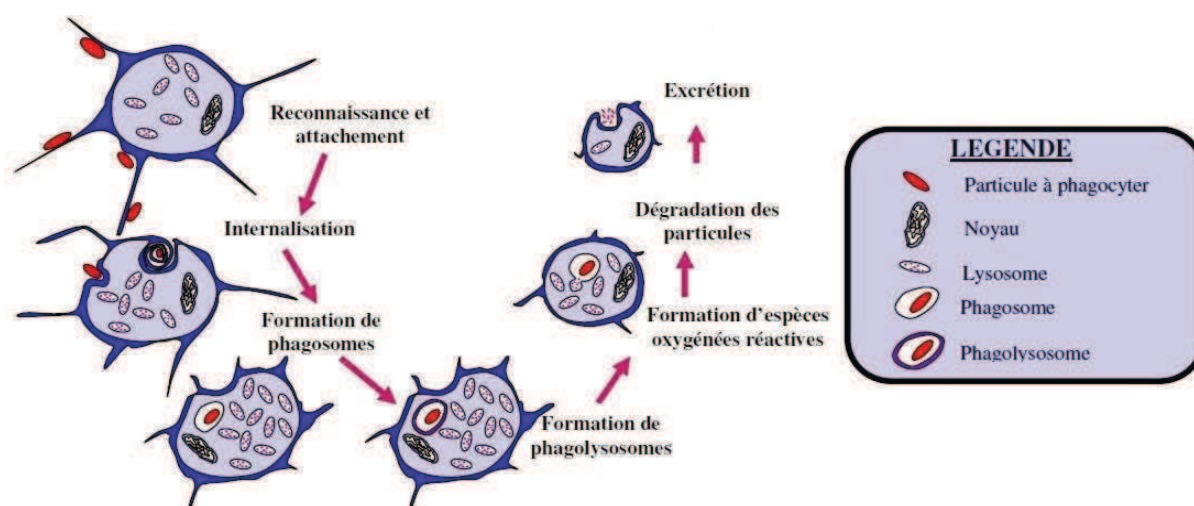


Figure 7 : les différentes étapes de la phagocytose (adapté de Bado-Nilles (2008))

Il a été démontré à de multiples reprises, qu'en présence de polluants, la capacité de phagocytose des macrophages pouvait être diminuée. Par exemple des plies canadiennes, *Hippoglossoides platessoides*, ont été mises en contact avec des sédiments contaminés, notamment aux PCBs, pendant 3 mois (Lacroix et al., 2001). Dès le premier mois il apparaît que les macrophages des poissons exposés ont des capacités de phagocytose plus faibles que ceux des poissons non exposés. De plus, les poissons ont ensuite été remis dans un milieu sain durant un mois. Après cette période de récupération, les mesures ont montré que, si les capacités de phagocytose des macrophages avaient augmenté, elles n'étaient pas encore

équivalentes à celles des poissons non exposés. A travers cette expérience, il apparaît que la présence de contaminants peut avoir un effet à long terme sur le système immunitaire, et peut donc perdurer après la fin de la contamination ; cette perturbation paraît être cependant réversible (Weeks *et al.*, 1986).

4.5 Mécanismes de détoxification

4.5.1 Ethoxyresorufin-O-deethylase, EROD

L'activité EROD est dépendante du cytochrome P450 (plus particulièrement du CYP1A cité précédemment) qui est un système protéique de la membrane cellulaire (Burgeot et Ménard, 2004). La mesure de l'activité EROD est un biomarqueur qui fait l'objet d'une norme ISO (ISO/TS 23893-2:2007). L'activité EROD est très souvent considérée comme un bon marqueur d'exposition aux contaminants, son induction ayant été démontrée chez plus de 150 espèces de poissons (Whyte et Jung, 2000).

Une augmentation d'activité EROD a été mise en évidence chez le flet en présence de différents contaminants organiques de types PCBs (Besselink *et al.* 1996) et HAPs (Kirby *et al.* 2007; Malmstrom *et al.* 2004), de même que pour le poulamon (Couillard *et al.*, 2005).

L'évaluation de l'activité EROD est complémentaire de la mesure de l'expression du gène CYP1A. Des mesures en parallèle d'activité EROD et d'expression du CYP1A n'ont pas mis en évidence de fortes corrélations entre ces 2 approches (George *et al.*, 2002; Kammann *et al.*, 2008); néanmoins, l'induction de ces deux biomarqueurs est globalement confirmée pour les HAPs et certains PCBs.

4.5.2 Métallothionéine

La métallothionéine (MT) est une protéine qui joue un rôle important dans la protection contre les effets toxiques des métaux lourds (George et Olsson, 1994). La liaison de MTs avec les métaux a pour fonction de séquestrer ces métaux et ainsi de protéger la cellule (Klaassen, Liu et Choudhuri, 1999). Des études ont ainsi montré que la concentration en MTs pouvait être augmentée en présence de cadmium, cuivre, zinc, mercure, cobalt, nickel ou encore argent (George et Olsson, 1994; Hagger *et al.*, 2006; van der Oost, Beyer et Vermeulen, 2003).

4.6 Métabolisme énergétique

Le taux d'activité métabolique d'un organisme, reflète la quantité d'énergie qu'il produit pour assurer ses fonctions vitales ; cette activité peut être considérée en tant que biomarqueur représentatif du statut physiologique d'un poisson (Plante *et al.*, 2005). En présence de xénobiotiques, de nombreux mécanismes physiologiques sont mis en place : pour maintenir l'homéostasie, pour la détoxification, la protection et/ou la réparation des cellules ; tous ces processus nécessitant de l'énergie. L'évaluation de cette production énergétique globale, permet donc d'estimer le coût du maintien des fonctions vitales et de la réponse au stress (Beyers *et al.*, 1999).

La respiration est une source de production d'énergie essentielle sous forme d'ATP, particulièrement pour les vertébrés. Elle peut donc être mesurée afin d'évaluer les besoins globaux d'un organisme en énergie. Des mesures de consommation en oxygène sur un animal entier (par respirométrie) ont montré une augmentation du taux d'activité métabolique des poissons en présence de contaminants (Beyers *et al.*, 1999). Néanmoins cette mesure doit être réalisée sur des poissons vivants, au repos, et présentant un estomac vide ; elle est donc difficilement mesurable dans les milieux naturels.

C'est pourquoi des indicateurs du métabolisme énergétique pourraient être utilisés comme biomarqueurs. La Cytochrome C Oxydase (CCO) est l'enzyme terminale de la chaîne respiratoire mitochondrial et est responsable de 90% de la consommation en oxygène des cellules chez les mammifères (Xu, Charles et Moncada, 2005). La mesure de l'activité de la CCO pourrait donc être un bon indicateur du métabolisme aérobie (Lapointe et Couture, 2010). Des études ont montré que la présence de polluants comme le nickel ou du pétrole dispersé pouvait être associée à une augmentation de l'activité de la CCO; ces expériences suggèrent donc que l'exposition à des xénobiotiques peut entraîner un coût physiologique conséquent (Cohen, Gagnon et Nugegoda, 2005; Lapointe et Couture, 2010)

4.7 Indices de condition

Tout comme le métabolisme énergétique, l'étude des indices de condition permet d'évaluer le statut physiologique général d'un individu. Les rapports gonadosomatique RGS (GSI "gonadosomatic index") et hépatosomatique RHS (HSI "hepatosomatic index") mettent en évidence respectivement l'importance des gonades et du foie relativement au poids de la carcasse d'un individu. Ils sont calculés par les formules suivantes (Kleinkauf et al. 2004):

$$\text{RGS} = \frac{\text{poids des gonades}}{\text{poids de la carcasse}} * 100$$

$$\text{RHS} = \frac{\text{poids du foie}}{\text{poids de la carcasse}} * 100$$

Le RGS reflète l'état de maturation sexuelle des poissons et varie donc de manière saisonnière avec le cycle de reproduction. Le foie joue un rôle important dans les processus de détoxification, aussi une augmentation du RHS peut être détectée lors d'une contamination forte aux PCBs ou dioxines (Grinwis et al. 2000; Grinwis et al. 2001). Néanmoins le RHS peut aussi subir des variations saisonnières liées à la reproduction (Kleinkauf et al. 2004) ; *i.e.* au stockage – déstockage de réserves.

L'indice de condition somatique (CF) est calculé selon la formule suivante :

$$\text{CF} = \frac{\text{poids}}{\text{taille}^3} * 100$$

On considère, qu'à taille égale, un individu plus maigre sera considéré a priori comme un poisson présentant une moins bonne condition physiologique (Froese, 2006). Pour des organismes de même sexe, à une même période de l'année, l'indice de condition somatique peut montrer des différences entre des sites contaminés et non contaminés (Kleinkauf et al. 2004). Néanmoins, les variations de ce paramètre peuvent être liées à la présence de contaminants mais également aux conditions hydro-climatiques spécifiques des sites échantillonnés (température, salinité, disponibilité en oxygène,...), comme à la disponibilité en nourriture. Plus largement ce paramètre CF peut aussi être fortement lié à la période de l'année, à l'âge ou encore au sexe des poissons. De multiples facteurs pouvant affecter cet indice de condition somatique, il faut donc le considérer avec une certaine précaution en écotoxicologie (Gilliers, Amara et Bergeron, 2004).

Au final, l'utilisation conjointe de tous ces biomarqueurs doit nous permettre d'analyser de façon approfondie la réponse des populations de poissons face aux stress chimiques, à différentes échelles de temps et à différents niveaux d'organisation biologique (Figure 5).

4.8 Approche protéomique 2D

Les approches protéomiques ont pour objectif d'étudier le protéome (c'est-à-dire l'ensemble des protéines) d'un organisme, d'un organe ou d'un tissu. Parmi ces approches, la

protéomique 2D est celle qui est le plus utilisée actuellement en écotoxicologie. Cette approche consiste à extraire les protéines puis à utiliser des techniques d'électrophorèse en 2 dimensions pour les séparer en fonction de leur point isoélectrique, puis de leur masse. Le profil protéique de l'organe étudié est ainsi obtenu sous la forme d'un gel ou chaque « spot » correspond normalement à une protéine et dont l'intensité dépend de l'abondance de cette protéine (Figure 8). Les protéines sont ensuite identifiées par spectrométrie de masse (Sanchez, Ralston-Hooper et Sepúlveda, 2011). Il s'agit d'une approche sans *a priori*, qui présente donc l'avantage de ne cibler aucune fonction ou voie métabolique particulière (Dowling et Sheehan, 2006). Il est ainsi possible d'obtenir le profil protéique de poissons dans des situations contrastées. Par exemple, la protéomique 2D peut aider à comprendre les voies métaboliques mis en jeu lors d'une infection (en comparant le protéome d'individus sains et infectés), durant le développement larvaire (en comparant le protéome de larves à différents stades de développement) ou lors d'une contamination (en comparant des individus contaminés et non contaminés) (Tomanek, 2010). Ce type d'approche protéomique se développe de plus en plus en écotoxicologie et permet d'étudier les mécanismes de réponse des organismes aux polluants, aussi bien en conditions expérimentales que naturelles (Lemos *et al.*, 2010; Sanchez, Ralston-Hooper et Sepúlveda, 2011)

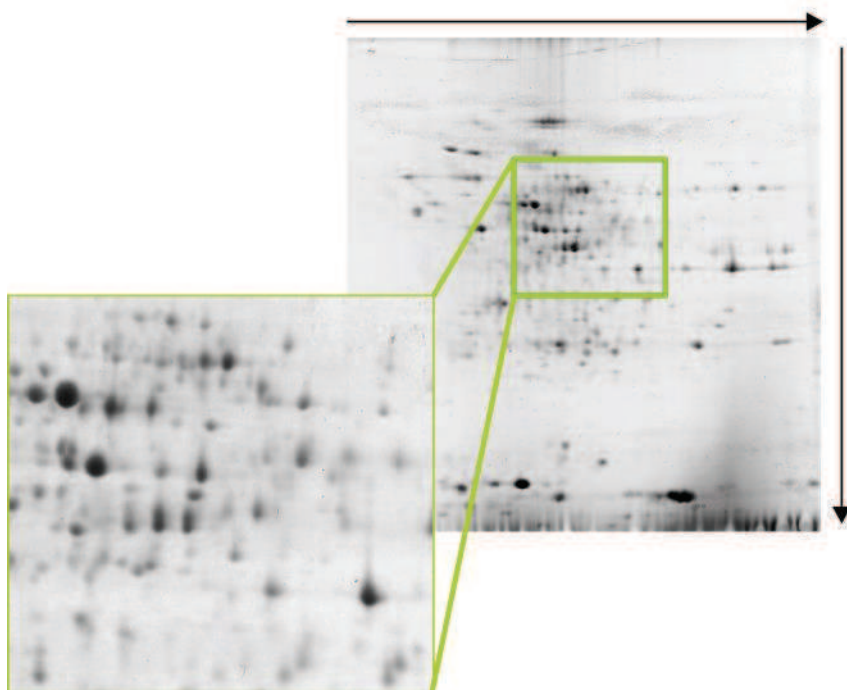


Figure 8. Exemple de gel 2D obtenu à partir d'un foie de flet.

Dans ce travail de thèse, la réponse du flet au stress chimique a été étudiée au cours d'une contamination expérimentale (chapitre 2) et sur des populations naturelles plus ou moins polluées (chapitre 3). Lors de ces approches, parallèlement aux investigations sur les biomarqueurs présentées dans les chapitres précédemment cité, une étude par protéomique 2D a été réalisée sur les mêmes poissons, dans le cadre de la thèse de Claire Galland. Cette approche protéomique pourrait donc apporter des informations complémentaires, relativement aux explorations sur les biomarqueurs (chapitres 2 & 3); c'est pourquoi les 2 publications en protéomique de Claire Galland, où je suis co-auteur, ont été placées en annexe 1 et 2.

5 OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'objectif principal de cette thèse est d'améliorer notre compréhension sur la réponse de poissons estuariens soumis aux stress chimiques, en conditions naturelles et au cours de stress expérimentaux, en intégrant différents niveaux d'organisation biologique.

Nos objectifs spécifiques sont ici:

- l'évaluation de l'impact d'une contamination expérimentale par un cocktail de polluants (HAPs & PCBs) sur une durée de 1 mois, suivie par une phase de décontamination;
- l'analyse de différents biomarqueurs dans des milieux naturels plus ou moins contaminés, afin d'identifier leur pertinence en écotoxicologie;
- la recherche de liens entre les réponses du poisson au stress chimique, en intégrant les niveaux moléculaire, cellulaire, individuel;
- la comparaison des réponses de deux espèces sentinelles estuariennes classiquement étudiées de part et d'autre de l'Atlantique, le flet (*P. flesus*) en France et le poulamon au Québec (*M. tomcod*), afin d'identifier les convergences ou divergences dans la réponse de ces deux poissons face aux stress chimiques.

Chapitre 2 :

**Réponses du flet, *Platichthys flesus*, en présence
d'un mélange complexe de HAPs et PCBs en
conditions expérimentales**

1 INTRODUCTION

Le flet est une espèce sentinelle qui a fait l'objet de nombreuses études écotoxicologiques, aussi bien en conditions expérimentales que naturelles. Sur le terrain, si un biomarqueur peut être modulé par la pollution, de nombreux facteurs confondants peuvent également altérer cette réponse : saison, température, salinité, hypoxie, etc. (van der Oost, Beyer et Vermeulen, 2003). Les expériences de contaminations en conditions contrôlées permettent de s'affranchir de la plupart de ces facteurs et ainsi de dissocier la variabilité naturelle d'un biomarqueur (le bruit), de la variabilité induite par le stress chimique (le signal).

Le premier travail de cette thèse a donc consisté à étudier en conditions expérimentales la réponse du flet face à une contamination complexe de HAPs et PCBs. Les **objectifs** de cette étude étaient :

- d'évaluer chez le flet, le niveau de base de plusieurs biomarqueurs liés à l'immunité, au métabolisme énergétique et aux dommages à l'ADN,
- d'étudier la réponse de ces biomarqueurs à une contamination aux HAPs et PCBs.

Les **paramètres immunitaires** sont parfois considérés comme des biomarqueurs peu efficaces et donc peu utilisés, car ils ne sont pas spécifiques de certaines familles de polluants, et peuvent répondre en fait à de multiples perturbations (van der Oost, Beyer et Vermeulen, 2003). Ce sont tout de même des marqueurs pertinents du fait de leur grande importance écologique, une altération du système immunitaire pouvant favoriser les infections et conduire à la mort des individus (*e.g.* Danion *et al.*, 2012a; Dautremepuits *et al.*, 2004).. Dans cette étude, nous avons évalué dans quelle mesure 4 biomarqueurs immunitaires pouvaient être modulés par la présence de contaminants : l'expression des gènes C3 et TNF-R, la quantité de lysozyme et la capacité de phagocytose.

L'effet génotoxique des contaminants a été évalué par la mesure du **test des comètes**. La mesure de l'expression du gène **CYP1A1** nous a donné des indications sur les mécanismes de biotransformation. La mesure de l'activité de la **CCO** (Cytochrome C Oxydase) a été ici considérée comme un proxy du métabolisme énergétique.

L'étude en **protéomique 2D** réalisée lors de cette expérimentation a montré que différentes voies métaboliques étaient mise en jeu chez les poissons contaminés (annexe 1). L'étude du protéome indique une dérégulation du niveau d'accumulation de différentes

protéines impliquées dans le métabolisme énergétique (NDPK, MDH), les défenses antioxydantes (GST, GPx, CAT) et le métabolisme de la méthionine (SHMT, BHMT). Afin de confirmer ces résultats, et de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu, nous avons choisi d'étudier l'expression du gène de la **BHMT**. L'objectif étant d'évaluer si l'augmentation de la quantité de protéine BHMT chez les poissons contaminés, était accompagnée d'une sur-expression du gène correspondant.

Le mélange de multiples contaminants peut conduire dans le milieu naturel à un « effet cocktail ». C'est-à-dire que le mélange des molécules peut produire des effets synergique ou antagoniste. Plutôt que de tester un seul contaminant, nous avons choisi de contaminer nos poissons avec un mélange de **9 HAPs** et **13 PCBs** afin de prendre en compte cet effet cocktail. De plus, afin de s'approcher au mieux des conditions naturelles, la contamination a été réalisée par l'intermédiaire de la nourriture. Des granulés ont été imprégnés d'une solution de 9 HAPs et 13 PCBs à deux concentrations :

- une concentration **C1** similaire à celle que l'on peut trouver dans l'estuaire de la Seine, dans les sédiments (pour les HAPs) et dans les poissons (pour les PCBs)
- une concentration **C2**, 10 fois supérieure à C1.

Le protocole de prélèvement est détaillé dans le Tableau 1. La **contamination** a duré **29 jours**, suivis par **14 jours de récupération** ; 10 poissons sont prélevés pour chacune des conditions : contrôle (Ctl), C1 et C2. L'expérience est réalisé en duplicata, dans l'un des duplicata les contrôles sont des poissons nourris de granulés imprégnés d'iso-octane (le solvant ayant servi à la dissolution de HAPs et PCBs) et dans le second duplicata, les contrôles sont des poissons nourris de granulés normaux. Les mesures réalisées n'ont pas mis en évidence de différence de réponse des poissons entre les deux duplicatas pour une condition donnée, les résultats des témoins (avec et sans iso-octane) ont donc était regroupés pour chaque temps.

Tableau 1. Nombre de poissons prélevés pour chaque temps et chaque condition lors de l'expérience de contamination.

	Avant contamination	Contamination 4semaines		récupération 2 semaines	toto par bac
	t0	14 jours	29 jours	43 jours	
Ctl iso-octane		10	10	10	40
C1	10	10	10	10	30
C2		10	10	10	30
Ctl		10	10	10	40
C1	10	10	10	10	30
C2		10	10	10	30
Prélèvement t0 2x14 poissons		2x38 poissons	2x54 poissons	2x30 poissons	200

2 RESULTATS ET DISCUSSION

L'ensemble des résultats est présenté de manière synthétique dans le Tableau 2. Une analyse en composante principale (ACP) a également été réalisée afin d'appréhender la variabilité inter-groupe (contrôle / exposé à C1 / exposé à C2), en prenant en compte tous les marqueurs après 14 jours et 29 jours de contamination. Les résultats de capacité de phagocytose ne sont pas présentés dans l'article qui suit, car aucune différence n'a été détectée pour ce biomarqueur entre les poissons contrôles, et ceux exposés à C1 ou C2.

Tableau 2. Récapitulatif des résultats des différents biomarqueurs et indicateurs utilisés au cours de cette étude. Phago=capacité de phagocytose, dommages=dommages à l'ADN, indiv.=individu, reins a.=reins antérieur ou pronéphros, érythro.=érythrocytes, cyto=cytométrie, activ.=activité enzymatique par mesure d'absorbance ou de luminescence, ref. correspond à la valeur de référence pour les comparaisons, un ++ ou - - signifie que la valeur est plus de 2 fois supérieure ou inférieure à la valeur de référence.

indice mesuré		ADN	detoxification		système immunitaire				metabo.	indices de condition
		dommages	CYP1A1	BHMT	phago.	lysozyme	C3	TNF-R	CCO	CF
organe	technique	sang érythro. comet assay	foie RT-PCR	foie RT-PCR	reins a. cyto.	sang serum activ.	foie RT-PCR	foie RT-PCR	muscle activ.	indiv. indice
conditions expé.										
t0	Ctl	ref.	ref.	ref.	ref.	ref.	ref.	ref.	ref.	ref.
t14	Ctl	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C1	0	0	0	0	-	0	0	0	0
	C2	0	0	0	0	-	0	0	0	0
t29	Ctl	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C1	0	0	0	0	-	+	0	0	0
	C2	+	++	+	0	-	++	+	0	0
t43	Ctl	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C2	0	+	++	0	0	0	0	0	0

Des **dosages chimiques de PCBs** réalisés par Véronique Loizeau (IFREMER-Brest) dans les carcasses de flets après 29 jours de contamination, confirment que la contamination par l'alimentation est efficace. Le niveau de contamination dans les tissus est proche de celui attendu ; il y a bien un facteur proche de 10 entre les niveaux de contaminations pour les poissons C2 / poissons C1. Par ailleurs, la prise de poids (SGR) est corrélée avec la concentration en contaminants dans la condition C1 (confirmant qu'un poisson qui mange plus est plus contaminé).

Le cocktail à un niveau C2 entraîne une sur-expression des gènes **CYP1A1** et **BHMT** après **29 jours** de contamination ; cette induction est maintenue après les 14 jours de restauration. L'induction de ces deux gènes peut s'expliquer par la mise en place de processus de détoxification. De plus, l'étude en protéomique 2D a démontré, après 29 jours de

contamination à un niveau C2, une augmentation de l'abondance de la BHMT et de la SHMT, 2 protéines impliquées dans le métabolisme de la méthionine. Cette augmentation pourrait être associée à une augmentation des défenses anti-oxydante (GPx) et suggère que la BHMT et de la SHMT seraient impliquées dans un cycle aboutissant à la production de glutathion (annexe 1)

Le maintien de la sur-expression des gènes **CYP1A1** et **BHMT** après la phase de **restauration** peut indiquer que des PCBs ou des métabolites de HAPs sont encore présents dans les poissons en quantités suffisantes pour induire des processus de détoxification. Pour confirmer cette hypothèse, Véronique Loizeau va réaliser, en janvier 2013, des dosages complémentaires de PCBs dans les carcasses des poissons contaminés à un niveau C2 à 43 jours.

Après 29 jours de contamination à un niveau C2, le niveau de **dommages à l'ADN** sont significativement plus élevés et corrélés avec le niveau d'expression du CYP1A1 ($R=0.964$, $p<0.05$). Cela suggère que la production de métabolites des HAPs pourrait conduire à une augmentation des dommages à l'ADN (Lee et Steinert, 2003). De plus, l'approche en protéomique a mis en évidence une augmentation des défenses anti-oxydantes qui pourrait être associée à la présence de ROS, ces derniers pouvant également entraîner des dommages à l'ADN (Lee et Steinert, 2003). L'absence de dommages à l'ADN à 43 jours suggère que le niveau de métabolites et/ou de ROS est passé en dessous de la limite qui entraîne une génotoxicité mesurable par le test des comètes.

Les **marqueurs immunologiques** sont nettement affectés par la pollution, mais leurs réponses demeurent complexes à analyser. Ainsi le C3 et le TNF sont induits en présence de polluants après 29 jours à un niveau C2, alors qu'à l'inverse, la quantité de lysozyme est diminuée dès 14 jours de contamination à un niveau C1. Le système du complément et du TNF sont tous deux impliqués dans la réponse inflammatoire. Les polluants chimiques sont connus pour entraîner une inflammation chez les poissons (*e.g.* Pacheco et Santos, 2002), qui pourrait donc expliquer cette induction de C3 et TNF-R. Le lysozyme, quant à lui, est impliqué dans la lyse des bactéries ; aussi, une diminution de sa quantité suggère un effet immunotoxique des contaminants. De plus le lysozyme est le plus sensible des marqueurs immunitaires analysés dans cette étude, puisqu'il est modulé dès le niveau C1 à 14 et 29 jours.

Le **niveau de contamination C1** n'induit aucune réponse en protéomique, relativement à la condition contrôle ; de plus, parmi les biomarqueurs mesurés, seuls 2 paramètres

immunitaires sont modulés par le niveau de contamination C1 équivalent à celui de la Seine (le lysozyme à 14j et 29j et le C3 à 29j). Pourtant plusieurs études ont observé sur des poissons en baie de Seine des dommages à l'ADN ou l'induction du CYP1A1 (*e.g.* Akcha, Vincent Hubert et Pfohl-Leszkowicz, 2003). Cette absence de réponse en situation expérimentale peut s'expliquer par la courte durée de la période de contamination (seulement 1 mois) et par l'absence de certaines substances dans notre cocktail. En effet, le mélange de HAPs et PCBs dont les effets sont explorés au laboratoire, ne peut évidemment pas simuler la complexité du mélange de polluants en Seine.

L'Analyse en Composantes Principales permet d'identifier les grandes tendances dans les réponses des biomarqueurs après 14 jours et 29 jours d'exposition. Après 14 jours de contamination, l'ACP met en évidence une structuration majoritairement liée à des différences intra-condition, avec 2 types de réponses particulièrement observées chez les poissons contaminés à un niveau C2 : des poissons avec un métabolisme actif (niveaux élevés pour lysozyme, CCO, BHMT et CYP1A1) et d'autres avec un métabolisme plus lent (niveaux plus bas pour les biomarqueurs précédents, mais taille et croissance des poissons plus fortes). Seuls les dommages à l'ADN semblent liés à une différence inter-conditions. Après 29 jours de contamination, la structuration est différente, les différences inter-conditions deviennent prédominantes ; les poissons les plus contaminés présentent alors un fort niveau de dommage à l'ADN et un niveau d'expression plus élevé pour le CYP1A1 et le TNF-R qui sont par ailleurs corrélés.

Pour conclure, cette expérience montre que les marqueurs employés sont bien modulés par la présence de contaminants dans notre situation expérimentale. Même si la réponse du système immunitaire reste complexe, il est clairement impacté par le stress chimique. Par ailleurs, l'existence d'un lien entre le CYP1A1 et les dommages à l'ADN est confirmée dans cette expérience. Les approches futures de contaminations expérimentales chez le flet devront aussi prendre en compte les marqueurs du stress oxydant, ainsi que la mesure des métabolites des HAPs, pour mieux explorer les liens fonctionnels entre : la bioaccumulation, la biotransformation, les réponses immunitaires et les différents dommages cellulaires (génotoxicité, peroxydation lipidique,...).

Responses of the European flounder (*Platichthys flesus*) to a mixture of PAHs and PCBs in experimental conditions

Célie Dupuy^{a,b}, Claire Galland^a, Alain Devaux^c, Sylvie Bony^c, Véronique Loizeau^d, Morgane Danion^e, Michel Auffret^a, Michel Fournier^b, Jean Laroche^a

^aUniversité Européenne de Bretagne, Université de Bretagne occidentale, UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin LEMAR, Institut Universitaire Européen de la Mer, 29280 Plouzané, France

^bInstitut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier (INRS-IAF), 31 Des Prairies Blvd., Laval, Quebec, Canada H7V 1B7

^c USC INRA "Impact génotoxique sur les hydrosystèmes", UMR LEHNA 5023, ENTPE, Rue Maurice Audin, 69518 Vaulx en Velin Cedex, France

^dDépartement d'Ecologie Côtière, IFREMER, Centre de Brest, BP70, 29280 Plouzané, France

^eANSES, Laboratoire Ploufragan-Plouzané, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

En préparation

ABSTRACT

A multibiomarker approach was developed to evaluate the juvenile European flounder responses to a complex mixture of 9 PAHs and 13 PCBs. To further mimic field conditions, exposure was performed through contaminated food pellets displaying: (1) similar PAHs and PCBs levels to those detected in the heavily polluted Seine estuary, respectively in sediment and in flatfish and (2) 10 times this concentration. Several biomarkers of the immune system (lysozyme concentration and gene expression of complement component C3 and TNF-receptor), DNA damage (comet assay), energetic metabolism (activity of Cytochrome C

oxidase), detoxification process (Cytochrome P450 1A1 expression level: CYP1A1; betaine homocysteine methyl transferase expression level: BHMT) were investigated after 14 and 29 days of contamination, followed by a 14 days recovery period. After 29 days of contamination, the detoxification activity (CYP1A1 expression level) was positively correlated with DNA damages; the increase of the BHMT expression level could be also associated to the detoxification process. Furthermore, after the recovery period, some biomarkers were still up-regulated (CYP1A1 and BHMT expression levels). The immune system was significantly modulated by the chemical stress at the two concentration levels and the lysozyme seemed to be the more sensitive marker to the mixture of contaminants.

Keywords: mixture of contaminants, fish, immunotoxicity, DNA damages, lysozyme, C3, TNF, BHMT

1 INTRODUCTION

The European flounder (*Platichthys flesus*) is considered as a pertinent sentinel species for water quality monitoring in coastal marine systems (SGIMC 2011); thus, numerous studies have assessed the biological effects of contaminants on natural populations of *P. flesus* (e.g. Evrard *et al.*, 2010a; Vethaak, Jol et Martínez-Gómez, 2011). In field studies, contaminant load and responses from the subcellular (e.g. molecular responses, DNA damages, etc.) to the organism level (e.g. growth, disease occurrence, etc.) are nowadays frequently assessed in order to explore possible cause-and-effect relationships between chemical stress and biological responses; this integrative approach on the flounder responses in estuaries being sometimes efficient to diagnose the general level of chemical stress (Laroche *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2011). However, complementary studies must be conducted in laboratory to better explore the natural variability (noise) vs the contaminant-induced stress (signal) for numerous biomarkers, in the context of mixtures of pollutants.

The aquatic environments can be affected by complex mixtures of chemicals, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), heavy metals, pesticides, endocrine disrupting chemicals... The safety levels of these contaminants are based on single substance exposure studies; however when present in a mixture, a contaminant can be more or less toxic, because of possible chemical interaction between

toxics, commonly called "a cocktail effect" (Celander, 2011). Thus in different mixtures, contaminants can produce synergistic or antagonistic effects on the exposed organisms.

The present study is exploring 1) the baseline of several biomarkers linked to immunity, metabolic rate and DNA damages, and 2) their responses for flounders exposed to a mixture of PAHs and PCBs in experimental conditions. A cocktail of 9 PAHs and 13 PCBs commonly observed in the field was prepared. To further mimic field conditions, exposure was performed through contaminated food pellets displaying for one experiment similar PAHs and PCBs levels to those detected in the heavily polluted Seine estuary, respectively in sediments (Cachot *et al.*, 2006) and in flatfish (Abarnou et Duchemin, 2008; Loizeau et Abarnou, 1995).

Flounders were contaminated by the pellets during 29 days, then fed with uncontaminated food for a 14 days recovery period. Immune markers were analyzed during this experiment: lysozyme activity and gene expression of complement unit 3 (C3) and Tumor Necrosis Factor Receptor (TNF-R). Contaminants may modulate the immune system by immunosuppression, autoimmunity reactions or hypersensitivity responses (Zelikoff, 1998). Immune parameters can be modulated by many stressors and thus are not considered as specific markers (van der Oost, Beyer et Vermeulen, 2003); however, immunotoxicologic approaches appear very pertinent in ecotoxicology because alterations of the immune functions may conduct to an increased fish susceptibility to parasites and thus to a lower fitness (*e.g.* Danion *et al.*, 2012a; Dautremepuits *et al.*, 2004).

The Lysozyme is an enzyme of the innate immune system, playing a role in protection against microbial invasion (Lie *et al.*, 1989). The lysozymes show lytic activity against gram-positive et gram-negative bacteria and play a role in the activation of complement system and phagocytes (Saurabh et Sahoo, 2008). Serum lysozyme level is sensitive to environmental contaminants and is measured on the serum (easy and inexpensive analysis); thus, the lysozyme level could be a convenient parameter for monitoring the impact of pollutants (Bols *et al.*, 2001b).

Furthermore, the expression level of two genes (C3 and TNF-R) was also measured in flounder liver. The Complement C3 is a central protein involved in both classical and alternate pathways of complement (Rehana et Kini, 2008). Complement system is implicated in modulation of phagocytosis, lysis of cells and the inflammatory response (Boshra, Li et Sunyer, 2006; Ye *et al.*, 2011). A modulation of C3 mRNA expression was observed in fish after a long-term exposition or between fish living in contrasted habitats; thus several studies

observed an induction of C3 mRNA by the pollutants (Holth *et al.*, 2010; Straub *et al.*, 2004). On the other hand, Williams *et al.* (2003) showed a down-regulation of C3 mRNA in European flounders living in a contaminated estuary.

The tumor necrosis factor (TNF) and its cellular receptor (TNF-R) are protein implicated in cellular signaling pathways involving inflammation, apoptosis, necrosis, lymphocyte homeostasis (Smith, Farrah *et al.* Goodwin, 1994; Wiens *et al.* Glenney, 2011). The TNF-alpha is a TNF that could also modulate the biotransformation process by the down regulation of Cytochrome P450 activities in fish (Reynaud *et al.*, 2005). Moreover, Bado-Nilles *et al.* (2011) observed an up-regulation of TNF-alpha on European seabass, *Dicentrarchus labrax*, after 7 days of exposure with light cycle oil. No sequence of TNF-alpha being known on the European flounder, thus we decided to study the expression of the corresponding cell-surface receptors (TNF-R).

The molecular responses to the chemical stress were also analyzed in flounder liver considering the expression level of two genes: the betaine homocysteine S-methyltransferase (BHMT) and the Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1). BHMT is an enzyme implicated in the regeneration of methionine by remethylation of homocysteine. Induction of BHMT was underlined in several studies on the flounder responses to contaminants in experimental context and in the field which suggest that BHMT could be involved in detoxification process (Evrard *et al.*, 2010a; Marchand *et al.*, 2006). CYP1A1 has an important function in the biotransformation of many xenobiotics (Sarasquete *et al.* Segner, 2000). Induction of flounder mRNA CYP1A1 by the pollutants was also demonstrated in laboratory and in the field (Eggens *et al.*, 1996; Evrard *et al.*, 2010a). Moreover, studies suggest that the immunotoxic effects of contaminant could be induced by the upregulation of CYP1A1 (Carlson, Li *et al.* Zelikoff, 2004)

The flounder cellular responses to the chemical stress were also considered in this study by the estimation of DNA damage level in erythrocytes, by the comet assay. This test determines the level of DNA single-strand breaks in cells. Several studies underlined the pertinence of this test to assess the genotoxic effects of some contaminant like PAHs on fish tissues (*e.g.* Costa *et al.*, 2008; Devaux *et al.*, 1998; Flammarion *et al.*, 2002)

Lastly, the Cytochrome C Oxidase (CCO) activity was measured in fish muscle. CCO is the terminal enzyme of electron transport chain of the mitochondria (Complex IV); this aerobic enzyme may constitute an excellent proxy of the fish metabolic capacity (Cohen, Gagnon *et al.* Nugegoda, 2005; Pelletier *et al.*, 1994).

The major objective of the present study is to integrate the molecular, cellular and physiological responses of the flounder to the food contamination with a mixture of PAHs and PCBs, during a one month period, followed by a recovery period where the reversibility of the different markers will be explored.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Experimental design

Juveniles of *P. flesus* (cohort 0+) were purchased in a farm (Fishlab, Denmark) in october (2010), then reared in our laboratory in experimental tanks, the water being directly collected in the Bay of Brest (salinity $\approx 35\text{g/l}$, $14^{\circ}\text{C} < \text{temperature} < 17^{\circ}\text{C}$). After a 14 days acclimation period to the laboratory conditions, several fish groups were contaminated through food; pellets were soaked in a mixture of pollutants dissolved in iso-octane (Table1), designed to reflect the PAHs (Cachot *et al.*, 2006) and PCBs (Abarnou et Duchemin, 2008) concentrations detected in respectively sediments and fish of the heavily polluted Seine estuary (C1) and 10 times higher concentrations (C2). Mixtures were prepared by IDHESA laboratory and pellet contaminant load was also measured by IDHESA to check the efficiency of the impregnation (Table1). Six fish groups were considered: a control group (granulates without iso-octane), a control group with the solvent (granulates with iso-octane) and 2 contaminated groups (C1 and C2) in batch replicates.

After the acclimation period, 10 fish were sacrificed as a control (t0), then, 10 fish were sacrificed per group after 14 and 29 days of contamination. After this contamination period, fish were fed with normal commercial granulates and 30 fish per group were sacrificed after a 15 days recovery period (*i.e.* 45 days after t0).

One day before t0, animals were tagged and their standard length (Lsd, *i.e.* until the hypural joint) and total weight were measured. Each sampling operation was conducted with the following protocole:

(1) the Lsd and total and gutted-carcass weight were measured per fish, and a blood sample was collected in the caudal vein with a heparinized syringe; a part of blood sample was diluted (x100) in a cryopreservative buffer (Evrard *et al.*, 2010a) for the Comet test and a second part of blood sample was centrifuged (5min, 5000G) to obtain plasma for the lysozyme activity; All these samples were frozen in liquid nitrogen;

(2) fish were knocked out and fragments of liver and muscle were quickly dissected and frozen in liquid nitrogen; Carcass of each fish being stored at -20°C until PCB analysis .

Visual inspection did not reveal any trace of liver pathology or parasite infection. All experiments were performed according to the guidelines laid down by the french "Ministère de l'Agriculture" and the European Union council directive for the care and use of laboratory animals.

Table 1. Targeted and measured concentrations of PAHs and PCBs in the fish pellets

	control with iso-octane	C1		C2	
	measured concentration (ng/g)	targeted concentration (ng/g)	measured concentration (ng/g)	targeted concentration (ng/g)	measured concentration (ng/g)
HAP :					
fluoranthene	2.3	210	189	2100	2072
pyrene	3.2	200	176	2000	1916
benzo(a)anthracene	0.7	70	49.6	700	640
chrysene	1.5	130	84.8	1300	1144
benzo(b)fluoranthene	2.3	170	116	1700	1501
benzo(k)fluoranthene	0.7	60	43.3	600	529
benzo(a)pyrene	1.3	60	42.1	600	517
indeno(1,2,3-cd)pyrene	nm	50	nm	500	514
benzo(ghi)perylene	0	50	54	500	435
Σ HAP =	12	1000	754.8	10000	9268
CB :					
CB 28	0	5	4.2	50	47.1
CB 52	0.4	25	24.3	250	252
CB 101	1.6	50	43.8	500	470
CB 149	2.1	50	42.8	500	477
CB 118	1.1	50	41.7	500	465
CB 153	3.3	100	86	1000	939
CB 105	1.4	25	20.3	250	238
CB 138	2.6	100	79.4	1000	911
CB 156	1.2	25	20.3	250	218
CB 180	1.4	50	37.9	500	449
CB 170	1.5	25	17.7	250	212
CB 194	0	5	3.5	50	42.5
CB 126	0	5	3.9	50	46.9
Σ PCB	16.6	515	425.8	5150	4767.5
total load of contaminants	28.6	1515	1180.6	15150	14035.5

2.2 Biometric indexes

The body condition factor (CF) was calculated by the formula: $CF = 100 \times W / Lsd^3$, where W is gutted-carcass weight (g) and Lsd is standard length (mm) of each fish.

The growth of each fish was estimated by the measured of the specific growth rate (SGR) by the formula : $SGR (\%/day) = 100 \times (\ln W_t - \ln W_0) / t$, where W_0 and W_t are the initial and final weights respectively and t is time (day) (Talbot, 1993).

2.3 Food preparation and PCB analysis in food and fish tissue

Commercial food (Inicio plus, 1.9mm), obtained from Biomar (France), consisted of a formulated feed containing 61% crude protein and 33% crude fat. Spiked food was prepared by batch to avoid deterioration and by slowly adding a solution in iso-octane of known amounts of thirteen PCB congeners and 9 PAH, (AccuStandard Inc., New Haven, USA, purity above 98%) to food pellets in order to prepare diets. PCBs mixtures were composed of the seven indicator PCB congeners (CB28, 52, 101, 118, 138, 153, 180), and a few others to describe a larger range of chlorination from 3 to 8 chlorine atoms (CB105, 126 149, 156, 170, 194). The latter compounds were chosen because they can highlight any underlying mechanisms acting on the distribution of organic contaminants in biota, *i.e.* bioaccumulation or biotransformation. CB153 is not metabolized and is used as a representative of all thirteen congeners. PAHs mixtures were composed of 9 PAHs of high molecular weight (three to five rings) found in European and American estuaries and already used in several studies of contamination with PAHs mixtures (*e.g.* Arkoosh *et al.*, 2001b; Bravo, 2005; Bravo *et al.*, 2011).

Two diets were prepared: PCBs&PAHs-medium and PCBs&PAHs-high for which targeted concentrations of individual congeners are shown in Table 1. PAHs being metabolized, only the PCBs concentrations were assessed to confirm the fish contamination. Batches of spiked food were stored in amber containers in a cool, dark place throughout their use (circa 1.5 months). Individual PCB congener concentrations were determined in each batch of spiked food (Table 1). Non-spiked food was also analyzed for PCB levels, and concentrations were between <0.05 ng/g dry weight (dw) and 3.0 ng/g dw (mean value calculated on 5 replicates) depending on the congener. In addition to congeners included to spike the contaminated food, CB 31 (not detected; nd), CB 77 (nd), CB110 (0.75 ng/g dw), CB132 (nd), CB128 (nd), CB187 (nd) non-added congeners and p,p_DDE (3.50 ng/g dw) were measured.

PCB analysis in fish carcass was performed according to the protocol described by Bodiguel *et al.* (2009). Briefly, approximately one gram of freeze-dried fish carcass were

extracted in a hot Soxhlet extraction apparatus (Soxtec) over 1.5 h with a hexane:acetone mixture (80:20). The amount of extracted fat was determined by gravimetric analysis. Then, two successive cleanups were performed on the extractible material. First, lipids and co-extractible material were destroyed by adding concentrated sulphuric acid. The cleaned extract was then purified by adsorption chromatography on a Florisil column (16% MgO + 84% SiO₂, activated for 1.5 h at 500°C, deactivated with 3% of demineralised water) and eluted with pentane. Finally, PCB congeners were analyzed by gas chromatography with an electron capture detector, on a HP 5890 series II equipped with a CP-Sil19 capillary column (60 m length, internal diameter 0.25 mm, and 0.15 µm phase film thickness) following optimized conditions described by Jaouen-Madoulet et al. (2000). The system was calibrated within quite a large range using a six-point calibration curve to define the linearity range of our detector (ECD) for all contaminants. The relative precision of the method was checked for this type of sample by analyzing five aliquots of a homogeneous tissue preparation of fish muscle. The results showed standard deviations of less than 10% for all congeners, indicating that the method had a satisfactory reproducibility. During analysis of the real samples, analytical blanks were systematically measured for every ten samples. The blank concentrations were always less than the concentrations of the lowest standards of all congeners. Finally, 5 replicates of a reference material, BCR-CRM349 (Cod Liver Oil) were analyzed to determine the accuracy and precision of the method. PCB recoveries varied between 74% and 125%. Furthermore, the RSD values ranged from 4% to 19%, with a mean of 10% for all PCBs. All of these results were in agreement with certified reference values and published data (Schantz *et al.*, 1993). The laboratory regularly takes part in Quality Assurance of Information for Marine Environmental Monitoring in Europe (QUASIMEME) intercomparison exercises for PCBs in biota and our Z-scores are satisfactory, *i.e.* between -2 and +2

2.4 Comet assay

The level of DNA breaks induced by chemicals and estimated by the Comet assay is considered as a precocious and sensitive biomarker for populations living in contaminated aquatic systems (Frenzilli, Nigro et Lyons, 2009). In this study, the Comet assay was carried out on flounder erythrocytes according to the procedure described by Singh et al. (1988) with slight modifications detailed in (Evrard *et al.*, 2010a). After cells treatment and electrophoresis, DNA was stained with 0.05 mM ethidium bromide and scored using an

Axioskop epi-fluorescence microscope (Zeiss) and the comet assay IV image analysis system (Perceptive Instruments Ltd., Havrevill, UK). Randomly selected cells from two replicated slides (50 cells per slide) were analysed. The percentage of DNA in the comet tail (median % tail intensity) was chosen as the most reliable and meaningful comet measurement (Jha, 2008).

2.5 Lysozyme

The assessment of plasma lysozyme level was carried out by the turbidimetric method of Parry et al. (1965). A suspension of 110µl *Micrococcus lysodeikticus* (10 µg/ml, 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 6.4) was mixed with 40µl of serum in a 96-well plate. The reaction was carried out at room temperature and read at 450 nm at 1 min intervals for 20 min with a shake before each reading. On each 96-well plate, the measure was also carried out on a standard being a concentration of lysozymes know (0 to 0.75µg/ml) to calculate the concentration of lysozyme in each plasma sample. Protein concentrations in plasma sample were determined by the method of Bradford using bovine serum albumin as a standard (BIO-RAD Laboratories, USA).

2.6 CCO (Cytochrome C oxidase)

CCO activity was measured at 22°C by a microplate spectrophotometric assay in muscle S9 fraction (Smith et Conrad, 1956; Théron, Guerrero et Sebert, 2000). Absorbance changes were monitored at 550nm during 8min. Protein concentrations were determined by the method of Bradford using bovine serum albumin as a standard (BIO-RAD Laboratories, USA).

2.7 Gene expression

The procedure used to measure the gene expression level is similar to that described by Calvès (2011)

Total RNA was isolated using Trizol reagent (Applied Biosystems) at a concentration of 1ml/50mg of tissue. Each liver was homogenized in Trizol using a Precellys-24 ceramic bead-based homogenizer (Bertin Technologies). Samples were treated with RTS DNase Kit (MO BIO) to prevent DNA contamination. The purity and concentration of sample were

determined using a NanoDrop 8000 spectrometer (Thermo Scientific). Purity was assessed using the ration A260/A230 and A260/A280. RNA quality was assessed using the 2100 Bioanalyzer Agilent (Agilent Technologies) or by migration on agarose gel (1.5%). Reverse transcription (RT) was carried out using 1µg total RNA from each sample with RevertAid H minus First Strand, cDNA Synthesis Kit® (Fermentas). A RT was carried out using a RNA mixture of samples come from each experimental condition. This mixture is a control used on each run of real-time PCR.

The mRNA expression level was explored for the following genes: BHMT, C3, TNF α and CYP1A1. Two housekeeping genes were tested : alpha-tubulin and 18S. No significant differences of Ct were observed for alpha-tubulin between the control and the contaminated fish; furthermore Alpha-tubulin showed the lowest variation coefficient, and thus was retained as the housekeeping gene in our analysis. Primers of CYP1A1, Alpha-tubulin, 18S and BHMT were obtained in the literature (Table 2). Primers of C3 and TNF-R were designed considering the sequences available on GENE BANK and using Primer 3 software (Rozen et Skaletsky, 1999).

Table 2. Primer sequences used to RT-PCR

Gene	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')	origin
α -Tubuline	CAC-AGC-CTC-ACT-TCG-TTT-TG	AGA-TGA-CAG-GGG-CAT-AGG-TG	Leaver et al. (2010)
18S	GTC-TGG-TTA-ATT-CCG-ATA-ACG-AAC-GAG-ACT-CTA	TGC-TCA-ATC-TCG-TGT-GGC-TAA-ACG-CCA-CTT-G	Evrard et al. (2010)
CYP1A1	GCC-AAC-GTG-ATC-TGC-GGA-ATG	AAG-CCG-ACC-AGC-TCC-TGA-TC	Calves et al. (2011)
BHMT	AGA-GAG-GCC-TAC-AAG-GCT-GG	GTG-TGC-ATC-TCC-AGA-CCA-GCG-C	Evrard et al. (2010)
TNF-R	CAG-CCG-AAT-CTC-AGT-GAT-GG	CAG-TTG-GAT-GCC-AAG-TCA-GC	design of ES443667.1
C3	ACG-ATG-AAA-GTG-GGC-GTC-TT	TGC-AGT-TCT-CTT-CGG-CAC-AT	design of EC379465.1

The real-time PCR (RT-PCR) amplifications were carried out in triplicate with the Absolute QPCR SYBR Green ROX Mix (Thermo Scientific) The final volume of reaction was of 25µl with 1µl of cDNA (1/40 dilution), 12,5µl of ABsolute QPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientif), 1.75µl of each primer (1µM) and 8 µl of water. A negative control was carried out (each total RNA sample with DNase treatment). Each run included cDNA of sample, cDNA of mixture used like control and blank controls (water) analyzed for each primer pair. The RT-PCR were carried out using a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) with RT-PCR thermal cycling program as follow : 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, then 40 cycles at 95°C for 15s follow by 1min at 60°C. A melt curve was carried out to confirm the specificity of the reaction with the program following: 95°C for 15s, 60°C for

30s and an increase of temperature by 0.5°C each 15s to 90°C. PCR efficiency (E) was determined for each primer pair by determining the slopes of standard curves obtained from serial dilution analysis of cDNA. Relative expression of the target gene was calculated with the Pfaffl formula (2001) using Alpha-tubulin like reference gene :

$$ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta CP_{target}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(control-sample)}}$$

The ratio of a target gene is expressed in a sample versus a control in comparison to a reference gene. E_{target} is the real-time PCR efficiency of target gene transcript; E_{ref} is the real-time PCR efficiency of a reference gene transcript; ΔCP_{target} is the CP deviation of control – sample of the target gene transcript; $\Delta CP_{ref} = CP$ deviation of control – sample of reference gene transcript.

2.8 Statistical analysis

Statistic tests and box plot graphs were carried out using Statistica 10.0 (StatSoft). The variables were not normally distributed, so the Kruskal-Wallis (KW) test was used for inter-condition comparisons. When KW test was significant ($p \leq 0.05$), it was followed by a post-hoc test: a multiple bilateral comparisons of mean ranks. No significant difference was detected over the whole markers (KW test: $p > 0.05$) between control group and control group with solvent, between the two groups of C1 and between the two groups of C2, thus the analysis were conducted grouping the two groups of control, the two groups of C1 and C2.

Principal Component Analysis (PCA) was used to develop an integrative approach on the fish responses to contaminants after 14 days and 29 days of exposition, considering the three fish groups; control/exposed to C1/exposed to C2. The following variables were considered in the PCA: Lsd, SGR, DNA damage, lysozyme concentration, CCO and gene expression; all data being standardized (zero mean, unit variance) before the analysis.

3 RESULTS

3.1 Chemical analysis in pellets and in fish carcass, biometric indexes

The chemical analysis in pellets indicates that the concentrations of PCBs/PAHs in granulates were close to the intended concentrations (Table1), for the moderate as for the high load of contaminants (C1 and C2).

After the 29 days contamination period, the concentration of PCBs in fish carcass was close to the concentration in pellets for both C1 and C2 levels (Fig 1). Furthermore, for the C1 experiment, a significant correlation ($R=0.9$, $p<0.05$) was detected between the CB153 concentration in fish carcass after 29 days of contamination and the specific growth rate (SGR).

No significant difference of CF, Lsd or SGR was detected between the different fish groups (control/exposed to C1/exposed to C2) after 14, 29 or 43 days of experience.

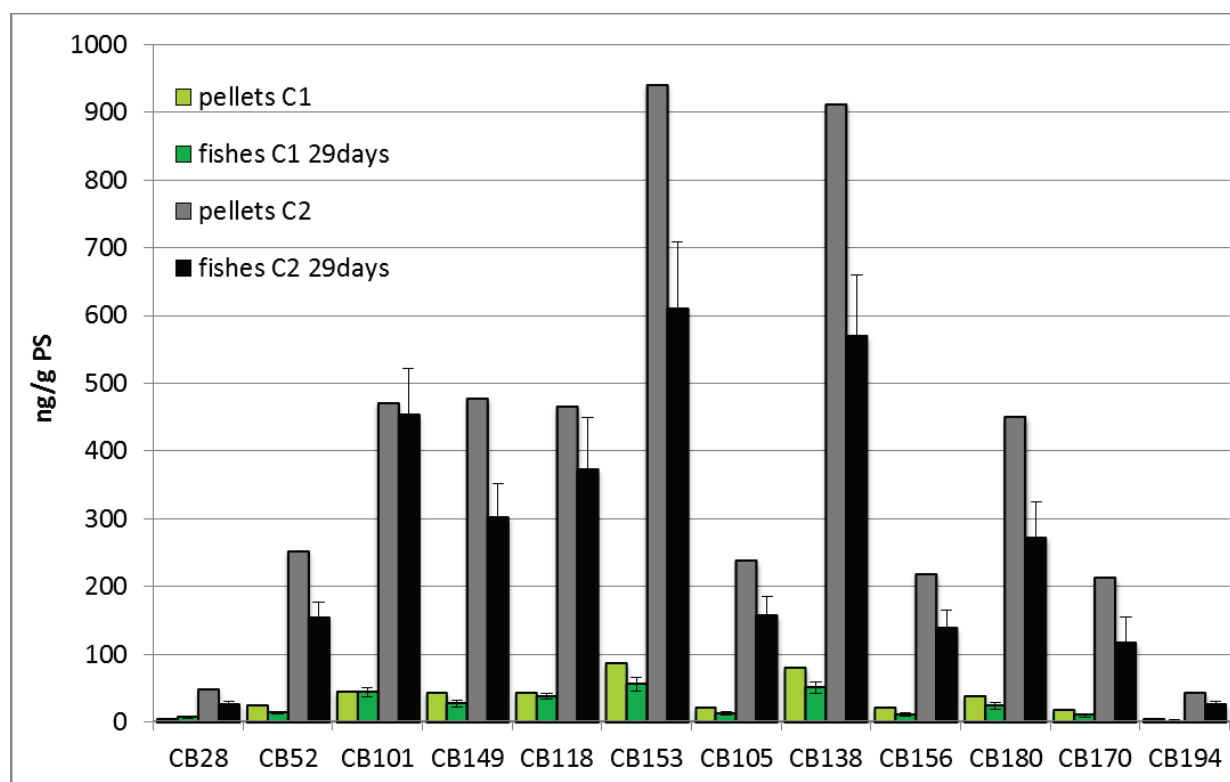


Fig 1. Measured concentrations of PCBs indicators in pellets and in fish carcass after 29 days of contamination.

3.2 Comet assay

After 14 days of contamination, a higher level of DNA damage was observed for the C2 exposed fish compared to the other groups (Fig 2), however this trend was not significant ($p>0.05$); this increase of DNA damage becoming significant for this C2 group ($p<0.01$) after the 29 days contamination period. After the restoration period lasting 15 days, the levels of DNA damage were not significantly different between fish groups (Fig 2); these levels were low and similar to those observed at the beginning of the experiment.

For the C2 experiment after 29 days of contamination, a significant correlation ($R=0.964$, $p<0.05$) was detected between the level of DNA damage and the mRNA level of CYP1A1.

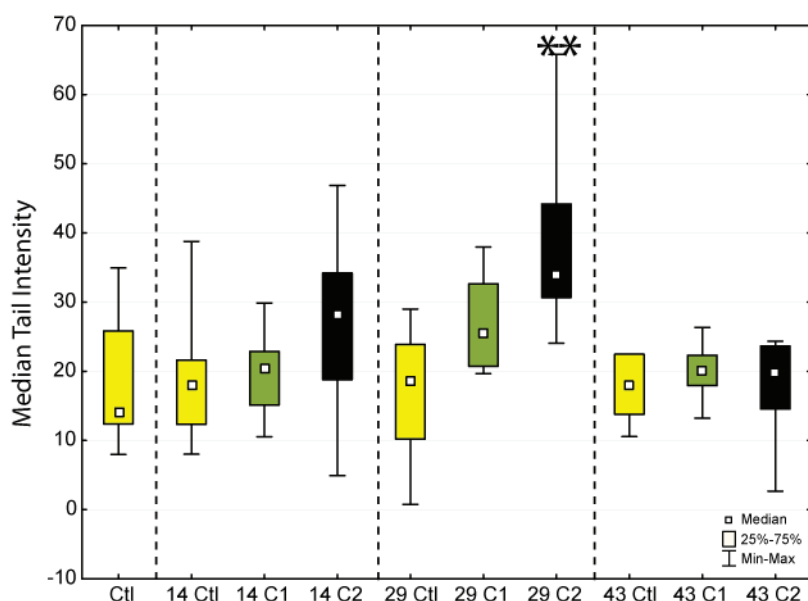


Fig 2. Primary DNA damage levels expressed as median tail intensity by the Comet assay during the experiment in control (Ctl) and in contaminated conditions (C1 and C2) after 14, 29 and 43 days. * : $p<0.05$; ** : $p<0.01$ and * : $p<0.001$**

3.3 Lysozyme

A significant decrease of the lysozyme activity was detected after 14 days of contamination for the C1 exposed fish compared to other groups (Fig 3); a similar trend was observed for the C2 group compared to the control but was insignificant. After 29 days of contamination, the lysozyme activity was significantly reduced for both C1 and C2 groups compared to the control (Fig 3). The levels of lysozyme activity were similar in the three fish groups after the restoration period.

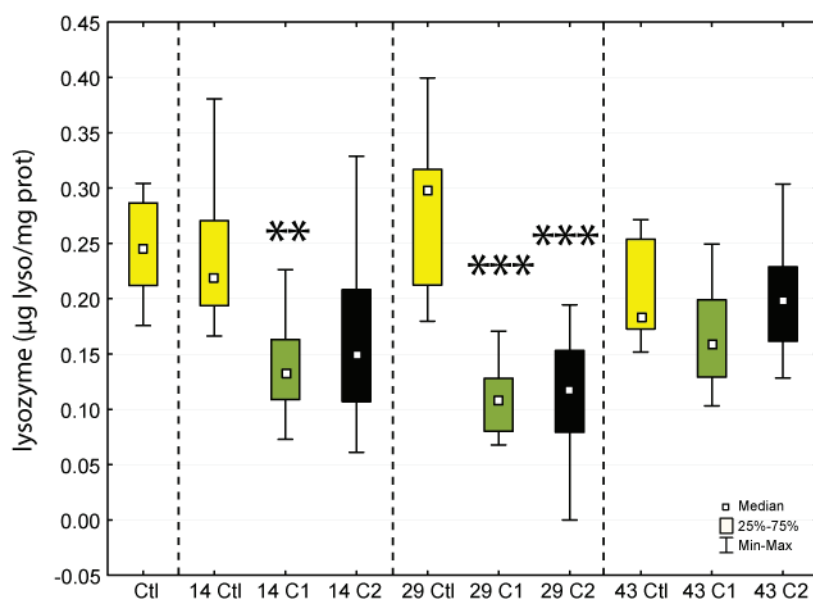


Fig 3. Lysozyme concentration in plasma during the experiment in control (Ctl) and in contaminated conditions (C1 and C2) after 14, 29 and 43 days. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ and *** : $p < 0.001$

3.4 CCO (Cytochrome C oxidase)

No significant difference was detected for the CCO activities among the fish groups, along the whole experiment (Fig 4); however the highest and the lowest CCO activities were detected for the C2 fish group after respectively 14 and 29 days of contamination.

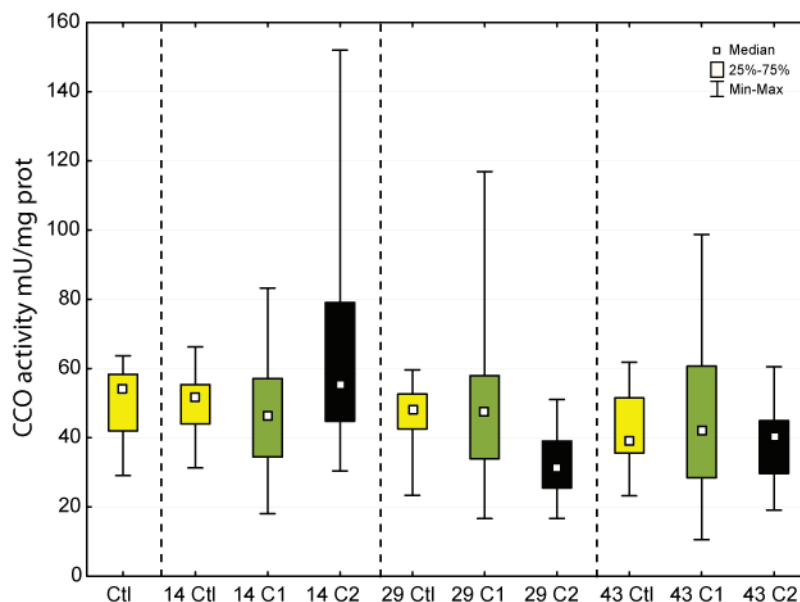


Fig 4 CCO activity during the experiment in control (Ctl) and in contaminated conditions (C1 and C2) after 14, 29 and 43 days. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ and *** : $p < 0.001$

3.5 Gene expression

The BHMT and CYP1A1 expressions were up-regulated for the C2 fish compared to the other groups after 29 days of contamination ; this up-regulation being maintained after the restoration period (Fig 5). The C3 gene expression was up-regulated for the C1 and C2 groups after 29 days of contamination; the expression levels of this gene were not significantly different between the fish groups after the restoration (Fig 5). The TNF-R gene expression was up-regulated in the C2 fish compared to other groups, after the 29 days contamination period (Fig 5).

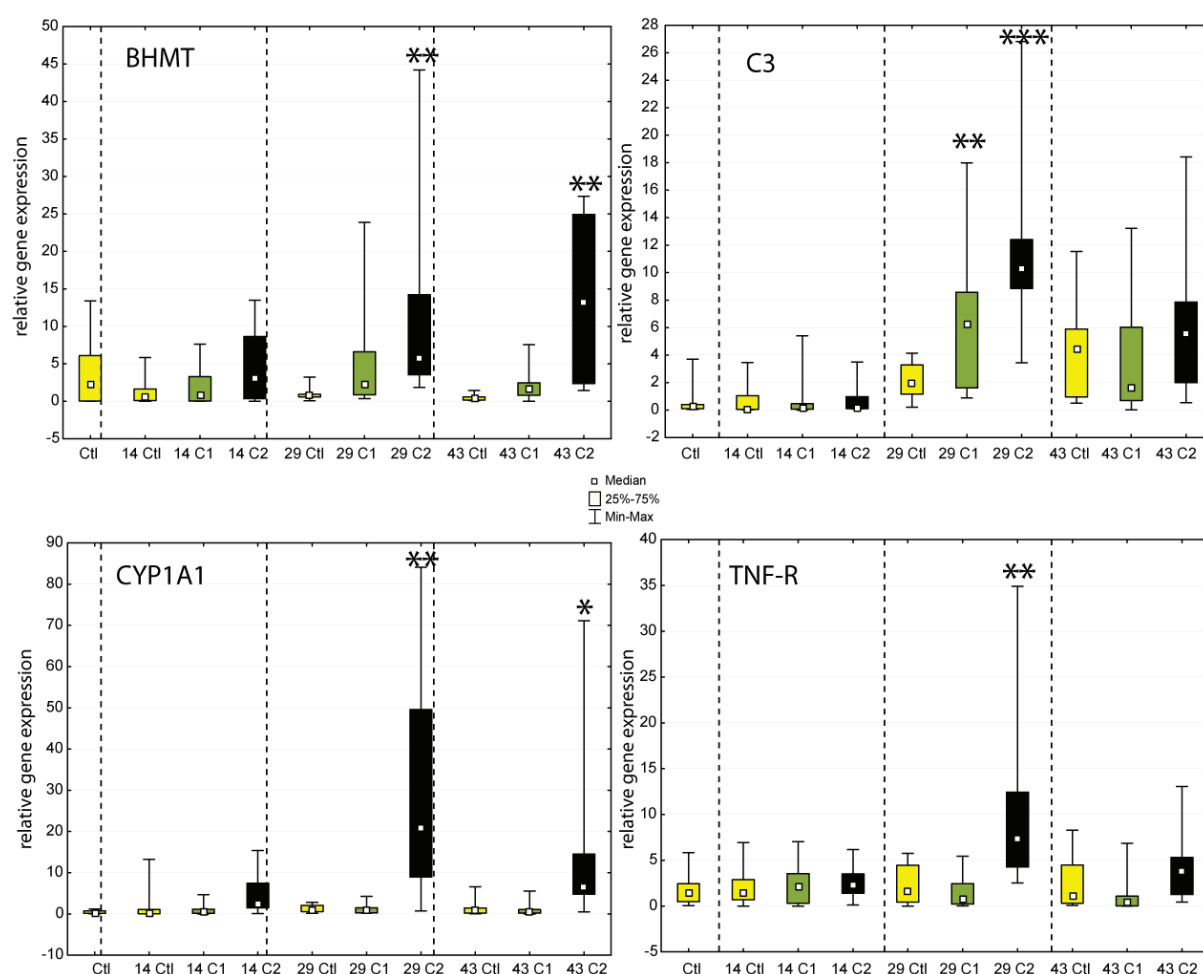


Fig 5. Expression level of target gene compared to the reference gene (α tubuline) during the experiment in control (Ctl) and in contaminated conditions (C1 and C2) after 14, 29 and 43 days. * : $p<0.05$; ** : $p<0.01$ and * : $p<0.001$**

3.6 PCA

Two PCA were carried out on the fish responses after 14 and 29 days of contamination. After the 14 days contamination period, the first and second principal components (axis 1 & axis 2) accounted for respectively 38.34% and 16.50% of the total variance over the whole data set (Fig. 6A). On the first axis of the correlation circle, an opposition was observed between the left side of the diagram mainly characterized by high CCO and lysosyme activities, high BHMT and CYP1A1 expression levels and the right side mainly linked to high fish standard length (Fig 6A). The second axis of the correlation circle was mainly linked to DNA damage (Fig 6A). The distribution of the individuals on the main factorial plan (Axis 1 & 2) showed a mixture of individuals coming from the two groups: control and C1 exposed fish (Fig 6B); the C2 exposed group being mainly localized in the lower part of the diagram and thus showing higher DNA damages. The inter-individual variability in the fish responses of the C2 group was higher to those observed for the control and C1 groups (Fig 6B).

After the 29 days contamination period, the first and second principal components (axis 1 & axis 2) accounted for respectively 40.36% and 19.42% of the total variance over the whole data set (Fig. 6C). On the first axis of the correlation circle, an opposition was observed between the left side of the diagram mainly characterized by high DNA damage and high expression level of TNF α , CYP1A1, C3 and the left side of the plan mainly linked to high lysozyme and CCO activities (Fig. 6C). An inverse correlation was detected between the expression level of BHMT in the upper part of the diagram, and the specific growth rate in the lower part of the plan (Fig 6C). The distribution of individuals after 29 days of contamination showed that the three fish groups (control, C1 and C2) were clearly separated along the first axis (Fig 6D) :

- on the right part of the plan, the control fish showed high CCO and lysozyme activities, reduced DNA damages and limited expression levels for TNF α , CYP1A1, C3 and BHMT;
- on the left part of the plan, the C2 fish displayed an inverse trend, *i.e.* limited CCO and lysozyme activities, high DNA damages and high expression levels for TNF α , CYP1A1, C3 and BHMT;
- on the plan center, the C1 fish showed intermediate responses between the control group and the C2 group.

The inter-individual variability in the fish responses of the C2 group after 29 days of contamination was again higher than those observed for the control and C1 groups (Fig 6D).

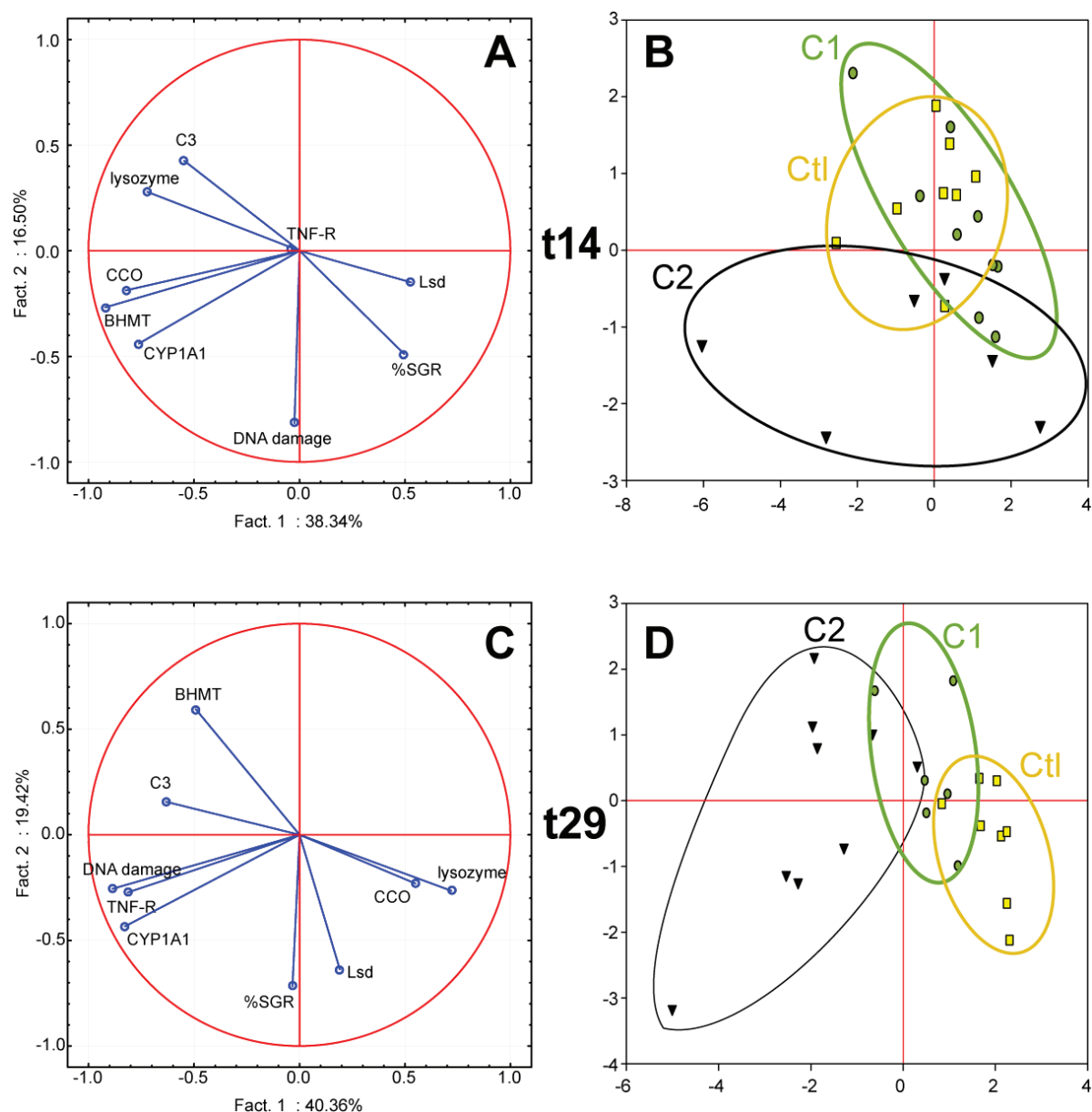


Fig 6. Principal Component Analysis (PCA): distribution of the variables on the correlation circle after 14 days (A) and 29 days (C) of contamination and distribution of the fish on the main factorial plan after 14 days (A) and 29 days (C) of contamination, considering the three fish groups (Ctl, C1 and C2)

4 DISCUSSION

4.1 Contamination by food and fish chemical load

The Specific Growth Rate and the carcass chemical load clearly showed that all fish fed during the experiment and that the flounder contamination by food was efficient. Chemical

analysis underlined a low variability in the fish PCBs concentrations in each condition. Furthermore, after a 29 days contamination period, the ratio of the PCBs loads in group exposed to the high concentration (C2) vs in group submitted to the moderate concentration (C1) was close to 10 (*i.e.* the C2/C1 ratio in the pellets); this result suggests that in our experimental conditions, the fish PCBs bioaccumulation increased linearly with the level of food contamination.

The cocktail of pollutants C1 was designed to reflect the general level of PAHs and PCBs observed in respectively sediment and biota for heavily polluted systems (Abarnou et Duchemin, 2008; Cachot *et al.*, 2006). A first approximation could be to consider that our experimental levels of contamination (C1 and C2= C1 x 10) allow to explore the complex effects of cocktails on process of detoxification, DNA damages, immune and metabolic responses in environmentally realistic conditions.

4.2 Detoxification-biotransformation and genotoxicity

The CYP1A1 induction is a major biomarker of exposition to environmental contamination in aquatic ecosystems (van der Oost, Beyer et Vermeulen, 2003) which is implicated in the metabolization of PAHs and of other organic pollutants, and particularly in the first step of the detoxification process; the resulting molecules being sometimes more toxic than the parental ones. For the European flounder as for numerous fish species, an up-regulation of CYP1A1 induced by PCBs and PAHs was observed both in laboratory (Eggens *et al.*, 1996; Lewis, Williams et Chipman, 2006) and in the field (Evrard *et al.*, 2010a; Williams *et al.*, 2003).

In the present study, the PCBs-PAHs cocktail induced an up-regulation of the CYP1A1 expression for the higher concentrated mixture, after a 29 days contamination period; this up-regulation was maintained after the 15 days restoration period and was probably linked to the presence in fish tissues of compounds displaying low rates of biotransformation and probably PCBs. Similarly, the expression of BHMT, an enzyme which catalyses the methylation of homocysteine to methionine and have been suggested as involved in phase II detoxification (Evrard *et al.*, 2010b; Marchand *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2008), was also up-regulated after 29 days of contamination with the higher dose. This up-regulation was maintained after 14 days recovery. These convergent results with those observed in the CYP1A1 expression could confirm the implication of BHMT in detoxification processes.

Besides, Galland *et al.*, (in prep, annexe 1) observed co-accumulation of BHMT and GST and GPx in European flounders experimentally contaminated with this PAHs/PCBs cocktail. They suggested that BHMT could be implied in a pathway leading to the production of glutathione, allowing the excretion of conjugated xenobiotics by GST or anti-oxidative defenses by GPx.

This study considered the use of the comet assay for DNA damage assessment in flounder erythrocytes, like a pertinent marker to reveal the impact of stress in aquatic environments (Frenzilli, Nigro et Lyons, 2009). If the PAH metabolites are well-known genotoxicants (Lee et Steinert, 2003), PCBs genotoxicity remains more controversial, depending on the family compound. In the present study, the increase of the DNA damage detected after a 29 days exposure to the concentrated cocktail, then the return to the baseline level after the restoration period, suggest that the PAHs showing the higher rate of biotransformation by CYP1A1 could be the main inducers of the genotoxicity. This last hypothesis could be probably strengthened by the correlation detected in the previous experimental context (29 days and C2 concentration) between the levels of DNA damage and mRNA CYP1A1. Absence of DNA damage after the recovery period indicates that the DNA damages were repaired, the level of metabolites being below the critical threshold necessary to induce genotoxicity.

However the genotoxicity is not necessarily linked to the direct impact of xenobiotics or of their metabolites on DNA, but could be also related to the production of reactive oxygen species by PCBs (Schleizinger *et al.*, 2006) or by the immune system (*e.g.* TNF system in Yang *et al.*, 2007). We suggest that new explorations on the impacts of mixture of PCBs and PAHs on fish should consider 1) supplementary markers linked to the oxidative stress, 2) larger juveniles to collect bile for the analysis of PAH metabolites, allowing to better explore the relationships between exposition, biotransformation and genotoxicity.

In the present study, the C1 level of food contamination didn't induce alteration of the CYP1A1 expression level or increase of the DNA damage; this contamination level was rather similar to the one observed in the heavily polluted Seine estuary, where significant DNA damages were detected for flatfish (Akcha, Vincent Hubert et Pfohl-Leskowicz, 2003). This difference could be probably explained by the rather limited exposure time in our experiment (30 days). In the field, juvenile flatfish must stay several months in polluted estuaries before significant biomarker responses could be detected (Evrard *et al.*, 2012); furthermore, the high complexity of the mixture of pollutants (PAHs, PCBs, heavy metals,

pesticides,...) in natural systems could also increase the potential effects of the chemical stress on fish populations.

4.3 Immune responses

In the present study, immune biomarkers were clearly modulated by the chemical stress, the decrease of the lysozyme activity being possibly associated to an immunosuppression, whereas the increase of TNF-R and C3 expression levels could indicate an activation of immune system. These results confirm 1) that chemical stress could induce diversified immunomodulatory effects and 2) that a battery of tests is necessary for a better evaluation of the immune system response in polluted environments (Dunier et Siwicki, 1993). The inverse trends suggested by lysozyme *vs* TNF-R / C3 results could be explained by the complexity of the immune system; *i.e.* xenobiotics could lead to alterations that produce apparently contrasted effects: for example, cadmium can elevate lysozyme activity but impair phagocytosis (Bols *et al.*, 2001b).

Furthermore, the contrasted trends detected before must be considered cautiously, considering that they are assessed respectively at the protein *vs* mRNA levels. A higher expression of mRNA is not necessarily accompanied by an increase of protein level; *i.e.* the toxicant which inhibits the activity of protein may increase the transcription of the gene coding for the protein (Nikinmaa et Rytönen, 2011). Thus, Teles *et al* (2011) underlined an increase in TNF α mRNA expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) contaminated with copper but no change in TNF α protein concentration extra-cellular, suggesting that translation of TNF α mRNA or secretion of the TNF α protein by the cell is somehow inhibited. In our experimental context, we suggest that measures at protein level will be necessary in the future to confirm the induction of TNF α and C3.

Several authors had evaluated the modulation of TNF system by the measure of TNF-alpha a cytokine extracellular. But no sequence of TNF-alpha being available for the European flounders, we chose to study the expression of the corresponding cell-surface receptor (TNF-R), thus exploring an indirect response of TNF system. TNF-R is a receptor of TNF system implicated in apoptosis and cell necrosis (Smith, Farrah et Goodwin, 1994) and playing a role during acute inflammation (Wiens et Glenney, 2011). The presence of high contaminant concentrations may be associated with inflammatory response (*e.g.* Leaver *et al.*, 2010; Pacheco et Santos, 2002; Sheir et Handy, 2010). In the present study, the induction of

TNF-R mRNA could be the result of fish inflammatory response for the higher concentration of pollutants (C2). Several studies showed an activation of TNF system in fish exposed to copper (Teles *et al.*, 2011), effluent wastewater (Kerr *et al.*, 2008) and soluble fraction of light cycle oil (Bado-Nilles *et al.*, 2011). Reynaud *et al.* (2005; 2008) observed in carp, *Cyprinus carpio*, an interaction between the immune system and biotransformation, suggesting that the immune system could modulate the biotransformation system; they measured a down regulation in cytochrome P450 content after an injection with TNF-alpha.

In the present study, after 29 days of contamination, the up-regulation of TNF-R had not lead to a down-regulation of CYP1A1 but was associated with an up-regulation of CYP1A1. So, if TNF-alpha down regulated the cytochrome P450, this regulation occurred maybe after mRNA expression, or the TNF-R considered in our study like a proxy of TNF-alpha could in fact respond differentially. To better explore the TNF system response, it will be necessary in the future to consider the TNF-alpha specific sequence of the European flounder.

In our experimental conditions, C3 like TNF-R were up-regulated after 29 days of exposition to the "high" chemical stress; furthermore the C3 up-regulation was also significant for the "moderate" chemical stress. Thus, we suggest that C3 could be a more sensitive biomarker than TNF-R. The complement system is composed of more than 35 soluble plasma proteins and is initiated by one or a combination of four pathways of activation (Amara *et al.*, 2008; Boshra, Li et Sunyer, 2006). C3 is the central protein of complement activation pathways in teleosts like in human (Boshra, Li et Sunyer, 2006; Ye *et al.*, 2011). Complement displays lytic, proinflammatory, chemotactic and opsonic activities, and is associated to nonspecific phagocytic processes (Watts, Munday et Burke, 2001). Some complement components are up-regulated in acute phase responses (Bayne *et al.*, 2001), including the proteins C3 which are upregulated during inflammation (Watts, Munday et Burke, 2001).

Several studies showed an up-regulation of mRNA C3 during an experimental contamination with a complex cocktail of PAHs, alkylphenols and phenol on Atlantic cod, *Gadus morhua* (Holth *et al.*, 2010) or in a field study on winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, comparing polluted vs pristine sites (Straub *et al.*, 2004). In the other hand, Williams *et al.* (2003) observed a down-regulation of C3 in European flounder over polluted sites. Thus, if the C3 and TNF-R mRNA expressions could become pertinent markers in

ecotoxicology, more studies will be necessary to better understand the mechanisms of up or down-regulation of these genes by the contaminants.

In the present study, a significant decrease of the lysozyme activity was detected in our contaminated fish groups compared to the control. Fish lysozyme displays lytic activity against both Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria (Saurabh et Sahoo, 2008). Exposure to pollutants could modulate lysozyme levels but the nature of the modulation seems complex : serum lysozyme activity was elevated in rainbow trout exposed to cadmium, mercury or zinc (Sanchez-Dardon *et al.*, 1999), plasma lysozyme concentration decreased in flounder contaminated with DDT adducts and PCBs (Skouras *et al.*, 2003), whereas no modification in lysozyme concentration was detected in plasma of sea bass submitted to heavy fuel oil or light cycle oil (Bado-Nilles *et al.*, 2009). These differences of responses could be explained by the type and the concentrations of contaminants; however, in many fish studies, the general decrease of lysozyme in contaminated contexts appears as a sensitive biomarker (Bols *et al.*, 2001b; Saurabh et Sahoo, 2008). In our experimental context, the measure of lysozyme level appears like a sensitive immune response to contaminants, a signal being detected after only 14 days of exposition in the "moderately" contaminated fish group.

Considering the whole immune responses to contaminants in the present study, we observed after the 15 days recovery period, a restoration of the biological signals towards the initial levels, whatever the considered marker (lysozyme, TNF-R, C3); thus it seems in our experiment, that the contaminants induce a short-time impact on the immune system.

4.4 Metabolic activity

In the present study, the estimation of the muscle Cytochrome C Oxydase activity (CCO) was considered as a potential proxy of the fish metabolic capacity (Cohen, Nuggeoda et Gagnon, 2001). Within each experimental condition (14 and 29 days exposition period, 15 days restoration period) the interindividual variability of the CCO is relatively high in each fish group (control / low contamination / high contamination), thus no significant difference was detected between groups; however a trend was noted for the highly contaminated group which displayed the highest and the lowest CCO over the whole data set, respectively after 14 days and 29 days of exposition to contaminants. We suggest that the possible increase of the CCO at 14 days for the heavily polluted group could reflect the energetic cost displayed by

fish to cope with the chemical stress; during the first months of their impregnation in polluted estuaries, young flounders displayed a similar energetic metabolism trend (Evrard *et al.*, 2012). On the other hand, the possible decrease of the CCO at 29 days for the heavily polluted group could reveal a possible disruption of the energy metabolism induced by the toxics, as suggested for sub-adult and adult flounders in polluted estuaries (Evrard *et al.*, 2010a).

4.5 Integration of fish responses to chemical stress

After a 14 days contamination period, the factorial analysis underlined the main relationships between the fish groups (control *vs* moderately contaminated *vs* highly contaminated) and the markers. The main part of the variance in PCA was probably not related to the chemical stress, but could be more related to the flounder physiology; in fact, an opposition between two main physiological trends was observed for the flounder, a "high metabolic rate" (high levels for lysozyme, CCO, BHMT and CYP1A1) *vs* a "low metabolic rate" characterized by low levels for the previous markers, and also by high length and specific growth rate. This dichotomy in flounder physiology was first observed in a previous study on juveniles collected in french estuaries: the Seine and the Vilaine (Calvès, 2011). A secondary part of the variance in PCA was related to the chemical stress, the higher levels of DNA damage being clearly observed for the highly contaminated fish group.

A much contrasted situation was observed by the factorial analysis after a 29 days contamination period. The main part of the variance in PCA was here clearly associated to the chemical stress; *i.e.* the highly contaminated fish group displayed high levels for DNA damage, TNF α and CYP1A1, these biomarkers being positively correlated. This result confirms 1) the potential relationships between CYP1A1 activity and DNA damages frequently suggested by different authors (*e.g.* Kleinjans *et al.* van Schooten, 2002; Roy *et al.*, 2003; Wessel *et al.*, 2010) and 2) the link between CYP1A1 activity and immune function in polluted contexts (Reynaud *et al.* Deschaux, 2006).

5. Conclusions

The present study underlined an efficient flounder contamination by the food. Thus, the impact of a mixture of PAHs and PCBs was explored in environmentally realistic conditions.

Particularly after a one month contamination period, several biomarkers were clearly affected by the chemical stress. The detoxification activity increased (higher CYP1A1 expression level) in the same way to the rise of DNA damages; furthermore, the increase of the BHMT expression level could be also associated to the detoxification process. The responses of the immune system to the chemical stress were clearly identified but complex to analyze, considering several modulations in the lysosome activity, and in the expression level of TNF- α and C3.

New experimentations must be considered in the future to analyze thoroughly the links between exposition to complex mixture of pollutants, detoxification-biotransformation, DNA damages and immune responses, adding new markers related to the oxidative stress and the analysis of PAH metabolites in fish bile.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported firstly by the INTERREG IV program: DIESE (50% of a PhD grant was obtained by the first author, for the development of immune markers in ecotoxicology), and secondly by the DEVIL-INERIS program and by the EVOLFISH project (ANR-VMCS). Financial support was also provided by the Canada Research Chair in Environmental Immunotoxicology (Dr. Michel Fournier) and Collège Doctoral International de l'Université Européenne de Bretagne. Authors thank Carole Capitaine for her excellent technical assistance.

Chapitre 3 :

Approche multimarqueurs sur le flet, *Platichthys flesus*, dans la Manche

1 INTRODUCTION

L'expérience de contamination en conditions contrôlées a confirmé que la plupart des biomarqueurs étudiés étaient modulés par la présence de polluants. Nous avons donc ensuite exploré le potentiel de ces différents biomarqueurs dans les populations naturelles de flet, en estuaires plus ou moins contaminés. L'**objectif** de ce travail était donc

- d'évaluer si les marqueurs analysés en laboratoire permettraient de refléter le différentiel de contamination entre les estuaires
- et de continuer à approfondir nos connaissances sur les réponses du flet à la contamination chimique.

Les **marqueurs** utilisés sont donc pour la plupart identiques à ceux de l'expérience en conditions contrôlées : expression des gènes CYP1A1, BHMT, C3 et TNF-R, mesure de l'activité de la CCO, évaluation des capacités de phagocytose et calcul de l'indice de condition (CF). Les dommages à l'ADN et la quantité de lysozyme n'ont pu être mesurés ici ; ce sont des mesures réalisées sur du sang, qui exigent donc des prises de sang, trop laborieuses sur le terrain. L'expérience de contamination ayant soulevé la question de l'implication du stress oxydant dans la réponse de certains marqueurs, Wilfried Sanchez (INERIS) a collaboré à ce projet en mesurant les activités de SOD, Catalase et GPx. Ces analyses sont en cours et seront intégrées ultérieurement au projet de publication présenté ici.

Des juvéniles nés dans l'année (young of the year : YOY ou 0+) et des juvéniles de plus de 1 ans (1+) ont été capturés dans **3 estuaires** de la Manche : la Tamar (Angleterre), la Seine et la Canche (France) (n=30 pour chaque échantillonnage). L'estuaire de la Canche est un estuaire considéré dans de nombreuses études comme site de référence car présentant un faible niveau de contamination (*e.g.* Amara *et al.*, 2007; Amara *et al.*, 2009). La Seine est un estuaire considéré comme très pollué, présentant un mélange très complexe de polluants (HAPs, PCBs, métaux lourds,...) (Loizeau et Abarnou, 1995; Munschy *et al.*, 1996). Enfin la Tamar présente de fortes concentrations en métaux qui sont la conséquence d'anciennes activités minières (Langston *et al.*, 2003).

Une **étude précédente** en génétique de populations, sur plusieurs populations de flets de l'Angleterre au Portugal, a mis en évidence l'existence d'une probable pression de sélection exercée par les polluants, particulièrement en Seine et Tamar ; dans ces deux

estuaires, cette sélection conduirait à une augmentation de l'hétérozygotie pour le locus de l'AMP-desaminase isoform 1 (un gène impliqué dans le métabolisme énergétique). De plus, l'**approche protéomique** réalisée parallèlement à l'étude génétique, a mis en évidence que les sites contaminés (Seine et Tamar) présentaient une abondance en protéines impliquées dans le métabolisme énergétique, le stress oxydatif et les processus de détoxification (annexe 2). La question est donc de savoir si les biomarqueurs explorés en conditions de contaminations expérimentales, peuvent se révéler efficaces pour identifier le caractère vraisemblablement très pollué de la Seine et de la Tamar, relativement à la Canche.

2 RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats sont présentés ici de manière synthétique (Tableau 3). Les corrélations existantes entre les paramètres mesurés ont été calculées pour les estuaires de la Seine et de la Canche en 2010 pour les 2 classes d'âges (0+ et 1+).

Tableau 3. Récapitulatif des résultats des différents biomarqueurs et indicateurs utilisés au cours de cette étude. Phago=capacité de phagocytose, indiv.=individu, reins a.=reins antérieur ou pronéphros, cyto=cytométrie, activ.=activité enzymatique par mesure d'absorbance ou de luminescence, ref. correspond à la valeur de référence pour les comparaisons, un ++ ou - - signifie que la valeur est plus de 2 fois supérieur ou inférieur à la valeur de référence

indice mesuré		detoxification		système immunitaire			metabo.	indices de condition
		CYP1A1	BHMT	phago.	C3	TNF-R	CCO	CF
organe	technique	foie	foie	reins a.	foie	foie	muscle	indiv.
		RT-PCR	RT-PCR	cyto.	RT-PCR	RT-PCR	activ.	indice
terrain - flet								
2009	Canche	ref.	ref.	n.m.	ref.	ref.	ref.	ref.
	Tamar	0	0	n.m.	0	+	0	-
	Seine	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	+	-
2010	Canche 0+	0	0	ref	0	0	0	0
	Canche 1+	0	0	0	0	0	0	0
	Seine 0+	0	+	- -	+	+	++	0
	Seine 1+	0	0	- -	+	+	0	0

Des **dosages de métaux** (Cu, Pb et Cd) ont été réalisés par Ricardo Riso (LEMAR, UMR 6539) sur 3 pools, constitués chacun d'un mélange de 3 foies de flets 0+ échantillonnés respectivement en Seine, Canche et Tamar. Ces dosages confirment que la Canche présente une pollution métallique limitée et qu'à l'inverse la Tamar est fortement contaminée par les métaux lourds ; les concentrations en Cd dans les foies des poissons de la Tamar étant 240 fois plus fortes relativement à celles de la Canche. Notons que la Seine présente des concentrations de métaux intermédiaires entre Tamar et Canche.

L'indice de condition (**CF**) est plus faible en 2009 pour les poissons de la Seine et de la Tamar, relativement à ceux de la Canche ; cette différence n'apparaissant plus en 2010. Il est donc possible qu'en 2010, la présence de facteurs confondants plus favorables aux poissons en Seine et Tamar (abondance de proies, salinité...) aient masqué l'effet des polluants.

En conditions expérimentales, l'activité de la **CCO** ne montrait pas de modulation nette liée à la présence de polluants (Chapitre 2) ; par contre, en milieu naturel, l'activité de la CCO est différente entre les sites pour la cohorte 0+. Les flets de la Seine présentent en effet une activité de la CCO plus élevée relativement à ceux de la Canche ; elle pourrait refléter un surcoût énergétique pour les poissons contaminés, lié aux mécanismes de protection/réparation vis-à-vis des polluants.

Au niveau des processus de **détoxication**, l'expression du **CYP1A1** ne semble pas être induite dans les sites contaminés. Par ailleurs, la **BHMT**, qui est aussi liée à la détoxication, est induite en Seine pour la cohorte 0+. De plus, l'étude protéomique montre une augmentation de la quantité de GST sur l'estuaire de la Seine et de la Tamar relativement à la Canche (Annexe 2), associée aux processus de détoxication. Au final, une activation des processus de détoxication semble évidente en Seine ; l'expression du CYP1A1 pourrait être potentiellement inhibée par la présence de perturbateurs endocriniens révélés sur la Seine par l'étude en protéomique (Annexe 2). Rappelons de plus, qu'il n'y pas forcément de corrélation entre la mesure au niveau de l'ARNm et l'activité enzymatique de la protéine. La mesure de l'activité EROD dépendante du CYP1A1 permettrait à l'avenir de mieux comprendre la réponse du flet à la contamination dans l'estuaire de la Seine.

Parallèlement à notre expérience de contamination expérimentale, l'expression des gènes **TNF-R** et **C3** est augmentée dans les estuaires pollués. L'expression du C3 pourrait être un indicateur moins sensible à la pollution métallique de la Tamar, puisqu'il n'est induit qu'en Seine alors que le TNF-R est activé en Seine et Tamar. L'hypothèse la plus probable est que la présence de polluants entraînant une inflammation, le système du complément et le TNF étant impliqués dans la réponse inflammatoire seraient alors activés. Par ailleurs, la **capacité de phagocytose** est diminuée aussi bien pour la cohorte 0+ que 1+ de la Seine par rapport à la Canche en 2010. Cela suggère que le stress chimique peut exercer un effet immunosuppresseur qui pourrait fragiliser à termes les populations très polluées, en les rendant moins résistantes aux pathogènes.

Cette approche multiparamètres confirme que certains marqueurs testés en laboratoire peuvent être également pertinents pour diagnostiquer la qualité des milieux estuariens.

Néanmoins, la présence de facteurs confondants rend souvent difficile l'interprétation des résultats. La réponse des biomarqueurs explorés dans cette étude (au niveau du métabolisme énergétique, des activités de détoxification et du système immunitaire) montre que les poissons de Seine présentent des différences très tranchées dans leurs réponses, relativement à ceux de la Canche. Nos biomarqueurs différencient assez faiblement les poissons de la Tamar relativement à ceux de la Canche, ce qui pourrait confirmer la nature différentielle du stress dans cet estuaire, probablement liée aux métaux. La mise en œuvre de marqueurs plus spécifiques de la contamination métallique en Canche devrait nous permettre d'explorer cette dernière hypothèse.

Assessment of the European flounder responses to chemical stress in the British Channel, by a multiparametric approach

Célie Dupuy^{a,b}, Claire Galland^a, Wilfried Sanchez^c, Ricardo Riso^a, Matthieu Waeles^a, Vianney Pichereau^a, Michel Fournier^b, Louis Quiniou^a, Jean Laroche^a

^a Université Européenne de Bretagne, Université de Bretagne Occidentale, UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin LEMAR, Institut Universitaire Européen de la Mer, 29280 Plouzané, France

^b Institut National de la Recherche Scientifique - Institut Armand-Frappier (INRS-IAF), 31 Boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

^c Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques, Pôle "Dangers et impact sur le vivant", Unité d'écotoxicologie in vitro et in vivo, Parc Technologique ALATA, 60550 Verneuil en Halatte, France

En préparation

ABSTRACT

A multibiomarker approach was developed to evaluate the juvenile European flounder responses in three contrasted estuaries over the British Channel : the Canche (a pristine site), the Tamar (an estuary displaying a heavy metal stress) and the Seine (a heavily polluted system by a diffuse contamination). The condition factor (CF) and several biomarkers of the immune system (Phagocytosis and gene expression of complement component C3 and TNF-receptor), energetic metabolism (activity of the Cytochrome C oxidase: CCO), detoxification process (expression levels of Cytochrome P450 1A1: CYP1A1 and betaine homocysteine methyl transferase: BHMT) were investigated on young-of-the-year (0+) and one-year-old (1+) flounders. The results underlined the difference between the pristine site and the Seine which showed a modulation of the immune system (lower phagocytosis capacity and up-regulation of C3 and TNF-R mRNA), a higher CCO activity, an up-regulation of BHMT

expression level and a lower CF. The results confirmed the relationship between the immune system and the detoxification processes in the heavily polluted Seine system. The CYP1A1 gene expression was not modulated in the contaminated systems compared to the pristine site; this result, particularly in the Seine estuary, could suggest the presence of inhibitors of this activity in the field or a possible adaptation in the chronically contaminated flounder population. Finally, the limited multibiomarker responses for juvenile flounders in the Tamar estuary, could be linked to the specific contamination context of this estuary.

Keywords: immunotoxicity, pollution, fish, estuaries, gene expression, *Platichthys flesus*

1 INTRODUCTION

Coastal systems like bays or estuaries are essential nursery areas for juvenile fish displaying high densities, pronounced growth rate, and being submitted to a low predation risk (Beck *et al.*, 2001). These environments are characterized by a high potential of fish production (Dolbeth *et al.*, 2008), and are considered as essential ecosystems for the renewal of fisheries resources; many of the juvenile fish living in estuaries being commercially important marine species (Cowley et Whitfield, 2002; Houde et Rutherford, 1993; Lamberth et Turpie, 2003). Quality of these coastal nurseries is crucial for the fish early life-stages (Florin, Sundblad et Bergström, 2009) and is linked to complex interactions between biotic factors (*i.e.* population density, inter-specific competition) and abiotic parameters (*i.e.* temperature, salinity, dissolved oxygen, sediment nature, food availability,...) (Ramos, Ré et Bordalo, 2009; Yamashita, Tanaka et Miller, 2001). Nevertheless, estuaries are also characterized by a high level of human activities and display frequently high levels of xenobiotics in water and sediment (Courrat *et al.*, 2009)

The flatfish are particularly sensitive to the effects of pollution, as benthic species tightly linked to sediments which are frequently contaminated by complex mixtures of toxics (Johnson *et al.*, 1998). In this study, the responses of the European flounder (*Platichthys flesus*) were explored in three estuaries in the English Channel; the flounder being considered as a pertinent sentinel species for the diagnostic of the water quality in Europe (Laroche *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2011). Moreover, the European flounder juveniles stay two or three years in estuary, until the maturation process (Skerritt, 2010; Stevens, Maes et Ollevier,

2006); thus, they showed an increase of cellular damage, energetic request and detoxification rate related to the growing exposure time to stress in polluted estuaries (Evrard *et al.*, 2012).

In the present study, the fish responses were compared in three contrasted estuaries over the English Channel : the Tamar in England and the Seine and Canche in France. Hagger *et al* (2008) compared the responses of *Mytilus edulis* in several estuaries along the South-West coast of England, and considered that the Tamar estuary is a site at risk; the mussel displaying in this system low phagocytosis activity, high lysosomal damage and high acetylcholinesterase activity. Mining was a feature of the Tamar for at least nine centuries (Langston *et al.*, 2003), thus load of tin, copper, lead, silver, iron, arsenic, zinc, tungsten and manganese could be high in the sediment. On the other hand, the PCBs and PAHs concentrations could be low (Langston *et al.*, 2003; Law *et al.*, 1997), thus low 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity was detected in Tamar Eels (*Anguilla anguilla*) (Doyotte *et al.*, 2001).

The Canche estuary was considered as a pristine site in previous studies (Amara *et al.*, 2007; Amara *et al.*, 2009; Gilliers, Amara et Bergeron, 2004); the heavy metals and PAHs concentrations being lower in Canche *vs* in Seine sediments. Furthermore, the fish showed higher condition index and marked growth rate in Canche *vs* Seine (Amara *et al.*, 2007; Amara *et al.*, 2009). The Seine estuary undergoes a diffuse contamination (complex mixture of chemicals: heavy metals, PCBs, PAHs,...) similar to the one reported in heavily polluted estuaries of North America (Munschy *et al.*, 1996); thus, this high pollution level can induce high EROD activity (Minier *et al.*, 2000) and reduced fecundity (Marchand *et al.*, 2004) in the Seine flounder population.

A population genetics study was recently conducted on the European flounder, considering the three previous systems (Tamar, Canche and Seine) and other southern estuaries, along the Atlantic coast (Calvès, 2011); the exploration of the polymorphism of a candidate gene involved in the energetic metabolism, the AMP-desaminase isoform 1 (AMPD1), was carried out focusing on the exon 1, and underlined the highest heterozygosity in the most polluted populations (Seine, Tamar) and their marked genetic differentiation with the other group of populations including the Canche. Finally, this population genetics study suggests that cocktails of pollutants act as selective agents directly or indirectly on the AMPD1 locus, in chronically contaminated flounder populations in the British Channel (Calvès, 2011). The comparisons of liver proteomes in the European flounder from the previous Channel estuaries, also confirmed that the Seine and the Tamar displayed common

trends which differentiate them from the Canche, *i.e.* an increase of the energetic metabolism, oxidative stress and detoxification process, which could be related to the high level of chemical stress (Galland *et al.*, 2012).

Considering the pertinence of the European flounder as a sentinel species, and the previous genetics and proteomics approaches conducted on this species over the English Channel, the main objective of the present study is to improve our knowledge on the impact of chemical stress on flounder, considering several molecular and physiological biomarkers in the previous estuaries (Tamar, Canche, Seine).. The measure of condition factor was considered as a global indicator of fish health status. The immune system responses were explored by the measure of phagocytosis capacity of anterior kidney cells and by the assessment of the liver gene expression level of the Complement component C3 (C3) and of the tumor necrosis factor receptor (TNF-R). TNF-R is a protein of the TNF system, implicated in apoptosis and cellular necrosis (Smith, Farrah et Goodwin, 1994). Moreover the TNF system and complement are involved in inflammatory responses (Bayne *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2012; Watts, Munday et Burke, 2001). C3 is the central protein of the complement system which is implicated in the modulation of phagocytosis, lysis of cells and inflammatory response (Boshra, Li et Sunyer, 2006; Qi *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2011). The liver gene expression levels of Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) and betaine homocysteine S-methyltransferase (BHMT) were also assessed; CYP1A1 playing a major role in the fish biotransformation of many xenobiotics (Sarasquete et Segner, 2000) and BHMT being also involved in fish detoxification process and/or oxidative stress response (Evrard *et al.*, 2010a; Marchand *et al.*, 2006). Lastly, the Cytochrome C oxidase (CCO) enzymatic activity was measured, CCO being the complex IV of electron transport chain of the mitochondria; thus CCO could be considered as a potential proxy of the fish metabolic capacity (Cohen, Gagnon et Nugegoda, 2005; Pelletier *et al.*, 1994)

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Fish sampling and cell preparation

Juveniles were collected by a beam-trawl in September-October 2009 and 2010, in three estuaries over the Channel (Fig. 1): the Canche (n=30, in 2009 and 2010), the Tamar (n=30 in 2009) and the Seine (n=30 in 2009; n=34 in 2010). Fish were killed by cervical dislocation, just after the catch. Their total length and total and gutted-carcass weight were

measured. The liver and a part of muscle were flash-frozen and stored at -80°C. Otoliths were removed for ageing.

The head kidney of each fish was aseptically removed. Pronephric cell suspensions were obtained by homogenization of head kidney with a syringe valve against a steel grid with 1ml of medium. The medium used throughout the assays, consisted of steril RPMI 1640 supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) from Biomedica (Montreal, Quebec, Canada), 0.5 mg/mL sodium pyruvate, penicillin (100 U/mL)/streptomycin (100 mg/mL), and buffered with 10 mM Hepes (pH 7.4) (Brousseau *et al.*, 1999). Cells were counted with hemocytometer by the microscope, using trypan blue dye exclusion (0.4%). Viability was over 90%.

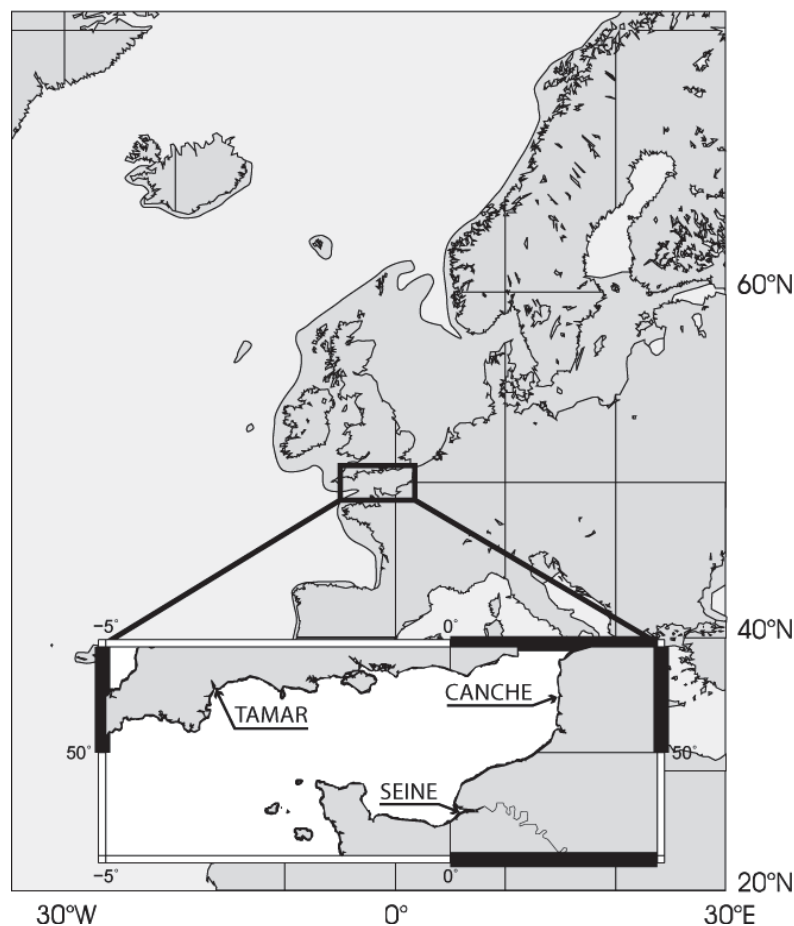


Fig. 1 The three sampling sites in the British Channel

2.2 Biometric indexes

The body condition factor (CF) was calculated by the formula: $CF = 100 \times W / L^3$, where W is gutted-carcass weight (g) and L is standard length (mm) of each fish.

Age of each fish was assessed by reading otoliths by a binocular.

2.3 Metals analysis

For each estuary, three pools of three liver samples (~100 mg) were mineralized in 3 mL nitric acid (65%, Suprapur, Merck). After dilution (10 mL), concentrations of Copper (Cu), lead (Pb) and Cadmium (Cd) were assessed by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS).

A Perkin-Elmer SIMAA 6100 working in the single element monochromator mode was used for all atomic absorption measurements. End-capped pyrolytic coated graphite tubes equipped with integrated platforms were used. The inert gas was argon. Samples were delivered to the furnace using a Perkin-Elmer AS-800 auto-sampler and stored in acid washed polypropylene cups prior to injection. The light sources were Perkin-Elmer hollow cathode lamps. Calibration curves were drawn up and, when necessary, solutions were diluted before measurements were taken. Dilutions were carried out with calibrated Gilson Pipetman pneumatic syringes. For the determination of Cu, a 2300 °C atomization temperature was used; for Pb and Cd, a 1800 °C atomization temperature was used. Furnace programs have been optimized in previous works (Cabon *et al.*, 2007; Salomon, Giamarchi et Le Bihan, 2000). No pretreatment step was used for the determination of metals in these different solutions. The detection limits of metals were respectively: 0.2 µg l⁻¹ for Cu, 0.05 µg l⁻¹ for Cd, and 0.5 µg l⁻¹ for Pb.

Standard solutions of Cu, Pb and Cd (1 g.L⁻¹ in 0.5 M HNO₃, Merck solutions) were used to build calibration curves. All dilutions were prepared in Milli Q water (18.2 MΩ cm⁻¹).

2.4 CCO (Cytochrome C oxidase)

CCO activity was measured at 22°C by a microplate spectrophotometric assay in muscle S9 fraction (Smith et Conrad, 1956; Théron, Guerrero et Sebert, 2000). Absorbance changes were monitored at 550nm during 8min. Protein concentrations were determined by the method of Bradford using bovine serum albumin as a standard (BIO-RAD Laboratories, USA).

2.5 Phagocytosis

Capacity of phagocytosis was assessed by the method described by Brousseau et al. (1999). Briefly, fluorescent latex beads (d=1.7µm, Polysciences, Warrington, USA) were

added to pronephric cell suspensions (10^6 cells/ml) in order to respect the 100:1 beads to cell ratio. The cells were incubated 18h at ambient temperature ($20^{\circ}\text{C}\pm 1$). Then, cell suspension was layered over a 3% bovine serum albumin gradient and cells recovered by centrifugation at 150g for 8 min in order to remove the free beads. Cell pellets were then resuspended in 0.5 ml of 0.5% formaldehyde and 0.2% sodium azide diluted in phosphate buffer saline (PBS). Cells can be kept in one week. Cells were analyzed by flow cytometer (FACSCalibur cytometer, Becton Dickinson, San José, USA) and 10000 events were recorded. The efficiency of phagocytosis was determined by the percentage of cells having three or more beads in macrophage gate.

2.6 Gene expression

The procedure used to measure the gene expression level is similar to that described by Calvès (2011).

Total RNA was isolated using Trizol reagent (Applied Biosystems) at a concentration of 1ml/50mg of tissue. Each liver was homogenized in Trizol using a Precellys-24 ceramic bead-based homogenizer (Bertin Technologies). Samples were treated with RTS DNase Kit (MO BIO) to prevent DNA contamination. The purity and concentration of sample were determined using a NanoDrop 8000 spectrometer (Thermo Scientific). Purity was assessed using the ratios A260/A230 and A260/A280. RNA quality was assessed using the 2100 Bioanalyzer Agilent (Agilent Technologies) or by migration on agarose gel (1.5%). Reverse transcription (RT) was carried out using 1µg total RNA from each sample with RevertAid H minus First Strand, cDNA Synthesis Kit® (Fermentas). A RT was carried out using a RNA mixture of samples from each experimental condition. This mixture is a control used on each run of real-time PCR.

The mRNA expression level was explored for the following genes: BHMT, C3, TNF- α and CYP1A1. Two housekeeping genes were tested : alpha-tubulin and 18S. No significant differences of Ct were observed for alpha-tubulin between the control and the contaminated fish; furthermore Alpha-tubulin showed the lowest variation coefficient, and thus was retained as the housekeeping gene in our analysis. Primers of CYP1A1, Alpha-tubulin, 18S and BHMT were obtained in the literature (Table 1). Primers of C3 and TNF-R were designed considering the sequences available on GENE BANK and using Primer 3 software (Rozen et Skaletsky, 1999).

Table 1. Primer sequences used to RT-PCR

Gene	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')	origin
α -Tubuline	CAC-AGC-CTC-ACT-TCG-TTT-TG	AGA-TGA-CAG-GGG-CAT-AGG-TG	Leaver et al. (2010)
18S	GTC-TGG-TTA-ATT-CCG-ATA-ACG-AAC-GAG-ACT-CTA	TGC-TCA-ATC-TCG-TGT-GGC-TAA-ACG-CCA-CTT-G	Evrard et al. (2010)
CYP1A1	GCC-AAC-GTG-ATC-TGC-GGA-ATG	AAG-CCG-ACC-AGC-TCC-TGA-TC	Calves et al. (2011)
BHMT	AGA-GAG-GCC-TAC-AAG-GCT-GG	GTG-TGC-ATC-TCC-AGA-CCA-GCG-C	Evrard et al. (2010)
TNF-R	CAG-CCG-AAT-CTC-AGT-GAT-GG	CAG-TTG-GAT-GCC-AAG-TCA-GC	design of ES443667.1
C3	ACG-ATG-AAA-GTG-GGC-GTC-TT	TGC-AGT-TCT-CTT-CGG-CAC-AT	design of EC379465.1

The real-time PCR (RT-PCR) amplifications were carried out in triplicate with the Absolute QPCR SYBR Green ROX Mix (Thermo Scientific) The final volume of reaction was of 25 μ l with 1 μ l of cDNA (1/40 dilution), 12,5 μ l of ABSolute QPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientif), 1.75 μ l of each primer (1 μ M) and 8 μ l of water. A negative control was carried out (each total RNA sample with DNase treatment). Each run included cDNA of sample, cDNA of mixture used like control and blank controls (water) analyzed for each primer pair. The RT-PCR were carried out using a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) with RT-PCR thermal cycling program as follow : 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, then 40 cycles at 95°C for 15s follow by 1min at 60°C. A melt curve was carried out to confirm the specificity of the reaction with the program following: 95°C for 15s, 60°C for 30s and an increase of temperature by 0.5°C each 15s to 90°C. PCR efficiency (E) was determined for each primer pair by determining the slopes of standard curves obtained from serial dilution analysis of cDNA. Relative expression of the target gene was calculated with the Pfaffl formula (2001) using Alpha-tubulin like reference gene :

$ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta CP_{target}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(control-sample)}}$. The ratio of a target gene is expressed in a sample versus a control in comparison to a reference gene. E_{target} is the real-time PCR efficiency of target gene transcript; E_{ref} is the real-time PCR efficiency of a reference gene transcript; ΔCP_{target} is the CP deviation of control – sample of the target gene transcript; ΔCP_{ref} = CP deviation of control – sample of reference gene transcript.

2.7 Statistical analyses

Statistic tests and box plot graphs were carried out using Statistica 10.0 (StatSoft). The variables were not normally distributed, so the Kruskal-Wallis (KW) test was used for inter-condition comparisons. When KW test was significant ($p \leq 0.05$), it was followed by a post-hoc test: a multiple bilateral comparisons of mean ranks.

The relationships between quantitative data (L, CF, phagocytosis, CCO and the gene expression level for C3, TNF-R, CYP1A1 and BHMT) were investigated using nonparametric tests (Pearson's correlation).

3 RESULTS

3.1 Metals analysis

Over the three estuaries, the lowest concentrations of liver metals (for Cu, Pb or Cd) were detected in the Canche estuary (Table 2). The concentration of Cu and Pb in fish liver was respectively five and two times lower in the Canche compared to the Seine and Tamar. On the other hand, the Cd level appeared very low in the Canche compared to the other estuaries; it was 30 times and 240 times lower in the Canche compared respectively to the Seine and Tamar (Table 2).

Table 2. Loads of metals detected in liver of flounder young juveniles (0+ cohort) from the Seine, Canche and Tamar

	Cu ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Pb ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Cd ($\mu\text{g.g}^{-1}$)
Canche	1.833 ± 0.31	0.087 ± 0.03	0.009 ± 0.001
Seine	9.2 ± 0.73	0.19 ± 0.11	0.257 ± 0.03
Tamar	8.6 ± 1.67	0.127 ± 0.01	2.167 ± 1.16

3.2 Biometric indexes

In 2009, the condition factors of the young of the year cohort (Y0Y or 0+) collected in the Seine and the Tamar estuaries were lower than the one estimated for the Canche (Fig 2). Furthermore, in the same year, the average fish length in Canche was lower than those observed in Seine and Tamar (Table 3). In 2010, no significant difference of the condition factor was detected between estuaries, whatever the considered cohort: 0+ or 1+ (Fig 2), but the average fish length of the 1+ cohort was higher in Seine compared to Canche (Table 3). Finally, the average fish length of the 0+ cohort in Seine was lower in 2010 compared to 2009 (Table 3).

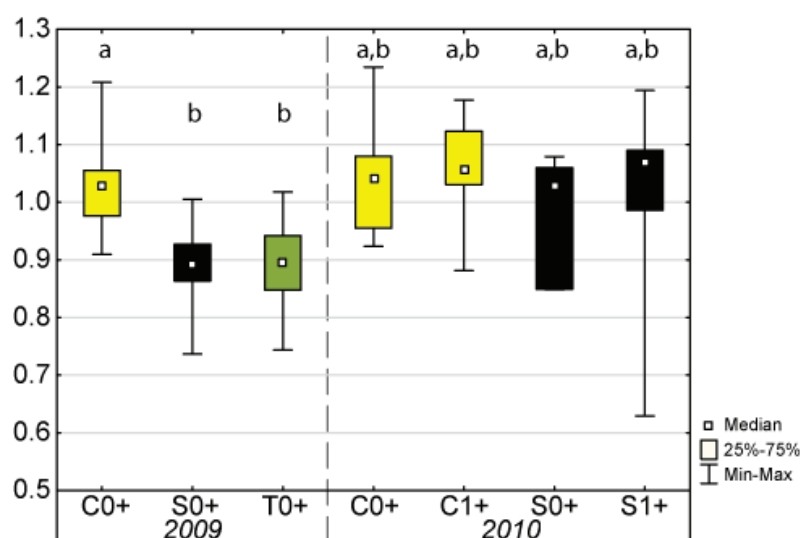


Fig 2. European flounder condition factor in the Canche (C), Seine (S) and Tamar (T), considering 0+ and 1+ cohorts. (Statistics: letters indicate significant differences between populations; $P < 0.05$)

Table 3. Average fish total length $\pm$ SD, of the 0+ and 1+ cohorts in the Canche (C), Seine (S) and Tamar (T). (Statistics : * significant difference between estuaries, in the same year ($p < 0.05$), # significant difference within the same estuary, between 2009 and 2010 ($p < 0.05$))

total length $\pm$ SD	
2009	
C0+	10.2 $\pm$ 1.0 *
S0+	13.5 $\pm$ 1.7
T0+	11.8 $\pm$ 2.1
2010	
C0+	9.65 $\pm$ 1.4
C1+	12.0 $\pm$ 3.2
S0+	9.75 $\pm$ 1.7 #
S1+	17.9 $\pm$ 3.2 *

3.3 CCO

In 2009 and 2010, the Seine YOY cohort showed a higher CCO activity compared to the one observed for the Canche YOY cohort (Fig 3); no significant difference of CCO activity was observed between Tamar and Canche in 2009. In 2010, no significant difference in the CCO activity of the 1+ cohort was detected between Seine and Canche (Fig 3).

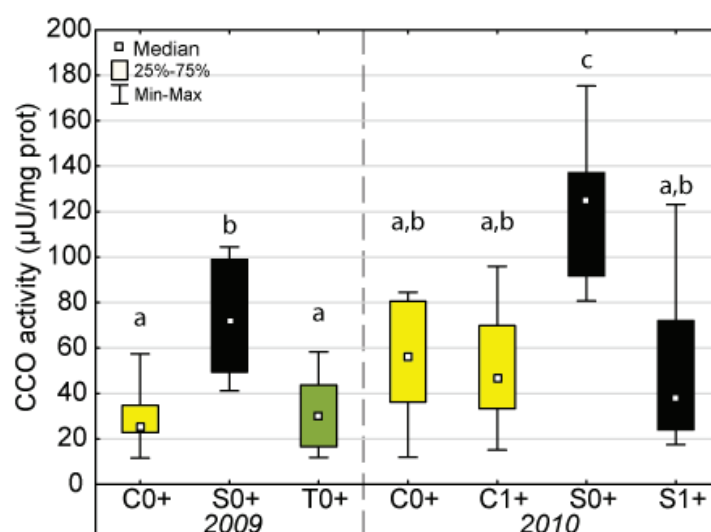


Fig 3. CCO activities of flounders from the Canche (C), the Seine (S) and the Tamar (T) considering 0+ and 1+ cohorts. (Statistics: letters indicate significant differences between populations; $P < 0.05$)

3.4 Phagocytosis

0+ and 1+ cohorts showed a significantly lower phagocytosis capacity in Seine compared to Canche (Fig 4).

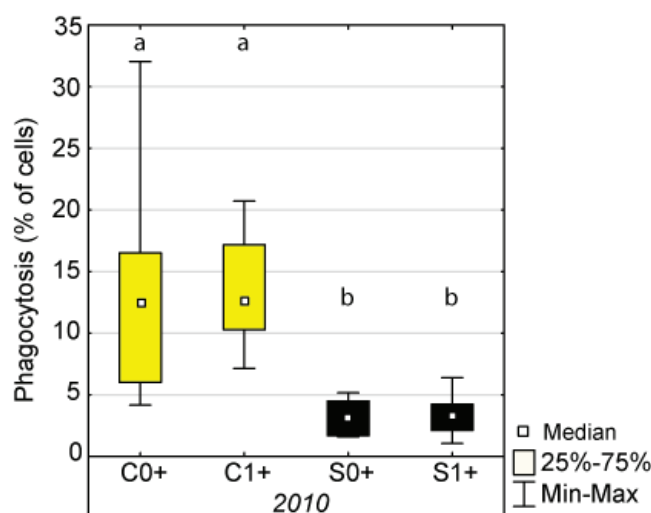


Fig 4. Phagocytosis capacity (percentage of cells that have engulfed three beads and more) of flounders from the Canche (C) and Seine (S), considering 0+ and 1+ cohorts. (Statistics: letters indicate significant differences between populations; $P < 0.05$)

3.5 Gene expression

In 2009, no significant difference was detected between the YOY BHMT expression levels in the Canche vs in the Tamar estuaries (Fig 5). In 2010, an up-regulation of the YOY BHMT expression level was observed in Seine compared to Canche; this trend between the two estuaries being not confirmed for the 1+ cohort..

No significant difference of CYP1A1 expression level was detected between the estuaries, in 2009 as in 2010, considering the 0+ or 1+ flounder cohorts (Fig 5).

No significant difference of the C3 expression level was detected between the YOY cohorts in Canche vs Seine; on the other hand, a significant C3 up-regulation was observed in Seine vs Canche considering the 0+ and 1+ cohorts (Fig 5).

A general up-regulation of the TNF-R expression level was apparent in Tamar-Seine vs Canche, considering the 0+ and 1+ cohorts. (Fig 5).

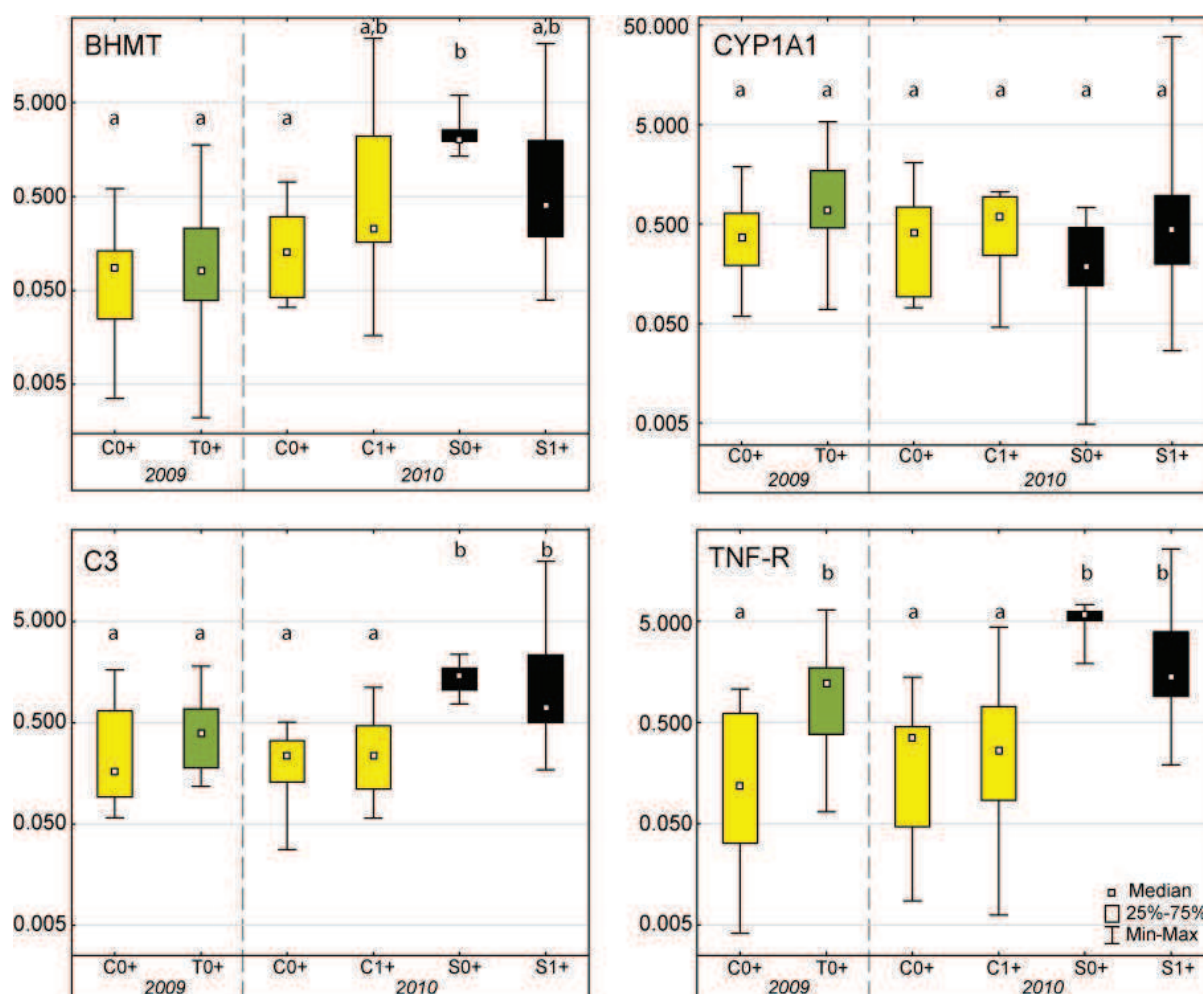


Fig 5. Relative expression of 4 transcripts (BHMT, CYP1A1, C3 and TNF-R) in European flounders from the Canche (C), Seine (S) and Tamar (T) considering 0+ and 1+ cohorts. (Statistics: letters indicate significant differences between populations; P<0.05)

3.6 Correlation between biomarkers

The correlation data revealed contrasted results between the estuaries; no significant correlation between biomarkers was detected in the Tamar and Canche 0+ cohorts, whereas two, three and eight significant correlations were observed respectively in the Canche 1+, Seine 0+, Seine 1+ cohorts (Table 4 with Tamar data not showed).

Thus, correlations were detected between :

- phagocytosis and C3 expression ($R=0.68$), CYP1A1 and C3 expressions ($R=0.71$), in the Canche 1+ cohort;
- phagocytosis and condition factor ($R=-0.94$), CCO and condition factor ($R=0.83$), CYP1A1 and BHMT expressions ($R=0.83$), in the Seine 0+ cohort;
- condition factor and BHMT ($R=-0.60$), condition factor and CYP1A1 level ($R=-0.63$), CCO and BHMT ($R=0.61$), C3 and BHMT expressions ($R=0.58$), CYP1A1 and BHMT ($R=0.77$), C3 and TNF-R expressions ($R=0.49$), C3 and CYP1A1 expressions ($R=0.44$), and finally TNF-R and CYP1A1 expressions ($R=0.47$), in the Seine 1+ cohort

Table 4. Pearson's correlation between standard length (L), condition factor (CF), phagocytosis capacity (phago.), CCO activity and expression of 4 transcripts (BHMT, CYP1A1, C3 and TNF-R) measured in flounder 0+ and 1+ cohorts, from the Seine and Canche in 2010. (red values in the matrix were significantly different from 0, with $p<0.05$).

Seine - YOY									Canche - YOY								
	L	CF	phago.	CCO	BHMT	C3	TNF-R	CYP1A1		L	CF	phago.	CCO	BHMT	C3	TNF-R	CYP1A1
L	1.00	-0.13	0.03	-0.43	0.77	0.49	-0.10	0.37	L	1.00	0.26	-0.41	-0.31	-0.48	-0.12	0.04	-0.26
CF		1.00	-0.94	0.83	-0.49	0.43	-0.20	-0.43	CF		1.00	0.24	-0.07	-0.46	0.12	-0.68	-0.15
phago.			1.00	-0.77	0.43	-0.66	0.10	0.49	phago.			1.00	0.18	-0.21	0.32	0.19	-0.48
CCO				1.00	-0.60	0.40	-0.40	-0.60	CCO				1.00	-0.38	0.13	-0.45	-0.02
BHMT					1.00	0.26	-0.50	0.83	BHMT					1.00	0.07	-0.26	0.21
C3						1.00	-0.20	-0.03	C3						1.00	-0.29	0.42
TNF-R							1.00	-0.70	TNF-R							1.00	0.05
CYP1A1								1.00	CYP1A1								1.00

Seine - 1+									Canche - 1+								
	L	CF	phago.	CCO	BHMT	C3	TNF-R	CYP1A1		L	CF	phago.	CCO	BHMT	C3	TNF-R	CYP1A1
L	1.00	-0.02	-0.26	-0.43	-0.19	-0.31	0.22	0.29	L	1.00	-0.67	-0.27	-0.22	-0.02	-0.53	0.50	-0.25
CF		1.00	0.17	0.29	-0.60	-0.32	-0.11	-0.63	CF		1.00	0.24	0.01	-0.08	0.22	-0.48	-0.04
phago.			1.00	-0.27	-0.25	0.12	-0.08	-0.25	phago.			1.00	-0.54	0.10	0.68	-0.47	0.42
CCO				1.00	0.61	0.52	0.24	-0.08	CCO				1.00	-0.44	-0.24	-0.11	-0.38
BHMT					1.00	0.58	0.39	0.77	BHMT					1.00	0.27	0.25	0.53
C3						1.00	0.49	0.44	C3						1.00	-0.14	0.71
TNF-R							1.00	0.47	TNF-R							1.00	-0.12
CYP1A1								1.00	CYP1A1								1.00

4 DISCUSSION

4.1 Contaminant load in fish tissue

In the present study, the analysis of heavy metals in fish liver (Cu, Pb, Cd) underlined limited metallic concentrations in the Canche estuary, compared to the polluted sites: the Seine and Tamar. This analysis confirms the pristine character of the Canche estuary, where low levels of heavy metals and PAHs were detected in previous studies on sediments of the Canche (Amara *et al.*, 2007; Amara *et al.*, 2009). A high Cd concentration in adult flounder liver was also detected in the past for the Seine estuary (average Cd concentration $\approx 0.9 \mu\text{g.g}^{-1}$ in Marchand *et al.* 2004); this three times higher Cd concentration relatively to the present study on juveniles in Seine, being probably explained by bioaccumulation linked to fish aging.

Furthermore, in the present study, the Cd concentration in fish liver from the Tamar was 10 and 240 times higher than those detected respectively in the Seine and Canche and confirmed that the ancient mining activities (Langston *et al.*, 2003) led to a chronicle metallic contamination in the Tamar estuary.

4.2 Biometric index

The condition factor is considered in the bibliography as a proxy of the fish health status, based on the general assumption that, for a given length, the heavier fish are in better condition (Froese, 2006). Thus the condition factor could be considered in ecotoxicology as a first-level screen to identify the impact of a potential chemical stress (van der Oost, Beyer et Vermeulen, 2003). For example, Amara *et al.* (2007) underlined that the juvenile soles (*Solea solea*) displayed a higher condition factor in the Canche compared to polluted sites in the same area.

In the present study, the significantly lower condition factor for the 0+ cohort in the polluted Seine and Tamar estuaries compared to the Canche in 2009, was not confirmed in 2010 where no difference was detected between the estuaries, considering the 0+ and 1+ cohorts. We suggest that in 2009, the limited flounder condition factor in Seine and Tamar could indicate a poor fish health status in polluted systems, whereas in 2010 confounding factors not directly linked to the pollutants (abundance of prey (Dutil, Lambert et Chabot,

2003), salinity (Lambert, Dutil et Munro, 1994), sex and climate (Guimaraes *et al.*, 2009; Lambert et Dutil, 1997)) could mask the impact of chemical stress.

4.3 Energetic metabolism

The Cytochrome C Oxydase (CCO) forms complex IV of the mitochondrial chain, and catalyses the transfer of electrons from reduced cytochrome c to molecular oxygen (Tsiftoglou, Tsamadou et Papadopoulou, 2006); thus, the CCO activity is an indicator of aerobic metabolism (Gagnon et Holdway, 1999). Several experiments highlighted a CCO activity decrease in fish submitted to petroleum hydrocarbons (Cohen, Gagnon et Nugegoda, 2005) or metals (Couture, Rajotte et Pyle, 2008). Other experimental contaminations could lead to an enhancement of fish CCO activity (*e.g.* Gagnon, 2002; Garceau, Pichaud et Couture, 2010).

In the present study, the 0+ cohort displayed a higher CCO activity in Seine vs Canche, in 2009 and 2010. On the other hand, the CCO activities of the Tamar 0+ cohort and of the Canche and Seine 1+ cohorts were similar to the Canche 0+ cohort activity. We suggest that the high level of chemical stress in the Seine could increase the aerobic respiration of young juveniles, thus reflecting the energetic cost displayed by fish to cope with the stress; in such increasing cost context, the positive correlation between the CCO activity and the condition factor highlights that a high metabolic rate is necessary to maintain fish condition. A similar increase of the energetic production was observed for flounder young juveniles exposed to the growing effect of pollutants from summer to autumn in a contaminated estuary (Evrard *et al.*, 2012).

The baseline level of the CCO activity observed for the Seine 1+ cohort (similar to the Canche 1+ cohort CCO level) could be linked:

- (1) to the effect of increasing age and decreasing growth rate classically described for juvenile fish in estuaries (Fonseca, Vinagre et Cabral, 2006), thus allowing a better capacity for fish to respond to stress;
- (2) to a possible selective pressure induced by contaminants on genes involved in the energetic metabolism (Calvès, 2011), that could select in the population the genotypes able to reduce the energetic cost of the stress response.

The apparent absence of any pollution effect on the CCO activity of the Tamar 0+ cohort could be linked to the differential nature of the cocktail of contaminants in this system,

mainly characterized by heavy metals, compared to the Seine displaying a complex mixture of pollutants linked to domestic, industrial and agriculture effluents (Cachot *et al.*, 2012).

4.4 Detoxification activities

As methyl transferase could step in phase II conjugation reactions, BHMT has been proposed to act as a detoxification enzyme and/or to be involved in oxidative stress response (Evrard *et al.*, 2010b; Marchand *et al.*, 2006). In the present study, the up-regulation of the BHMT expression was only observed for the 0+ cohort in the heavily polluted Seine system compared to the same cohort in the pristine Canche system; no alteration of the BHMT expression being detected in the polluted Tamar estuary. This differential BHMT regulation in flounder 0+ cohort in Seine vs Canche strengthens our previous hypothesis on the different nature of the chemical stress in these two systems.

No significant alteration of the CYP1A1 expression was observed in the polluted systems (Tamar and Seine) vs the pristine estuary (Canche), considering the 0+ and the 1+ cohorts. The Tamar pollution was mainly characterized by high concentrations of heavy metals but moderate levels of PCBs and PAHs (Langston *et al.*, 2003; Law *et al.*, 1997), thus inducing low EROD activity particularly in the Eel, *Anguilla Anguilla* (Doyotte *et al.*, 2001).

In the present study, the lack of flounder CYP1A mRNA induction appeared more surprising in the Seine; this estuary being highly contaminated by PCBs and PAHs and thus showing significant induction of EROD activities in adult flounders (Minier *et al.*, 2000). However, the expression level of the CYP1A1 is not always correlated with the EROD activity; a time-lag may exist between mRNA production and protein formation and the level of many proteins is post-transcriptionally regulated (Nikinmaa et Rytönen, 2011).

The limited CYP1A1 expression level in the Seine could be also related to the chronically contaminated sediments displaying very high concentrations of PAHs and PCBs (Cachot *et al.*, 2012). The fish CYP1A1 system may become unresponsive after long-term exposure to PAHs, an experimental contamination showing a significant CYP1A1 induction after a one month exposure period, but no effect after a six months exposure (Reynolds *et al.*, 2003). Moreover, several inhibitors of CYP1A system like some sex steroids (Goksoyr et Larsen, 1991; Kirby *et al.*, 2007) or heavy metals (Al-Arabi et Goksoyr, 2002; Viarengo *et al.*, 1997) could be present in the heavily polluted Seine estuary. The last suggestion could be that the low CYP1A1 induction in the Seine is the result of an adaptation of the population

submitted to strong contamination over several decades (Wirgin et Waldman, 1998). In the future, the possible trend detected for the low CYP1A1 in the Seine should be confirmed at the protein level, measuring the EROD activity.

In the Seine estuary, a positive correlation was detected between the expressions of BHMT and CYP1A1, for the 0+ and 1+ cohorts; furthermore, the negative correlations between BHMT and CF, or between CYP1A1 and CF were only observed in the 1+ cohort. We suggest that the previous correlations specifically detected in the heavily contaminated Seine could be the consequence of a possible adaptation to chemical stress: the selective pressure could retain in this population two main fish physiological orientations:

- individuals showing high detoxification capacity, but a possible physiological cost associated to this detoxification, *i.e.* a reduced condition factor
- individuals showing a reduced detoxification capacity, but a higher condition factor.

Finally, the present study should confirm the previous results on the physiological cost of tolerance to toxicants, in the European flounder along the French Atlantic coast (Marchand *et al.*, 2004).

4.5 Immune responses

TNF-R is the fish tumor necrosis factor receptor of TNF α (Park *et al.*, 2003). The C3 complement and TNF system play a major role in the fish immunity, being involved in numerous innate and acquired immune responses (Kerr *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2011). The up-regulation of C3 and TNF-R mRNA levels was observed in European flounder exposed to PAHs and PCBs mixtures (Dupuy *et al.*, in submission). Moreover, TNF-R system and complement system are implicated in inflammation process (Bayne *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2012; Watts, Munday et Burke, 2001) that could be associated to the fish response to high concentrations of contaminant (*e.g.* Leaver *et al.*, 2010; Pacheco et Santos, 2002; Sheir et Handy, 2010).

In the present study, up-regulation of the C3 and TNF-R expressions were detected in Seine compared to Canche, for the 0+ and 1+ cohorts; while only the TNF-R up-regulation was observed in Tamar compared to Canche. We suggest that the higher expression level of these two genes could indicate a higher infection rate in Seine fish and possibly in Tamar fish; however this hypothesis must be considered cautiously, because Seine fish also

displayed a decrease phagocytosis capacity which is in conflict with an activation of the immune system due to infection. Furthermore, the Seine 1+ cohort showed positive correlations between the expression levels of C3, TNF-R, and CYP1A1, underlining the links between the immune responses and the detoxification process in heavily contaminated systems.

The Tamar vs Canche flounders displayed an up-regulation of the TNF-R mRNA expression but no difference in C3 mRNA expression. Similar trends were detected on European sea bass exposed to light cycle oil (up-regulation of TNF α , no variation in C3 mRNA expression; in Bado-Nilles *et al.* (2011); furthermore, an increasing activity of the alternative complement pathway was observed in this experiment. Finally, in the Tamar, we suggest that the TNF-R up-regulation probably induced by the high metallic stress, could indicate an increase of apoptosis and cell necrosis in the flounder liver, as observed in different cellular models (Smith, Farrah *et* Goodwin, 1994). Further histopathological investigations should be conducted in the flounder liver to confirm this hypothesis in the Tamar estuary; an epidemiological survey on histopathological liver lesions confirming that 0+ European flounders may serve as valuable bioindicators for assessing the health status of euryhaline fish populations (Cachot *et al.*, 2012).

The phagocytosis capacity is a widely used biomarker in ecotoxicology, particularly for the fish and mollusk models (Bols *et al.*, 2001b; van der Oost, Beyer *et* Vermeulen, 2003); thus, many xenobiotics can inhibit the activity of macrophages leading to a decrease of their phagocytosis capacity (Bols *et al.*, 2001b; Fournier *et al.*, 2000). For example, Danion *et al.* (2011a) observed a decreased in phagocytosis activity of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to chronic hydrocarbons pollution. In the present study, both 0+ and 1+ flounder cohorts in the heavily polluted Seine displayed a lower phagocytosis capacity compared to fish from the pristine Canche. The phagocytosis capacity was negatively correlated with the condition factor, particularly in the Seine 0+ cohort. The previous result underlines that the phagocytosis is an energy-demanding process for fish; a similar trend being observed for the mollusks where a positive correlation between phagocytosis and condition factor or metabolic activity was detected (Blaise *et al.*, 2002).

4.6 Conclusion

In the present study, the contamination load in fish tissue as the multiparametric approach conducted on juvenile flounders, confirm the differential level of contamination in the sampled estuaries; the Canche being characterized as a pristine site, the Tamar and the Seine displaying a high level of chemical stress induced respectively by heavy metals and complex mixtures of pollutants (PCBs, PAHs, heavy metals,...).

Fish health status estimated by the condition factor could indicate a lower condition in the polluted systems: Tamar and Seine. Globally, the biomarker responses for juvenile flounders (considering energetic metabolism, detoxification activity and immune responses) are poorly marked in the Tamar estuary, and clearly detected in the Seine system. A high number of correlations between biomarkers was observed, particularly in the heavily polluted system, *i.e.* the Seine, where the activities of detoxification were positively correlated with the levels of immune responses, but could be negatively correlated with the condition factors. We suggest that these physiological orientations could be the results of a selective pressure induced by the contaminants, particularly in the Seine estuary.

Finally, our results confirm the relationship between the immune system and the detoxification processes in heavily polluted systems (Reynaud et Deschaux, 2006; Reynaud, Raveton et Ravanel, 2008). We demonstrate that the immune responses of juvenile flounders to heavy metals or to mixtures of pollutants are complex, but could become very pertinent biomarkers to estimate the quality of estuarine waters and the health status of estuarine fish populations.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported firstly by the INTERREG IV program: DIESE (50% of a PhD grant was obtained by the first author, for the development of immune markers in ecotoxicology), and secondly by the DEVIL-INERIS program and by the EVOLFISH project (ANR-VMCS). Financial support was also provided by the Canada Research Chair in Environmental Immunotoxicology (Dr. Michel Fournier) and Collège Doctoral International de l'Université Européenne de Bretagne. Authors thank Carole Capitaine for her excellent technical assistance.

Chapitre 4 :

**Approche multimarqueurs sur le poulamon,
Microgadus tomcod, dans l'estuaire du St. Laurent**

1 INTRODUCTION

Les études réalisées sur le flet aussi bien en conditions expérimentales que sur le terrain ont montré la pertinence de l'utilisation de différents biomarqueurs, au niveau du métabolisme énergétique, des activités de détoxification, du système immunitaire. Dans ce 4^{ème} chapitre, ces outils ont été appliqués à une autre espèce, le **poulamon** (*Microgadus Tomcod*), échantillonné dans des environnements contrastés au Québec. Le poulamon est une espèce dont la réponse à la pollution a été étudiée dans la rivière Hudson et dans l'estuaire du Saint Laurent. Wirgin et al (2011) ont notamment démontré dans l'Hudson qu'une forte pression de sélection liée à la pollution a conduit à un rapide changement évolutif du gène codant AHR2 qui se traduit par une résistance de cette population aux hydrocarbures aromatiques halogénés HAHs. Des études sur les poulamons capturés dans le Saint Laurent suggèrent qu'ils ne présentent pas ce caractère de résistance.

Pour des contraintes matérielles et techniques, il n'était pas possible de réaliser des **mesures** d'expression de gènes sur le poulamon, nous avons donc choisi ici de compléter nos explorations en utilisant la cytométrie pour mesurer non seulement la capacité de phagocytose, comme précédemment, mais également le cycle cellulaire et la quantité de métallothionéine dans les cellules du pronéphros. De plus, la mesure de CYP1A1 n'étant pas réalisable, nous avons choisi de quantifier l'activité enzymatique qui en découle : l'activité EROD. Comme pour le flet, l'activité de la CCO a été évaluée, le CF ayant été complété avec d'autres indicateurs biométriques : HSI et GSI. La mesure du GSI a permis de séparer les poissons de chaque site en 2 groupes : les poissons immatures (GSI faible) et les poissons en cours de maturation (GSI fort) ; tous les poissons ayant moins de 3ans.

L'échantillonnage a été réalisé sur **4 sites** contrastés : Cacouna (n=39), Rivière-Ouelle (n=60), Sept-Îles (n=33) et Penouille (n=44). Les sites de Cacouna et Rivière-Ouelle sont situés dans l'estuaire du Saint Laurent et ne présentent pas de contamination connue. Le site de Penouille, situé dans la Baie de Gaspé, est fortement contaminé aux métaux lourds et notamment au cuivre ; ce stress métallique étant lié à l'existence en amont d'une ancienne mine (mine de Murdochville). Le site de Sept-Îles, lui aussi situé dans une baie, est un site très industrialisé et portuaire, caractérisé notamment par une pollution notamment aux butylétains, à l'arsenic et au cuivre. Les sites de Cacouna et Rivière-Ouelle, étant situés dans le Saint Laurent, ils présentent une plus faible variation de salinité (12 à 27psu) que les sites

de Sept-Îles et Penouille qui peuvent être fortement influencés par les arrivées d'eaux douces (5 à 30psu). De plus, le site de Penouille présente un hydroclimat particulier par rapport aux autres sites ; il présente ainsi des écarts de température moins marqués, des températures hivernales plus élevées et une couverture de glace moins persistante.

L'objectif ce travail était d'évaluer si l'utilisation de multiples biomarqueurs sur le poulamon permet de rendre compte de la qualité des eaux estuariennes.

2 RESULTATS ET DISCUSSION

L'ensemble des résultats est présenté de manière synthétique dans le Tableau 4. Une analyse en composantes principales (ACP) a également été réalisée afin d'appréhender la variabilité inter-estuariennes, en prenant en compte tous les marqueurs. Les résultats de l'activité de la CCO ne sont pas présentés dans l'article, car ils ne mettent pas en évidence de différence inter-estuariennes ; ils sont cependant intégrés à l'ACP, pour explorer les relations possibles entre biomarqueurs.

Tableau 4. Récapitulatif des résultats des différents biomarqueurs et indicateurs utilisés au cours de cette étude. Phago=capacité de phagocytose, cycle=% de cellules en phase G2/M, indiv.=individu, reins a.=reins antérieur ou pronéphros, cyto=cytométrie, activ.=activité enzymatique par mesure d'absorbance ou de luminescence, imat.=immature et matur. = en cours de maturation. n.m. signifie qu'il s'agit d'un marqueur non mesuré dans cette condition, ref. correspond à la valeur de référence pour les comparaisons, un ++ ou -- signifie que la valeur est plus de 2 fois supérieur ou inférieur à la valeur de référence.

indice mesuré	detoxification		système immunitaire		metabo.	indices de condition		
	MT	EROD	phago.	cycle	CCO	CF	HSI	GSI
organe technique	reins a. cyto.	foie activ.	reins a. cyto.	reins a. cyto.	muscle activ.	indiv. indice	indiv. indice	indiv. indice
terrain - Poulamon								
Rivière-Ouelle - imat.	ref.	ref.	ref.	ref.	ref.	ref.	ref.	ref.
Rivière-Ouelle - matur.	0	0	0	0	0	0	+	+
Cacouna - imat.	0	+	0	0	0	0	+	0
Cacouna - matur.	0	0	0	0	0	0	+	+
Sept-îles - imat.	0	0	0	+	0	+	+	0
Sept-îles - matur.	+	0	-	+	0	0	0	+
Penouille - imat.	0	++	--	+	0	++	0	0
Penouille - matur.	++	0	--	++	0	++	0	+

Le CF est plus élevé pour les poissons capturés à Penouille que sur les autres sites. De plus, le CF et la longueur des poissons semblent plus élevés pour les poissons des sites situés le plus à l'Est (Penouille et Sept-Îles). La pollution ne semble donc pas entraîner de

diminution de CF ; les variations de CF et de longueurs semblent plus liées à des conditions hydroclimatiques différentes entre les sites.

La mesure du **GSI** a essentiellement permis de distinguer les poissons matures, des sub-adultes. Le **HSI** est quant à lui plus élevé pour les poulamons capturés à Cacouna et Rivière-Ouelle. Cette augmentation peut être liée à une induction d'enzyme hépatique ou à un stockage d'énergie. Comme elle se semble par corrélée avec l'activité EROD, il est possible que ces différences de HSI soient liées à un stockage de l'énergie différentiel entre les sites. Chez les gadidés le contenu en énergie du muscle est largement associé à sa teneur en protéines alors que celui du foie est essentiellement relié à son contenu en lipides (Lambert et Dutil, 1997). Par conséquent des différences de HSI pourraient s'expliquer par une allocation de l'énergie différente entre les poulamons de Cacouna et Rivière-Ouelle, par rapport à ceux de Sept-Îles et Penouille, sans liens directs avec la pollution.

L'activité EROD est induite chez les poulamons immatures de Cacouna et Penouille, mais ne révèle pas de différences entre les sites pour les sub-adultes. Cette modification dans les patterns d'activités EROD entre immatures et sub-adultes pourrait s'expliquer par un changement dans l'exposition aux polluants dû à une modification du régime alimentaire du poulamon au cours de sa croissance. Cela peut également s'expliquer par la présence d'inhibiteurs qui en s'accumulant dans l'organisme conduiraient à la réduction de l'activité EROD. Enfin, il est possible que cela soit la conséquence de phénomènes de sélection des individus à activités de biotransformation les plus modérées, dans les milieux les plus pollués.

A l'inverse de EROD, la **MT** n'est pas induite chez les immatures mais uniquement chez les sub-adultes des sites de Sept-Îles et Penouille. Ces 2 sites étant connus pour leurs pollutions métalliques, la MT pourrait donc être un marqueur pertinent de la présence de polluants métalliques, mais il ne serait induit qu'au-delà d'un certain seuil de bioaccumulation dans les tissus du poulamon.

Les marqueurs de l'état du **système immunitaire** montrent une nette distinction entre 2 groupes, les poissons de Rivière-Ouelle et Cacouna répondant différemment de ceux de Sept-Îles et Penouille. Les poulamons de Rivière-Ouelle et Cacouna montrent les plus fortes capacités de phagocytose et un moins grand nombre de cellules en phase G2/M. Ces résultats confirment la complexité des réponses immunitaires, évoquée sur le modèle flet ; ainsi, sur les sites de Sept-Îles et Penouille, la diminution des capacités de phagocytose suggère un effet immunosuppresseur des polluants métalliques (dont la présence est confirmée par le MT

élevé), mais la plus grande quantité de cellules en phase de multiplication suggère une activation du système immunitaire sur ces mêmes sites. Des analyses plus poussées du système immunitaire seront nécessaires pour mieux comprendre les réponses parfois contradictoires de ce système en présence de polluants.

L'ACP confirme la distinction entre 2 groupes

- d'un côté les poissons de Rivière-Ouelle et Cacouna avec une meilleure capacité de phagocytose, un plus faible nombre de cellules en phase G2/M, un CF plus faible et des activités de détoxification plus faibles (EROD et MT)
- d'un autre côté les poissons de Sept-Îles et Penouille avec une plus faible capacité de phagocytose, un plus grand nombre de cellules en phase G2/M, un CF plus élevé et des activités de détoxification forte (EROD et MT)

Cette distinction pourrait être principalement liée à la pollution ; les sites de Sept-Îles et Penouille étant identifiés par leur contamination métallique et par des niveaux EROD et/ou MT plus élevés relativement aux autres sites. Néanmoins cette différenciation des sites en deux groupes correspond aussi à une distinction Est/Ouest ; on ne peut pas exclure que des conditions hydro-climatiques contrastées sur ce gradient puissent interférer avec les réponses des différents biomarqueurs.

Pour conclure, chez le poulamon comme précédemment chez le flet (chapitre 3), les mesures d'indices de condition semblent plus liées aux conditions climatiques qu'à la pollution. Cette étude suggère que la mesure d'EROD et de MT pourrait être des marqueurs efficaces de la pollution ; cependant ces marqueurs doivent être considérés avec précaution car leur réponse semble varier en fonction de l'âge ou du niveau de maturité du poisson. Enfin les marqueurs immunologiques semblent encore une fois fortement modulés par la présence de contaminants, même si ces réponses restent complexes et difficiles à interpréter. À l'avenir, il serait nécessaire de compléter cette étude par d'autres marqueurs immunitaires et de mettre en œuvre des analyses de chimie analytique sur les polluants contenus dans les sédiments et les poissons, pour dresser une typologie de la pollution de ces différents systèmes. Des explorations génétiques seraient également très pertinentes sur le poulamon, pour évaluer si une partie de la variabilité dans les réponses des biomarqueurs ne serait pas expliquée par une différenciation génétique des populations dans l'estuaire du St Laurent.

A multibiomarker approach on the Atlantic tomcod (*Microgadus tomcod*) in the St. Lawrence Estuary

Célie Dupuy^{a,b}, Catherine M. Couillard^c, Jean Laroche^a, Pierre Nellis^c, Pauline Brousseau^b, Michel Fournier^b

^aUniversité Européenne de Bretagne, Université de Bretagne occidentale, UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin LEMAR, Institut Universitaire Européen de la Mer, 29280 Plouzané, France

^bInstitut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier (INRS-IAF), 31 Des Prairies Blvd., Laval, Quebec, Canada H7V 1B7

^cPêches et Océans Canada, Institut Maurice Lamontagne, 850 route de la mer, Mont-Joli, QC G5H 3Z4, Canada

Corresponding author: Célie Dupuy, email: cel.e@hotmail.fr

Accepté dans Environmental Science and Pollution Research. DOI: 10.1007/s11356-012-1285-2 (numéro special ecotoxicology of estuaries in France and Québec, Canada)

ABSTRACT

A multibiomarker approach was developed on juvenile Atlantic tomcod (*Microgadus tomcod*) to evaluate the pertinence of this approach for low-cost screening assessment of the environmental quality of various coastal sites within estuaries. Several biometric indices and biomarkers (EROD activity, metallothionein concentration and immune responses) were investigated on immature and maturing tomcods (≤ 31 months) collected in four environmentally contrasted sites in the St Lawrence Estuary (SLE). Simultaneous examination of various age classes provides the opportunity to detect short-term responses in sensitive young-of-the-year fish (e.g. EROD induction) and longer-time effects associated with chronic exposure and bioaccumulation (e.g. metallothionein induction). Principal component analysis was helpful to discriminate between responses possibly related to

contaminant exposure (EROD, metallothionein) and responses that could be affected by upstream-downstream gradient (immune response, biometric indices). Measurement of a battery of biomarkers in young tomcods at several sites along the shore of the SLE is a low-cost screening investigation useful to identify hot spots requiring further investigation with chemical analysis and additional reference sites

Keywords: biometric indexes, EROD, metallothionein, immunotoxicity, pollution, fish

1 INTRODUCTION

Smith et al. (1979) had detected a high prevalence of hepatocellular carcinomas for the Atlantic tomcod (*Microgadus tomcod*) in Hudson River (USA), possibly related to elevated concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and halogenated aromatic hydrocarbons (HAHs) such as polychlorinated biphenyls (PCBs) and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins/furans (PCDD/Fs). During the forty next years, the Atlantic tomcod has been considered as a candidate species to monitor the quality of estuarine waters in Canada (Couillard, 2009), whereas resistance to HAHs and susceptibility to PAHs were demonstrated for the Hudson River's tomcod population (Sorrentino *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2006).

More recently, Wirgin et al. (2011) demonstrated the major role played by the AHR in the tolerance of tomcod to chemical stress; the Hudson River population exhibiting a particular allele of AHR2 encoding an AHR protein characterized by reduced affinity for dioxin-like compounds; this variant being not detected in other estuaries in the United States or in Canada. Thus in the previous study, a structural change in the coding region of a single gene could explain the resistance of the population. The authors suggested that the fish bioaccumulation of high levels of xenobiotic, associated with low gene flow between populations and strong selective pressure have conducted to a rapid evolutionary change of AHR2 in the Hudson River population.

In Canada (St Lawrence Estuary) tomcod populations are generally submitted to a lower level of contamination compared to the Hudson River population, and do not exhibit the HAH resistance AHR2 allele demonstrated in the Hudson River (Wirgin *et al.*, 2011). Thus, an experimental exposure to PCB77 induced an activation of the CYP1A mRNA expression for Canadian tomcod populations vs no alteration of the expression level for the Hudson River population (Yuan *et al.*, 2006). These confirmed the hypothesis of Wirgin et al.

(1994) that Canadian tomcod populations could be more sensitive to lower levels of pollution, compared to the Hudson River population. Several biomarkers measured on mature adult tomcod in Canada have been correlated to pollution level (Couillard *et al.*, 1999; Couillard *et al.*, 2004). In 1994, multifocal granulomatous lesions in the spleen, likely caused by an infectious agent, and density and surface area of pigmented macrophage aggregates were higher in tomcod sampled in the Miramichi Estuary, (NB, Canada) receiving pulp and paper mill effluent compared to a reference estuary (Couillard *et al.*, 1999). Adult tomcods collected in St. Lawrence Estuary (SLE, QC, Canada) and exposed to high levels of organochlorine contaminants including PCBs showed high levels of DNA adducts and hepatocellular proliferations and low hepatic EROD (Ethoxyresorufin-*O*-deethylase) activity, compared to fish from two estuaries with a lower level of organochlorine contamination (Couillard *et al.*, 2005). Furthermore, Lair *et al.* (1997) also identified jaw ulcers in tomcods from the SLE, but the cause(s) of these lesions were not identified.

The Atlantic tomcod is an anadromous species; adults undertake yearly migration (up to several hundreds of kilometers) throughout the SLE to spawn in freshwater tributaries (Scott *et al.*, 1988). In contrast, young-of-the-year (YOY) Atlantic tomcod living in eelgrass meadows are rather sedentary and may better represent local contamination at their site of capture than adult fish as shown previously in the Hudson Estuary (Fernandez *et al.*, 2004). Thus, in this study, we have collected juvenile tomcods in four sites along the SLE: Sept-Îles, Penouille, Cacouna, Rivière-Ouelle.

The Sept-Îles Bay is characterized by numerous industrial and harbor activities and thus probably submitted to a high chemical stress induced by a complex mixture of xenobiotics; some analysis indicating high levels of total Butyltins (BTs) in the benthic invertebrates (about 120ng Sn /g d.w.) and fish (222ng Sn /g d.w.) in this area compared to other sites in SLE (benthic invertebrate between 40 and 60ng Sn /g d.w. and benthic fish between 50 and 120 ng Sn /g d.w.) (Michaud *et al.*, 2006). Furthermore, sediments near the harbor of Sept-Îles Bay presented high concentrations of arsenic (6 to 13mg/kg) and copper (28 to 38mg/kg); concentrations of arsenic, boron and sulfates in the water of Sept-Îles Bay exceeding the threshold to protect aquatic life (respectively 0.069mg/L, 5mg/L and 1499mg/L) (GENIVAR, 2012).

Penouille, located in a Bay is displaying a contamination mainly linked to the anthropogenic activities of the city of Gaspé (presence of PCBs, PAHs), but also resulting from mining activities in the river basin and thus showing significant levels of heavy metals

like copper (Gagnon, 1997; Xstrata Copper Canada, 2012). The mine was closed in 1999 and a rehabilitation of the Bay of Gaspé is carried out (removing of contaminated sediments near study site) (Xstrata Copper Canada, 2012).

The sites of Rivière-Ouelle and Cacouna could be considered as pristine areas, their basins receiving reduced inputs of domestic, agricultural and industrial effluents. Furthermore, these two sites are not located in bays and thus submitted to a higher mixing with the water of the SLE, compared to the two previous polluted systems. Thus, a fish re-introduction is currently conducted in the Rivière-Ouelle site and the Cacouna site (located between harbour of Cacouna and the Isle Verte) is considered as a major nursery for birds and several fish species (Gagnon, 1998; Saint-Louis, Gobeil et Pelletier, 1997).

In the present study, an integrative approach on the fish responses to chemical stress was conducted considering several biomarkers (activities of detoxification, immunocompetence, biometric indexes). The major objective was to assess the potential of YOY tomcod as sentinels to explore the water quality in contrasted environments in the SLE.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Fish sampling and cells preparation

Tomcods were collected by a hoop net in September-October 2010 in four eelgrass meadows in Québec (Fig. 1): Cacouna (n=39), Rivière-Ouelle (n=60), Sept-îles (n=33) and Penouille (n=44). Fish were killed by cervical dislocation, just after the catch. Their total length, gutted-carcass weight, liver weight and gonads weight were measured. The liver and a part of muscle were flash-frozen and stored at -80°C. Otoliths were removed for ageing.

The head kidney of each fish was aseptically removed. Pronephric cell suspensions were obtained by homogenization of head kidney with a syringe valve against a steel grid with 1ml of medium. The medium used throughout the assays, consisted of steril RPMI 1640 supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) from Biomedica (Montreal, Quebec, Canada), 0.5 mg/mL sodium pyruvate, penicillin (100 U/mL)/streptomycin (100 mg/mL), and buffered with 10 mM Hepes (pH 7.4) (Brousseau *et al.*, 1999). Cells were counted with hemocytometer by the microscope, using trypan blue dye exclusion (0.4%). Viability was over 90%.

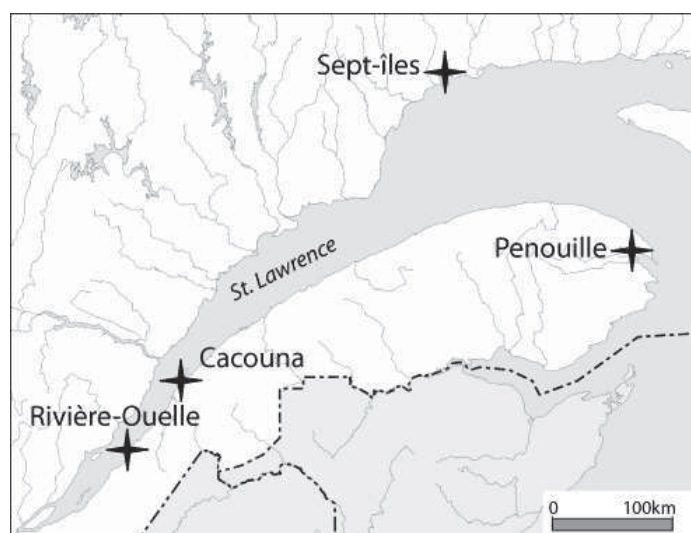


Fig. 1 The four sampling sites in the St Lawrence Estuary, Québec (CANADA)

2.2 Biometric indexes

The individual fish age was estimated considering that all fish were born in February in a SLE tributary (Fortin *et al.*, 1990); the number of winter being detected on the otoliths by a binocular.

The body condition factor (CF) was calculated by the formula: $CF = 100 \times W / L^3$, where W is gutted-carcass weight (g) and L is total fish length (mm).

The hepatosomatic index (HSI) was calculated as: $HSI = 100 \times LW/W$, and gonadosomatic index (GSI) as: $GSI = 100 \times GW/W$ where W is gutted-carcass weight (g), LW is liver weight (g) and GW is gonad weight (g).

Frequency of GSI distribution, for males as females, was used to classify the fish into two groups: immature fish with low GSI and maturing fish with higher GSI (data not shown). All indices were then calculated for each group separately.

2.3 Detoxification

2.3.1 EROD (ethoxyresorufin-O-deethylase)

EROD activity was measured at 22°C by a microplate spectrofluorometric assay (excitation 530nm, emission 585nm) in the liver S9 fraction (Couillard *et al.*, 2004). Protein concentrations were determined by the method of Bradford using bovine serum albumin as a standard (BIO-RAD Laboratories, USA).

2.3.2 Metallothionein

A metallothionein(MT)-specific antibody and flow cytometry were used to determinate the relative cellular level of metallothionein in immune cells as described by Yurkowi and Makhijani (1998). Briefly, pronephric cell suspensions were fixed with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) with 0.3% of paraformaldehyde. One million cells were washed at 1200G, 5min and 500µl of permeabilization buffer (PBS with 3% foetal calf serum, 0.1% sodium azide and 0.1% saponine, pH 7.4) was added on the pellet. After 30 min of incubation, 500µl of staining buffer (PBS with 3% foetal calf serum, 0.1% sodium azide, pH 7.4) were added. Cells were centrifuged at 1200G, 5min. Specific anti-MT monoclonal mouse antibody (DAKO-MT-E9, Dako Canada Inc., Burlington, Ontario, Canada) was added on the cells (1µg of antibody to 1.10^6 cells) and incubated 30min at ambient temperature. Cells were washed with staining buffer and an anti-mouse IgG antibody (Fab specific, F(ab')₂ fragment-FITC antibody (Sigma-Aldrich Canada Ltd) was added on the pellet (10 µl of a 1:100 dilution of conjugate per 10^6 cells). After washing the cells (centrifugation at 1200G, 5min), the pellet was re-suspended in PBS. Cells were analyzed by flow cytometry (FACSCalibur cytometer, Becton Dickinson, San José, USA) and 10000 events were recorded. The relative cellular MT concentration is estimated by mean fluorescence intensity of macrophage population.

2.4 Immunology

2.4.1 Phagocytosis

Capacity of phagocytosis was assessed by the methods described by Brousseau et al. (1999). Briefly, fluorescent latex beads ($d=1.7\mu\text{m}$, Polysciences, Warrington, USA) were added to pronephric cell suspensions (10^6cells/ml) in order to respect the 100:1 beads to cell ratio. The cells were incubated 18h at ambient temperature ($20^\circ\text{C}\pm 1$). Then, cell suspension was layered over a 3% bovine serum albumin gradient and cells recovered by centrifugation at 150g for 8 min in order to remove the free beads. Cell pellets were then resuspended in 0.5 ml of 0.5% formaldehyde and 0.2% sodium azide diluted in phosphate buffer saline (PBS). Cells can be kept in one week. Cells were analyzed by flow cytometer (FACSCalibur cytometer, Becton Dickinson, San José, USA) and 10000 events were recorded. The efficiency of phagocytosis was determined by the percentage of cells having three or more beads in macrophage gate.

2.4.2 Cell cycle analysis

Proliferation of lymphocytes was estimated by flow cytometry assay based on the analysis of cell cycle through the quantification of DNA content (Chilmonczyk et Monge, 1999; Nunez, 2001). Pronephric cell suspensions (1ml of 10^6 cells/ml) were fixed with ethanol and stored at 4°C. For analysis, cells were centrifugated (5min, 450G) and were resuspended in PBS ($0,5 \cdot 10^6$ cells/ml). Each sample was recentrifugated (5min, 450G) and resuspended in 500ml of PBS with RNase (10µg/ml) and propidium iodide (50µg/ml). Cells were incubated at room temperature during 30min. Cells were analysed by FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson, San José, USA), 10000 events were recorded and doublet cells were subtracted (Wersto *et al.*, 2001). Percentage of lymphocytes and macrophages in G0/G1, S and G2/M were acquired by DNA content analysis (represent by the red fluorescence intensity due to propidium iodide) of lymphocyte and macrophage gate.

2.5 CCO (Cytochrome C oxidase)

CCO activity was measured at 22°C by a microplate spectrophotometric assay in muscle S9 fraction (Smith et Conrad, 1956; Théron, Guerrero et Sebert, 2000). Absorbance changes were monitored at 550nm during 8min. Protein concentrations were determined by the method of Bradford using bovine serum albumin as a standard (BIO-RAD Laboratories, USA). CCO is the complex IV of electron transport chain in mitochondria and is responsible for 90% of cellular oxygen consumption in mammals (Xu, Charles et Moncada, 2005).

2.6 Statistical analyses

Statistic tests and box plot graphs were carried out using Statistica 10.0 (StatSoft). The variables were not normally distributed, so the Kruskal-Wallis (KW) test was used for inter-sites comparisons for immature and maturing fish separately. Within sites, immature and maturing fish were also compared by KW test. When KW test was significant ($p \leq 0.05$), it was followed by a post-hoc test: a multiple bilateral comparisons of mean ranks. No significant differences between males and females was detected over the whole markers (KW test: $p > 0.05$); thus the analysis were conducted grouping males and females.

Principal Component Analysis (PCA) was used to explore the variability of the different fish markers over the sampling sites. Markers of cell cycle were strongly correlated,

thus only the percentage of lymphocytes on G2/S phase was considered in the PCA. HSI and GSI were strongly dependent of maturity and/or gender and/or fish age, thus these two indices were not considered. Finally, CF, EROD, MT, lymphocytes on G2/S phase, phagocytosis and CCO were considered in the PCA. All data were standardized (zero mean, unit variance) before PCA.

3 RESULTS

3.1 Biometric indices

YOY (8-9 months), one-year-old (20-21 months) and two-years-old (32-33 months) tomcods were caught at each sampling site (Fig. 2). Fish sampled in Sept-îles and Penouille showed higher total length and condition factor compared to those of Rivière-Ouelle and Cacouna (Fig. 2 & 3A).

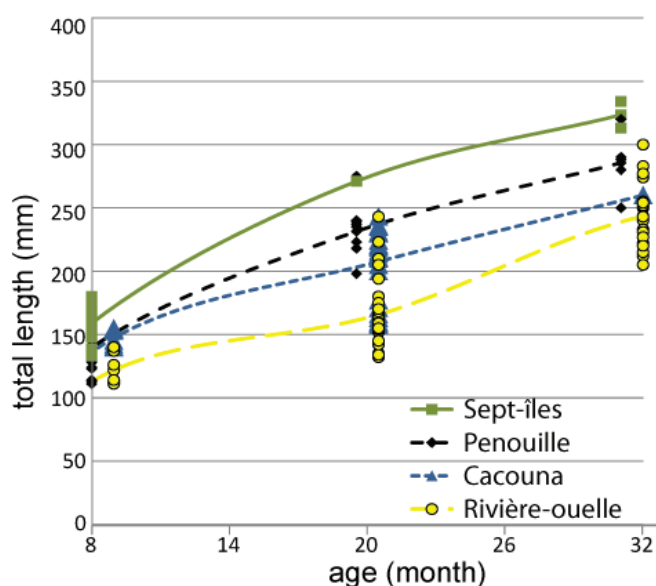


Fig. 2 Total length of different age groups of tomcods sampled in Sept-îles, Penouille, Cacouna and Rivière-Ouelle.

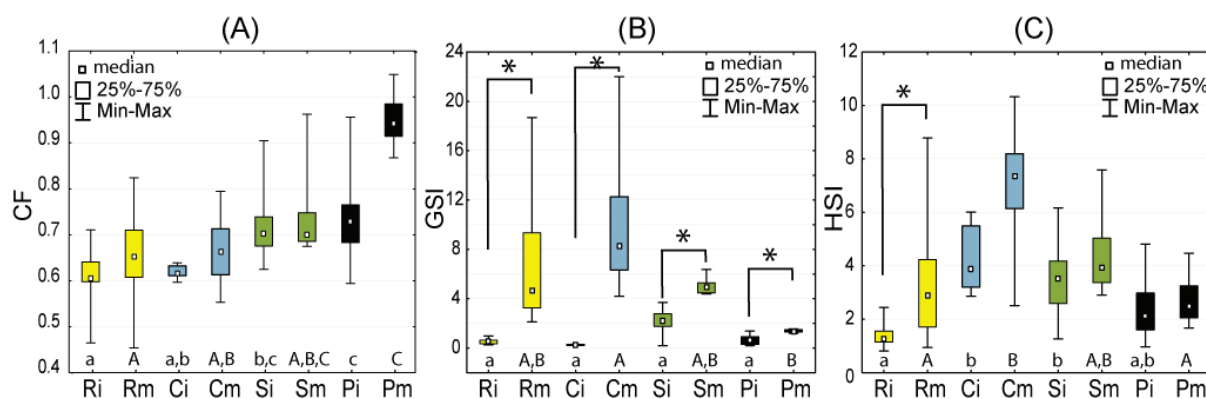


Fig. 3 Biometric indices of tomcod from Rivière-Ouelle (R), Cacouna (C), Sept-Îles (S), and Penouille (P), considering immature (i) and maturing fish (m). A: condition factor (CF), B: female gonadosomatic index (GSI), C: hepatosomatic index (HSI). (Statistics: lower-case letters indicate significant differences between immature populations; capital letters indicate significant differences between maturing populations; asterisks indicate significant differences between immature and maturing fish from the same site with $P < 0.05$)

Whatever the considered site, the GSI of maturing females (males: data not showed) was higher than the one of immature fish (Fig. 3B); however the increase of GSI linked to the maturation process appeared more limited in Penouille compared to other sites.

Immature fish showed lower HSI than maturing fish, this difference being only significant in Rivière-Ouelle (Fig. 3C); furthermore, the HSI of fish in maturation was significantly higher in Cacouna vs Rivière-Ouelle and Penouille (Fig. 3C).

3.2 Detoxification

3.2.1 EROD (ethoxyresorufin-O-deethylase)

No significant difference was detected between males and females for EROD activity within site (KW test: $p > 0.05$), thus the data were pooled by site (Fig. 4A). In Cacouna, EROD activity was higher for immature compared to maturing tomcods. In addition, immature tomcods displayed a higher EROD activity in Penouille compared to other sites; no significant difference was detected between sites for maturing tomcods (Fig. 4A).

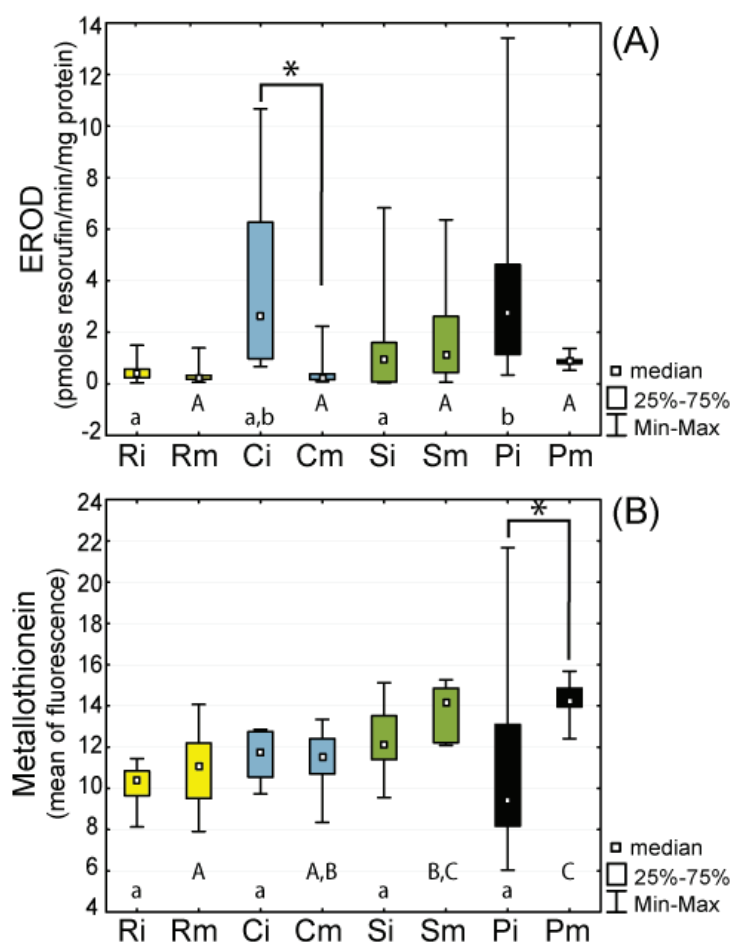


Fig. 4 Assessment of biomarkers on tomcod from Rivière-Ouelle (R), Cacouna (C), Sept-Îles (S), and Penouille (P), immature (i) and maturing fish (m). **A:** EROD activity (pmoles resorufin/min/mg protein), **B:** Metallothionein induction (mean of fluorescence of pronephric cells suspension). (Statistics: lower-case letters indicate significant differences between immature populations; capital letters indicate significant differences between maturing populations; asterisks indicate significant differences between immature and maturing fish from the same site with $P < 0.05$)

3.2.2 Metallothionein

No significant difference of MT concentration was detected among sampling sites for immature tomcods (Fig. 4B). However a particularly high inter-individual variability was observed for this biomarker in Penouille. The MT concentration differed among sites only for maturing fish, tomcods in Rivière-Ouelle, and in Sept-Îles/Penouille showing respectively the lowest and the highest values (Fig. 4B). In Penouille, significantly more MT was detected in maturing than in immature tomcods.

3.3 Immunology

No significant difference of immune responses (cell cycle or phagocytosis activity), was detected between immature and maturing tomcods, whatever the sampling site (Fig. 5A & 5B).

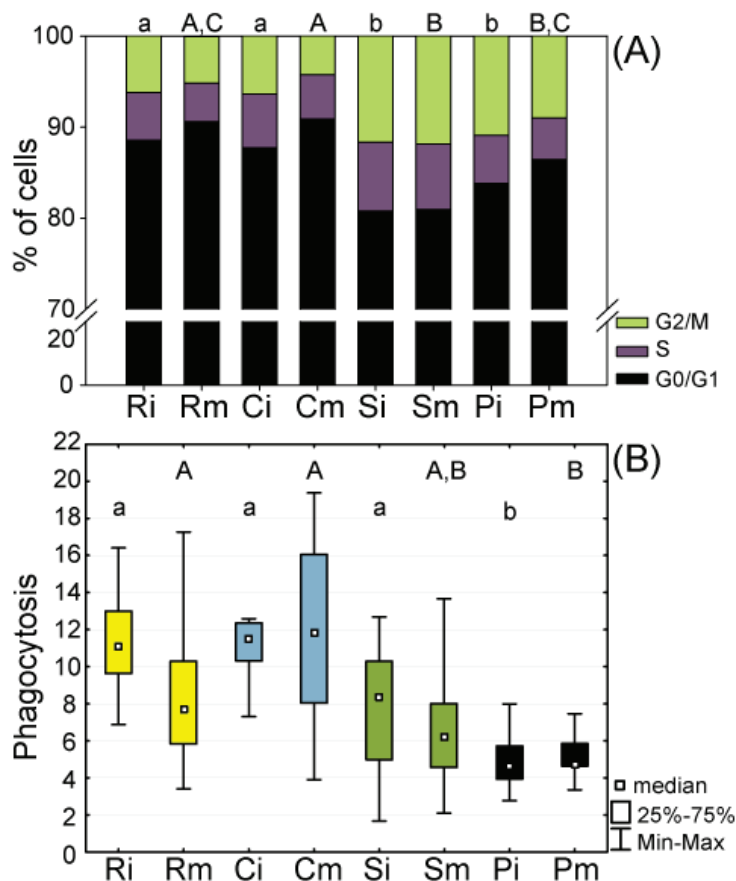


Fig. 5 Assessment of immune biomarkers on tomcod from Rivière-Ouelle (R), Cacouna (C), Sept-Îles (S), and Penouille (P), immature (i) and in maturation (m). A: cellular cycle (percentage of cells in lymphocyte gate in G2/M, S and G0/G1 phase), B: phagocytosis capacity (percentage of cells that have engulfed three beads and more). (Statistics: lower-case letters indicate significant differences between immature populations; capital letters indicate significant differences between maturing populations; with $P < 0.05$)

3.3.1 Cell cycle analysis

Over the whole data set, the percentage of cells in G0/G1 phase was strongly and negatively correlated with the one of cells in G2/M phase ($R = -0.93$, $p < 0.001$). In Sept-Îles and Penouille, tomcods showed a significantly higher percentage of cells in G2/M (and lower percentage of cells in G0/G1) relatively to those in Rivière-Ouelle and Cacouna (Fig. 5A).

3.3.2 Phagocytosis

Fish in Rivière-Ouelle and Cacouna displayed a higher capacity of phagocytosis than those of Sept-Îles and Penouille; the phagocytosis activity being particularly reduced in Penouille for immature as maturing fish (Fig. 5B).

3.4 CCO

Activity of CCO showed a high within site variability. No significant difference was detected for the CCO activities over the different sites ($0.54 \pm 0.35 < \text{mean} \pm \text{SD} < 0.83 \pm 0.31$)

The results were not presented because no significant difference was detected among sites, sexes, maturity classes or age.

3.5 PCA

The first and second principal components (axis 1 & axis 2) accounted for respectively 34.49% and 21.6% of the total variance over the whole data set (Fig. 6). On the first axis of the correlation circle, an opposition was observed between the right side of the diagram mainly characterized by a high phagocytosis activity and the left side principally linked to high condition index and % of lymphocytes in G2/M phase (Fig. 6). The second axis was mainly linked to detoxification activities, the upper and lower parts of the plan being characterized respectively by a high EROD activity and a high concentration of MT.

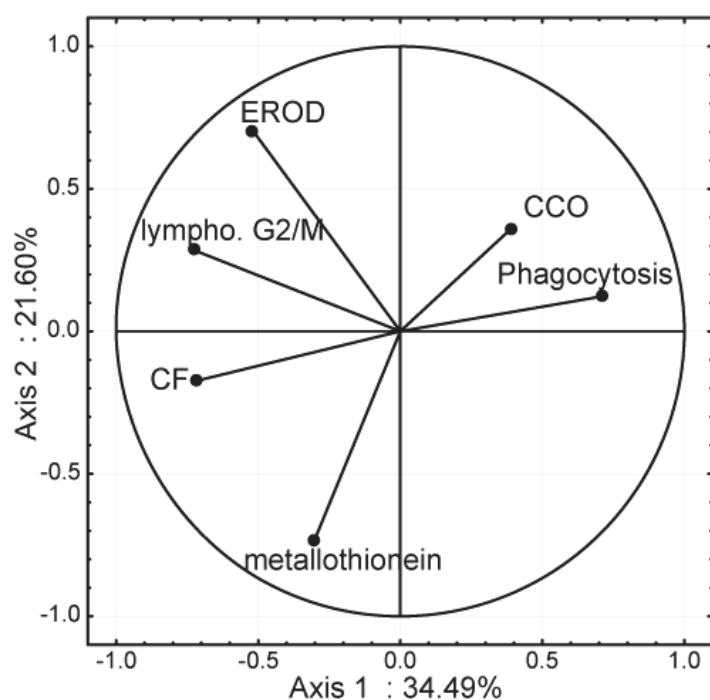


Fig. 6 Principal Component Analysis (PCA): distribution of the variables on the correlation circle (CF: condition factor, EROD, metallothionein, capacity of phagocytosis, cell cycle: % of lymphocyte in G2/M phase, CCO: enzymatic activity of the Cytochrome C Oxydase).

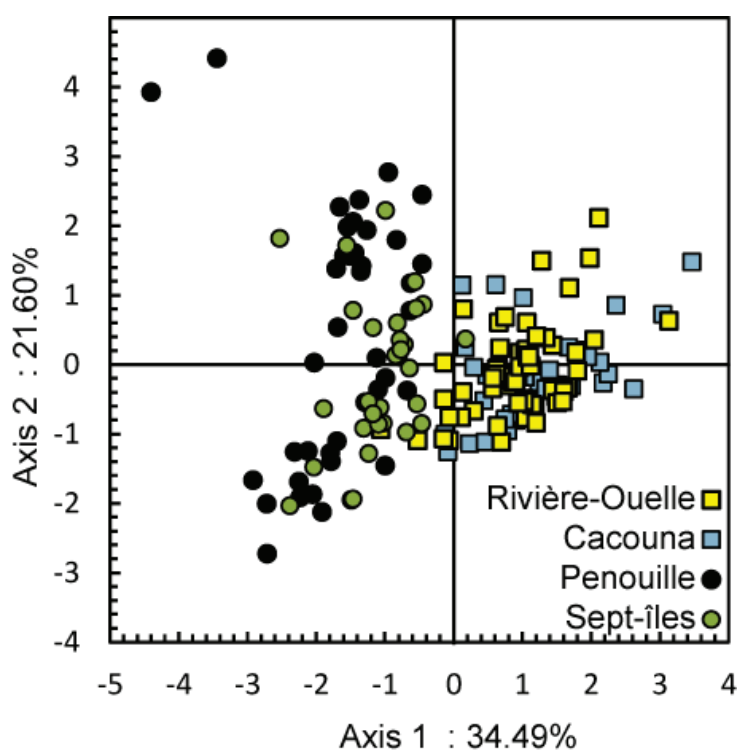


Fig. 7 Principal Component Analysis (PCA): distribution of the individuals (fish) on the main factorial plan.

On the distribution of the individuals on the main factorial plan (Axis 1 & 2), two groups of fish were clearly detected (Fig. 7):

- on the left part of the plan, a mixture of individuals from Penouille and Sept-Îles displaying a reduced capacity of phagocytosis, high percentage of cells in G2/M phase and high CF; upper and lower fish displaying respectively a high activity of detoxification by EROD and by MT;
- on the right part of the plan, a mixture of individuals from Rivière-Ouelle and Cacouna showing a high capacity of phagocytosis, a reduced percentage of cells in G2/M phase, a reduced CF and a limited activity of detoxification (EROD or MT) explaining their reduced spatial distribution over the axis 2;
- Furthermore, the fish group: (Cacouna and Rivière-Ouelle) showed a higher CCO activity relatively to the group (Penouille and Sept-Îles).

4 DISCUSSION

In the past, most biomarkers assessed in Atlantic tomcod were measured in liver: liver histopathology (Cormier *et al.*, 1989; Couillard *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1979), hepatic DNA adducts (Wirgin *et al.*, 1994), EROD activity (Couillard *et al.*, 2005) and the expression of genes, mainly the CYP1A (Carlson, Roy et Wirgin, 2009; Couillard *et al.*, 2004; Sorrentino *et al.*, 2005; Williams, Courtenay et Wilson, 1998; Wirgin *et al.*, 1994; Yuan *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2001). These earlier studies were focused mostly on HAHs toxicity. In the present study, an integrative approach was conducted on the responses of the tomcod to the chemical stress (organic and inorganic) exploring biometric indices, biomarkers of detoxification and of immunocompetence, in four contrasted environments in the SLE including two displaying mixed sources of contamination. Earlier studies in the SLE used adult fish whereas our studies use YOY and subadults (from 8 to 33 month old fish) to explore the tomcod responses at different sites within a single estuary. We suggest that these young fish can be impacted by the chemical stress in estuaries and thus could response to the contamination at different levels of biological organization (molecular, biochemical, cellular and organism levels) as it was previously observed for juvenile fish like tomcod or European flounder, respectively in North-West and North-East Atlantic (Evrard *et al.*, 2012; Wirgin et Waldman, 1998)

4.1 Biometric indexes

To distinguish the natural variability (noise) and contaminant-induced stress (signal), the baseline data of a biomarker/bioindicator should be well defined (van der Oost, Beyer et Vermeulen, 2003). Williams et al. (1998) measured CF, HSI and GSI during one year on mature Atlantic tomcods in a reference site and an area polluted by pulp and paper effluents. The biometric indices in the reference as in the contaminated sites varied along the annual reproductive cycle between 0.55 and 0.85 for the CF, between 2 and 7 for the HSI, and between 3 to 6 for females and 1 to 5 to males considering the GSI. CF and HSI were maximal in the fall (September-November) and minimal during the spawning period (February-March). In contrast GSI was maximal in February and minimal in May. Other studies on mature Atlantic tomcod sampled yearly in early spring from 1998 to 2004 in the SLE, showed that CF can vary between the years from 0.45 to 0.75 (Couillard *et al.*, 2004).

In the present study, maturing tomcods of Penouille showed higher CF value compared to reference sites in the bibliography. Thus, CF does not appear to be negatively impacted by chemical stress and may be more influenced by natural factors (Linde-Arias *et al.*, 2008). Condition factor of fish can be modified by various factors including bathymetry (Chouinard et Swain, 2002), abundance of prey (Dutil, Lambert et Chabot, 2003), salinity (Lambert, Dutil et Munro, 1994), age, sex and climate (Guimaraes *et al.*, 2009; Lambert et Dutil, 1997). Penouille site is probably characterized by a contrasted hydroclimatic conditions relatively to the other sites in the SLE, considering particularly the thermal regime and the onset of sea ice (Saucier *et al.*, 2003; Villeneuve, 1959). These differences can directly impact the metabolism of tomcod, and also its growth rate as observed in the present study where the growth appeared higher at the downstream sites (Penouille/Sept-îles) compared to the upstream sites (Cacouna/Rivière-Quelle). Density-dependent processes could also be involved. Furthermore, the local hydroclimatic conditions and habitat physicochemical characteristics can also modify the availability of prey and consequently the tomcod energy allocation. Finally, it is possible that the populations of tomcod sampled downstream in the SLE are genetically distinct from those sampled upstream and their genetic could affect energy allocation.

Variation in GSI (considering females) is primary explained by the reproductive cycle (Williams, Courtenay et Wilson, 1998). Maturing tomcods of Cacouna and Rivière-Ouelle (collected in October) showed higher GSI compared to those of Sept-îles and Penouille

(collected in September); thus, the differential between the sampling periods could explain that Cacouna and Rivière-Ouelle fish should be more advanced in their reproductive cycle and could explain their contrasted GSI. However we suggest, particularly for the Penouille site, that the very limited increase of GSI from immature to maturing fish could be related to a toxic effect of pollutants. In these fish, more energy could be allocated to storage than to reproduction. Complementary observations on the reproduction biology should be conducted in this site, considering an annual change in ovarian histology and steroid profiles at Penouille and in a reference site with similar hydroclimatic and habitat characteristics.

Maturing tomcods in Cacouna showed higher HSI compared to other sites. Xenobiotics exposure can lead to induction of hepatic enzymes, liver inflammation or abnormal growth (Olivares *et al.*, 2010). Higher HSI could be explained by the increase of cell size or cell number as a response to pollutants (van der Oost, Beyer et Vermeulen, 2003). Maturing tomcods in Cacouna did not show any induction of EROD activity (see 4.2), thus their high HSI does not seem to be a consequence of enzymatic induction. The gadidae store their lipid reserves in liver (Lambert et Dutil, 1997) and fat reserves are transferred from liver to gonads at the time of maturation. Vitellogenesis also occurs in liver during gonad maturation. We suggest that the highest HSI in maturing fish in Cacouna could be a consequence of their more advanced maturation. Finally, in the present study, no obvious relationship was detected between the HSI and the level of pollution, considering the immature as the maturing tomcods.

4.2 EROD (ethoxyresorufin-o-deethylase) and MT (metallothionein)

Hepatic EROD induction is commonly considered as a pertinent indicator of exposure to molecules binding to the arylhydrocarbon receptor such as PAHs and HAHs (van der Oost, Beyer et Vermeulen, 2003). Several studies have demonstrated a significant increase of EROD activity for animals living in polluted sites (*e.g.* Aarab *et al.*, 2004; Fasulo *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2002).

In several fish species, EROD induction, particularly for females, was dependent on the stage of maturity and thus could explain a differential between males and females (*e.g.* Khan et Payne, 2002; Kirby *et al.*, 1999; Miller, Addison et Bandiera, 2004). We suggest that the absence of difference in the EROD activity between genders in the present study could be linked to the sampling period of tomcods, at the beginning of their reproductive cycle

(Williams, Courtenay et Wilson, 1998). An absence of difference between males and females EROD activity has been reported occasionally for other fish species (Fang *et al.*, 2010; Flammarion *et al.*, 2002; Gungordu et Ozmen, 2011)

In the present study, in two sites (Cacouna and Penouille), YOY tomcod displayed a higher EROD activity compared to maturing fish, the median values being respectively 3 and 0.5-1 pmol/min/mg. Lower EROD activity in maturing fish could reflect differential exposure as a result of different diet or of bioaccumulation of chemicals with age. Dietary shift from zooplankton to macroinvertebrates in the first year of age has been reported in Hudson Estuary tomcod (Fernandez *et al.*, 2004). Lower EROD activity in older maturing fish could be related to natural selection for less-inducible genotypes (Wirgin *et al.*, 2011) or to suppression of CYP1A activity by steroid hormones (Williams, Courtenay et Wilson, 1998) or by bioaccumulated xenobiotics (*e.g.* Couillard *et al.*, 2004, EROD levels being 2-9 and 0.6-5 pmol/min/mg for respectively 1+ tomcods and older fish). This hypothesis could be strengthened particularly for the Penouille site where a significant contamination by complex mixture of pollutants is suspected (Gagnon, 1997; Xstrata Copper Canada, 2012); this type of contamination being a strong inhibitor of EROD activity (Kerambrun *et al.*, 2012; Viarengo *et al.*, 1997). Furthermore in the SLE, Couillard (2009) underlined a negative correlation between the level of hepatic EROD activity and the organochlorine concentration, considering adult tomcods; the average level of EROD activity being respectively of 1 and 10 pmol/min/mg for the highly vs lowly contaminated fish.

Finally the present study confirmed that there are obviously many gaps in our knowledge on the tomcod EROD activity. Further studies are needed to compare exposure of YOY and maturing tomcod to different classes of inducing or inhibiting xenobiotics or to explore the hypotheses of post-transcriptional inhibition of EROD activity or natural selection. The variability of this biomarker is potentially linked to multiple factors and could be inhibited by the pollutants, thus the EROD induction used alone must be considered cautiously for the diagnostic of the water quality in the field.

MT is a protein which plays a major role in the protection against the toxic effects of heavy metals (George et Olsson, 1994). MT shows a sequestering function explained by the binding of MT to particular metals (Klaassen, Liu et Choudhuri, 1999). Several laboratory experiments underlined that teleost MT's are inducible by numerous metals like cadmium, copper, zinc (George et Olsson, 1994; van der Oost, Beyer et Vermeulen, 2003). In this

study, the relative quantity of MT was estimated by an immunoassay technique, considered as the most sensitive method for the quantification of MT proteins (George et Olsson, 1994).

In the present study, a significant increase of MT was clearly detected in maturing tomcods of Penouille and Sept-Îles compared to those of Cacouna and Rivière-Ouelle; this trend being not detected for the immature fish. We suggest that maturing fish have bioaccumulated more metals in their tissues; the higher bioaccumulation for older fish conducting to MT induction; this trend being also detected for coastal fish submitted to metallic pollution (Marijić et Raspor, 2006; Rotchell *et al.*, 2001). The Penouille and Sept-Îles sites were clearly suspected to show a chronic metallic contamination; thus their higher MT levels suggest that this biomarker could become an efficient tool for the diagnostic of heavy metals exposure in estuarine waters.

4.3 Immunology

Immunocompetence might be considered as a pertinent biomarker of exposure to environmental stress (Burnett *et al.*, 2007). Several xenobiotics can conduct to an immunosuppression but conflicting results indicated a difference in sensitivity according to the species tested, the concentrations used, and the time and/or exposure route (Sanchez-Dardon *et al.*, 1999). The exposure of animals to contaminants in the field could lead to suppression, inhibition of immune competence and / or stimulation, hypersensitivity and auto-immune reaction (Sweet et Zelikoff, 2001). Capacity of phagocytosis is widely used in ecotoxicology, considering particularly fish and mollusks (Bols *et al.*, 2001b; van der Oost, Beyer et Vermeulen, 2003). Several toxics can inhibit the activity of macrophages leading to a decrease of their phagocytosis capacity (Bols *et al.*, 2001b; Fournier *et al.*, 2000). Measures of cell cycle by flow cytometer allowed to estimate the lymphocyte proliferation (Chilmonczyk et Monge, 1999). Some toxics might inhibit (*e.g.* Payette *et al.*, 1995) or enhance the proliferation (*e.g.* Low et Sin, 1998). Low and Sin (1998) have demonstrated that low and high concentrations of mercury respectively enhance and inhibit the proliferation of lymphocytes.

The result of immune biomarkers on tomcod showed clearly two groups of sites in the SLE. The tomcods from the upstream sites (Rivière-Ouelle and Cacouna) displayed a high capacity of phagocytosis and few lymphocytes in G2/S phase compared to fish from the upstream sites (Sept-Îles and Penouille), with a lower capacity of phagocytosis and more

lymphocytes in G2/S phase (*i.e.* an increase of proliferation for these two last sites). These responses may seem conflicting but they were also reported in other studies, the responses of immune system to complex mixture being difficult to predict (Burnett *et al.*, 2007; Finkelstein *et al.*, 2007; Tahir et Secombes, 1995). Generally, chemical exposure can interfere with critical phases of the fish immunity by blocking phagocytic activity, inducing or inhibiting cell proliferation, or negating precursor cell formation (Sweet et Zelikoff, 2001).

Numerous xenobiotics can modulate the immune function, particularly the heavy metals (Bernier *et al.*, 1995; Fournier *et al.*, 2000; Sanchez-Dardon *et al.*, 1999); the underlying mechanisms being not clear. Toxics could affect directly the immune system, for example by inducing the apoptosis of immune cells. The presence of toxics in an organism can also induce the production of stress hormones which can modulate the immune system (Bols *et al.*, 2001b). In tomcods from Sept-Îles and Penouille, measures of MTs were also carried out on head kidney and showed that pronephric cells responded to heavy metals. We suggest that the presence of heavy metals and possibly of other pollutants induces several significant alterations of the tomcod immune system in these polluted sites, inhibiting its capacity of phagocytosis and enhancing the proliferation of lymphocytes. On the long range, these alterations could reduce the efficiency of the immune system and as a consequence, could increase the disease susceptibility (Arkoosh *et al.*, 2001a; Arkoosh *et al.*, 1998). Alternative hypotheses are modulation of the immune response by natural upstream-downstream ecological gradient or by the reproductive cycle. Further studies with fish sampling at reference sites with similar ecological characteristics than Penouille and Sept-îles and chemical analyses would be necessary to discriminate among these various hypotheses. Again, the variability of this biomarker is potentially linked to multiple factors, thus the immune response used alone must be considered cautiously for the diagnostic of the water quality in the field.

4.4 multibiomarker approach

In a multibiomarker approach, the major objectives are to investigate markers that complement each other and adequately explain the differences between the study sites (Humphrey, King et Klumpp, 2007). In the present study, the main factorial plan of the PCA, explained 56 % of the total variance of the data set and thus gives a global vision on the variability of biomarkers and fish distributions over the different sampling sites along the St Lawrence estuary. The first PCA axis was mainly explained by the immune markers and by

the condition index (phagocytosis *vs* CF - percentage of G2/M phase lymphocytes); the second axis being associated to detoxification activities (EROD *vs* MT).

The fish distribution on the main factorial plan shows a clear separation of the upstream sites (Rivière-Ouelle and Cacouna) where the fish showed a better capacity of phagocytosis, a low number of cells in G2/M, a lower CF and limited detoxification activities (EROD and MT). We suggest that these sites are probably submitted to a reduced pollution, considering (1) their obvious reduced inputs of domestic, agricultural and industrial effluents and (2) the highly probable dilution effect of the SLE water in these “open systems” (*i.e.* non located in Bays).

On the other hand, the fish of the downstream sites (Sept-Îles and Penouille) showed globally a lower capacity phagocytosis, more cells in G2/M and higher CF, EROD activities and metallothionein levels; this second fish group was probably living in heavily polluted bays displaying complex mixtures of contaminants. We suggest that the higher fish spatial distribution over the axis 2 of the PCA in the downstream *vs* upstream populations underlines a higher variability of the detoxification activities (EROD activity and metallothionein level) linking to the fish aging in polluted *vs* in pristine systems.

5 CONCLUSION

In the present study, several biomarkers were explored on the Atlantic tomcod in contrasted environments of the SLE, the downstream sites displaying higher inputs of anthropogenic effluents when compared to upstream sites. Higher growth rate and condition factor in the two downstream sites (Penouille and Sept-Îles) *vs* upstream-sites (Cacouna, Rivière Ouelle) could be more related to ecological gradient than to contamination level. A reduced energy allocation for reproduction in maturing fish at Penouille could have detrimental consequences for fish reproduction and warrants further investigation on sexual maturation process and potential endocrine disruption at this site.

EROD and MT are linked to detoxification and are considered as biomarkers of exposure to pollutants. However, with the aging of the fish in the more polluted systems, the bioaccumulation of xenobiotics could inhibit the EROD activity but on the other hand should be necessary to induce the production of MT. The capacity of phagocytosis and the cell cycle analysis are indicators of the immune function that could affect the susceptibility of individuals to infectious agents (Bols *et al.*, 2001b). In the present study, complex mixtures of

contaminants in the downstream polluted systems could induces significant alterations of the tomcod immune system (inhibition of phagocytosis and proliferation of lymphocytes).

Further investigations will be necessary to thoroughly analyze the tomcod responses in habitats displaying contrasted levels of contamination but also differential hydroclimatic conditions. A better understanding of the possible role of the confounding factors (*i.e.* not directly linked to the chemical stress) on the modulation of biomarkers is needed. Chemical analysis should be conducted in sediments, preys and tomcod tissues to better characterize differential exposure of various age classes of tomcods at different sites. Thus, we suggest to study in the future the basic life cycle and the physiology of the tomcod in different regions of the SLE, as well as the seasonal baseline levels in the biomarkers, in addition to pollutant load in these locations. Finally, we suggest that the tomcod population genetics should be explored, to assess the possibility of gene flow between different sites and of genetic adaptation over the SLE.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was conducted in the environmental immunotoxicology laboratory at Institut Armand Frappier (IAF-INRS). Financial support has been provided by the Canada Research Chair in Environmental Immunotoxicology (Dr. Michel Fournier) and Collège Doctoral International de l'Université européenne de Bretagne. Authors also thank S. Gauthier-Clerc, Agence Mamu Innu Kaikusseht, the staff of Parc national Forillon and of the Ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Bas-Saint-Laurent for field sampling. The authors tank Marlene Fortier and Benoît Légaré for her technical assistance. Many thanks to an anonymous referee for his pertinent comments on the draft of this paper. This study was also supported by the INTERREG IV program (DIESE): 50% of the PhD grant was obtained by the first author, for the development of immune markers in ecotoxicology.

Chapitre 5 :

Discussion générale et perspectives

Les travaux réalisés au cours cette thèse mettent en évidence la pertinence d'un certain nombre de biomarqueurs en écotoxicologie, mais ils soulignent aussi les limites de leur utilisation et nos lacunes dans la compréhension des mécanismes de réponse à la contamination chimique. Comme bilan de cette thèse, on essaiera ici de répondre à différentes questions, autour de la réponse des poissons aux stress chimiques.

1 QUELS LIENS EXISTENT ENTRE LES DIFFÉRENTS BIOMARQUEURS ET QUELS MÉCANISMES SONT MIS EN JEUX ?

Le Tableau 5 reprend l'ensemble des biomarqueurs utilisés dans cette étude et les réponses observées dans chacun des chapitres présentés précédemment.

Nous citons ici deux études de cas abordés dans cette thèse, sur le système immunitaire et sur l'activité de biotransformation.

1.1 Le cas des réponses du système immunitaire

Au travers des trois études réalisées ici, il apparaît que les polluants peuvent impacter le système immunitaire, mais que les mécanismes mis en jeux restent complexes et peu connus. Par exemple, l'étude sur le poulamon met en évidence une diminution de la phagocytose ainsi qu'une augmentation de la prolifération lymphocytaire en milieux contaminés. Les polluants peuvent avoir un effet sur le système immunitaire par différents mécanismes : action directe des polluants, effet des hormones de stress, de la présence de ROS ou encore modification de la concentration cellulaire en Ca^{2+} (Bols *et al.*, 2001b; Reynaud et Deschaux, 2006; Reynaud, Raveton et Ravanel, 2008). Il est probable que l'induction du TNF-R et du C3 chez les flets contaminés soit liée à une inflammation au niveau du foie. L'inflammation est une réponse de défense non spécifique de l'organisme qui conduit à l'accumulation de leucocytes et de fluides sur la zone irritée, blessée ou infectée (Roca *et al.*, 2008); de nombreux polluants induisant une réponse inflammatoire au niveau du foie. Des analyses histopathologiques du foie permettraient de confirmer la présence d'une inflammation.

La diminution de la concentration en lysozyme et des capacités de phagocytose chez les poissons contaminés suggèrent un effet immunosuppresseur des contaminants. Les marqueurs utilisés ici ne permettent pas à eux seuls de comprendre les mécanismes de réponse du système immunitaire. Afin d'aider à cette compréhension, il faudrait envisager de mesurer

l'induction d'autres cytokines pro-inflammatoires et d'autres éléments du système du complément afin de confirmer le lien entre l'activation du système du TNF + complément, et la réponse inflammatoire. Il serait aussi nécessaire de compléter nos analyses en mesurant les hormones de stress ou la présence de ROS afin d'évaluer si ces éléments peuvent être responsables des modulations observées.

De plus, Reynaud *et al.* (2005) suggèrent que si les polluants peuvent moduler la réponse immunitaire, à l'inverse, certaines protéines du système immunitaire pourraient participer à la régulation des phénomènes de détoxification (notamment CYP1A1 et GST). Ces auteurs suggèrent que des cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF α ou l'interleukine1 α , pourraient participer à la sous-régulation des activités dépendantes du CYP1A1 par une action directe sur le Ah-R ou sur le gène CYP1A1. Néanmoins, au cours de cette étude, nous n'avons pas observé de corrélation négative entre le TNF-R et le CYP1A1 mRNA; ce résultat pouvant s'interpréter de différentes manières. Nous sommes partis de l'hypothèse qu'une induction du TNF-R était associée à une induction de TNF α ; néanmoins, il est possible que ce ne soit pas le cas, aussi seule l'identification du gène TNF α chez le flet nous permettrait d'approfondir cette hypothèse. De plus, s'il existe une régulation des activités CYP1A1 dépendantes, cette régulation pourrait être post-transcriptionnelle. Enfin, pour améliorer notre compréhension de ces mécanismes de régulation du processus de détoxification, il serait nécessaire de mesurer à la fois le niveau d'ARNm de CYP1A1 mais aussi son niveau de protéines et/ou l'activité EROD qui en découle, parallèlement à une quantification des cytokines pro-inflammatoires telle que le TNF α et l'interleukine1 α .

1.2 Le cas du couplage : biotransformation – dommages à l'ADN

L'utilisation d'analyses factorielles conduites sur les multiples biomarqueurs et le calcul de corrélations peuvent améliorer notre compréhension sur les liens existant entre les différentes fonctions biologiques modulées par un stress chimique. Ainsi, lors de l'étude expérimentale, nous avons pu confirmer qu'il existait une corrélation entre l'induction de CYP1A1 et le niveau de dommages à l'ADN. Des études ont déjà souligné le lien entre la concentration en métabolites des HAPs ou l'activité EROD et les dommages à l'ADN (*e.g.* Curtis *et al.*, 2011; Wessel *et al.*, 2010). Notre étude suggère donc que la présence de métabolites puisse conduire à une augmentation de la génotoxicité, néanmoins, il ne faut pas écarter la possibilité que d'autres mécanismes soient également impliqués dans ces

dommages, comme par exemple la production de ROS. De plus, l'absence de dommages mesurables 15 jours après l'arrêt de la contamination suggère que ces dommages peuvent être réparés et que par conséquent, une pollution ponctuelle n'entraînera probablement pas de dommages à l'ADN durables.

2 QUELS BIOMARQUEURS A PRIVILÉGIER ?

L'expérience de **contamination expérimentale** (chapitre 2) a mis en évidence un effet des contaminants significatif sur différents biomarqueurs : les dommages à l'ADN, les mécanismes de détoxification (CYP1A1, BHMT) et les marqueurs immunologiques (lysozyme, TNF-R et C3) (Tableau 5). Néanmoins, on a constaté que l'indice de condition (CF), l'activité enzymatique de la Cytochrome C Oxydase (CCO) et la phagocytose n'ont pas été modulés par la présence du mélange HAPs - PCBs.

2.1 Les marqueurs qui n'ont pas montré de modulations dans une ou plusieurs études doivent-ils être reconsidérés ?

L'absence de modulation du **CF** est en fait un élément positif dans notre expérience de contamination par l'aliment ; elle confirme en fait que les poissons n'ont pas mangé de façon différentielle les granulés, qu'ils soient imprégnés ou non par les contaminants. En milieu naturel, le CF a mis en évidence des différences significatives entre les sites, pour nos deux taxons : flet comme poulamon (Tableau 5) ; il est par contre difficile de différencier l'impact des polluants sur ce paramètre CF, relativement à celui des facteurs confondants de l'environnement (compétition intra-spécifique, abondance en proies, température, niveau d'eutrophisation,...).

De la même manière, les modulations de **HSI** semblent principalement liées aux conditions environnementales et notamment aux variations inter-saisons de l'allocation de l'énergie au niveau corporel, notamment chez le poulamon. Nos résultats sont donc en accord avec l'observation de Van der Oost *et al.* (2003) qui suggèrent que les indices de condition tel que le CF et le HSI peuvent être des indicateurs pertinents de l'état de santé global de l'organisme, mais qu'ils doivent être considérés avec précaution en écotoxicologie.

Tableau 5. Résultats des différents biomarqueurs et indicateurs mis en œuvre au cours de cette étude. Phago=capacité de phagocytose, cycle=% de cellules en phase G2/M, dommages=dommages à l'ADN, indiv.=individu, reins a.=reins antérieur ou pronéphros, érythro.=érythrocytes, cyto=cytométrie, activ.=activité enzymatique par mesure d'absorbance ou de luminescence, imat.=immature, matur. = en cours de maturation, n.m. signifie qu'il s'agit d'un marqueur non mesuré dans cette condition, ref. correspond à la valeur de référence à laquelle sont comparées les valeurs des autres conditions, un ++ ou - signifie que la valeur est plus de 2 fois supérieure ou inférieure à la valeur de référence.

indice mesuré		ADN	detoxification				système immunitaire					metabo.	indices de condition		
		dommages	MT	EROD	CYP1A1	BHMT	phago.	cycle	lysozyme	C3	TNF-R	CCO	CF	HSI	GSI
organe	technique	sang érythro. comet assay	reins a. cyto.	foie activ.	foie RT-PCR	foie RT-PCR	reins a. cyto.	reins a. cyto.	sang serum activ.	foie RT-PCR	foie RT-PCR	muscle activ.	indiv. indice	indiv. indice	indiv. indice
conditions expé.															
t0	Ctl	ref.	n.m.	n.m.	ref.	ref.	ref.	n.m.	ref.	ref.	ref.	ref.	ref.	n.m.	n.m.
t14	Ctl	0	n.m.	n.m.	0	0	0	n.m.	0	0	0	0	0	n.m.	n.m.
	C1	0	n.m.	n.m.	0	0	0	n.m.	-	0	0	0	0	n.m.	n.m.
	C2	0	n.m.	n.m.	0	0	0	n.m.	-	0	0	0	0	n.m.	n.m.
t29	Ctl	0	n.m.	n.m.	0	0	0	n.m.	0	0	0	0	0	n.m.	n.m.
	C1	0	n.m.	n.m.	0	0	0	n.m.	-	+	0	0	0	n.m.	n.m.
	C2	+	n.m.	n.m.	++	+	0	n.m.	-	++	+	0	0	n.m.	n.m.
t43	Ctl	0	n.m.	n.m.	0	0	0	n.m.	0	0	0	0	0	n.m.	n.m.
	C1	0	n.m.	n.m.	0	0	0	n.m.	0	0	0	0	0	n.m.	n.m.
	C2	0	n.m.	n.m.	+	++	0	n.m.	0	0	0	0	0	n.m.	n.m.
terrain - flet															
2009	Canche	n.m.	n.m.	n.m.	ref.	ref.	n.m.	n.m.	n.m.	ref.	ref.	ref.	ref.	n.m.	n.m.
	Tamar	n.m.	n.m.	n.m.	0	0	n.m.	n.m.	n.m.	0	+	0	-	n.m.	n.m.
	Seine	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	+	-	n.m.	n.m.
2010	Canche 0+	n.m.	n.m.	n.m.	0	0	ref	n.m.	n.m.	0	0	0	0	n.m.	n.m.
	Canche 1+	n.m.	n.m.	n.m.	0	0	0	n.m.	n.m.	0	0	0	0	n.m.	n.m.
	Seine 0+	n.m.	n.m.	n.m.	0	+	--	n.m.	n.m.	+	+	++	0	n.m.	n.m.
	Seine 1+	n.m.	n.m.	n.m.	0	0	--	n.m.	n.m.	+	+	0	0	n.m.	n.m.
terrain - Poulamon															
Rivière-Ouelle - imat.		n.m.	ref.	ref.	n.m.	n.m.	ref.	ref.	n.m.	n.m.	n.m.	ref.	ref.	ref.	ref.
Rivière-Ouelle - matur.		n.m.	0	0	n.m.	n.m.	0	0	n.m.	n.m.	n.m.	0	0	+	+
Cacouna - imat.		n.m.	0	+	n.m.	n.m.	0	0	n.m.	n.m.	n.m.	0	0	+	0
Cacouna - matur.		n.m.	0	0	n.m.	n.m.	0	0	n.m.	n.m.	n.m.	0	0	+	+
Sept-îles - imat.		n.m.	0	0	n.m.	n.m.	0	+	n.m.	n.m.	n.m.	0	+	+	0
Sept-îles - matur.		n.m.	+	0	n.m.	n.m.	-	+	n.m.	n.m.	n.m.	0	0	0	+
Penouille - imat.		n.m.	0	++	n.m.	n.m.	--	+	n.m.	n.m.	n.m.	0	++	0	0
Penouille - matur.		n.m.	++	0	n.m.	n.m.	--	++	n.m.	n.m.	n.m.	0	++	0	+

La mesure de l'**activité enzymatique de la CCO** sur le muscle n'a pas donné de résultats probants, en conditions expérimentales pour le flet, comme sur le terrain pour le poulamon. Seuls les flets 0+ échantillonnés sur le terrain présentaient une modulation de cette activité, entre les sites contaminés et non contaminés. La comparaison pour les poissons juvéniles, des valeurs moyennes de CCO inter-groupes ne semble donc pas *a priori* très pertinente ; cependant, les analyses inter-individuelles (conduites par AFC et estimation de corrélations) démontrent que la CCO est un marqueur qui peut conduire à l'identification de réponses différentielles entre des poissons soumis au même stress chimique. Par ailleurs, il a été démontré récemment que la présence de polluants pouvait entraîner une modulation du métabolisme énergétique chez les flets juvéniles, mais au niveau hépatique (Calvès, 2011). Globalement, on peut donc considérer que l'étude du métabolisme énergétique est très pertinente en écotoxicologie, la manière de produire de l'énergie et de l'allouer à différentes fonctions permettant au poisson de « résister » plus ou moins bien face au stress chimique.

Pour approfondir les modulations du métabolisme énergétique du poisson, induites par les polluants, l'utilisation de marqueurs complémentaires devrait être envisagée, comme la mesure de la citrate synthase, autre indicateur des capacités aérobies du muscle. La CS est la première enzyme intervenant dans le cycle de Krebs, dont l'activité peut être modulée chez les poissons, notamment par un stress métallique (Couture et Rajender Kumar, 2003). Par ailleurs, au niveau moléculaire, des études sur le flet ont mis en évidence des modulations de l'expression du gène de l'ATPase en présence d'herbicides après 30 jours d'exposition (Marchand *et al.*, 2006) et sur des sites estuariens à contamination chronique (Calvès, 2011). L'expression de l'ATPase pourrait donc être utilisée aussi comme un bon proxy potentiel du métabolisme énergétique, en complément de la mesure de l'activité de la CCO et de la CS.

Comme l'activité CCO, la **capacité de phagocytose** n'a pas produit de résultats probants en conditions expérimentales, mais a permis d'identifier des différentiels de réponse très significatifs sur le terrain, en lien avec la contamination chimique (Tableau 5). Les niveaux de capacité de phagocytose des poissons en conditions expérimentales étaient très faibles, dans toutes les conditions. Les poissons expérimentés étant des poissons issus d'un élevage au Danemark, des études complémentaires seraient nécessaires pour savoir si les niveaux de base faibles, en termes de phagocytose, ne seraient pas la conséquence de pressions de sélections involontaires liées à la technologie aquacole. De plus la durée assez

courte de l'exposition (29 jours) peut expliquer l'absence de réponse au niveau de la capacité de phagocytose.

De nombreuses études ont déjà démontré une diminution des capacités de phagocytose en présence de polluants (*e.g.* Danion *et al.*, 2012b; Salo *et al.*, 2007; Sanchez-Dardon *et al.*, 1999) ; les études réalisées dans cette thèse sur les populations naturelles de flet et de poulamon confirmant la pertinence de ce biomarqueur pour diagnostiquer l'effet immunosuppresseur des polluants.

2.2 Les marqueurs du système immunitaire sont-ils pertinents ?

Les autres indicateurs de l'état du **système immunitaire**, explorés dans cette thèse, ont été clairement impactés par le stress chimique, en conditions contrôlées comme en milieux naturels. Ainsi le **lysozyme** semble être le marqueur le plus sensible, puisqu'il est le seul à répondre chez le flet soumis 14 jours à un niveau de contamination (HAPs + PCBs) reflétant un milieu pollué comme l'estuaire de la Seine. Plusieurs études ont suggéré que le lysozyme pourrait être un biomarqueur pertinent en écotoxicologie du fait de sa sensibilité aux xénobiotiques, mais également parce que sa mesure est peu onéreuse, aisée à mettre en œuvre sur le sérum, et donc ne nécessitant pas le sacrifice des individus (Saurabh et Sahoo, 2008). Néanmoins, il n'est pas toujours possible de réaliser des prises de sang rapidement lors d'échantillonnage de 0+ sur le terrain car les poissons sont parfois trop petits ; en conséquence le lysozyme n'a pu être mesuré en conditions naturelles. Chez les poissons, le lysozyme est une enzyme présente au niveau des neutrophiles, monocytes et plus faiblement détectée dans les macrophages (Saurabh et Sahoo, 2008). Si le lysozyme est souvent mesuré dans le sérum, il est aussi retrouvé dans la rate, le tube digestif, le foie, ou encore le mucus de la peau des poissons (Murray et Fletcher, 1976; Saurabh et Sahoo, 2008). Par conséquent, on pourrait envisager de mesurer le niveau de lysozyme dans le mucus, ceci permettant un prélèvement non invasif, rapide et simple, quelle que soit la taille du poisson. Stabili et Pagliara (2009) ont observé une diminution de l'activité du lysozyme dans le mucus d'une étoile de mer (*Marthasterias glacialis*) en présence de zinc ; ceci suggérant que la quantité de lysozyme dans le mucus pourrait être modulée par la présence de polluants, tout comme elle l'est dans le sérum. Des analyses en conditions contrôlées et sur le terrain seront nécessaires pour évaluer si la mesure du lysozyme dans le mucus pourrait devenir un biomarqueur pertinent.

Le niveau d'expression des **gènes C3 et TNF-R** augmente en présence de contaminants chez le flet, aussi bien en conditions naturelles que contrôlées (chapitre 2 et 3 et Tableau 5). Comme mentionné précédemment, ces deux gènes sont impliqués dans la réponse inflammatoire aussi leur sur-expression pourrait s'expliquer par la présence d'une inflammation au niveau foie induite par les polluants. Il faut noter que seule l'expression de ces gènes a été mesurée et pas leur présence au niveau protéique. Or, l'approche **protéomique 2D** n'a pas mis en évidence de modulation particulière de la réponse inflammatoire ou d'inhibition du système immunitaire dans les 2 approches sur le flet (Annexes 1 et 2). Les approches en protéomique sont évidemment dépendantes des bases de données, aussi toutes les protéines qui apparaissent dérégulées sur un gel ne seront pas forcément identifiées. Sur le flet, environ 37% et 22% des protéines dérégulées ont pu être identifiées respectivement en conditions expérimentales et sur le terrain, ce qui est en accord avec les pourcentages d'identification observés sur d'autres espèces non modèles (Dowd, 2012; Forné, Abián et Cerdà, 2010). Par conséquent, l'absence de protéines immunitaires lors de l'approche 2D pourrait, en partie, s'expliquer par le fait que ces protéines ne sont pas encore clairement identifiées et disponibles dans les bases de données. Néanmoins, les bases de données étant les mêmes que celles utilisées pour de la génomique (banque EST), ce n'est pas l'hypothèse la plus probable. Notons qu'il est également possible que la quantité de protéines associée à un spot soit en dessous des seuils de détection de la technique (spot trop faible pour détecter des différences). De plus, les gels réalisés dans les approches 2D (présentées dans cette thèse en annexes) ne permettent pas de détecter des protéines en dessous de 14kDa, or certaines cytokines sont inférieures à cette taille. L'absence de protéine du système immunitaire en approche 2D peut donc s'expliquer par les limites de cette technique.

Néanmoins, on ne peut pas écarter l'hypothèse que l'augmentation du niveau d'expression des gènes **C3 et TNF-R** ne serait pas obligatoirement associée à une augmentation de la protéine correspondante. Certains polluants peuvent ainsi affecter l'efficacité de la traduction ou la stabilité de l'ARNm ou de la protéine (Nikinmaa et Rytönen, 2011). Par conséquent, la mesure de l'expression du gène C3 pourrait être complétée par une mesure de l'activité de la voie alterne du complément (ACH50), plusieurs études ayant démontré sa dérégulation chez les poissons en présence de contaminants (e.g. Bado-Nilles *et al.*, 2009; Danion *et al.*, 2012b; Danion *et al.*, 2011b). De plus, l'expression du gène TNF-R a été considérée ici comme indicateur de l'activation du système du TNF.

Néanmoins, l'augmentation du récepteur n'est pas forcément liée à une augmentation de la protéine associée et il est donc nécessaire de réussir à identifier le gène du TNF- α chez le flet et d'étudier son expression ainsi que les niveaux de la protéine correspondante.

Lors de l'étude sur le poulamon, en complément des investigations sur la phagocytose, la proportion de cellules dans les différentes phases du **cycle cellulaire** a également été mesurée par cytométrie. Il s'agit d'une mesure permettant d'évaluer le pourcentage de cellules en division et donc d'estimer la prolifération cellulaire des lymphocytes. L'étude sur les populations de poulamon montre la complexité de la réponse immunitaire en présence de polluants ; sur les sites contaminés aux métaux, la diminution de capacité de phagocytose (qui suggère donc une immuno-suppression) a été associée à une augmentation du pourcentage de lymphocytes en prolifération (ce qui suggère à l'inverse une immuno-stimulation). La complexité du système immunitaire est aussi confirmée par Low et Sin (1998) qui observent que de faibles quantités de mercure entraînent une augmentation de la prolifération des lymphocytes, alors qu'une plus grande quantité inhiberait cette prolifération. De plus, le nombre de cellules immunitaires (leucocytes) et les proportions des différents types cellulaires (lymphocytes, neutrophiles granulocytes et monocytes) n'ont pas été évalués lors de notre étude sur le poulamon. Sachant qu'une diminution de certains types de leucocytes est possible en présence de contaminants (*e.g.* Danion *et al.*, 2011b), Il aurait été intéressant de réaliser le comptage des différentes populations cellulaires afin d'évaluer si l'augmentation des lymphocytes en phase de prolifération ne permettrait pas de compenser une diminution de leur effectif. De même, l'évaluation du pourcentage de cellule en apoptose pourrait être conduite par cytométrie, afin d'évaluer si cette prolifération s'explique par une augmentation du nombre de cellules qui meurent.

Si la réponse des **marqueurs immunologiques** à la contamination semble complexe, les investigations sur de tels marqueurs nous paraissent très pertinentes car une modification des capacités immunitaires d'un organisme peut conduire à une augmentation de sa sensibilité aux pathogènes et donc à une perte de fitness. Par ailleurs, des analyses génétiques sur le flet par l'utilisation de puces à ADN ou de banques soustractives (SSH) ont mis en évidence des modulations très significatives de l'expression de gènes du système immunitaire par les polluants, en conditions contrôlées et dans la nature (Evrard *et al.*, 2010b; Marchand *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2003). Par conséquent, il serait probablement judicieux d'étudier la réponse d'autres gènes impliqués dans l'immunité comme celle d'une autre cytokine pro-inflammatoire l'interleukin 1 ; ceci permettant de confirmer que la réponse du TNF est bien

liée à une réponse inflammatoire. De plus d'autres marqueurs au niveau cellulaire pourraient être mesurés par cytométrie comme par exemple la flambée oxydative ; Il s'agit ici d'une mesure complémentaire de la capacité de phagocytose qui donne une indication, non plus de la capacité à phagocyter une bille, mais à détruire un élément phagocyté.

2.3 Importance et complexité des marqueurs de détoxification et de génotoxicité

Les **biomarqueurs de détoxification** sont très utilisés en écotoxicologie car leur induction est le plus souvent la conséquence d'une pollution plus ou moins spécifique. L'induction de CYP1A1 ou de l'activité EROD est le plus souvent due à la présence de HAPs ou de PCB-dl alors que l'induction de MT s'explique par la présence de métaux. Néanmoins, il faut interpréter ces derniers biomarqueurs avec précaution, car comme le suggère l'étude de populations naturelles de poissons (chapitre 2 et 3), l'absence d'induction ne signifie pas forcément une absence de polluants. Ainsi, l'expression du gène CYP1A1 n'est pas induite pour les flets de la Seine, malgré une contamination avérée en PCBs et HAPs dans cet estuaire. De même, si les poulamons immatures montrent une augmentation de l'activité EROD, elle n'est pas retrouvée chez les sub-adultes qui vivent pourtant dans le même environnement. A l'inverse, la MT est induite chez les poulamons prélevés dans deux sites contaminés aux métaux, mais uniquement pour le stade sud-adulte. Ces résultats suggèrent que si la MT est un biomarqueur de la présence de métaux, une certaine bioaccumulation est nécessaire pour que la MT soit induite et/ou détectable. Par conséquent, ces marqueurs de détoxification (CYP1A1, EROD et MT) sont à interpréter avec précaution ; l'absence de leur induction pouvant s'expliquer aussi bien par l'absence de contaminants que par la présence de substances inhibitrices de leur expression ou de leur activité, ou par le fait que les poissons sont trop jeunes pour avoir accumulé suffisamment de polluants. Rappelons qu'une absence d'induction d'un processus de détoxification peut être aussi liée à une adaptation développée dans une population chroniquement exposée aux polluants sur plusieurs décennies, des signatures adaptatives ayant été clairement identifiées chez différentes populations de flets en milieux estuariens (Calves *et al.*, 2012; Marchand *et al.*, 2010; Marchand *et al.*, 2004)

La **BHMT** est une enzyme catalysant la méthylation de l'homocystéine en méthionine. De nombreux travaux ont montré sa dérégulation tant au niveau de l'expression du gène que de l'accumulation de protéine, en réponse à une contrainte environnementale et notamment à

la contamination chimique ; son implication dans les mécanismes de détoxification de phase II a ainsi été proposée (Annexe 1; Evrard *et al.*, 2012; Evrard *et al.*, 2010b; Marchand *et al.*, 2006). La BHMT pourrait être impliquée dans un cycle aboutissant à la production de glutathion (GSH) (annexe 1). Le GSH intervient à la fois dans les défenses antioxydantes (par l'intermédiaire de la GPx) et dans la détoxification par conjugaison avec les xénobiotiques catalysée par la GST (ce qui permet leur excrétion). Afin de confirmer cette hypothèse, il pourrait être intéressant de cibler les autres protéines impliquées dans le cycle aboutissant à la production de glutathion et dont fait partie la BHMT (Annexe 1, Fig 7), comme par exemple la SHMT (Serine hydroxymethyltransférase) et la méthionine synthase (MS). Une investigation sur ces deux derniers gènes pourrait être envisagée, afin d'évaluer si leurs niveaux d'expression peuvent être corrélés avec celui de la BHMT.

Les **dommages à l'ADN** n'ont pu être mesurés sur le terrain, par la difficulté à prélever rapidement du sang sur un organisme de petite taille sur le terrain. Le test comète montre une différence du signal génotoxique significative entre flets témoins et flets contaminés, après 29 jours de contamination avec un niveau de HAPs + PCBs de l'ordre de 10 fois celui rencontré en estuaire de Seine. Malgré une non différenciation significative du niveau moyen de génotoxicité entre témoins et pollués après 14 jours d'exposition, l'analyse factorielle multi-paramètres met cependant clairement en évidence que c'est le seul marqueur qui permet de ségréger les groupes de poissons selon leur nature, *i.e.* pollués ou témoins. Il serait donc souhaitable dans le futur de mener aussi des explorations sur les signaux génotoxiques des flets juvéniles face à la pollution en milieux naturels ; un travail récent ayant souligné la forte pertinence de ce marqueur pour le flet 0+ en milieux estuariens (Evrard *et al.*, 2012) .

2.4 Biomarqueurs de la variabilité génétique

L'ensemble des marqueurs présentés précédemment peuvent être pertinents pour explorer la réponse d'organismes à la pollution et pour effectuer un diagnostic de la qualité des eaux estuariennes. Néanmoins, ces marqueurs à eux seuls ne peuvent mettre en évidence l'existence d'adaptation locale liée à des pressions de sélection dans les milieux naturels. Pour cela, de nouvelles explorations sont nécessaires afin d'évaluer la variabilité génétique des populations sur des sites plus ou moins contaminés.

Par exemple, sur le flet, Marchand *et al.* (2010) observent une augmentation de la fréquence de l'allèle A du locus p53 sur les sites contaminés par rapport au site de référence.

Le p53 est une protéine impliquée dans le contrôle de la croissance cellulaire et le maintien de l'intégrité du génome. Les individus portant l'allèle A de p53 pourraient avoir été sélectionnés sur les sites contaminés, car ils présentent vraisemblablement une meilleure fitness relativement aux autres génotypes dans les sites pollués. En l'absence d'une telle approche, il n'est pas possible de savoir par exemple si l'absence d'induction de CYP1A1 sur le flet de la Seine est la conséquence d'une sélection-adaptation dans cette population.

Calvès *et al.* (2012) ont mis en évidence sur le flet, une différence d'hétérozygotie entre les populations polluées de la Tamar et de la Seine par rapport à celle de la Canche, au niveau du locus AMPD1. L'AMPD1 est impliquée dans le métabolisme énergétique et plus particulièrement dans la stabilisation de la charge énergétique (Chapman et Atkinson, 1973; Yoshino et Murakami, 1981). Ces résultats suggèrent que les pressions induites par les contaminants ont pu entraîner une sélection dans les populations de Seine et de Tamar, retenant les génotypes associés à un meilleur bilan énergétique et donc à une meilleure capacité de résistance au stress chimique (Calvès, 2011). Si ces pressions de sélection s'exercent principalement lors du premier hiver (donc entre le passage de l'âge 0+ à 1+), cela pourrait expliquer pourquoi la cohorte de flets 0+ sur la Seine présente une CCO élevée relativement à celle d'une population témoin (Canche), alors qu'il n'existe plus de différentiel d'activité de la CCO entre les cohortes 1+ pour Seine et Canche. Ce type d'approche sur un gène candidat lié à la détoxification pourrait aussi permettre d'identifier une réponse adaptative du flet vis-à-vis de la détoxification en milieux pollués.

3 QUEL TYPE DE CONTAMINATION EXPÉRIMENTALE À PRIVILÉGIER ?

Un autre moyen d'appréhender l'effet de possibles adaptations locales au sein de populations est de réaliser une expérience de type « jardin commun » (« common garden » en anglais). Ce type d'expérience consiste à ramener au laboratoire et à maintenir simultanément en élevage des poissons issus de plusieurs populations naturelles. Une telle expérience a été menée avec succès sur le flet au laboratoire LEMAR, en collaboration avec l'équipe ARN (Adaptation – Reproduction – Nutrition) d'Ifremer-Brest, dans le cadre du programme ANR-EVOLFISH. Des poissons de la cohorte 0+ ont été capturés dans un estuaire au Portugal (le Mondego) et dans deux estuaires en France (La Seine et la Vilaine) ; ils ont été maintenus en captivité pendant plusieurs mois en conditions contrôlées. Ces poissons ont subi un challenge thermique et/ou chimique. Il a été ainsi possible d'évaluer si la réponse à une perturbation est

similaire quelle que soit l'origine populationnelle des poissons, ou au contraire d'identifier de possibles capacités différentielles à résister aux stress, *i.e.* des adaptations locales. Cette étude en « jardin commun » a notamment mis en évidence que les populations du Mondego étaient plus vulnérables face aux conditions de stress thermique ou chimique, relativement aux autres populations, et que ce différentiel de vulnérabilité était accru en situation de multi-stress (stress thermique + chimique) ; les poissons du Mondego présentant alors une altération de leur capacité à produire de l'énergie et un amaigrissement, relativement aux poissons de Vilaine et Seine.

On pourrait donc imaginer de mener une expérience similaire de type « jardin commun », à partir du savoir-faire acquis par le Laboratoire Lemar, pour comparer les performances de flets issus de Seine, Canche et Tamar, vis-à-vis de contaminations expérimentales. Pour les populations de poulamons, les niveaux de bases des biomarqueurs envisagés restent souvent peu connus pour cette espèce. Il serait là aussi très pertinent de réaliser un « jardin commun » sur le poulamon en considérant au laboratoire, les performances de poissons issus d'un site peu contaminé telle que Rivière-Ouelle et de deux sites fortement contaminés, tels que Penouille et Sept-îles.

La réalisation d'une **contamination** par des **aliments** contenant un mélange de polluants reste un bon moyen d'approcher les conditions naturelles (puisque la contamination se fait en grande partie par la chaîne alimentaire), tout en contrôlant les concentrations et les types de polluants (Daouk *et al.*, 2011). Un tel moyen de contamination semble donc préférable à une contamination par injection ou baignade. D'autre part, les études réalisées sur les populations naturelles ont montré que les **métaux** sont également des polluants très présents dans certains milieux (par exemple sur la Tamar pour le flet et à Penouille pour le poulamon) et qu'ils peuvent entraîner des modulations du système immunitaire. Par conséquent, il serait probablement très pertinent d'ajouter un polluant métallique au cocktail HAPs +t PCBs, comme par exemple du cadmium et/ou du cuivre. Enfin, le cocktail utilisé dans notre approche expérimentale sur le flet, à un niveau de concentration dans l'aliment similaire à celui de la Seine, a entraîné une réponse relativement faible des poissons, pour une durée courte d'exposition de 29 jours. Aussi en maintenant notre objectif de s'approcher des conditions naturelles, la durée de la contamination pourrait être rallongée à 5 mois ; cette durée correspondrait sensiblement à la période d'imprégnation nécessaire pour un flet en

estuaire pollué, pour montrer les premiers signaux de réponse au stress chimique (Evrard *et al.*, 2012).

Enfin, parallèlement au suivi des différents biomarqueurs évoqués dans les chapitres précédents, la pertinence des marqueurs immunologiques serait particulièrement testée par un **challenge viral**, après la période de contamination expérimentale. Notre objectif serait ici d'évaluer si les modulations du système immunitaire identifiées sont suffisantes pour sensibiliser les poissons à la présence de pathogènes. De telles expériences ont démontré que la présence de polluants pouvait diminuer le temps de vie des poissons exposés aux virus (Danion *et al.*, 2012a).

4 QUELS SITES D'ÉTUDES, PÉRIODES ET MODÈLES CHOISIR EN MILIEU NATUREL ?

L'une des questions soulevées par l'étude sur le poulamon est l'existence d'un gradient Est/Ouest de différenciation dans les réponses des biomarqueurs, potentiellement lié à l'hydroclimat et pas forcément majoritairement au stress chimique (chapitre 4). **L'ajout d'un site** contaminé, à proximité géographique des sites de référence, permettrait d'évaluer la part de réponse liée à la contamination, de celle liée à l'hydroclimat. Il existe un herbier à zostère à proximité du port de Rimouski, une ville située à environ 100km au Nord de Cacouna. Des échantillonnages réalisés dans cet herbier ont déjà montré la présence de poulamons (Nellis *et al.*, 2012) ; par ailleurs, du fait de la présence de la ville et du port de Rimouski, ce site est potentiellement contaminé. L'ajout de ce site pourrait donc être envisagé pour de futures études sur le poulamon. Les sites échantillonnés en France et au Québec sont des sites présentant des niveaux contrastés de pollution, aussi des **dosages chimiques** seront aussi nécessaires (dosages des métaux et polluants organiques, dans les sédiments et dans les tissus des poissons) afin de mieux caractériser la contamination des sites.

Lors des études sur les populations naturelles (chapitre 3 et 4), les poissons ont été capturés au moins de septembre ou octobre donc avant l'hiver, après que les poissons aient passé un été dans l'estuaire. Néanmoins, de nombreuses études ont démontré qu'une grande part de la variabilité des biomarqueurs était liée à la **saison** (Kirby *et al.*, 2004; Kopecka et Pempkowiak, 2008; Pelletier, Guderley et Dutil, 1993). Par exemple, entre le mois de juillet et de décembre, Evrard *et al.* (2012) notent chez des flets échantillonnés dans la Vilaine, une augmentation du métabolisme enzymatique (expression du gène ATPase), de l'expression de

la BHMT et des dommages à l'ADN. Ces différences entre les réponses estivales et hivernales sont souvent plus marquées dans les estuaires contaminés que dans les estuaires peu pollués (Laroche *et al.*, 2012). Cela peut s'expliquer par l'impact des conditions environnementales sur la réponse des biomarqueurs (effet de la température, salinité, croissance...), mais aussi par des modifications de la source, des concentrations et de la nature des polluants présents dans les estuaires, selon la saison considérée. De plus, des perturbations spécifiques supplémentaires peuvent apparaître à certaines saisons et notamment une augmentation de la température et des phénomènes d'hypoxie en été. Ces perturbations peuvent accentuer l'effet des polluants sur les organismes. Il serait donc intéressant d'étudier dans quelle mesure la réponse du flet ou du poulamon au stress chimique pourrait être différente entre l'été et l'hiver.

L'un des objectifs de cette thèse était d'identifier les **convergences ou divergences** dans la réponse des **deux modèles** (le flet et le poulamon) face aux stress chimiques. Les études réalisées ici confirment que ces deux espèces pourraient être de bonnes espèces sentinelles de la qualité des milieux estuariens ; la plupart des biomarqueurs mesurés sur chacune de ces espèces semblant modulés par les contaminants. Pour des raisons techniques, tous les marqueurs n'ont pu être mesurés chez les deux espèces simultanément. Uniquement la capacité de phagocytose, l'activité de la CCO et le CF ont été mesurés sur le flet (en conditions contrôlées et environnementales) et le poulamon (Tableau 5). De plus, si l'expression du gène CYP1A1 a été mesurée sur le flet, l'activité EROD dépendante du CYP1A1 a été mesurée sur le poulamon, ces mesures peuvent donc être comparées afin d'évaluer la convergence des réponses des deux espèces à la pollution. Il apparaît, pour les deux espèces, que si l'activité liée au **cytochrome P450** peut être induite potentiellement en présence de polluants, la présence de contaminants n'est pas toujours associée à l'activation du cytochrome P450.

La mesure de l'activité de la **CCO** ne donne des résultats pertinents que sur les populations naturelles de flets 0+. L'absence de réponse sur le flet dans les autres conditions ou sur le poulamon ne semble pas liée à l'espèce étudiée, mais plus à la forte variabilité inter-individuelle du paramètre.

La variation du **CF** pourrait être plus sensible chez le flet puisqu'elle semble, dans certain cas, liée à la présence de contaminants (diminution du CF sur la Seine et la Tamar en 2009), ceci n'étant pas le cas pour le poulamon. Mais chez les deux espèces, on note

également que le CF peut être influencé par les facteurs confondants (pas de différence en 2010 pour le flet et un CF plus élevé pour le poulamon sur les sites les plus à l'Est).

L'**activité de phagocytose** ne donne pas de résultats concluants en conditions contrôlées sur les flets d'élevages et est réduite, pour le flet comme pour la poulamon, dans les sites contaminés. Il serait intéressant de mesurer d'autres paramètres immunitaires tels que le lysozyme ou le cycle cellulaire, sur les deux espèces afin de voir si l'on peut vérifier une certaine convergence dans les réponses immunitaires de ces modèles face aux polluants. Il faut noter que les deux espèces en milieux naturels ne sont pas forcément soumises aux mêmes types de contaminants et que les différences de réponses qui pourraient apparaître seraient à considérer avec précautions.

Enfin, se pose la question de l'**âge** des poissons. Des poulamons et des flets de la cohorte 0+, 1+ voir 2+ ont été capturés et les analyses réalisées démontrent que leurs réponses, en présence de polluants, peuvent être différentes selon les âges. Par exemple, l'activité EROD est induite chez les poulamon 0+ mais pas chez les poissons les plus âgés. Marchand *et al.*, (2006) ont réalisé une étude comparative de la réponse de flet juvéniles et adultes (mâles et femelles pris séparément) dans un estuaire peu contaminé et un estuaire présentant une pollution aux pesticides ; Ils observent une modulation de l'expression de gènes liés notamment au métabolisme général, à la production d'énergie et au transport de protéines. De la même manière dans notre étude, l'activité EROD n'est induite que chez les poulamons immatures de Cacouna et Penouille, (et pas chez les sub-adultes de ces mêmes sites) et l'activité de la CCO n'est augmentée que chez les flets 0+ de la Seine (et pas les 1+). Le statut physiologique et le régime alimentaire des poissons peuvent être différents entre les 0+ et les 1+ et ainsi expliquer qu'ils ne soient pas soumis à la même pollution. Des pressions de sélections s'exercent sur les poissons au cours de l'hiver et peuvent elles-aussi expliquer que les réponses des biomarqueurs soient différentes entre les 1+ et les 0+. Ainsi, travailler sur des poissons 0+ peut permettre d'évaluer des différences de réponses entre les sites, avant que les pressions de sélection ne se soient réellement exercées. Les 1+ sont quant à eux des poissons qui ont subi une première pression de sélection au cours de l'hiver. Bien que cela soit très coûteux en termes de temps passé sur le terrain, il semble donc très pertinent de continuer à explorer les réponses des juvéniles 0+ comme des 1+ dans les milieux naturels.

5 PERSPECTIVES

Quelques-unes des questions soulevées précédemment et les perspectives que l'on pourrait envisager suite à ce travail de thèse sont présentées de façon schématique dans la Figure 9.

Les études expérimentales et les explorations sur le terrain sont parfaitement complémentaires ; la réalisation couplée de telles approches permet de mieux comprendre la part de la réponse du poisson liée aux polluants et celle en relation avec les facteurs confondants de l'environnement. Le flet et le poulamon sont visiblement de bonnes espèces sentinelles de la qualité des milieux estuariens, aussi des études pourraient être conduites sur ces deux espèces en se concentrant sur la réponse des stades juvéniles (0+ et 1+).

Une approche de type « jardin commun » à partir de poissons venant de trois sites (pour le flet, comme pour le poulamon) permettrait d'appréhender la résultante de possibles pressions de sélection et aiderait à approfondir les mécanismes de réponse mis en jeux lors d'un stress chimique. Le protocole de l'expérience de contamination pourrait être établi en prenant en compte les questions soulevées dans cette thèse :

- augmentation du temps de contamination afin d'évaluer la durée d'exposition nécessaire pour observer des réponses à un niveau de contamination réaliste relativement à celui de l'environnement,
- complexification du mélange de contaminants afin de prendre en compte l'effet des métaux,
- réalisation d'un challenge virale en fin de contamination expérimentale, pour confirmer que l'altération du système immunitaire puisse s'accompagner d'une augmentation de la sensibilité au pathogène (Figure 9, en vert en haut).

Les études sur le terrain ont montré qu'il était parfois difficile de faire la part entre les modulations dues à la présence de polluants et celles liées aux facteurs confondants. Afin de mieux prendre en compte ces paramètres, il serait nécessaire à l'avenir de mieux caractériser les sites d'étude (Figure 9, en vert en bas). Pour cela, des dosages chimiques devront être réalisés sur les poissons et les sédiments des zones échantillonnées. Les conditions hydro-climatiques (température, salinité...) doivent être également prises en compte et un échantillonnage de poisson en été et hiver permettrait d'étudier l'effet de la saison sur les marqueurs retenus.

Enfin, de nombreux biomarqueurs utilisés au cours de cette thèse ont montré des réponses qui pourraient être liées à la présence de contaminants. Leur utilisation semble donc pertinente pour de nouvelles études. Néanmoins, d'autres paramètres pourraient être mesurés afin (1) de mieux comprendre les mécanismes de réponses au stress chimique, les liens entre ces mécanismes, et (2) de proposer à terme, de nouveaux indicateurs de l'état des écosystèmes estuariens. La Figure 9, reprend plusieurs des paramètres dont l'utilisation a été suggérée dans ce chapitre (Figure 9, encart violet). Il serait par exemple pertinent de compléter certaines approches en expression de gènes par des analyses au niveau de la protéine afin de détecter des inhibitions post-transcriptionnelles ou des décalages entre l'induction d'ARNm et celle de la protéine. La mesure de marqueurs de la réponse anti-oxydante pourrait également donner des indications sur l'éventuelle présence de ROS et ainsi aider à déterminer dans quelles mesures ils sont responsables des dommages à l'ADN et des modulations du système immunitaire. D'autres marqueurs immunologiques pourraient être étudiés afin de mieux appréhender la complexité des réponses de ce système face aux polluants.

Pour conclure, ce travail de thèse a permis de compléter certaines connaissances sur la réponse des poissons à la contamination, en utilisant une approche multi-paramètres. Cette thèse soulève également de nombreuses questions qui mettent en évidence la complexité des études écotoxicologiques et la nécessité d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes de la réponse des poissons face à la contamination chimique.

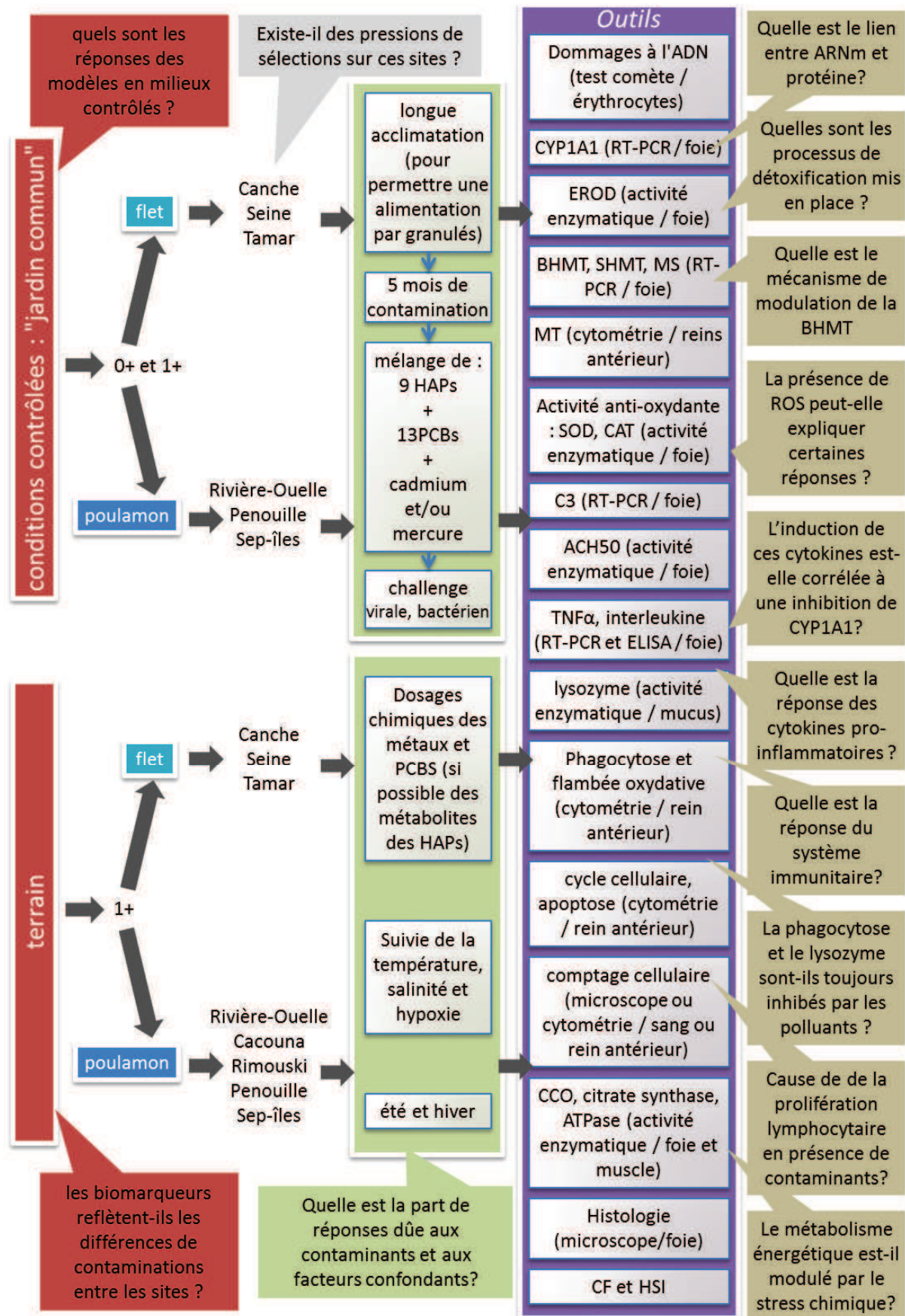


Figure 9 : Synthèse générale des questionnements et perspectives de recherche, sur l'impact du stress chimique sur les poissons.

Références bibliographiques

- Aarab, N., O. Champeau, P. Mora, M. Daubeze, P. Garrigues et J.F. Narbonne. 2004. «Scoring approach based on fish biomarkers applied to French river monitoring». *Biomarkers*, vol. 9, no 3, May-Jun, p. 258-270. En ligne: <Go to ISI>://WOS:000225863700003.
- Abarnou, A. et J. Duchemin. 2008. *Distribution et devenir de contaminants persistants dans les écosystèmes littoraux. Comparaison Manche ouest-Manche est*. Coll. «Rapport final etude AESN-IFREMER».
- Akcha, F., C. Spagnol et J. Rouxel. 2012. «Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos». *Aquatic Toxicology*, vol. 106–107, no 0, p. 104-113. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X1100302X>.
- Akcha, F., F. Vincent Hubert et A. Pfol-Leszkowicz. 2003. «Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds». *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 534, no 1–2, p. 21-32. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571802002449>.
- Al-Arabi, S.A.M. et A. Goksoyr. 2002. «Cytochrome P4501A responses in two tropical fish species, riverine catfish (*Rita rita*) and marine mudfish (*Apocryptes bato*)». *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, vol. 131, no 1, Jan, p. 61-71. En ligne: <Go to ISI>://000173570600007.
- Amara, R., T. Meziane, C. Gilliers, G. Hermel et P. Laffargue. 2007. «Growth and condition indices in juvenile sole *Solea solea* measured to assess the quality of essential fish habitat». *Marine Ecology Progress Series*, vol. 351, December 06, 2007, p. 201-208. En ligne: <http://www.int-res.com/abstracts/meps/v351/p201-208/>.
- Amara, R., J. Selleslagh, G. Billon et C. Minier. 2009. «Growth and condition of 0-group European flounder, *Platichthys flesus* as indicator of estuarine habitat quality». *Hydrobiologia*, vol. 627, no 1, p. 87-98.
- Amara, U., D. Rittirsch, M. Flierl, U. Bruckner, A. Klos, F. Gebhard, J.D. Lambris et M. Huber-Lang. 2008. «Interaction Between the Coagulation and Complement System». Dans *Current Topics in Complement II*, Trad. English, sous la dir. de J.D. Lambris, p. 68-76. Coll. «Advances in Experimental Medicine and Biology», no 632: Springer US. En ligne: http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-78952-1_6.
- Amiard, J. et C. Amiard-Triquet. 2008. *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques*. Paris: Lavoisier.

- Arkoosh, M., E. Clemons, P. Huffman, A. Kagley, E. Casillas, N. Adams, H. Sanborn, T. Collier et J. Stein. 2001a. «Increased susceptibility of juvenile chinook salmon to *vibriosis* after exposure to chlorinated and aromatic compounds found in contaminated urban estuaries». *Journal of Aquatic Animal Health*, vol. 13, p. 257-268.
- Arkoosh, M.R., E. Casillas, E. Clemons, A.N. Kagley, R. Olson, P. Reno et J.E. Stein. 1998. «Effect of Pollution on Fish Diseases: Potential Impacts on Salmonid Populations». *Journal of Aquatic Animal Health*, vol. 10, no 2, 1998/06/01, p. 182-190. En ligne: [http://dx.doi.org/10.1577/1548-8667\(1998\)010<0182:EOPOFD>2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1577/1548-8667(1998)010<0182:EOPOFD>2.0.CO;2). Consultation le 2012/08/02.
- Arkoosh, M.R., E. Clemons, P. Huffman, A.N. Kagley, E. Casillas, N. Adams, H.R. Sanborn, T.K. Collier et J.E. Stein. 2001b. «Increased Susceptibility of Juvenile Chinook Salmon to *Vibriosis* after Exposure to Chlorinated and Aromatic Compounds Found in Contaminated Urban Estuaries». *Journal of Aquatic Animal Health*, vol. 13, no 3, 2001/09/01, p. 257-268. En ligne: [http://dx.doi.org/10.1577/1548-8667\(2001\)013<0257:ISOJCS>2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1577/1548-8667(2001)013<0257:ISOJCS>2.0.CO;2). Consultation le 2012/11/08.
- Bado-Nilles, A. 2008. «Effets de pollutions par hydrocarbures sur les capacités de défense d'organismes marins». Université de La Rochelle.
- Bado-Nilles, A., C. Quentel, D. Mazurais, J.L. Zambonino-Infante, M. Auffret, H. Thomas-Guyon et S. Le Floch. 2011. «In vivo effects of the soluble fraction of light cycle oil on immune functions in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linné)». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 74, no 7, p. 1896-1904. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651311001850>.
- Bado-Nilles, A., C. Quentel, H. Thomas-Guyon et S. Le Floch. 2009. «Effects of two oils and 16 pure polycyclic aromatic hydrocarbons on plasmatic immune parameters in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linne)». *Toxicology in Vitro*, vol. 23, no 2, Mar, p. 235-241. En ligne: <Go to ISI>://000264044000005.
- Baganz, D., G. Staaks et C. Steinberg. 1998. «Impact of the cyanobacteria toxin, microcystin-lr on behaviour of zebrafish, *danio rerio*». *Water Research*, vol. 32, no 3, p. 948-952. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135497002078>.
- Bayne, C.J., L. Gerwick, K. Fujiki, M. Nakao et T. Yano. 2001. «Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization». *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 25, no 3, p. 205-217. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X00000574>.

- Beck, M., K. Heck Jr, K. Able, D. Childers, D. Eggleston, B. Gillanders, B. Halpern, C. Hays, K. Hoshino et T. Minello. 2001. «The identification, conservation, and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates». *BioScience*, vol. 51, no 8, p. 633-641.
- Bélangier, D. 2009. «Utilisation de la faune macrobenthique comme bioindicateur de la qualité de l'environnement marin côtier». Sherbrooke, université de Sherbrooke, 74 p.
- Belfroid, A.C., M. van Drunen, M.A. Beek, S.M. Schrap, C.A. van Gestel et B. van Hattum. 1998. «Relative risks of transformation products of pesticides for aquatic ecosystems». *The Science of The Total Environment*, vol. 222, no 3, p. 167-183. En ligne: <http://ukpmc.ac.uk/abstract/MED/9851068>.
- Bernier, J., P. Brousseau, K. Krzystyniak, H. Tryphonas et M. Fournier. 1995. «Immunotoxicity of heavy metals in relation to Great Lakes». *Environ Health Perspect*, vol. 103, no Suppl 9. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1289%2Fehp.95103s923>.
- Berthet, B. 2008. «Les espèces sentinelles». Dans *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques*, p. 121-148: Paris: Lavoisier.
- Beyers, D., J. Rice, W. Clements et C. Henry. 1999. «Estimating physiological cost of chemical exposure: integrating energetics and stress to quantify toxic effects in fish». *Can. J. Fish. Aquat. Sci*, vol. 56, p. 814-822.
- Blaise, C., F. Gagne, J. Pellerin, P.D. Hansen et S. Trottier. 2002. «Molluscan shellfish biomarker study of the Quebec, Canada, Saguenay Fjord with the soft-shell clam, *Mya arenaria*». *Environmental Toxicology*, vol. 17, no 3, Jun, p. 170-186. En ligne: <Go to ISI>://WOS:000176717400004.
- Bodiguel, X. 2008. «Caractérisation et modélisation des processus de bioaccumulation des PCB chez le merlu (*Merluccius merluccius*) du golfe du Lion». Montpellier 1.
- Bols, N.C., J.L. Brubacher, R.C. Ganassin et L.E.J. Lee. 2001a. «Ecotoxicology and innate immunity in fish». *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 25, no 8-9, p. 853-873. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T5X-43VYK8W-F/2/03464fcf2f567466adb0e77acf81e69c>.
- Bols, N.C., J.L. Brubacher, R.C. Ganassin et L.E.J. Lee. 2001b. «Ecotoxicology and innate immunity in fish». *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 25, no 8-9, Oct-Dec, p. 853-873. En ligne: <Go to ISI>://000171243900013.

- Borsa, P., A. Blanquer et P. Berrebi. 1997. «Genetic structure of the flounders, *Platichthys flesus*, at different geographic scales». *Marine Biology*, vol. 129, no 2, p. 233-246. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1007/s002270050164>.
- Boshra, H., J. Li et J.O. Sunyer. 2006. «Recent advances on the complement system of teleost fish». *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 20, no 2, p. 239-262. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S105046480500077X>.
- Bravo, C.F. 2005. «Assessing mechanisms of immunotoxicity for polycyclic aromatic hydrocarbons in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)». Oregon State university.
- Bravo, C.F., L.R. Curtis, M.S. Myers, J.P. Meador, L.L. Johnson, J. Buzitis, T.K. Collier, J.D. Morrow, C.A. Laetz, F.J. Loge et M.R. Arkoosh. 2011. «Biomarker responses and disease susceptibility in juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fed a high molecular weight PAH mixture». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 30, no 3, p. 704-714. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1002/etc.439>.
- Brousseau, P., Y. Payette, H. Tryphonas, B. Blakley, H. Boermans, D. Flipo et M. Fournier. 1999. *Manual of immunological methods*. Coll. «Handbooks in Pharmacology and Toxicology». Boston, USA: CRC Press.
- Bruneau, A. 2011. «Immunotoxicité Des Nanoparticules De Cd/S, Cd/Te Et D'Ag Sur Des Espèces Modèles». thesis, Montréal, INRS-institut armand frappier, biologie, 426 p.
- Burgeot, T. et D. Ménard. 2004. *Mesure de l'activité enzymatique éthoxyrésorufine-O-dééthylase (ÉROD) chez les poissons marins*. Coll. «Méthodes d'analyse en milieu marin»: Ifremer, 25 p.
- Burnett, K.G., L.J. Bain, W.S. Baldwin, G.V. Callard, S. Cohen, R.T. Di Giulio, D.H. Evans, M. Gómez-Chiarri, M.E. Hahn, C.A. Hoover, S.I. Karchner, F. Katoh, D.L. MacLatchy, W.S. Marshall, J.N. Meyer, D.E. Nacci, M.F. Oleksiak, B.B. Rees, T.D. Singer, J.J. Stegeman, D.W. Towle, P.A. Van Veld, W.K. Vogelbein, A. Whitehead, R.N. Winn et D.L. Crawford. 2007. «*Fundulus* as the premier teleost model in environmental biology: Opportunities for new insights using genomics». *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, vol. 2, no 4, p. 257-286. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1744117X0700072X>.
- Cabas, I., S. Liarte, A. García-Alcázar, J. Meseguer, V. Mulero et A. García-Ayala. 2012. «17 α -Ethinylestradiol alters the immune response of the teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) both in vivo and in vitro». *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 36, no 3, p. 547-556. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X11002564>.

- Cabon, J.Y., L. Burel, C. Jaffrennou, P. Giamarchi et F. Bautin. 2007. «Study of trace metal leaching from coals into seawater». *Chemosphere*, vol. 69, no 7, p. 1100-1110. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653507004869>.
- Cabral, H.N., R. Vasconcelos, C. Vinagre, S. França, V. Fonseca, A. Maia, P. Reis-Santos, M. Lopes, M. Ruano, J. Campos, V. Freitas, P.T. Santos et M.J. Costa. 2007. «Relative importance of estuarine flatfish nurseries along the Portuguese coast». *Journal of Sea Research*, vol. 57, no 2-3, p. 209-217. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VHH-4KX2DF5-1/2/159afc14f75ac5b195bc920178abceca>.
- Cachot, J., Y. Cherel, T. Larcher, A. Pfohl-Leszkowics, J. Laroche, L. Quiniou, J. Morin, J. Schmitz, T. Burgeot et D. Pottier. 2012. «Histopathological lesions and DNA adducts in the liver of European flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Seine estuary versus two reference estuarine systems on the French Atlantic coast». *Environ. Sci Pollut Res (In press)*.
- Cachot, J., O. Geffard, S. Augagneur, S. Lacroix, K. Le Menach, L. Peluhet, J. Couteau, X. Denier, M.H. Devier, D. Pottier et H. Budzinski. 2006. «Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France)». *Aquatic Toxicology*, vol. 79, no 3, p. 257-267. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T4G-4KJDWP0-1/2/0f286c661dabb8d03ab866735ac8452f>.
- Calvès, I. 2011. «Effets du réchauffement climatique, de l'hypoxie et de la contamination chimique sur les réponses évolutives de populations de flet (*Platichthys flesus*)». thesis, Brest, Université de Bretagne Occidentale, Science de la mer, 204 p.
- Calves, I., E. Lavergne, A. Meistertzheim, G. Charrier, H. Cabral, B. Guinand, L. Quiniou et J. Laroche. 2012. «Genetic structure of the European flounder (*Platichthys flesus*) considering the southern limit of the species' range and the potential impact of chemical stress». *Mar Ecol Prog Ser*, vol. (In press).
- Carlson, E.A., Y. Li et J.T. Zelikoff. 2004. «Benzo[a]pyrene-induced immunotoxicity in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): relationship between lymphoid CYP1A activity and humoral immune suppression». *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 201, no 1, Nov, p. 40-52. En ligne: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WXH-4CTN4C7-1&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=35a27ac6333ee76d5353b0969922a01e.

- Carlson, E.A., N.K. Roy et I.I. Wirgin. 2009. «Microarray analysis of polychlorinated biphenyl mixture-induced changes in gene expression among Atlantic tomcod populations displaying differential sensitivity to halogenated aromatic hydrocarbons». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 28, no 4, p. 759-771. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1897/08-195R.1>.
- Celander, M.C. 2011. «Cocktail effects on biomarker responses in fish». *Aquatic Toxicology*, vol. 105, no 3-4, Supplement, p. 72-77. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X11001603>.
- Chapman, A.G. et D.E. Atkinson. 1973. «Stabilization of Adenylate Energy Charge by the Adenylate Deaminase Reaction». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 248, no 23, December 10, 1973, p. 8309-8312. En ligne: <http://www.jbc.org/content/248/23/8309.abstract>.
- Chilmonczyk, S. et D. Monge. 1999. «Flow cytometry as a tool for assessment of the fish cellular immune response to pathogens». *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 9, no 4, p. 319-333. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464898901887>.
- Chouinard, G.A. et D.P. Swain. 2002. «Depth-dependent variation in condition and length-at-age of Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the southern Gulf of St. Lawrence». *Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, vol. 59, no 9, p. 1451. En ligne: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=aph&AN=8770429&lang=fr&site=ehost-live>.
- Christen, V., S. Hickmann, B. Rechenberg et K. Fent. 2010. «Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: A concept for their identification based on their mode of action». *Aquatic Toxicology*, vol. 96, no 3, p. 167-181. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X09004226>.
- Cohen, A., M. Gagnon et D. Nugegoda. 2005. «Alterations of Metabolic Enzymes in Australian Bass, *Macquaria novemaculeata*, After Exposure to Petroleum Hydrocarbons». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 49, no 2, p. 200-205. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-004-0174-1>.
- Cohen, A., D. Nugegoda et M.M. Gagnon. 2001. «Metabolic Responses of Fish Following Exposure to Two Different Oil Spill Remediation Techniques». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 48, no 3, p. 306-310. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651300920207>.
- Coleman, F. et S. Williams. 2002. «Overexploiting marine ecosystem engineers: potential consequences for biodiversity». *TRENDS in Ecology & Evolution*, vol. 17, no 1.

- Cormier, S.M., R.N. Racine, C.E. Smith, W.P. Dey et T.H. Peck. 1989. «Hepatocellular carcinoma and fatty infiltration in the Atlantic tomcod, *Microgadus tomcod* (Walbaum)». *Journal of Fish Diseases*, vol. 12, no 2, p. 105-116. En ligne: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=aph&AN=15417772&lang=fr&site=ehost-live>.
- Corsolini, S., N. Ademollo, T. Romeo, S. Greco et S. Focardi. 2005. «Persistent organic pollutants in edible fish: a human and environmental health problem». *Microchemical Journal*, vol. 79, no 1-2, Oct 20-24, p. 115-123. En ligne: <Go to ISI>://000226907100021.
- Costa, P.M., J. Lobo, S. Caeiro, M. Martins, A.M. Ferreira, M. Caetano, C. Vale, T.Á. DelValls et M.H. Costa. 2008. «Genotoxic damage in *Solea senegalensis* exposed to sediments from the Sado Estuary (Portugal): Effects of metallic and organic contaminants». *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 654, no 1, p. 29-37. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571808001290>.
- Cotano, U. et F. Villate. 2006. «Anthropogenic influence on the organic fraction of sediments in two contrasting estuaries: A biochemical approach». *Marine Pollution Bulletin*, vol. 52, no 4, p. 404-414. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X05004194>.
- Couillard, C.M. 2009. «Utilisation des poissons pour évaluer les effets biologiques des contaminants dans l'estuaire du Saint-Laurent et le fjord du Saguenay / use of fish to assess biological effects of contaminants in the St. Lawrence Estuary and Saguenay Fjord». *Revue des sciences de l'eau / journal of water Science*, vol. 22, no 2, p. 291-314.
- Couillard, C.M., M. Lebeuf, M.G. Ikononou, G.G. Poirier et W.J. Cretney. 2005. «Low hepatic ethoxyresorufin-o-deethylase activity correlates with high organochlorine concentrations in Atlantic tomcod from the Canadian east coast». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 24, no 10, p. 2459-2469. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1897/05-048R.1>.
- Couillard, C.M., P.J. Williams, S.C. Courtenay et G.P. Rawn. 1999. «Histopathological evaluation of Atlantic tomcod (*Microgadus tomcod*) collected at estuarine sites receiving pulp and paper mill effluent». *Aquatic Toxicology*, vol. 44, no 4, p. 263-278. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X9800085X>.
- Couillard, C.M., I.I. Wirgin, M. Lebeuf et B. Légaré. 2004. «Reduction of cytochrome P4501A with age in Atlantic tomcod from the St. Lawrence Estuary, Canada: relationship with emaciation and possible effect of contamination». *Aquatic*

- Toxicology*, vol. 68, no 3, p. 233-247. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X04001006>.
- Courrat, A., J. Lobry, D. Nicolas, P. Laffargue, R. Amara, M. Lepage, M. Girardin et O. Le Pape. 2009. «Anthropogenic disturbance on nursery function of estuarine areas for marine species». *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, vol. 81, no 2, p. 179-190. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272771408003971>.
- Couture, P. et P. Rajender Kumar. 2003. «Impairment of metabolic capacities in copper and cadmium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*)». *Aquatic Toxicology*, vol. 64, no 1, p. 107-120. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X03000286>.
- Couture, P., J.W. Rajotte et G.G. Pyle. 2008. «Seasonal and Regional Variations in Metal Contamination and Condition Indicators in Yellow Perch (*Perca flavescens*) along Two Polymetallic Gradients. III. Energetic and Physiological Indicators». *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, vol. 14, no 1, 2008/02/01, p. 146-165. En ligne: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10807030701790314>. Consultation le 2012/11/05.
- Cowley, P.D. et A.K. Whitfield. 2002. «Biomass and production estimates of a fish community in a small South African estuary». *Journal of Fish Biology*, vol. 61, p. 74-89. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.2002.tb01763.x>.
- Curtis, L.R., C.B. Garzon, M. Arkoosh, T. Collier, M.S. Myers, J. Buzitis et M.E. Hahn. 2011. «Reduced cytochrome P4501A activity and recovery from oxidative stress during subchronic benzo[a]pyrene and benzo[e]pyrene treatment of rainbow trout». *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 254, no 1, p. 1-7. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X11001542>.
- Danion, M., S. Le Floch, J. Castric, F. Lamour, J. Cabon et C. Quentel. 2012a. «Effect of chronic exposure to pendimethalin on the susceptibility of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* L., to viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 79, no 0, p. 28-34. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014765131200022X>.
- Danion, M., S. Le Floch, R. Kanan, F. Lamour et C. Quentel. 2012b. «Effects of in vivo chronic exposure to pendimethalin/Prowl 400® on sanitary status and the immune system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)». *Science of the Total Environment*, vol. 424, no 0, p. 143-152. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969712002677>.

- Danion, M., S. Le Floch, R. Kanan, F. Lamour et C. Quentel. 2011a. «Effects of in vivo chronic hydrocarbons pollution on sanitary status and immune system in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)». *Aquatic Toxicology*, vol. 105, no 3–4, p. 300-311. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X11001913>.
- Danion, M., S. Le Floch, F. Lamour, J. Guyomarch et C. Quentel. 2011b. «Bioconcentration and immunotoxicity of an experimental oil spill in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 74, no 8, p. 2167-2174. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651311002089>.
- Daouk, T., T. Larcher, F. Roupsard, L. Lyphout, C. Rigaud, M. Ledevin, V. Loizeau et X. Cousin. 2011. «Long-term food-exposure of zebrafish to PCB mixtures mimicking some environmental situations induces ovary pathology and impairs reproduction ability». *Aquatic Toxicology*, vol. 105, no 3, p. 270-278.
- Dautremepuits, C., S. Betoulle, S. Paris-Palacios et G. Vernet. 2004. «Humoral immune factors modulated by copper and chitosan in healthy or parasitised carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp (Cestoda)». *Aquatic Toxicology*, vol. 68, no 4, Jul 14, p. 325-338. En ligne: <Go to ISI>://WOS:000222092500004.
- DeFranco, A.L., M. Robertson et R.M. Locksley. 2009. *Immunité : la réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires*. Bruxelles.
- Déniel, C. 1981. «Les Poissons plats (Téléostéens, Pleuronectiformes) en baie de Douarnenez: reproduction, croissance et migration des *Bothidae*, *Scophthalmidae*, *Pleuronectidae* et *Soleidae*». Université de Bretagne Occidentale.
- Derfus, A.M., W.C.W. Chan et S.N. Bhatia. 2004. «Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots». *Nano Letters*, vol. 4, no 1, 2004/01/01, p. 11-18. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1021/nl0347334>.
- Devaux, A., P. Flammarion, V. Bernardon, J. Garric et G. Monod. 1998. «Monitoring of the chemical pollution of the river Rhone through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A induction in chub (*Leuciscus cephalus*)». *Marine Environmental Research*, vol. 46, no 1-5, Jul-Dec, p. 257-262. En ligne: <Go to ISI>://WOS:000075806100053.
- Dew, C. et J. Hecht. 1994. «Hatching, estuarine transport, and distribution of larval and early juvenile Atlantic tomcod, *Microgadus tomcod*, in the Hudson River». *Estuaries and Coasts*, vol. 17, no 2, p. 472-488. En ligne: <http://dx.doi.org/10.2307/1352677>.

- Dobson, J. 2000. «Long Term Trends in Trace Metals in Biota in the Forth Estuary, Scotland, 1981-1999». *Marine Pollution Bulletin*, vol. 40, no 12, p. 1214-1220. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V6N-41WJY0N-M/2/c725ced0632b638e64270fc1412937b8>.
- Dolbeth, M., F. Martinho, I. Viegas, H. Cabral et M.A. Pardal. 2008. «Estuarine production of resident and nursery fish species: Conditioning by drought events?». *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, vol. 78, no 1, p. 51-60. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272771407005124>.
- Dowd, W.W. 2012. «Challenges for Biological Interpretation of Environmental Proteomics Data in Non-model Organisms». *Integrative and Comparative Biology*, June 22, 2012. En ligne: <http://icb.oxfordjournals.org/content/early/2012/06/22/icb.ics093.abstract>.
- Dowling, V.A. et D. Sheehan. 2006. «Proteomics as a route to identification of toxicity targets in environmental toxicology». *PROTEOMICS*, vol. 6, no 20, p. 5597-5604. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200600274>.
- Doyotte, A., C.L. Mitchelmore, D. Ronisz, J. McEvoy, D.R. Livingstone et L.D. Peters. 2001. «Hepatic 7-ethoxyresorufin O-deethylase activity in eel (*Anguilla anguilla*) from the Thames Estuary and comparisons with other United Kingdom estuaries». *Marine Pollution Bulletin*, vol. 42, no 12, Dec, p. 1313-1322. En ligne: <Go to ISI>://000173052200019.
- Dunbar, M. 1970. «On the fishery potential of the sea waters of the Canadian north». *Arctic*, vol. 23, no 3, p. 150-174.
- Dunier, M. 1996. «effets des pesticides et des métaux lourds sur le système immunitaire de la carpe *Cyprinus carpio*». *Ichthyophysiol.*, vol. Acta 14, p. 9-22.
- Dunier, M. et A.K. Siwicki. 1993. «effects of pesticides and other organic pollutants in the aquatic environment on immunity of fish - a review». *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 3, no 6, Nov, p. 423-438. En ligne: <Go to ISI>://A1993MJ15200003.
- Dupuy, C., C. Galland, A. Devaux, S. Bony, V. Loizeau, M. Danione, M. Auffret, M. Fournier et J. Laroche. in submission. «Responses of the European flounder (*Platichthys flesus*) to a mixture of PAHs and PCBs in experimental conditions».
- Dutil, J.-D., Y. Lambert et D. Chabot. 2003. «Winter and spring changes in condition factor and energy reserves of wild cod compared with changes observed during food-deprivation in the laboratory». *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*,

- vol. 60, no 4, January 1, 2003, p. 780-786. En ligne: <http://icesjms.oxfordjournals.org/content/60/4/780.abstract>.
- Eggens, M.L., A.D. Vethaak, M.J. Leaver, G. Horbach, J.P. Boon et W. Seinen. 1996. «Differences in CYP1A response between flounder (*Platichthys flesus*) and plaice (*Pleuronectes platessa*) after long-term exposure to harbour dredged spoil in a mesocosm study». *Chemosphere*, vol. 32, no 7, Apr, p. 1357-1380. En ligne: <Go to ISI>://A1996UD53600012.
- Ekino, S., M. Susa, T. Ninomiya, K. Imamura et T. Kitamura. 2007. «Minamata disease revisited: An update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning». *Journal of the Neurological Sciences*, vol. 262, no 1-2, p. 131-144. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T06-4PB75MD-4/2/9ee467b4f846b7af6bd43077a067db56>.
- Evrard, E. 2009. «Réponses d'un poisson estuarien le flet (*Platichthys flesus*) au stress pesticides en milieu expérimental et au multi-stress in situ». Université de Bretagne Occidentale, 189 p.
- Evrard, E., A. Devaux, S. Bony, T. Burgeot, R. Riso, H. Budzinski, M. Du, L. Quiniou et J. Laroche. 2010a. «Responses of the European flounder *Platichthys flesus* to the chemical stress in estuaries: load of contaminants, gene expression, cellular impact and growth rate». *Biomarkers*, vol. 15, no 2, p. 111-127.
- Evrard, E., A. Devaux, S. Bony, J. Cachot, G. Charrier, L. Quiniou et J. Laroche. 2012. «Responses of juvenile European flounder (*Platichthys flesus*) to multistress in the Vilaine estuary, during a 6-month survey». *Environmental Science and Pollution Research*, p. 1-14. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-012-1138-z>.
- Evrard, E., J. Marchand, M. Theron, K. Pichavant-Rafini, G. Durand, L. Quiniou et J. Laroche. 2010b. «Impacts of mixtures of herbicides on molecular and physiological responses of the European flounder *Platichthys flesus*». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 152, no 3, p. 321-331. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1532045610001109>.
- Fang, J.K.H., D.W.T. Au, A.K.Y. Chan, L.K.Y. So, W.H. Liu, H.O.L. Mok, W.Y. Yu, R.S.S. Wu et P.K.S. Shin. 2010. «Ethoxyresorufin-O-deethylase enzyme activities and accumulation of secondary/tertiary lysosomes in rabbitfish *Siganus oramin* as biomarkers for xenobiotic exposures». *Science of the Total Environment*, vol. 408, no 20, Sep, p. 4833-4840. En ligne: <Go to ISI>://WOS:000281931500064.
- Fasulo, S., S. Marino, A. Mauceri, M. Maisano, A. Giannetto, A. D'Agata, V. Parrino, R. Minutoli et E. De Domenico. 2010. «A multibiomarker approach in *Coris julis* living

- in a natural environment». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 73, no 7, Oct, p. 1565-1573. En ligne: <Go to ISI>://WOS:000282792300011.
- Fernandez, M.P., M.G. Ikonou, S.C. Courtenay et I.I. Wirgin. 2004. «Spatial Variation in Hepatic Levels and Patterns of PCBs and PCDD/Fs among Young-of-the-Year and Adult Atlantic Tomcod (*Microgadus tomcod*) in the Hudson River Estuary». *Environmental Science & Technology*, vol. 38, no 4, 2004/02/01, p. 976-983. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1021/es034177f>. Consultation le 2012/07/05.
- Finkelstein, M.E., K.A. Grasman, D.A. Croll, B.R. Tershy, B.S. Keitt, W.M. Jarman et D.R. Smith. 2007. «Contaminant-associated alteration of immune function in black-footed albatross (*Phoebastria nigripes*), a North Pacific predator». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 26, no 9, Sep, p. 1896-1903. En ligne: <Go to ISI>://WOS:000248885900014.
- Flammarion, P., A. Devaux, S. Nehls, B. Migeon, P. Noury et J. Garric. 2002. «Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France)». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 51, no 2, Feb, p. 145-153. En ligne: <Go to ISI>://WOS:000174173700010.
- Florin, A.-B., G. Sundblad et U. Bergström. 2009. «Characterisation of juvenile flatfish habitats in the Baltic Sea». *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, vol. 82, no 2, p. 294-300. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272771409000225>.
- Flynn, L.T. 1997. «Public Health Concerns About Environmental Polychlorinated Biphenyls (PCBs)». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 38, no 2, p. 71.
- Fonseca, V.F., C. Vinagre et H.N. Cabral. 2006. «Growth variability of juvenile soles *Solea solea* and *Solea senegalensis*, and comparison with RNA : DNA ratios in the Tagus estuary, Portugal». *Journal of Fish Biology*, vol. 68, no 5, p. 1551-1562. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-1112.2006.001042.x>.
- Forné, I., J. Abián et J. Cerdà. 2010. «Fish proteome analysis: Model organisms and non-sequenced species». *Proteomics*, vol. 10, no 4, p. 858-872. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200900609>.
- Fortin, R., M. Léveillé, P. Laramée et Y. Mailhot. 1990. «Reproduction and year-class strength of the Atlantic tomcod (*Microgadus tomcod*) in the Sainte-Anne River, at La Pêrade, Québec». *Canadian Journal of Zoology*, vol. 68, no 7, p. 1350-1359.

- Fouqueray, C. 2008. «Le chien, sentinelle d'exposition ou d'effet sanitaire pour l'homme - Application aux polluants chimiques de l'environnement». Saint-nazaire, Faculté de médecine de Creteil, 126 p.
- Fournier, M., D. Cyr, B. Blakley, H. Boermans et P. Brousseau. 2000. «Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics». *American Zoologist*, vol. 40, no 3, p. 412.
- Frenzilli, G., M. Nigro et B.P. Lyons. 2009. «The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments». *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, vol. 681, no 1, p. 80-92. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383574208000355>. Consultation le 2009/2//.
- Froese, R. 2006. «Cube law, condition factor and weight-length relationships: history, meta-analysis and recommendations». *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 22, no 4, p. 241-253. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00805.x>.
- Gagnon, M. 1998. *Regional Assessment: South Shore of the St. Lawrence Upper Estuary. Priority Intervention Zones 15, 16 and 17*. Environment Canada – Quebec Region, Environmental Conservation, St. Lawrence Centre. , 70p p.
- Gagnon, M. 1997. *Bilan régional Gaspésie-Sud - Baie des Chaleurs : zone d'intervention prioritaire 20B*. Centre Saint-Laurent. En ligne: <http://books.google.fr/books?id=fBxSXwAACAAJ>.
- Gagnon, M.M. 2002. «Metabolic disturbances in fish exposed to sodium pentachlorophenate (NaPCP) and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126), individually or combined». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 132, no 4, p. 425-435. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1532045602000911>.
- Gagnon, M.M. et D.A. Holdway. 1999. «Metabolic Enzyme Activities in Fish Gills as Biomarkers of Exposure to Petroleum Hydrocarbons». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 44, no 1, p. 92-99. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651399918043>.
- Galland, C., C. Dupuy, C. Capitaine, M. Auffret, L. Quiniou, J. Laroche et V. Pichereau. 2012. «Comparisons of liver proteomes in the European flounder *Platichthys flesus* from three contrasted estuaries». *Journal of Sea Research*, no 0. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385110112000676>.

- Garceau, N., N. Pichaud et P. Couture. 2010. «Inhibition of goldfish mitochondrial metabolism by in vitro exposure to Cd, Cu and Ni». *Aquatic Toxicology*, vol. 98, no 2, p. 107-112. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X10000408>.
- GENIVAR. 2012. *Aménagement d'infrastructures portuaires au Port de Sept-Îles, Construction d'un quai multi-usagers à Pointe-Noire - Examen environnemental préalable*. 115 + annexes p.
- George, S., M. Gubbins, A. MacIntosh, W. Reynolds, V. Sabine, A. Scott et J. Thain (dir.). 2002 (Safety Harbor, FL, May 09). Elsevier Sci Ltd, 571-575 p. En ligne: <Go to ISI>://000222199100068.
- George, S.G. et P.E. Olsson. 1994. «Metallothioneins as indicators of trace metal pollution». Dans *Biomonitoring of coastal waters and estuaries*, sous la dir. de K.J.M. Kramer, p. 151-178. Boca Raton: CRC Press.
- Giesy, J.P. et K. Kannan. 1998. «Dioxin-Like and Non-Dioxin-Like Toxic Effects of Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Implications For Risk Assessment». *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 28, no 6, p. 511-569. En ligne: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/10408449891344263>.
- Gilliers, C., R. Amara et J.-P. Bergeron. 2004. «Comparison of growth and condition indices of juvenile flatfish in different coastal nursery grounds». *Environmental Biology of Fish*, vol. 71, no 2, p. 189-198. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1007/s10641-004-0090-2>.
- Goksoyr, A. et H.E. Larsen. 1991. «The cytochrome-P450 system of atlantic salmon (*Salmo salar*) .1. Basal properties and induction of P450-1A1 in liver of immature and mature fish.». *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 9, no 4, Dec, p. 339-349. En ligne: <http://www.springerlink.com/content/w061356r71n46g76/>.
- Guimaraes, L., C. Gravato, J. Santos, L.S. Monteiro et L. Guilhermino. 2009. «Yellow eel (*Anguilla anguilla*) development in NW Portuguese estuaries with different contamination levels». *Ecotoxicology*, vol. 18, no 4, May, p. 385-402. En ligne: <Go to ISI>://WOS:000264833100001.
- Gungordu, A. et M. Ozmen. 2011. «Assessment of seasonal and sex-related variability of biomarkers in carp (*Cyprinus carpio* L.) from Karakaya Dam Lake, Turkey». *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 31, no 3, May, p. 347-356. En ligne: <Go to ISI>://WOS:000290780000001.

- Hagger, J.A., M.B. Jones, D.R.P. Leonard, R. Owen et T.S. Galloway. 2006. «Biomarkers and integrated environmental risk assessment: Are there more questions than answers?». *Integrated Environmental Assessment and Management*, vol. 2, no 4, p. 312-329. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1002/ieam.5630020403>.
- Hagger, J.A., M.B. Jones, D. Lowe, D.R.P. Leonard, R. Owen et T.S. Galloway. 2008. «Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: A case study». *Marine Pollution Bulletin*, vol. 56, no 6, p. 1111-1118. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X08001744>.
- Hale, R.C., M. Alaee, J.B. Manchester-Neesvig, H.M. Stapleton et M.G. Ikononou. 2003. «Polybrominated diphenyl ether flame retardants in the North American environment». *Environment International*, vol. 29, no 6, p. 771-779. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V7X-48S30D6-4/2/3d6de4c11b0e569d07e3c3f8409a5483>.
- Harmens, H., D.A. Norris, G.R. Koerber, A. Buse, E. Steinnes et Å. Rühling. 2008. «Temporal trends (1990-2000) in the concentration of cadmium, lead and mercury in mosses across Europe». *Environmental Pollution*, vol. 151, no 2, p. 368-376. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VB5-4PB166V-2/2/aeb1e79780468b6c8ab80d2280670c27>.
- Harmens, H., D.A. Norris, G.R. Koerber, A. Buse, E. Steinnes et Å. Rühling. 2007. «Temporal trends in the concentration of arsenic, chromium, copper, iron, nickel, vanadium and zinc in mosses across Europe between 1990 and 2000». *Atmospheric Environment*, vol. 41, no 31, p. 6673-6687. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VH3-4NNN0J6-1/2/0ea608e833db04e649dc23e9ca0d39fe>.
- Holland, M.C.H. et J.D. Lambris. 2002. «The complement system in teleosts». *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 12, no 5, p. 399-420. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464801904085>.
- Holth, T.F., A. Thorsen, P.A. Olsvik et K. Hylland. 2010. «Long-term exposure of Atlantic cod (*Gadus morhua*) to components of produced water: condition, gonad maturation, and gene expression». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 67, no 10, p. 1685-1698. En ligne: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/F10-089>.
- Houde, E. et E. Rutherford. 1993. «Recent trends in estuarine fisheries: Predictions of fish production and yield». *Estuaries*, vol. 16, no 2, 1993/06/01, p. 161-176. En ligne: <http://dx.doi.org/10.2307/1352488>.

- Huber-Lang, M., J.V. Sarma, F.S. Zetoune, D. Rittirsch, T.A. Neff, S.R. McGuire, J.D. Lambris, R.L. Warner, M.A. Flierl, L.M. Hoesel, F. Gebhard, J.G. Younger, S.M. Drouin, R.A. Wetsel et P.A. Ward. 2006. «Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway». *Nature medicine*, vol. 12, no 6, p. 682-687. En ligne: <http://europepmc.org/abstract/MED/16715088>.
- Humphrey, C.A., S.C. King et D.W. Klumpp. 2007. «A multibiomarker approach in barramundi (*Lates calcarifer*) to measure exposure to contaminants in estuaries of tropical North Queensland». *Marine Pollution Bulletin*, vol. 54, no 10, Oct, p. 1569-1581. En ligne: <Go to ISI>://WOS:000250599700014.
- Hunter. 1998. «Cyanobacterial toxins and human health». *Journal of applied microbiology*, vol. 84, no S1, p. 35S-40S. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.0840s135S.x>.
- Jacobson, J. et S. Jacobson. 1996. «Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero». *The New England journal of medicine*, vol. 335, no 11, p. 783.
- Jaouen-Madoulet, A., A. Abarnou, A.M. Le Guellec, V. Loizeau et F. Leboulenger. 2000. «Validation of an analytical procedure for polychlorinated biphenyls, coplanar polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples». *Journal of Chromatography A*, vol. 886, no 1-2, p. 153-173. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967300004222>.
- Jee, J.-H., S.-G. Kim et J.-C. Kang. 2004. «Effects of phenanthrene on growth and basic physiological functions of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*». *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, vol. 304, no 1, p. 123-136. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T8F-4BJX7G9-1/2/4ff5f9d36d6b7f94b660268b02a01678>.
- Jha, A.N. 2008. «Ecotoxicological applications and significance of the comet assay». *Mutagenesis*, vol. 23, no 3, May 1, 2008, p. 207-221. En ligne: <http://mutage.oxfordjournals.org/content/23/3/207.abstract>.
- Johnson, L.L., M.R. Arkoosh, T.K. Collier, M.M. Krahn, J.P. Meador, M.S. Myers, W.L. Reichert et J.E. Stein. 2001. «The effects of Polycyclic aromatic hydrocarbons in fish from Puget Sound Washington». Dans *The Toxicology of Fish*, sous la dir. de D.H.E. R. T. Di Giulio. New York, London: Taylor & Francis.
- Johnson, L.L., J.T. Landahl, L.A. Kubin, B.H. Horness, M.S. Myers, T.K. Collier et J.E. Stein. 1998. «Assessing the effects of anthropogenic stressors on Puget Sound flatfish populations». *Journal of Sea Research*, vol. 39, no 1-2, p. 125-137. En ligne:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VHH-3SX87F9-B/2/508599a3309ad9ad1f97990666a50ec6>.

- Johnson, L.L., C.M. Stehr, O.P. Olson, M.S. Myers, S.M. Pierce, C.A. Wigren, B.B. McCain et U. Varanasi. 1993. «Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the northeast coast of the United States». *Environmental Science & Technology*, vol. 27, no 13, Dec, p. 2759-2771. En ligne: <Go to ISI>://A1993MJ95600021.
- Jos, Á., S. Pichardo, A.I. Prieto, G. Repetto, C.M. Vázquez, I. Moreno et A.M. Cameán. 2005. «Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*) under laboratory conditions». *Aquatic Toxicology*, vol. 72, no 3, p. 261-271. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X05000159>.
- Kammann, U., T. Lang, A.J. Berkau et M. Klempt. 2008. «Biological effect monitoring in dab (*Limanda limanda*) using gene transcript of CYP1A1 or EROD-a comparison». *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 15, no 7, Nov, p. 600-605. En ligne: <Go to ISI>://000260524700009.
- Kemenade, B., A. Groeneveld, B. Rens et J. Rombout. 1994. «Characterization of macrophages and neutrophilic granulocytes from the pronephros of carp (*Cyprinus carpio*)». *Journal of Experimental Biology*, vol. 187, no 1, p. 143.
- Kerambrun, E., F. Henry, A. Marechal, W. Sanchez, C. Minier, I. Filipuci et R. Amara. 2012. «A multibiomarker approach in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, exposed to contaminated sediments». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 80, Jun, p. 45-53. En ligne: <Go to ISI>://WOS:000304337300007.
- Kerr, J.L., Z. Guo, D.W. Smith, G.G. Goss et M. Belosevic. 2008. «Use of goldfish to monitor wastewater and reuse water for xenobiotics». *Journal of Environmental Engineering and Science*, vol. 7, no 4, p. 369-383. En ligne: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/S08-011>.
- Kester, M.H.A., S. Bulduk, H. van Toor, D. Tibboel, W. Meinl, H. Glatt, C.N. Falany, M.W.H. Coughtrie, A.G. Schuur, A. Brouwer et T.J. Visser. 2002. «Potent Inhibition of Estrogen Sulfotransferase by Hydroxylated Metabolites of Polyhalogenated Aromatic Hydrocarbons Reveals Alternative Mechanism for Estrogenic Activity of Endocrine Disrupters». *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 87, no 3, March 1, 2002, p. 1142-1150. En ligne: <http://jcem.endojournals.org/content/87/3/1142.abstract>.

- Khan, R.A. 2003. «Health of flatfish from localities in Placentia Bay, Newfoundland, contaminated with petroleum and PCBs». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 44, no 4, May, p. 485-492. En ligne: <Go to ISI>://000182102400009.
- Khan, R.A. et J.F. Payne. 2002. «Some factors influencing EROD activity in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) exposed to effluent from a pulp and paper mill». *Chemosphere*, vol. 46, no 2, p. 235-239. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653501001254>.
- Kirby, M.F., P. Matthiessen, P. Neall, T. Tylor, C.R. Allchin, C.A. Kelly, D.L. Maxwell et J.E. Thain. 1999. «Hepatic EROD activity in flounder (*Platichthys flesus*) as an indicator of contaminant exposure in English estuaries». *Marine Pollution Bulletin*, vol. 38, no 8, Aug, p. 676-686. En ligne: <Go to ISI>://000082686400017.
- Kirby, M.F., P. Neall, T.A. Bateman et J.E. Thain. 2004. «Hepatic ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity in flounder (*Platichthys flesus*) from contaminant impacted estuaries of the United Kingdom: continued monitoring 1999-2001». *Marine Pollution Bulletin*, vol. 49, no 1-2, Jul, p. 71-78. En ligne: <Go to ISI>://000222939800019.
- Kirby, M.F., A.J. Smith, J. Rooke, P. Neall, A.P. Scott et I. Katsiadaki. 2007. «Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and vitellogenin (VTG) in flounder (*Platichthys flesus*): System interaction, crosstalk and implications for monitoring». *Aquatic Toxicology*, vol. 81, no 3, Mar, p. 233-244. En ligne: <Go to ISI>://000245069500001.
- Klaassen, C.D., J. Liu et S. Choudhuri. 1999. «METALLOTHIONEIN: An Intracellular Protein to Protect Against Cadmium Toxicity». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 39, no 1, p. 267-294. En ligne: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.267>.
- Kleinjans, J.C.S. et F.J. van Schooten. 2002. «Ecogenotoxicology: the evolving field». *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 11, no 3-4, Jul, p. 173-179. En ligne: <Go to ISI>://000177071500005.
- Kopecka, J. et J. Pempkowiak. 2008. «Temporal and spatial variations of selected biomarker activities in flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Baltic proper». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 70, no 3, Jul, p. 379-391. En ligne: <Go to ISI>://000257046800004.
- Lacroix, A., M. Fournier, M. Lebeuf, J.J. Nagler et D.G. Cyr. 2001. «Phagocytic response of macrophages from the pronephros of American plaice (*Hipoglossoides platessoides*)

- exposed to contaminated sediments from Baie des Anglais, Quebec». *Chemosphere*, vol. 45, no 4-5, Nov, p. 599-607. En ligne: <Go to ISI>://000171451900022.
- Lair, S., Y. Mailhot, R. Higgins, D. Belanger, L. Berthiaume, Y. deLafontaine et D. Martineau. 1997. «Jaw ulcers in Atlantic tomcod, *Microgadus tomcod* (Walbaum), from the St Lawrence River». *Journal of Fish Diseases*, vol. 20, no 1, Jan, p. 11-17. En ligne: <Go to ISI>://A1997WB58100002.
- Lambert, Y. et J.-D. Dutil. 1997. «Can simple condition indices be used to monitor and quantify seasonal changes in the energy reserves of cod (*Gadus morhua*)?». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 54, no S1, p. 104-112. En ligne: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/f96-149>.
- Lambert, Y., J.-D. Dutil et J. Munro. 1994. «Effects of Intermediate and Low Salinity Conditions on Growth Rate and Food Conversion of Atlantic Cod (*Gadus morhua*)». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 51, no 7, p. 1569-1576. En ligne: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/f94-155>.
- Lamberth, S.J. et J.K. Turpie. 2003. «The Role of Estuaries in South African Fisheries: Economic Importance and Management Implications». *African Journal of Marine Science*, vol. 25, no 1, 2003/06/01, p. 131-157. En ligne: <http://dx.doi.org/10.2989/18142320309504005>. Consultation le 2012/11/04.
- Langston, W., B. Chesman, G. Burt, S. Hawkins, J. Readman et P. Worsfold. 2003. «Characterisation of the South West European Marine Sites : Plymouth Sound and Estuaries cSAC, SPA. Occasional Publications.». *Mar. Biol. Assoc. Occ. Pub*, vol. 9, p. 202p.
- Lapointe, D. et P. Couture. 2010. «Accumulation and effects of nickel and thallium in early-life stages of fathead minnows (*Pimephales promelas*)». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 73, no 4, p. 572-578. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651310000059>.
- Laroche, J., O. Gauthier, L. Quiniou, A. Devaux, S. Bony, E. Evrard, J. Cachot, Y. Chérel, T. Larcher, R. Riso, V. Pichereau, M. Devier et H. Budzinski. 2012. «Variation patterns in individual fish responses to chemical stress among estuaries, seasons and genders: the case of the European flounder (*Platichthys flesus*) in the Bay of Biscay». *Environmental Science and Pollution Research*.
- Law, R.J., V.J. Dawes, R.J. Woodhead et P. Matthiessen. 1997. «Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in seawater around England and Wales». *Marine Pollution Bulletin*, vol. 34, no 5, May, p. 306-322. En ligne: <Go to ISI>://A1997XD94800014.

- Lazzari, M.A. et B.Z. Stone. 2006. «Use of submerged aquatic vegetation as habitat by young-of-the-year epibenthic fish in shallow Maine nearshore waters». *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, vol. 69, no 3-4, p. 591-606. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WDV-4KCXJMW-1/2/9423cf1c993e2c81ddade321add0d523>.
- Leaver, M.J., A. Diab, E. Boukouvala, T.D. Williams, J.K. Chipman, C.F. Moffat, C.D. Robinson et S.G. George. 2010. «Hepatic gene expression in flounder chronically exposed to multiply polluted estuarine sediment: Absence of classical exposure 'biomarker' signals and induction of inflammatory, innate immune and apoptotic pathways». *Aquatic Toxicology*, vol. 96, no 3, p. 234-245. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T4G-4XNF3WD-2/2/0da893bb84594a4f78726e9146e6f2a3>.
- LeBlanc, G. et L. Bain. 1997. «Chronic toxicity of environmental contaminants: sentinels and biomarkers». *Environmental Health Perspectives*, vol. 105, no Suppl 1, p. 65.
- Lee, R.F. et S. Steinert. 2003. «Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals». *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, vol. 544, no 1, Sep, p. 43-64. En ligne: <Go to ISI>://000185156600003.
- Lemos, M.F.L., A.M.V.M. Soares, A.C. Correia et A.C. Esteves. 2010. «Proteins in ecotoxicology – How, why and why not?». *PROTEOMICS*, vol. 10, no 4, p. 873-887. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1002/pmuc.200900470>.
- Lewis, N.A., T.D. Williams et J.K. Chipman. 2006. «Functional analysis of a metal response element in the regulatory region of flounder cytochrome P450 1A and implications for environmental monitoring of pollutants». *Toxicological Sciences*, vol. 92, no 2, Aug, p. 387-393. En ligne: <Go to ISI>://000238907300006.
- Lie, O., O. Evensen, A. Sorensen et E. Froysadal. 1989. «Study on lysozyme activity in some fish species». *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 6, no 1, p. 1-5.
- Linde-Arias, A.R., A.F. Inacio, L.A. Novo, C. de Albuquerque et J.C. Moreira. 2008. «Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraíba do Sul». *Environmental Pollution*, vol. 156, no 3, Dec, p. 974-979. En ligne: <Go to ISI>://WOS:000261678700051.
- Loizeau, V. et A. Abarnou. 1995. «Niveaux de contamination par les PCB dans le réseau trophique du bar et du flet». *Rapport scientifique Seine Aval, Thème Edifices Biologiques*, 85–120.

- Low, K.W. et Y.M. Sin. 1998. «Effects of mercuric chloride and sodium selenite on some immune responses of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus)». *Science of the Total Environment*, vol. 214, no 1-3, p. 153-164. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969798000618>.
- Lower, W. et R. Kendall. 1990. «Sentinel species and sentinel bioassay». Dans *Biomarkers of Environmental Contamination*, p. 309-331: Lewis Publishers, Chelsea, Michigan.
- Lu, X.-J., J. Chen, Z.-A. Huang, L. Zhuang, L.-Z. Peng et Y.-H. Shi. 2012. «Influence of acute cadmium exposure on the liver proteome of a teleost fish, ayu (*Plecoglossus altivelis*)». *Molecular Biology Reports*, vol. 39, no 3, p. 2851-2859. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-011-1044-3>.
- Maes, J., C. Belpaire et G. Goemans. 2008. «Spatial variations and temporal trends between 1994 and 2005 in polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and heavy metals in European eel (*Anguilla anguilla* L.) in Flanders, Belgium». *Environmental Pollution*, vol. 153, no 1, p. 223-237. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VB5-4PMJB3S-3/2/a7c7a05c74a49ff8ea79aeafd4519dbd>.
- Marchand, J., E. Evrard, B. Guinand, J. Cachot, L. Quiniou et J. Laroche. 2010. «Genetic polymorphism and its potential relation to environmental stress in five populations of the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast». *Marine Environmental Research*.
- Marchand, J., L. Quiniou, R. Riso, M.-T. Thebaut et J. Laroche. 2004. «Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast». *Aquatic Toxicology*, vol. 70, no 4, p. 327-343. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X04002620>.
- Marchand, J., A. Tanguy, G. Charrier, L. Quiniou, E. Plee-Gauthier et J. Laroche. 2006. «Molecular identification and expression of differentially regulated genes of the european flounder, *Platichthys flesus*, submitted to pesticide exposure». *Marine Biotechnology*, vol. 8, no 3, Jun, p. 275-294. En ligne: <Go to ISI>://000238157700007.
- Marijić, V.F. et B. Raspor. 2006. «Age- and tissue-dependent metallothionein and cytosolic metal distribution in a native Mediterranean fish, *Mullus barbatus*, from the Eastern Adriatic Sea». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 143, no 4, p. 382-387. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S153204560600113X>.

- Martinho, F., R. Leitão, J. Neto, H. Cabral, J. Marques et M. Pardal. 2007. «The use of nursery areas by juvenile fish in a temperate estuary, Portugal». *Hydrobiologia*, vol. 587, no 1, p. 281-290. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-007-0689-3>.
- Masson, G. 1987. «Biologie et ecologie d'un poisson plat amphihalin, le flet(*Platichthys flesus* Linne, 1758) dans l'environnement ligérien: distribution, démographie, place au sein des réseaux trophiques». Sciences: Brest: 1987.
- Michaud, M.H. et É. Pelletier. 2006. «Sources and fate of butyltins in the St. Lawrence Estuary ecosystem». *Chemosphere*, vol. 64, no 7, p. 1074-1082. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653505014189>.
- Miller, K.A., R.F. Addison et S.M. Bandiera. 2004. «Hepatic CYP1A levels and EROD activity in English sole: biomonitoring of marine contaminants in Vancouver Harbour». *Marine Environmental Research*, vol. 57, no 1-2, p. 37-54. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014111360300059X>. Consultation le 2004/3//.
- Minier, C., F. Levy, D. Rabel, G. Bocquené, D. Godefroy, T. Burgeot et F. Le Boulenger. 2000. «Flounder health status in the Seine Bay. A multibiomarker study». *Marine Environmental Research*, vol. 50, no 1-5, p. 373-377. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V7H-41MJ1C2-4K/2/60712b099071816cd7707ef8ed1e4351>.
- Moore, M.N. 2006. «Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment?». *Environment International*, vol. 32, no 8, p. 967-976. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412006000857>.
- Munsch, C., K. Moisan, I. Truquet et J. Tronczynski. 1996. *Caractérisation chimique de la contamination organique dans l'estuaire de la Seine*. Coll. «Rapport Seine-Aval 1996/FIN-3 »: Agence de l'Eau Seine-Normandie, France, 41-60 p.
- Murray, C.K. et T.C. Fletcher. 1976. «The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues». *Journal of Fish Biology*, vol. 9, no 4, p. 329-334. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.1976.tb04681.x>.
- Nellis, P., D. Dorion, S. Pereira, H.-F. Ellefsen et M. Lemay. 2012. *Suivi de la végétation et des poissons dans six zosteraies au Québec (2005-2010)*. no 2985, x+96 p.
- Nikinmaa, M. et K.T. Rytönen. 2011. «Functional genomics in aquatic toxicology - Do not forget the function». *Aquatic Toxicology*, vol. 105, p. 16-24.

- Nowacek, D., L. Thorne, D. Johnston et P. Tyack. 2007. «Responses of cetaceans to anthropogenic noise». *Mammal Review*, vol. 37, no 2, p. 81-115.
- Nunez, R. 2001. «DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry». *Current issues in molecular biology*, vol. 3, p. 67-70.
- O'Brien, D., J. Kaneene et R. Poppenga. 1993. «The use of mammals as sentinels for human exposure to toxic contaminants in the environment». *Environmental Health Perspectives*, vol. 99, p. 351.
- Olivares, A., L. Quiros, S. Pelayo, A. Navarro, C. Bosch, J.O. Grimalt, M.D. Fabregat, M. Faria, L. Benejam, J. Benito, M. Sole, C. Barata et B. Pina. 2010. «Integrated biological and chemical analysis of organochlorine compound pollution and of its biological effects in a riverine system downstream the discharge point». *Science of the Total Environment*, vol. 408, no 22, Oct, p. 5592-5599. En ligne: <Go to ISI>://WOS:000283611800042.
- Pacheco, M. et M.A. Santos. 2002. «Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.)». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 53, no 3, Nov, p. 331-347. En ligne: <Go to ISI>://WOS:000179987000001.
- Pajares, M. et D. Pérez-Sala. 2006. «Betaine homocysteine S-methyltransferase: just a regulator of homocysteine metabolism?». *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 63, no 23, p. 2792-2803. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-006-6249-6>.
- Park, C.-I., T. Kurobe, I. Hirono et T. Aoki. 2003. «Cloning and characterization of cDNAs for two distinct tumor necrosis factor receptor superfamily genes from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*». *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 27, no 5, p. 365-375. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X02001180>.
- Parry, R.M., R.C. Chandan et K.M. Shahani. 1965. «A Rapid and Sensitive Assay of Muramidase». *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, vol. 119, no 2, June 1, 1965, p. 384-386. En ligne: <http://ebm.rsmjournals.com/content/119/2/384.abstract>.
- Payette, Y., M. Lachapelle, C. Daniel, J. Bernier, M. Fournier et K. Krzystyniak. 1995. «Decreased interleukin-2 receptor and cell cycle changes in murine lymphocytes exposed in vitro to low doses of cadmium chloride». *International Journal of Immunopharmacology*, vol. 17, no 3, p. 235-246. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0192056195000011>.

- Pelletier, D., J.D. Dutil, P. Blier et H. Guderley. 1994. «Relation between growth rate and metabolic organization of white muscle, liver and digestive tract in cod, *Gadus morhua*». *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, vol. 164, no 3, p. 179-190. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00354078>.
- Pelletier, D., H. Guderley et J.-D. Dutil. 1993. «Does the aerobic capacity of fish muscle change with growth rates?». *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 12, no 2, p. 83-93. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00004373>.
- Pfaffl, M.W. 2001. «A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR». *Nucleic Acids Research*, vol. 29, no 9, May 1, 2001, p. e45. En ligne: <http://nar.oxfordjournals.org/content/29/9/e45.abstract>.
- Pihl, L., A. Cattrijsse, I. Codling, S. Mathieson, D. McLusky et C. Roberts. 2002. «Habitat use by fish in estuaries and other brackish areas». *Fish in Estuaries*, p. 10-53.
- Plante, S., C. Audet, Y. Lambert et J. de la Noüe. 2005. «Alternative Methods for Measuring Energy Content in Winter Flounder». *North American Journal of Fisheries Management*, vol. 25, no 1, p. 1-6. En ligne: <http://afsjournals.org/doi/abs/10.1577/M03-104.1>.
- Polak-Juszczak, L. 2009. «Temporal trends in the bioaccumulation of trace metals in herring, sprat, and cod from the southern Baltic Sea in the 1994-2003 period». *Chemosphere*, vol. 76, no 10, p. 1334-1339. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V74-4WP4BDW-5/2/7c66c5b935fc92b52c3a893d5ba7eb9b>.
- Qi, Z.-H., Y.-F. Liu, W.-N. Wang, X. Wu, Y. Xin, Y.-F. Lu et A.-L. Wang. 2011. «Molecular characterization and functional analysis of a complement C3 molecule in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)». *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 31, no 6, p. 1284-1290. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464811003585>.
- Ramos, S., P. Ré et A.A. Bordalo. 2009. «Environmental control on early life stages of flatfish in the Lima Estuary (NW Portugal)». *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, vol. 83, no 2, p. 252-264. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272771409001620>.
- Rehana, S. et R.M. Kini. 2008. «Complement C3 isoforms in *Austrelaps superbus*». *Toxicon*, vol. 51, no 5, p. 864-881. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010107004631>.

- Reynaud, S. et P. Deschaux. 2006. «The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review». *Aquatic Toxicology*, vol. 77, no 2, May, p. 229-238. En ligne: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T4G-4HWXKTJ-1&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=978bccf775f0319885c0df8b0802b056
- Reynaud, S., D. Marrionet, L. Taysse et P. Deschaux. 2005. «Interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor alpha modulate cytochrome P450 activities in carp (*Cyprinus carpio*)». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 62, no 3, Nov, p. 355-362. En ligne: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WDM-4FD79JN-1&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=ac213d74c9522d2498e0356b979f6d18
- Reynaud, S., M. Raveton et P. Ravanel. 2008. «Interactions between immune and biotransformation systems in fish: A review». *Aquatic Toxicology*, vol. 87, no 3, p. 139-145. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X08000313>.
- Reynolds, W.J., S.W. Feist, G.J. Jones, B.P. Lyons, D.A. Sheahan et G.D. Stentiford. 2003. «Comparison of biomarker and pathological responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) induced by ingested polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination». *Chemosphere*, vol. 52, no 7, Aug, p. 1135-1145. En ligne: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6V74-48KVBD2-1&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=bf637a576114e4f535792967172c6401
- Roca, F.J., I. Mulero, A. López-Muñoz, M.P. Sepulcre, S.A. Renshaw, J. Meseguer et V. Mulero. 2008. «Evolution of the Inflammatory Response in Vertebrates: Fish TNF- α Is a Powerful Activator of Endothelial Cells but Hardly Activates Phagocytes». *The Journal of Immunology*, vol. 181, no 7, October 1, 2008, p. 5071-5081. En ligne: <http://jimmunol.org/content/181/7/5071.abstract>.
- Romano, N., M.R. Baldassini, F. Buonocore, S. Picchietti, L. Mastrolia et L. Abelli. 2005. «In vivo allograft rejection in a bony fish *Dicentrarchus labrax* (L.): characterisation of effector lymphocytes». *Cell and Tissue Research*, vol. 321, no 3, p. 353-363. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-005-1137-1>.
- Ross, G. 2004. «The public health implications of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 59, no 3, Nov, p. 275-291. En ligne: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WDM-4D09FBM-

[1&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=16fa91b257796801678ca36a71c662c9](#) ou <Go to ISI>://000224318700001.

- Rotchell, J.M., K.R. Clarke, L.C. Newton et D.J. Bird. 2001. «Hepatic metallothionein as a biomarker for metal contamination: age effects and seasonal variation in European flounders (*Pleuronectes flesus*) from the Severn Estuary and Bristol Channel». *Marine Environmental Research*, vol. 52, no 2, p. 151-171. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141113600002701>.
- Roy, L.A., S. Steinert, S.M. Bay, D. Greenstein, Y. Sapozhnikova, O. Bawardi, I. Leifer et D. Schlenk. 2003. «Biochemical effects of petroleum exposure in hornyhead turbot (*Pleuronichthys verticalis*) exposed to a gradient of sediments collected from a natural petroleum seep in CA, USA». *Aquatic Toxicology*, vol. 65, no 2, p. 159-169. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X03001358>.
- Rozen, S. et H. Skaletsky. 1999. «Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers», *Bioinformatics Methods and Protocols*. sous la dir. de S. Misener et S.A. Krawetz, p. 365-386. Coll. «Methods in Molecular Biology», no 132: Humana Press. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-192-2:365>.
- Saint-Louis, R., C. Gobeil et E. Pelletier. 1997. «Le Tributyletain et Ses Produits de Dégradation Dans L'Estuaire du Saint-Laurent (Canada) Tributyltin and Its Degradation Products in the St Lawrence Estuary (Canada)». *Environmental Technology*, vol. 18, no 12, 1997/12/01, p. 1209-1218. En ligne: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09593330.1997.9618601>.
- Salas, V.M. et S.W. Burchiel. 1998. «Apoptosis in Daudi Human B Cells in Response to Benzo[a]pyrene and Benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol». *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 151, no 2, p. 367-376. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WXH-45M32VJ-2T/2/8df9d5e46062f7bdc890975ec6059cd7>.
- Salo, H.M., N. Hébert, C. Dautremepuits, P. Cejka, D.G. Cyr et M. Fournier. 2007. «Effects of Montreal municipal sewage effluents on immune responses of juvenile female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)». *Aquatic Toxicology*, vol. 84, no 4, p. 406-414. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X07002639>.
- Salomon, S., P. Giamarchi et A. Le Bihan. 2000. «Desirability approach for optimisation of electrothermal atomic absorption spectrometry factors in iron determinations». *Analisis*, vol. 28, no 7, p. 575-586. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1051/analisis:2000133>.

- Sanchez-Dardon, J., I. Voccia, A. Hontela, S. Chilmonczyk, M. Dunier, H. Boermans, B. Blakley et M. Fournier. 1999. «Immunomodulation by heavy metals tested individually or in mixtures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vivo». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 18, no 7, Jul, p. 1492-1497. En ligne: <Go to ISI>://000081021400022.
- Sanchez, B.C., K. Ralston-Hooper et M.S. Sepúlveda. 2011. «Review of recent proteomic applications in aquatic toxicology». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 30, no 2, p. 274-282. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1002/etc.402>.
- Sarasquete, C. et H. Segner. 2000. «Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fish. A review of immunohistochemical studies». *The Science of The Total Environment*, vol. 247, no 2-3, p. 313-332. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V78-3YVM1DK-S/2/afe7a5a137912c404de552f957d9fca4>.
- Saucier, F.J., F. Roy, D. Gilbert, P. Pellerin et H. Ritchie. 2003. «Modeling the formation and circulation processes of water masses and sea ice in the Gulf of St. Lawrence, Canada». *J. Geophys. Res.*, vol. 108, no C8, p. 3269. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1029/2000JC000686>.
- Saurabh, S. et P. Sahoo. 2008. «Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system». *Aquaculture Research*, vol. 39, no 3, p. 223-239.
- Sauvé, S., P. Brousseau, J. Pellerin, Y. Morin, L. Senécal, P. Goudreau et M. Fournier. 2002. «Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn)». *Aquatic Toxicology*, vol. 58, no 3-4, p. 189-200. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T4G-45S3JM5-6/2/06348274654c82d932bc881022dda7e4>.
- Schantz, M., R. Parris, J. Kurz, K. Ballschmiter et S. Wise. 1993. «Comparison of methods for the gas-chromatographic determination of PCB congeners and chlorinated pesticides in marine reference materials». *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, vol. 346, no 6-9, 1993/06/01, p. 766-778. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00321288>.
- Schantz, S., D. Gasior, E. Polverejan, R. McCaffrey, A. Sweeney, H. Humphrey et J. Gardiner. 2001. «Impairments of memory and learning in older adults exposed to polychlorinated biphenyls via consumption of Great Lakes fish». *Environmental Health Perspectives*, vol. 109, no 6, p. 605.
- Schleizinger, J.J., W.D.J. Struntz, J.V. Goldstone et J.J. Stegeman. 2006. «Uncoupling of cytochrome P450 1A and stimulation of reactive oxygen species production by co-

- planar polychlorinated biphenyl congeners». *Aquatic Toxicology*, vol. 77, no 4, p. 422-432. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X06000427>.
- Scott, W.B. et M.G. Scott. 1988. *Atlantic fish of Canada*. no 219: University of Toronto Press Toronto, 731 p p.
- Secombes, C. 1996. «The nonspecific immune system: cellular defenses». Dans *The fish immune system : organism, pathogen and environment*, sous la dir. de G. Iwama et T. Nakanishi, p. 63-103: Academic Press.
- Secombes, C.J., T. Wang, S. Hong, S. Peddie, M. Crampe, K.J. Laing, C. Cunningham et J. Zou. 2001. «Cytokines and innate immunity of fish». *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 25, no 8-9, p. 713-723. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T5X-43VYK8W-5/2/098cde29666a1f9eb1226e3a820dd55d>.
- Sheir, S.K. et R.D. Handy. 2010. «Tissue Injury and Cellular Immune Responses to Cadmium Chloride Exposure in the Common Mussel *Mytilus edulis*: Modulation by Lipopolysaccharide». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 59, no 4, Nov, p. 602-613. En ligne: <Go to ISI>://WOS:000283098800009.
- Shelley, L.K., S.K. Balfry, P.S. Ross et C.J. Kennedy. 2009. «Immunotoxicological effects of a sub-chronic exposure to selected current-use pesticides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)». *Aquatic Toxicology*, vol. 92, no 2, p. 95-103. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T4G-4VGF3P1-2/2/d7af204ea5b92627a8eeb708c2ba92de>.
- Singh, N.P., M.T. McCoy, R.R. Tice et E.L. Schneider. 1988. «A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells». *Experimental Cell Research*, vol. 175, no 1, p. 184-191. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014482788902650>.
- Skerritt, D. 2010. *A review of the European flounder *Platichthys flesus*-Biology, Life History and Trends in Population*. Coll. «International Marine & Environmental Consultancy MSc»: Newcastle University.
- Skouras, A., K. Broeg, H. Dizer, H. von Westernhagen, P.D. Hansen et D. Steinhagen. 2003. «The use of innate immune responses as biomarkers in a programme of integrated biological effects monitoring on flounder (*Platichthys flesus*) from the southern North Sea». *Helgolander Marine Research*, vol. 57, no 3-4, Oct, p. 190-198. En ligne: <Go to ISI>://000186604600007.

- Smith, C.A., T. Farrah et R.G. Goodwin. 1994. «The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: Activation, costimulation, and death». *Cell*, vol. 76, no 6, p. 959-962. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867494903727>.
- Smith, C.E., T.H. Peck, J. Klauda et J.B. McLaren. 1979. «Hepatomas in Atlantic tomcod *Microgadus tomcod* (Walbaum) collected in the Hudson River estuary in New York». *Journal of Fish Diseases*, vol. 2, no 4, p. 313-319. En ligne: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=aph&AN=15420377&lang=fr&site=ehost-live>.
- Smith, L. et H. Conrad. 1956. «A study of the kinetics of the oxidation of cytochrome c by cytochrome c oxidase». *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 63, no 2, p. 403-413. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003986156900558>.
- Sorrentino, C., N.K. Roy, S.C. Courtenay et I. Wirgin. 2005. «Co-exposure to metals modulates CYP1A mRNA inducibility in Atlantic tomcod *Microgadus tomcod* from two populations». *Aquatic Toxicology*, vol. 75, no 3, p. 238-252. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T4G-4H5MYC9-1/2/9df879ceff8975c94e390a41058435c1>.
- Stabili, L. et P. Pagliara. 2009. «Effect of zinc on lysozyme-like activity of the seastar *Marthasterias glacialis* (Echinodermata, Asteroidea) mucus». *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 100, no 3, p. 189-192. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201109000184>.
- Stevens, M., J. Maes et F. Ollevier. 2006. «A spatially-explicit bioenergetics model of habitat quality for flounder *Platichthys flesus* in the Scheldt estuary». Dans *Intertidal and basin-wide habitat use of fish in the Scheldt estuary*, p. 93
- Straub, P.F., M.L. Higham, A. Tanguy, B.J. Landau, W.C. Phoel, L.S. Hales et T.K.M. Thwing. 2004. «Suppression subtractive hybridization cDNA libraries to identify differentially expressed genes from contrasting fish habitats». *Marine Biotechnology*, vol. 6, no 4, Jul-Aug, p. 386-399. En ligne: <Go to ISI>://000224471700010.
- Sunyer, J.O., L. Tort et J.D. Lambris. 1997. «Structural C3 diversity in fish: characterization of five forms of C3 in the diploid fish *Sparus aurata*». *The Journal of Immunology*, vol. 158, no 6, March 15, 1997, p. 2813-2821. En ligne: <http://jimmunol.org/content/158/6/2813.abstract>.
- Sweet, L.I. et J.T. Zelikoff. 2001. «Toxicology and immunotoxicology of mercury: A comparative review in fish and humans». *Journal of Toxicology and Environmental*

- Health-Part B-Critical Reviews*, vol. 4, no 2, Apr-Jun, p. 161-205. En ligne: <Go to ISI>://WOS:000168377500001.
- Tahir, A. et C.J. Secombes. 1995. «The effects of diesel oil-based drilling mud extracts on immune responses of rainbow trout». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 29, no 1, p. 27-32. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00213083>.
- Talbot, C. 1993. «Some aspects of the biology of feeding and growth in fish». *Proc Nutr Soc*, vol. 52, no 3, Oct, p. 403-416.
- Teles, M., S. Mackenzie, S. Boltana, A. Callol et L. Tort. 2011. «Gene expression and TNF-alpha secretion profile in rainbow trout macrophages following exposures to copper and bacterial lipopolysaccharide». *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 30, no 1, Jan, p. 340-346. En ligne: <Go to ISI>://WOS:000286905800043.
- Théron, M., F. Guerrero et P. Sebert. 2000. «Improvement in the efficiency of oxidative phosphorylation in the freshwater eel acclimated to 10.1 MPa hydrostatic pressure». *Journal of Experimental Biology*, vol. 203, no 19, October 1, 2000, p. 3019-3023. En ligne: <http://jeb.biologists.org/content/203/19/3019.abstract>.
- Tomanek, L. 2010. «Environmental Proteomics: Changes in the Proteome of Marine Organisms in Response to Environmental Stress, Pollutants, Infection, Symbiosis, and Development». *Annual Review of Marine Science*, vol. 3, no 1, 2011/01/15, p. 373-399. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142729>. Consultation le 2012/11/12.
- Travis, J. 2003. «Climate change and habitat destruction: a deadly anthropogenic cocktail». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 270, no 1514, p. 467.
- Tsiftoglou, A.S., A.I. Tsamadou et L.C. Papadopoulou. 2006. «Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: Molecular, cellular, and pharmacological aspects». *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 111, no 2, p. 327-345. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725805002780>.
- United Nations Environment Program (2011). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, C.N.703.201.TREATIES-8, depositary notification En ligne: <http://chm.pops.int/Convention/ThePOPs/TheNewPOPs/tabid/2511/Default.aspx>.
- United Nations Environment Program (2009). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, C.N.524.2009.TREATIES-4, depositary notification En ligne: <http://chm.pops.int/Convention/ThePOPs/TheNewPOPs/tabid/2511/Default.aspx>.

- van der Oost, R., J. Beyer et N.P.E. Vermeulen. 2003. «Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review». *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 13, no 2, Feb, p. 57-149. En ligne: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T6D-47BXBTF-2&_user=10&_coverDate=02%2F28%2F2003&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=53304b1cbaa9211b685074eb6fb55b55.
- Vethaak, A.D., J.G. Jol et C. Martínez-Gómez. 2011. «Effects of cumulative stress on fish health near freshwater outlet sluices into the sea: A case study (1988–2005) with evidence for a contributing role of chemical contaminants». *Integrated Environmental Assessment and Management*, vol. 7, no 3, p. 445-458. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1002/ieam.163>.
- Viarengo, A., E. Bettella, R. Fabbri, B. Burlando et M. Lafaurie. 1997. «Heavy metal inhibition of EROD activity in liver microsomes from the bass *Dicentrarchus labrax* exposed to organic xenobiotics: Role of GSH in the reduction of heavy metal effects». *Marine Environmental Research*, vol. 44, no 1, p. 1-11. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141113696000979>.
- Villeneuve, G. 1959. «Bref aperçu climatique du Québec méridional». *Cahiers de géographie du Québec*, vol. 3, no 6.
- Wang, P.-H., D.-H. Wan, L.-R. Pang, Z.-H. Gu, W. Qiu, S.-P. Weng, X.-Q. Yu et J.-G. He. 2012. «Molecular cloning, characterization and expression analysis of the tumor necrosis factor (TNF) superfamily gene, TNF receptor superfamily gene and lipopolysaccharide-induced TNF- α factor (LITAF) gene from *Litopenaeus vannamei*». *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 36, no 1, p. 39-50. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X11001686>.
- Watts, M., B.L. Munday et C.M. Burke. 2001. «Immune responses of teleost fish». *Australian Veterinary Journal*, vol. 79, no 8, p. 570-574. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-0813.2001.tb10753.x>.
- Weeks, B.A., J.E. Warinner, P.L. Mason et D.S. McGinnis. 1986. «Influence of toxic chemicals on the chemotactic response of fish macrophages». *Journal of Fish Biology*, vol. 28, no 6, p. 653-658. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.1986.tb05200.x>.
- Wenger, M., U. Sattler, E. Goldschmidt-Clermont et H. Segner. 2011. «17Beta-estradiol affects the response of complement components and survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) challenged by bacterial infection». *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 31, no 1, p. 90-97. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464811001355>.

- Wersto, R.P., F.J. Chrest, J.F. Leary, C. Morris, M. Stetler-Stevenson et E. Gabrielson. 2001. «Doublet discrimination in DNA cell-cycle analysis». *Cytometry*, vol. 46, no 5, p. 296-306. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.1171>.
- Wessel, N., R. Santos, D. Menard, K. Le Menach, V. Buchet, N. Lebayon, V. Loizeau, T. Burgeot, H. Budzinski et F. Akcha. 2010. «Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*)». *Marine Environmental Research*, vol. 69, Supplement 1, no 0, p. S71-S73. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141113610000449>.
- Whyte, J.J. et R. Jung. 2000. «Erod Activity». *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 30, no 4, p. 347-570.
- Wiens, G.D. et G.W. Glenney. 2011. «Origin and evolution of TNF and TNF receptor superfamilies». *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 35, no 12, p. 1324-1335. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X11001066>.
- Williams, P.J., S.C. Courtenay et C.E. Wilson. 1998. «Annual sex steroid profiles and effects of gender and season on cytochrome P450 mRNA induction in atlantic tomcod (*Microgadus tomcod*)». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 17, no 8, p. 1582-1588. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620170820>.
- Williams, T.D., A. Diab, F. Ortega, V.S. Sabine, R.E. Godfrey, F. Falciani, J.K. Chipman et S.G. George. 2008. «Transcriptomic responses of European flounder (*Platichthys flesus*) to model toxicants». *Aquatic Toxicology*, vol. 90, no 2, Nov, p. 83-91. En ligne: <Go to ISI>://000261309900001.
- Williams, T.D., K. Gensberg, S.D. Minchin et J.K. Chipman. 2003. «A DNA expression array to detect toxic stress response in European flounder (*Platichthys flesus*)». *Aquatic Toxicology*, vol. 65, no 2, p. 141-157. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X0300119X>.
- Williams, T.D., N. Turan, A.M. Diab, H. Wu, C. Mackenzie, K.L. Bartie, O. Hrydziusko, B.P. Lyons, G.D. Stentiford, J.M. Herbert, J.K. Abraham, I. Katsiadaki, M.J. Leaver, J.B. Taggart, S.G. George, M.R. Viant, K.J. Chipman et F. Falciani. 2011. «Towards a System Level Understanding of Non-Model Organisms Sampled from the Environment: A Network Biology Approach». *PLoS Comput Biol*, vol. 7, no 8, p. e1002126. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002126>.

- Wirgin, I., N.K. Roy, M. Loftus, R.C. Chambers, D.G. Franks et M.E. Hahn. 2011. «Mechanistic Basis of Resistance to PCBs in Atlantic Tomcod from the Hudson River». *Science*, vol. 331, no 6022, March 11, 2011, p. 1322-1325. En ligne: <http://www.sciencemag.org/content/331/6022/1322.abstract>.
- Wirgin, I. et J.R. Waldman. 1998. «Altered gene expression and genetic damage in North American fish populations». *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 399, no 2, Mar, p. 193-219. En ligne: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T2C-3SY9PXB-6&_user=10&_coverDate=03%2F20%2F1998&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=f06e0d9118a085f8a2ed11d6cf2af47 ou <Go to ISI>://000074337700007.
- Wirgin, I.I., C. Grunwald, S. Courtenay, G.L. Kreamer, W.L. Reichert et J.E. Stein. 1994. «A biomarker approach to assessing xenobiotic exposure in Atlantic tomcod from the North American Atlantic coast». *Environmental Health Perspectives*, vol. 102, no 9, p. 764.
- Xstrata Copper Canada. 2012. *Closing the Murdochville site. Leaving a positive, sustainable legacy*.
- Xu, W., I.G. Charles et S. Moncada. 2005. «Nitric oxide: orchestrating hypoxia regulation through mitochondrial respiration and the endoplasmic reticulum stress response». *Cell Res*, vol. 15, no 1, p. 63-65. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cr.7290267>.
- Xu, Y., J. Zhang, W. Li, K.W. Schramm et A. Kettrup. 2002. «Endocrine effects of sublethal exposure to persistent organic pollutants (POPS) on silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)». *Environmental Pollution*, vol. 120, no 3, p. 683-690. En ligne: <Go to ISI>://WOS:000179013200020.
- Yamashita, Y., M. Tanaka et J.M. Miller. 2001. «Ecophysiology of juvenile flatfish in nursery grounds». *Journal of Sea Research*, vol. 45, no 3-4, p. 205-218. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385110101000491>.
- Yang, D., S.G. Elner, Z.-M. Bian, G.O. Till, H.R. Petty et V.M. Elner. 2007. «Pro-inflammatory cytokines increase reactive oxygen species through mitochondria and NADPH oxidase in cultured RPE cells». *Experimental Eye Research*, vol. 85, no 4, p. 462-472. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014483507001704>.
- Ye, R., E. Lei, M. Lam, A. Chan, J. Bo, J. van de Merwe, A. Fong, M. Yang, J. Lee, H. Segner, C. Wong, R. Wu et D. Au. 2011. «Gender-specific modulation of immune system complement gene expression in marine medaka *Oryzias melastigma* following

- dietary exposure of BDE-47». *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 19, no 7, p. 2477-2487. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-012-0887-z>.
- Yoshino, M. et K. Murakami. 1981. «In situ studies on AMP deaminase as a control system of the adenylate energy charge in yeasts». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 672, no 1, p. 16-20. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304416581902749>.
- Yuan, Z., S. Courtenay, R.C. Chambers et I. Wirgin. 2006. «Evidence of Spatially Extensive Resistance to PCBs in an Anadromous Fish of the Hudson River». *Environ Health Perspect*, vol. 114, no 1. En ligne: <http://dx.doi.org/10.1289%2Fehp.8255>.
- Yuan, Z., M. Wirgin, S. Courtenay, M. Ikonomou et I. Wirgin. 2001. «Is hepatic cytochrome P4501A1 expression predictive of hepatic burdens of dioxins, furans, and PCBs in Atlantic tomcod from the Hudson River estuary?». *Aquatic Toxicology*, vol. 54, no 3-4, p. 217-230. En ligne: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T4G-43P3SS5-6/2/b32bb086130b904b1960b21ffc062fa0>.
- Yum, S., S. Woo, E. Choi, S. Kim, R. Oh, S. Lee et T.K. Lee. 2005. «Analysis of Gene Expression in Benzo[a]pyrene-exposed *Sebastes schlegeli* using Differential Display Polymerase Chain Reaction». *J Environ Toxicol*, vol. 20, no 1, p. 67-73. En ligne: <http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.5620%2Fjet.2005.20.1.67>.
- Yurkowi, E.J. et P.R. Makhijani. 1998. «Flow cytometric determination of metallothionein levels in human peripheral blood lymphocytes: utility in environmental exposure assessment». *Journal of Toxicology & Environmental Health: Part A*, vol. 54, no 6, p. 445-457. En ligne: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=aph&AN=3974201&lang=fr&site=ehost-live>.
- Zelikoff, J.T. 1998. «Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals?». *Toxicology*, vol. 129, no 1, Aug, p. 63-71. En ligne: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TCN-3W01HGC-6&_user=10&_coverDate=08%2F07%2F1998&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=7ed0f64418a9667f56eb929b68b5d261 ou <Go to ISI>://000076112100006.
- Zhou, Q., J. Zhang, J. Fu, J. Shi et G. Jiang. 2008. «Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem». *Analytica Chimica Acta*, vol. 606, no 2, p. 135-150. En ligne: <http://ukpmc.ac.uk/abstract/MED/18082645>.

Annexe 1 :

**Réponses du flet, *Platichthys flesus*, en présence
d'un mélange complexe de HAPs et PCBs en
conditions expérimentales**

Approche 2D

Article 2 : Proteomic analysis of the European flounder *Platichthys flesus* after experimental PAH/PCB contamination.

GALLAND Claire¹, DUPUY Célie¹, LOIZEAU Véronique², DEVAUX Alain⁴, DANION Morgane³, AUFFRET Michel¹, QUINIOU Louis¹, LAROCHE Jean¹, and PICHEREAU Vianney¹

¹ Université de Bretagne Occidentale, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, LEMAR UMR 6539 CNRS/UBO/IRD, Institut Universitaire Européen de la Mer, 29280 Plouzané, France

² Département d'Ecologie Côtière, IFREMER, Centre de Brest, BP70, 29280 Plouzané, France

³ ANSES, site de Ploufragan-Plouzané- Technopole Brest Iroise, 29280 Plouzané

⁴ USC INRA "Impact génotoxique sur les hydrosystèmes", UMR LEHNA 5023, ENTPE, Rue Maurice Audin, 69518 Vaulx en Velin Cedex, France

En préparation

ABSTRACT

PCBs and PAHs are persistent organic chemical pollutants that accumulate in estuarine sediments. As a consequence, flatfish such as *Platichthys flesus* may be subjected to these compounds, and are often used as sentinel species to monitor the estuarine water qualities.

In this study, we performed an experimental contamination of fish using a PCBs/PAHs mixture at concentrations found in the Seine estuary (C1), and 10 fold this concentration (C2) during 15 or 30 days, followed by a 15-days recovery period. Chemical analysis of fish proved the efficiency of contamination. We developed a proteomic approach to understand the molecular mechanisms underlying the adaptation of *P. flesus* to these xenobiotics. We

showed 54 protein spots differentially accumulated (p-value < 0.05) in one or several conditions, 34 of which displaying accumulation factors higher than 2, and we identified 13 of them by MALDI TOF-TOF mass spectrometry. We could determine that several proteins belonging to the betaine demethylation pathway and the methionine cycle (BHMT, SHMT, SAHH) were accumulated, and showed for BHMT a similar expression pattern at the transcriptional level. This accumulation was related to that of the glutathione metabolism enzymes GST and GPx. The other identified proteins were oxidative stress proteins, and proteins involved in the energy metabolism.

Key words: *Platichthys flesus*, proteomics, pollution, biomarker, betaine and methionine metabolism, PAH, PCB, BHMT.

1 INTRODUCTION

Estuaries are connection zones between land and sea, what gives them a high ecological importance as they often contain high levels of nutrients and organic materials and serve as nurseries for a number of marine organisms (Able, 2005; Vasconcelos et al., 2011). Moreover, estuaries are often located near towns and industries and are impacted by a range of human activities. Estuaries receive particles carried out within the drainage basin, including urban and industrial development as well as intensive agriculture. Thus, estuarine waters and sediments accumulate xenobiotics such as heavy metals and organic contaminants, that degrade the overall quality of the remaining estuarine habitats for marine organisms (Courrat et al., 2009).

Among chemical pollutants, organic ones are of important concern. Indeed, they are hydrophobic and remanent in the environment where they are fixed on organic materials. They bioconcentrate in organisms and bioaccumulate in the food web (Loizeau et al., 2001). High predators such as carnivorous fish are thus subjected to elevated concentrations of these contaminants.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), and polychlorobiphenyls (PCBs) are produced by industrial and agricultural activities. They are recognized to have adverse effects on organisms including genotoxicity, embryotoxicity, cancerogenicity or immunotoxicity

(Cachot et al., 2006). They also induce detoxification enzymes especially through the activation of the arylhydrocarbon receptor (AhR) (Blanchard et al., 1999; Wang et al., 2009). PCBs are divided in two classes: dioxin like PCB (PCB-dl) and non dioxin like PCBs (PCB-ndl); the first one being able to bind the Ahr on the contrary to the second (Takigami et al., 2010). After these observations, biomarkers have been determined to monitor both the effects of pollutants on the organisms and their response and have been used to monitor and evaluate the organic contamination in organisms.

Recently, -omics studies in ecotoxicology demonstrated their utility to study and better understand the molecular mechanisms and to identify new biomarkers. As effectors of cellular mechanisms, receptors, structure or signaling molecules, proteins are key molecules of the cell machinery and then, of the organisms functioning. Proteomic tools allow the identification of proteins which abundances change as a result of environmental pressures, thus giving essential information on the actual physiology of organisms under adverse conditions (Tomanek, 2011). A few proteomic studies were focused on PCBs and PAHs effects in fish. Berg et al. (2011) studied the brain proteome of the Atlantic cod *Gadus morhua* after PCB153 contamination. PCB153 is often considered alone in studies as it is considered as representative of other PCBs in the environment. It is the most bioaccumulated PCB. Sanchez et al. (2009) studied the effects of an acute exposure of 2 PAHs (toxaphene, phenanthrene), a PCB (PCB126) and Cadmium chloride independently on the liver proteome of the largemouth bass (*Micropterus salmoides*). Whereas all these studies used specific contaminants, Bohne-Kjersem et al. (2009) studied the plasma proteome of the Atlantic cod *Gadus morhua* after crude oil contamination, containing a combination of PAHs. Besides, Costa et al. (2010) studied the liver proteome response of soles *Solea senegalensis* after subacute exposure to Cadmium, Benzo(a)pyrene or their combination. They demonstrated that the combined effects are different of the effects of each pollutant independently. It is indeed well known that combining contaminants may cause synergistic or antagonist effects, and that the effects of the combination can be different from those of each contaminant independently (Cellander, 2011). In the environment, chemical contaminants are present associated to each other but only a few studies used combinations of chemicals.

In this study, the european flounder *Platichthys flesus* was contaminated through food with a cocktail of contaminants designed to reflect the levels of PAHs and PCBs found in the Seine (Cachot et al., 2006), one of the most polluted estuary in Europe (Tronczynski et al., 1999 ; Motelay-massei et al., 2004). the European flounder *Platichthys flesus* is a

catadromous fish living in estuaries, so that these ecosystems are described as nurseries for them (Dando, 2011). *P. flesus* is known to display a high capacity to adapt to changing environments characterized by reduced salinity, hypoxia and highly variable temperatures (Larsen et al., 2007; Hemmer-Hansen et al., 2007; Evrard et al., 2010; Marchand et al., 2010). Juvenile flatfish feed on benthic organisms and live in close association with the bottom sediments, where most of the chemicals introduced into aquatic environments by human activities do accumulate. They are considered as particularly sensitive to the effects of pollution and other types of habitat degradation (Skerritt, 2010), and as a consequence are considered as a valuable sentinel species often used to monitor estuarine water quality (Amara et al., 2009; Lyons et al., 2010; Leaver et al., 2010). Nevertheless, at this time, only two proteomic studies have been devoted to this species (Galland et al., 2012; Galland et al., in prep). Galland et al. (2012) were able to discriminate the proteomic signatures of flounder from polluted estuaries from that of flounder from non polluted ones, thus showing the potential of flounder proteomics in an environmental monitoring perspective. In this paper, we developed a global proteomic approach by two-dimensional electrophoresis (2-DE) to identify differentially expressed proteins in *P. flesus* subjected to oral contamination by a cocktail of PAHs and PCBs designed to reflect the concentration found in the Seine, and 10 times this concentration. The aim was to identify accumulated proteins in the livers, the main detoxification organ, in order to better understand the response mechanism to contamination by PAHs and PCBs, and to identify potential new protein biomarkers.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Experimental design and procedure

Juveniles of *P. flesus* (cohort 0+) were purchased in a farm (Fishlab, Danemark) in October 2010. They were then reared in our laboratory in experimental tanks, the water being directly collected in the Bay of Brest salinity ≈ 35 g/l, temperature maintained between 14 and 17°C). After 14 days acclimation, 13 fish were sacrificed as a control (T0) and remaining fish were separated in 6 groups: 2 control groups (control and control+solvent) and 2 contaminated groups in batch replicates (C1 and C2). Fish were contaminated through food with granulates soaked with a PAH/PCB mixture dissolved in iso-octane (Table 1) designed to reflect the PAHs (Cachot et al., 2006) and PCBs (Abarnou and Duchemin, 2008) concentrations in respectively sediments and fish measured in the heavily polluted Seine

estuary (C1) and 10 times these concentrations (C2). Mixture was prepared by IDHESA laboratory and pellets contaminant load was in granulates by IDHESA to check the efficiency of the impregnation (Table I).

After 14 (t14) and 29 days (t29) contamination, 13 fish were sacrificed per group. Fish were then refed with normal commercial granulates and 10 fish per group were sacrificed after 14 days recovery (i.e. 43 days after t0).

One day before t0, animals were tagged and their standard lengths (Lsd, i.e., until the hypural joint) and total weights were measured. Each sampling operation was conducted with the following protocol:

(1) the Lsd and total- and gutted-carcass weight were measured per fish, and a blood sample was taken in the caudal vein with a heparinized syringe; a part of blood sample was diluted (x100) in a cryopreservative buffer (Evrard et al., 2010) for the Comet assay before being frozen in liquid nitrogen;

(2) fish were knocked out and fragments of liver were quickly dissected and frozen in liquid nitrogen; the carcass of each fish was stored at -20°C until PCBs analysis.

Samples were kept at -80°C until further analysis. 10 samples per condition and organ were kept for biomarker analysis (BHMT gene expression by qPCR in the liver ; COMET assays in the blood). 3 livers per condition were kept for proteomic analyses by two-dimensional electrophoresis.

Visual inspection did not reveal any trace of liver pathology or parasite infection. All experiments were performed according to the guidelines laid down by the french "Ministère de l'Agriculture" and the European Union council directive for the care and use of laboratory animals.

2.2 Biometric indexes

The body condition factor (CF) was calculated by the formula: $CF = 100 \times W / Lsd^3$, where W is the gutted-carcass weight (g) and Lsd is standard length (mm) of each fish.

The growth of each fish was estimated by the measured of the specific growth rate (SGR) by the formula : $SGR (\%/day) = 100 \times (\ln W_t - \ln W_0) / t$, where W0 and Wt are the initial and final weights respectively and t is time (day) (Talbot, 1993).

2.3 Food preparation and PCBs analysis in food and fish

Commercial food (Inicio plus, 1.9 mm), obtained from Biomar (France), consisted of a formulated feed containing 61% crude protein and 33% crude fat. Spiked food was prepared by batch to avoid deterioration and by slowly adding an iso-octane solution of known amounts of thirteen PCBs congeners and 9 PAHs, (AccuStandard Inc., New Haven, USA, purity above 98%) to food pellets in order to prepare diets. PCBs mixtures were composed of the seven indicator PCBs congeners (CB28, 52, 101, 118, 138, 153, 180), and a few others to describe a larger range of chlorination from 3 to 8 chlorine atoms (CB105, 126 149, 156, 170, 194). The latter compounds were chosen because they can highlight any underlying mechanisms acting on the distribution of organic contaminants in biota, i.e. bioaccumulation or biotransformation. CB153 is not metabolized and is used as a representative of all thirteen congeners. PAHs mixtures were composed of 9 high molecular weights PAHs (three to five rings) found in European and American estuaries and already used in several studies of contamination with PAHs mixtures (Arkoosh et al., 2001; Bravo et al., 2011).

Two diets were prepared: PCBs&PAHs-medium (C1) and PCBs&PAHs-high (C2) for which targeted concentrations of individual congeners are shown in Table I. PAHs being metabolized, only the PCBs concentration was measured to confirm the fish contaminations. Batches of spiked food were stored in amber containers in a cool, dark place throughout their use (circa 1.5 months). Individual PCB congener concentrations were determined in each batch of spiked food (Table 1).

Table I: Concentration of chemical pollutantS measured in the soaking solution, in pellets and in carcasses at T0 and T29 in control (control and control+iso-octane) and contaminated (C1 and C2) fish. Concentrations are given in ng/g of dried-weight. Concentrations were quantified in one representative sample in pellets and in carcasses of n fish. Results in fish are given as mean±sd.

Measured concentration of pollutants in ng/g	Control with iso-octane	C1		C2		Final concentration in carcasses				
	In pellets	In soaking solution	In pellets	In soaking solution	In pellets	T0 (n=5)	te T30 X (n=5)	Te T30 XX (n=5)	C1T30 (n=10)	C2 T30 (n=10)
PAH :										
fluoranthène	2.3	210	189	2100	2072	nm	nm	nm	nm	nm
pyrène	3.2	200	176	2000	1916	nm	nm	nm	nm	nm
benzo(a)anthracène	0.7	70	49.6	700	640	nm	nm	nm	nm	nm
chrysène	1.5	130	84.8	1300	1144	nm	nm	nm	nm	nm
benzo(b)fluoranthène	2.3	170	116	1700	1501	nm	nm	nm	nm	nm
benzo(k)fluoranthène	0.7	60	43.3	600	529	nm	nm	nm	nm	nm
benzo(a)pyrène	1.3	60	42.1	600	517	nm	nm	nm	nm	nm
indeno(1,2,3-cd)pyrène	nm	50	nm	500	514	nm	nm	nm	nm	nm
benzo(ghi)pérylène	0	50	54	500	435	nm	nm	nm	nm	nm
Σ HAP =	12	1000	754.8	10000	9268					
PCB :										
CB 28	0	5	4.2	50	47.1	3.14±0.13	2.32±0.14	2.48±0.26	6.79±0.30	26.41±1.39
CB 52	0.4	25	24.3	250	252	1.76±0.17 4.34	1.08±0.16	1.14±0.18	13.15±0.65	154.2±7.40
CB 101	1.6	50	43.8	500	470	+0.32	3.8±0.18	3.36±0.32	43.59±2.02	452.8±21.55
CB 149	2.1	50	42.8	500	477	2.32±0.29	2.26±0.17	2.32±0.52	26.85±1.75	301.7±15.74
CB 118	1.1	50	41.7	500	465	6.64±0.40	5.76±0.17	6.16±0.40	38.11±1.46	371.6±24.82
CB 153	3.3	100	86	1000	939	2.06±0.41	2.4±0.25	2.74±0.17	55.79±3.19	609.4±31.56
CB 105	1.4	25	20.3	250	238	1.62±0.10	1.15±0.04	0.92±0.10	12.25±0.68	156.2±9.11
CB 138	2.6	100	79.4	1000	911	3.54±0.32	3.1±0.12	2.94±0.25	50.63±2.80	569±28.91
CB 156	1.2	25	20.3	250	218	0.92±0.06	0.8±0.02	0.76±0.05	10.8±0.62	137.8±8.79
CB 180	1.4	50	37.9	500	449	1.92±0.12	1.76±0.04	1.84±0.05	23.49±1.40	271.6±16.86
CB 170	1.5	25	17.7	250	212	1.86±0.41	2.11±0.16	1.56±0.07	9.95±0.76	116.9±12.01
CB 194	0	5	3.5	50	42.5	0.24±0.02	0.23±0.02	0.25±0.06	2.2±0.15	25.12±1.58
CB 126	0	5	3.9	50	46.9	nm	nm	nm	nm	nm

Annexe 1 : Réponses du flet en conditions expérimentales - approche 2D

CB 31	nm	nm	nm	nm	nm	2.62±0.17	1.94±0.02	2.34±0.25	3.25±0.17	4.79±0.31
CB 110	nm	nm	nm	nm	nm	1.94±0.13	2.02±0.09	2.14±0.31	2.4±0.18	3.44±0.15
CB 132	nm	nm	nm	nm	nm	1.94±0.25	1.15±0.02	1.14±0.07	1.7±0.29	2.97±0.28
CB 187	nm	nm	nm	nm	nm	1.02±0.12	0.96±0.07	1±0.09	1.28±0.11	2.39±0.23
CB 128	nm	nm	nm	nm	nm	1.56±0.13	1.26±0.07	1.24±0.09	1.72±0.04	3.28±0.08
Σ PCB	16.6	515	425.8	5150	4767.5	39.44	34.10	34.33	303.95	3209.6
Σ totale de contaminant	28.6	1515	1180.6	15150	14035.5					

Non-spiked food was also analyzed for PCB levels, and concentrations were between <0.05 ng/g dry weight (dw) and 3.0 ng/g dw (mean value calculated on 5 replicates) depending on the congener. In addition to congeners included to spike the contaminated food, CB 31 (not detected; nd), CB 77 (nd), CB110 (0.75 ng/g dw), CB132 (nd), CB128 (nd), CB187 (nd) non-added congeners and p,p_DDE (3.50 ng/g dw) were measured.

PCB analyses in fish carcasses were performed according to the protocol described by Bodiguel et al. (2009). Briefly, approximately one gram of freeze-dried fish carcass were extracted in a hot Soxhlet extraction apparatus (Soxtec) over 1.5 h with a hexane:acetone mixture (80:20). The amount of extracted fat was determined by gravimetric analysis. Then, two successive cleanups were performed on the extractable material. First, lipids and co-extractable materials were destroyed by adding concentrated sulphuric acid. The cleaned extract was then purified by adsorption chromatography on a Florisil column (16% MgO + 84% SiO₂, activated for 1.5 h at 500°C, deactivated with 3% of demineralised water) and eluted with pentane. Finally, PCB congeners were analyzed by gas chromatography with an electron capture detector, on a HP 5890 series II equipped with a CP-Sil19 capillary column (60 m length, internal diameter 0.25 mm, and 0.15 µm phase film thickness) following optimized conditions described by Jaouen-Madoulet et al. (2000). The system was calibrated within quite a large range using a six-points calibration curve to define the linearity range of our detector (ECD) for all contaminants. The relative precision of the method was checked for this type of sample by analyzing five aliquots of a homogeneous tissue preparation of fish muscle. The results showed standard deviations of less than 10% for all congeners, indicating that the method had a satisfactory reproducibility. During analysis of the real samples, analytical blanks were systematically measured for every ten samples. The blank concentrations were always less than the concentrations of the lowest standards of all congeners. Finally, 5 replicates of a reference material, BCR-CRM349 (Cod Liver Oil) were analyzed to determine the accuracy and precision of the method. PCB recoveries varied between 74% and 125%. Furthermore, the RSD values ranged from 4% to 19%, with a mean of 10% for all PCBs. All of these results were in agreement with certified reference values and published data (Schantz et al., 1993). The laboratory regularly takes part in Quality Assurance of Information for Marine Environmental Monitoring in Europe (QUASIMEME) intercomparison exercises for PCBs in biota and our Z-scores are satisfactory, i.e. between -2 and +2

2.4 Proteomic analysis

Protein extraction. Proteomic analyses were conducted as described in Galland et al. (2012). Briefly, frozen fish livers were homogenized in 1 ml of Tris-HCl buffer (100 mM, pH 6.8) containing 1% Protease Inhibitor Mix (GE Healthcare), using a Precellys 24 system (Bertin Technologies). The supernatants were removed by centrifugation (12 000 g, 15 min, 4°C) and then incubated at ambient temperature for 30 min with 1% DNase mix (GE Healthcare). Total protein contents were determined using DC protein assay kit (Biorad) in triplicate.

The volume corresponding to 500 µg of proteins was concentrated by TCA (10%, v/v) precipitation. Proteins were harvested by centrifugation (12 000 g, 10min, 4°C), and the protein pellet was washed several times using a mix Tris-HCl (50 mM, pH 8) - acetone (20/80:vol/vol) containing traces of bromophenol blue (used here as a pH indicator), until neutralisation. Supernatants were then discarded and protein pellets were dried in air, and then resuspended in 250 µl of Destreak Rehydration Solution (GE Healthcare) containing 1% IPG buffer pH 3-10 (GE Healthcare).

2-Dimensional Electrophoresis (2-DE) analysis. The proteins from at least 4 animals per estuary were individually loaded on linear pH 3-10 gradient IPG strips (13 cm, GE Healthcare). IEF was performed in an Ettan IPGphor III isoelectric focusing system (GE Healthcare), using the following protocol: a 15-min step at 250 V, a 2-h step 500 V, a 1-h gradient to 1 000 V, a 2.5-h gradient to 8 000 V, and a final 1.5-h step at 8 000V.

After the first dimension, strips were equilibrated 15 min in an equilibration solution (2% SDS, 6 M Urea, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 30% glycerol (v/v), BBP) containing DTT (1%), and then 15 min in the same solution containing iodoacetamide (260 mM). The second dimension was performed in 10-15% gradient polyacrylamide gel, as described in Budin-Verneuil et al. (2007). Proteins were revealed by incubating gels in 0.1% Coomassie blue staining solution (PhastGel Blue R-350 GE Healthcare) overnight, followed by washing in a methanol - acetic acid - water (30/7/63 : v/v/v) solution.

Electrophoregrams analyses. The analysis was performed on 2/3 2-DE gels per condition. Gels were scanned, and image- (spot detection and matching) and statistical-analyses were performed using the Progenesis SameSpot software (Nonlinear Dynamics). Spots displaying ANOVA p-values below 0.05 (as given by Progenesis SameSpot) were considered as significant, and were then selected for further analysis. Hierarchical clustering

were performed on standardized volumes given by the Progenesis Samespot software with the PermutMatrix software, using Pearson correlation and Ward aggregation method (Caraux and Pinloche, 2005).

Mass spectrometric analysis. Selected spots were manually excised from 2-DE gels, and proteins were in-gel trypsinolyzed as described in Budin-Verneuil et al. (2007). Briefly, gel pieces were first washed in 50 mM ammonium bicarbonate (BICAM), and then dehydrated in 100 % acetonitrile (ACN). Gel pieces were vacuum dried, and rehydrated with BICAM containing 0.5 µg trypsin (Promega), and incubated overnight at 37°C. Peptides were extracted from the gels by alternative washing with 50 mM BICAM and ACN, and with 5% formic acid and ACN. Between each step, the supernatants were pooled, and finally concentrated by evaporation using a speed vac (45°C). Samples were then resuspended in TFA (0.1% in water). Peptides solutions were mixed with the α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA, 10 mg/ml of a ACN/TFA/water (60/4/36 : v/v/v) solution), and spotted on a polished steel MALDI target using the dried droplet method. Peptides were then analysed by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-Of-Flight tandem mass spectrometry (MALDI TOF-TOF) in positive ion reflector mode, using an Autoflex III (Bruker Daltonics) mass spectrometer. The flexControl software (v3.0, Bruker Daltonics) was programmed to acquire successively PMF spectra and MS/MS from the dominant peaks.

Proteins identification. Mass spectrometric data were analyzed by using both Mascot online (Matrix Science Ltd.), and the Peaks software (Bioinformatics Solutions) for MS/MS-based identification and de novo sequencing. The search parameters allowed for one trypsin miscleavage, oxidation of methionine, carbamidomethylation of cysteine and at least 100 ppm mass accuracy. We used three different databases; a NR protein database, and 3 ESTs databases, which contained the sequenced ESTs of vertebrates, of fish or a one containing only the Platichthys ESTs sequenced to date. The best results were obtained with the vertebrate ESTs database, using the Peaks software. All sequence tags obtained were submitted to homology searches using the Blast algorithm available at www.ncbi.nlm.nih.gov.

2.5 Biomarker analysis

2.5.1 Gene expression by qPCR analysis

The procedure used to measure the gene expression level is similar to that described by Dupuy et al. (in prep.). Total RNAs were isolated using the Trizol reagent (Applied Biosystems) at a concentration of 1 ml per 50 mg of tissue. Each liver was homogenized in Trizol using a Precellys-24 ceramic bead-based homogenizer (Bertin Technologies). Samples were treated with RTS DNase Kit (MO BIO) to prevent DNA contamination. The purity and concentration of samples were determined using a NanoDrop 8000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Purity was assessed using the A260/A230 and A260/A280 ratios. RNA quality was assessed using the 2100 Bioanalyzer Agilent (Agilent Technologies) or by migration on agarose gel (1.5%). Reverse transcription (RT) was carried out using 1 µg total RNA from each sample with RevertAid H minus First Strand, cDNA Synthesis Kit® (Fermentas). A Retrotranscriptase PCR was carried out using a pool of RNA representative of samples from each experimental condition. This cDNA pool obtained was the used as a control in each run of real-time PCR.

The mRNA expression level was explored for the betaine homocysteine methyl transferase (BHMT) gene. Two housekeeping genes were tested: alpha-tubulin and 18S rRNA. No significant differences were observed for alpha-tubulin between the Ct of the control and the contaminated fish; furthermore Alpha-tubulin showed the lowest variation coefficient, and thus was retained as the housekeeping gene in our analysis. Primers of Alpha-tubulin, 18S and BHMT were obtained from the literature (Table 2).

Table 2 : Primer sequences used in RT-PCR

Gene	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')	Ref.
α-Tubuline	CAC-AGC-CTC-ACT-TCG-TTT-TG	AGA-TGA-CAG-GGG-CAT-AGG-TG	Leaver et al. (2010)
18S	GTC-TGG-TTA-ATT-CCG-ATA-ACG-AAC-GAG-ACT-CTA	TGC-TCA-ATC-TCG-TGT-GGC-TAA-ACG-CCA-CTT-G	Evrard et al. (2010)
CYP1A1	GCC-AAC-GTG-ATC-TGC-GGA-ATG	AAG-CCG-ACC-AGC-TCC-TGA-TC	Calves et al. (2011)
BHMT	AGA-GAG-GCC-TAC-AAG-GCT-GG	GTG-TGC-ATC-TCC-AGA-CCA-GCG-C	Evrard et al. (2010)
TNF-R	CAG-CCG-AAT-CTC-AGT-GAT-GG	CAG-TTG-GAT-GCC-AAG-TCA-GC	design of ES443667.1
C3	ACG-ATG-AAA-GTG-GGC-GTC-TT	TGC-AGT-TCT-CTT-CGG-CAC-AT	design of EC379465.1

The real-time PCR (RT-PCR) amplifications were carried out in triplicate with the Absolute QPCR SYBR Green ROX Mix (Thermo Scientific) The final volume of reaction was of 25 µl with 1 µl of cDNA (1/40 dilution), 12.5 µl of Absolute QPCR SYBR Green

Mix (Thermo Scientif), 1.75 µl of each primer (1µM) and 8 µl of water. A negative control was carried out with total RNA DNase treated for each sample. Each run included cDNA of sample, cDNA of the representative pool used as control and blank controls (water) analyzes for each primer pair. The RT-PCR were carried out using a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) with RT-PCR thermal cycling program as follow : 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, then 40 cycles at 95°C for 15 s follow by 1 min at 60°C. A melt curve was carried out to confirm the specificity of the reaction with the program following: 95°C for 15 s, 60°C for 30s and an increase of temperature by 0.5°C each 15 s to 90°C. PCR efficiency (E) was determined for each primer pair by determining the slopes of standard curves obtained from serial dilution analysis of cDNA. Relative expression of the target gene was calculated with the Pfaffl formula (2001) using Alpha-tubulin as the reference gene :

$$ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta CP_{target}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(control-sample)}}$$

The ratio of a target gene is expressed in a sample versus a control in comparison to a reference gene. E_{target} is the real-time PCR efficiency of target gene transcript; E_{ref} is the real-time PCR efficiency of a reference gene transcript; ΔCP_{target} is the CP deviation of control – sample of the target gene transcript; ΔCP_{ref} = CP deviation of control – sample of reference gene transcript.

2.5.2 COMET analysis

The level of DNA breaks induced by chemicals and estimated by the Comet assay is considered as a precocious and sensitive biomarker for populations living in contaminated aquatic systems (Frenzilli et al., 2009). In this study, the Comet assay was carried out on flounder erythrocytes according to the procedure described by Singh et al. (1988) with slight modifications detailed in Evrard et al. (2010). After cells treatment and electrophoresis, DNA was stained with 0.05 mM ethidium bromide and scored using an Axioskop epi-fluorescence microscope (Zeiss) and the comet assay IV image analysis system (Perceptive Instruments Ltd., Havrevill, UK). Randomly selected cells from two replicate slides (50 cells per slide) were analysed. The percentage of DNA in the comet tail (median % tail intensity) was chosen as the most reliable and meaningful comet measurement (Jha, 2008).

2.6 Statistical analyses

Statistic tests and box plot graphs were carried out using Statistica 10.0 (StatSoft). The variables were not normally distributed, so the Kruskal-Wallis (KW) test was used for inter-condition comparisons. When KW test was significant ($p \leq 0.05$), it was followed by a post-hoc test: a multiple bilateral comparisons of mean ranks. No significant difference was detected over the whole markers (KW test: $p > 0.05$) between control group and control group with solvent, between the two groups of C1 and between the two groups of C2, thus the analysis were conducted grouping the two groups of control, the two groups of C1 and C2.

3 RESULTS

3.1 Body condition and chemical analyses

P. flesus reared in Denmark were acclimated to our Laboratory conditions during 13 days, and then subjected to chemical contamination by feeding granulates soaked with 2 different concentrations of a PAH/PCB mixture, which composition reflected the PAH/PCB concentrations found in the Seine (C1), or ten times more (C2). Two control experiments (no contamination) were performed, in which fish were fed normal granulates (control) or granulates soaked with solvent (solvent control).

PCB quantification in fish muscles after 30 days exposure showed that all of the exposed fish had accumulated PCBs (Table 1). Furthermore, we observed that fish fed with the higher concentration (C2) accumulated approximately 10 times more PCBs than fish contaminated with C1. For example, CB153 concentrations in fish carcasses were found to be 2.1 (± 0.6) ng/g DW in control fish after 29 days, while this compound reached 55.8 (± 10) and 609 (± 99) ng/g DW in fish exposed to C1 and C2, respectively, at the same sampling time. It is noteworthy that these concentration were very near to those measured in the granulates after soaking (Table 1). This demonstrated that the contamination way was appropriate and efficient.

The body condition indexes (BCIs) and growth rates of fish (Fig. 1 A and B) were determined at each sampling time. We did not observe significant changes of these parameters throughout the experiment, suggesting that all the flounders took up similar

amounts of granulates, irrespective of the sampling time or the extent of the chemical contamination.

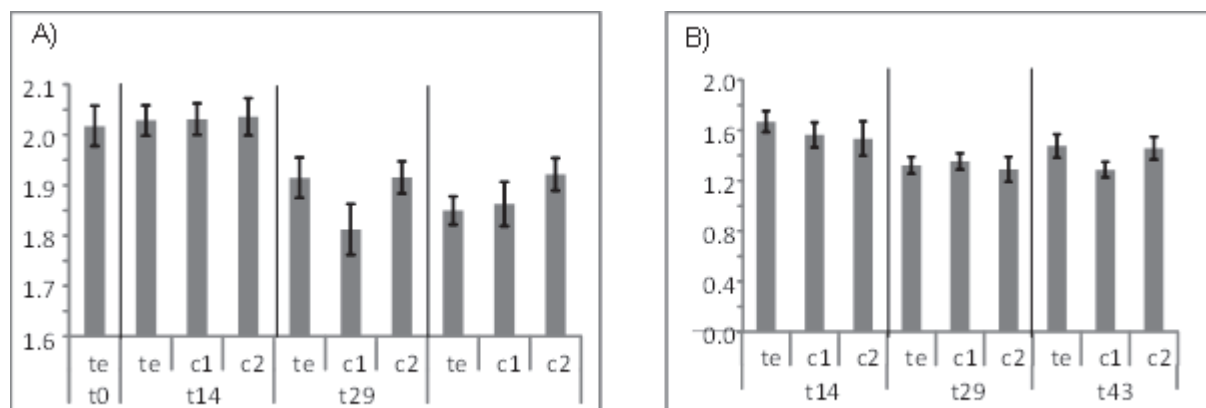


Figure 1: Morphometric measurements before sacrifice. A) Condition index B) Standard growth rate are given in mean $\pm$ sd. No difference appears between animals at each sampling time (t0: before contamination, T14 and T29 after 14 and 29 days contamination De (T43), after 14 days of recovery), whatever their treatment (Te : control; C1; medium dose; C2 high dose, ie. 10 times C1)

3.2 2-dimensional electrophoresis

At each sampling time, the livers of 3 fish per condition were frozen in liquid nitrogen, proteins were extracted and separated by 2-DE. After Coomassie blue staining, an average of 660 spots were detected on each gel. We performed many comparisons to detect spots which abundance was significantly (p -value < 0.05) altered in one or several conditions (figure 2).

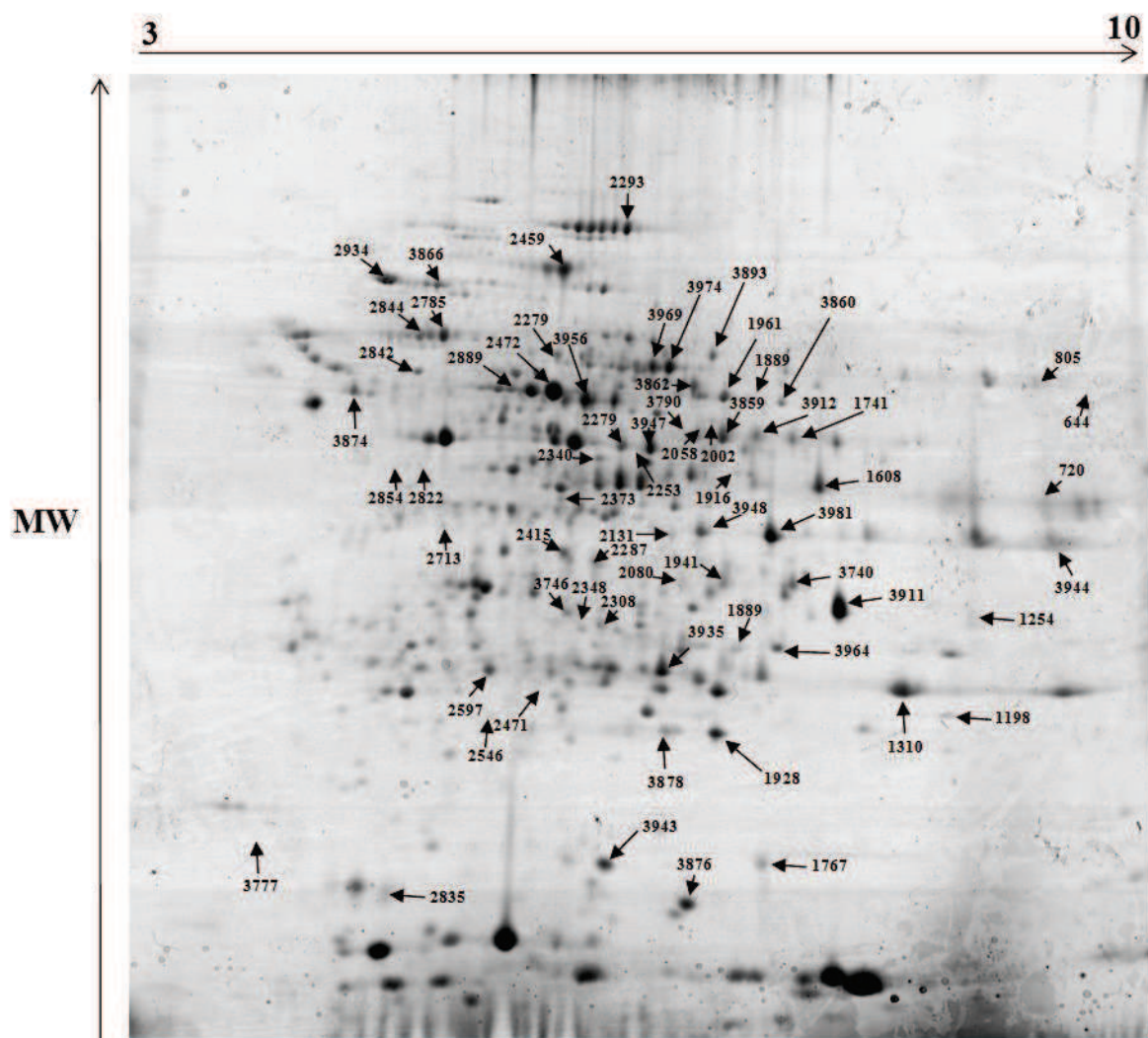


Figure 2: Master gel representative of T29 C2 gels. Numbers and arrows represent spots deregulated in at least one condition.

We first compared the control proteomes. We did not observe any significant differences between controls with or without solvent. This result was expected, as the solvent used was iso-octane, a volatile compound commonly found in petroleum. Safety datasheets of this compound indicate that its volatilization half life in a model river 1 meter deep flowing at 1 m/sec with a wind speed of 3 m/sec has been estimated to be 3.1 hours. As a consequence, in our experimental conditions, iso-octane most probably volatilized during granulates drying, so that fish (both from solvent control and C1 and C2 experiments) were simply not exposed to it. We also compared the control proteomes obtained at the different sampling times. In all, five spots revealed lower abundance in T0, as compared to T14, T29 and T43. 4 of these spots (ie., 2495, 2361, 2292 and 2335) would correspond to different isoforms of

HSC70 (see the identification section). By contrast, the T14-, T29- and T43- proteomes did not reveal significantly deregulated spots.

The comparison of chemically contaminated conditions versus controls revealed 54 protein spots differentially accumulated in one or several conditions, with fold change values ranging from 1.3 to 7.1 (figure 3).

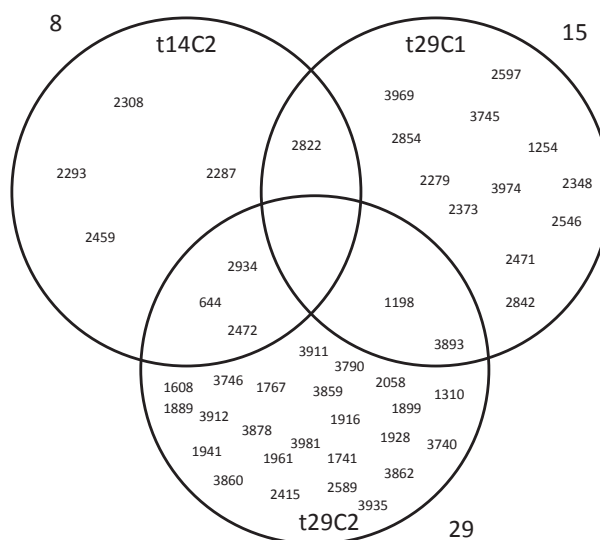


Figure 3: differentially accumulated spots in each condition, after 14 or 29 days of contamination (T14, T29) with the medium dose (C1) or the high dose (C2) of the contaminant mixture

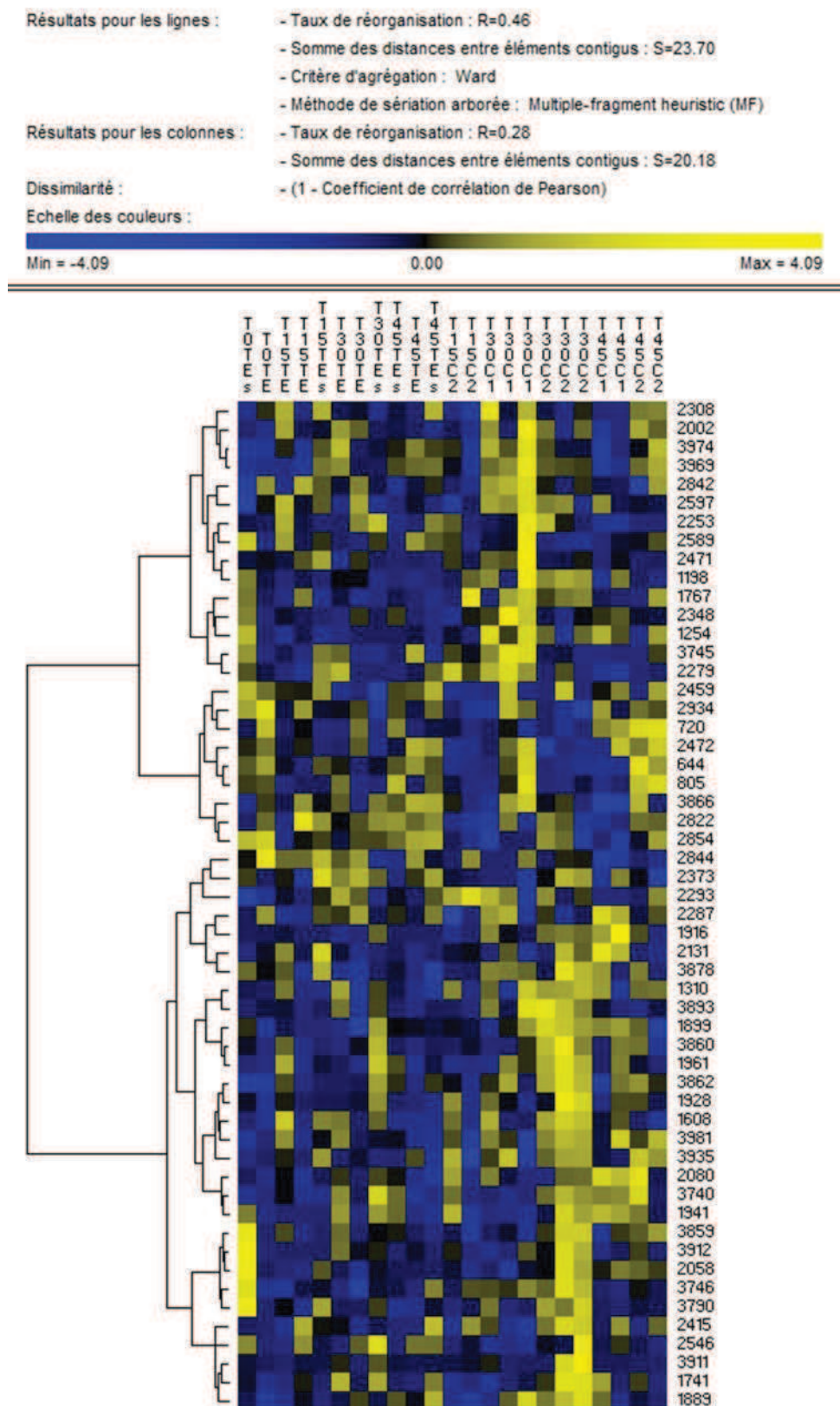


Figure 4: Heat map based on the normalised integrated volumes given by the Progenesis sameSpot software for spots found significantly deregulated in this study (see methods for parameters used in PermutMatrix).

Thirty four of them displayed fold changes over 2. After 29 days of contamination with the concentration C1, we observed 11 spots over-, and 4 down-accumulated. With the C2 concentration, the abundances of 8 spots revealed modified after 14 days exposure, most of which (7) being decreased. Expectedly, more modifications were observed with the C2 concentration after 29 days exposure, as the abundances of 29 spots were modified, ie, among which 25 appeared accumulated. Comparing the results obtained, we observed that only 6 spots overlapped between 2 conditions, ie., the spots 644, 2472 and 2934 between T14C2 and T29C2, the spots 1198 and 3893 between T29C1 and T29C2, and the spot 2822 between T14C2 and T29C1. However, we did not observe any spot significant in all of the contamination experiments we did.

After the 29-days contamination period, fish were subjected to depuration in seawater and fed with normal commercial food free from pollutants for 14 additional days. We also analyzed the modifications of proteomes during this period. In all, the relative abundances of 14 proteins appeared modified during this period. As shown in Table 3, half of these proteins (7) were already shown to be modified in at least one of the previous conditions tested, and 7 were observed only in these depuration conditions.

Table 3: Significant changes in proteins abundances during pollutants exposure. 1IC1 and IC2 refer to spots which abundance was found increased, and RC1 and RC2 to those showing decreased intensities in T29 gels. For spots observed on T14 gels, the suffix T14 was added to IC2 or RC2. IDC1, IDC2, RDC1 and RDC2 refer to spots which intensities were found increased (I) or decreased (R) after the depuration period (at T43), following the exposure to C1 or C2.

Spot number	Fold change	Change Profile Category ¹	p-value
<u>T29 C1 vs control</u>			
2348	2.1	IC1	0.002
1254	2.4	IC1	0.006
3745	1.7	IC1	0.008
2546	2.2	RC1	0.010
2854	1.6	RC1. RDC1	0.010
2279	1.6	IC1	0.015
2822	1.9	RC1. RDC1. RC2T15	0.024
3893	1.6	IC1.IC2	0.028
3969	1.6	IC1. IDC2	0.031
2471	2.3	IC1	0.033
1198	2.0	IC1. IC2	0.037
2842	1.6	IC1	0.041
2597	1.5	IC1	0.045
3974	1.5	IC1	0.048
2373	1.4	RC1	0.050

Spot number	Fold change	Change Profile Category ¹	p-value
<u>T14 C2 vs control</u>			
2822	2.8	RC1. RDC1. RC2T15	0.007
644	2.2	IDC2. RC2T15. RC2	0.011
2287	1.8	RC2T15	0.021
2308	2.1	RC2T15	0.021
2472	1.3	RC2T15. RC2	0.023
2293	1.8	IC2T15	0.025
2934	1.3	RC2T15. RC2	0.041
2459	1.4	RC2T15	0.045
<u>T29 C2 vs control</u>			
1916	2.0	IC2. IDC1	0.001
1198	1.9	IC1. IC2	0.001
3860	2.8	IC2	0.001
1899	1.7	IC2	0.002
3893	2.1	IC1. IC2	0.002
3862	2.0	IC2	0.004
644	2.1	RC2T15. RC2. IDC2	0.005
3859	1.8	IC2	0.005
2058	1.9	IC2	0.005
3912	2.7	IC2	0.005
2934	1.4	RC2T15. RC2	0.006
1928	3.3	IC2	0.007
1961	2.3	IC2	0.007
3746	1.7	IC2	0.008
2472	1.3	RC2T15. RC2	0.008
3790	1.8	IC2	0.012
3911	5.3	IC2	0.022
1741	2.0	IC2	0.023
1767	1.8	IC2	0.023
3981	1.7	IC2	0.024
1889	1.5	IC2	0.026
1310	2.1	IC2	0.027
1608	2.1	IC2	0.027
3740	2.1	IC2	0.030
1941	2.0	IC2. IDC1	0.033
3935	1.6	IC2. IDC2	0.033
2415	1.8	IC2	0.036
2589	1.6	RC2	0.037
3878	1.6	IC2	0.050

Spot number	Fold change	Change Profile Category ¹	p-value
<u>T43 vs control</u>			
3866	7.1	RDC1	0.001
644	4.9	IDC2. RC2T15. RC2	0.001
1916	3.6	IC2. IDC1	0.002
2844	2.2	RDC1. RDC2	0.011
2080	2.1	IDC1. IC2	0.012
2253	3.7	RDC1. RDC2	0.014
720	2.5	IDC1. IDC2	0.014
805	3.8	IDC2	0.019
2131	3.4	IDC1	0.020
2854	1.8	RC1. RDC1	0.027
2002	2.5	IDC2	0.028
2822	2.3	RC1. RDC1. RC2T15	0.028
3935	1.9	IC2. IDC2	0.034
3969	2.3	IC1. IDC2	0.050

3.3 Proteins identification

A total of 48 protein spots were excised from gels, trypsinolyzed and subjected to MALDI-TOF-TOF tandem mass spectrometry. Mass spectra were compared to two custom databases, ie. a fish ESTs- and a *P. flesus* ESTs- databases with the PEAKS software. In all, we could identify 18 unique proteins (Table 4).

Tableau 4: Identification of differentially accumulated proteins1

Spot n°	Identification	Species	NCBI accession n°	Sequenced peptides	Coverage (%)	PEAKS Score (%)
3860	Serine hydroxymethyltransferase (SHMT)	<i>Platichthys flesus</i>	gi 78227067	VNPETGYIDYDR YYGGTEHVDELER YSEGYPGQR FGSPALTSR	15.36	87.1
1928	Glutathione peroxidase (GPx)	<i>Platichthys flesus</i>	gi 78227841	DYTQMNELHQR DYTQM(+15)NELHQR LPFPTDEPTALLNDPR	11.46	41.9
1961	SHMT	<i>Sparus aurata</i>	gi 207959479	YSEGYPGQR YYGGTEHVDELER VNPETGYIDYDR	15.45	67.2
3911	Beta 2-globin	<i>Platichthys flesus</i>	gi 260099289	FLSVVVSALGR IDVGEIGPQALTR GVYSALSTM(15)HSEK HFSTFGDSTTAAILGSEK	42.97	98.8
3964	phosphoglycerate mutase 1a	<i>Ictalurus punctatus</i>	gi 56171915	VLIAAHGNSLR ALPFWNDEIAPQIK NLKPVKPMQFLGDEETVR NLKPVKPM(15)QFLGDEETVR	38.05	95.9
3859	nucleoside diphosphate kinase B	<i>Platichthys flesus</i>	gi 84117756	DTPFYAGLC(57)K FIQASEDHMK TFIAVKPDGVQR MMLGETNPADSKPGSIR M(15)MLGETNPADSKPGSIR YMSSGPVFAMVWEGQSIVK YM(15)SSGPVFAMVWEGQSIVK	43.50	98.9
2131	malate dehydrogenase	<i>Lates calcifer</i>	gi 164358710	GDFISTVQLR VVDGLSINDFSR MDATAAELVEER	22.08	97.9
3981	malate dehydrogenase 1	<i>Danio rerio</i>	gi 102905885	VVDGLSINDFSR	23.68	60.8
2293	Heat shock cognate 70 kDa	<i>Salmo salar</i>	gi 223570517	AQVHDIVLVGGSTR TVNNAVVTVPAYFNDSQR FEELNADLFR STAGDTHLGGEDFDNR GETKSFYPEEISSMVL VK TTPSYVAFTDSER AVGIPFQFK VELAAGQQYSEDFGK	26.33	98.8
3935	glutathione S-transferase theta 1b	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	gi 90600775	AVGIPFQFK VELAAGQQYSEDFGK	9.16	82.5

Annexe 1 : Réponses du flet en conditions expérimentales - approche 2D

Spot n°	Identification	Species	NCBI accession n°	Sequenced peptides	Coverage (%)	PEAKS Score (%)
3874	ATP synthase beta-subunit	<i>Ictalurus punctatus</i>	gi 204214387	GQKVLDTGAPIR IMNVIGEPIDER AHGGYSVFAGVGER VALVYGQMNEPPGAR VALVYGQM(15)NEPPGAR LVLEVAQHLGESTVR AIAELGIYPVDPDPLDSTSR	28.45	98.7
3956	Adenosylhomocysteinase B (SAHHb)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	gi 402742735	HIIVLAEGR INIKPQVDR	16.82	77.1
3974	catalase	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	gi 52354832	AVHPDYGNR TFYTQVLNEEER LFSYPDTHR LGANYLQIPVNC(57)PFR GAGAFGYLEVTHDITR	8.54	98.2
3969	Catalase	<i>Xiphophorus maculatus</i>	gi 192821533	AVHPDYGNR LFSYPDTHR LGANYLQIPVNC(57)PFR (GAGAFGYLEVTHDITR	12.25	97.3
3948	MDH	<i>Gobiocypris rarus</i>	gi 120438805	VFGVTTLDIVR DDLFTNATIVATLADAC(57)AR	14.72	68.2
3944	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)	<i>Oreochromis niloticus</i>	gi 253934731	VPTPNSVVDLTVR (LVSWYDNEFAYSQR	13.29	60.8
3943	copper/zinc superoxide dismutase (Cu/ZnSOD)	<i>Platichthys flesus</i>	gi 78230468	NHAGPTDADR GAGETSGTVHFEQESDSAPVK	20.17	79.7
3912	Betaine homocysteine methyl transferase (BHMT)	<i>Platichthys flesus</i>	CF379280	AGPWTPEATVTHPEAVR	17	35*

1Proteins were excised from 2-DE gels, trypsinolyzed, and the resulting peptides were sequenced by using MALDI TOF-TOF mass spectrometry. Spectra analysis was performed using the PEAKS Software. The score and the coverage were those given by the PEAKS software, using the search parameters described in the Materials and methods section. * BHMT was identified with MASCOT software and the score given is the MASCOT score.

This corresponded to an identification ratio of 37.5%, which is quite similar to those commonly described for this kind of non-model fish, and even to those we previously obtained for *P. flesus* (Galland et al., 2012). Some proteins, such as the catalase, the Serine Hydroxymethyl Transferase (SHMT) or the MDH could be identified several times in different spots. These spots could correspond to different isoforms, or to post-translationally modified forms of a single protein.

Three of these proteins could be linked to a part of the metabolism of methionine, ie the betaine homocysteine methyl transferase (BHMT, spot 3912), and two SHMTs (noted SHMT1 and 2, corresponding to spot 3860 and 1961, respectively), 4 on oxidative metabolism, ie, 2 catalases (noted CAT 1 and 2, corresponding to spots 3969 and 3974, respectively), the glutathione peroxidase (GPx, spot 1928) and the glutathione-S-transferase (GST, spot 3935), and 3 to the energetic metabolism, ie., an enolase (ENO, spot 2472), a nucleotide diphosphate kinase (NDPK, spot 3859), and 2 malate dehydrogenases (MDH1 and 2, spots 3981 and 2131). We also could identify the Heat Shock Cognate 70 kDa (HSC70, spot 2293) and the beta-globin (BG, spot 3911). Excepted the enolase, that revealed down-accumulated in fish subjected to the higher concentration of the PAH/PCB mixture (C2), all the other protein spots appeared over-accumulated in at least one condition. Most were accumulated in fish exposed to C2 at the T29 sampling time. this is the case for NDPK, beta globin, MDH, SHMT1, SHMT2, BHMT, GPx and GST. Interestingly, GST was still over-abundant in the same fish at T43 (after the 14-days recovery period). The two identified catalases were found significantly deregulated in fish subjected to C1. One of these catalases was also accumulated during decontamination (T43C2).

HSC70 was the lone protein identified in T14C2 samples. The corresponding spot was included in a stretch of 6 spots displaying the same molecular weight, regularly disposed on the same horizontal line on the gel. All of these spots most probably correspond to different phosphorylation states of the protein. Interestingly, several of these spots (ie., 2293, 2335, 2361 and 2495), were found less abundant in T0 samples.

3.4 Construction of a thematic heatmap

As part of a previous proteomic study, we could map several proteins belonging to the 3 main functional categories identified in this paper, ie, energetic metabolism proteins, oxidative stress proteins and methionine cycle. As an attempt to further understand the

potential role of the corresponding metabolisms in fish adaptation to chemicals, we also analysed the accumulation profiles of these proteins (Fig. 4) and constructed a thematic heatmap using the PermutMatrix software.

3.5 Expression of the BHMT gene

We found that BHMT, as well as several proteins implied in related metabolism (see thereafter), was accumulated in the livers of contaminated fish (condition T29C2). As BHMT was often pointed out as deregulated in fish ecotoxicological studies, we measured by RT q-PCR the expression of the corresponding gene.

Fig. 5 shows the statistical analysis relative to our measurements of expression of the BHMT gene, in each of the conditions assayed in this study. We observed that the BHMT expression was significantly enhanced in both the C2 treated fish after 29 days of contamination, and in the same fish after the 14 subsequent depuration days. No other condition gave statistically remarkable results. However, it should be noted that for each sampling time, we could observe a trend suggesting that the BHMT gene would be up-regulated in PCB/PAH treated fish, at all sampling times and in a dose dependent manner.

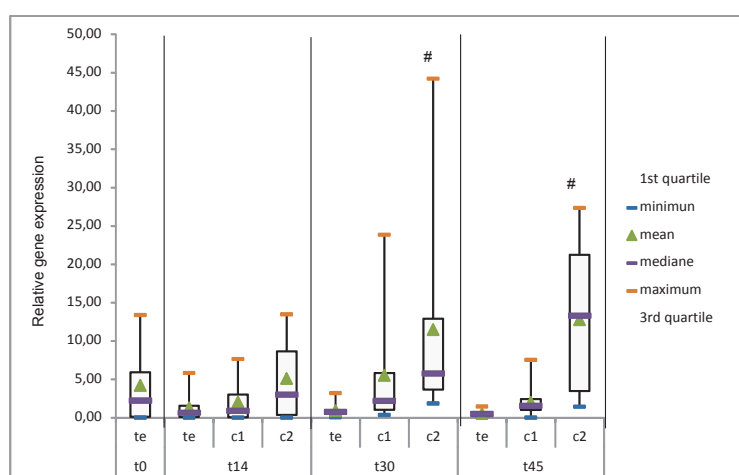


Figure 5: Level of gene expression of BHMT compare to reference gene (18S) during the experiment in control (Te) and contaminated conditions (C1 and C2) after 14, 29 and 43 days. #: $p < 0.05$

3.6 COMET Assays

Although cellular oxidative stress and DNA alterations is often considered as a toxic component of chemical contamination by PCBs/PAHs. We analyzed DNA damages in red blood cells by COMET assay. The results presented in Fig. 6 showed that DNA damages in red blood cells of C2 treated fish after 9 days of contamination were significantly higher than in other conditions. Interestingly, as for BHMT gene expression, our results suggested a dose dependant response at the 14- and 29-days sampling times. Indeed, DNA damages seemed higher in C1 treated cells as compared to the corresponding controls, and higher in C2 treated cells compared to the C1 ones.

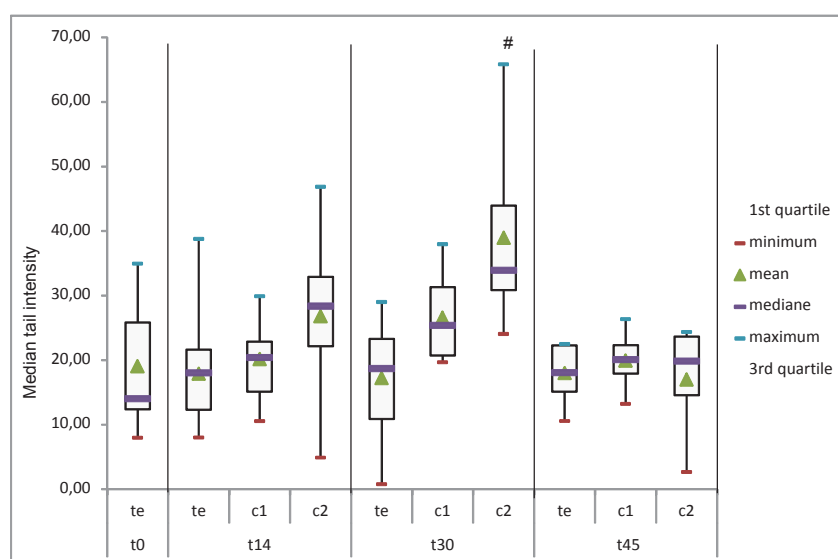


Figure 6: Primary damage levels expressed as median tail intensity by the Comet assay during the experiment in control (Te) and contaminated (C1 and C2) after 14, 29, and 43 days. #: $p < 0.05$

4 DISCUSSION

4.1 On the classical detoxication mechanisms

Liver is known as the main center of xenobiotics detoxification in animals. Detoxification processes are commonly divided in two sequential steps referred to as Phase I and Phase II systems. One of the most common Phase I modifications is oxidation catalyzed by cytochrome P-450 enzymes, that allow incorporation of an atom of oxygen into nonactivated hydrocarbons, which can result in either the introduction of hydroxyl groups or N-, O- and S-dealkylation of substrates (Guengerich, 2001). These modifications can neutralize some xenobiotic compounds, or at least render them susceptible to phase 2 conjugation reactions.

Cytochrome P450 are known to be positively deregulated in response to xenobiotics, and are commonly used as biomarkers of exposure to xenobiotics. It is noteworthy that the CYP4501A expression was measured in fish belonging to this experiment, revealing a high induction in the condition T29C2 and T43C2 (data not shown). This induction was not observable in our proteomic study at the protein level. However, it should be noted that to our knowledge, if they could be evidenced by Laemmli 1-D gels (Kanaeva et al., 2005), no (eco)-toxicological 2-D proteomic approach did evidence to date cytochrome P450 as xenobiotics induced proteins. This is most probably due to technical considerations, as classical 2-D based proteomic protocols for proteins extraction and solubilisation are optimized for soluble proteins (and not for such hydrophobic proteins).

In phase II detoxication systems, activated xenobiotic metabolites are conjugated with compounds such as glutathione (GSH), glycine, sulfate, or glucuronic acid. These reactions are catalysed by a large group of broad-specificity transferases. One of the most important of these groups are the glutathione S-transferases (GSTs), that are commonly found induced, at both the gene expression- and protein- levels, in organisms subjected to pollutants (Napieraska et al., 2006; Kerambrun et al., 2011 Dabas et al., 2012). The addition of glutathione detoxifies reactive electrophiles and leads to more polar metabolites, thus facilitating their transport and excretion. In our study, we could identify GST, and showed its accumulation in livers of fish subjected to the higher PCBs/PAHs concentration (C2), at the time points T29 and T43 (showing that its high level remains stable during the depuration period).

In addition with its crucial role in phase II detoxication processes, it has to be noted that glutathione (i) could be considered as an endpoint product of the methionine cycle (Fig. 7), and (ii) plays a major role in the response to oxidative stress.

4.2 A role for the methionine cycle in xenobiotics detoxication?

Glutathione is an enzymatically assembled tripeptide, ie γ -glutamyl-cysteinyl-glycine. As a consequence, one could hypothesize that the availability of its precursors does influence its synthesis. Interestingly, three protein spots highly accumulated in the livers of fish (accumulation factors from 2.3 to 2.8) subjected to C2 at 29 were identified as the BHMT and two SHMTs, both belonging to the demethylation pathway of betaine that leads to the production of glycine and serine. This cycle, and the images of the corresponding spots, were replaced on Figure 7, together with others from this study (GPx, GST) or others previously

identified in our Laboratory (SAHH). It should be noted that the BHMT is also part of the methionine cycle, a metabolism in which methionine is converted to S-adenosylmethionine, which serves as a methylating agent in many cellular methylation reactions (catalyzed by methyltransferases). Examples of methyltransferases that use this compound as the methyl donor are found in the synthesis of epinephrine, creatine, phosphatidyl choline or in the methylation of nucleic acids (ADN, ARN) and proteins. S-adenosylhomocysteine produced in these methylation reactions is hydrolyzed to adenosine and homocysteine, which can be remethylated to methionine by either methionine synthase (which uses 5-methyltetrahydrofolate) or by BHMT, which plays a key role in the modulation of this metabolism (Ueland et al., 2005).

By its central role in cellular methylation processes, the methionine cycle is pivotal in cell functioning. However, it also provides skeletons for biosynthesis of other molecules. In particular, homocysteine sits as a metabolic crossroad, as it may either be remethylated to methionine or catabolised into cysteine (through a 2-steps pathway commonly called the transsulfuration pathway). As a consequence, the above metabolic pathways also serve to provide precursors of glutathione synthesis, ie., glycine and cysteine.

Considering that we observed the concomitant accumulation of two enzymes using glutathione as substrate, ie GST and GPx, we could infer that the increase of the methionine cycle and betaine demethylation pathway should respond to the increased demand in glutathione.

4.3 What's about the redox status?

In addition with its role in phase II xenobiotic detoxification process, glutathione is one of the most important antioxidant in cells. Indeed, this tripeptide contains a cysteinyl residue that may be oxidized by hydrogen peroxide to glutathione disulfide (GS-SG) by the selenium-containing enzyme, glutathione peroxidase, and also by other enzymes that may use lipid peroxides rather than hydrogen peroxide as the oxidant. Thus, glutathione can detoxify both soluble and organic peroxides. Glutathione disulfide is subsequently reduced by glutathione reductase, using NADPH as the reductant. The fact that glutathione peroxidase appeared significantly accumulated in the livers of C2 treated fish suggested that they were subject to oxidative stress.

More generally, several lines of evidence showed that the exposure to xenobiotics leads to the intracellular accumulation of reactive oxygen species such as superoxide, hydrogen peroxide or free radicals (Winston et al., 1996). This accumulation is commonly attributed to a failure in the balance between oxidant generation and antioxidant processes, including protective enzymes (eg, catalase, SOD) and repair of oxidative damages. In our study, the COMET assays clearly demonstrated that the fish subjected to the higher pollutants concentration were subject to DNA degradation, which is associated with oxidative stress (Marabini et al., 2011). Interestingly, two catalases appeared significantly increased in C1 treated fish. We examined the accumulation profiles of both proteins, and that of the SOD (which spot was previously identified in Galland et al., 2012), all along the experiment (Fig. 8). The two catalases appeared highly abundant in the livers of T29C1-treated fish, but were not significantly altered in T29C2- ones. By contrast, we did not show any significant increase of SOD in any of the assayed conditions even if examination of the relative abundances of this protein suggest that it could accumulate in some individuals (Fig. 8). In all, our results suggest that the exposure to PAHs/PCBs triggers oxidative stress in fish, that cannot be compensated by anti-oxidant enzymes such as catalases, SOD, or GPx.

in both an in vivo and in vitro model. they showed that fish mobilized glucose, while hepatocytes displayed impaired mitochondrial respiration upon exposure to PCBs 126 and 77 (that may mask the increase of the whole animal energy demand).

Several recent proteomic studies showed that metabolic enzymes were modulated by PCBs exposure. For example, Berg et al. (2011) showed that several proteins implied in the energetic metabolism (ie, enolase, FBP aldolase, MDH and creatine kinase) accumulated in the brain of atlantic cod upon exposure to PCB153. However, it should be noted that other proteomics studies suggested an inverse trend. For example, Leroy et al. (2010) showed that GAPDH and enolase were down accumulated in PCBs- (PCB169 and 177) treated *Gammarus pulex*, and Costa et al. (2012) showed that enolases 1 and 3, and PGM were also decreased in the liver proteome of *Solea senegalensis* subjected to a PAH/PCB mix. It is likely that in fact, the different compounds have different effects on the animal metabolism, so as it should be difficult to generalize. For example, Penttinen and Kukkonen (1998) showed, using a direct calorimetric method, that 4 different aromatic toxic compounds structurally related to PCBs, differentially affected the energetic metabolism of invertebrates, ie DNP, PCP and TCP (all being phenolic compounds) increased it, while TCB (trichloro benzene) displayed a negative effect.

In our study, we showed that the relative abundances of several proteins related to energetic metabolism was modulated by pollutants exposure. Indeed, enolase appeared significantly decreased in T14C2 samples, whereas MDH2, NDPK, and beta-globin revealed induced in T29C2 samples. In a previous study, we could identify and map on 2D gels several other proteins associated to the energetic metabolism, and we examined their relative amounts. Figure 8 shows that the glycolytic enzymes GAPDH, PGM and ENO seemed decreased in T29C2 samples. By contrast, the 4 citric acid cycle enzymes we could map on gels appeared increased in the same conditions. Combined with the accumulation profile of beta-globin, which suggests that the oxygen demand of stressed fish would be increased, our results suggest that the xenobiotic-stressed fish should favor an oxidative metabolism during exposure rather than a fermentative one. During recovery, GAPDH and ENO seem accumulated, as well as 2 MDHs and NDPK.

Obviously this kind of indirect approach of metabolism is still limited in our case by the fact that we did not map all of the energy metabolism enzymes, their isoforms, nor all of the possible post-translational modifications they should carry and that are known to modulate

their activities. Therefore, we think it should be interesting to validate our interpretations by using a true metabolomic experimental strategy.

5 CONCLUSION

In conclusion, the current study examined the proteome modifications in the liver of *P. flesus* subjected to an environmentally relevant chemical contamination by a PAH/PCB mixture. The most striking result was the observed accumulation of several proteins of the betaine demethylation pathway, which is related to the methionine cycle. This accumulation most probably aims at feeding intermediates to the glutathione synthesis pathway, but could reflect a potential role for methylation processes in the adaptation of fish to xenobiotics. Further studies will analyze the determinism of accumulation of these proteins, especially that of BHMT, which is often found deregulated in fish subjected to xenobiotic, and their potential use as molecular biomarkers to evaluate environmental chemical contaminations.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mehdi Taiya (MS platform, UBO) for his help in protein identification. We also thank Carole Capitaine (LEMAR, UBO) for her technical support and Claire Quentel and Francois Lamour (ANSES, Plouzane) for the animal care and the precious advises. This work is part of-, and is funded by- the European Interreg IVa France (Channel) / England program, and the French ONEMA (office national de l'eau et des milieux aquatiques).

REFERENCES

- Abarnou, A. & J. Duchemin, 2008. Distribution et devenir de contaminants persistants dans les écosystèmes littoraux. Comparaison Manche ouest-Manche est Rapport final étude AESN-IFREMER
- Able, K. W., 2005. A re-examination of fish estuarine dependence: Evidence for connectivity between estuarine and ocean habitats. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 64(1):5-17 doi:10.1016/j.ecss.2005.02.002.
- Amara, R., J. Selleslagh, G. Billon & C. Minier, 2009. Growth and condition of 0-group European flounder, *Platichthys flesus* as indicator of estuarine habitat quality. *Hydrobiologia* 627(1):87-98.
- Arkoosh, M. R., E. Clemons, P. Huffman & A. N. Kagley, 2001. Increased susceptibility of juvenile Chinook salmon to vibriosis after exposure to chlorinated and

aromatic compounds found in contaminated urban estuaries. *Journal of Aquatic Animal Health* 13(3):257-268 doi:10.1577/1548-8667(2001)013<0257:isojcs>2.0.co;2.

Bains, O. S. & C. J. Kennedy, 2004. Energetic costs of pyrene metabolism in isolated hepatocytes of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic toxicology* 67(3):217-226 doi:10.1016/j.aquatox.2004.01.008.

Berg, K., P. Puntervoll, J. Klungsøyr & A. Goksøyr, 2011. Brain proteome alterations of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to PCB 153. *Aquatic toxicology* 105(3-4):206-217 doi:10.1016/j.aquatox.2011.06.010.

Blanchard, M., M. J. Teil, A. M. Carru, D. Ollivon, B. Garban, A. Chesterikoff & M. Chevreuil, 1999. PCB and PAH Impacts on Cytochrome P-450-dependent oxidases in Roach (*rutilus rutilus*) from the Seine River (France).

Bodiguel, X., V. Loizeau, A.-M. Le Guellec, F. Roupsard, X. Philippon & C. Mellon-Duval, 2009. Influence of sex, maturity and reproduction on PCB and p,p' DDE concentrations and repartitions in the European hake (*Merluccius merluccius*, L.) from the Gulf of Lions (NW Mediterranean). *Science of the Total Environment* 408(2):304-311 doi:10.1016/j.scitotenv.2009.10.004.

Bohne-Kjersem, A., A. Skadsheim, A. Goksøyr & B. E. Grøsvik, 2009. Candidate biomarker discovery in plasma of juvenile cod (*Gadus morhua*) exposed to crude North Sea oil, alkyl phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Marine environmental research* 68(5):268-277 doi:10.1016/j.marenvres.2009.06.016.

Bravo, C. F., L. R. Curtis, M. S. Myers, J. P. Meador, L. L. Johnson, J. Buzitis, T. K. Collier, J. D. Morrow, C. A. Laetz, F. J. Loge & M. R. Arkoosh, 2011. BIOMARKER RESPONSES AND DISEASE SUSCEPTIBILITY IN JUVENILE RAINBOW TROUT *ONCORHYNCHUS MYKISS* FED A HIGH MOLECULAR WEIGHT PAH MIXTURE. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30(3):704-714 doi:10.1002/etc.439.

Budin-Verneuil, A., V. Pichereau, V. Auffray, D. Ehrlich & E. Maguin, 2007. Proteome phenotyping of acid stress-resistant mutants of *Lactococcus lactis* MG1363. *Proteomics* 7(12):2038-2046 doi:10.1002/pmic.200600773.

Bundy, J. G., M. P. Davey & M. R. Viant, 2009. Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. *Metabolomics* 5(1):3-21 doi:10.1007/s11306-008-0152-0.

Cachot, J., O. Geffard, S. Augagneur, S. Lacroix, K. Le Menach, L. Peluhet, J. Couteau, X. Denier, M. H. Devier, D. Pottier & H. Budzinski, 2006. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquat Toxicol* 79(3):257-67 doi:10.1016/j.aquatox.2006.06.014.

Caraux, G. & S. Pinloche, 2005. PermutMatrix: a graphical environment to arrange gene expression profiles in optimal linear order. *Bioinformatics* 21(7):1280-1281 doi:10.1093/bioinformatics/bti141.

Celander, M. C., 2011. Cocktail effects on biomarker responses in fish. *Aquat Toxicol* 105(3-4 Suppl):72-7 doi:10.1016/j.aquatox.2011.06.002.

Costa, P. M., E. Chicano-Galvez, S. Caeiro, J. Lobo, M. Martins, A. M. Ferreira, M. Caetano, C. Vale, J. Alhama-Carmona, J. Lopez-Barea, T. A. DelValls & M. H. Costa, 2012. Hepatic proteome changes in *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: a laboratory and in situ survey. *Ecotoxicology* 21(4):1194-207 doi:10.1007/s10646-012-0874-7.

Costa, P. M., E. Chicano-Galvez, J. Lopez Barea, T. A. DelValls & M. H. Costa, 2010. Alterations to proteome and tissue recovery responses in fish liver caused by a short-term combination treatment with cadmium and benzo[a]pyrene. *Environ Pollut* 158(10):3338-46 doi:10.1016/j.envpol.2010.07.030.

Courrat, A., J. Lobry, D. Nicolas, P. Laffargue, R. Amara, M. Lepage, M. Girardin & O. Le Pape, 2009. Anthropogenic disturbance on nursery function of estuarine areas for marine species. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 81(2):179-190.

Dabas, A., N. S. Nagpure, R. Kumar, B. Kushwaha, P. Kumar & W. S. Lakra, 2012. Assessment of tissue-specific effect of cadmium on antioxidant defense system and lipid peroxidation in freshwater murrel, *Channa punctatus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 38(2):469-482 doi:10.1007/s10695-011-9527-7.

Dando, P., 2011. Site fidelity, homing and spawning migrations of flounder *Platichthys flesus* in the Tamar estuary, South West England. *Marine Ecology Progress Series* 430:183-196.

Evrard, E., A. Devaux, S. Bony, T. Burgeot, R. Riso, H. Budzinski, M. Le Du, L. Quiniou & J. Laroche, 2010. Responses of the European flounder *Platichthys flesus* to the chemical stress in estuaries: load of contaminants, gene expression, cellular impact and growth rate. *Biomarkers* 15(2):111-127 doi:10.3109/13547500903315598.

Frenzilli, G., M. Nigro & B. P. Lyons, 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* 681(1):80-92 doi:10.1016/j.mrrev.2008.03.001.

Galland, C., C. Dupuy, C. Capitaine, M. Auffret, L. Quiniou, J. Laroche & V. Pichereau, 2012. Comparisons of liver proteomes in the European flounder *Platichthys flesus* from three contrasted estuaries. *Journal of Sea Research* doi:10.1016/j.seares.2012.05.009.

Guengerich, F. P., 2001. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical Research in Toxicology* 14(6):611-650 doi:10.1021/tx0002583.

Hemmer-Hansen, J., E. E. G. Nielsen, P. Groenkejaer & V. Loeschcke, 2007. Evolutionary mechanisms shaping the genetic population structure of marine fish; lessons from the European flounder (*Platichthys flesus* L.). *Molecular Ecology* 16(15):3104-3118.

Jaouen-Madoulet, A., A. Abarnou, A. M. Le Guellec, V. Loizeau & F. Leboulenger, 2000. Validation of an analytical procedure for polychlorinated biphenyls, coplanar polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples. *J Chromatogr A* 886(1-2):153-173 doi:10.1016/S0021-9673(00)00422-2.

Jha, A. N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23(3):207-221 doi:10.1093/mutage/gen014.

Kanaeva, I. P., N. A. Petushkova, A. V. Lisitsa, P. G. Lokhov, V. G. Zgoda, Karuzina, II & A. I. Archakov, 2005. Proteomic and biochemical analysis of the mouse liver microsomes. *Toxicology in Vitro* 19(6):805-812 doi:10.1016/j.tiv.2005.03.016.

Kerambrun, E., W. Sanchez, F. Henry & R. Amara, 2011. Are biochemical biomarker responses related to physiological performance of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) caged in a polluted harbour? *Comparative biochemistry and physiology Toxicology & pharmacology : CBP* 154(3):187-95 doi:10.1016/j.cbpc.2011.05.006.

Larsen, P. F., E. E. Nielsen, T. D. Williams, J. Hemmer-Hansen, J. K. Chipman, M. Kruhoffer, P. Gronkjaer, S. G. George, L. Dyrskjot & V. Loeschcke, 2007. Adaptive differences in gene expression in European flounder (*Platichthys flesus*). *Molecular Ecology* 16(22):4674-4683 doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03530.x.

Leaver, M. J., A. Diab, E. Boukouvala, T. D. Williams, J. K. Chipman, C. F. Moffat, C. D. Robinson & S. G. George, 2010. Hepatic gene expression in flounder chronically exposed to multiply polluted estuarine sediment: Absence of classical exposure 'biomarker' signals and induction of inflammatory, innate immune and apoptotic pathways. *Aquat Toxicol* 96(3):234-45 doi:10.1016/j.aquatox.2009.10.025.

Leroy, D., E. Haubruge, E. De Pauw, J. P. Thome & F. Francis, 2010. Development of ecotoxicoproteomics on the freshwater amphipod *Gammarus pulex*: identification of PCB biomarkers in glycolysis and glutamate pathways. *Ecotoxicol Environ Saf* 73(3):343-52 doi:10.1016/j.ecoenv.2009.11.006.

Loizeau, V., A. Abarnou, P. Cugier, A. Jaouen-Madoulet, A.-M. Leguellec & A. Menesquen, 2001. A model of PCB bioaccumulation in the Sea Bass Food Web from the Seine Estuary (Eastern English Channel). *Marine pollution bulletin* 43(7):242-255.

Lyons, B. P., J. E. Thain, G. D. Stentiford, K. Hylland, I. M. Davies & A. D. Vethaak, 2010. Using biological effects tools to define Good Environmental Status under the European Union Marine Strategy Framework Directive. *Marine pollution bulletin* 60(10):1647-1651 doi:10.1016/j.marpolbul.2010.06.005.

Marabini, L., R. Calo & S. Fucile, 2011. Genotoxic effects of polychlorinated biphenyls (PCB 153, 138, 101, 118) in a fish cell line (RTG-2). *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 25(5):1045-52 doi:10.1016/j.tiv.2011.04.004.

Marchand, J., E. Evrard, B. Guinand, J. Cachot, L. Quiniou & J. Laroche, 2010. Genetic polymorphism and its potential relation to environmental stress in five populations of the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic coast. *Marine environmental research* 70(2):201-209 doi:10.1016/j.marenvres.2010.05.002.

Motelay-Massei, A., D. Ollivon, B. Garban, M. J. Teil, M. Blanchard & M. Chevreuil, 2004. Distribution and spatial trends of PAHs and PCBs in soils in the Seine River basin, France. *Chemosphere* 55(4):555-65 doi:10.1016/j.chemosphere.2003.11.054.

Napierska, D., J. Kopecka, M. Podolska & J. Pempkowiak, 2006. Hepatic glutathione S-transferase activity in flounder collected from contaminated and reference sites along the Polish coast. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65(3):355-363 doi:10.1016/j.ecoenv.2005.07.022.

Nault, R., S. Al-Hameedi & T. W. Moon, 2012. Effects of polychlorinated biphenyls on whole animal energy mobilization and hepatic cellular respiration in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Chemosphere* 87(9):1057-1062 doi:10.1016/j.chemosphere.2012.02.012.

Oliveira, M., M. Pacheco & M. A. Santos, 2011. Fish thyroidal and stress responses in contamination monitoring—An integrated biomarker approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(5):1265-1270 doi:10.1016/j.ecoenv.2011.03.001.

Pacheco, M. & M. A. Santos, 2001. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicol Environ Saf* 49(1):64-75 doi:10.1006/eesa.2000.2025.

Pankhurst, N. W., 2011. The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective. General and comparative endocrinology 170(2):265-75 doi:10.1016/j.ygcen.2010.07.017.

Penttinen, O. P. & J. Kukkonen, 1998. Chemical stress and metabolic rate in aquatic invertebrates: Threshold, dose-response relationships, and mode of toxic action. Environmental Toxicology and Chemistry 17(5):883-890 doi:10.1897/1551-5028(1998)017<0883:csamri>2.3.co;2.

Rowe, C. L., W. A. Hopkins, C. Zehnder & J. D. Congdon, 2001. Metabolic costs incurred by crayfish (*Procambarus acutus*) in a trace element-polluted habitat: further evidence of similar responses among diverse taxonomic groups. Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 129(3):275-283 doi:10.1016/s1532-0456(01)00204-6.

Samuelsson, L. M. & D. G. J. Larsson, 2008. Contributions from metabolomics to fish research. Molecular Biosystems 4(10):974-979 doi:10.1039/b804196b.

Sanchez, B. C., K. J. Ralston-Hooper, K. A. Kowalski, H. Dorota Inerowicz, J. Adamec & M. S. Sepulveda, 2009. Liver proteome response of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) exposed to several environmental contaminants: potential insights into biomarker development. Aquat Toxicol 95(1):52-9 doi:10.1016/j.aquatox.2009.08.002.

Schantz, M. M., B. J. Koster, S. A. Wise & P. R. Becker, 1993. DETERMINATION OF PCBS AND CHLORINATED HYDROCARBONS IN MARINE MAMMAL TISSUES. Science of the Total Environment 140:323-345.

Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice & E. L. Schneider, 1988. A SIMPLE TECHNIQUE FOR QUANTITATION OF LOW-LEVELS OF DNA DAMAGE IN INDIVIDUAL CELLS. Experimental Cell Research 175(1):184-191 doi:10.1016/0014-4827(88)90265-0.

Skerritt, D. J., 2010. A review of the European flounder *Platichthys flesus*-Biology, Life History and Trends in Population.

Takigami, H., G. Suzuki & S.-i. Sakai, 2010. Screening of dioxin-like compounds in bio-composts and their materials: chemical analysis and fractionation-directed evaluation of AhR ligand activities using an in vitro bioassay. Journal of Environmental Monitoring 12(11):2080-2087.

Talbot, C., 1993. Some aspects of the biology of feeding and growth in fish. Proceedings of the Nutrition Society 52(03):403-416.

Tierney, K. B., J. L. Williams, M. Gledhill, M. A. Sekela & C. J. Kennedy, 2011. ENVIRONMENTAL CONCENTRATIONS OF AGRICULTURAL-USE PESTICIDE MIXTURES EVOKE PRIMARY AND SECONDARY STRESS RESPONSES IN RAINBOW TROUT. Environmental Toxicology and Chemistry 30(11):2602-2607 doi:10.1002/etc.656.

Tomanek, L., 2011. Environmental Proteomics: Changes in the Proteome of Marine Organisms in Response to Environmental Stress, Pollutants, Infection, Symbiosis, and Development. Annual Review of Marine Science 3(1):373-399 doi:10.1146/annurev-marine-120709-142729.

tronczynski, J., C. Munsch & K. Moisan, 1999. Les polluants organiques qui laissent des traces: sources, transport. . vol Programme Scientifique Seine Aval, Fascicule 12, Ifremer, , 39.

Ueland, P. M., P. I. Holm & S. Hustad, 2005. Betaine: a key modulator of one-carbon metabolism and homocysteine status. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 43(10):1069-1075 doi:10.1515/cclm.2005.187.

Vasconcelos, R. P., P. Reis-Santos, M. J. Costa & H. N. Cabral, 2011. Connectivity between estuaries and marine environment: Integrating metrics to assess estuarine nursery function. *Ecological Indicators*.

Vieira, L. R., A. Sousa, M. F. Frasco, I. Lima, F. Morgado & L. Guilhermino, 2008. Acute effects of Benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *The Science of the total environment* 395(2-3):87-100 doi:10.1016/j.scitotenv.2008.01.052.

Wang, Z., H. Yang, A. Ramesh, L. J. Roberts II, L. Zhou, X. Lin, Y. Zhao & Z. Guo, 2009. Overexpression of Cu/Zn-superoxide dismutase and/or catalase accelerates benzo(a)pyrene detoxification by upregulation of the aryl hydrocarbon receptor in mouse endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine* 47(8):1221-1229 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.08.001.

Winston, G. W., M. N. Moore, M. A. Kirchin & C. Soverchia, 1996. Production of reactive oxygen species by hemocytes from the marine mussel, *Mytilus edulis*: Lysosomal localization and effect of xenobiotics. *Comp Biochem Physiol C-Pharmacol Toxicol Endocrinol* 113(2):221-229 doi:10.1016/0742-8413(95)02091-8.

Annexe 2 :

**Approche multimarqueurs sur le flet, *Platichthys
flesus*, dans La Manche**

Approche 2D



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Sea Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/seares

Comparisons of liver proteomes in the European flounder *Platichthys flesus* from three contrasted estuaries

Claire Galland, Célie Dupuy, Carole Capitaine, Michel Auffret, Louis Quiniou, Jean Laroche, Vianney Pichereau *

Université de Bretagne Occidentale, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, LEMAR UMR 6539 CNRS/UBO/IRD, Institut Universitaire Européen de la Mer, 29280 Plouzané, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 November 2011
Received in revised form 12 April 2012
Accepted 12 May 2012
Available online xxxx

Keywords:

Estuary
Platichthys flesus
Liver Proteomics
Pollution
Biomarker

ABSTRACT

Estuaries are important areas highly susceptible to anthropogenic degradations like pollution. Estuarine species have thus to cope with many types of constraints depending on the estuaries' characteristics. The European flounder *Platichthys flesus* is considered as a sentinel species for the monitoring of estuarine water quality. In this study, juvenile flounders (0+ group) were sampled from three contrasted Channel estuaries, i.e. the Seine, the Canche and the Tamar, and we characterized their liver proteomes by using a two-dimensional electrophoresis based proteomic approach.

We showed that 27 protein spots differentially accumulated between the 3 populations. Six of these proteins were identified by MALDI TOF–TOF mass spectrometry. Flounders from the Seine and from the Tamar, two highly polluted estuaries, displayed common differences, i.e. an increase of the energetic- and the glutathione-metabolism. The most accumulated protein in the Seine's samples (6.7-fold) was a Vitelline Membrane Outer layer protein 1 homolog, suggesting oogenesis deregulation in these juvenile (sexually immature) flounders. Future works applying this kind of proteomic approach on flounders experimentally exposed to conditions that mimic environmental constraints will help to better understand the significance of these environmental proteomic signatures.

   2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Estuaries are zones of connection between land and sea, that present a very high level of productivity, giving them a high ecosystemic value (Costanza et al., 1997; Courrat et al., 2009). These ecosystems receive freshwater derived from land drainage, often containing high levels of nutrients and organic material, and serve as nurseries for a number of marine organisms (Able, 2005; Vasconcelos et al., 2011). Estuaries are often located near towns and industries and are impacted by a range of human activities. They receive particles carried out within the drainage basin, including urban and industrial development as well as intensive agriculture. Thus, estuarine waters and sediments, that naturally encounter large variations of salinity, oxygen, and temperature, also accumulate xenobiotics such as heavy metals and organic contaminants, that degrade the overall quality of the remaining estuarine habitats for marine organisms (Courrat et al., 2009).

The European flounder, *Platichthys flesus*, is a catadromous fish species widely distributed from Norway to Portugal, spawning in winter in the mouth of the estuaries or at sea, displaying pelagic larvae, and living approximately two years in estuaries at the juvenile stage

(Dando, 2011). *P. flesus* displays a high capacity to adapt to changing environments characterized by reduced salinity, hypoxia and highly variable temperature (Evrard et al., 2010; Hemmer-Hansen et al., 2007; Larsen et al., 2007; Marchand et al., 2010). During the first month of settlement, juveniles are concentrated in low salinity habitats that are commonly described as nurseries for them. Juvenile flatfishes feed on benthic organisms and live in close association with the bottom sediments, where most of the chemicals introduced into aquatic environments by human activities accumulate. They are considered particularly sensitive to the effects of pollution and other types of habitat degradation (Skerritt, 2010), and as a consequence are considered as a valuable sentinel species often used to monitor estuarine water quality (Amara et al., 2009; Leaver et al., 2010; Lyons et al., 2010).

Several biological and biochemical parameters can be measured to assess the extent of environmental contamination (Amara et al., 2009; Lyons et al., 2010; Sarkar et al., 2006). Molecular biomarkers often consist in measuring DNA integrity, or the expression of candidate genes/proteins involved in detoxification such as cytochrome P4501A (CYP1A) or metallothionein, or proteins involved in metabolisms particularly sensitive to a given class of pollutants (e.g., acetylcholinesterase inhibition by neurotoxic agents).

As effectors of cellular mechanisms, receptors, and structure or signaling molecules, proteins are key molecules of the cell machinery and then, of the organisms' functioning. Proteomic tools allow the

* Corresponding author at: Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, LEMAR UMR 6539 CNRS/UBO/IRD, Institut Universitaire Européen de la Mer, Rue Dumont d'Urville, 29280 Plouzané, France. Tel.: +33 2 98 49 86 12; fax: +33 2 98 49 86 09.

E-mail address: vianney.pichereau@univ-brest.fr (V. Pichereau).

identification of proteins whose abundance changes as a result of environmental pressures, thus giving essential information on the actual physiology of organisms under adverse conditions (Tomanek, 2011). In this paper, we developed a global proteomic approach to compare the steady state levels of proteins in the livers of *P. flesus* naturally living in 3 estuaries located in the same geographic area (the Channel, Fig. 1), but contrasted at least in terms of chemical pollution patterns. Indeed, the Canche estuary is located in a natural protected area and could be considered as pristine (Amara et al., 2009), the Seine is one of the heaviest polluted river in France (PAHs, PCBs, metals), since it flows through high populated and industrial regions (Cachot et al., 2006; Schnitzler et al., 2011), and the Tamar is known to suffer from an old industrial pollution by heavy metals (Mighanetara et al., 2009).

2. Materials and methods

2.1. Animal sampling

Juveniles of *P. flesus* were collected in October 2009 (Tamar) and 2010 (Seine and Canche), in 3 European estuaries (Fig. 1): the Seine and the Canche (France), and the Tamar (England). At least 30 individuals were collected in each sampling site, all belonging to the 0+ group and sexually immature (macroscopically undifferentiated). Animals were killed just after capture by cervical dislocation. Their standard lengths (i.e. until the hypural joint) and weights were determined, the body condition index was calculated from these measures by using the formula $100 \times \text{weight} / (\text{standard length})^3$. Data concerning the animals studied in this paper are given in Table 1. The livers were taken up and immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C . Visual inspection did not reveal any trace of liver pathology or parasite infection. All experiments were performed according to the guidelines laid down by the French “Ministère de l’Agriculture” and the European Union council directive for the care and use of laboratory animals.

2.2. Proteomic analysis

2.2.1. Protein extraction

Frozen fish livers were homogenized in 1 ml of Tris–HCl buffer (100 mM, pH 6.8) containing 1% Protease Inhibitor Mix (GE Healthcare),

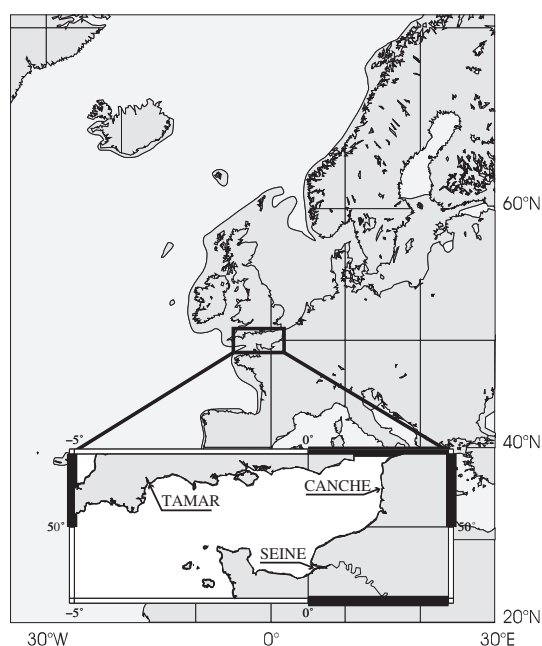


Fig. 1. Sampling locations of the European flounder used in this study.

Table 1

Morphometric measures of the 4 juvenile flounders used in the 2-DE experiments in each estuary. Results are presented in mean $\pm$ sd.

	The Tamar	The Seine	The Canche
Standard length (cm)	9.24 $\pm$ 0.91	12.58 $\pm$ 1.24	11.20 $\pm$ 1.33
Weight (g)	13.20 $\pm$ 3.95	37.36 $\pm$ 10.23	27.48 $\pm$ 8.05
Body condition index	1.49 $\pm$ 0.04	1.70 $\pm$ 0.08	1.72 $\pm$ 0.06

using a Precellys 24 system (Bertin Technologies). The supernatants were removed by centrifugation (12 000 g, 15 min, 4°C) and then incubated at ambient temperature for 30 min with 1% DNase mix (GE Healthcare). Total protein contents were determined using DC protein assay kit (biorad) in triplicate.

The volume corresponding to 500 μg of proteins was concentrated by TCA (10%, v/v) precipitation. Proteins were harvested by centrifugation (12 000 g, 10 min, 4°C), and the protein pellet was washed several times using a mix Tris–HCl (50 mM, pH 8)–acetone (20/80: vol/vol) containing traces of bromophenol blue (used here as a pH indicator), until neutralization. Supernatants were then discarded and protein pellets were dried in air, and then resuspended in 250 μl of Destreak Rehydration Solution (GE Healthcare) containing 1% IPG buffer pH 3–10 (GE Healthcare).

2.2.2. 2-Dimensional electrophoresis (2-DE) analysis

The proteins from at least 4 animals per estuary were individually loaded on linear pH 3–10 gradient IPG strips (13 cm, GE Healthcare). IEF was performed in an Ettan IPGphor III isoelectric focusing system (GE Healthcare), using the following protocol: a 15-min step at 250 V, a 2-h step 500 V, a 1-h gradient to 1000 V, a 2.5-h gradient to 8000 V, and a final 1.5-h step at 8000 V.

After the first dimension, strips were equilibrated 15 min in an equilibration solution (2% SDS, 6 M Urea, 50 mM Tris–HCl pH 8.8, 30% glycerol (v/v), BBP) containing DTT (1%), and then 15 min in the same solution containing iodoacetamide (260 mM). The second dimension was performed in 10–15% gradient polyacrylamide gel, as described in Budin-Verneuil et al. (2007). Proteins were revealed by incubating gels in 0.1% Coomassie blue staining solution (PhastGel Blue R-350 GE Healthcare) overnight, followed by washing in a methanol–acetic acid–water (30/7/63:v/v/v) solution.

2.2.3. Electrophoregrams analyses

Gels were scanned, and image- (spot detection and matching) and statistical-analyses were performed on 4 electrophoregrams per condition, by using the Prodigy SameSpot software (Nonlinear Dynamics). Spots displaying ANOVA P-values below 0.05 and fold accumulations above 2 (as given by SameSpot) were considered as highly significant, and were then selected for further analysis. However, we also kept some spots displaying a high accumulation factor, while displaying P-values above 0.05, and some spots displaying a factor slightly lower than 2 (see the Results and discussion section).

2.2.4. Mass spectrometric analysis

Selected spots were manually excised from 2-DE gels, and proteins were in-gel trypsinolyzed as described in Budin-Verneuil et al. (2007). Briefly, gel pieces were first washed in 50 mM ammonium bicarbonate (BICAM), and then dehydrated in 100% acetonitrile (ACN). Gel pieces were vacuum dried, and rehydrated with BICAM containing 0.5 μg trypsin (Promega), and incubated overnight at 37°C . Peptides were extracted from the gels by alternative washing with 50 mM BICAM and ACN, and with 5% formic acid and ACN. Between each step, the supernatants were pooled, and finally concentrated by evaporation using a speed vac (45°C). Samples were then resuspended in TFA (0.1% in water). Peptide solutions were mixed with the α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA, 10 mg/ml of a ACN/TFA/water (60/4/36:v/v/v) solution), and spotted on a polished steel MALDI target

using the dried droplet method. Peptides were then analyzed by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight tandem mass spectrometry (MALDI TOF–TOF) in positive ion reflector mode, using an Autoflex III (Bruker Daltonics) mass spectrometer. The flexControl software (v3.0, Bruker Daltonics) was programmed to acquire successively PMF spectra and MS/MS from the dominant peaks.

2.2.5. Proteins identification

Mass spectrometric data were analyzed by using both Mascot online (Matrix Science Ltd.), and the Peaks software (Bioinformatics Solutions) for MS/MS-based identification and de novo sequencing. The search parameters allowed for one trypsin miscleavage, oxidation of methionine, carbamidomethylation of cysteine and at least 100 ppm mass accuracy. We used three different databases; a NR protein database, and 2 EST databases, which contained ESTs of vertebrates or one containing only the *Platichthys* ESTs sequenced to date. The best results were obtained with the vertebrate EST database, using the Peaks software. All sequence tags obtained were submitted to homology searches using the Blast algorithm available at www.ncbi.nlm.nih.gov.

3. Results and discussion

Organisms commonly adapt to adverse environmental conditions by expressing selective sets of proteins allowing them to modify their metabolism, in an attempt to counteract the deleterious effects of stress on cellular functions. Conversely, we could consider that the proteins expressed by an organism in a given ecosystem reflect the environmental conditions it encounters. In this study, we first developed a global proteomic approach aiming at characterizing the proteins differentially expressed in the livers of *P. flesus* juveniles fished in three European estuaries known to be contrasted in the nature and extent of pollutions they harbor.

3.1. Characterization of proteins differentially expressed in juveniles of *P. flesus* from the Canche-, the Seine-, and the Tamar-estuaries

Proteins were separated by 2-DE gel electrophoresis. Fig. 2 shows representative Coomassie Blue stained gels obtained for each condition. At least 500 spots were detected in each gel. We performed quantitative comparison of electrophoregrams using the SameSpot software. We first considered spots as highly significant the spots displaying a P-value lower than 0.05 and/or a differential accumulation factor higher than 2, leading to the selection of 9 protein spots (Table 1). However, we considered 18 additional spots, among which 13 displayed high

accumulation factors, but P-values above 0.05, and 5 displayed factors slightly lower than 2 (between 1.6 and 1.9), but appeared clearly deregulated on gels and displayed low P-values. The high P-values observed for some spots resulted from discrepancies between replicate gels from individuals collected in the same estuary, thus most probably from the biological inter-individual variation. Some of these spots revealed to be highly increased in one individual, whereas absent or almost absent in other ones. For example, the abundance of spot T1 increased 2.6-fold (Fig. 4C, Table 1) in individuals from the Tamar, but was in fact observable only in two of the four electrophoregrams. As a consequence, its P-value was relatively high (i.e., 0.112). Two-dimensional electrophoresis should be considered as a very powerful approach to evaluate at a global scale, without a priori, the cell physiology of fishes in their ecosystem. However, in such an ecological study, working on natural ecosystems and natural *P. flesus* populations, this kind of proteomic approach (technically heavy) should be considered as exploratory. Thus, we decided not to exclude these spots from the study, considering that such accumulation patterns may reflect a particular metabolism in some individuals of a given estuary, even if it is not observable in all of the studied individuals.

Several spots revealed to be more abundant in one or two of the three estuaries (Figs. 2 and 3). For example, considering only the spots giving a P-value lower than 0.05, 2 spots were clearly more abundant in the Canche extracts (conversely, it could mean that these spots were down-accumulated both in the Tamar- and in the Seine-extracts, as compared to the Canche). In the same way, 3 spots revealed to be more abundant in fishes from the Seine and 4 in fishes from the Tamar, including 1 spot found to be accumulated in both conditions, as compared to fishes from the Canche.

Juveniles of *P. flesus* (0+) were all caught during autumn in three European estuaries located in the same hydroclimatic area (the Channel) that displays heavy currents (and thus a good oxygenation rate). The three estuaries are known to display strong differences in pollution nature and extent. Indeed, the Canche is often considered as a pristine estuary (Amara et al., 2009), whereas the Seine and the Tamar are highly polluted, by a heavy diffuse industrial and agricultural pollution (PAHs, PCBs, metals), and an old metal contamination from mine exploitation, respectively (Cachot et al., 2006; Dauvin, 2008; Durou et al., 2007; Mighanetara et al., 2009).

The differential protein spots could be considered as the proteomic signature of the environmental conditions encountered by *P. flesus* in the different estuaries. Considering the different pollutions described above, one could assume that the proteomic signatures of the three estuaries should in fact reflect their chemical signatures. In such a

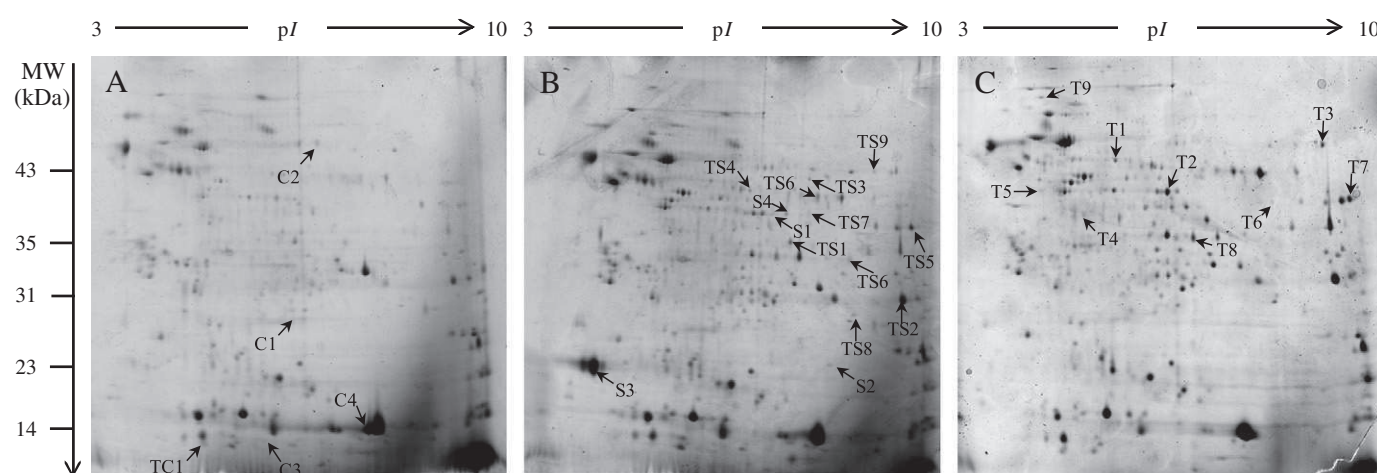


Fig. 2. Representative 2-DE gels of hepatic proteins in the flounder *Platichthys flesus* from 3 different estuaries. (A) the Canche, (B) the Seine, and (C) the Tamar. The protein spots differentially expressed in each estuary are labeled with numbers. The molecular weights (MW) and pI scales are indicated. Each gel is representative of four independent replicates.

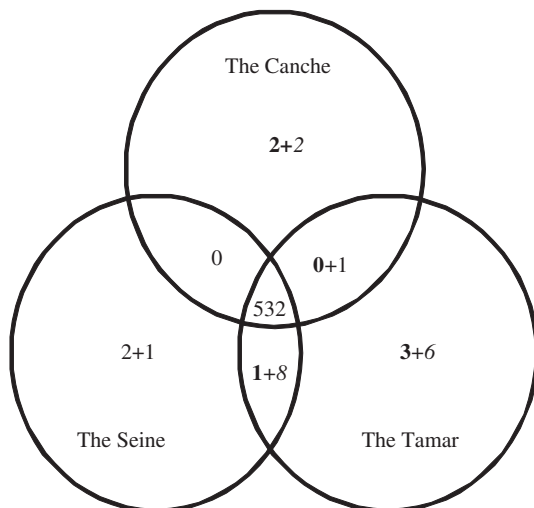


Fig. 3. Number of spots differentially accumulated in each estuary. Numbers in bold correspond to spots which level increased more than 2 times, with a P-value <0.05. Numbers in italic correspond to spots displaying high inter-individual differences (P-value >0.05) or accumulation factor <2.

hypothesis, the protein spots overrepresented in the livers of flounders from both the Seine- and the Tamar-estuaries (TS spots, Table 2) should then be related to the need of these fishes to adapt to environmental pollutions encountered in both ecosystems. Similarly, protein spots specifically found in liver proteomes of *P. flesus* from the Seine— (S spots) and the Tamar— (T) should be related to the adaptation to the specific pollutants found in these estuaries (i.e., PAHs/PCBs and metals, respectively). Conversely, the protein spots overrepresented in the Canche's extracts (C spots) should correspond to proteins particularly sensitive to pollutants.

However, it should be kept in mind that in such an ecological study (we work on wild populations, in natural environments), the liver proteome is not only impacted by the nature and extent of chemical contamination of estuaries but is also dependent upon many other confounding factors, such as natural life history traits, salinity variations, temperature, food availability, the type of sediments, ... To further characterize the proteomic signatures of the three estuaries in the flounder livers, it was necessary to identify the proteins contained in those specific spots.

3.2. Mass spectrometric identification of differentially expressed proteins

To further understand the specific physiology of fishes in each estuary, the protein spots were subjected to trypsin degradation and analyzed by MALDI TOF–TOF mass spectrometry. We could obtain MS–MS data for most of them, compare these data to EST databases (vertebrate- and *P. flesus*-databases) using the PEAKS software, and finally succeed in identifying 6 of them (Table 2).

3 spots deregulated in *P. flesus* protein extracts from both the Seine and the Tamar could be identified. The TS2 spot was identified as a Glutathione S-transferase (GST) belonging to the rho-class, a class described only so far in teleost fishes (Konishi et al., 2005). GSTs are known to participate in the defense of organisms against oxidative stress, and play a major role in the detoxification of many xenobiotic compounds. Indeed, these enzymes catalyze the conjugation of the tripeptide glutathione to electrophilic parts of a wide range of xenobiotic compounds (Salinas and Wong, 1999), producing compounds that are generally less reactive and more soluble (phase II metabolism, Martinez-Lara et al., 2002). The activity of GST is often used as an indicator in experimental- and environmental-ecotoxicological studies (Fonseca et al., 2011; Kerambrun et al., 2011). In several estuarine fishes, including flounder, the GST activity was shown to correlate

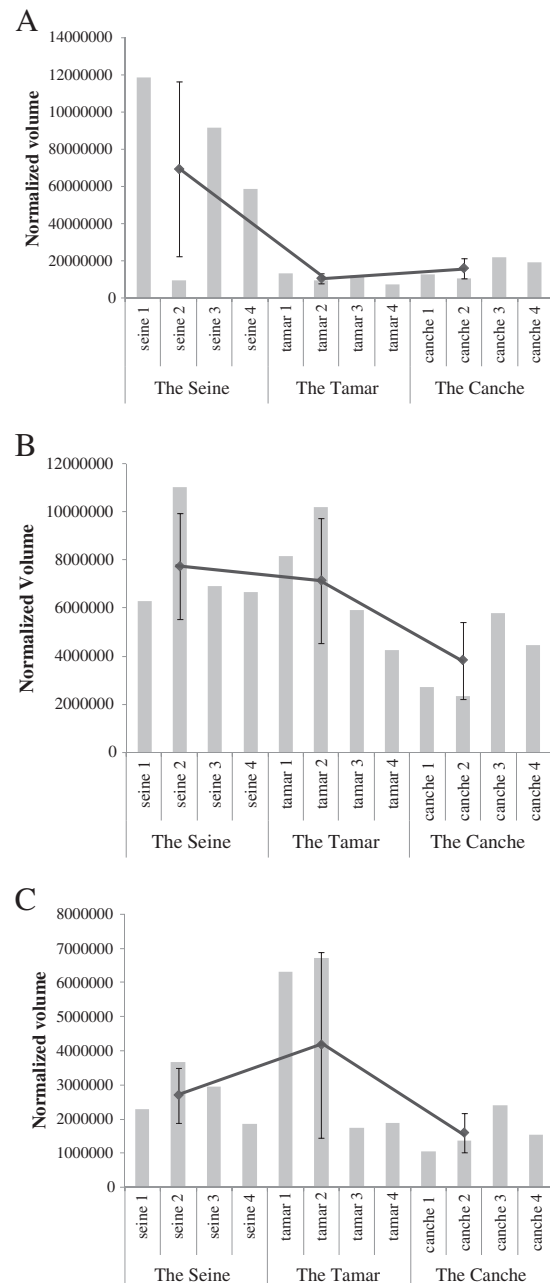


Fig. 4. Examples of typical accumulation patterns of selected spots in each estuary. A) spot S3 B) spot TS1 C) Spot T1. Points represent the mean average normalized volume of each spot $\pm$ SD. Histograms represent the normalized volumes of each spots on each 4 gels per group.

with PAH-, PCB-, and metal-environmental contaminations (Kerambrun et al., 2011; Napierska and Podolska, 2008; Napierska et al., 2006; Vieira et al., 2009).

Two protein spots corresponding to energetic metabolism enzymes, i.e. the malate dehydrogenase (TS1, MDH), a protein implied in the citric acid cycle, and the fructose biphosphate aldolase (TS5), appeared to be also overproduced in the two polluted estuaries (i.e., Seine and Tamar). Interestingly, the α -enolase (T1), also implied in glycolysis, also appeared to be more abundant in the Tamar. These results suggest an increase of the overall energy demand in fishes subjected to polluted environments, that would result from the need to adapt to environmental constraints (including pollution and/or other stressing condition specific to the life in these estuaries). It should be noted that the calculated condition indexes of the fishes from the

Table 2
Differentially accumulated spots.

Estuary	Spot number	Fold	P-value
Tamar + Seine	TS1	2.0	0.035
	TS2	2.0	0.181
	TS3	2.2	0.234
	TS4	1.8	0.019
	TS5	2.4	0.800
	TS6	2.1	0.162
	TS7	3.8	0.088
	TS8	2.6	0.155
	TS9	2.4	0.443
Canche	C1	2.6	0.043
	C2	2.0	0.008
	C3	1.7	0.041
	C4	2.3	0.152
Seine	S1	2.5	0.048
	S2	2.4	0.047
	S3	6.7	0.029
	S4	2.4	0.076
Tamar	T1	2.6	0.116
	T2	2.2	0.020
	T3	3.4	0.133
	T4	1.6	0.026
	T5	2.1	0.084
	T6	2.1	0.013
	T8	1.9	0.006
	T9	2.2	0.046
	T10	2.3	0.678
	TC1	1.7	0.042

Data result from the SameSpot analysis of four 2-DE gels per condition. Results in bold correspond to spots which level increased more than 2 times, with a P-value < 0.05. Results in italic correspond to spots displaying high inter-individual differences (P-value > 0.05) or accumulation factor < 2.

Canche was 1.72 ± 0.06 , and 1.7 ± 0.08 and 1.49 ± 0.04 for fishes from the Seine and the Tamar, respectively. This suggests that the increase in energy metabolism observed in individuals from the Seine and the Tamar does not serve for growth and development, thus suggesting energy reallocation toward adaptation to the particular environmental conditions encountered by these fishes.

The last identified spot (S3 – Fig. 2–Table 3) corresponded to a fertilization envelope outer layer protein-like, which belongs to the VMO-I superfamily (Vitelline Membrane Outer layer protein 1 homolog). This protein appeared to be highly accumulated in the livers of fishes from the Seine. VMO-I is an egg soluble protein expressed in the hen oviduct (Uyeda et al., 1994) that interacts with ovomucin to constitute the outer layer of the vitelline membrane (Kido and Doi, 1988). Vitellogenin (VTG) production is commonly used as a biomarker of exposure to estrogens and to xenobiotics displaying affinity for the estrogenic receptor, including PCBs and PAHs (van der Oost et al., 2003). VTG revealed to be highly induced not only in *P. flesus*

experimentally exposed to 17- β estradiol (Williams et al., 2007), but also in wild fishes from several UK estuaries, most probably resulting from the presence of endocrine disrupting compounds (Allen et al., 1999; Kleinkauf et al., 2004; Scott et al., 2006). We did not identify VTG in our study. However, it should be noted that, during fish oogenesis, the production of vitelline envelope proteins (especially *zona radiata* proteins) precedes that of vitellogenin (Arukwe and Goksoyr, 2003). Therefore, our results suggest that the flounders from the Seine, although immature (O+ group), initiated oogenesis. This could be due to the presence of endocrine disrupters in the Seine, that could activate an early maturation of the flounders. Interestingly, a significant proportion of intersex was previously reported in male flounders from the Seine (Minier et al., 2000). Further experiments will be of particular interest to formally correlate the presence of this protein to the initiation of the ovarian development in *P. flesus* juveniles, and to determine whether this is linked to the pollution specifically found in the Seine.

Finally, over the 27 selected proteins, we could identify only 6 of them. Considering the data available in the literature, the rate of success in protein identification from non model fishes is highly variable (Forné et al., 2010). It should be noted that, for most of the unidentified proteins, we obtained good quality MS/MS spectra. Considering how MS–MS software such as Mascot and Peaks do work, the identification success mainly depends on (i) the availability of protein/genomic sequences in databases, and on (ii) the degree of conservation of the protein. This suggests that the yet unidentified proteins should be original ones (i.e., which sequences are not yet available in databases), and thus could be of primary interest. Further progresses in the knowledge of flatfishes' genomics will certainly help, in the coming years, to improve the identification rate of proteins, and thus the overall interest of proteomic studies for this kind of experimental approaches.

4. Concluding remarks

P. flesus is often used as a sentinel species to monitor estuarine water quality. Several recent studies dealing with stress adaptation of this species used a wide transcriptomic approach, based on a 13,270-clones cDNA microarray, developed in the context of the EU-GENIPOL project (Williams et al., 2006). These transcriptomic studies were effective to characterize the responses not only of flounder to model toxicants in contamination experiments (Williams et al., 2006, 2007, 2008), but also of mesocosms- (Leaver et al., 2010) and environmentally sampled-fishes (Falciani et al., 2008; Larsen et al., 2008). Recently, Williams et al. (2011) integrated transcriptomic, metabolomic and phenotypic data to study wild *P. flesus* populations sampled at 7 estuaries displaying different degrees and profiles of chemical contaminants, and identified molecular networks associated with fishes' environmental exposure. Proteomics is highly complementary to transcriptomic analysis, as (i) proteins are direct effectors

Table 3
Identification of proteins differentially accumulated in the livers of *P. flesus* from the three estuaries.

Spot no.	Identification	Species	NCBI accession no.	Sequenced peptides	Coverage (%)	Score (%)	MW obs/th (kDa)	pI obs
TS1	Malate dehydrogenase 1a, NAD (soluble)	<i>Danio rerio</i>	gi 237850666	VVDGLSINDFSR	9.2	60.8	34/33	7.8
TS2	Glutathione S-transferase rho class	<i>Platichthys flesus</i>	gi 78229130	LWEEYLQK FGLSEERYPK DM(+15)TLLWGSPPC(+57)WR	14.4	38.9	30/24	9.4
TS5	Fructose-bisphosphate aldolase B	<i>Oryzias latipes</i>	gi 187457650	ISDGC(+57)PSALAIENANVLAR	23.5	60.8	38/39	9.6
C4	Beta hemoglobin A	<i>Seriola quinqueradiata</i>	gi 285278803	LHVDPDNFR FLSVVVSALGR IDVGEIGPQALTR	18.0	84.2	13/16	7.7
T1	Alpha enolase	<i>Black bear</i>	gi 282756065	AAVPSGASTGIYEALRLR	23.5	21.7	43/47	5.9
S3	VMO-1 superfamily protein	<i>Platichthys flesus</i>	gi 109176266	GDDTTANNIR M(+16)EDQQGGDDTALNDVR	24.6	70.0	23/23	4.6

Proteins were excised from the 2-DE gels, trypsinolyzed, and the resulting peptides were sequenced by using MALDI TOF–TOF mass spectrometry. Spectra analysis was performed using the PEAKS Software. The score and the coverage were those given by the PEAKS software, using the search parameters described in the Materials and methods section.

of the actual cellular and organism physiology (Tomanek, 2011), and (ii) it is acknowledged that transcriptomic data explains less than half of the variations in protein abundances (Feder and Walser, 2005). Proteomics was also considered in the GENIPOL project and was presented in several meeting abstract (George et al., 2003; MacKenzie et al., 2008; Rogowska-Wrzesinska et al., 2003, 2006) but, to our knowledge, never published as full papers.

In our study, we characterized several proteins differentially accumulated in the livers of flounder collected in 3 estuaries that notably differ in the nature and extent of pollution they carry. The obtained results suggest that *P. flesus* individuals collected in polluted areas (i) increase their energetic metabolism-, and (ii) use Glutathione-S-transferase-, to counteract the deleterious effects of pollution. In addition, we showed a strong accumulation of a protein belonging to the VMO-I superfamily in individuals from the Seine, that could be related to the presence of endocrine disrupters in this site. However, it should be kept in mind that working on wild populations, in natural environments, raises questions about the actual link between the observed proteome phenotypes and the nature and extent of chemical contamination of estuaries. Indeed, the measured molecular response will obviously be also dependent upon natural life history traits, and to other environmental factors such as salinity variations, temperature, food availability, the type of sediments, or other confounding factors. As a consequence, this kind of proteomic strategy should be considered as exploratory, and we are now (i) characterizing the effects of experimental contaminations on flounder liver proteome, and (ii) studying the physiology of fishes in both experimentally- and naturally-polluted environments. The combination of these experimental approaches will help us in understanding the adaptation mechanisms of *P. flesus* to estuarine pollutions, and will hopefully lead to the development of new molecular biomarker to monitor the quality of estuarine water.

Acknowledgments

We thank Mehdi Taiya (MS platform, UBO) for his help. This work is part of – , and is funded by – the European Interreg IVa France (Channel)/England program, and the French ONEMA (office national de l'eau et des milieux aquatiques).

References

- Able, K.W., 2005. A re-examination of fish estuarine dependence: evidence for connectivity between estuarine and ocean habitats. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 64, 5–17.
- Allen, Y., Scott, A.P., Matthiessen, P., Haworth, S., Thain, J.E., Feist, S., 1999. Survey of estrogenic activity in United Kingdom estuarine and coastal waters and its effects on gonadal development of the flounder *Platichthys flesus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 1791–1800.
- Amara, R., Selleslagh, J., Billon, G., Minier, C., 2009. Growth and condition of 0-group European flounder, *Platichthys flesus* as indicator of estuarine habitat quality. *Hydrobiologia* 627, 87–98.
- Arukwe, A., Goksoyr, A., 2003. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comparative Hepatology* 2, 1–21.
- Budin-Verneuil, A., Pichereau, V., Auffray, J., Ehrlich, D., Maguin, E., 2007. Proteome phenotyping of acid stress-resistant mutants of *Lactococcus lactis* MG1363. *Proteomics* 7, 2038–2046.
- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M.H., Pottier, D., Budzinski, H., 2006. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicology* 79, 257–267.
- Costanza, R., d'Arge, R., de Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., O'Neill, R.V., Paruelo, J., Raskin, R.G., Sutton, P., van den Belt, M., 1997. The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387, 253–260.
- Courrat, A., Lobry, J., Nicolas, D., Laffargue, P., Amara, R., Lepage, M., Girardin, M., Le Pape, O., 2009. Anthropogenic disturbance on nursery function of estuarine areas for marine species. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 81, 179–190.
- Dando, P.R., 2011. Site fidelity, homing and spawning migrations of flounder *Platichthys flesus* in the Tamar estuary, South West England. *Marine Ecology Progress Series* 430, 183–196.
- Dauvin, J.-C., 2008. Effects of heavy metal contamination on the macrobenthic fauna in estuaries: the case of the Seine estuary. *Marine Pollution Bulletin* 57, 160–169.
- Durou, C., Poirier, L., Amiard, J.-C., Budzinski, H., Gnassia-Barelli, M., Lemenach, K., Peluhet, L., Mouneyrac, C., Roméo, M., Amiard-Triquet, C., 2007. Biomonitoring in a clean and a multi-contaminated estuary based on biomarkers and chemical analyses in the endobenthic worm *Nereis diversicolor*. *Environmental Pollution* 148, 445–458.
- Evrard, E., Marchand, J., Theron, M., Pichavant-Raffini, K., Durand, G., Quiniou, L., Laroche, J., 2010. Impacts of mixtures of herbicides on molecular and physiological responses of the European flounder *Platichthys flesus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 152, 321–331.
- Falciani, F., Diab, A.M., Sabine, V., Williams, T.D., Ortega, F., George, S.G., Chipman, J.K., 2008. Hepatic transcriptomic profiles of European flounder (*Platichthys flesus*) from field sites and computational approaches to predict site from stress gene responses following exposure to model toxicants. *Aquatic Toxicology* 90, 92–101.
- Feder, M.E., Walser, J.C., 2005. The biological limitations of transcriptomics in elucidating stress and stress responses. *Journal of Evolutionary Biology* 18, 901–910.
- Fonseca, V.F., Franc, S., Serafim, A., Company, R., Lopes, B., Bebianno, M.J., Cabral, H.N., 2011. Multi-biomarker responses to estuarine habitat contamination in three fish species: *Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis* and *Pomatoschistus microps*. *Aquatic Toxicology* 102, 216–227.
- Forné, I., Abián, J., Cerdà, J., 2010. Fish proteome analysis: model organisms and non-sequenced species. *Proteomics* 10, 858–872.
- George, S., Chipman, K., Fey, S., Mose-Larsen, P., Tom, M., 2003. A genomic and proteomic approach to develop toxicologically predictive gene sets for assessment of fish health in polluted environments. 22nd ESCP meeting, Biological effects of pollutants: The role of environmental proteomics and genomics. Alessandria, Italy.
- Hemmer-Hansen, J., Nielsen, E.E., Gronkjaer, P., Loeschcke, V., 2007. Evolutionary mechanisms shaping the genetic population structure of marine fishes; lessons from the European flounder (*Platichthys flesus* L.). *Molecular Ecology* 16, 3104–3118.
- Kerambrun, E., Sanchez, W., Henry, F., Amara, R., 2011. Are biochemical biomarker responses related to physiological performance of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) caged in a polluted harbour? *Comparative Biochemistry and Physiology. C* 154, 187–195.
- Kido, S., Doi, Y., 1988. Separation and properties of the inner and outer layers of the vitelline membrane of hen's egg. *Poultry Science* 67, 476–486.
- Kleinkauf, A., Scott, A.P., Stewart, C., Simpson, M.G., Leah, R.T., 2004. Abnormally elevated VTG levels in flounder (*Platichthys flesus*) from the Mersey Estuary (UK) – a continuing problem. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 58, 356–364.
- Konishi, T., Kato, K., Araki, T., Shiraki, K., Takagi, M., Tamaru, Y., 2005. A new class of glutathione S-transferase from the hepatopancreas of the red sea bream *Pagrus major*. *Biochemical Journal* 388, 299–307.
- Larsen, P.F., Nielsen, E.E., Williams, T.D., Hemmer-Hansen, J., Chipman, J.K., Kruhoffer, M., Gronkjaer, P., George, S.G., Dyrskjot, L., Loeschcke, V., 2007. Adaptive differences in gene expression in European flounder (*Platichthys flesus*). *Molecular Ecology* 16, 4674–4683.
- Larsen, P.F., Nielsen, E.E., Williams, T.D., Loeschcke, V., 2008. Intraspecific variation in expression of candidate genes for osmoregulation, heme biosynthesis and stress resistance suggests local adaptation in European flounder (*Platichthys flesus*). *Heredity* 101, 247–259.
- Leaver, M.J., Diaba, A., Boukouvala, E., Williams, T.D., Chipman, J.K., Moffat, C.F., Robinson, C.D., George, S.G., 2010. Hepatic gene expression in flounder chronically exposed to multiply polluted estuarine sediment: Absence of classical exposure 'biomarker' signals and induction of inflammatory, innate immune and apoptotic pathways. *Aquatic Toxicology* 96, 234–245.
- Lyons, B.P., Thain, J.E., Stentiford, G.D., Hylland, K., Davies, I.M., Vethaak, A.D., 2010. Using biological effects tools to define good environmental status under the European Union Marine Strategy Framework Directive. *Marine Pollution Bulletin* 60, 1647–1651.
- MacKenzie, C., Rogowska-Wrzesinska, A., George, S., 2008. Proteomic analysis of pollutant effects in European flounders using DIGE. *Marine Environmental Research* 66, 101.
- Marchand, J., Evrard, E., Guinand, B., Cachot, J., Quiniou, L., Laroche, J., 2010. Genetic polymorphism and its potential relation to environmental stress in five populations of the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic coast. *Marine Environmental Research* 70, 201–209.
- Martinez-Lara, E., Leaver, M., George, S., 2002. Evidence from heterologous expression of glutathione S-transferase A and A1 of the plice (*Pleurocetes platessa*) that their endogenous role is in detoxification of lipid peroxidation products. *Marine Environmental Research* 54, 263–266.
- Mighanetara, K., Braungardt, C., Rieuwerts, J., Azizi, F., 2009. Contaminant fluxes from point and diffuse sources from abandoned mines in the River Tamar catchment, UK. *Journal of Geochemical Exploration* 100, 116–124.
- Minier, C., Levy, F., Rabel, D., Bocquené, G., Godefroy, D., Burgeot, T., Leboulenger, F., 2000. Flounder health status in the Seine Bay: a multibiomarker study. *Marine Environmental Research* 50, 373–377.
- Napierska, D., Podolska, M., 2008. Relationship between biomarker responses and contaminant concentration in selected tissues of flounder (*Platichthys flesus*) from Polish coastal area of the Baltic Sea. *Oceanologia* 50, 421–442.
- Napierska, D., Kopecka, J., Podolska, M., Pempkowiak, J., 2006. Hepatic glutathione S-transferase activity in flounder collected from contaminated and reference sites along the Polish coast. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65, 355–363.
- Rogowska-Wrzesinska, A., Fey, S.J., George, S., Mose-Larsen, P., 2003. Proteome analysis of pollutant responses in European flounders: methodological development and preliminary analysis of effects of estuarine pollution. 12th International Symposium Pollutant Responses In Marine Organisms, Tampa, Florida, USA.
- Rogowska-Wrzesinska, A., George, S., Sabine, V., Mose-Larsen, P., Fey, S.J., 2006. Proteome analysis of European Flounder: methodological outline and analysis of effects of pollution. *Marine Environmental Research* 62, 157–158.
- Salinas, A.E., Wong, M.G., 1999. Glutathione S-transferases: a review. *Current Medicinal Chemistry* 6, 279–309.
- Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, A.N., 2006. Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology* 15, 333–340.

- Schnitzler, J.G., Thomé, J.P., Lepage, M., Das, K., 2011. Organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and trace elements in wild European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) off European estuaries. *Sciences of The Total Environment* 409, 3680–3686.
- Scott, A.P., Katsiadaki, I., Kirby, M.F., Thain, J., 2006. Relationship between sex steroid and vitellogenin concentrations in flounder (*Platichthys flesus*) sampled from an estuary contaminated with estrogenic endocrine-disrupting compounds. *Environmental Health Perspectives* 114, 27–31.
- Skerritt, D.J., 2010. A review of the European flounder *Platichthys flesus* – biology, life history and trends in population. Eastern Sea Fisheries Joint Committee report. Newcastle University. 13 pp. (available at , www.esfjc.co.uk).
- Tomanek, L., 2011. Environmental proteomics: changes in the proteome of marine organisms in response to environmental stress, pollutants, infection, symbiosis, and development. *Annual Reviews of Marine Science* 3, 373–399.
- Uyeda, A., Inuzuka, C., Doi, Y., Kido, S., Kikuchi, M., 1994. Cloning and sequencing of hen magnum cDNAs encoding vitelline membrane outer layer protein I (VMO-I). *Gene* 144, 311–312.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57–149.
- Vasconcelos, R.P., Reis-Santos, P., Costa, M.J., Cabral, H.N., 2011. Connectivity between estuaries and marine environment: Integrating metrics to assess estuarine nursery function. *Ecological Indicators* 11, 1123–1133.
- Vieira, L.R., Gravato, C., Soares, A., Morgado, F., Guilhermino, L., 2009. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere* 76, 1416–1427.
- Williams, T.D., Diab, A.M., George, S.G., Godfrey, R.E., Sabine, V., Conesa, A., Minchin, S.D., Watts, P.C., Chipman, J.K., 2006. Development of the GENIPOL European flounder (*Platichthys flesus*) microarray and determination of temporal transcriptional responses to cadmium at low dose. *Environmental Science & Technology* 40, 6479–6488.
- Williams, T.D., Diab, A.M., George, S.G., Sabine, V., Chipman, J.K., 2007. Gene expression responses of European flounder (*Platichthys flesus*) to 17-beta estradiol. *Toxicology Letters* 168, 236–248.
- Williams, T.D., Diab, A., Ortega, F., Sabine, V.S., Godfrey, R.E., Falciani, F., Chipman, J.K., George, S.G., 2008. Transcriptomic responses of European flounder (*Platichthys flesus*) to model toxicants. *Aquatic Toxicology* 90, 83–91.
- Williams, T.D., Turan, N., Diab, A.M., Wu, H.F., Mackenzie, C., Bartie, K.L., Hrydziusko, O., Lyons, B.P., Stentiford, G.D., Herbert, J.M., Abraham, J.K., Katsiadaki, I., Leaver, M.J., Taggart, J.B., George, S.G., Viant, M.R., Chipman, K.J., Falciani, F., 2011. Towards a system level understanding of non-model organisms sampled from the environment: a network biology approach. *PLoS Computational Biology* 7, e1002126.

Abstract: responses of fish populations to chemical stress in estuaries : molecular, biochemical and immunotoxicologic approach

Coastal and estuarine environments are mainly impacted by anthropogenic activities that lead to several stress (chemical and/or thermal stress, hypoxia...). Presence of complex mixtures of contaminants could create serious damages in aquatic ecosystems and also in human populations.

During this work, two studies were carried out in France and Québec, on two species: the European flounder (*Platichthys flesus*) and the Atlantic tomcod (*Microgadus tomcod*), these fishes being considered as sentinel species of the water estuarine quality. A multi-parameter approach was conducted considering the fish responses to the chemical stress, from molecular to individual levels (gene expression, detoxification process, functioning of the immune system, energetic metabolism and condition index). The main objective of this study was to identify the more pertinent biomarkers to evaluate the estuarine water quality.

Firstly, the flounder responses were studied in controlled conditions after 29 days of contamination with environmentally relevant concentrations of PAHs and PCBs in food, followed by a 14 days recovery period. The contaminated diet impacted the immune system and showed an increase of the detoxification process and of the DNA damages. Up-regulation of the complement C3 and TNF-receptor gene expressions could be explain by an inflammatory response in liver. The lysozyme level was also impacted and appeared to be the more sensitive immune parameter to the chemical stress. This study underlined a significant correlation between the Cytochrome P450 1A1 expression level and the DNA damage.

Secondly, the previous markers were explored on the flounder and the tomcod, considering the fish population responses to contaminants in the field. These two studies underlined the complexity of the immune responses to contamination, some functions being inhibited (capacity of phagocytosis) whereas others being enhanced (expression of C3 and TNF-R, proliferation of lymphocytes). Moreover, this multiparameter approach confirmed the pertinence of several markers in experimental conditions as in the field. This study carried out on flounder and tomcod populations showed differential responses of populations in contaminated vs in pristine sites (particularly considering: energetic metabolism, detoxification process, immune response and condition index), linked to fish aging (0+ vs 1+ cohorts).

Résumé : Réponses de populations de poissons au stress chimique en milieux estuariens : intégration des réponses moléculaires, biochimiques et immunotoxicologiques

Les milieux côtiers et estuariens sont aujourd'hui particulièrement impactés par les activités anthropiques qui se traduisent par des stress multiples s'exerçant sur les populations aquatiques (stress chimique, thermique, hypoxique,...). La présence de cocktails de polluants complexes dans les eaux peut avoir des conséquences non seulement sur les écosystèmes aquatiques, mais également sur les populations humaines situées au sommet de la chaîne trophique.

Au cours de ce travail de thèse, deux études ont été menées parallèlement en France et au Québec, sur deux poissons considérés comme des espèces sentinelles en milieux estuariens, respectivement le flet (*Platichthys flesus*) et le poulamon (*Microgadus tomcod*). Une batterie de biomarqueurs a été mise en œuvre, en considérant différents niveaux d'organisation biologique, c'est-à-dire en analysant les réponses au stress chimique du niveau moléculaire au niveau individuel (expression de gènes, activité de détoxification, fonctionnement du système immunitaire, métabolisme énergétique, indices de condition). L'objectif principal de cette étude était de rechercher les biomarqueurs les plus pertinents pour évaluer la qualité des écosystèmes estuariens, en prenant en compte les spécificités des milieux contaminés et des espèces sentinelles.

Dans un premier temps, la réponse du flet a été explorée en conditions contrôlées, après une contamination de 29 jours avec un cocktail de HAPs et PCBs à des doses environnementales, suivie de 14 jours de récupération. Le cocktail de polluants, administré par l'alimentation, affecte le système immunitaire et induit des processus de détoxification et des dommages à l'ADN. L'augmentation de l'expression du composant C3 du complément et du TNF-receptor suggère que les polluants provoquent une réponse inflammatoire au niveau du foie. La mesure du lysozyme apparaît comme l'un des marqueurs les plus sensibles du système immunitaire face aux contaminants. Enfin, cette étude met en évidence une corrélation entre l'expression du gène Cytochrome P450 1A1 et les dommages à l'ADN.

Ces marqueurs ont été dans un second temps mis en œuvre dans l'analyse des réponses de populations naturelles de flet puis de poulamon à la contamination chimique. Il apparaît dans ces deux études que la réponse du système immunitaire est complexe, certaines fonctions étant inhibées (capacité de phagocytose) alors que d'autres sont activées en présence de polluants (expression du C3 et du TNF-R, prolifération lymphocytaire). De plus, l'approche multiparamètres confirme que certains marqueurs testés en laboratoire peuvent être également pertinents pour diagnostiquer la qualité des milieux estuariens. Les études réalisées sur les populations de flet et de poulamon montrent un différentiel entre sites contaminées *versus* sites témoins, au niveau de plusieurs biomarqueurs (métabolisme énergétique, activités de détoxification, réponses immunitaires, indices de condition), selon les sites échantillonnés et l'âge des poissons (cohortes 0+ ou 1+).
