

Colloque de restitution du Programme National d'Ecotoxicologie

Lille Grand Palais • 13 et 14 octobre 2008



Ecotoxicologie Terrestre et Aquatique
De la recherche à la gestion des milieux



INERIS
maîtriser le risque
pour un développement durable

Colloque de restitution du Programme National d'Écotoxicologie

Lille Grand Palais • 13 et 14 octobre 2008



→ Écotoxicologie Terrestre et Aquatique : de la recherche à la gestion des milieux

Document publié sous la coordination de :

Marc BABUT, CEMAGREF

Marion BARDY, Pierre VAISS, MEEDDAT

Jean-Marc PORCHER, Catherine GONDCAILLE,

Vanessa VEG, INERIS

Cet ouvrage est disponible en ligne sur les
pages du programme :

<http://www.ecologie.gouv.fr/-PNETOX-.html>

Avant-propos



En utilisant de multiples substances chimiques, d'origine naturelle ou anthropique, l'homme exerce une pression intense sur l'environnement. Quel est le devenir de ces substances polluantes dans l'environnement ? Quels sont les impacts de leur dissémination sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes ? Quelles sont les conséquences de ces impacts sur la biodiversité ou sur les services apportés par les écosystèmes à l'humanité ? **Telles sont les questions auxquelles le Programme national d'écotoxicologie (PNETOX), piloté par le ministère chargé de l'écologie, s'intéresse depuis 1996 dans le but de développer des connaissances et des outils permettant une meilleure gestion des milieux naturels.** Il s'agit de créer les connaissances utiles aux politiques publiques de protection de l'environnement dans le domaine de la gestion des substances chimiques. Ce champ de recherches longtemps soutenu par le seul ministère chargé de l'écologie est maintenant reconnu comme une priorité nationale dans le cadre du volet recherche du Grenelle de l'environnement.

En 2000, le Programme est entré dans une seconde phase, qui a donné lieu à deux appels à propositions de recherche, en 2001 et 2004. Tout en prolongeant les grandes lignes du programme précédent en ce qui concerne l'évaluation des impacts des polluants sur les écosystèmes, le PNETOX II a voulu donner la priorité aux recherches permettant de répondre aux interrogations des pouvoirs publics et des gestionnaires, confrontés notamment aux réglementations nouvelles ou en cours d'élaboration (directive cadre et loi sur l'eau, directive biocides, directive REACH, ...). De plus, alors que les milieux aquatiques ont été les premiers à bénéficier des développements de l'écotoxicologie, PNETOX II a incité à la mise en œuvre de recherches portant sur les écosystèmes terrestres, ainsi que le développement de nouvelles approches pour l'évaluation, à la fois rétrospective et prospective, des risques liés à la présence de polluants dans les milieux.

Le colloque de Lille a pour objectif principal de dresser un bilan des connaissances acquises dans le cadre du PNETOX II. Ce colloque doit également être un lieu de rencontre permettant aux équipes de recherche d'échanger autour de leurs projets, non seulement avec des chercheurs de disciplines différentes, mais aussi avec des utilisateurs de ces recherches en vue d'une application opérationnelle des outils issus de la recherche. Il aura également un relief particulier du fait du Grenelle de l'environnement, ainsi l'ensemble des capacités de recherche nationales dans le domaine de l'écotoxicologie pourra échanger sur les enjeux du renouveau de cette discipline en France.

Afin de favoriser ce dialogue et de faciliter la lecture des résultats obtenus, des chercheurs et des gestionnaires utilisateurs des recherches ont réalisé conjointement des synthèses des travaux s'inscrivant dans les trois grandes thématiques du colloque. Ils ont ainsi mis en avant les acquis du PNETOX II directement transférables, ou les compléments de recherche ou de développement nécessaires pour qu'ils le deviennent. Nous les remercions pour leur investissement dans ce travail.

Eric VINDIMIAN

Chef du Service de la Recherche
Ministère de l'Écologie, de l'Énergie,
du Développement Durable et de
l'Aménagement du Territoire
**Président du Comité d'Orientation
du Programme**

Marc BABUT

CEMAGREF
Unité de Recherches Biologie
des Écosystèmes Aquatiques
**Président du Conseil Scientifique du
Programme**

Table des matières

Avant-propos	3
Conférence introductive REACH	6
Principes généraux et besoins de recherche Eric Thybaud , INERIS	
Session 1	
Ecosystèmes aquatiques	7
➔ Conférence invitée	8
Intégration des avancées scientifiques dans la mise en œuvre de la directive cadre sur l'eau Besoins d'interface et de synergies pluridisciplinaires - Philippe Quevauviller	
➔ Synthèse des travaux de la thématique "Ecosystèmes aquatiques"	10
Coordonnée par Claude Lascombe et Jean- Louis Rivière - Avec l'appui de Thomas Pelte et Françoise Quiniou	
➔ Travaux de recherche de la thématique "Ecosystèmes aquatiques"	
APR 2001	
• Les sédiments : un compartiment clé pour l'évaluation des interactions entre contami- nants chimiques et biota dans les écosystè- mes estuariens - Coordinateur : Claude Amiard-Triquet	22
• Identification et quantification de substan- ces à visée thérapeutique ou diagnostique dans les stations d'épuration et évaluation des effets potentiels sur des organismes non cible Coordinateur : Claude Casellas	24
• Transfert, bioaccumulation, biotransforma- tion et effets biologiques des composés aromatiques chez un copépode de l'estuaire de Seine, <i>Eurytemora affinis</i> - Coordinateur : Joëlle Forget	26
• Ecotoxicologie et modélisation des systèmes biologiques - Coordinateur : Jeanne Garric	28
• Toxicogénomique des perturbateurs endocri- niens de la reproduction chez la truite arc-en- ciel - Coordinateur : Gilles Monod	30
• Utilisation des biomarqueurs dans les stades embryo-larvaires de bivalves marins comme outils rapides et sensibles d'évaluation et de gestion du risque chimique.	
Essai de validation <i>in situ</i> - Coordinateur : Michèle Romeo	32
APR 2003	
• Étude des phénomènes de bioaccumulation / biotransformation des Hydrocarbures Aromati- ques Polycycliques (HAP) par les organismes aquatiques (poissons). Relation exposition génétoxicité Coordinateur : Hélène Budzinski	34
• Impact des hydrocarbures sur les commu- nautés bactériennes dans les zones côtières polluées : mise au point d'outils moléculaires et de bio-indicateurs pour évaluer l'impact d'une pollution Coordinateur : Robert Duran	36
• Marqueurs de stress toxiques chez les microorganismes autotrophes aquatiques - Coordinateur : Jean-François Humbert	38
• Évaluation du risque environnemental des traitements de démoustication : harmonisa- tion des méthodes applicables aux inverté- brés non-cibles dans les zones humides littorales méditerranéennes et atlantiques - Coordinateur : Laurent Lagadic	40
• Approche multi-estuaire des réponses de populations d'huîtres creuses <i>Crassostrea</i> <i>gigas</i> et de flets <i>Platichthys flesus</i> à la contami- nation chimique - Coordinateur : Jean Laroche	42
• Influence des métaux sur la structure et le fonctionnement du phytoplancton dans le lagon sud ouest de Nouvelle Calédonie - Coordinateur : Emma Rochelle-Newall	44
• Critères de qualité pour les eaux de surface : métaux labiles, dissous, ou associés aux matières en suspension ? - Coordinateur : Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin	46
Session 2	
Nouvelles approches Polluant émergents	47
➔ Conférence invitée	
Sources to and effects caused by urban pollution : Examples from the Øresund region Eva Eriksson	48
➔ Synthèse des travaux de la thématique "Nouvelles approches / Polluants émer- gents"	49
Coordonnée par Claude Putavy et James Devillers	
➔ Travaux de recherche de la thématique "Nouvelles approches - polluant émergents" APR 2001	
• Construction d'une levure transgénique pour l'évaluation du risque génotoxique et la caracté- risation des effets mutagènes dans l'envi- ronnement - Coordinateur : Jérôme Cachot	54
• Gestion des gènes de résistance aux pestici- des : application de la stratégie de la zone stable - Coordinateur : Michel Raymond	56
• Adaptation microbienne aux composés xéno- biotiques - Coordinateur : Timothy Vogel	58
APR 2003	
• Relations de type Structure-Activité (SARs et QSARs) appliquées aux perturbateurs endocri- niens xénobiotiques - Coordinateur : James Devillers	60
• Extrapolation des effets entre niveaux d'orga- nisation biologique. Expérimentation et modéli- sation, de l'individu à la population, des effets d'un perturbateur endocrinien chez un poisson, la gambusie - Coordinateur : Gilles Monod	62
• Evaluation des effets des mélanges de métaux sur la base de concentrations internes Coordi- nateur : Alexandre Pery	64
➔ Conférence invitée	
Recherche et action publique – Apports de la sociologie de la traduction – Pierre-Benoît Joly	66
Session 3	
Ecosystèmes terrestres	67
➔ Conférence invitée	68
The Soil Thematic Strategy and its implications for eco-toxicology – Luca Montanarella	
➔ Synthèse des travaux de la thématique "Ecosystèmes terrestres"	69
Coordonnée par Antonio Bispo et Pascal Simonet	
➔ Travaux de recherche de la thématique "Ecosystèmes terrestres"	
APR 2001	
• Analyse couplée de la dissipation des pesti- cides dans le sol et de leur impact écotoxicolo- gique sur les Nématodes - Coordinateur : Laurent Bruckler	80
• Utilisation de l'abeille domestique (<i>Apis</i> <i>mellifera</i>) pour caractériser le niveau de contamination de l'environnement par les xénobiotiques industriels à caractère hydro- phobe - Coordinateur : James Devillers	82
• Impact des inocula bactériens (<i>Azospirillum</i> naturels et génétiquement modifiés) stimula- teurs des cultures sur le fonctionnement biologique du sol - Coordinateur : Yvan Moëgne-Loccoz	84
APR 2003	
• Éléments traces métalliques (ETM) dans le continuum sol-plante, espèces tolérantes et restauration des sites industriels - Coordina- teur : Josep Escarré	86
• Mesure et procédures d'évaluation de l'impact sur l'environnement des anti-viru- lents ciblant le quorum-sensing - Coordina- teur : Denis Faure	88
• Biodisponibilité du cuivre pour des plantes cultivées dans des sols à antécédent viticole - Méthodes d'évaluation et déterminants biologiques et biogéochimiques - Coordina- teur : Philippe Hinsinger	90
• Étude modèle de l'exposition de végétaux à la pollution atmosphérique : utilisation de la réponse enzymatique comme bio-indicateur - Coordinateur : Stéphane Le Calvé	92
• La végétation des friches métallurgiques : caractéristiques écophysiological et influence sur la mobilité des métaux lourds - Coordinateur : Jean-Claude Leclerc	94
• Réponses adaptatives des communautés microbiennes du sol aux toxiques : approche métagénomique - Coordinateur : Roland Marmeisse	96
➔ Présentation générale du programme PNETOX	98

Les besoins de recherche liés à REACH

Auteur

• **Éric Thybaud**

INERIS

Direction des risques chroniques

Pôle Dangers et impact sur le vivant

Parc Technologique ALATA - BP n°2 - 60 550 Verneuil-en-Halatte

Eric.Thybaud@ineris.fr

→ **Le règlement REACH nécessite de produire des connaissances sur la toxicologie et l'écotoxicologie au moment de deux grandes étapes, l'enregistrement et l'autorisation :**

1. Au moment de l'enregistrement doivent en effet être mises à disposition des données concernant les propriétés physico-chimiques, toxicologiques et écotoxicologiques. Ces différentes informations permettront d'élaborer le rapport sur la sécurité chimique (ensembles des propriétés de la substance) et de réaliser l'évaluation de la sécurité chimique (évaluation des risques en fonction des usages).

A ce jour il est évalué que cette étape d'enregistrement concernera environ 30 000 substances chimiques sur une période de 11 ans.

2. L'autorisation concerne les substances remplissant les critères CMR, PBT ou vPvB, mais aussi perturbateur endocrinien ou présentant un niveau de préoccupation équivalent sans que pour ces deux derniers points des critères soient actuellement disponibles et consensuels.

A ce jour il est évalué qu'environ 1500 substances seront concernées par cette autorisation sur 3 ans. Au delà, d'autres substances viendront vraisemblablement grossir ce total.

A ces deux étapes le règlement REACH introduit non seulement de nouveaux critères d'effet (la perturbation endocrinienne par exemple) mais aussi de nouveaux outils de caractérisation des propriétés des substances chimiques (méthodes *in vitro*, QSARs ou read across par exemple).

Il s'agira au cours de cette conférence de présenter le règlement REACH et les besoins de recherche qui lui sont associés.



Session 1 Ecosystèmes aquatiques



→ Conférence invitée

Intégration des avancées scientifiques dans la mise en œuvre de la directive cadre sur l'eau - Besoins d'interface et de synergies pluridisciplinaires - **Philippe Quevauviller**

→ Synthèse des travaux de la thématique "Ecosystèmes aquatiques"

Coordonnée par **Claude Lascombe** et **Jean-Louis Rivière**

Avec l'appui de **Thomas Pelte** et **Françoise Quiniou**

→ Travaux de recherche de la thématique "Ecosystèmes aquatiques"

APR 2001

- Les sédiments : un compartiment clé pour l'évaluation des interactions entre contaminants chimiques et biota dans les écosystèmes estuariens - **Claude Amiard-Triquet**
- Identification et quantification de substances à visée thérapeutique ou diagnostique dans les stations d'épuration et évaluation des effets potentiels sur des organismes non cible - **Claude Casellas**
- Transfert, bioaccumulation, biotransformation et effets biologiques des composés aromatiques chez un copépode de l'estuaire de Seine, *Eurytemora affinis* - **Joëlle Forget**
- Ecotoxicologie et modélisation des systèmes biologiques - **Jeanne Garric**
- Toxicogénomique des perturbateurs endocriniens de la reproduction chez la truite arc-en-ciel - **Gilles Monod**
- Utilisation des biomarqueurs dans les stades embryo-larvaires de bivalves marins comme outils rapides et sensibles d'évaluation et de gestion du risque chimique. Essai de validation *in situ* - **Michèle Romeo**

APR 2003

- Étude des phénomènes de bioaccumulation/biotransformation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) par les organismes aquatiques (poissons). Relation exposition-génotoxicité - **Hélène Budzinski**
- Impact des hydrocarbures sur les communautés bactériennes dans les zones côtières polluées : mise au point d'outils moléculaires et de bio-indicateurs pour évaluer l'impact d'une pollution - **Robert Duran**
- Marqueurs de stress toxique chez les microorganismes autotrophes aquatiques (MASTOC) - **Jean-François Humbert**
- Évaluation du risque environnemental des traitements de démoustication : harmonisation des méthodes applicables aux invertébrés non-cibles dans les zones humides littorales méditerranéennes et atlantiques - **Laurent Lagadic**
- Approche multi-estuaire des réponses de populations d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* et de flets *Platichthys flesus* à la contamination chimique - **Jean Laroche**
- Influence des métaux sur la structure et le fonctionnement du phytoplancton dans le lagon sud ouest de Nouvelle Calédonie - **Emma Rochelle-Newall**
- Critères de qualité pour les eaux de surface : métaux labiles, dissous, ou associés aux matières en suspension ? - **Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin**

CONFÉRENCE INVITÉE

Intégration des avancées scientifiques dans la mise en oeuvre de la Directive Cadre sur l'eau - Besoins d'interface et de synergies pluridisciplinaires

Auteur

• **Philippe Quevauviller**
 Commission européenne
 DG Environnement (BU9 3/142)
 rue de la Loi 200
 B-1049 Bruxelles
 philippe.quevauviller@ec.europa.eu

La Directive Cadre sur l'eau (2000/60/CE), ou DCE, établit l'objectif de « bon état » devant être atteint pour toutes les eaux d'ici la fin de l'année 2015. Cet objectif repose sur la mise en œuvre et l'efficacité de plans de gestion de réseaux hydrographiques qui sont en voie de développement (consultation du public à la fin 2008, publication en 2009) et qui comportent des étapes opérationnelles telles que la caractérisation des masses d'eaux, l'analyse de pressions anthropiques et de leurs impacts, les programmes de surveillance et les programmes de mesures. La complexité de cette gestion intégrée des systèmes aquatiques (différents écosystèmes, pressions anthropiques, évolutions temporelles etc.) nécessite le développement de partenariats pluridisciplinaires et plurisectoriels, et la prise en compte continue des avancées scientifiques pour une meilleure mise en œuvre.

Parmi les disciplines concernées, l'apport des connaissances en écotoxicologie représente un volet essentiel des prises de décisions liées à la problématique de gestion citée ci-dessus. En premier lieu, ces connaissances sont utilisées pour l'établissement de diagnostics sur la qualité des milieux (répondant aux exigences de la directive concernant l'évaluation des risques et impacts) et également pour la surveillance de paramètres caractérisant les risques de détérioration d'origine anthropique. Les critères écotoxicologiques sont également pris en compte pour l'établissement de normes de qualité environnementales (NQE) telles que celles proposées pour les substances prioritaires définies dans la directive 'fille' récemment adoptée et celles devant être établies par les États membres dans les eaux souterraines d'ici la fin 2008 dans le cadre de la directive 2006/118/EC (autre directive 'fille' de la DCE). Parmi les projets de recherche qui se sont penchés – à l'échelle européenne – sur ces aspects, on peut citer le projet REBECCA qui a étudié les liens entre l'état écologique et l'état chimique des eaux, mais la recherche en ce domaine reste largement à développer tant sur le plan des outils méthodologiques

et leur validation (par exemple par le biais de sites expérimentaux) que sur les essais écotoxicologiques nécessaires à l'établissement de NQE représentatives.

Le succès de la DCE dépendra en partie de la capacité qu'auront les acteurs principaux de sa mise en œuvre à réaliser un transfert régulier des connaissances scientifiques vers les applications opérationnelles. La combinaison d'objectifs contraignants (l'atteinte du "bon état"), de guides représentant une interprétation commune des dispositions réglementaires, du développement de projets de recherche, et de partenariats multidisciplinaires et multisectoriels tels que ceux développés dans le cadre de la "Stratégie Commune de Mise en Œuvre" (CIS) de la DCE, ouvre une approche itérative essentielle à l'amélioration des connaissances qui aura un impact direct sur l'efficacité des futurs plans de gestion des réseaux hydrographiques. Les cycles successifs de ces plans, associés – le cas échéant – à des révisions des annexes techniques de la directive, représentent une opportunité unique pour la communauté scientifique d'anticiper les besoins de recherche et d'en communiquer les résultats d'une manière utilisable par les législateurs en fonction de l'échéancier des cycles de gestion. Ce partenariat entre sphères scientifique et législative ne fonctionnera que si des efforts sont faits pour l'établissement d'un dialogue pérenne et d'une communication visant à un transfert effectif et efficace des résultats de la recherche. Cette présentation fait le point sur le cadre législatif opérationnel de la DCE et sur les liens établis avec la communauté scientifique en soutien à sa mise en œuvre, en mettant l'accent sur les besoins en matière d'écotoxicologie.

Les vues exprimées dans ce texte sont celles de l'auteur et ne reflètent pas nécessairement une position officielle de la Commission européenne.



Synthèse des travaux de la thématique « Ecosystèmes aquatiques »

Auteurs

- **Claude Lascombe** Expert indépendant - Ex-responsable « études » à l'Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse, Lyon
- **Jean-Louis Rivière** Directeur de recherche honoraire à l'INRA - Vice-président de la Commission des produits chimiques et biocides, MEEDDAT
- **Thomas Pelte** Expert outils et prospectives eaux superficielles, Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse, Lyon - Thomas.PELTE@eaurnmc.fr
- **Françoise Quiniou** Chercheur en écotoxicologie, IFREMER Brest, Plouzané - Vice-présidente du comité d'experts scientifiques biocides de l'AFSSET - francoise.quiniou@ifremer.fr.

1. Introduction

Le titre de cette session fait référence à la différence entre polluant et toxique. Cette différence essentielle est souvent mal comprise : le polluant implique une notion de contamination de l'eau, c'est-à-dire d'exposition potentielle des organismes aquatiques aux substances chimiques, alors que la toxicité est une caractéristique propre à la substance chimique. Cette distinction est importante parce que le cadre réglementaire fait appel, tantôt uniquement à la pollution (par exemple, les valeurs seuils des pesticides dans l'eau), tantôt impose une évaluation de risque combinant pollution et toxicité, autrement dit, exposition et danger (par exemple, les autorisations de mises sur le marché des pesticides et biocides). Il est plus rare que la notion de toxicité seule soit prise en compte. L'exemple le plus manifeste est celui des CMR (produits cancérigènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction) dont on cherche à limiter le plus possible l'utilisation afin de protéger la santé humaine.

1.1 - Les enjeux de gestion dans leur cadre réglementaire

1.1.1 - Rappel général sur la problématique des polluants et toxiques au regard de la réglementation.

L'évolution de l'écotoxicologie aquatique est manifeste depuis les années 70. C'était l'époque de l'identification des polluants persistants, le DDT, les PCBs, les dioxines (devenus POP) et la naissance de l'écotoxicologie comme une discipline scientifique à part entière.

D'une manière intéressante, l'écotoxicologie et la réglementation ont des liens très étroits : l'homme fabrique des substances toxiques, mais très vite, il lui a paru nécessaire que ces substances ne soient pas répandues par n'importe qui et n'importe comment... d'où des mesures d'encadrement contraignantes, des dispositions légales, qui se sont développées au fil des années. Ces mesures portent sur un nombre de plus en

plus grand de substances et sont de plus en plus détaillées, mais ces réglementations ont besoin de bases scientifiques de plus en plus précises pour asseoir leurs prises de position.

La nécessité d'une **évaluation de risque** s'est imposée, d'abord d'une manière informelle, mais les concepts de l'évaluation de risque n'ont été véritablement formulés que récemment, dans les années 90 (cf. l'ouvrage fondateur de Glen Suter « Ecological Risk Assessment »). Le principe est simple : à partir du danger d'une substance, déterminé sur la base d'essais de laboratoire sur quelques espèces, on peut estimer une concentration dangereuse pour les organismes aquatiques en ajoutant un facteur de sécurité à ces valeurs de toxicité (principe de la PNEC, « Predicted No Effect Concentration », Concentration sans effet prévisible). On détermine ensuite l'exposition à cette substance (principe de la PEC, « Predicted Environmental Concentration », Concentration environnementale prévisible ». La comparaison des deux (danger et exposition) permet de caractériser le niveau de risque d'une population. Aujourd'hui, la situation a beaucoup changé, la plupart des substances sont soumises à un contrôle préliminaire basé sur une évaluation de risque : autorisation de mise sur le marché des pesticides (1996), des biocides (1998), des médicaments humains (2006), contrôle des substances chimiques (règlement REACH). Parallèlement, l'écotoxicologie s'imposait comme discipline scientifique à part entière. Dans ce processus, l'**écotoxicologie aquatique** a été prise d'abord en compte pour trois raisons principales : l'idée, aujourd'hui remise en cause, que l'eau est le réceptacle final des pollutions, l'apparente facilité d'exploration du milieu aquatique et la relative homogénéité de ce milieu par opposition au sol, milieu hétérogène, souvent considéré comme le site de l'« épuration » des substances chimiques.

La première mission de l'écotoxicologie a été de définir des essais utilisables et significatifs pour ces besoins réglementaires ; ces essais sont maintenant parfaitement codifiés au niveau international.

Aujourd'hui, le développement d'essais supplémentaires paraît moins prioritaire, mais beaucoup de questions restent encore à résoudre : la discussion sur la valeur de la NOEC (concentration sans effet observé) et son remplacement par des ECx (Effective Concentration x%,

c'est-à-dire la concentration qui produit tant de % d'effet) est significative de cette évolution.

Le premier colloque de restitution du PNETOX en 2004, s'était interrogé sur la reconquête de la qualité des ressources en eau et des milieux naturels. Il avait retenu dans sa conclusion que la préoccupation essentielle demeurait le transfert des outils et la valorisation des connaissances des outils issus du PNETOX vers les gestionnaires, y compris au regard de la réglementation. La question reste clairement posée :

- quels sont les acquis opérationnels / transférables pour le programme PNETOX ?
- quels compléments de recherche ou développements seraient encore nécessaires pour que les résultats obtenus deviennent opérationnels / transférables ?

Une fois encore, il faut affirmer les liens profonds qui unissent écotoxicologie, évaluation du risque et réglementation, tout en reconnaissant qu'il s'agit d'activités qui restent différentes et qu'il ne faudrait pas confondre. La notion d'exposition par exemple est encore le talon d'Achille de l'évaluation de risque, confrontée à la variété des milieux et des organismes d'une complexité sans aucune mesure avec ce qui se passe avec l'homme.

1.1.2 - Le cadre réglementaire actuel

Le cadre réglementaire a donné des **objectifs sur les polluants toxiques dès 1967**, avec la **directive** sur la classification et l'étiquetage, qui permettait déjà de distinguer les substances toxiques de celles qui ne l'étaient pas. La **directive de 1976** sur les « **substances dangereuses** déversées dans le milieu aquatique » a conforté cette avancée avec deux visées complémentaires, une réduction globale des rejets et l'identification des substances sur lesquelles agir en priorité.

Toutefois - et comme souvent -, la directive était aussi un outil incitatif, les bases scientifiques n'étant pas toutes suffisamment établies, et la difficulté a été avant tout technique : manque d'outils, difficulté à caractériser les risques face à la multiplicité des substances, des voies d'exposition et d'expression des effets. Les acteurs ont tâtonné un peu et c'est surtout à partir des années 90 que la connaissance décolle significativement, avec une mobilisation accrue de la recherche sur le sujet.

Le **renforcement réglementaire** a porté d'abord sur l'introduction des substances dans les milieux et ensuite le contrôle de leur utilisation. Les substances ont été réglementées en fonction de leurs usages, tenant compte de leur toxicité, mais aussi - ce qui est souvent oublié - de

leurs avantages et des nécessités du commerce européen (cf. traité de Rome). La plupart des substances visées étant écotoxiques (les pesticides en étant l'exemple le plus emblématique), ceci a impliqué des restrictions très précises à l'utilisation.

La **Directive Cadre sur l'Eau (DCE)** de 2000 reprend, dans son domaine, la philosophie de la directive 76/464 : action systématique sur les rejets, identification de substances prioritaires, en y ajoutant la dimension supplémentaire du milieu avec des Normes de Qualité Environnementale (NQE) explicitement précisées pour l'eau et le biote (directive-fille) et qui renvoient aux rejets avec notamment des arrêts en préparation sur la définition des Valeurs Limites d'Emission (VLE).

Cette nouveauté ouvre un champ d'investigation très large. Etant donné la portée réglementaire de ces valeurs seuils, comment les définir au plus juste ? Quelles sont les conséquences d'un dépassement ? Les valeurs inférieures sont-elles parfaitement sécurisantes, et faut-il un niveau « zéro » ?

Plus globalement, comment gagner la qualité écologique visée par la DCE si les micropolluants sont responsables de sa dégradation ? Comment aller au-delà du qualificatif (« ce sont les toxiques ») et identifier la ou les substances responsables ?

Bien d'autres questions restent en suspens, concernant notamment les multiples voies d'exposition, directes ou indirectes (y compris évidemment pour l'homme : ex. des polychlorobiphényles (PCB) dans le poisson consommé), qui obligent à élucider les processus de contamination et d'effets.

Que penser aussi de la gestion du risque et de l'application du principe de précaution, autrement plus délicate pour les polluants suspectés de toxicité que pour les polluants dits « classiques » ?

Le « **Grenelle de l'Environnement** », en soulignant l'importance de cette problématique des toxiques, a mis l'accent sur l'harmonie à instaurer entre l'environnement et la santé humaine en introduisant la notion de « santé environnementale », avec comme principaux objectifs et mesures correspondantes :

- réduire drastiquement l'émission et la dispersion dans les milieux des polluants connus pour leur caractère nocif pour la santé ;
- prévenir ou anticiper les risques liés aux productions, aux techniques et aux modifications de l'environnement ;
- renforcer et partager les connaissances dans le domaine des liens entre la santé et l'environnement.

Synthèse des travaux de la thématique « Ecosystèmes aquatiques »

Tout est dit dans l'exposé de ces ambitions et le PNETOX se positionne comme un élément-clé pour une connaissance approfondie des processus de toxicité et pour le développement des approches et outils écotoxicologiques opérationnels spécifiques à ces polluants (bioessais, NQE...), nécessaires à une gestion éclairée et acceptable de cette problématique.

Ceci étant, le concept de santé environnementale ou santé de l'écosystème, développé par différents auteurs depuis une vingtaine d'années, aussi séduisant soit-il, mériterait une discussion approfondie. Cette métaphore tend à faire préconiser des formes de gestion des écosystèmes à connotations fortement médicales ("soigner" des écosystèmes "malades"), alors que les écosystèmes ne sont pas simplement de simples "super-organismes" et ont des propriétés fonctionnelles différentes. Comment définir pratiquement un écosystème en bonne santé ? Si on admet que la santé d'un écosystème n'est pas un concept opérationnel, il faut définir des propriétés mesurables des écosystèmes qui pourront être combinées pour fournir un indice représentatif de l'état de bonne ou de mauvaise santé au sens de la "qualité" de l'environnement, dans l'optique d'un développement durable. En définitive, si l'objectif ultime de l'évaluation du risque écologique est de protéger des écosystèmes, nos connaissances restent très modestes sur plusieurs points :

- l'impact exact des polluants sur les écosystèmes,
- la distinction entre ce qui est dû à l'impact des polluants et à l'impact des autres stressseurs,
- la prédiction des effets au-delà du niveau de l'individu,
- la définition de ce qu'il faut protéger et jusqu'à quel point.

1.2 - Traduction des besoins en APR

A la suite du premier Appel à Proposition de Recherche (**APR 2001**) de portée relativement générale sur l'évaluation (rétrospective et prospective) du risque lié à la présence de polluants dans le milieu, le second **APR (2003)**, plus clairement axé sur les déficits de connaissance concernant les milieux terrestres et les milieux aquatiques, s'organisait selon **quatre volets**, un premier traitant des écosystèmes et milieux concernés (avec une attention particulière aux interfaces), ainsi que des facteurs de perturbation pour les trois autres, reprenant le schéma classique de l'évaluation du risque, avec :

- la connaissance des effets toxiques ;
- la caractérisation des expositions ;
- la caractérisation des risques.

De cette subdivision, émergent naturellement deux grands axes, selon que l'on s'intéresse aux polluants

(les substances) ou aux pollués (les milieux). Pour les **milieux aquatiques**, les premiers concernés et mis en lumière, les connaissances sont plus avancées et les recherches à engager davantage ciblées. L'APR a mis plus particulièrement l'accent :

- sur les interfaces eaux douces et eaux marines (les eaux de transition de la DCE), avec notamment toute la problématique du devenir des polluants et de leurs effets en milieu estuarien et côtier,
- en lien avec la DCE, sur une meilleure compréhension des relations entre l'état écologique des milieux et les seuils de qualité pour les substances toxiques.

1.3 - Echéances spécifiques aux substances dangereuses et positionnement des résultats de recherche attendus par rapport à ces échéances

Une démarche de recherche à finalité opérationnelle, quelle qu'en soit l'horizon, doit tenir compte des **délais prévisibles ou possibles** de sortie des résultats pour une valorisation ou la réalisation de travaux de recherche complémentaires préparant cette valorisation à terme, en fonction d'échéances de gestion bien identifiées.

Pour les milieux aquatiques, les besoins au regard de la **DCE**, des **SDAGE** (Schémas Directeurs d'Aménagement et de Gestion des Eaux) et des programmes d'accompagnement, se positionnent selon trois échéances :

- **immédiate ou à très court terme** pour la mise en œuvre du 1^{er} plan de gestion (2009-2015) et la révision prévue en 2009 du 9^{ème} programme des Agences de l'Eau,
- **à moyen terme** pour la préparation du 2^{ème} plan (2015-2021), qui s'enclenchera sans doute à mi-parcours du premier,
- **à long terme** pour celle du 3^{ème} plan (2021-2027). Cette échéance peut paraître lointaine mais on sait que pour répondre efficacement en temps voulu aux demandes opérationnelles (toujours urgentes) des gestionnaires, la recherche a besoin de temps pour acquérir les connaissances de base nécessaires à la bonne compréhension des phénomènes. Le problème est bien d'identifier à temps les directions à privilégier.

Les échéances spécifiques aux substances dangereuses sont les suivantes :

- **Vingt ans** après la sortie (attendue en 2009) de la directive-fille pour les "substances dangereuses prioritaires" (SDP),
- **2015, 2021 et 2027** pour le respect des NQE (Bon Etat

chimique et biologique) pour les 41 substances prioritaires (SP),

- **2015** pour la diminution de 50% des SDP, de 30% des SP, de 10% des 86 "substances pertinentes" du Programme National d'Action.

On rappellera que les **eaux marines** sont également concernées par la DCE qui distingue :

- les eaux côtières : situées à moins de un mille marin de la ligne de base servant pour la mesure de la largeur des eaux territoriales ;
- les eaux de transition : eaux situées à proximité des embouchures de rivières, partiellement salines en raison de leur proximité aux eaux côtières mais qui restent fondamentalement influencées par les courants d'eau douce, soit les estuaires.

Le calendrier des différentes étapes est le même que pour les eaux continentales avec une atteinte du « bon état des masses d'eau naturelles » au 22 décembre 2015.

Par ailleurs, depuis 2002 s'est mis en place un processus préparatoire d'une Stratégie Marine Européenne (SME) adoptée le 24 octobre 2005 et qui vient d'aboutir à la **Directive de la stratégie marine européenne** (2008/56/EC) ou MSFD (« Marine Strategy Framework Directive ») publiée au journal officiel le 25 juin 2008. Cette SME propose une approche à deux niveaux : une approche globale et coopération communes pour appréhender des problématiques transnationales et une approche par régionalisation (définition de régions marines et de sous-régions) pour prendre en compte les spécificités des mers européennes.

L'objectif est de parvenir à un bon état environnemental des eaux marines de l'Union européenne à l'horizon de 2021, selon plusieurs étapes :

- à plus 4 ans, évaluation initiale avec la détermination des caractéristiques de « bon état environnemental » ;
- à plus 5 ans, établissement des objectifs environnementaux et des indicateurs associés ;
- à plus 6 ans, mise en œuvre des programmes de surveillance pour l'évaluation ;
- en 2016, au plus tard, développement d'un programme de « mesures à prendre » ;
- en 2018, au plus tard, démarrage opérationnel de programmes de mesures ;
- en **2021**, au plus tard, atteinte du « bon état écologique », comprenant les caractéristiques physiques et chimiques, types d'habitats, éléments biologiques... ainsi que les pressions et impacts tels que pertes physiques et dommages (perturbations non physiques, contaminations toxiques ou non toxiques et les perturbations biologiques...);
- suivi d'un rapport d'évaluation tous les 6 ans.

La mise en œuvre en parallèle de la DCE et de la SME permettra, à terme, de protéger l'ensemble des masses d'eau européennes. C'est donc dans ce cadre temporel global que l'on doit resituer les résultats des recherches du PNETOX et ses prolongements.

2. Projets examinés

Dans le cadre de cette synthèse des travaux relevant de la thématique « écosystèmes aquatiques », treize projets de recherche ont été examinés :

APR 2001

- **Claude Amiard-Triquet** - Les sédiments : un compartiment clé pour l'évaluation des interactions entre contaminants chimiques et biota dans les écosystèmes estuariens
- **Claude Casellas** - Identification et quantification de substances à visée thérapeutique ou diagnostique dans les stations d'épuration et évaluation des effets potentiels sur des organismes non cible

- **Joëlle Forget** - Transfert, bioaccumulation, biotransformation et effets biologiques des composés aromatiques chez un copépode de l'estuaire de Seine, *Eurytemora affinis*

- **Jeanne Garric** - Ecotoxicologie et modélisation des systèmes biologiques

- **Gilles Monod** - Toxicogénomique des perturbateurs endocriniens de la reproduction chez la truite arc-en-ciel

- **Michèle Romeo** - Utilisation des biomarqueurs dans les stades embryo-larvaires de bivalves marins comme outils rapides et sensibles d'évaluation et de gestion du risque chimique. Essai de validation *in situ*

APR 2003

- **Hélène Budzinski** - Étude des phénomènes de bioaccumulation/biotransformation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) par les organismes aquatiques (poissons). Relation exposition-génotoxicité

- **Robert Duran** - Impact des hydrocarbures sur les communautés bactériennes dans les zones côtières polluées : mise au point d'outils moléculaires et de bio-indicateurs pour évaluer l'impact d'une pollution

- **Jean-François Humbert** - Marqueurs de stress toxiques chez les microorganismes autotrophes aquatiques

- **Laurent Lagadic** - Évaluation du risque environnemental des traitements de démoustication : harmonisation des méthodes applicables aux invertébrés non-cibles dans les zones humides littorales méditerranéennes et atlantiques

- **Jean Laroche** - Approche multi-estuaire des réponses de populations d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* et de flets *Platichthys flesus* à la contamination chimique

Synthèse des travaux de la thématique « Ecosystèmes aquatiques »

- **Emma Rochelle-Newall** - Influence des métaux sur la structure et le fonctionnement du phytoplancton dans le lagon sud ouest de Nouvelle Calédonie
- **Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin** - Critères de qualité pour les eaux de surface : métaux labiles, dissous, ou associés aux matières en suspension ?

3. Connaissance produite et gestion des milieux

Ce chapitre, axé sur le rendu des travaux de recherche, est volontairement organisé selon une entrée « gestion ». Les résultats se positionnant toutefois et logiquement dans le droit fil de l'APR, on retrouvera en second intitulé et entre parenthèses la correspondance avec le ou les thèmes correspondants.

La présentation des résultats distingue les milieux d'eau douce continentale d'une part et les milieux marins et saumâtres (estuariens) d'autre part. Même si des liens existent entre les méthodes applicables à ces milieux, et bien que la politique relative aux substances dangereuses (la DCE en premier lieu) fixe un objectif identique ou presque pour tous les milieux, les approches dulçaquicoles et marines ont des spécificités qu'il convient d'aborder séparément, notamment sous l'angle de la surveillance, sans se priver pour autant de transferts méthodologiques entre les approches développées pour ces différents milieux.

3.1 – Etats des lieux et outils de surveillance des milieux (APR : écosystèmes et milieux, facteurs de perturbation ; caractérisation des expositions ; connaissance des effets toxiques)

Si chaque type de milieu a ses caractéristiques et exigences propres, les connaissances et méthodes développées pour chacun d'eux ne sont pas forcément spécifiques. A côté des résultats rattachés aux milieux considérés, continentaux ou marins, et sans aller jusqu'à extraire systématiquement des projets les résultats susceptibles d'une valorisation élargie, quelques travaux relatifs à des problématiques particulières sont signalés pour leur portée relativement générale.

On soulignera, en remarque préliminaire, la difficulté rencontrée dans le contexte de gestion pour établir des liens entre les niveaux de contamination et les risques

écotoxicologiques, pour la raison simple et fondamentale que les bioindicateurs actuellement disponibles ne sont pas conçus pour y répondre.

On notera aussi que pour les toxiques, la surveillance est un vrai problème en soi compte tenu des coûts et de la diversité de comportement des molécules qui se retrouvent en mélanges complexes dans le milieu naturel, mais également de l'interférence des facteurs biotiques et abiotiques sur les réponses de certains biomarqueurs, d'où l'importance de la recherche et des résultats présentés ci-après pour en optimiser les contenus.

3.1.1 - Connaissances applicables spécifiquement aux différents milieux

La présence de **médicaments d'origine humaine ou vétérinaire** est avérée depuis quelques années à large échelle dans tous les milieux. Sur cette question émergente, les questionnaires sont toujours sur plusieurs fronts : avoir une idée des molécules présentes dans le milieu et des concentrations associées, caractériser la capacité d'abattement des stations d'épuration (il semble qu'à ce niveau, une marge de manœuvre importante existe) et estimer le niveau de risque d'écotoxicité sur les organismes non-cibles selon les substances.

Le projet coordonné par **C. Casellas** se situe dans cette dernière préoccupation. Outre ses apports bibliographiques sur le marché des médicaments en France, il apporte des éléments de connaissance sur les effets induits de plusieurs substances potentiellement présentes dans les milieux. Les résultats permettent de dimensionner le problème, tant en terme de concentration dans les STEP que d'origine (forte suspicion notamment sur les effluents hospitaliers) et d'effets sur les organismes.

Au-delà des résultats proprement dits, ce travail a largement contribué à éveiller l'intérêt pour le sujet et a été à l'origine d'un séminaire regroupant des scientifiques et les représentants des Ministères (Ecologie, Santé) et des Agences pour une mise à niveau des connaissances et une réflexion sur les stratégies à développer. Il renvoie ainsi plus largement aux préoccupations générales de définition d'une éventuelle NQE, de suivi dans le milieu, de stratégie d'action.

Les HAP et les PCB, autres polluants toujours préoccupants, ont fait l'objet de plusieurs travaux, selon des approches différentes mais complémentaires. Bien qu'axés principalement sur les milieux estuariens, les études par la démarche suivie et l'accent mis sur les aspects de bioaccumulation, de biotransformation, et

l'importance des métabolites dans l'évaluation des effets toxiques, revêtent une portée dépassant les milieux considérés.

Les travaux coordonnés par **J. Forget-Leray** sur l'estuaire de la Seine ont permis de caractériser le phénomène de bioaccumulation sur une espèce de zooplancton pour deux familles de contaminants : PCB et HAP. La démarche a le mérite d'apporter de la visibilité sur la place de ce type d'organisme intermédiaire de la chaîne trophique dans le transfert des polluants. Il ressort de cette étude que le zooplancton contribue bien pour une part au transfert de PCB ou HAP dans la chaîne trophique et probablement vers le poisson. Les résultats permettent d'appréhender un certain ordre de grandeur qu'il serait intéressant de mettre en regard avec les teneurs retrouvées sur d'autres organismes (invertébrés benthiques, algues, poissons ; cf les études et projets de l'Ifremer sur la bioaccumulation dans les chaînes trophiques allant jusqu'à l'évaluation des risques sanitaires). L'actualité, avec le problème des dépassements de normes sur les PCB dans les poissons d'eaux douces, illustre par elle-même la portée opérationnelle des résultats de cette étude.

Le projet coordonné par **H. Budzinski** est focalisé sur l'impact des HAP. Il porte à la fois sur le phénomène de bioaccumulation et l'effet induit, notamment au travers d'indicateurs de type biomarqueurs, par exemple la modification de l'ADN. L'approche en laboratoire a permis d'identifier les métabolites produits et de caractériser les lésions structurales de l'ADN. Grâce aux données chimiques obtenues sur deux années consécutives, des niveaux de base en métabolites biliaires ont pu être définis pour la baie de Seine ; associés aux indications données par les biomarqueurs biologiques (EROD, EthoxyRésorufine O-dééthylase ; cassures de brins), une cartographie spatiale et temporelle de la zone étudiée a été mise en place.

Les résultats obtenus selon cette approche doivent permettre de mieux interpréter les concentrations observées dans les organismes lors des suivis et leur donner un sens écotoxicologique au-delà du simple constat de bioaccumulation. Ce travail touche donc à un aspect particulièrement intéressant dans la mesure où il est difficile pour le gestionnaire de prioriser des secteurs d'action vis-à-vis de ce groupe de polluants ubiquistes. Cela renvoie également aux contraintes de l'élaboration des NQE, dans le contexte d'une pollution généralisée et difficilement maîtrisable.

Le projet qu'a coordonné **J. Laroche** apporte une autre contribution à la connaissance des effets des polluants et notamment des HAP et PCB sur les bivalves et les

poissons, à partir d'une approche multi-estuarienne, incluant une mise en relation des réponses des biomarqueurs avec la période de reproduction liée à la saison d'échantillonnage et aux facteurs du milieu. Chez les flets, les génotypes ont des réponses et pathogénicités différentes selon les contextes polluants, tandis que les huîtres ont une capacité de certains génotypes à conserver l'intégrité de leur ADN. Les résultats indiquent que ces deux organismes ont des aptitudes différentes à résister au stress engendré par ces deux groupes de substances. L'étude apporte aussi des éléments factuels sur le niveau de contamination des poissons par les PCB, particulièrement appréciables dans un contexte actuel sensible.

Les **métaux** font l'objet de plusieurs travaux. Le projet CRIQUALADIM coordonnée par **M.H. Tusseau-Vuillemin** aborde la question de la prise en compte du caractère dissous ou labile des métaux dans la caractérisation du risque. Les conclusions sont importantes pour les questionnaires car elles renvoient aux conditions dans lesquelles les tests d'écotoxicité sont menés en laboratoire et au risque de définir des valeurs seuils non pertinentes. Ces seuils étant le fondement des NQE utilisées pour la définition du bon état chimique ou écologique de la DCE, les résultats des travaux menés invitent à examiner la manière de prendre en compte le caractère dissous ou labile des métaux dans la conduite des évaluations de risque.

3.1.2 - Milieux continentaux

Vu sous l'angle spécifique des eaux douces, le projet coordonné par **M.H. Tusseau-Vuillemin** mérite une seconde lecture, en apportant des informations indispensables pour l'interprétation des données basées sur les réponses des bryophytes et daphnies, organismes très largement utilisés pour les diagnostics et suivis de qualité. On constate ainsi que la bioaccumulation du Cu par les bryophytes est réduite en présence de matière organique dissoute de diverses origines. La forme labile représente le cuivre biodisponible pour la bioaccumulation, sauf en présence d'acides humiques, auquel cas la forme labile sous-estime la fraction biodisponible. Pour le Cd vis-à-vis des daphnies, les voies de contamination dissoute et trophique sont mises en évidence en laboratoire. Le contrôle de la spéciation pendant de longues durées, et les variations du taux d'alimentation des daphnies en présence de nourriture contaminée semblent être des points-clefs pour l'interprétation de ces expériences. La biodisponibilité et la toxicité pour les daphnies d'algues contaminées en Cd est démontrée, mais les critères biologiques - croissance et reproduction -

Synthèse des travaux de la thématique « Ecosystèmes aquatiques »

n'apparaissent pas pertinents pour l'évaluation de la toxicité chronique du Cd sur daphnies. Tous ces résultats devraient conduire à reconsidérer les protocoles actuellement utilisés et les bases d'interprétation des données acquises.

On soulignera par ailleurs ici à nouveau l'intérêt du travail de défrichage des travaux coordonnés par **C. Casellas** sur les médicaments, polluants émergents susceptibles d'effets importants. Il est clair que la problématique des perturbateurs endocriniens doit s'intéresser en premier lieu au plus puissant des œstrogènes de synthèse, l'éthinyl estradiol pour les milieux continentaux.

3.1.3 - Milieux marins, estuariens

Le projet coordonné par **C. Amiart-Triquet**, sur l'estuaire de la Seine et la baie d'Authie, présente un intérêt particulier par la comparaison entre deux sites présentant des niveaux très différents d'exposition aux polluants. Les résultats montrent curieusement que les biomarqueurs classiques glutathion S-transférase (GST), acétylcholinestérase (AChE) et catalase chez l'annélide *Nereis diversicolor* testé, ne sont pas discriminants en fonction des sites, ni les marqueurs du métabolisme énergétique par opposition aux marqueurs morphologiques et aux indicateurs d'un potentiel reproducteur. L'importance du rôle de la méiofaune dans le remaniement des sédiments des vasières intertidales et celui des bactéries sulfitoréductrices ainsi que du microphytobenthos dans le flux des métaux et leur biogéochimie est clairement mise en évidence. L'intérêt du travail réside dans son caractère très complet, intégrant des biomarqueurs, et la disponibilité des polluants. L'étude éclaire donc sur la façon d'appréhender une contamination dans ce milieu complexe et sensible qu'est un estuaire, notamment en faisant ressortir l'importance du compartiment sédiments dans le diagnostic.

Le projet conduit sous la coordination de **M. Roméo** utilise lui, le stade embryo-larvaire de l'huître creuse pour étudier la réponse des biomarqueurs d'exposition et de défense comme indicateurs précoces d'une exposition à des contaminants. L'étude montre que ces biomarqueurs sont influencés par des facteurs abiotiques. Ainsi l'activité acétylcholinestérase (AChE) diminue quand la salinité augmente tandis que l'activité catalase (CAT) et le taux de métallothionéines (MT) augmentent avec la température. Une fois l'interaction de ces facteurs environnementaux maîtrisée en travaillant à température et salinité fixés, les résultats montrent que les polluants métalliques (Cu et Cd) ou organiques, (un herbicide et deux insecticides) ont tendance à faire baisser l'activité AChE et au contraire augmenter les activités glutathion S-transférase (GST) et

CAT. Les variations des marqueurs du stress oxydant sont moins significatives. Les taux de MT augmentent dans les larves exposées au cuivre et surtout au cadmium.

Une validation *in situ* a pu être réalisée, grâce à un dispositif de conteneurs à larves mis au point et breveté par l'Ifremer, à l'entrée et au fond du port d'Arcachon. Elle révèle que l'un (entrée) est particulièrement exposé aux HAP et l'autre (fond) au cuivre ainsi qu'au tributylétain présent dans les sédiments. Par ailleurs, la comparaison des réponses des biomarqueurs chez des larves issues de géniteurs provenant d'une zone peu contaminée (le bassin d'Arcachon) et de la rivière de la Bidassoa, fortement contaminée en métaux, montre que la tolérance acquise par les parents (Bidassoa) est transmise aux larves qui sont plus résistantes au toxique de référence et dont les biomarqueurs ont des réponses décalées proportionnellement à leur degré de tolérance. *In fine* l'étude aura permis de calibrer la capacité de réponse de ces biomarqueurs pour différents polluants et le positionne donc comme un candidat potentiel dans les études de diagnostics sur les risques d'écotoxicité associés à des contaminations. Du fait de leur réponse rapide (de 24 h à 48 h) aux polluants, les larves d'huîtres se révèlent un matériel biologique rapide, sensible et pertinent pour des études de biosurveillance en périodes favorables au développement larvaire, l'huître pouvant selon la situation géographique être remplacée par la moule. Déjà utilisée comme objet de test pour déceler des anomalies environnementales liées à des micropolluants, la mesure des biomarqueurs d'exposition et de défense chez les larves des bivalves ouvre une nouvelle possibilité d'indication d'effets avant l'observation d'anomalies de développement, de manière encore plus précoce. A ce titre, elle constitue un outil de gestion de choix, d'autant que le protocole du bioessai bivalve marin fait l'objet d'une norme Afnor qui sera publiée début 2009.

Le projet coordonné par **H. Budzinski** a déjà été présenté ci avant. Sans revenir ici sur l'intérêt de la démarche du projet et les connaissances qui en résultent sur les effets des HAP, on rappellera que c'est sur la base de ces travaux qu'un programme européen (ICON) mené conjointement par l'ICES et par l'OSPAR a vu le jour en 2008. Il a pour but d'évaluer l'état des écosystèmes de la mer du Nord face aux contaminants anthropogéniques en considérant les effets biologiques, dans le cadre d'une approche intégrée (analyses chimiques dans les sédiments, les poissons et bivalves, dosages de bioindicateurs chez les deux organismes, évaluation de la toxicité des sédiments à l'aide de plusieurs bioessais). Ce programme permettra de plus, d'établir les niveaux de base des indicateurs mesurés, répondant ainsi aux besoins de la Directive de la stratégie marine européenne (2008/56/EC).

Les travaux menés sous la coordination de **J. Laroche** apportent aussi des informations locales utiles à une politique différenciée de gestion de trois estuaires importants de fleuves et rivières françaises : la Vilaine, la Loire et la Gironde. Ils montrent que le Belon et le Ster de Lesconil, subissant une faible pression anthropique, peuvent servir de référence pour l'évaluation de l'impact de la contamination des autres estuaires. L'élargissement, de la mesure de ces paramètres aux autres estuaires français permettrait d'établir une cartographie et de suivre l'évolution vers le « bon état » écologique demandé par la DCE.

3.2 – Aide à la décision pour l'établissement des plans de gestion et des programmes d'action (APR : connaissance des effets ; caractérisation des risques)

Toutes les connaissances issues des programmes de recherche **participent plus ou moins** à la construction des politiques d'action. La révision des SDAGE, à partir de la DCE, a notamment mis l'accent sur les substances toxiques, reconnues comme des enjeux de premier plan. Les plans de gestion et les programmes de mesures (au sens « action ») qui les prolongent, de même que les mises en œuvre locales des politiques, évoluent au rythme des avancées scientifiques.

Sans prétendre dresser ici un état exhaustif des plus-values opérationnelles apportées par le PNETOX, quelques considérations générales permettent de situer l'importance des enjeux pour la gestion.

La contribution du programme à la connaissance des substances suit un développement logique : la priorité reste donnée aux grandes classes de polluants organiques persistant (HAP) ainsi qu'aux polluants métalliques dont le double caractère de substances naturelles, devenues des polluants par leur utilisation par l'homme, pose de difficiles problèmes et devra susciter encore de nombreuses études avant qu'une gestion satisfaisante soit établie.

Le problème des substances dont l'utilisation est réglementée est d'une nature différente : la mise en évidence de contaminations ou d'impacts potentiels peut orienter la réglementation : c'est le cas des médicaments. Par ailleurs, pour les substances déjà évaluées, l'évaluateur du risque et le gestionnaire des milieux seront intéressés par la confirmation (ou non) des prédictions développées par le premier. A ce titre, il sera intéressant de revenir bientôt sur l'impact de la suppression des herbicides de la famille de l'atrazine.

Plus concrètement, on ne manquera pas d'évoquer ici le projet coordonné par **L. Lagadic** sur les traitements de décontamination des zones littorales.

La décontamination est une pratique un peu particulière car elle est motivée à la fois par un objectif de confort et par un objectif de protection sanitaire (ex : Camargue ou La Réunion). Le fait est qu'elle n'obéit pas à une logique strictement économique et donc l'approche pression-impact se détache notablement des démarches habituelles en ce sens qu'il existe autour de cette contamination une certaine tolérance d'un effet compte tenu de la portée « sociale » de l'opération. Par ailleurs le mode d'exposition est particulièrement diffus et vise par nature les points d'eau, milieux qu'en principe, les politiques actuelles de gestion souhaitent préserver. Dans ce contexte, évaluer les risques environnementaux apparaît comme une démarche forcément structurante.

Au-delà de son intérêt méthodologique (couplage des approches laboratoire et terrain, pertinence mais lourdeur de ces dernières) et même si les résultats ne sont pas automatiquement applicables à toutes les situations, l'étude apporte une prise de recul édifiante sur deux produits et permet d'avoir une lecture plus avisée sur les effets associés, à la fois sur les espèces cibles et non cibles. Les résultats offrent des bases de réflexion sur la marge de manœuvre possible pour appréhender ces risques environnementaux. La question se pose aussi de la recolonisation après traitement pour mettre en balance l'efficacité du produit et ses effets sur les espèces non cibles.

Cette étude pose le problème sous différentes dimensions et se présente ainsi comme une invitation à approfondir la question sous différentes directions.

On se doit de mentionner aussi le projet coordonné par **E. Rochelle-Newall** sur la pollution métallique du lagon de Nouméa, soumis aux apports d'une exploitation minière et aux rejets urbains. Il est montré que ces éléments peuvent avoir un impact sur la structure et la composition des écosystèmes phytoplanctoniques et bactériens, et être bioaccumulés par des bivalves filtreurs. Pour la majorité des métaux testés, la nourriture phytoplanctonique représente la source majeure de contamination de ces derniers. L'intérêt de ce travail tient principalement au milieu particulier sur lequel il porte. De fait les impacts observés, notamment du zinc, peuvent entraîner d'autres phénomènes associés liés aux caractéristiques particulières au système lagon. L'approche pression-impact prise en compte dans la SME (Stratégie Marine Européenne) est donc à envisager de manière plus aiguë pour ce milieu et l'analyse qui a été menée dans ce projet invite à élargir la lecture des risques associés aux

Synthèse des travaux de la thématique « Ecosystèmes aquatiques »

contaminations toxiques pour des milieux particuliers comme le lagon. Ce type de résultats peut amener les gestionnaires à voir sous un autre angle les priorités d'actions sur les substances dangereuses et orienter les mesures de réduction des rejets.

D'une manière générale, les travaux de **C. Amiart-Triquet et al.**, **M. Roméo et al.**, **J. Laroche et al.**, **J. Forget-Leray et al.**, et **E. Rochelle-Newall et al.**, soulèvent les phénomènes de résistance et/ou tolérance des organismes étudiés. **C. Amiart-Triquet et al.**, et **J. Laroche et al.** montrent que cette tolérance a un coût qui se répercute sur la fécondité et la croissance des organismes. Les observations de **J. Forget-Leray et al.** et **J. Laroche et al.**, indiquent eux que cette tolérance peut conduire à une possible sélection des organismes aptes à accumuler les contaminants jouant ainsi un rôle important dans le transfert trophique pouvant aller jusqu'au risque sanitaire. **M. Roméo et al.** et **J. Forget-Leray et al.** ont montré que l'exposition chronique des organismes à un milieu contaminé peut induire des tolérances de ces derniers ou de leurs larves, mais aussi développer une sensibilité accrue à d'autres expositions (forte concentration en MO pour le copépode *Eurytemora*) et **E. Rochelle-Newall et al.** ont pu déterminer l'expression d'un gène de résistance au zinc chez les bactéries. Ces phénomènes de tolérance sont à prendre en considération si l'on veut pouvoir comparer plusieurs zones d'études lors de programmes de surveillance afin de bien déterminer les gradients de contamination et les seuils de NQE au travers de la mesure des réponses des bioessais, biomarqueurs enzymatiques ou génétiques.

3.3 – Aide à la décision sur l'orientation et la programmation des travaux dans le cadre des partenariats entre organismes de gestion et organismes de recherche (APR : tous thèmes)

Outre les attentes relatives à la surveillance et à l'action dans les domaines identifiés comme des problématiques indiscutables, un éclairage scientifique est attendu par les gestionnaires pour une meilleure compréhension des problèmes émergents ou particuliers et des enjeux correspondants, en vue de prises de position sur les suites à donner : on touche là aux missions de veille et de prospective. Dans cette optique, différents projets ont apporté leur lot de connaissance pour poser les bases sur un sujet précis et ouvrir la possibilité aux gestionnaires de rebondir ou non pour éclairer sur la dimension du

A titre d'illustration, on évoquera les travaux menés sous la coordination de **J. Garric** sur la modélisation des effets biologiques dans une approche écotoxicologique. La finalité de cette démarche, qui est de simuler les effets d'une contamination au-delà de l'individu pour les appréhender à l'échelle de la population, ceci sur l'ensemble des paramètres essentiels du cycle de vie du Chironome (survie, croissance, émergence, reproduction) mérite l'intérêt des gestionnaires. Si la pertinence de la méthode reste en effet peu convaincante dans la perspective d'une utilisation sur le terrain, il n'en reste pas moins que la démarche est prometteuse sur d'autres aspects, dans une perspective de gestion. En effet, les risques associés aux contaminants sont généralement appréhendés au travers de bioessais qui expriment un effet écotoxique sur une fonction biologique. Le lien entre le résultat de ces bioessais et les valeurs des normes de qualité environnementales est actuellement direct. S'il était possible d'avoir une lecture plus intégrée de ces résultats en les positionnant dans un modèle de cycle de vie, il est probable que les diagnostics établis par ailleurs gagneraient en réalisme écologique.

Egalement dans l'idée de poser des bases d'un sujet à approfondir, les travaux coordonnés par **R. Duran** sur la mise au point d'outils moléculaires et de bioindicateurs pour évaluer l'impact d'une pollution par les hydrocarbures, se présentent comme une approche préalable au développement d'un outil nouveau pour diagnostiquer la présence de contamination par les hydrocarbures. Le projet s'est attaché à caractériser le profil moléculaire de la communauté bactérienne en présence d'hydrocarbures, selon différents schémas d'exposition, afin d'essayer de dégager ceux qui sont révélateurs d'une contamination par ces polluants. A l'issue des travaux, il reste encore beaucoup d'étapes avant d'espérer bénéficier d'un outil opérationnel mais le travail mené permet aux gestionnaires de mesurer les potentialités offertes par les outils moléculaires et le cas échéant les relayer dans d'autres types de développements.

On note également que l'utilisation d'outils moléculaires semble une voie prometteuse pour identifier des indicateurs de stress ou de résistance des organismes en présence de toxiques, lesquels peuvent être mis en lien avec le constat d'une contamination. Le projet MASTOC coordonné par **J. F. Humbert** dont l'objet est de tester une puce à ADN en présence d'Irgarol 1051 (de la famille des s-triazines) et de caractériser les mutations génétiques provoquées par ce polluant sur du phytoplancton, se place dans cette démarche. Les résultats positionnent ces outils

moléculaires comme une option technique à développer dans la construction d'outils de bioindication d'écotoxicité, que ce soit pour la compréhension des phénomènes toxiques induits (lecture approfondie des gènes mutés) ou pour le développement d'outils de type PICT (« Pollution Induced Community Tolerance » ; tolérance de la communauté induite par la pollution).

Le projet coordonné par **J. Laroche** propose aussi des voies de développement de futurs outils au travers de l'expression, chez l'huître, de gènes liés au stress, même si ces derniers nécessiteraient des explorations complémentaires.

Par ailleurs, les travaux scientifiques peuvent contribuer à l'émergence de réflexions prospectives sur des sujets nouveaux autrement qu'en terme de méthodes de diagnostic. Il peut s'agir aussi d'éclairer les gestionnaires sur les particularités liées à un type ciblé de milieu et apporter une lecture nouvelle dans le diagnostic à porter sur les relations pressions/impacts. Le fait que les travaux de **E. Rochelle-Newall et al.** portent sur les lagons par exemple, ou bien ceux de **C. Amiart-Triquet et al.** et **J. Forget-Leray et al.** sur la zone estuarienne, donne à la connaissance produite un intérêt particulier ne serait-ce qu'en raison de la spécificité des milieux étudiés, milieux transitoires, complexes et fragiles sur lesquels les schémas de gestion classiques ne s'appliquent pas forcément tels quels.

4. Incidence de la connaissance produite sur les modes de gestion à venir

On précisera tout d'abord que cette incidence est à considérer sous un double aspect :

- **évolution des modes de gestion** au vu des avancées actuelles de connaissances,
- **besoins de compléments de connaissances** pour améliorer la gestion et répondre aux demandes prévisibles à moyen-long terme (définition puis mise en œuvre du 2^{ème} plan de gestion et préparation du 3^{ème}). Il s'agira soit de prolongements ciblés de travaux déjà engagés, soit d'axes nouveaux de recherche à promouvoir.

Par ailleurs, il convient de souligner que le terme de gestion recouvre en fait deux notions, à distinguer dans une réflexion prospective :

- la **gestion des substances**, que l'on peut définir comme

les mesures destinées à limiter le risque à un niveau acceptable ; ce sont généralement des mesures de restriction des apports : réduction des rejets industriels, définition de zones non-traitées pour les pesticides, par exemple.

- la **gestion des milieux** aquatiques, notion plus générale, recouvrant partiellement la précédente, qui vise à maintenir ou restaurer un niveau de qualité de la ressource et des milieux aquatiques.

Si les deux doivent avancer parallèlement, la **gestion des substances reste le point-clé** dans une politique d'action cohérente privilégiant le préventif par rapport au curatif. L'évaluation du risque écologique des substances chimiques est en amont des mesures d'autorisation de mise sur le marché et le processus est extrêmement complexe. Pour s'en convaincre, il suffit par exemple de consulter le site internet de l'AFSSA détaillant la méthodologie et les données nécessaires pour évaluer le risque écologique d'un pesticide, ou celui de l'AFSSET en ce qui concerne les biocides et les nouvelles substances chimiques devant répondre à la réglementation REACH. Pour autant, évaluer le risque d'un produit, écotoxique par définition comme l'est un pesticide n'est pas simple ; *in fine*, l'autorisation devra obligatoirement indiquer quelles sont les mesures de gestion indispensables pour que le risque reste dans des limites acceptables.

Cette conception semble excellente dans son principe, mais l'application reste encore à faire. Pour assumer ses responsabilités, « le politique » s'est emparé de ce concept et a souligné la distinction et la séparation entre évaluation, domaine plutôt scientifique, et gestion, mais cette séparation n'est pas exempte de difficultés de mise en œuvre : par exemple, pour reprendre le problème de zones non-traitées pour les pesticides, il reste un travail considérable à faire pour définir valablement des pratiques réalistes. Ce travail ne peut se faire qu'avec des allers-retours continus entre autorités administratives, évaluateurs du risque et gestionnaires des milieux.

Sous ces différents angles, il ressort de l'ensemble des études conduites dans ce programme, un certain nombre d'**éléments pouvant être relayés** directement ou indirectement **par les gestionnaires et décideurs** de la politique de l'eau. Le chapitre 4 a illustré la manière dont les résultats acquis peuvent s'intégrer dans une démarche de gestion, en les présentant selon une architecture assez expressive : état des lieux et outils, aide à la décision et compréhension des phénomènes pour une veille ou l'émergence de nouveaux outils.

Il reste à espérer que les différents acteurs de la gestion s'en saisissent.

Synthèse des travaux de la thématique « Ecosystèmes aquatiques »

Ainsi, concernant le volet relatif à la définition des **valeurs seuils, normes de qualité environnementales et autres objectifs de qualité** du milieu, les travaux aidant à interpréter avec davantage de pertinence les résultats de tests biologiques, notamment en laboratoire, sont à prendre en compte dans les chantiers conduits aux niveaux national ou européen sur le sujet. On citera en exemple les travaux de **J.Garric et al.** et **M.H. Tusseau-Vuillemin et al.** qui s'inscrivent bien dans cette perspective.

Par ailleurs, les organismes chargés de la **surveillance des milieux**, notamment les Agences de l'Eau, les DIREN et l'ONEMA, ont besoin d'outils leur donnant un diagnostic sur le niveau d'écotoxicité, de manière à compléter une approche basée pour l'essentiel sur l'interprétation des données de qualité chimique. Une lecture "biologique" apparaît aujourd'hui absolument indispensable. Tous les travaux visant à faire émerger des outils de **bio-indication** sont donc bienvenus et il est souhaitable que les plus aboutis puissent trouver un champ d'application plus large, on pense notamment aux biomarqueurs embryon-larvaires développés par **M. Roméo et al.**

Enfin, il serait utile que les éléments de connaissances apportés par de nombreux projets sur les **phénomènes induits** par une contamination (transfert, bioaccumulation, intoxication, ...) soient relayés auprès des utilisateurs potentiels. On pense ici aux groupes de travail sur les problèmes de **PCB** dans les milieux où la question du transfert devient cruciale pour mieux positionner l'action. Ceci devrait se faire en liaison avec les groupes européens chargés de travailler sur les normes de qualité, les stratégies de suivi ou la définition des substances considérées comme prioritaires.

Dans tous ces domaines, l'acquis déjà très important doit être mis à profit immédiatement en terme d'aide à la décision, mais ne doit pas pour autant masquer les nombreuses **zones d'ombre** qui ne pourront être levées qu'à la faveur de travaux de recherche complémentaires. Partant toutefois de connaissances constamment consolidées, c'est de façon ciblée et donc optimisée que doivent se développer ces prolongements.

Ceci n'exclut en rien les **travaux plus fondamentaux** visant à faire émerger de nouvelles techniques, qui mériteraient d'inspirer des suites en étroite collaboration entre scientifiques et acteurs de l'eau, comme par exemple la piste des outils moléculaires explorée par **J.F. Humbert et al.** et **R. Duran et al.**, mais aussi **H. Budzinski et al.** et **J. Laroche et al.**

5. Conclusion

L'évolution des dernières années a été caractérisée par le renforcement de la perception négative du public en ce qui concerne les problèmes de la pollution toxique et ses effets considérés comme probables.

Cette perception s'est traduite généralement sous forme d'outils réglementaires concernant à la fois les substances (mises sur le marché, REACH) et les milieux (DCE, SME), d'où la demande, de plus en plus insistante, des gestionnaires publics pour des outils scientifiques destinés à soutenir des politiques publiques de réduction. Ce qui a été fait, notamment par PNETOX est-il suffisant ? A l'évidence, non, pour plusieurs raisons : de nouvelles problématiques émergent et les besoins des gestionnaires évoluent et se déplacent en fonction de nouvelles exigences, sociales, économiques, avec les nouveautés réglementaires qui les accompagnent.

L'évaluation préalable du risque est certainement un progrès, mais tout progrès a son revers : la tendance à confondre évaluation des dangers, évaluation des expositions, évaluation des risques et impact réel. D'où l'importance de la communication : communication entre les principaux acteurs, le public, les politiques, les gestionnaires sur le terrain et les scientifiques. Le dialogue doit être renforcé. Ceci passe par une familiarisation plus grande des scientifiques avec les concepts et les outils de l'évaluation du risque. Réciproquement, les gestionnaires doivent comprendre que l'évaluation de risque n'est qu'un outil et les modèles, de plus en plus sophistiqués, ne sont pas pour autant décisifs.

La demande d'évaluation écologique (évaluations du risque des substances, diagnostic écologique, développement d'indicateurs de qualité, NQE) a explosé ces dernières années. Les chercheurs de cette discipline récente qu'est l'écotoxicologie, sont confrontés à la nécessité de fournir de plus en plus de données scientifiques pour fournir à cette demande. Cette production intensive a ses inconvénients : le chercheur, incapable de maîtriser le flux incessant des publications, devient de plus en plus spécialisé et le gestionnaire, face à la multiplicité des informations qui lui sont fournies, a de plus en plus de difficulté à décider. Les réglementations sont complexes, se superposent, mélangent des considérations juridiques et scientifiques qui ne font pas toujours bon ménage ensemble. Le public lui-même, inondé d'affirmations contradictoires, devient de plus en plus méfiant. Le problème du futur sera peut-être le développement de nouvelles approches pour gérer la masse des informations accumulées.



Les sédiments : un compartiment clé pour l'évaluation des interactions entre contaminants chimiques et biota dans les écosystèmes estuariens

Partenaires

• EA 2160 Nantes : J.C. Amiard et al. • UMR 5255 CNRS, Bordeaux 1 : H. Budzinski et al. • UMR 8016 CNRS, Lille 1 : A. Créach et al. • IRD, UR 055, Nouméa : J.P. Debenay • UMR 5178 MNHN, Concarneau et Université du Maine, Le Mans : F. Denis • UMR 8187 CNRS, Lille 1, Wimereux : L. Denis et al. - J.C. Fischer et al. • Center for Estuarine and Coastal Ecology, Pays-Bas : H. Hummel et al. • UMR 6143 CNRS, Rouen : R. Lafite, F. Petit et al. • EA 2160, CERE, Angers : C. Mouneyrac et al. • Natural History Museum, London : P.S. Rainbow et al. • EA ECOMERS, Univ. Nice Sophia Antipolis : M. Roméo et al. • CEREGE, IRD-CNRS-Univ. Aix-Marseille : F. Sylvestre

Coordinateur

• Claude Amiard-Triquet
CNRS, Université de Nantes
Pôle Mer et Littoral
EA 2160 Mer, Molécules,
Santé (MMS)
Claude.Amiard-Triquet@univ-nantes.fr

Mots clés

Cycles biogéochimiques, Biomarqueurs, Tolérance, Effets supra-individuels, Modélisation

Objectifs

Dans ce projet nous nous proposons d'apporter une contribution à une meilleure compréhension i) des facteurs biotiques et abiotiques influençant les flux de contaminants transitant par le compartiment sédimentaire ; ii) de l'impact des contaminants sur les organismes appartenant aux principaux groupes fonctionnels de l'écosystème benthique et au réseau trophique des milieux intertidaux de la Manche ; iii) de la dynamique spatio-temporelle des contaminants présents dans les sédiments marins et estuariens par le biais de la modélisation. Les applications envisagées étaient d'apporter des éléments explicatifs sur les causes des changements de la biodiversité (effets naturels ou induits par l'homme) et proposer des outils complémentaires (bioindicateurs, biomoniteurs, biomarqueurs) pour évaluer la santé de l'environnement estuarien.

Résultats

La qualité du milieu a été évaluée comparativement en estuaires de Seine et d'Authie (2002-2004, prélèvements trimestriels) par l'analyse de la plupart des contaminants détectables dans les eaux, les sédiments et l'annélide endogée *Nereis diversicolor*. L'utilisation de marqueurs biochimiques et physiologiques a été testée chez cette espèce qui apparaît comme un biomoniteur pertinent pour les milieux sédimentaires. Les effets de la contamination ont été examinés sur différentes composantes du biota : i) les communautés microbiennes avec un suivi de la quantification moléculaire des gènes de résistance qui

montre des abondances relatives des bactéries résistantes au cadmium et au mercure plus importantes dans la vase de Seine ; ii) les communautés microphytobenthiques qui, bien que leurs structures soient très distinctes, ont des capacités photosynthétiques comparables dans les deux estuaires ; *N. diversicolor* qui présente un statut physiologique et une reproduction très dégradés en Seine, en dépit de sa tolérance, voire de son adaptation génétique. Le stress chimique n'est peut-être pas seul en cause, du moins directement, puisque la nourriture (diatomées, foraminifères) est moins abondante en Seine à certaines saisons (cas de la nématofaune).

En retour, l'estimation de l'impact du biota sur le devenir des contaminants s'est focalisée sur un composé modèle, le cuivre, en interaction avec le cycle des sulfures. La quantification moléculaire du gène *dsrAB*, codant une des enzymes responsables de la production d' H_2S , a été utilisée comme indicateur de la production de sulfure par voie microbienne. Pour mieux appréhender les transformations biogéochimiques au sein des premières couches de la colonne sédimentaire, les entités sulfurées inorganiques (sulfures S(-II), sulfates, AVS, CRS) ont été analysées et les acides gras ont été utilisés en tant que marqueurs qualitatifs de l'activité bactérienne. L'utilisation d'un modèle de diagenèse précoce à l'état stable a montré l'influence de la bioturbation due à *N. diversicolor* sur les profils de composés dissous (oxygène, sulfates, H_2S), sans toutefois que la cinétique globale des réactions soit affectée. L'alternance des phases de dépôt et de remise en suspension du sédiment s'est révélée très importante dans un estuaire à l'hydrodynamisme élevé comme la Seine, contrôlant les concentrations de toutes les classes de contaminants dans le sédiment de surface, la spéciation chimique des métaux traces, la structure des assemblages des organismes de petite taille et la distribution des bactéries résistantes sur les vasières estuariennes.

Pour la gestion de l'environnement côtier et d'un point de vue sociétal, les principaux acquis de ces recherches

comprennent 1) la mise au point d'outils analytiques pour la spéciation et la biodisponibilité des métaux dans les eaux intersticielles ; 2) la validation de marqueurs chimiques et physiologiques chez une espèce représentative du compartiment sédimentaire ; 3) une proposition de méthodologie compréhensive pour l'évaluation de l'état de santé des écosystèmes estuariens.

Difficultés rencontrées

L'état des connaissances et l'insuffisance des données disponibles sur le "bruit de fond" ne permettent pas de se dispenser de la comparaison avec un site de référence. Ce site doit être aussi similaire que possible aux sites impactés pour tous les facteurs naturels (salinité, granulométrie, climat...). Il est beaucoup plus délicat d'éviter les différences hydrodynamiques, la plupart des estuaires soumis à de faibles pressions anthropogéniques étant de petite taille tandis que les activités humaines responsables de la présence de contaminants dans le milieu sont développées sur les rives des cours d'eau les plus importants.

Perspectives

Les marqueurs biochimiques qui ont donné lieu à une masse de travaux depuis deux décennies ont montré leurs limites, le principal reproche formulé à leur endroit étant leur faiblesse à appréhender les perturbations aux niveaux d'organisation biologique supra-individuels. Un ouvrage récent (Amiard et Amiard-Triquet, coordinateurs, Lavoisier, 2008) a mis en lumière des biomarqueurs plus effectifs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Ces marqueurs (paramètres lysosomaux, bioénergétique, comportement, perturbations endocriniennes, génotoxicité, immunotoxicité) peuvent être utilisés avec profit par rapport à la problématique des mélanges. En cas de perturbation, une approche multi-marqueur classique n'en reste pas moins pertinente pour cibler les classes de contaminants responsables. Les quantifications de contaminants dans le sédiment et les organismes d'intérêt (concentrations globales mais surtout fractions spécifiques et métabolites) permettront de valider les hypothèses dérivées de l'approche multi-marqueurs. Chez

plusieurs espèces-clés de la structure et du fonctionnement de l'écosystème, le lien entre ces perturbations observées au niveau infra-individuel et individuel devra être recherché avec les effets au niveau des populations, des assemblages et des communautés. S'agissant d'espèces-clés, ces perturbations au niveau supra-individuel sont susceptibles d'engendrer des désordres écologiques qui peuvent être examinés en prenant particulièrement en compte les processus de bioturbation impliqués dans les cycles biogéochimiques et les relations trophiques qui conditionnent les disponibilités alimentaires (à la fois en terme de ressource énergétique et de risque de transfert de contaminant).

Actions de transfert et perspectives pratiques

La réalisation de ce programme incluant des spécialistes de la chimie, de l'écotoxicologie et de l'écologie est exemplaire de la multidisciplinarité indispensable au développement des sciences environnementales. De l'ensemble des résultats obtenus, nous attendons une évaluation de l'état écologique du milieu estuarien généralisable à d'autres d'estuaires dans le monde. C'est pourquoi un ouvrage a été réalisé autour des résultats que nous avons acquis dans le cadre du PNETOX, avec l'apport d'autres projets soutenus par PNETOX (APR 2001, Forget-Leray *et al.*) et d'autres programmes, en particulier Seine-Aval (« Environmental assessment of estuarine ecosystems : A case study », coordonné par Amiard-Triquet & Rainbow, CRC Press, Boca Raton, FL., USA, édition en cours) . Cet ouvrage se termine par des recommandations sur le choix des sites de référence, l'évaluation chimique de la qualité environnementale, la biosurveillance à l'aide des biomarqueurs, le choix des espèces sentinelles, la prise en compte des facteurs de confusion, la modélisation et les plans d'échantillonnage raisonnés.

Valorisations



Articles scientifiques

- Billon et al. (2007). *J. Soils Sediments*, 7 : 17-24.
- Bragigand et al. (2006). *Sci. Total Environ.*, 368 : 615-626.
- Deloffre et al. (2007). *Mar. Geol.*, 235 : 151-164.
- Durou et al. (2005). *Environ. Toxicol.*, 20 : 23-31.
- Durou et al. (2007a). *Environ. Pollut.*, 148 : 445-458.
- Durou et al. (2007b). *Ecotox. Environ. Saf.*, 66 : 402-411.
- Durou et al. (2008). *Water Res.*, 42 : 2157-2165.
- Gillet et al. (2008). *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 76 : 201-210.
- Poirier et al. (2006). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 86 : 71-82.
- Ramond et al. (2008). *Mar. Pollut. Bull.*, 56 : 1168-1176

APR 2001

Identification et quantification de substances à visée thérapeutique ou diagnostique dans les stations d'épuration et évaluation des effets potentiels sur des organismes non cibles

Partenaires

• UMR 5569 "Hydrosciences", Montpellier : C. Casellas, H. Fenet, E. Gomez, F. Elbaz-Poulichet, J.-L. Seidel, N. Laville • Cemagref, Lyon : J. Garric, B. Fraysse • IRSN DPRE/SERLAB/LRE, Saint-Paul-Lez-Durance : C. Adam • Université Paul Verlaine, Metz : P. Vasseur, S. Pachura • INERIS, Unité d'évaluation des risques écotoxicologiques, Verneuil-en-Halatte : N. Laville, S. Ait-Aïssa, J.M. Porcher • U 540, INSERM, Montpellier : A. Pillon, P. Balaguer.

Coordinateur

• Claude Casellas
UMR-5569 "Hydrosciences"
Département Sciences de l'Environnement et Santé Publique
IUP - Faculté de Pharmacie
15, Av. Charles Flahault - BP 14 491
34093 Montpellier Cedex 3
casellas@univ-montp2.fr

Mots clés

Médicaments,
Stations d'épuration,
Organismes non cible,
Effets non intentionnels,
Écotoxicité

Objectifs

Les médicaments sont des substances ou des mélanges possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales. Les molécules mères et/ou leurs métabolites sont rejetés continuellement dans les milieux aquatiques essentiellement par le biais des effluents de stations d'épuration après leur utilisation thérapeutique ou diagnostique. L'objectif de cette étude est d'une part d'évaluer les concentrations de certains médicaments trouvés dans des effluents de stations d'épuration et, d'autre part, de rechercher les effets potentiels sur les organismes non cibles.

Résultats

Quatre stations d'épuration de charge et de taille différente ont été sélectionnées. Des substances appartenant à différentes classes pharmaceutiques ont été retrouvées en entrée et/ou en sortie de stations d'épuration en fonction de leur taux d'élimination ou de leur usage en milieu hospitalier. L'étude des effets non intentionnels des médicaments sur des modèles correspondant à différents niveaux de réponses biologiques ont été utilisés et développés. Sur hépatocytes de poissons, plusieurs médicaments, seraient inhibiteurs d'activité EROD ou inducteurs et semblent donc capables de perturber l'activité métabolique des poissons. Certaines molécules sont cytotoxiques et capables d'induire un stress oxydant à des concentrations sub-létales. Les tests sur *Hydra*

attenuata montrent que pour les substances étudiés, aucune n'a d'effet sur la survie des adultes à des concentrations environnementales possibles. Des bioessais sur trois espèces (*Ceriodaphnia dubia*, *Brachionus calyciflorus* et *Danio rerio*) regroupant 2 niveaux trophiques et 2 niveaux de toxicité ont permis de classer les molécules testées vis à vis de leurs effets sur ces 3 espèces modèles. L'étude des perturbations de développement embryonnaire de *D. rerio* a permis de compléter ces études. Les essais sur la truite arc en ciel de l'iode-131 ont montré, qu'en termes d'écotoxicité, les radiopharmaceutiques étudiés sont éliminés biologiquement assez rapidement.

Action de transfert et perspectives d'application

Un colloque intitulé « Risques sanitaires et écologiques des résidus de médicaments dans les eaux : Rapprocher Science et Décision » a eu lieu en juin 2005 et a permis de restituer aux scientifiques et gestionnaires les résultats de ce programme. Les communications issues de ce colloque sont parues dans le numéro juillet-août 2006 de la revue « Environnement, Risque, Santé ».



Valorisations



Articles scientifiques

• Laville N., Ait-Aïssa S., Gomez E., Casellas C., Porcher J. M. (2004) Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology*, 196, Issues 1-2 : 41-55.

Articles parus dans « Environnement, Risque, Santé », juillet-août 2006

- Editorial. les médicaments : contaminants émergents ? - C. Casellas
- Devenir des médicaments dans l'environnement - H. Fenet
- Les produits radiopharmaceutiques dans les effluents hospitaliers et domestiques - C. Adam
- Détection de produits pharmaceutiques ligands de récepteurs nucléaires dans les milieux environnementaux. - Pillon A.
- Le modèle Hyde pour l'évaluation de l'impact sur le développement - P. Vasseur, S. Pachura
- Application de modèles *in vitro* à l'étude des effets des médicaments chez les poissons - N. Laville
- Impact de médicaments à usage humain sur les organismes aquatiques d'eau douce - J. Garric

Thèses

- Laville N. (2005) Evaluation de l'(éco-)toxicité et du potentiel perturbateur endocrinien de contaminants aquatiques à l'aide de modèles cellulaires humains et de poissons. Thèse de doctorat, Université de Montpellier II, 193 p.
- Pachura S. (2006) Le modèle Hyde pour l'évaluation de l'impact sur le développement. Thèse de doctorat- Université de Metz.

APR 2001

Transfert, biocaccumulation, biotransformation et effets des composés aromatiques chez un copépode de l'estuaire de la Seine, *Eurytemora affinis*

Partenaires

- LPTC, UMR 5472 CNRS, Université Bordeaux 1 : Hélène BUDZINSKI
- LEMA, UPRES-EA 3222, GDR Imophys, IFRMP 23, Université du Havre : Kévin CAILLEAUD (Bordeaux et Le Havre)

Coordinateur

- Joëlle Forget-Leray
LEMA
UPRES-EA 3222, GDR Imophys, IFRMP 23
Université du Havre
25 rue Philippe Lebon - BP 540
76058 LE HAVRE cedex
forgetj@univ-lehavre.fr

Mots clés

Bioaccumulation, *Eurytemora affinis*, Hydrocarbures aromatiques polycycliques, Polychlorobiphényles, Bioessais

Objectifs

Eurytemora affinis est l'espèce prédominante du zooplancton de la zone oligohaline de l'estuaire de la Seine et se localise en marge du bouchon vaseux. Cette zone est fortement contaminée et il est important de connaître les modes d'action des contaminants sur cette espèce clé du réseau trophique de l'estuaire de la Seine.

Les objectifs de ce projet étaient multiples :

- Développement méthodologique de l'analyse de la bioaccumulation des HAP et PCB chez *Eurytemora affinis*,
- Développement de bioessais sur 10 et 21 jours avec l'organisme estuarien *Eurytemora affinis*,
- Détermination des seuils de sensibilité des mélanges étalons HAP et PCB,
- Application méthodologique des techniques de dosage pour évaluer la bioaccumulation et la biotransformation des HAP et PCB chez *Eurytemora affinis*,
- Evaluation de la biodisponibilité des PCB et des HAP dans les sédiments naturels de Seine,
- Application des bioessais développés sur les différents compartiments naturels.

Résultats

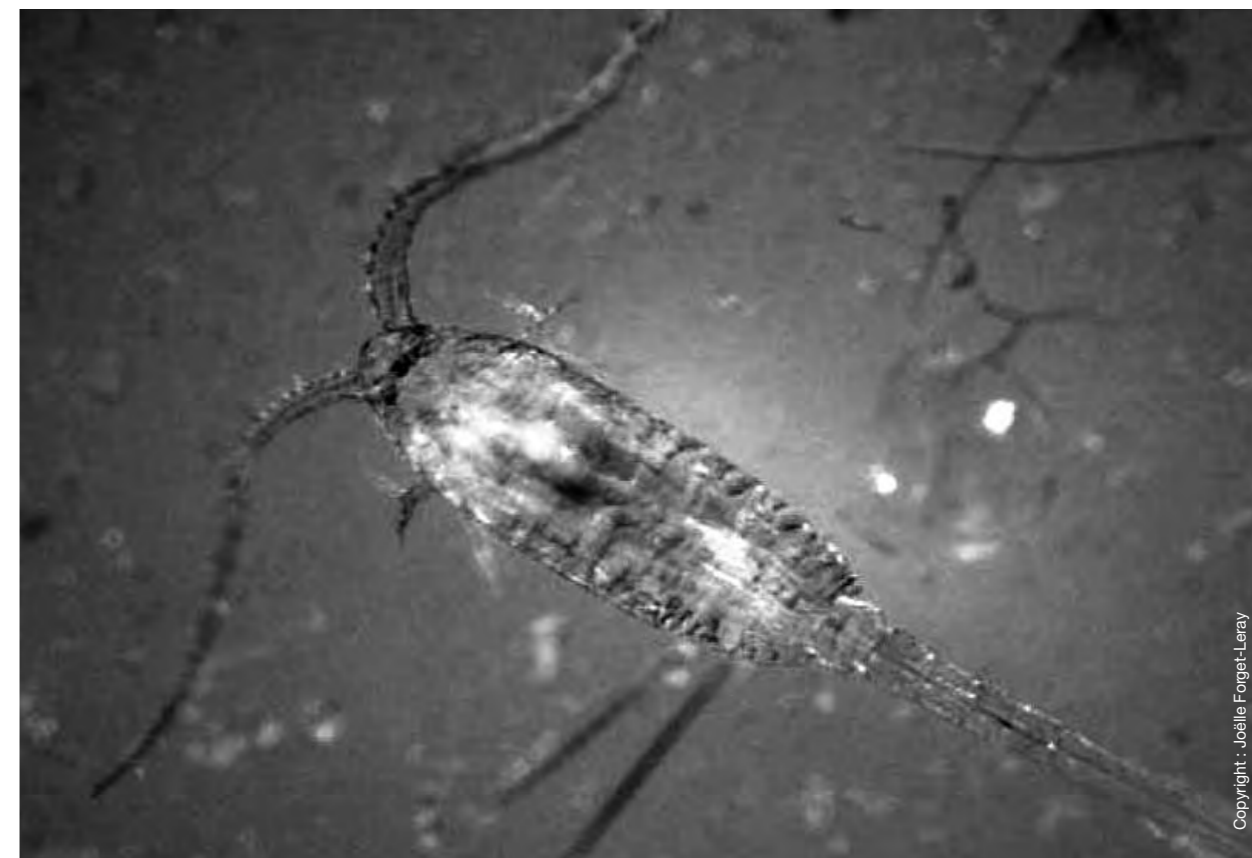
Les PCB et les HAP présents dans le compartiment biologique et dans le compartiment bouchon vaseux ont été identifiés et quantifiés. Des niveaux de contamination

élevés en PCB et HAP ont été mesurés dans les copépodes *Eurytemora affinis* prélevés en Seine (jusqu'à 3000 ng.g⁻¹ de poids sec pour les PCB et pour les HAP). Des expériences d'exposition à des mélanges étalons de PCB et HAP nous ont permis de déterminer des NOEC et LOEC sur 10 jours compris entre 1,09 et 17,35 µg.L⁻¹ et d'évaluer des effets de ces mélanges étalons sur la reproduction au bout de 21 jours. Des expériences réalisées au laboratoire sur des solutions étalons de HAP et PCB ont révélé une bioaccumulation de ces composés chez *Eurytemora affinis*. Des effets sur la reproduction et la survie ont été observés après exposition à des éluviats de sédiments naturels provenant de la Seine avec un taux de fécondation et une viabilité des naupli plus faibles.

Cette étude nous a permis de donner des éléments de réponse sur la capacité de bioaccumulation et de biotransformation du copépode *E. affinis*, un organisme à la base du réseau trophique. Des effets sur la reproduction ont également été constatés. Chez cet organisme, une contamination importante en PCB et HAP via la phase dissoute a été mise en évidence, ainsi qu'une élimination active des HAP. Pour les sédiments naturels, on observe une variation saisonnière de la toxicité des sédiments, ce copépode semble être un organisme adéquat pour évaluer la toxicité des éluviats où l'effet observé est la survie.

Perspectives scientifiques identifiées

L'étude des produits de transformation des HAP et PCB et de leurs effets sur le taux de survie et la reproduction d'*Eurytemora affinis* devrait permettre de progresser dans la connaissance des mécanismes d'exposition des organismes biologiques à ces contaminants et dans la compréhension des relations entre la contamination



Copyright : Joëlle Forget-Leray

chimique de l'environnement aquatique et l'apparition des réponses toxicologiques des organismes, comme le copépode *Eurytemora affinis* à la base du réseau trophique estuarien. La physiologie des copépodes et en particulier leur cycle de reproduction extrêmement court en font potentiellement un modèle animal de choix pour l'étude des mécanismes d'action des contaminants susceptibles d'influer sur le sexe. De plus cette étude renforce le choix d'utiliser et de proposer *Eurytemora affinis* comme espèce bioindicatrice pour l'évaluation de la qualité des eaux estuariennes.

Action de transfert et perspectives pratiques

Ce travail a permis notamment d'adapter des protocoles d'analyses pour les PCB et HAP à des microorganismes comme les copépodes (crustacés), mais également de développer un bioessai sur 21 jours permettant d'évaluer des effets sur la reproduction.

Valorisations



Articles scientifiques

Cailleaud K., Forget-Leray J., Souissi S., Hilde D., LeMenach K. & Budzinski H. (2007) Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer on a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoida, copepoda). Part1: PCBs and PAHs. **Chemosphere**, 70 : 270-280.

APR 2001

Ecotoxicologie et modélisation des systèmes biologiques

Partenaires

- Laboratoire d'écotoxicologie, UR BELY, Cemagref Lyon : A. Péry
- UMR INRA - Agrocampus 985 "Ecobiologie et Qualité des Hydrosystèmes Continentaux", Equipe "Ecotoxicologie et Qualité des Milieux aquatiques" : L. Lagadic, M. Servia
- Université de Lyon 1, CNRS UMR 5558, Laboratoire de Biométrie - Biologie Evolutive : S. Charles, M. Ferreol, C. Lopes

Coordinateur

- **Jeanne Garric**
Cemagref - Groupement de Lyon
UR BELY
Laboratoire d'écotoxicologie
3 bis Quai Chauveau - CP 220
69336 LYON Cedex 9
garric@lyon.cemagref.fr

Mots clés

Biomarqueurs,
Modélisation,
Chironome,
Sédiment,
Dynamique de population

Objectifs

L'énergie est l'une des principales clés de compréhension du fonctionnement biologique et écologique des organismes vivants.

Notre étude chez le chironome *Chironomus riparius*, fréquemment utilisé au cours des tests de toxicité comme indicateur de la qualité des sédiments, s'est intéressée à l'énergie, depuis le niveau individuel (mesures de sucres et de lipides dans les organismes) jusqu'au niveau population (effets des toxiques sur la biomasse et le taux d'accroissement asymptotique de la population).

Résultats

Au niveau individuel, des modèles à fondement biologique ont été proposés et validés. Ils permettent l'estimation de paramètres de toxicité indépendants du temps et ayant une pertinence biologique. Ils aident à la détermination du mode d'action physiologique du contaminant et proposent des allures de courbes de toxicité en adéquation avec les données observées.

En ce qui concerne les biomarqueurs, des mesures de sucres et de lipides ont été mises au point. Pour le chironome, il est apparu que seuls les lipides sont à même de rendre compte de l'exposition à un toxique ou de l'influence de la nourriture et de la matière organique. Cependant, l'utilisation sur le terrain semble délicate, du fait d'un bruit de fond important. La mesure de l'accumulation de toxiques nous est apparue beaucoup plus prometteuse pour rendre compte à la fois de l'exposition et des effets.

Au niveau des populations, nous proposons deux approches. La première, permet de déduire les effets des

toxiques sur la biomasse et la densité de population. Cette approche permet d'isoler l'influence de la toxicité sur la dynamique de population indépendamment des autres effets du milieu. La seconde approche est matricielle (Matrices de Leslie). Elle étudie en priorité le taux d'accroissement de la population et permet des comparaisons faciles avec les autres espèces ainsi qu'une étude mathématique poussée de l'influence de chaque composante du cycle de vie sur la dynamique de population.

Le lien entre ces différentes échelles a été réalisé. Les modèles de changement d'échelle se fondent entièrement sur les données modélisées au niveau individuel.

Action de transfert et perspectives d'application

Grâce à ce projet, le gestionnaire dispose désormais de techniques de mesures des biomarqueurs énergétiques et de l'accumulation en toxiques (ici des métaux) chez les organismes, de modèles d'analyses des données de toxicité pour le chironome, et de modèles de changement d'échelle lui permettant d'intégrer en un ou deux paramètres populationnels l'ensemble des données de toxicité disponibles pour l'ensemble des paramètres du cycle de vie.



Valorisations



Logiciel

Ce projet est à l'origine de la mise au point d'un logiciel d'analyse des données obtenues par des tests de toxicité avec le chironome : CHIMOTOX, <http://www.lyon.cemagref.fr/bea/tox/logiciel.shtml>

Articles scientifiques

- Servia M.J., Heydorff M., Péry A.R.R., Garric J., Lagadic L. (2006) Sex- and developmental stage-related changes in energy reserves in fourth-instar larvae of the midge *Chironomus riparius* Meigen (Diptera : Chironomidae) : implications for ecotoxicity testing, **Environmental Entomology**, 35 : 865-874.
- Servia M.J., Péry A.R.R., Heydorff M., Garric J., Lagadic L. (2006) Effects of copper on energy metabolism and larval development in the midge *Chironomus riparius*, **Ecotoxicology**, 15 : 229-240.
- Péry A.R.R., Babut M.P., Mons R., Garric J. (2006) Deriving effects on *Chironomus* population carrying capacity from standard toxicity tests, **Environmental Toxicology and Chemistry**, 25 : 144-148.
- Péry A.R.R., Garric J. (2006) Modelling effects of temperature and feeding level on the life cycle of the midge *Chironomus riparius* : an energy-based modelling approach, **Hydrobiologia**, 553 : 59-66.
- Lopes C., Péry A.R.R., Chaumot A., Charles S. (2005) Ecotoxicology and population dynamics : using DEBtox models in a Leslie modeling approach, **Ecological Modelling**, 188 : 30-40.
- Péry A.R.R., Béthune A., Gahou J., Mons R., Garric J. (2005) Body-residues : a key variable to analyze toxicity tests with *Chironomus riparius* exposed to copper-spiked sediments, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 61 : 160-167.
- Péry A.R.R., Mons R., Garric J. (2005) Modelling of the life cycle of *Chironomus* species using an energy-based model, **Chemosphere**, 59 : 247-253.
- Péry A.R.R., Mons R., Garric J. (2004) Energy-based modeling to study population growth rate and production for the midge *Chironomus riparius* in ecotoxicological risk assessment, **Ecotoxicology**, 13 : 647-656.
- Charles S., Ferreol M., Chaumot A., Péry A.R.R. (2004) Food availability effect on population dynamics of the midge *Chironomus riparius* : a Leslie modeling approach, **Ecological Modelling**, 175 : 217-229.
- Péry A.R.R., Mons R., Ducrot V., Garric J. (2004) Effects of methiocarb on *Chironomus riparius* survival and growth with and without tube-building, **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 72 : 358-364.
- Ducrot V., Péry A.R.R., Mons R., Garric J. (2004) Energy-based modeling as a basis for the analysis of reproductive data with the midge *Chironomus riparius*, **Environmental Toxicology and Chemistry**, 23 : 225-231.
- Péry A.R.R., Sulmon V., Mons R., Garric J. (2003) A model to understand the confounding effects of natural sediments in toxicity tests with *Chironomus riparius*, **Environmental Toxicology and Chemistry**, 22 : 2476-2481.
- Péry A.R.R., Ducrot V., Mons R., Garric J. (2003) Modelling toxicity and mode of action of chemicals to analyze growth and emergence tests with the midge *Chironomus riparius*, **Aquatic Toxicology**, 65 : 281-292.
- Péry A.R.R., Ducrot V., Mons R., Miège C., Gahou J., Gorini D., Garric J. (2003) Survival tests with *Chironomus riparius* exposed to spiked sediments can profit from DEBtox model, **Water Research**, 37 : 2691-2699.
- Péry A.R.R., Mons R., Flammarion P., Lagadic L., Garric J. (2002) A modeling approach to link food availability, growth, emergence, and reproduction for the midge *Chironomus riparius*, **Environmental Toxicology and Chemistry**, 21 : 2507-2513.
- Péry A.R.R., Flammarion P., Vollat B., Bedaux J.J.M., Kooijman S.A.L.M., Garric J. (2002) Using a biology-based model (DEBtox) to analyze bioassays in ecotoxicology : opportunities and recommendations, **Environmental Toxicology and Chemistry**, 21 : 459-465.

Toxicogénomique des perturbateurs endocriniens de la reproduction chez la truite arc-en-ciel

Partenaires

• INRA, SCRIBE :

Daniel Baron, Julien Bobe, Alexis Fostier, Yann Guiguen, Emilie Haon-Lasportes, Florence Le Gac, Jérôme Montfort, Hélène Rime

Coordinateur

• Gilles Monod

INRA, SCRIBE
Campus de Beaulieu
35042 Rennes
gilles.monod@rennes.inra.fr

Mots clés

Toxicogénomique,
Puce à ADN, Truite,
Reproduction,
Perturbateur endocrinien

➔ Objectifs

Il est difficile d'authentifier l'origine endocrinienne des perturbations affectant les performances reproductrices via la seule analyse de critères fonctionnels. Or, le mode d'action des hormones repose sur la modulation de réseaux de gènes dans les cellules cibles. Par conséquent, l'analyse de l'expression des gènes de ces cellules apparaît comme une approche *a priori* intéressante pour caractériser des biomarqueurs spécifiques de perturbations endocriniennes. La toxicogénomique vise à caractériser, [1] des gènes ou des groupes de gènes dont le niveau de transcription rend compte d'une exposition à un toxique, [2] comment la modulation de la transcription du génome découlant de l'exposition à des polluants chimiques peut déboucher sur des effets toxicologiques fonctionnels.

En 2001, lors de la conception de ce projet, la démarche de type "gène candidat" (quelques gènes marqueurs choisis *a priori*) représentait l'approche classiquement mise en œuvre dans les travaux relatifs à l'étude des bases moléculaires de l'effet des perturbateurs endocriniens (par exemple, activation des gènes de la vitellogénine et du récepteur aux œstrogènes par des xénoœstrogènes chez différentes espèces de poissons). Mais une approche complémentaire était en développement : l'identification de tous les transcrits (ARNm) d'un type cellulaire ou d'un tissu donné afin de définir le répertoire des gènes exprimés (transcriptome). C'est cette approche sans *a priori*, à haut débit, basée sur l'utilisation de "puces à ADN" (micro-réseaux d'ADN complémentaires des ARNm recherchés) qui a été mise en œuvre dans le cadre de ce projet, avec l'appui du programme AGENAE (Analyse des GENomes des Animaux d'Elevage) de l'INRA, et avec la truite comme poisson modèle.

➔ Résultats

Les expériences ont porté sur la différenciation sexuelle et 2 phases précises de la gamétogenèse : l'initiation de la spermatogenèse chez le mâle, et la maturation ovocytaire chez la femelle. Ces processus sont sous contrôle endocrinien étroit. La démarche générale suivie s'est décomposée en 3 étapes : [1] Réalisation d'expérimentations d'exposition à des xénobiotiques, *in vivo* ou *in vitro*, visant à révéler des effets phénotypiques et à récolter des populations de transcrits (ARN messagers) représentatifs de conditions "témoins" et de conditions "traitées" ; [2] Analyse des transcrits ; [3] Mise en relation des profils d'expression génique et des effets phénotypiques constatés.

Effet "gonadotropin-like" de fongicides "azoles" vis-à-vis de la maturation ovocytaire *in vitro*

À l'issue de la vitellogenèse, la maturation ovocytaire est déclenchée par les gonadotropines (hormones hypophysaires). Nos résultats montrent que des matières actives comme le prochloraz, l'époxyconazole, et à un degré moindre l'imazalil, potentialisent très fortement l'activité des gonadotropines. De plus, le prochloraz et l'époxyconazole peuvent, à eux seuls, induire la maturation ovocytaire. Ces travaux représentent la première démonstration d'un effet "gonadotropin-like" par des xénobiotiques et suggèrent l'existence d'un type de perturbation endocrinienne qui n'avait pas encore été décrit.

Effet d'un xéno-androgène sur le transcriptome gonadique en cours de différenciation sexuelle

Un traitement de juvéniles femelles à la 11bêta-hydroxyandrostenedione (11bOHD4) aboutit à une transdifférenciation testiculaire des gonades (développement de gonades mâles au lieu de gonades femelles). Cependant ce traitement n'induit pas un profil d'expression génique comparable à celui observé lors de la différenciation testiculaire naturelle (chez les mâles témoins). Plusieurs groupes de gènes co-exprimés signent ainsi cette différence entre trans-différenciation testiculaire induite par la 11bOHD4 et différenciation testiculaire naturelle. L'exposition à un xéno-androgène induit donc une empreinte transcriptomique singulière.

Effet d'un xéno-œstrogène et d'un xéno-androgène sur le transcriptome testiculaire

De nombreux gènes sont également perturbés dans la gonade mâle prépubère lors d'une exposition *in vivo* à un œstrogène (œstradiol) ou à un androgène (testostérone). Cette dérégulation coïncide avec des anomalies de la fonction testiculaire : blocage (réversible) de la spermatogenèse dans les gonades exposées à l'œstradiol ; anomalies histologiques dans les gonades exposées à la testostérone.

➔ Perspectives scientifiques identifiées

A l'heure du bilan, l'idée force du programme initial, c'est-à-dire mettre en œuvre des protocoles à partir desquels il serait possible de confronter la réponse du transcriptome à celles de niveaux d'organisation supérieurs, est confortée. En effet, il est extrêmement important de pouvoir aborder l'analyse du transcriptome, et l'étude de sa réponse aux toxiques, dans le cadre de processus biologiques dont le déroulement est bien connu et maîtrisé en conditions expérimentales. Au plan technologique, la PCR quantitative pourrait à l'avenir rester la technique utilisée pour le suivi de quelques dizaines de gènes. Par contre, les puces de haute densité (plusieurs milliers de gènes) seront sans doute l'outil incontournable pour réaliser des travaux sur le mécanisme d'action des perturbateurs endocriniens. La simplification probable des techniques d'utilisation des puces, associée au développement de modèles d'analyse des données de plus en plus accessibles et performants, devraient permettre de progresser rapidement dans ce domaine.

➔ Actions de transfert et perspectives pratiques

Les travaux basés sur l'utilisation de "puces à ADN" dans les domaines de la biologie cellulaire, de la pathologie, de la pharmacologie, de la toxicologie, de l'agronomie (en particulier vis-à-vis de modèles végétaux), se sont accumulés ces dernières années. Par contre, en écotoxicologie, peu de résultats originaux ont été publiés. En fait,

si la toxicogénomique appliquée à la santé humaine, en raison du fond de connaissances important, et de la qualité élevée des outils disponibles, donne l'impression d'avancer à grands pas, la toxicogénomique appliquée à la santé de l'environnement ("écotoxicogénomique") est largement tributaire de la relative méconnaissance des bases moléculaires des modèles biologiques auxquels elle s'adresse, et du caractère "prototypique" des outils avec lesquels elle fait ses premières armes.

En écotoxicologie aquatique, il est probable qu'il faudra encore des développements importants et de nombreuses études de validation pour que cette approche puisse se justifier comme moyen de pronostic (prévision des effets) sur des individus de poissons sauvages. En effet, dans ce contexte, la versatilité du transcriptome et l'impossibilité de connaître avec précision le degré d'homogénéité des échantillons récoltés (âge, état nutritionnel, etc.), sont des sources de bruit de fond a priori très pénalisantes. De manière plus optimiste, on peut penser que, en tant qu'outil de mise en évidence d'une exposition à telle ou telle xéno(anti)hormone, l'utilisation de puces à ADN pourra être réalisée à moyen terme. Mais il reste à caractériser, en conditions expérimentales, des signatures suffisamment robustes et discriminantes pour chacune des différentes classes de perturbateurs endocriniens.

À plus court terme, l'utilisation de puces à haute densité pourrait être envisagée pour l'évaluation de nouvelles substances avant leur mise sur le marché, ou, pour la révision de substances anciennes. En effet, ces procédures reposent sur des tests réalisés avec des espèces modèles (poisson zèbre, médaka, truite), dont le transcriptome est en passe d'être complètement annoté. Il sera alors possible de caractériser l'empreinte transcriptomique complète des composés testés. Et cette empreinte pourra alimenter l'évaluation du risque par comparaison avec l'empreinte de perturbateurs endocriniens connus.

Valorisations

Publications scientifiques

- Baron, D. & Guiguen, Y. (2004), Gene expression during gonadal sex differentiation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) : from candidate genes studies to high throughput genomic approach, **Fish Physiology and Biochemistry** 28 : 119-123.
- Baron, D., Fostier, A., Breton, B. & Guiguen, Y. (2005), Androgen and estrogen treatments alter steady state messengers RNA (mRNA) levels of testicular steroidogenic enzymes in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, **Molecular Reproduction and Development** 71 : 471-479.
- Baron, D., Houllatte, R., Fostier A., Guiguen, Y. (2005), Large-scale temporal gene expression profiling during gonadal differentiation and early gametogenesis in rainbow-trout, **Biology of Reproduction** 73 : 959-966.
- Bobe, J., Rime, H., Fostier A. & Monod, G. Prochloraz-induced oocyte maturation in rainbow trout, a gonadotropin-like effect but a gonadotropin-unlike mechanism? (en préparation).
- Mazurais, D., Montfort, J., Delalande, C., Le Gac, F. (2005), Transcriptional analysis of testis maturation using trout cDNA macroarrays, **General and Comparative Endocrinology** 142 : 143-154.
- Monod G., Rime H., Bobe J., Jalabert B. (2004), Agonistic effect of imidazole and triazole fungicides on *in vitro* oocyte maturation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), **Marine Environmental Research** 58 : 143-146.

Thèse

- Baron D. (2005), Utilisation des outils de la génomique expressionnelle pour l'étude de la différenciation sexuelle chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*. Thèse de doctorat (Biologie), Université de Rennes 1 et Agrocampus.

Utilisation des biomarqueurs dans les stades embryo-larvaires de bivalves marins comme outils rapides et sensibles d'évaluation et de gestion du risque chimique. Essai de validation *in situ*

Partenaires

• UMR R.O.S.E, Nice, M. Gnassia-Barelli, G. Damiens, V. Morton - Service d'Ecotoxicologie ISOMer - SMAB, Université de Nantes : C. Amiard-Triquet, C. Durou, C. Mouneyrac • Ifremer, Arcachon : E. His • Ifremer, Brest : F. Quiniou, X. Caisey • Laboratoire de la Communauté d'agglomération Nice-Côte d'Azur : F. Pin, D. Laurent, P. Pacini et D. Gavalda • Laboratoire de Physico-Toxico-Chimie LPTC, UPRESA 5472, Université de Bordeaux I : H. Budzinski • EA 2069 URVVC, Laboratoire d'Eco-Toxicologie, Faculté des Sciences Exactes et Naturelles de Reims : A. Geffard

Coordinateur

• Michèle Roméo
UMR 1112 INRA-UNSA R.O.S.E. "Réponse des Organismes aux Stress Environnementaux", EA 4228 ECOMERS (au 1/01/2008), Faculté des sciences, BP 71, Parc Valrose 06108 Nice cedex 2 romeo@unice.fr

Mots clés

Larves, Huîtres, Biomarqueurs, Polluants, Transplantation

Objectifs

L'objectif principal du travail a été d'évaluer si des biomarqueurs qui sont des changements moléculaires, biochimiques et cellulaires provoqués par les substances chimiques pouvaient constituer un signal d'alarme précoce chez les larves de bivalves marins exposées à divers polluants. De nombreuses éclosions européennes peuvent en effet être confrontées à des problèmes de croissance larvaire sans qu'aucune anomalie morphologique ni aucun germe pathogène ne puissent être décelés. Il pourrait s'agir d'anomalies environnementales liées à la pollution du milieu, d'où l'intérêt de ce travail. Un essai de transplantation *in situ* a été prévu pour valider les résultats de laboratoire.

Résultats

Les larves D de l'huître *Crassostrea gigas* ont été obtenues à partir de géniteurs provenant d'éclosions, l'induction de la ponte a été réalisée en laboratoire par choc thermique. Les biomarqueurs ont été mesurés à la fin du développement des larves (24 h). Le choix s'est porté sur des biomarqueurs de dommage : l'activité de l'acétylcholinestérase AChE, inhibée par certains pesticides ou dans certains cas par des métaux lourds ou des toxines algales, le taux de peroxydation lipidique évalué en termes de TBARS (thiobarbituric acid reactive substances), indiquant une atteinte aux membranes lipidiques, des biomarqueurs de défense tels que l'activité de la glutathion transférase GST,

enzyme de phase II prenant en charge les métabolites issus de la phase I de biotransformation des organiques (catalysée par l'EROD, notamment) pour faciliter leur excrétion, l'activité de l'enzyme anti-oxydante catalase (CAT), enfin le taux de métallothionéines (MT), protéines de piégeage et de détoxification des métaux. Les variations de la réponse biomarqueur en fonction de la température et la salinité du milieu ont permis de fixer les conditions expérimentales à 23 °C et 30 ‰. Les polluants choisis, qu'ils soient métalliques (cuivre et cadmium) ou organiques (atrazine, carbofuran et malathion), ont tendance à faire baisser l'activité AChE et au contraire augmenter les activités GST et CAT. Les variations du taux de TBARS sont moins significatives. Enfin les taux de MT augmentent dans les larves exposées au cuivre et surtout au cadmium qui accumulent ces deux métaux. Quand deux couples de géniteurs sont testés, à des saisons et/ou périodes de maturité différentes, pour un même contaminant, des différences dans la réponse biomarqueur des larves sont observées. Le même phénomène est aussi noté quand les géniteurs sont prélevés dans des zones à forte pression anthropique (Bidassoa : forte contamination en métaux) par rapport à des zones relativement propres (Arcachon).

La validation sur le terrain a pu être réalisée, grâce à un dispositif de conteneurs à larves mis au point et breveté par l'IFREMER, à l'entrée (A) et dans le fond (P) du port d'Arcachon. Après 48 h, l'activité GST et le taux de TBARS sont plus élevés dans les larves se développant en P par rapport à celles de A. Le taux de MT et celui de cuivre tendent à croître de A en P tandis que l'activité AChE diminuerait en P. Les concentrations en hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans les larves sont plus élevées en A qu'en P. Les deux sites sembleraient donc exposés l'un aux HAP (A) et l'autre au cuivre (P) plus vraisemblablement au TBT présent dans les sédiments du port.

En conclusion, les résultats montrent une réponse rapide (de 24 h à 48 h) aux polluants chez les larves d'huîtres qui seraient un matériel biologique de choix pour des études de biosurveillance en périodes favorables au développement larvaire. Les objectifs annoncés ont été pleinement atteints, les résultats acquis sont les premiers publiés sur des marqueurs biochimiques déterminés sur des larves de bivalves exposées à différents contaminants *in vitro* et *in situ*. Seule la MT avait été étudiée auparavant chez ces larves.

Difficultés rencontrées et perspectives scientifiques identifiées

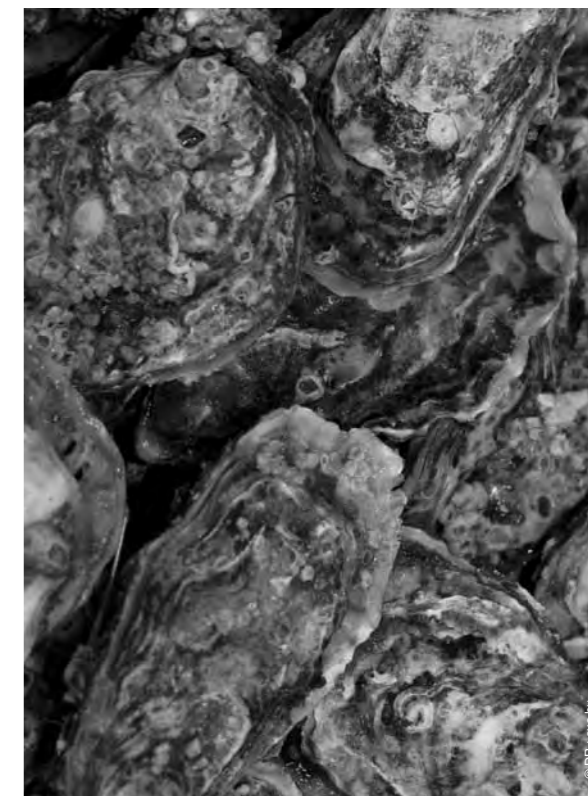
Dans une perspective de recherche (banque soustractive) ou d'application plus immédiate, il faudrait s'affranchir des difficultés rencontrées lors de l'étude. En effet pour les huîtres, le test *in situ* se déroulant mieux à des températures supérieures à 19 °C, facteur limitant pour l'obtention d'une quantité suffisante de larves D normales, l'emploi de larves de moules dont le développement est optimal dès 17-18 °C pourrait constituer une alternative intéressante.

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la biosurveillance de l'environnement. La thèse de G. Damiens « Etude des effets des contaminants chimiques chez des espèces mollusques sentinelles (*Mytilus galloprovincialis* et *Crassostrea gigas*). Application à la biosurveillance de l'environnement marin », soutenue en juin 2007 (Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé, Université de Nice-Sophia Antipolis) a repris certains des résultats concernant les larves de *C. gigas*.

Une approche plus fondamentale telle que celle de la transcriptomique pourrait être développée sur les larves d'huîtres, la technique des banques soustractives employée chez les adultes de *C. gigas* a déjà permis de mettre en évidence des gènes induits ou inhibés par différents polluants. L'expression des ARN messagers de gènes codant pour des protéines de détoxification, des marqueurs de stress oxydant ou de stress général pourrait être suivie (si l'on arrive à extraire suffisamment d'ARN) et fournir des indications globales sur l'exposition des larves aux polluants.

Actions de transfert et perspectives pratiques

Différents avantages de l'utilisation des premiers stades de développement des bivalves apparaissent, notamment une sensibilité aux métaux (surtout le cuivre) et organoétoxicité plus importante chez les larves que chez les adultes. De plus, les stades larvaires ont souvent un taux d'accumulation des polluants plus important, lié à un développement plus rapide, permettant ainsi de réaliser des expériences de courte durée. Les biomarqueurs, enfin, sont des signaux d'alarme précoces traduisant l'exposition ou l'effet des polluants. Des utilisateurs potentiels, à savoir des laboratoires habilités à travailler, soit pour des ostréiculteurs, soit sur les problèmes environnementaux, par exemple, dans la mise en place de la Directive Cadre Européenne (DCE) sur l'Eau, pourraient être intéressés par la mesure de biomarqueurs chez les stades larvaires d'huîtres.



Valorisations



Articles scientifiques

- Damiens G., His E., Gnassia-Barelli M., Quiniou F., Roméo M. (2004) Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C 138 : 121-128.
- Damiens G., Mouneyrac C., Quiniou F., His E., Gnassia-Barelli M., Roméo M. (2006) Metal bioaccumulation and metallothionein concentrations in larvae of *Crassostrea gigas*. **Environmental Pollution**, 140 : 492-499.
- Quiniou F., Damiens G., Gnassia-Barelli M., Geffard A., Mouneyrac C., Budzinski H., Roméo M. (2007) Marine water quality assessment using transplanted oyster larvae. **Environment International**, 33 : 27-33.

Etude des phénomènes de bioaccumulation biotransformation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) par les organismes aquatiques (poissons). Relation exposition-génotoxicité

Partenaires

- ISM-LPTC, Laboratoire de Physico-Toxico-Chimie de l'Environnement, UMR CNRS 5255, Talence : M. Le Dû-Lacoste, K. Le Menach, B. Morin
- IFREMER, Laboratoire d'Ecotoxicologie, Département Polluants Chimiques, Nantes : T. Burgeot, F. Akcha, S. Rousseau, D. Menard

Coordinateur

- Hélène Budzinski
ISM-LPTC, Laboratoire de Physico- et Toxico-Chimie de l'Environnement, UMR CNRS 5255 - Université Bordeaux I
351 cours de la Libération - 33405 Talence
h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr

Mots clés

HAP, Métabolites, Poissons, Surveillance, Génotoxicité

Objectifs

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des contaminants ubiquistes de l'environnement marin d'une part à cause de leur stabilité importante et d'autre part à cause de la multiplicité de leurs sources (principalement production d'énergie à partir de combustibles fossiles et leur utilisation dans le transport, diverses industries métallurgiques, combustion des déchets et marées noires...). Ils sont considérés comme des contaminants prioritaires des écosystèmes tant terrestres que marins du fait de leur activité cancérogène et mutagène vis-à-vis de la faune et de la flore. L'exposition des organismes aquatiques aux HAP a été souvent évaluée en mesurant la teneur en HAP de leurs tissus. Cette approche est critiquable si l'on tient compte des capacités de biotransformation de ces organismes biologiques. Elle ne renseigne pas non plus sur les effets toxiques potentiels.

Un premier objectif des travaux proposés a donc été d'étudier les phénomènes de biodisponibilité, de bioaccumulation et de biotransformation des HAP chez des poissons marins. Il s'est agi notamment d'évaluer l'exposition des poissons benthiques aux HAP via la détermination des métabolites produits. Un second objectif a été d'étudier la relation entre présence des HAP dans le milieu, exposition des organismes à ces HAP, biotransformation et expression d'effets génotoxiques. Les altérations de l'ADN ont été déterminées par la mesure de plusieurs lésions structurales de l'ADN (cassures de brins, bases oxydées et adduits). Enfin un troisième objectif a été de proposer de nouveaux outils de biosurveillance dans le cadre de pollutions par les hydrocarbures (cas notamment des marées noires ou des rejets pétroliers) en milieu marin.

Résultats

Le projet proposé a couplé une approche au laboratoire (en utilisant le turbot (*Scophthalmus maximus*) comme poisson modèle) et une approche terrain (application des outils et validation sur une espèce de référence des programmes de surveillance de la mer du Nord : la limande (*Limanda limanda*) appliquée au cas de la Baie de Seine. L'approche en laboratoire a permis d'identifier les métabolites produits et de caractériser les lésions structurales de l'ADN (cassures de brins, bases oxydées et adduits) issues d'une contamination par les HAP sur une espèce d'élevage. L'approche terrain a eu pour but de confronter les profils obtenus dans un cas d'exposition chimique diffuse des limandes au sein d'un des estuaires les plus contaminés d'Europe par les HAP et de valider ces méthodes pour la surveillance et l'évaluation du risque chimique en milieu marin. En laboratoire, les résultats ont montré que les niveaux de métabolites quantifiés dans la bile des poissons corrélaient avec les niveaux de contamination du milieu, même si des différences de nature et de quantité de métabolites formés existaient. Une rapide production de métabolites était également observable quelques soient les niveaux d'exposition du milieu, et en particulier pour le 1-hydroxypyrene (1-OHP), métabolite majoritaire du pyrene. Ces observations corroborent l'hypothèse que les métabolites de HAP et en particulier le 1-OHP peuvent être utilisés comme biomarqueurs d'exposition précoce aux HAP, même à faible dose de contamination. A l'inverse aucune bioaccumulation dans les tissus n'a été démontrée au cours de l'exposition. Ainsi la seule caractérisation chimique des HAP parents dans les muscles et le foie n'est pas suffisante pour démontrer une exposition de l'organisme. D'autres marqueurs doivent être utilisés conjointement.

Concernant les biomarqueurs biologiques, l'analyse des cassures de brins de l'ADN a montré un effet significatif du temps d'expérimentation et de l'exposition aux HAP. Les taux de cassures pour les limandes des différents groupes d'exposition sont différents de ceux du groupe de témoins. En revanche, après 4 jours de contamination, on ne peut pas faire de différence entre les effets des 3 modalités d'exposition : sédimentaire, dissoute et éluatriat de

pétrole. Concernant l'activité EROD, seul le groupe exposé au mélange de HAP dissous présente une activité EROD moyenne significativement différente de celle du groupe témoin. Le groupe exposé au sédiment montre également une induction significative de l'activité EROD au 3^{ème} jour d'exposition. Enfin pour le dosage de la base oxydée 8-oxodG, les résultats sont similaires à ceux de l'activité EROD avec des groupes exposés au mélange de HAP dissous et au sédiment qui présentent une augmentation significative du taux de 8-oxodG montrant ainsi la génotoxicité des HAP pour deux modes de contamination différents. En Estuaire de Seine, les niveaux en métabolites biliaires mesurés ont permis de confirmer la présence de HAP dans les zones étudiées et leur biodisponibilité pour les organismes vivants. Après exposition, ces composés ont été absorbés par la limande, bioaccumulés dans ses différents tissus (foie, muscle), puis biotransformés et stockés dans la bile. Les résultats obtenus ont montré des niveaux de contamination en HAP plus élevés dans la zone de l'estuaire de la Seine par rapport à la zone centrale de la Baie de Seine. Du fait de la biotransformation, les concentrations en HAP dans les muscles sont proches de la limite de quantification dans les limandes des deux zones et ne permettent pas de différencier les niveaux d'exposition. Cependant, grâce à l'analyse des métabolites biliaires, des différences dans les niveaux de contamination chimique ont été observées avec la période et le site d'échantillonnage. En revanche, aucune différence selon l'âge ou le sexe de la limande dans les niveaux ou dans le profil de contamination n'a pu être établi avec certitude. Au cours de nos études *in situ*, l'influence de facteurs biotiques (âge, sexe) et abiotiques (site et saison d'échantillonnage) sur le niveau de cassures de brins de l'ADN de limande a été mis en évidence. Les effets de l'âge et du sexe de la limande ainsi que leur interaction significative semblent indiquer l'influence d'autres facteurs physiologiques tels que vraisemblablement le cycle de reproduction de la limande. La ponte peut en effet constituer chez les limandes femelles une voie indirecte d'élimination d'une partie des polluants chimiques absorbés au cours de son existence. La connaissance de l'influence de ces facteurs permettra d'améliorer la stratégie d'échantillonnage à adopter pour les études de biosurveillance.

Grâce aux données chimiques obtenues sur les deux années consécutives, des niveaux de base en métabolites biliaires ont pu être définis pour les deux sites d'étude. Associés aux indications données par les biomarqueurs biologiques (EROD, cassures de brins), une cartographie spatiale et temporelle de la zone étudiée a pu être mise en place. Elle associe donc les indicateurs de contaminations

chimiques et les marqueurs biologiques chez la limande et définit une base pour la surveillance et le suivi de la contamination en HAP, de cette espèce, dans cette zone géographique à forte pression économique, l'Estuaire de la Seine. C'est sur la base de ces travaux qu'un programme européen (ICON) mené conjointement par le CIEM et par l'OSPAR a vu le jour en 2008. Il a pour but d'évaluer « l'état écologique » de la mer du Nord face aux contaminants anthropogéniques en considérant les effets biologiques, dans le cadre d'une approche intégrée.

Perspectives scientifiques identifiées

Les résultats de cette étude laissent encore bien des questions en suspens. Afin d'y répondre, il faudrait étoffer le volet en laboratoire par des expérimentations plus longues afin de saturer la capacité métabolique des organismes et observer les effets de cette saturation. Il serait intéressant également d'étudier d'autres métabolites (comme les diols ou cétones). Du point de vue de la surveillance environnementale, de nouvelles campagnes sur plusieurs saisons devraient renforcer les données existantes afin de conforter ou non les résultats obtenus sur deux années, et en particulier « les niveaux de base » obtenus au cours de ces quatre campagnes.

Actions de transfert et perspectives pratiques

L'expérience acquise lors de cette étude a été valorisée sous forme de transfert méthodologique dans le cadre du programme de surveillance de la zone Manche Mer du Nord mené par OSPAR. Les données recueillies pendant deux ans ont été compilées sur une matrice et seront transmises sur la base de données internationale gérée par le CIEM. Les variations spatiales et temporelles des concentrations en HAP dans les muscles et foies et les biomarqueurs EROD, métabolites HAP, comète et 8 oxodG ont été interprétées et utilisées pour la rédaction d'une proposition de biosurveillance en estuaire de Seine (Burgeot et al., 2006). Cette proposition intègre les recommandations du JAMP (2007) concernant la stratégie d'échantillonnage et les méthodes d'analyses pour conduire un suivi des effets biologiques sur les côtes françaises sur une espèce de référence : la limande. Cette étude propose également des « niveaux de base » pour chacun des biomarqueurs. Ces niveaux de base seront utilisés par OSPAR pour la validation et l'interprétation régionale des biomarqueurs dans la rédaction du rapport de qualité de la mer du Nord qui sera publié en 2010.

Valorisations



Rapports

- Burgeot T., Akcha F., Minier C., Cachot J., Budzinski H. (2006) Position française sur le développement de bioessais et biomarqueurs en biosurveillance (OSPAR). Décembre 2006 – R.INT.DCN-BE-EX/2006.11/Nantes, 10p.
- Thain J., Vetaack D., Burgeot T., Ketil H., Cooreman K., Gubbins M., Brett L., Thomas K., Lethonen K., Kamann U. (2005) Report of the working group on biological effects of contaminants (WGBEC) ICES WGBEC Report 2005. ICES Marine Habitat Committee CM 2005/MHC:03, Ref ACME.
- Thain J., Vetaack D., Burgeot T., Ketil H., Cooreman K., Gubbins M., Brett L., Thomas K., Lethonen K., Kamann U. (2006) Report of the working group on biological effects of contaminants (WGBEC) ICES WGBEC Report 2006. ICES Marine Habitat Committee CM 2006/MHC:03, Ref ACME.
- Thain J., Vetaack D., Burgeot T., Ketil H., Cooreman K., Gubbins M., Brett L., Thomas K., Lethonen K., Kamann U. (2007) Report of the working group on biological effects of contaminants (WGBEC) ICES WGBEC Report 2007. ICES Marine Habitat Committee CM 2007/MHC:03, Ref ACME.
- Thain J., Vetaack D., Burgeot T., Ketil H., Cooreman K., Gubbins M., Brett L., Thomas K., Lethonen K., Kamann U. (2008) Report of the working group on biological effects of contaminants (WGBEC) ICES WGBEC Report 2008. ICES Marine Habitat Committee CM 2008/MHC:03, Ref ACME.

APR 2003

Impact des hydrocarbures sur les communautés bactériennes dans les zones côtières polluées : mise au point d'outils moléculaires et de bio-indicateurs pour évaluer l'impact d'une pollution

Partenaires

- Université Bordeaux I - Laboratoire de Physico- et Toxico-Chimie des Systèmes Naturels (LPTC) : Hélène Budzinski
- Université de Pau et des Pays de l'Adour - Laboratoire des Fluides Complexes (LFC) : Patrice Creux
- Université de Pau et des pays de l'Adour - Equipe Chimie Bio-Inorganique et Environnement UMR IPREM 5254 : David Amouroux

Coordinateur

- Robert Duran
- Equipe Environnement et Microbiologie
UMR CNRS IPREM 5254
Université de Pau et des Pays de l'Adour
IBEAS BP1155
Avenue de l'Université - 64013 Pau cedex
robert.duran@univ-pau.fr

Mots clés

Diversité bactérienne, Hydrocarbures, Tapis microbien, Puce ADN, Bio-senseurs

Objectifs

Dans l'environnement, les microorganismes jouent un rôle clé dans le devenir des polluants, notamment des hydrocarbures et des produits pétroliers. Les connaissances sur la réponse et l'adaptation des communautés bactériennes sont essentiellement basées sur les études menées en laboratoire avec des micro-organismes isolés pour leur capacité à dégrader les hydrocarbures. L'objectif principal du projet était de mettre en évidence les mécanismes bactériens mis en œuvre en réponse à la présence du polluant dans les écosystèmes marins côtiers. Dans cette perspective, les objectifs spécifiques étaient d'évaluer l'impact du contaminant sur la structure des communautés bactériennes et d'identifier les gènes intervenant dans la réponse bactérienne. Il était ensuite envisagé, en se basant sur les résultats obtenus, de développer des outils moléculaires, puces ADN et bio-senseurs, permettant d'évaluer l'impact des hydrocarbures sur les micro-organismes des zones côtières.

Résultats

Les tapis microbiens, structures stratifiées de micro-organismes se développant dans les zones côtières, ont été les principaux écosystèmes utilisés comme modèles. Les études ont été menées soit in situ sur des sites contaminés chroniquement, soit sur des tapis microbiens non contaminés maintenus en microcosmes au laboratoire, permettant de simuler des contaminations ponctuelles. Ainsi, dans un premier temps, les travaux ont permis d'obtenir toute une collection d'acides nucléiques métagénomiques (ADN et ARN) de différentes origines et correspondant à différents

niveaux de pollutions et degrés d'expositions. Cette collection a été caractérisée par les méthodes moléculaires actuelles et sera d'une aide précieuse pour le développement de futurs outils d'analyse.

Quel que soit le site ou le dispositif étudié, les analyses ont permis de mettre en évidence les modifications de la structure des communautés bactériennes suite à une contamination pétrolière. Ainsi, une bonne corrélation, entre la structure des communautés et le niveau de pollution, a été observée indiquant que des populations bactériennes adaptées au polluant sont mises en place. Après plusieurs mois d'exposition, les hydrocarbures sont dégradés et un retour des communautés bactériennes à la structure initiale est observé démontrant la capacité de résilience des communautés bactériennes.

Cette étude a montré tout l'intérêt de l'analyse au niveau des transcrits ARN, permettant de rendre compte l'impact du polluant plus précocement que l'analyse au niveau de l'ADN. Par contre, d'un point de vue fonctionnel, les analyses ont montré que la diversité des gènes modèles suivis, naphthalène/phénanthrène dioxygénase pour le métabolisme aérobie et benzyl-succinate-synthase pour le métabolisme anaérobie, n'était pas modifiée. Il est donc nécessaire de trouver de nouveaux gènes permettant de rendre compte de l'impact du polluant sur les communautés bactériennes. La méthode d'expression différentielle a été adaptée pour l'analyse de communautés bactériennes complexes afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans les mécanismes bactériens d'adaptation en réponse à la présence de polluant.

Cette approche a permis de mettre en évidence plusieurs gènes candidats codant essentiellement pour des protéines membranaires ou des transporteurs. Ces nouveaux gènes pourront être utilisés comme gènes cibles afin d'appréhender l'impact de polluants sur les communautés bactériennes.



Difficultés rencontrées et perspectives scientifiques identifiées

Des difficultés ont été rencontrées pour le développement des outils moléculaires envisagés pour évaluer l'impact des hydrocarbures sur les micro-organismes. L'extraction des polluants des matrices complexes est le principal obstacle pour la mise en place des bio-senseurs.

Des problèmes répétitifs de dépôt des sondes ont repoussé l'analyse par puce ADN. Les essais n'ont pu être réalisés que sur des puces de qualité médiocre. Malgré ces difficultés, cette technologie reste prometteuse et nous envisageons, dans l'avenir, de développer une puce comportant les différents gènes identifiés par la méthode d'expression différentielle. Les nouveaux gènes identifiés par expression différentielle présentent un réel potentiel pour évaluer l'impact des hydrocarbures sur les communautés bactériennes et déterminer leur potentiel de dégradation. Toutefois, l'exploitation éventuelle de ces gènes passe par leur caractérisation fonctionnelle. Cette étape pourrait être facilitée par des analyses métagénomiques, qui sont en plein essor depuis l'amélioration considérable des méthodes de séquençage. Ces approches vont

permettre de compléter la panoplie de gènes utilisables comme bio-indicateurs pour estimer les capacités de dégradation des polluants dans l'environnement. La collection d'échantillons et d'acides nucléiques constituée au cours de cette étude sera précieuse pour le développement de ces outils. Par ailleurs, l'exploitation de ces collections permettra d'approfondir nos connaissances fondamentales sur la "réponse" aux hydrocarbures des microorganismes dans l'environnement.

Actions de transfert et perspectives pratiques

Les connaissances et les compétences analytiques acquises au cours de ce projet présentent un intérêt particulier pour les entreprises de dépollution. Nous avons établi une collaboration avec une PME de la région paloise, particulièrement intéressée par le suivi des communautés bactériennes au cours des traitements. La technologie des puces ADN serait particulièrement adaptée pour la réalisation de ce suivi. Des efforts doivent être maintenus pour obtenir des puces ADN de qualité ciblant les gènes pertinents pour le suivi de traitements de dépollution.

Valorisations



Articles scientifiques

- Bordenave S., Goñi-Urriza M. S., Caumette P., Duran R. (2007) Effects of Heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. **Applied and Environmental Microbiology**, 73 : 6089-6097.
- Bordenave S., Goñi-Urriza M.S., Vilette C., Blanchard S., Caumette P., Duran R. (2008) Diversity of ring-hydroxylating 1 dioxygenases in pristine and oil contaminated microbial mats at genomic and transcriptomic levels. **Environmental Microbiology**, sous presse.
- Paise S., Goñi-Urriza M.S., Caumette P., Duran R. (2008) Molecular biodiversity studies of oil polluted microbial mat from Etang de Berre (France). **FEMS Microbial Ecology**, sous presse.

APR 2003

Marqueurs de stress toxiques chez les microorganismes autotrophes aquatiques (MASTOC)

Partenaires

- UMR CARRTEL, INRA Thonon :
C. Le Boulanger, A. Bouchez, A. Villeneuve & B. Le Berre
- CEA / Saclay, Laboratoire de Biologie Intégrative, Gif-sur-Yvette :
F. Chauvat, C. Cassier Chauvat

Coordinateur

- Jean-François Humbert
INRA, UMR CARRTEL
BP 511 - 74203 Thonon Cedex
humbert@thonon.inra.fr
Institut Pasteur-CNRS URA 2172
Unité des Cyanobactéries
75724 Paris Cedex 15

Mots clés

Irgarol 1051, Microorganismes Photosynthétiques, Écosystèmes aquatiques, Transcriptome, Résistance

→ Objectifs

L'irgarol 1051 est une molécule de la famille des triazines utilisée dans les peintures antisalissure dont les effets sur les espèces cibles ont été jusqu'ici peu documentés. C'est pourquoi le projet MASTOC avait pour but d'étudier i) la réponse transcriptionnelle de la cyanobactérie *Synechocystis* PCC6803 lorsqu'elle est exposée à de faibles doses de cet herbicide et ii) l'acquisition de résistances à cette molécule chez plusieurs espèces modèles (cyanobactérie et microalgues).

→ Résultats

Concernant le premier objectif, les résultats obtenus par une approche basée sur l'utilisation des puces à ADN ont mis en évidence que 25 gènes impliqués dans des fonctions très différentes sont induits ou réprimés par cette molécule. La construction de mutants sur ces gènes permettra de confirmer par la suite leur implication véritable dans la réponse à une exposition par l'irgarol 1051 chez *Synechocystis* PCC6803.

Concernant le second objectif, nous sommes parvenus à sélectionner chez deux genres de microalgues aquatiques, *Chlorella* et *Mychonastes*, et chez une cyanobactérie, *Synechocystis* PCC6803, des souches présentant une résistance à l'irgarol 1051. Nous avons aussi montré chez *Mychonastes*, que l'acquisition de cette résistance avait un coût car les souches résistantes présentent un moins bon fitness que les souches sensibles. Une nouvelle mutation sur le gène *psbA* (qui code pourtant pour la protéine D1 du

photosystème II qui est la cible de l'irgarol 1051) a par ailleurs été mise en évidence pour une des souches résistantes de *Synechocystis* PCC6803.

En revanche, pour toutes les autres souches sélectionnées, aucune mutation n'est présente sur ce même gène ce qui suggère que d'autres mécanismes peuvent être impliqués dans l'acquisition de la résistance à l'irgarol 1051. Cette hypothèse est renforcée par le fait que chez *Mychonastes*, les souches résistantes à l'irgarol 1051 restent sensibles à l'atrazine, à la simazine et au DCMU alors que ces molécules ont pourtant la même cible que l'irgarol 1051. Pour conclure, nos résultats suggèrent que l'irgarol 1051 a des effets pleiotropes sur les cellules cibles et que les mécanismes de résistance à cette molécule sont probablement multiples. Ils montrent aussi le potentiel des approches de post-génomiques pour identifier de nouveaux marqueurs de stress toxique chez les microorganismes.

→ Perspectives scientifiques identifiées

Les perspectives de ce travail concernent essentiellement la poursuite de l'approche de transcriptomique afin de mieux comprendre comment les microorganismes réagissent à un stress toxique et quels sont les mécanismes mis en jeu lors de cette réaction.

En ce qui concerne la sélection de mutants résistants, il serait particulièrement intéressant de poursuivre la recherche de mutations associées à la résistance dans des communautés naturelles régulièrement exposées à l'irgarol 1051 afin de déterminer si ce sont toujours les mêmes mutations qui sont présentes ou si différentes mutations ont été sélectionnées dans les diverses communautés étudiées.

De tels marqueurs pourraient ensuite être utilisés dans une perspective plus appliquée, pour rechercher si une communauté a été exposée à ce polluant.

→ Actions de transfert et perspectives pratiques

Aucun transfert vers les utilisateurs finaux n'a été à ce jour réalisé car nos travaux se situaient très en amont d'une recherche finalisée. Cependant, les résultats obtenus

montrent que les approches de génomique et de post-génomique devraient permettre à l'avenir à la fois de mieux comprendre les effets des toxiques sur les organismes exposés et de mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs d'exposition.



Copyright : Laurent Mignaux - MEEODAT



Évaluation du risque environnemental des traitements de démoustication : harmonisation des méthodes applicables aux invertébrés non-cibles dans les zones humides littorales méditerranéennes et atlantiques

Partenaires

- INRA Rennes : Th. Caquet, M. Heydorff, L. Lagadic, P. Le Goff, M. Roucaute
- Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléocologie (IMEP), UMR CNRS 6116, Université de Droit, d'Économie et des Sciences, Aix-Marseille (UDESAM) : E. Franquet, F. Torre
- Entente Interdépartementale pour la Démoustication du Littoral Méditerranéen (EID Méditerranée), Montpellier : C. Duchet, C. Lagneau
- Entente Interdépartementale pour la Démoustication du Littoral Atlantique (EID Atlantique), Saint Crépin : S. Chouin, J. Guilloteau, B. Le Hunsec
- Department of System Ecotoxicology, Helmholtz Centre for Environmental Research - UFZ, Leipzig, Allemagne : S. Duquesne, M. Liess, M. Kutyniok

Coordinateur

- Laurent Lagadic
- INRA - Équipe Ecotoxicologie et Qualité des Milieux Aquatiques - UMR 985 Écologie et Santé des Écosystèmes
Agrocampus Rennes
65 rue de Saint-Brieuc - 35042 Rennes
Laurent.Lagadic@rennes.inra.fr

Mots clés

Aedes sp., *Culex* sp.,
Daphnia sp., Larvicides,
Bioessais,
Évaluation *in situ*

Objectifs

L'objectif général du programme était de définir des méthodes d'évaluation du risque écotoxicologique de produits insecticides utilisés contre les larves de moustiques dans les zones humides littorales, en associant une approche de laboratoire, basée sur des tests de toxicité permettant de comparer l'intensité des éventuels effets sur des espèces non-cibles (*Daphnia* sp.) avec l'efficacité des traitements sur les espèces cibles (moustiques des genres *Culex*, *Ochlerotatus* et *Aedes*), et une approche de terrain, réalisée en microcosmes et en milieu naturel, visant à comparer les prédictions réalisées à partir des tests de laboratoire avec les concentrations affectant réellement les invertébrés dans les milieux traités.

Du point de vue cognitif, la démarche adoptée visait à acquérir des éléments de connaissance et de compréhension sur la transmission des effets des larvicides de l'individu à la population, puis à la communauté. Du point de vue finalisé, le programme visait principalement à améliorer l'évaluation du risque écotoxicologique des larvicides et à contribuer à mieux intégrer les pratiques de démoustication dans les stratégies de gestion des milieux, en conciliant l'efficacité des traitements avec la préservation de la biodiversité des zones humides littorales. Reposant sur une interaction étroite entre chercheurs et praticiens, il visait notamment à promouvoir des pratiques de démoustication réduisant les impacts environnementaux non intentionnels dans le cadre d'une gestion durable de ces écosystèmes.

Résultats

Le choix des produits étudiés a été basé sur la volonté de comparer des larvicides de modes d'action différents, concernés par la Directive "Biocides", en ciblant sur des molécules "en émergence" dans le contexte de la démoustication : le diflubenzuron (famille des benzoylphénylurées ; sous forme de Dimilin® 25WP) et le spinosad (molécule d'origine biologique, produite par un actinomycète). Le Bti (*Bacillus thuringiensis* sérovar *israelensis* ; sous forme de Vectobac® 12AS) a été utilisé comme produit de référence compte tenu de sa sélectivité vis-à-vis des diptères nématocères auxquels appartiennent les moustiques.

Au laboratoire, des tests de toxicité monospécifiques ont permis de comparer l'efficacité des traitements sur les espèces cibles avec l'intensité des éventuels effets sur des espèces non-cibles. De façon complémentaire, des études sur des associations d'espèces (espèces cibles et non-cibles et/ou deux espèces non-cibles) ont analysé l'influence des relations interspécifiques sur la toxicité des produits. Pour ces études, les principaux critères mesurés étaient la survie, la durée avant la première reproduction ou avant l'émergence, le taux d'émergence. Parallèlement, des marqueurs biochimiques ont été utilisés pour mesurer, chez les daphnies, les effets individuels non létaux des larvicides. Sur le terrain ont été mises en place des études en microcosmes, en enclos littoraux et "en vraie grandeur", permettant de tester, dans les conditions de la pratique, les effets de chacun des larvicides, dont les concentrations *in situ* ont été, dans la mesure du possible, mesurées au moment de l'application (évaluation de l'exposition). Ces études ont privilégié les approches au niveau des populations et des communautés. Chez *Culex pipiens molestus*, considérée comme espèce cible, les trois larvicides ont un effet sur la

survie des individus et donc sur la population ; par contre, ils n'affectent pas d'autres performances individuelles des survivants (fécondité et durée avant l'émergence) qui sont également importantes pour la population.

Des études en milieu contrôlé et en conditions d'apports nutritifs limités ont montré que l'exposition aux trois larvicides testés peut être bénéfique au développement des populations de moustiques, suite à une modification du niveau de la compétition intraspécifique. De tels effets indésirables sur les espèces cibles pourraient apparaître en milieu naturel sous certaines conditions d'apports nutritifs. En ce qui concerne les espèces non cibles, les études au niveau individuel ont montré que le diflubenzuron et le spinosad avaient un effet sur les performances individuelles (survie et reproduction) de *D. magna* et *D. pulex* aux trois concentrations testées. De plus, il semble qu'il y ait un effet des trois larvicides sur les biomarqueurs AChE et CbE (α et β), 2 jours après les contaminations. Des études en microcosmes extérieurs (de type "flaques") sur des communautés composées de daphnies et de larves de moustiques ont montré qu'un traitement au spinosad favorisait le retour de l'espèce cible (moustique) après une mortalité initiale des larves, suite à l'élimination de l'espèce non cible (daphnie), qui agissait en tant que compétiteur de l'espèce cible.

Dans le cadre d'études au niveau populationnel en enclos *in situ*, il a été possible d'observer un effet du diflubenzuron et du spinosad sur les populations de daphnies aussi bien en milieu méditerranéen qu'en milieu atlantique. En revanche, aucun effet du Bti n'a été observé. La récupération semble possible pour les populations de daphnies des deux régions 7 jours après un traitement au spinosad à 8 µg/L. Les études en milieu naturel "ouvert", ont montré que le spinosad exerçait un effet négatif sur les daphnies mais que les populations impactées se reconstituaient relativement rapidement, prioritairement par immigration d'individus à partir des zones non traitées. Dans le cas du diflubenzuron, et à la différence de ce qui a été observé dans les microcosmes *in situ*, aucun effet négatif n'a été observé sur les daphnies. En revanche, l'étude menée en zone atlantique a clairement montré que ce larvicide avait un impact négatif sur diverses espèces d'invertébrés non-cibles, et notamment des larves de divers groupes de Diptères. Les mares étudiées n'hébergeant pas de daphnies, il n'a pas été possible de confirmer les observations réalisées en zone

méditerranéenne pour ces organismes. Les milieux concernés par ces études sont des milieux naturellement contraints par divers facteurs dont l'assèchement saisonnier et les variations de salinité. De ce fait, même lorsqu'un larvicide a un impact ponctuel sur certains groupes taxonomiques, cet impact est généralement plus faible que celui des fluctuations naturelles des conditions environnementales. Au bilan, les deux substances candidates à une utilisation en démoustication en complément du Bti, à savoir le diflubenzuron et le spinosad, présentent des risques importants pour diverses espèces non-cibles dans les conditions auxquelles elles ont été employées ici (doses préconisées en démoustication notamment) qui conduisent à s'interroger sérieusement sur leur avenir dans ce contexte.

Actions de transfert et perspectives pratiques

D'un point de vue finalisé, les études réalisées ont permis d'identifier plusieurs éléments susceptibles d'être intégrés dans une démarche harmonisée d'évaluation des impacts non-intentionnels de la démoustication dans les zones humides littorales métropolitaines, en ce qui concerne (i) la complémentarité entre tests mono- et plurispécifiques en laboratoire, expérimentations en conditions contrôlées *in situ* (microcosmes et enclos) et études en milieu naturel, (ii) la nécessité d'analyser conjointement les métriques définies au niveau des communautés avec les données d'abondance des différents groupes taxonomiques, (iii) l'indispensable prise en compte des facteurs environnementaux naturels comme covariables dans l'analyse des résultats dans la mesure où certains (en particulier la hauteur d'eau) peuvent constituer des facteurs de forçage naturel majeurs dans ces milieux, et (vi) la dimension spatiale de l'évaluation dont dépendent les phénomènes de recolonisation à partir de zones non perturbées, qu'il s'agisse de sites adjacents (quelle que soit la région considérée) ou d'apports liés aux marées (en zone atlantique).

Les recommandations issues de ce programme intéressent les services chargés de l'homologation des biocides utilisés en démoustication, les opérateurs de démoustication et les gestionnaires des milieux concernés. Elles sont d'ores et déjà appliquées dans le cadre des suivis écologiques mis en place dans le Morbihan en accompagnement des programmes de démoustication menés par l'EID Atlantique.

Valorisations



Articles scientifiques

- Duchet C., Franquet E., Caquet, Th., Larroque, M., Lagneau Ch., Lagadic L. (2008) Effects of spinosad and *Bacillus thuringiensis israelensis* on a natural population of *Daphnia pulex* (Crustacea : Cladocera) in field microcosms. **Chemosphere**, en révision favorable.
- Duchet C., Inafuku M.M., Lagneau Ch., Lagadic L. Use of chitinase as an indicator of changes in growth and reproduction of *Daphnia* sp. exposed to diflubenzuron, spinosad and *Bacillus thuringiensis israelensis*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, soumis.
- Duchet C., Heydorff, M., Lagneau Ch., Lagadic L. Effects of diflubenzuron, spinosad and *Bacillus thuringiensis israelensis* on biomarker responses in *Daphnia* sp. (Crustacea : Cladocera). En préparation.
- Duquesne S., Kutyniok M., Liess M. An outdoor study about biological and chemical approaches, using *Daphnia magna* and spinosad for controlling the establishment and development of populations of *Culex pipiens molestus*. En préparation.
- Duquesne S., Beketov M., Liess M. Effects of various pesticides on the development of populations of *Culex pipiens molestus* according to intra and inter-specific competition; implications for mosquito control. En préparation.

APR 2003

Approche multi-estuaire des réponses de populations d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* et de flets *Platichthys flesus* à la contamination chimique

Partenaires

• LEMAR, UMR CNRS 6539, Brest : Louis QUINIOU, Dario MORAGA, Justine MARCHAND, Estérine EVRARD, Elise DAVID, Ricardo RISO
 • Institut des Sciences Moléculaires - UMR 5255 CNRS, Laboratoire de Physico- et Toxicochimie de l'Environnement, Université Bordeaux I : Hélène BUDZINSKI, Jérôme CACHOT, Marie-Hélène DEVIER, Nathalie TAPIE, Marie LE DU • Laboratoire d'Écotoxicologie des Milieux Aquatiques, LEMA, UPRES-EA 3222 IFRMP 23, Université du Havre : Christophe MINIER, Xavier DENIS, Perrine GERAUDIE • INRA-EFPA, Laboratoire des Sciences de l'Environnement, Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat, Vaulx-en-Velin : Alain DEVAUX, Yannick GANIA
 • Ecole Nationale Vétérinaire, Unité d'Anatomie Pathologique, UMR 703 INRA/ENVN, Nantes : Yann CHEREL • Ifremer, laboratoire d'écotoxicologie, LBEX, Nantes : Thierry BURGEOT

Coordinateur

• Jean LAROCHE
 Université de Bretagne Occidentale
 LEMAR, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, UMR CNRS 6539
 Institut Universitaire Européen de la Mer, Technopôle Brest - Iroise
 29280 Plouzané
 Jean.Laroche@univ-brest.fr

Objectifs

Dans ce projet, notre objectif était d'étudier (1) le transfert des contaminants métalliques et organiques vers deux organismes modèles, l'huître creuse et le flet, dans différents estuaires présentant des contaminations différentielles sur le Golfe de Gascogne, (2) d'étudier parallèlement les réponses moléculaires, physiologiques et populationnelles de ces organismes au stress chimique, en prenant en compte la variabilité génétique propre à chaque individu, (3) de rechercher de possibles couplages entre les phénotypes et les génotypes pour rechercher des caractères de "résistance" ou de "sensibilité" différentielles entre les génotypes.

Résultats

Une typologie des contaminants a été menée sur les différents estuaires du Golfe de Gascogne. Globalement, les organismes issus des estuaires du Ster, de Lesconil et du Belon présentent des charges en contaminants limitées, relativement à ceux prélevés en Loire et en Gironde qui montrent des contaminations parfois soutenues en polluants organiques (PCB, HAP) et/ou en métaux (Cd, Cu, Pb) ; les individus prélevés en Vilaine présentent quant à eux un niveau de contamination intermédiaire entre les deux profils précédents, avec une différence inter-saison importante.

Les réponses des organismes au niveau moléculaire ont été abordées par la mesure de l'expression de différents gènes candidats impliqués dans des fonctions variées (production d'énergie, détoxification, protection cellulaire, métabolisme du fer...) sur l'huître et le flet. Des expressions différentielles ont été mises en évidence dans certains contextes polluants. Les dommages cellulaires ont été explorés sur les deux modèles ; les signaux génotoxiques sont particulièrement évidents dans certains systèmes contaminés. Ils

pourraient être aussi intégrateurs d'un stress de nature hypoxique. Au niveau individuel, des baisses significatives de fitness sont appréhendées au niveau des populations exposées aux contaminants. On a ainsi pu diagnostiquer pour le flet des réductions du taux de croissance, de l'indice de condition et de la fécondité, pouvant s'accompagner de perturbations endocriniennes et de lésions hépatiques significatives.

L'intégration des données de contamination, des signaux physiologiques a été menée en liaison avec des marqueurs génétiques développés sur l'huître et le flet. Ces couplages génotypes-phénotypes ont mis en évidence chez l'huître la capacité de certains génotypes à mieux conserver l'intégrité de leur ADN ; pour le flet, certains génotypes présentent des patterns de contamination et/ou de réponses génotoxiques et/ou de pathogénicité différentiels.

Perspectives scientifiques identifiées

L'intégration des différentes approches (bioaccumulation, réponses moléculaires, physiologie, pathologie, variabilité génétique) est fructueuse en écotoxicologie ; elle nous a permis de détecter des réponses au stress chimique différentielles manifestées par les génotypes et peut-être aussi des capacités différentielles à « résister » à ce stress. Cette démarche est encore relativement rare dans la littérature et devrait être encouragée dans le futur, pour développer une démarche d'écotoxicologie évolutive, et donc explorer les pressions sélectives potentielles exercées par les xénobiotiques sur les populations.

Face aux changements climatiques, les espèces présentant une phase juvénile en milieux peu profonds comme les estuaires, vont être soumises à un stress additionnel lié au réchauffement des eaux. Les travaux explorant la synergie entre les effets du réchauffement et ceux de la pollution

sur les organismes estuariens devraient être encouragés ; des approches multi-disciplinaires impliquant des écotoxicologistes, physiologistes, biologistes des populations permettraient de tester le potentiel de résistance au stress multiple de différentes populations naturelles, par des expérimentations en laboratoire.

Actions de transfert et perspectives pratiques

Les marqueurs génétiques qui ont permis de révéler une expression différentielle entre les sites « témoins » et les sites contaminés, pourraient constituer dans le futur de nouveaux outils pour le diagnostic environnemental. Au cours de ce travail, différents biomarqueurs ont été clairement validés (génotoxicité, neurotoxicité, perturbations endocriniennes, traits de vie, pathologie) ; l'intégration de ces connaissances aboutissant à une

vision réaliste du statut physiologique d'une population dans un contexte environnemental donné.

Une hypothèse a été formulée : une pression sélective de l'environnement contaminé sur les individus pourrait retenir préférentiellement les génotypes les plus aptes à bioaccumuler les xénobiotiques dans ces milieux estuariens ; si cette hypothèse est confirmée, ce phénomène pourrait conduire à amplifier le transfert des contaminants vers l'homme via l'alimentation par des produits marins, avec les conséquences que l'on peut imaginer sur la santé des consommateurs.



Valorisations



Articles scientifiques

- David, E., Tanguy, A., Moraga, D. (2007) Peroxiredoxin 6 gene : a new physiological and genetic indicator of multiple environmental stress response in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Aquatic Toxicology**, 84 : 389-398.
- Marchand J., Tanguy A., Charrier G., Quiniou L., Plee-Gauthier E., Laroche J. (2006) Molecular identification and expression of differentially regulated genes of the European flounder, *Platichthys flesus*, submitted to pesticide exposure. **Mar. Biotechnol.** 8 : 275-294.
- Marchand J., Denis F., Laroche J. (2008) Modifications de la variabilité génétique et de l'expression des gènes. Dans : **Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques** (Amiard J.C., Amiard-Triquet C.) Tec & Doc Lavoisier, Paris, 331-351.
- Tanguy A., Boutet I., Laroche J., Moraga D. (2005) Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. **FEBS Journal**, 272 : 390-403.
- Tapie N., H. Budzinski, K. Le Ménach (2008) Fast and efficient extraction methods for the analysis of persistent organohalogen pollutants in biological matrices. **Anal. Bioanal. Chem.**, 2008 (sous presse).
- 11 Publications scientifiques - incluant les résultats de ce programme PNETOX multi-estuaire, ou issues du savoir-faire développé durant ce projet - sont en cours de montage.

APR 2003

Influence des métaux sur la structure et le fonctionnement du phytoplancton dans le lagon sud ouest de Nouvelle Calédonie

Partenaires

- UMR 5244 CNRS -EPHE - UPVD, Université Via Domitia, Perpignan : B. Delesalle
- UR103, Centre IRD de Nouméa : X. Mari, O. Pringault
- UR103 IRD/UMR 5119, Université Montpellier II : J.P. Torréton
- Laboratoire de l'Environnement Marin de l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (AIEA-LEM), Monaco : M. Warnau
- CNRS UMR 7093, LOV, Observatoire Océanologique, Villefranche-sur-Mer : M. Weinbauer

Coordinateur

- Emma Rochelle-Newall
- UR103, Centre IRD de Nouméa, BPA5
98848 Nouméa Cedex, Nouvelle Calédonie
Emma.Rochelle-Newall@mpl.ird.fr
- Coordonnées actuelles :**
UR103 CAMELIA, IRD, ECOLAG / UMR 5119
Université Montpellier II, Case 093
34095 Montpellier Cedex 05

Mots clés

Production primaire,
Production bactérienne,
Diversité, Lagon tropical,
Bioaccumulation

Objectifs

Le lagon sud ouest de Nouvelle Calédonie est soumis à une contamination métallique significative, liée à une activité minière importante et une urbanisation croissante. L'objectif principal de ce projet est de déterminer l'influence de Zn, Ni et Cr sur la structure et le fonctionnement de la boucle microbienne dans ce système. Dans un second temps, l'objectif est de caractériser les processus de bioaccumulation des métaux par voie trophique.

Résultats

Les effets des métaux (Ni, Cr et Zn) ont été étudiés dans trois environnements différents, une station sous influence industrielle (Ind), une station sous influence urbaine (Urb) et une station sous influence océanique prise comme référence (Réf). L'impact du Zn à court terme sur les activités de production (primaire et bactérienne) montre que les concentrations nécessaires pour diminuer de 50% l'activité sont de l'ordre de la centaine de microgrammes, alors que les concentrations observées dans le milieu sont inférieures à la dizaine de microgrammes. Le Ni semble avoir un effet stimulant pour la station Ind alors que pour les deux autres stations, il est inhibiteur. Pour le Cr, les effets sont moins nets que pour les deux autres métaux, néanmoins il semble que comme observé pour le Ni, l'ajout de Cr stimule les activités à la station Ind.

Les effets à long terme ont été étudiés dans des inocula provenant de chacune des trois stations, mis en cultures et amendés avec une charge métallique représentant entre 1

et 5 fois la concentration mesurée *in situ*. L'empoisonnement en Zn se traduit par une nette diminution de la biomasse phytoplanctonique accompagnée d'une importante diminution de la production primaire particulaire. La production bactérienne reste équivalente à celle mesurée dans le contrôle malgré une production de matière organique dissoute plus forte en présence de Zn. La conséquence directe est une accentuation du caractère hétérotrophe du système étudié. Ces changements d'activité sont accompagnés par des changements de diversité phytoplanctonique avec une diminution de l'abondance relative des diatomées au profit des Dinoflagellés et des Prasinophycées, en particulier pour les stations Lag et Ind.

Pour les deux autres métaux les effets sur les activités sont moins nets. Production primaire et bactérienne sont peu sensibles aux apports en Ni, une stimulation de la production primaire pouvant même s'observer pour la station Lag. La diversité phytoplanctonique est sensiblement équivalente à celle observée dans le témoin, et ce quelle que soit la station étudiée. Le Cr entraîne une légère diminution de la biomasse phytoplanctonique accompagnée d'une diminution de la production primaire, en particulier pour la station Lag. La production bactérienne est stimulée par les apports en Cr. A l'inverse, la diversité phytoplanctonique ne semble pas influencée par les apports en Cr. Les expériences de bioaccumulation avec le bivalve comestible *Gafrarium tumidum* conduites avec le ⁶³Ni et les cultures phytoplanctoniques des différentes stations montrent que le Ni est préférentiellement accumulé par les bivalves sous forme particulaire.

C'est pour la station Ind que l'accumulation est la plus importante, cette différence pouvant s'expliquer par une composition phytoplanctonique différente en station Ind. Bien que nous n'ayons pas étudié les impacts des apports métalliques sur la santé humaine, nous pouvons suggérer que dans les sites où ces bivalves sont fortement pêchés, les risques sur la santé publique devraient être examinés plus en détail.



Copyright : Emma Rochelle-Newall

Difficultés rencontrées et perspectives scientifiques identifiées

Il est clair que les futures recherches dans ce domaine doivent s'intéresser à l'impact des métaux sur les écosystèmes tropicaux où ils sont encore mal connus, et en particulier dans les estuaires, lieux de forte activité industrielle, de concentrations humaines importantes et souvent également de productions aquacoles. À ce sujet, le projet « HAIPHONG » (responsable : Jean-Pascal Torréton) financé par E2CO en 2007 et impliquant des intervenants communs à ce projet PNETOX aura, entre autres objectifs, celui d'évaluer l'influence des contaminants sur la diversité et l'activité des premiers maillons du réseau trophique planctonique dans un estuaire vietnamien (Bach Dang, delta du Fleuve Rouge).

Actions de transfert et perspectives pratiques

Formation pendant la durée du programme d'une technique en biologie et chimie marine (C. Rouchon) qui a trouvé un emploi (CDI) au sein de la société Goro-Nickel. Outils et bases de connaissance pour la mise en place d'un réseau de surveillance par la Province Sud dans le cadre de l'installation de l'usine Goro-Nickel dans le sud de la Nouvelle-Calédonie.

Valorisations



Articles scientifiques

- Rochelle-Newall E.J., Delesalle B., Mari X., Rouchon C., Torréton J.P., Pringault O. (2008) Zinc induces shifts in microbial carbon flux in tropical coastal environments. **Aquatic Microbial Ecology** (Sous presse)
- Pringault O., Tesson S., Rochelle-Newall E.J. (2008) Respiration in the light and bacterioplankton coupling in a coastal environment. **Microbial Ecology** (sous presse)
- Rochelle-Newall E.J., Mari X., Rouchon C., Pringault, O. Biodegradation of organic matter in a tropical coral reef ecosystem. **Marine Chemistry** (en préparation)
- Rochelle-Newall E.J., Van Rijswijk P., Middleburg J.J., Mari X., Rouchon C., Torréton J.P., Pringault, O. Short term effects of metal addition on carbon uptake and transfer in a tropical coastal reef system. **Aquatic Microbial Ecology** (en préparation)

APR 2003

CRIQUALADIM : CRItères de QUALité pour les eaux de surface : métal LAbile, DIssous, ou associé aux Matières en suspension ?

Partenaires

• EDF, Département Laboratoire National d'Hydraulique et Environnement, Chatou : N. Tousset, D. Ferreira
 • Cemagref, laboratoire d'écotoxicologie, Lyon : O. Geffard, B. Vولات

Coordinateur

• Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin
 Cemagref, HBAN
 Parc de Tourvoie
 92163 Antony
 marie-helene.tusseau@cemagref.fr

Mots clés

Métaux,
 Biodisponibilité,
 Outils,
 Spéciation

→ Objectifs

L'objectif général du projet est la mise au point d'une évaluation pertinente des contaminations métalliques biodisponibles voire toxiques dans les milieux naturels, tenant compte d'une part de la géochimie du milieu et de ses conséquences sur la spéciation métallique, et d'autre part de la diversité des voies d'exposition potentielles des organismes. Pour ceci, nous avons choisi de répondre aux deux questions plus spécifiques qui sont :

- 1 – l'accumulation métallique (Cu) dans les bryophytes est-elle un bon indicateur des niveaux de contamination en métaux bio-disponibles dans le milieu ?
- 2 – les métaux (Cd) associés à la phase particulaire (algues) sont-ils une source de contamination et d'effet chez *Daphnia magna* ?

→ Résultats

Une première phase méthodologique du projet a permis de proposer un protocole de bioaccumulation du Cu par les bryophytes pour des expositions à des concentrations environnementales. À l'aide de ce protocole, il a été montré que la bioaccumulation du cuivre par les bryophytes est réduite en présence de matières organiques dissoutes (MOD) d'origine diverse. De plus, le cuivre labile (mesuré par la technique du gradient de diffusion en couche mince) représente le cuivre biodisponible pour la bioaccumulation,

Valorisations



Publications scientifiques

- Ferreira D., Tusseau-Vuillemin M.-H., Tousset N., Ridame C. (2008) More than inorganic copper is bioavailable to bryophytes at environmentally relevant concentrations, **Environmental Toxicology and Chemistry** (acceptée).
- Geffard O., Geffard A., Alvarez C., Vولات B., Tusseau-Vuillemin M.-H., Garric J., (2008) Effects of Chronic Dietary and Waterborne Cadmium Exposures on the Contamination Level and Reproduction on *Daphnia Magna*, **Environmental Toxicology and Chemistry**, 27.

à une nuance près : dans le cas particulier des acides humiques, les teneurs en cuivre labile sous-estiment celles de cuivre biodisponible. Cette observation, qui peut être liée au protocole expérimental, demande à être confirmée par des mesures dans le milieu naturel. La validation en milieu naturel (Belleville sur la Loire) des relations entre spéciation du cuivre et biodisponibilité pour les bryophytes a montré que l'interprétation de l'accumulation du Cu dans les bryophytes requiert la prise en compte de la composition cationique du milieu. De plus, les résultats montrent qu'à composition cationique constante, c'est bien le cuivre labile (DGT) qui détermine sa bio-accumulation dans le bryophyte.

Pour *D. magna*, un protocole, permettant de dissocier une exposition via la voie trophique et/ou dissoute, a été développé. Les résultats de cette partie de notre projet ont montré que la voie trophique est une source de contamination importante en Cd, avec une efficacité d'assimilation plus élevée que pour une exposition par la phase dissoute. De plus, en accord avec l'accumulation, les effets obtenus via ces deux sources de contamination (dissoute et trophique) sont additives. Cependant, cette méthodologie d'évaluation est délicate à mettre en œuvre à des niveaux de contamination réalistes pour le Cd, du fait de ses propriétés physiques (faible adsorption sur les algues) et de ses propriétés biologiques (pas de relation dose-effet sur la reproduction et la croissance) chez *D. magna*.



Session 2 Nouvelles approches Polluants émergents

→ Conférence invitée

Sources to and effects caused by urban pollution: Examples from the Øresund region - **Eva Eriksson**

→ Synthèse des travaux de la thématique "Nouvelles approches / Polluants émergents"

Coordonnée par **Claude Putavy** et **James Devillers**

→ Travaux de recherche de la thématique "Nouvelles approches – polluant émergents"

APR 2001

- Construction d'une levure transgénique pour l'évaluation du risque génotoxique et la caractérisation des effets mutagènes dans l'environnement - **Jérôme Cachot**
- Gestion des gènes de résistance aux pesticides : application de la stratégie de la zone stable - **Michel Raymond**
- Adaptation microbienne aux composés xénobiotiques - **Timothy Vogel**

APR 2003

- Relations de type Structure-Activité (SARs et QSARs) appliquées aux perturbateurs endocriniens xénobiotiques - **James Devillers**
- Extrapolation des effets entre niveaux d'organisation biologique. Expérimentation et modélisation, de l'individu à la population, des effets d'un perturbateur endocrinien chez un poisson, la gambusie - **Gilles Monod**
- Evaluation des effets des mélanges de métaux sur la base de concentrations internes - **Alexandre Pery**

Conférence invitée

Recherche et action publique – Apports de la sociologie de la traduction - **Pierre-Benoît Joly**

CONFÉRENCE INVITÉE

Sources to and effects caused by urban pollution: examples from the Øresund region

Auteur

- **Eva Eriksson**

Department of Environmental Engineering - Technical University of Denmark - Miljøvej - Build. 113 - DK-2800 Kgs. Lyngby - DENMARK - eve@env.dtu.dk

The Øresund region, i.e., the regions around the Sound of the Baltic Sea houses the capitol of Denmark, Copenhagen, and the 3rd largest city in Sweden, Malmö. Intense focus on identifying sources to urban pollution has spawned many interesting studies including a recent Interreg IIIA project, the Source Partnership. Lessons learnt in these projects as well as complementing work done at the Technical University of Denmark form the boundaries for this contribution. Analysis of the various projects reveal that three different approaches have been adopted; I) source identification based on inventories and questionnaires; II) pollutant monitoring campaigns; and III) effects assays on selected organisms as well as combinations hereof. Additionally, risk assessment of urban emissions to recipients has been conducted on different levels. Here, five selected cases representing the work performed in the region will be presented and elaborated. Two of these cases are outlined below and these address aspects such as tracing the origin of certain substances and assessment of affected recipients.

The levels and types of pollution may differ between point (industrial) and diffuse (domestic) sources and hence, their individual contribution to the pollutant load in a wastewater treatment plant may also differ. The individual contribution of an industrial area was investigated by sampling wastewater in sewers and man-holes located in the area. The household contribution was estimated as the difference between concentrations found in the wastewater treatment plant and the mentioned industrial pollution (Flygare, 2008). Both weekday and weekend sampled. Phthalates were found in lower levels in both industrial and municipal wastewaters during the weekend compared to the working week,

suggesting emissions from the industrial processes. This was especially seen for diisononyl phthalate whereas no clear weekly pattern could be seen for diethylhexyl phthalate (DEHP). Hence, the industry releases diisononyl phthalate during their operation and maintenance, but not DEHP which also regulated by the Water Framework Directive. The major release of DEHP was attributed to diffuse, non-industrial, release, such as cleaning of plastic floor materials in households.

The urban rivers in the Copenhagen area are highly affected of urbanization and consist mainly of concrete bottoms and tiled slopes. The flow in Harresrup River comprises of a base flow and stormwater runoff (0-6 times the base flow depending on the season). Measurements of algal toxicity (*Pseudokirchneriella subcapitata*) revealed inhibition of the algae growth (20-50%) thus confirming that the aquatic ecosystem in the river was subjected to toxic effects. It was also found that 40% of the noted toxicity was caused by organic substances (Kildeby et al., 2004). Chemical analyses of 99 organic substances showed that 25 of them were present above the detection limit, ranging from 0.01 µg/l (4 PAHs) to trichloroacetic acid (2.4 µg/l) and linear alkyl benzene sulphonate (LAS) of 14 µg/l (Kildeby et al., 2004; Eriksson et al., 2007). Many of the substances were present in the river in the same levels as previously observed in urban and road runoff. Nine of the substances were in a hazard assessment found to have a risk ratio above 1 (fluoranthene, pyrene, diuron, dinitro-o-cresol, glyphosate, isoproturon, terbutylazine, Nonylphenol and LAS) (Eriksson et al., 2007).

From the material presented, research needs will be identified and a discussion of urban pollution management be initiated.

Synthèse des travaux de la thématique « Nouvelles approches - Polluants émergents »

Auteurs

- **James DEVILLERS** CTIS - 3 Chemin de la Gravière - 69140 RILLIEUX LA PAPE - j.devillers@ctis.fr.
- **Claude PUTAVY** DIREN Rhône-Alpes / Délégation de Bassin RM - 208, bis rue Garibaldi - 69422 LYON CEDEX 03 - Claude.PUTAVY@developpement-durable.fr

1. Eléments de contexte et projets examinés

L'appel à propositions de recherche 2001 du PNETOX affiche comme enjeux et objectifs la réponse à la demande générale des pouvoirs publics, des industriels et de l'agriculture en matière d'expertise, de conseil et de recherche finalisée pour tout ce qui touche à l'impact des polluants sur les écosystèmes.

L'appel à projets 2003, tout en maintenant le cap sur l'objectif général de fournir les connaissances nécessaires à l'évaluation des risques pour les écosystèmes, encourage plus particulièrement la recherche de concepts et de connaissances sur les relations entre les variables écotoxicologiques et le fonctionnement des écosystèmes ainsi que l'élaboration de modèles, dans une perspective soit cognitive (compréhension de phénomènes), soit prédictive (simulation, dans le cadre de scénarios d'évaluation ou de gestion).

Ce souhait de voir se développer des outils de modélisation au niveau des objectifs généraux du PNETOX est à noter, tout comme pourrait l'être le faible nombre de programmes de recherche s'intéressant à des polluants émergents ou à de nouvelles approches en particulier à des approches de modélisation.

Six projets de recherche ont été classés dans cette rubrique « nouvelles approches, polluants émergents » dont trois financés dans le cadre de l'APR 2003 qui conjuguent différents niveaux d'innovation. En effet, ces projets s'intéressent, pour deux d'entre eux aux perturbateurs endocriniens. Ils s'appuient tous sur des modèles pour extrapoler ou prédire les effets des substances chimiques étudiées. L'un d'entre eux s'intéresse aux multicontaminations métalliques sous l'angle rarement étudié de la caractérisation des effets induits par des mélanges de composés métalliques et la caractérisation des doses réellement à l'origine de la toxicité observée. Enfin, deux d'entre eux tentent l'exercice de l'extrapolation des effets observés sur l'individu à des effets sur la population.

APR 2003

- **Gilles MONOD** - Extrapolation des effets entre niveaux d'organisation biologique. Expérimentation et modélisation, de l'individu à la population, des effets des perturbateurs endocriniens chez un poisson, la gambusie.
- **Alexandre PERY** - Effets des mélanges de métaux sur la base de concentrations cytosoliques.
- **James DEVILLERS** - Relations de type structure-activité (SARs et QSARs) appliquées aux perturbateurs endocriniens xénobiotiques.

Pour les projets retenus dans le cadre de l'APR 2001, l'innovation se situe plutôt au niveau des techniques utilisées et de l'alliance entre des écotoxicologues et des généticiens ou biologistes moléculaires. L'un des projets s'appuie en effet sur des techniques de biologie moléculaire et de manipulation génique pointues pour produire un test utilisable pour caractériser les effets mutagènes. Le second projet vérifie les hypothèses d'apparition des gènes permettant aux bactéries de dégrader une substance chimique donnée. Là aussi, la collaboration d'écotoxicologues et de généticiens permet de faire avancer notre compréhension de la mise en place des phénomènes de dégradation. Enfin, le dernier projet, utilise des théories de la génétique des populations pour proposer une utilisation optimisée des pesticides visant à gérer les résistances.

APR 2001

- **Jérôme CACHOT** - Construction d'une levure transgénique pour l'évaluation du risque génotoxique et la caractérisation des effets mutagènes dans l'environnement.
- **Timothy VOGEL** - Adaptation microbienne aux composés xénobiotiques.
- **Michel RAYMOND** - Gestion des gènes de résistance aux pesticides : application de la stratégie de la zone stable.

2. Connaissance des effets et des expositions

Changements d'échelles

Les effets adverses d'un xénobiotique dans un écosystème aquatique ou terrestre s'observent au niveau des individus, des populations et des communautés. Ils dépendent d'un certain nombre de facteurs liés, entre autres, à la nature du polluant, à sa concentration, et aux facteurs abiotiques.

Références



- Eriksson E., Baun A., Mikkelsen P.S., & Ledin A. (2007) *Desalination* 215 (2007) 187-197
- Flygare S. (2008) <http://www.kildesamarbejdet.org/seminarer/afslutningsseminar.html>
- Kildeby M.R., Nielsen J.G., Jensen L., Ledin A. & Baun A. (2004) Vand&Jord, 1:4-7 (In DK).
- The Source Partnership** (2008) <http://www.kildesamarbejdet.org> (In DK and SE)

Synthèse des travaux de la thématique « Nouvelles approches - Polluants émergents »

Cependant, le plus souvent, un seul niveau d'organisation biologique est pris en compte dans les études écotoxicologiques. Ainsi, ces dernières sont généralement conduites au niveau individuel en utilisant des essais réalisés dans des conditions naturelles ou non et au cours desquels différents critères d'effets sont recherchés. Les résultats obtenus sont très souvent implicitement extrapolés aux populations voire aux communautés.

De la même façon, l'analyse des traits d'histoire de vie des populations permet d'évaluer l'impact d'une pollution anthropique et de prédire l'évolution de ces populations soumises à ce stress. Dans ces études écologiques, aucun lien direct n'est fait avec les mécanismes intrinsèques de toxicité considérés au niveau des individus et qui sont cependant, au moins en partie, à l'origine (ou supposés comme tels) des différents phénomènes observés sur les populations. Pourtant, dans les deux cas, les manifestations d'un état de stress restent liées à la présence, et à la nature du polluant ainsi qu'à son comportement dans le milieu considéré.

Cette prise en compte, dans la pratique, d'un seul niveau d'organisation n'est pas le fruit d'un choix délibéré mais plutôt le résultat d'un manque d'approches méthodologiques solides permettant d'effectuer des changements d'échelles. Deux projets se sont intéressés à ce challenge majeur de l'écotoxicologie.

Ainsi, dans le projet coordonné par **Gilles Monod**, pour traiter de l'extrapolation d'effets adverses de l'individu à la population, chez la gambusie (*Gambusia holbrooki*), une approche diachronique a été proposée. Elle consiste à exposer des individus, à un stade de développement donné, en laboratoire, pour étudier leurs réponses à court terme (e.g., biomarqueurs, performances reproductrices), puis, après avoir arrêté l'exposition, à étudier si ces effets ont des conséquences à long terme au niveau de la population en écosystème expérimental (cosme non contaminé). Cette méthodologie a été appliquée à l'éthynylœstradiol (EE2), un perturbateur de la fonction oestrogénique fréquemment retrouvé dans les rejets de stations d'épuration. Les résultats obtenus aux niveaux des cosmes étant limités en nombre et présentant une variabilité importante, un modèle individu-centré, de type système multi-agents, de la dynamique de population de la gambusie en cosme a été élaboré pour aider à la détection des effets de l'EE2. La construction de ce modèle a nécessité la caractérisation précise de certains traits d'histoire de vie relatifs à la survie, la croissance et la reproduction (sex-ratio, puberté et cycle sexuel) de la gambusie. Ce modèle stochastique, très flexible, a pour objet de prédire l'ensemble des populations attendues en conditions témoins, afin de disposer d'un

référentiel solide (témoin) et donc d'augmenter la puissance des comparaisons avec les populations exposées au toxique.

Dans le projet conduit sous la coordination d'**Alexandre Pery**, cette problématique a été abordée d'une manière différente. L'objectif premier de ce projet était de valider une méthode de mesure de concentration interne (concentration cytosolique) comme base d'évaluation des effets de mélanges de métaux (cuivre, cadmium, zinc) chez la daphnie (*Daphnia magna*) et le chironome (*Chironomus riparius*), l'analyse des données d'effets ayant été réalisée à partir de modèles de type DEBtox couplée à de l'inférence Bayésienne pour une meilleure estimation des paramètres. Le passage individu-population a été réalisé dans une seconde phase grâce à l'emploi de modèles faciles à mettre en place et réclamant peu de paramètres afin de dériver des seuils de risque pour les populations exprimés en termes d'accumulation cytosolique. Pour la daphnie, des modèles matriciels de dynamique des populations ont été utilisés. Ce sont des modèles en temps discret, où la population est découpée en classes d'âge ou en stades de développement. Les individus passent d'une classe à une autre à chaque pas de temps selon des taux vitaux (survie, fécondité). Ce type de modèle fournit de nombreux outils démographiques, dont le taux d'accroissement de la population. Le chironome étant un organisme subissant une synchronisation des cycles de l'hiver, un modèle de type cohorte (les individus se développent au même rythme) a été développé. Ce modèle permet de déduire, à partir des effets mesurés au niveau individuel, les effets attendus au niveau population en terme de densité et de biomasse.

Ce type de recherche doit se développer encore afin de permettre la prise en compte de l'impact des produits chimiques sur les populations puis sur les écosystèmes. En effet, il est encore trop fréquent que les gestionnaires ne perçoivent que l'aspect sanitaire d'un épisode de pollution sans comprendre qu'au-delà des individus, les populations et les écosystèmes dans leur ensemble, sont impactés par les produits chimiques. L'exemple de la pollution des sédiments des rivières par les PCB est assez frappant sur cet aspect.

Polluants émergents

Le terme de "polluants émergents" réfère à un ensemble de substances, nouvelles ou non, présentant des structures et des modes d'action variés et dont la prise de conscience de leurs effets néfastes sur l'environnement est récente. Ainsi, la mise en évidence de l'existence de perturbations des fonctions de la reproduction chez les êtres

vivants et d'une façon plus générale de leur système endocrinien, en relation avec des contaminations de leur biotope par certains xénobiotiques s'est faite dans les années 80. Ces molécules agissant, directement ou indirectement sur le système endocrinien sont appelées des perturbateurs endocriniens.

Deux projets se sont intéressés à ces molécules. Comme indiqué précédemment, le projet de **Gilles Monod** s'est attaché à étudier les effets de l'EE2 sur la gambusie au travers d'études de laboratoire poursuivies en cosmes, couplant des expérimentations et une modélisation calibrée pour les témoins.

Le projet mené sous la coordination de **James Devillers** s'est plutôt intéressé au problème du criblage des molécules par des méthodes (Q)SAR afin de détecter leurs effets perturbateurs endocriniens potentiels. L'objectif de ce projet de recherche était premièrement d'inventorier l'ensemble des modèles de type SAR et QSAR réalisés sur les perturbateurs endocriniens. Une analyse critique de ces modèles a été faite en s'attachant particulièrement à la qualité des données biologiques, la signification des descripteurs moléculaires et la validité des outils statistiques utilisés pour obtenir les modèles. Le pouvoir prédictif et le domaine d'application de ces modèles ont aussi été discutés. Dans une seconde étape, différents modèles SARs ont été élaborés. Ainsi, l'intérêt de considérer des profils d'activités endocrines à la place d'un critère unique pour mieux évaluer la complexité du phénomène de disruption endocrinienne a été discuté au travers d'une étude SAR réalisée sur 11 416 molécules extraites de la banque NCI et pour lesquelles 13 activités endocriniennes ont été estimées par le programme PASS. Différentes approches multivariées et projections graphiques ont été utilisées pour établir des relations de type structure-activité fondées sur des fragments structuraux spécifiques.

De la même façon, des données de "binding" (active/inactive) vis-à-vis du récepteur aux androgènes pour un échantillon d'environ 200 molécules de structures diverses, décrites par des descripteurs topologiques et physico-chimiques, ont été utilisées pour construire des modèles de type SAR. Sept approches statistiques linéaires et non linéaires ont été testées. Les meilleures classifications ont été obtenues avec un réseau de neurones probabilistes et une machine à vecteurs de support. Certains des modèles obtenus ont été raffinés en considérant un nombre plus important de classes d'activité.

3. Construction d'outils de gestion ou d'évaluation transférables

Acquis transférables directement

Pour certains projets les acquis rapidement transférables sont évidents. Le projet coordonné par **Jérôme Cachot** visant à la construction d'une levure transgénique pour l'évaluation du risque génotoxique et la caractérisation des effets mutagènes dans l'environnement en est l'illustration parfaite. Il a conduit au développement d'un nouveau test de mutagenicité *in vitro* baptisé FACIM (Functional Analysis of Chemical-Induced TP53 Mutations) permettant l'évaluation de la mutagenicité de nouvelles molécules ou d'échantillons environnementaux. Une société de biotechnologie a été créée pour assurer l'exploitation commerciale de ce test.

Ce résultat a été rendu possible grâce à la collaboration entre les chercheurs du laboratoire d'écotoxicologie de l'université du Havre, du centre de Génétique Moléculaire du CNRS situé à Gif-sur-Yvette et de la faculté de Médecine et de Pharmacie de Rouen.

Ce projet a consisté à construire par génie génétique une souche de levure « humanisée » possédant toute la cascade enzymatique lui permettant de biotransformer *in vivo* des pro-mutagènes tels que les HAP et de détecter les métabolites génotoxiques formés grâce à un dosimètre moléculaire. La souche diploïde obtenue s'est avérée stable et facilement cultivable dans des conditions normales de culture. La sensibilité de la souche vis à vis de promutagènes environnementaux tels que le B(a)P et le DMBA a été évaluée. Les réponses obtenues étaient du même ordre de grandeur que celles documentées pour le SOS Chromotest. Enfin, cette souche a été utilisée en parallèle avec le SOS Chromotest pour évaluer le potentiel mutagène d'un extrait organique de sédiment de Seine. Ces deux tests ont donné des réponses comparables confirmant la présence de composés organiques pro-mutagènes dans les sédiments de Seine.

Pour d'autres projets, les acquis transférables à court terme sont moins aboutis.

Le projet coordonné par **Michel Raymond**, réalisé en partenariat avec l'EID (Entente Interdépartementale de Démoustication), se proposait de valider une expérience *in natura* de gestion de la résistance aux insecticides, basée sur la "Stratégie de la Zone Stable". Cette stratégie est fondée sur des principes simples de génétique des populations

Synthèse des travaux de la thématique « Nouvelles approches - Polluants émergents »

et peut s'appliquer théoriquement à tous types de situations.

La stratégie de la zone stable devait être mise en place pour le contrôle des populations du moustique *Culex pipiens* dans la région de Montpellier, en collaboration avec l'EID. Un suivi précis des gènes de résistance (locus Ester et ace-1) a été effectué sur plusieurs années consécutives (plus de 3000 moustiques génotypés). Après analyse des traitements effectivement effectués par l'EID, il semble que la SZS n'ait pu être appliquée qu'au cours de l'année 2003, mais pas dans les années qui ont suivi du fait de problèmes entre les partenaires du projet.

En conséquence, il n'a pas été possible de détecter d'effet significatif de la mise en place de cette stratégie. Cependant, des tendances (en 2003) semblent indiquer que la stratégie pourrait se révéler efficace, s'il était possible de l'appliquer de manière plus rigoureuse. Ce travail consistant à explorer les situations en populations naturelles afin d'étudier les conditions d'apparition de la résistance se poursuit maintenant en Tunisie en dehors des financements du projet PNETOX. Des contacts directs avec des responsables opérationnels et politiques en liaison avec les traitements contre *Culex pipiens* ont été établis et des actes de formation ont été organisés. Si cette expérimentation se poursuit dans de bonnes conditions et si elle confirme l'efficacité de la stratégie proposée, elle permettra à terme de fournir un outil pour mieux contrôler les populations de moustique *Culex pipiens* pour les gestionnaires.

Acquis transférables à moyen et à long terme

Dans le cas des modèles développés dans les [projets décrits au point 2](#), même si aucun d'entre eux n'est directement utilisable par un gestionnaire, ni mis facilement à disposition, il ressort clairement que du point de vue scientifique, les modèles sont aboutis et validés. Il s'agit bien de l'ultime étape de transformation d'un outil purement scientifique en un outil accessible par d'autres qui semble difficile. Cette constatation laisse à penser que les acquis à moyen terme seront importants et que la mise à disposition de ces modèles sera une réalité prochainement.

Par ailleurs, les travaux coordonnés par **Timothy VOGEL**, qui étudient l'implication des différents mécanismes génétiques dans l'adaptation bactérienne, pourraient avoir des implications pratiques à plus long terme dans le cadre de la dépollution des sols.

Le projet s'est intéressé au lindane et à l'isolat bactérien capable de le dégrader *Sphingomonas paucimobilis*. Cette bactérie a mis en place une voie catabolique utilisant les

gènes *lin*. Le lindane est un pesticide utilisé depuis 1946. Il a été interdit dans certains pays (France, Canada...) à cause de ses effets neurotoxiques. Il reste tout de même très utilisé dans de nombreux pays à cause de son faible coût.

Les objectifs du projet ont été de rechercher au sein du métagénome (ADN correspondant à la totalité du patrimoine génétique des bactéries d'un environnement donné) de sols contaminés (et colonisés par des bactéries dégradant le lindane) et non contaminés la prévalence de ces différentes régions d'ADN correspondant aux domaines du gène *linA*. Les fragments PCR ainsi obtenus ont ensuite été séquencés en vue de leur identification et comparaison avec le gène *linA*. Des analyses bio-informatiques menées sur les séquences nucléiques ainsi que protéiques ont permis de faire ressortir un certain nombre de motifs communs avec le gène *linA*.

Le projet a permis tout d'abord de montrer une grande diversité de fragments d'ADN présents dans la communauté microbienne du sol et capables de s'hybrider avec les amorces spécifiques de *linA*. Ce résultat confirme l'hypothèse de la construction du gène *linA* par un assemblage récent à partir de plusieurs fragments provenant d'organismes potentiellement différents pour former un gène dit mosaïque.

Conclusion

Il ressort de cette synthèse que bien que peu nombreux, les projets s'intéressant aux technologies innovantes ou aux polluants émergents sont d'une très bonne qualité scientifique et d'un grand intérêt, comme en atteste la liste des publications qui émanent de ces recherches.

Cependant, le dernier colloque de restitution du PNETOX ayant déjà pointé la difficulté à aboutir sur des acquis opérationnels à court terme sur la plupart des projets, une réflexion sur cette question serait nécessaire pour identifier les problèmes. Il est probable que cet aspect de transfert ne représente pas la première des préoccupations des équipes des projets. De plus, alors que la qualité scientifique des travaux ne fait aucun doute, les compétences sont éventuellement limitées sur cet aspect opérationnel. Du côté des utilisateurs potentiels, les attentes sont souvent larges, et leur manque de précision ne facilite pas l'appropriation des résultats de la recherche.

Une proposition pourrait être de prévoir une structure de soutien pour cet aspect dans les programmes nationaux de recherche à venir qui permette une réflexion et un échange avec des utilisateurs potentiels. Cette démarche pourrait permettre aux chercheurs de comprendre les contraintes des gestionnaires et d'adapter en

conséquence leurs modèles ou méthodes. A l'inverse, les gestionnaires pourraient mieux appréhender les avantages ou les limites des modèles et méthodes proposées afin de les utiliser à bon escient.

Le déroulement du projet « Gestion des gènes de résistance aux pesticides » offre également matière à réflexion sur cette question du transfert : construit en associant une équipe de chercheurs à des utilisateurs, il présentait a priori de bonne chance de permettre l'appropriation des connaissances par ces derniers. Les contraintes opérationnelles respectives, entre autres raisons, ne l'auront pas permis, malheureusement.

Enfin, l'intérêt et la qualité de ces projets sont notablement augmentés par la collaboration de différentes équipes de scientifiques, spécialistes de techniques innovantes complémentaires. Cette collaboration est encouragée par un programme du type du PNETOX. Par ailleurs, si les programmes examinés ont permis de répondre à certaines questions, ils ont aussi montré l'étendue de ce qu'il reste encore à comprendre sur les mécanismes impliqués dans la toxicité des produits chimiques, sur la caractérisation des effets sur les individus et les populations aussi bien que sur les mécanismes permettant de dégrader ou de s'adapter à ces produits.

Il paraît donc indispensable qu'à l'avenir des programmes appliqués de ce type continuent d'impliquer les ministères dont le périmètre touche peu ou prou à l'environnement.



APR 2001

Construction d'une levure transgénique pour l'évaluation du risque génotoxique et la caractérisation des effets mutagènes dans l'environnement

Partenaires

- **Université du Havre, Laboratoire d'Ecotoxicologie, Le Havre :** Jérôme Couteau, François Leboulenger, Jérôme Cachot
- **Faculté de Médecine et de Pharmacie, INSERM U614, IFRMP23, Rouen :** Jean-Michel Flaman, Thierry Frébourg
- **Centre de Génétique Moléculaire du CNRS, UPR 9061, Gif-sur-Yvette :** Philippe Urban, Denis Pompon

Coordinateur

- **Jérôme Cachot**
Université du Havre, Laboratoire d'Ecotoxicologie - Milieux aquatiques - UPRES EA-3222, IFRMP23
25 rue Philippe Lebon, BP 50 - 76 600 Le Havre
- **Coordonnées actuelles**
Université Bordeaux 1, ISM-LPTC UMR CNRS 5255
351 cours de la libération - 33405 Talence Cedex
j.cachot@ism.u-bordeaux1.fr

Mots clés

Test *in vitro* de mutagénicité, Levure, Gène suppresseur de tumeur TP53, Bioactivation des promutagènes, Spectre de mutations

Objectifs

Cette étude visait à construire par génie génétique une souche de levure « humanisée » possédant la cascade enzymatique lui permettant de biotransformer *in vivo* la grande majorité des pro-mutagènes environnementaux tels que les HAP et d'évaluer le potentiel génotoxique des métabolites formés.

Résultats

Les gènes humains codant pour la protéine TP53 et l'époxyde hydrolase ainsi qu'un système rapporteur basé sur l'expression du gène *ADE2* ont été intégrés dans le génome de la souche tandis que les cytochromes P450-1A1, 1A2 et 3A4 étaient exprimés sous forme transitoire. La souche diploïde obtenue baptisée yJC² s'est avérée stable et facilement cultivable dans des conditions normales de culture. Le système de détection des mutations a été validé au moyen de deux mutagènes directs, les UV et le 4-NQO. La souche diploïde s'est révélée très sensible aux UV en raison d'une fréquence accrue de recombinaison au locus TP53.

Les réponses obtenues pour le 4-NQO étaient du même ordre de grandeur que celles documentées avec le SOS Chromotest. Les capacités de biotransformation de cette souche ont été évaluées par HPLC au moyen de différents substrats synthétiques et naturels. Bien que les activités des différents P450 soient relativement faibles, les produits de biotransformations de plusieurs HAP et de la testostérone ont bien été détectés. Cette activité relativement faible

explique cependant la sensibilité toute relative de la souche vis à vis de pro-mutagènes environnementaux tels que le B[a]P et le DMBA. Une soixantaine de mutations induites par les UV ou le B[a]P ont été caractérisées. Bien que préliminaires ces données font apparaître deux spectres de mutations distincts, le premier caractérisé par une plus forte proportion de transitions C vers T et le second par une majorité de transversions G vers T.

Enfin, cette souche a été utilisée en parallèle avec le SOS Chromotest, pour évaluer le potentiel mutagène d'un extrait organique de sédiment. Des réponses comparables ont été obtenues confirmant la présence de pro-mutagènes dans les sédiments de l'estuaire de Seine. Ce nouveau test *in vitro* de mutagénicité baptisé FACIM (Functional Analysis of Chemical-Induced TP53 Mutations) permet à la fois l'évaluation du potentiel mutagène de molécules pures ou en mélange et la caractérisation du spectre des mutations induites au locus TP53.

Actions de transfert et perspectives pratiques

La souche yJC² a fait depuis l'objet de nombreuses améliorations techniques qui en raison de leur caractère confidentiel (déclaration d'invention) ne peuvent pas être explicitées ici.

Ces travaux ont conduit à la création en mai 2008 de la société de Biotechnologies TOXEM qui met à profit le test FACIM et d'autres tests de mutagénicité *in vitro* pour l'évaluation à haut débit du potentiel mutagène et anti-mutagène de molécules chimiques ou d'échantillons biologiques et environnementaux.

Valorisations



Articles scientifiques

- Cachot J., Flaman J.-M., Frébourg T. & Leboulenger F. (2004) The European flounder (*Platichthys flesus*) TP53 functions as a temperature-sensitive transcription factor which inhibits cell growth in yeast. **Gene**, 324 : 97-104.
- Cachot J., Couteau J., Frébourg T., Leboulenger F. & Flaman J.-M. (2004) Functional analysis of chemically-induced mutations at the flounder TP53 locus, the FACIM assay. **Mutation Research, Fundamental & Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 552 : 51-60.
- Couteau J., Flaman J.-M., Minier C. & Cachot J. (2008) Detection of environmental mutagens using the FACIM assay. **Marine Environmental Research**, 66 : 62-63.

Brevet

- Déclaration d'invention déposée le 20 mars 2008 auprès des huissiers Monsieur Forestier et Madame Seron-Gravier au Havre.

Création d'entreprise

- Société de biotechnologies TOXEM, AIRHN, 73 rue Martainville, 76600 Rouen. Prix Oséo-ANVAR, région Haute-Normandie 2007

Thèse

- Couteau J. (2005) Création d'une souche de levure transgénique pour la mesure de la génotoxicité environnementale. Thèse de doctorat, Université du Havre, France, 169 p.

APR 2001

Gestion des gènes de résistance aux pesticides : application de la stratégie de la zone stable

Partenaires

- Entente Interdépartementale de démoustication (EID), Montpellier
- Centre d'Ecologie fonctionnelle et Evolutive, UPR 9056 CNRS Montpellier

Coordinateur

- Michel Raymond
CNRS, Equipe Génétique de l'Adaptation
Laboratoire génétique & environnement, CC 065
Institut des Sciences de l'Evolution
Université de Montpellier II
34090 Montpellier cedex 05
raymond@isem.univ-montp2.fr
Michel.Raymond@univ-montp2.fr

Objectifs

La résistance aux insecticides est le problème majeur rencontré actuellement. Ainsi le développement de stratégies de gestion de la résistance qui permettent de retarder son apparition et de ralentir son expansion a fait l'objet de recherches intenses. Ces stratégies ont fait l'objet de nombreux modèles, qui doivent prendre en compte :

- 1) les variations spatiales et temporelles des fréquences des gènes de résistance et des densités des populations traitées,
- 2) les fitness des différents génotypes en zones traitée et non-traitée,
- 3) le flux génique.

La plupart des modèles de gestion ne tiennent pas compte de l'ensemble de ces paramètres, particulièrement du coût de la résistance (i.e. la baisse de fitness subie par les individus porteurs de gènes de résistance en zone non-traitée par rapport aux individus sensibles), ce qui amène à des conclusions pessimistes (l'apparition et la fixation de la résistance ne peut être que retardée, jamais stoppée).

Résultats

En considérant l'ensemble de ces paramètres, on observe la mise en place d'un équilibre migration-sélection entre la zone traitée et non-traitée, qui dépend des coefficients de fitness (coût et résistance), des différents allèles présents et de l'intensité du flux génique. Il existe une taille limite a^* permettant la mise en place de cet équilibre: en dessous de cette taille, un allèle coûteux ne peut pas envahir les populations et donc la résistance ne peut pas s'établir (tant qu'un allèle moins coûteux n'apparaît pas). Cette taille limite est proportionnelle au rapport entre la sélection et la migration. Une nouvelle stratégie basée sur cette théorie a donc été proposée récemment et appelée "Stratégie de la Zone Stable" (SZS). L'idée est de traiter les populations sur une surface inférieure à a^* , empêchant

ainsi le développement des gènes de résistance, et prolongeant donc la durée de vie des insecticides existants. De plus, si des gènes de résistance sont déjà présents, en réduisant la taille de la zone traitée, la théorie prédit qu'ils devraient diminuer en fréquence.

Difficultés rencontrées

La SZS devait être mise en place en 1999 pour le contrôle des populations du moustique *Culex pipiens* dans la région de Montpellier, en collaboration avec l'organisme chargé du traitement, l'Entente Interdépartementale de Démoustication (EID). Nous avons voulu vérifier son effet sur le terrain. Un suivi précis des gènes de résistance (locus Ester et ace-1) a été effectué sur plusieurs années consécutives (plus de 3000 moustiques génotypés). Après analyse des traitements effectivement effectués par l'EID, il semble que la SZS n'ait pu être appliquée qu'au cours de l'année 2003, mais pas dans les années qui ont suivi. En conséquence, nous n'avons pas pu détecter d'effet significatif de la mise en place de cette stratégie. Cependant, des tendances (en 2003) semblent indiquer que la stratégie pourrait se révéler efficace, s'il était possible de l'appliquer de manière plus rigoureuse.



Valorisations



Articles scientifiques

- Labbé P., Lenormand T., Raymond M. (2005), On the worldwide spread of an insecticide resistance gene: a role for local selection, **Journal of Evolutionary Biology**, Sous presse.
- Labbé P., Sidos N., Raymond M., Lenormand T., Resistance gene replacement in the mosquito *Culex pipiens*: fitness estimation from long term cline series, En préparation.
- Labbé P., Berticat C., Berthomieu A., Unal S., Bernard C., Raymond M., Lenormand T., Weill M., Imperfect adaptation: adaptive duplication in the insecticide resistant mosquito *Culex pipiens* in Montpellier area, En préparation.
- Labbé P., Alout H., Berticat C., Berthomieu A., Raymond M., Lenormand T., Weill M., High duplication rate in the insecticide resistant mosquito *Culex pipiens*, En préparation.
- Labbé P., Berticat C., Berthomieu A., Unal S., Bernard C., Raymond M., Lenormand T., Weill M., Adaptive duplication in the mosquito *Culex pipiens* quinquefasciatus from Martinique: cost and advantages., En préparation.
- Labbé P., Sidos N., Marquine M., Raymond M., Lenormand T., Stable zone strategy: full-scale test of resistance management, En préparation.

APR 2001

Adaptation microbienne aux composés xénobiotiques (pesticides)

Partenaires

• Laboratoire d'Ecologie Microbienne,
Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne :
H. Boubakri, M. Beuf, P. Simonet

Coordinateur

• Timothy Vogel
Laboratoire d'Ecologie Microbienne
UMR CNRS 5557
Université Claude Bernard Lyon 1
Villeurbanne
Timothy.Vogel@univ-lyon1.fr

Mots clés
Métagénomique,
Lindane,
Microorganismes,
Diversité génique

Objectifs

Sphingomonas paucimobilis est capable de minéraliser entièrement un xénobiotique, le γ -hexachlorocyclohexane (lindane) en condition aérobie en faisant appel à des enzymes cataboliques codées par les gènes *lin*. *linA* se distingue des autres gènes *lin* par un % G/C et un usage des codons différent laissant envisager sa possible acquisition par transfert horizontal. Cependant l'absence d'homologie de la séquence et de la protéine *LinA* dans les banques de données de même que l'absence de fragment d'ADN similaire à l'intégralité du gène *linA* dans

l'ADN extrait de sol, pourrait s'expliquer par une construction du gène en mosaïque. Le découpage du gène *linA* et l'amplification spécifique de chaque fragment par PCR dans l'ADN extrait de sol (ou métagenome) a pour but de détecter dans la communauté microbienne du sol les fragments d'ADN ayant une forte similarité avec les fragments de *linA* et pouvant être à l'origine de ce dernier.

Résultats

Ce travail a permis d'identifier un certain nombre de motifs communs entre *linA* et les séquences nucléiques ou protéiques de certaines protéines. Une construction évolutive du gène a ensuite été évaluée en réalisant un remodelage génétique. Le métagenome de ce sol non-pollué a été utilisé comme donneur potentiel des fragments d'ADN pour de nouveau reconstruire le gène. Cette simulation artificielle permet de se rapprocher des conditions naturelles qui pourraient expliquer la genèse d'un nouveau gène.



APR 2003

Relations de Type Structure-Activité (SARs et QSARs) Appliquées aux Perturbateurs Endocriniens Xénobiotiques

Partenaires

• Université Bordeaux 1, UMR 5255 :
N. Marchand-Geneste
• INERIS, Pôle VIVA - Unité Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo* :
J.M. Porcher

Coordinateur

• James Devillers
CTIS
3 Chemin de la Gravière
69140 Rillieux La Pape
j.devillers@ctis.fr

Mots clés
Perturbateurs endocriniens,
Modélisation, QSAR,
Profils d'activités,
Binding

Objectifs

Depuis le début des années 80, de nombreuses études écotoxicologiques *in situ* ont révélé l'existence de perturbations des fonctions de la reproduction chez les animaux sauvages et d'une façon plus générale de leur système endocrinien, en relation avec des contaminations de leur biotope par des xénobiotiques. Une diminution de la fertilité de nombreux invertébrés et vertébrés ainsi que des phénomènes de masculinisation ou de féminisation ont été associés à la présence de xénobiotiques dans l'environnement. Des troubles de la fonction thyroïdienne chez les poissons et les oiseaux ont également été reliés à l'exposition de ces organismes à certains contaminants anthropiques.

Les molécules agissant directement ou indirectement sur le système endocrinien sont appelées des perturbateurs endocriniens. D'une manière plus formelle, un perturbateur endocrinien se définit comme un agent exogène qui interfère avec la synthèse, la sécrétion, la liaison, l'action, ou l'élimination des hormones naturelles responsables de l'homéostasie, de la reproduction, du développement ou du comportement d'un organisme.

Son activité se manifeste au niveau de l'individu ou de sa descendance. Ils peuvent agir au niveau : (1) de la glande endocrinienne où a lieu la synthèse hormonale ; (2) des protéines plasmatiques de transport qui maintiennent la concentration en hormones libres dans le sang ; (3) de la capture des hormones par les cellules cibles ; (4) des enzymes du métabolisme et du catabolisme hormonal qui

permettent l'activation ou l'élimination des hormones ; (5) des récepteurs aux hormones ou des protéines associées qui contrôlent l'expression des gènes via les éléments de réponses aux hormones. Parallèlement à ces effets directs, des effets indirects sur l'hypothalamus, l'hypophyse, le système immunitaire peuvent également modifier la fonction endocrinienne.

Il existe des tests *in vitro* et *in vivo* pour estimer les effets des molécules sur le système endocrinien. Si leur utilité est indiscutable, pour des raisons de coût et de temps, il apparaît illusoire de vouloir les employer sur l'ensemble des molécules susceptibles de contaminer les écosystèmes. Pour pallier ce problème, un nombre croissant de modèles de type structure-activité (SAR et QSAR) sont proposés.

Dans ces conditions, l'objectif de ce programme de recherche était premièrement d'inventorier l'ensemble des modèles de type SAR et QSAR réalisés sur les perturbateurs endocriniens. Une analyse critique de ces modèles a été faite en s'attachant particulièrement à la qualité des données biologiques, la signification des descripteurs moléculaires et la validité des outils statistiques utilisés pour obtenir les modèles. Le pouvoir prédictif et le domaine d'application de ces modèles ont aussi été discutés. Pendant cette première phase, les différentes banques de données disponibles sur Internet pour construire des modèles de type structure-activité ont également fait l'objet d'une analyse critique.

Cette analyse bibliographique approfondie nous a permis de constater que la modélisation de profils d'activités endocriniennes n'avait jamais été entreprise et que le nombre de modèles (Q)SAR permettant de prédire l'activité androgénique des molécules était réduit. Nous avons pallié ces manques dans la deuxième partie de notre programme de recherche.

APR 2003

Relations de Type Structure-Activité (SARs et QSARs) Appliquées aux Perturbateurs Endocriniens Xénobiotiques (suite)

➔ Résultats

Modélisation des xénobiotiques selon leur profil d'activités endocriniennes

Ce travail a été réalisé grâce à l'utilisation du système PASS ("Prediction of Activity Spectra for Substances") qui permet de prédire des profils d'activités à partir de fragments structuraux.

La première idée sous-jacente à l'élaboration de ce système unique en son genre est que très souvent on découvre *a posteriori* que des molécules mises sur le marché pour un usage thérapeutique donné peuvent également s'avérer actives pour d'autres usages.

L'autre idée à l'origine de ce modèle réside dans le fait que de nombreuses molécules potentiellement intéressantes en thérapeutique ne peuvent pas être utilisées à cause de leurs effets indésirables et/ou de leur trop grande toxicité. La version utilisée dans notre étude comportait un échantillon d'entraînement de 35 000 molécules et était capable de prédire 565 activités biologiques différentes.

La prédiction du profil d'activité d'une molécule se présente sous la forme de listes d'activités biologiques classées selon une probabilité d'activité (PA) et d'inactivité (PI).

Parmi les 565 activités biologiques de PASS, les 13 suivantes étaient en relation directe avec le système endocrinien et ont donc été sélectionnées : œstrogène agoniste, œstrogène antagoniste, androgène agoniste, androgène antagoniste, modulateur du récepteur aux œstrogènes, glucocorticoïde agoniste, glucocorticoïde antagoniste, minéralocorticoïde, progestérone agoniste, progestérone antagoniste, agoniste de l'hormone thyroïdienne, antagoniste de l'hormone thyroïdienne et aldostérone antagoniste.

A partir de la banque de données du "National Cancer Institute" comportant plus de 250 000 structures, 11 416 molécules avec une valeur de PA $\geq 0,3$ pour au moins une activité endocrinienne ont été considérées.

Ces molécules ont été codées par des descripteurs Booléens prenant en compte la présence ou non de fragments structuraux, de groupements fonctionnels, etc. Différentes méthodes multivariées et des représentations graphiques variées ont été utilisées avec succès pour établir des SAR.

Elles ont permis de montrer que si certains fragments structuraux et groupes fonctionnels sont inféodés à telle(s) ou telle(s) activité(s) endocrinienne(s) d'autres sont ubiquistes.

Modélisation de l'activité androgénique des molécules

Des données de "binding" vis-à-vis du récepteur aux androgènes, obtenues dans les mêmes conditions expérimentales, pour un échantillon d'environ 200 molécules présentant des structures diverses et décrites par des descripteurs CODESSA ("Comprehensive Descriptors for Structural and Statistical Analysis") codant pour des propriétés topologiques et physico-chimiques, ont été utilisées pour construire des modèles de type SAR (i.e., molécule active/inactive).

L'analyse CART, différents types de réseaux de neurones artificiels (i.e., linéaire, perceptron à trois couches, à fonction radiale, probabiliste, LVQ1) et une machine à vecteurs de support utilisant une fonction noyau Gaussienne ont été testés comme outils statistiques.

L'exercice de comparaison a été réalisé sur la base des mêmes échantillons d'apprentissage et de test ainsi qu'à partir des mêmes descripteurs moléculaires. Les meilleures classifications ont été obtenues avec un réseau de neurones probabilistes et une machine à vecteurs de support.

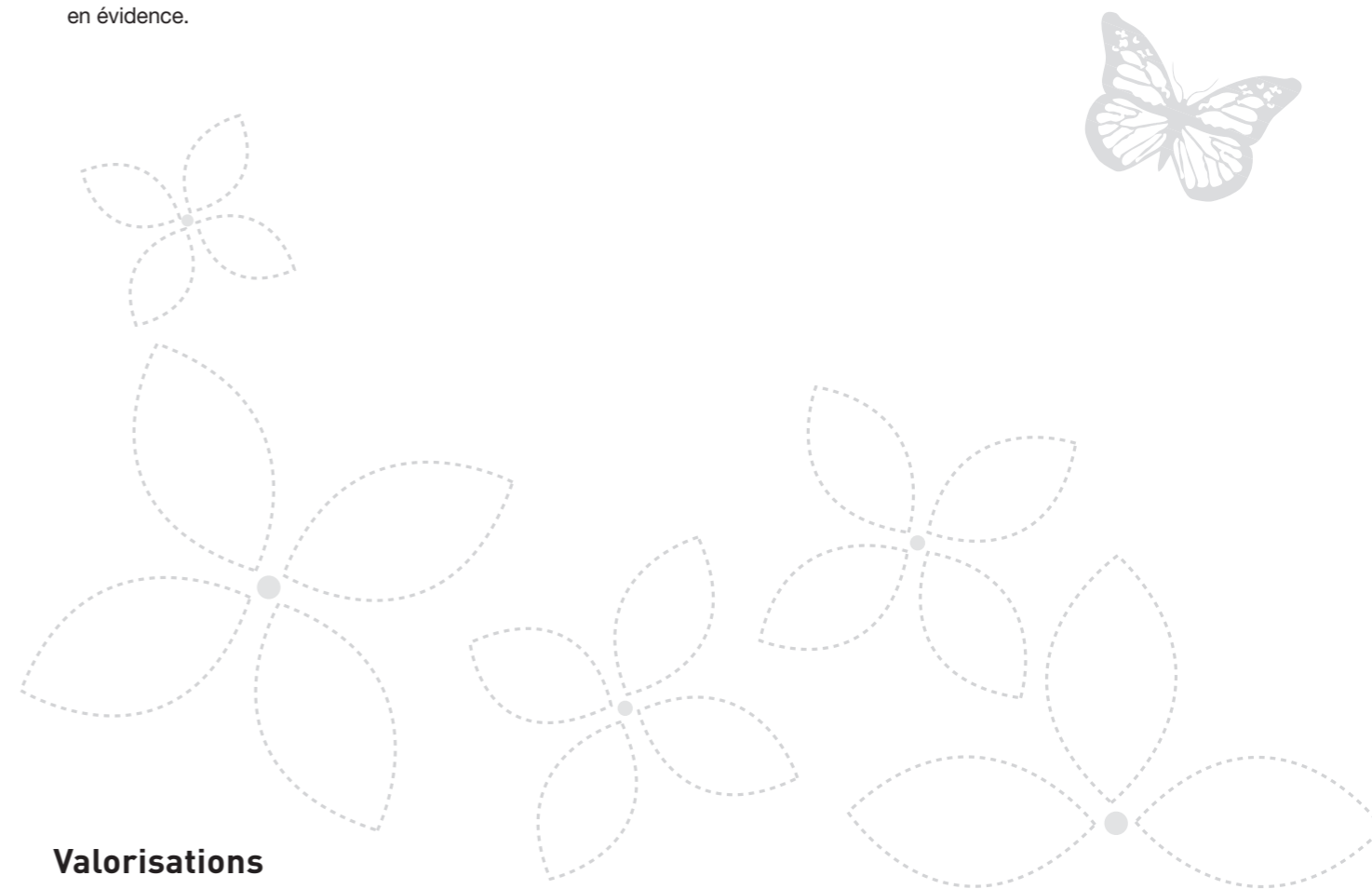
Les résultats obtenus en considérant les activités d'une façon Booléenne étant très satisfaisants, il nous est apparu intéressant de complexifier le problème en augmentant le nombre de classes d'activités. Pour cette étude, les performances d'une analyse CART et d'une machine à vecteurs de support ont été comparées.

➔ Perspectives scientifiques identifiées

Ce programme de recherche a permis de recenser l'ensemble des ressources et des modèles de type (Q)SAR sur les perturbateurs endocriniens et d'en faire une analyse critique. Un tel travail n'avait jamais été réalisé.

Le phénomène de perturbation endocrinienne est complexe et ne peut s'appréhender correctement via l'étude d'une seule cible même si, pour des raisons techniques et pratiques, c'est ce qui est généralement fait aussi bien expérimentalement que lors de l'élaboration de modèles. Pour la première fois, le profil d'activité endocrinienne d'un large corpus de molécules a été établi grâce à l'utilisation du programme PASS. Des relations de type SAR spécifiques ou non d'une cible ont ensuite été mises en évidence.

Les modèles élaborés pour prédire les effets des molécules au niveau du récepteur aux androgènes n'ont pas d'équivalent dans la littérature en ce qui concerne l'étendue de leur domaine d'application. Il en est de même du pouvoir prédictif de la plupart des modèles non linéaires générés dans ce programme de recherche et en particulier ceux utilisant un réseau de neurones probabilistes ou une machine à vecteurs de support. D'une façon plus générale, ce programme de recherche a permis de fédérer la recherche internationale en modélisation des perturbateurs endocriniens via l'organisation de trois sessions dans des congrès internationaux mais aussi grâce à la publication du premier livre sur le sujet.



Valorisations



Articles scientifiques

- Devillers J., Marchand-Geneste N., Carpy A., Porcher J.M. (2006) SAR and QSAR modeling of endocrine disruptors. **SAR and QSAR in Environmental Research**, 17 : 393-412.
- Marchand-Geneste N., Cazaunau M., Carpy A., Laguerre M., Porcher J.M., Devillers J. (2006) Homology model of rainbow trout estrogen receptor (rtER₁) and docking of endocrine disrupting chemicals (RDCs). **SAR and QSAR in Environmental Research**, 17 : 93-105.
- Devillers J., Marchand-Geneste N., Doré J.C., Porcher J.M., Poroikov V. (2007). Endocrine disruption profile analysis of 11,416 chemicals from chemometrical tools. **SAR and QSAR in Environmental Research**, 18 : 181-193.
- Panaye A., Doucet J.P., Devillers J., Marchand-Geneste N., Porcher J.M. (2008) Decision trees versus support vector machine for classification of androgen receptor ligands. **SAR and QSAR in Environmental Research**, 19 : 129-151.
- Devillers J. (2008) **Endocrine Disruption Modeling**. Taylor & Francis/CRC Press, Boca Raton, USA. (sous presse).
- Porcher J.M., Devillers J., Marchand-Geneste N. (2008) Mechanisms of endocrine disruptions: a tentative overview, dans **Endocrine Disruption Modeling** (Devillers J, ed.), Taylor & Francis/CRC Press, Boca Raton, USA (sous presse).
- Devillers J., Doucet J.P., Panaye A., Marchand-Geneste N., Porcher J.M. (2008) Structure-activity modeling of a diverse set of androgen receptor ligands, dans **Endocrine Disruption Modeling** (Devillers J, ed.), Taylor & Francis/CRC Press, Boca Raton, USA (sous presse).
- Marchand-Geneste N., Devillers J., Doré J.C., Porcher J.M. (2008) e-endocrine disrupting chemical databases for deriving SAR and QSAR models, dans **Endocrine Disruption Modeling** (Devillers J, ed.), Taylor & Francis/CRC Press, Boca Raton, USA (sous presse).



APR 2003

Extrapolation des effets entre niveaux d'organisation biologique. Expérimentation et modélisation, de l'individu à la population, des effets d'un perturbateur endocrinien chez un poisson, la gambusie

Partenaires

- INRA, Unité Biostatistiques et Processus Spatiaux, Avignon : Vincent Ginot¹
- INRA, SCRIBE et Unité Biostatistiques et Processus Spatiaux : Rémy Beaudouin
- Équipe Installations Expérimentales, SCRIBE
- Plateforme de calcul MIGALE, Unité Mathématique, Informatique et Génome, INRA, Jouy-en-Josas
- Unité Expérimentale d'Écologie et d'Écotoxicologie Aquatique, INRA, Rennes

Coordinateur

- Gilles Monod
INRA, SCRIBE
Campus de Beaulieu
35042 Rennes
gilles.monod@rennes.inra.fr

Mots clés
Modélisation,
Aide à la décision, Poisson,
Extrapolation des effets,
Biomarqueur, Population

Objectifs

Le développement des moyens d'analyse en biochimie et en biologie moléculaire a pu laisser imaginer que l'étude des réponses aux polluants des plus bas niveaux d'organisation (biomarqueurs) permettrait de prédire les conséquences pour la population. Mais, force est de constater que la question de l'extrapolation des effets reste très ouverte. Or, jusqu'à présent, les stratégies expérimentales mises en œuvre pour traiter cette question n'ont en général pas tenu compte des différences de temps de réponse des différents niveaux d'organisation : temps court pour les biomarqueurs, temps long pour la population. De plus, au niveau de la population, le faible nombre de répliques réalisables en conditions expérimentales, et la forte variabilité naturelle généralement constatée, entraînent une très faible puissance statistique des tests et, donc, un risque élevé de faux négatif.

Dans ce travail, une stratégie expérimentale permettant d'étudier le lien entre les réponses de différents niveaux d'organisation biologique, dont la population, a été définie et appliquée chez un poisson, la gambusie (*Gambusia holbrooki*). Elle repose sur la mise en œuvre d'une démarche diachronique et sur l'aide apportée par un modèle probabiliste de la dynamique des populations témoins. La démarche diachronique consiste à exposer des individus au laboratoire pour étudier leurs réponses à court terme (biomarqueurs, performances reproductrices), puis, après avoir arrêté l'exposition, à introduire ces individus en mésocosme pour étudier si les effets à court terme

peuvent être mis en relation avec des effets à long terme au niveau de la population. Le modèle probabiliste vise à remplacer les populations témoins réelles, peu nombreuses et fortement variables, par un très grand nombre ($n = 10\ 000$) de populations témoins virtuelles qui simulent, en respectant la variabilité naturelle, l'ensemble des populations attendues, compte tenu des conditions dans lesquelles se déroule l'expérience réelle (en particulier la température de l'eau). Ce grand nombre doit permettre d'augmenter considérablement la puissance statistique des comparaisons avec les populations réelles issues d'individus exposés au polluant.

Résultats

La construction d'un modèle individu-centré de la dynamique de population de la gambusie en mésocosme a constitué la première phase de ce travail. Pour ce faire, la connaissance des traits d'histoire de vie de la gambusie a été acquise pour renseigner de manière précise les paramètres du modèle. Le modèle mis au point est relativement complexe et comporte une trentaine de paramètres. Une méthode originale, basée sur l'utilisation des résultats de l'analyse de sensibilité, a été conçue pour le calibrer. Au final, le modèle a été calibré sur deux années d'expériences, et validé sur une troisième année différente des années ayant servi à la calibration.

L'étude de la réponse de la gambusie à un perturbateur endocrinien, l'éthynylœstradiol (EE2), a ensuite été réalisée. Chez les individus exposés au laboratoire de leur naissance à l'âge adulte, les résultats montrent que l'entrée en puberté des mâles témoins a été bloquée à cause de conditions expérimentales défavorables. Par contre, la puberté s'est déroulée normalement chez les individus exposés à 20 ou 40 ng/L d'EE2. Ce résultat suggère l'intervention du signal œstrogénique dans l'initiation de la spermatogenèse chez la gambusie, ce que de très récents travaux ont montré chez la souris.

Ces deux concentrations ont aussi accéléré l'entrée en puberté des femelles. Pour la plus forte concentration en EE2 (80 ng/L), on a constaté que les femelles n'avaient pas enclenché leur premier cycle ovarien alors que les mâles avaient accompli leur puberté sans dommage apparent. Au niveau de la population, aucun descendant n'a été retrouvé dans le mésocosme ayant reçu les individus qui avaient subi l'exposition à la plus forte concentration d'EE2 (80 ng/L). L'absence de développement ovarien constatée chez les femelles en fin d'exposition semble donc avoir été irréversible. Par contre, les individus fondateurs témoins (pas d'exposition préalable à l'EE2), ou ceux qui avaient été exposés à des concentrations inférieures à 80 ng/L d'EE2, ont produit des descendants. Mais la variabilité et le faible nombre de populations disponibles (3 populations témoins, 1 population par concentration d'EE2) empêchaient la mise en évidence de différences entre les structures des populations issues d'individus ayant subi des traitements différents.

Au contraire, la production (avec l'aide du modèle) d'un référentiel probabiliste de 10 000 populations attendues dans les conditions de l'année d'expérience a permis de révéler des écarts à la normale, aussi bien chez les populations issues d'individus témoins (ce qui confirme que les conditions expérimentales de la phase d'exposition n'étaient pas optimales), que chez celles issues d'individus exposés aux deux plus fortes concentrations d'EE2 (20 et 40 ng/L).

Le gain de puissance statistique apporté par le modèle a concerné aussi bien les variables scalaires (nombre, sex-ratio, ...) que la distribution de la fréquence des tailles. Cette dernière apparaît d'ailleurs comme une sortie très discriminante, une véritable "empreinte digitale" de la population (une méthode statistique de comparaison de distributions de fréquences, basée sur la notion de "distribution de distributions", a été mise au point dans le cadre de ce projet).

Au bilan, l'analyse des différences entre les populations réelles (observées dans les cosmes) et les populations attendues (simulées par le modèle) montre clairement l'influence primordiale des caractéristiques des individus fondateurs des populations réelles. Ceci permet, dans ce cas d'étude, d'extrapoler à la population (long terme) des effets observés au niveau des individus (court terme).

La stratégie proposée dans cette étude impose évidemment d'accorder une grande importance à la connaissance du système biologique étudié, dans son état normal (témoin). Concrètement, cela demande de ne pas "se satisfaire" de la présence d'un lot témoin dans le protocole expérimental. Faut-il encore savoir si ce témoin "fonctionne" normalement. Nous avons vu que, dans cette étude, cela avait été décisif. Car c'est bien parce que nous connaissions la dynamique normale de la puberté chez la gambusie, que nous avons pu interpréter les résultats observés au niveau des individus (et constater que les témoins étaient "anormaux").

Et c'est aussi parce que nous disposions d'un référentiel validé (le modèle probabiliste de dynamique de population) que nous avons pu détecter des écarts à la normale, aussi bien chez les populations "témoins" que chez les populations issues d'individus pré-exposés à l'EE2.

Perspectives scientifiques identifiées

À l'avenir, l'application de la démarche diachronique et l'exploitation du modèle probabiliste de dynamique de population de la gambusie pourraient concerner d'autres polluants et d'autres scénarios d'exposition.

Autour du modèle, de nouveaux axes de recherches pourraient aussi découler de ce travail, et notamment la planification d'expériences (recherche a priori du "pire cas" via des expériences simulatoires) et l'interprétation des effets sur les populations (inférence sur les paramètres du modèle).

En conclusion, notre étude montre qu'une démarche expérimentale diachronique est réalisable de l'individu à la population, chez un poisson. Elle représente une stratégie expérimentale originale pour interroger la signification écotoxicologique des biomarqueurs. Notre étude montre aussi que la faible puissance statistique qui pénalise les études expérimentales en cosme n'est pas une fatalité.

La modélisation probabiliste de la variable d'intérêt, dans son état "normal", nous semble être une voie très prometteuse pour augmenter la puissance statistique des comparaisons témoin/traité. À notre connaissance, cette stratégie n'avait encore jamais été proposée.

Valorisations



Publications scientifiques

- Soubeyrand, S., Beaudouin, R., Desassis, N. & Monod, G. (2007), Model-based estimation of the link between the daily survival probability and a time-varying covariate, application to mosquitofish survival data, *Mathematical Biosciences* 210 : 508-522.
- Beaudouin, R., Monod, G. & Ginot, V. Selecting parameters for calibration via sensitivity analysis: an individual-based model of mosquitofish population dynamics, *Ecological Modelling* (sous presse).
- Beaudouin, R., Ginot, V. & Monod, G., Length growth characteristics of eastern mosquitofish, *Gambusia holbrooki*, in its most northern habitat, *Journal of Fish Biology* (accepté).
- Beaudouin, R. & Monod, G. Reproductive characteristics of eastern mosquitofish, *Gambusia holbrooki*, in its most northern habitat, (en préparation).

Thèses

- Beaudouin, R. (2007), Modélisation individu-centrée pour aider à la détection et à l'interprétation des effets des polluants chimiques sur la dynamique de population d'un poisson, la gambusie, en écosystème expérimental, Thèse de doctorat (Biologie), Université Rennes 1.

¹ Vincent Ginot est décédé le 3 janvier 2007

APR 2003

Evaluation des effets des Mélanges de Métaux sur la base des Concentrations Internes (EMMCI)

Partenaires

- Cemagref, Lyon :
Jeanne Garric et Olivier Geffard
- Université de Reims :
Sylvie Biagianti et Alain Geffard
- Université Lyon 1, UMR CNRS 5558, Lyon :
Sandrine Charles et Elise Billoir

Coordinateur

- Alexandre Péry - Cemagref Lyon - UR BELY Laboratoire d'écotoxicologie
3 bis Quai Chauveau - CP 220 - 69336 LYON Cedex 9
- Coordonnées actuelles**
INERIS Direction des risques chroniques – Pôle VIVA
Unité « Modèles pour l'Ecotoxicologie et la Toxicologie »
Parc Technologique ALATA – BP n° 2 - 60550 Verneuil-en-Halatte
alexandre.pery@ineris.fr

Mots clés

Accumulation,
Concentration cytosolique,
Modélisation, Chironome,
Sédiment

Objectifs

L'évaluation du risque lié aux contaminations multi-métalliques est complexe du fait des problèmes de biodisponibilité variable des métaux et de la complexité des interactions entre métaux, tant au niveau de la cinétique qu'au niveau des effets.

Le projet EMMCI visait à proposer une évaluation du risque pour les chironomes et les daphnies exposées à des mélanges de métaux (cuivre, cadmium et zinc) alliant mesures biochimiques et modélisation.

Plus précisément, nous proposons de dériver le risque sur les populations de ces invertébrés à partir de données d'accumulation de métaux au niveau individuel.

Résultats

Au sein de la charge toxique globale d'un organe ou organisme, seule une fraction est toxicologiquement active. La fraction cytosolique apparaît comme importante dans la toxicologie des éléments métalliques. Or, la concentration interne totale rend compte de manière très imparfaite de la concentration cytosolique. Nous avons donc développé des méthodes d'analyse biochimique adaptées afin d'accéder à l'accumulation des métaux cytosoliques.

Nous avons ensuite mis au point des méthodes d'analyse des effets permettant d'estimer de manière robuste les paramètres liés à la réponse toxique et de dériver des seuils de toxicité sur l'ensemble du cycle de vie des invertébrés (croissance et reproduction).

Ces méthodes reposent sur des équations mathématiques à fondement biologique et sur des méthodes performantes d'estimation de paramètres par inférence Bayésienne.

En particulier, nous avons développé une approche d'estimation de paramètres qui permet d'intégrer l'expérience acquise au laboratoire ou dans la littérature via des tests réalisés en routine.

Nos seuils se sont révélés pertinents pour rendre compte des effets des mélanges de métaux et d'échantillons du terrain pollués en métaux (des sédiments proches de sources de pollution métallique pour le chironome, et des eaux du Lot pour la daphnie). Nous avons montré qu'une approche alternative fondée sur les concentrations totales ou sur les concentrations d'exposition n'aurait pas permis d'obtenir ce résultat.

Enfin, nous avons proposé des modèles de changement d'échelle de l'individu à la population, les moins exigeants possible en nombre de paramètres, afin de dériver des seuils de risque pour les populations exprimés en termes d'accumulation cytosolique.

Actions de transfert et perspectives pratiques

Des techniques appropriées de mesures pertinentes d'accumulation métallique chez des organismes d'intérêt en écotoxicologie, et des seuils de toxicité à plusieurs échelles d'organisation biologique ont été fournis sont ainsi disponibles, dans la perspective d'une meilleure connaissance des risques pour les écosystèmes aquatiques.



Valorisations



Publications scientifiques

- Billoir E., Péry A.R.R., Charles S. (2007) Integrating the lethal and sublethal effects of toxic compounds into the population dynamics of *Daphnia magna* : a combination of the DEBtox and matrix population models. **Ecological Modelling**, 203 :204-214.
- Billoir E., Delignette-Muller M.L., Péry A.R.R., Charles S. (2008) Statistical cautions when estimating DEBtox parameters. **Journal of Theoretical Biology** (en révision).
- Billoir E., Delignette-Muller M.L., Péry A.R.R., Charles S. (2008) On the use of Bayesian inference to estimate DEBtox parameters. **Environmental Science and Technology** (soumis).
- Conrad A., Péry A.R.R., Delahaut L., Sartelet H., Biagianti-Risbourg S., Geffard A., Subcellular distribution of metal (cadmium, copper and zinc) in *Chironomus riparius* (diptera chironomidae) (en préparation).
- Fraysse B., Geffard O., Berthet B., Quéau H., Biagianti-Risbourg S., Geffard A. (2006) Importance of metallothioneins in the cadmium detoxification process in *Daphnia magna*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 144C : 286-293.
- Péry A.R.R., Geffard A., Garric J. (2006) Mechanistic models to perform population risk assessment with the midge *Chironomus riparius* : application to heavy metals. **Environmental Science and Technology**, 40 : 6026-6031.
- Péry A.R.R., Ducrot V., Geffard A., Garric J. (2007) Do differences between metal body residues reflect the differences between effects for *Chironomus riparius* exposed to different sediments. **Chemosphere**, 66 : 397-403.
- Péry A.R.R., Geffard A., Conrad A., Mons R., Garric J. (2008) Assessing risk of multi-metallic sediment contamination on *Chironomus riparius* based on cytosolic accumulation. **Ecotoxicology and Environmental Safety** (sous presse).

Conférence invitée

Recherche et action publique
Apports de la sociologie de la traduction

Auteur

• Pierre-Benoit JOLY

INRA UR 1216 - Transformations Sociales et Politiques
liées au Vivant (TSV)

et

Institut Francilien "Recherche, Innovation, Société" (IFRIS)

65 boulevard de Brandebourg - 94205 IVRY-SUR-SEINE

Université Paris-Est Marne La Vallée

Bâtiment du Bois de l'Étang

5 boulevard Descartes - 77454 Champs sur Marne

joly@ivry.inra.fr



→ Afin de gérer les risques liés aux développements technologiques, le recours aux connaissances scientifiques va croissant. On attend en effet de la science qu'elle contribue à la définition de normes, qu'elle fournisse des instruments de métrologie et qu'elle soit une source d'alternatives en cas d'impasse. D'où l'importance de programmes de recherche finalisés dont l'objectif est de produire des connaissances en appui aux décisions publiques.

De tels programmes sont confrontés à plusieurs difficultés. D'une part, dans la gestion de ces programmes, il n'est pas évident d'associer les critères de l'excellence académique et ceux de la pertinence pour l'action publique – rares sont les équipes qui excellent dans les deux domaines. D'autre part, le potentiel d'"utilisabilité" des connaissances produites semble faible.

Au cours des 20 dernières années, ces problèmes ont fait l'objet d'une assez forte attention des chercheurs en sciences sociales et en sciences de gestion. Dans cette communication, on s'appuiera notamment sur la sociologie de la traduction pour montrer que :

(1) au plan conceptuel, il est préférable de raisonner en termes de co-production de connaissances et de l'action publique – plutôt que d'utiliser la métaphore de l'articulation ;

(2) au plan pratique, il faut prendre en compte l'ensemble des dispositifs – pas seulement le programme, mais aussi les diverses formes d'expertise et les investissements dans des infrastructures de connaissances - et leur architecturation.



Session 3 Ecosystèmes terrestres



→ Conférence invitée

The Soil Thematic Strategy and its implications for eco-toxicology - Luca Montanarella

→ Synthèse des travaux de la thématique "Ecosystèmes terrestres"

Coordonnée par Antonio Bispo et Pascal Simonet

→ Travaux de recherche de la thématique "Ecosystèmes terrestres"

APR 2001

- Analyse couplée de la dissipation des pesticides dans le sol et de leur impact écotoxicologique sur les Nématodes - Laurent Bruckler
- Utilisation de l'abeille domestique (*Apis mellifera*) pour caractériser le niveau de contamination de l'environnement par les xénobiotiques industriels à caractère hydrophobe - James Devillers
- Impact des inocula bactériens (*Azospirillum* naturels et génétiquement modifiés) stimulateurs des cultures sur le fonctionnement biologique du sol - Yvan Moënne-Loccoz

APR 2003

- Éléments traces métalliques (ETM) dans le continuum sol-plante, espèces tolérantes et restauration des sites industriels - Josep Escarré
- Mesure et procédures d'évaluation de l'impact sur l'environnement des anti-virulents ciblant le quorum-sensing - Denis Faure
- Biodisponibilité du cuivre pour des plantes cultivées dans des sols à antécédent viticole - Méthodes d'évaluation et déterminants biologiques et biogéochimiques - Philippe Hinsinger
- Étude modèle de l'exposition de végétaux à la pollution atmosphérique : utilisation de la réponse enzymatique comme bio-indicateur - Stéphane Le Calvé
- La végétation des friches métallurgiques : caractéristiques écophysiologiques et influence sur la mobilité des métaux lourds - Jean-Claude Leclerc
- Réponses adaptatives des communautés microbiennes du sol aux toxiques : approche métagénomique - Roland Marmeisse

CONFÉRENCE INVITÉE

The Soil Thematic Strategy and its implications for eco-toxicology

Auteur

• **Luca Montanarella**
European Commission
DG JRC
Via E. Fermi, 2749
I-21027 Ispra (VA)
ITALY
luca.montanarella@jrc.it



→ **The adoption of the EU Thematic Strategy for Soil Protection by the European Commission** has given formal recognition of the severity of the soil and land degradation processes within the European Union and its bordering countries. The thematic strategy underlines that soil degradation processes or threats or a combination of some of the threats can ultimately lead to desertification. The Strategy includes an extended impact assessment that has quantified soil degradation in Europe, both in environmental and economic terms. Available information suggests that, over recent decades, there has been a significant increase in soil degradation processes, and there is evidence that these processes will further increase if no action is taken. Soil degradation processes are driven or exacerbated by human activity. Climate change, together with individual extreme weather events, which are becoming more frequent, will also have negative effects on soil. Soil degradation processes occurring in the European Union include erosion, organic matter decline,

compaction, salinisation, landslides, contamination, sealing and biodiversity decline.

Including soil biodiversity pools into standard eco-toxicological assessments will become an important issue in the near future. The strong interest by the European Food Safety Authority (EFSA) in eco-toxicological aspects related to soil biodiversity has determined the further development of more intensive activities by the European Commission (DG JRC) leading to the establishment of a soil biodiversity working group including FAO, CBD, EFSA and independent experts in order to address further actions toward an improved understanding of soil biodiversity and its inclusion into future standard procedures for eco-toxicological testing on plant protection products.

Synthèse des travaux de la thématique « Ecosystèmes terrestres »

Auteurs

• **Antonio Bispo** - ADEME - Direction Déchets et Sols - Département Animation de la Recherche Déchets & Sols - 20, Avenue du Grésillé - BP 90406 - 49 004 ANGERS cedex 01 - antonio.bispo@ademe.fr
• **Pascal Simonet** - Équipe Génomique Microbienne environnementale - UMR CNRS 5005, CEGELY - École Centrale de Lyon - 36 avenue Guy de Collongue - 69134 ECULLY CEDEX - pascal.simonet@ec-lyon.fr

1. Contexte et besoins

La récente évaluation des services rendus par les écosystèmes a mis en évidence que nos sociétés, notre économie et plus généralement notre bien être reposent sur leur bon fonctionnement (MAE, 2005¹). Ainsi, les écosystèmes sont responsables de nombreux services tels que la fourniture d'aliments et de fibres ou encore la gestion des flux d'eau et de sa qualité. Pour les écosystèmes terrestres, la fourniture de ces services repose en grande partie sur le sol et notamment les organismes du sol. Dès lors, la caractérisation de la contamination du sol tout comme de ses impacts sur la biodiversité et ses fonctions sont cruciales.

Or il est démontré que les pressions sur les sols sont croissantes et vont continuer à croître compte tenu du contexte mondial de demande d'eau, d'espace, de nourriture et d'énergie (ex : demande de sol pour bâtir des infrastructures, intensification des pratiques agricoles et sylvicoles à vocation énergétiques). L'adoption en 2006 d'une stratégie européenne pour la protection des sols ainsi que la proposition d'une directive cadre pour la protection des sols, par la Commission Européenne, sont le reflet de ces inquiétudes et du besoin impérieux de protéger une ressource non renouvelable (COM 2006-231², COM 2006-232³). La Commission a ainsi identifié 8 menaces pesant sur les sols européens parmi lesquelles la contamination et la perte de biodiversité.

La contamination des sols a diverses origines :

- diffuse, liée à des dépôts atmosphériques, à des pratiques agricoles (ex : fertilisation, les traitements phytosanitaires, épandage de lisiers) ou encore à des épandages de déchets, ou,
- localisée, liée à d'anciens sites industriels ou miniers.

En fonction des régions, de l'usage des sols, des pratiques agricoles et de la proximité d'industries en fonctionnement ou ayant cessé leur activité, la part de chaque source à la contamination des sols peut être difficile à déterminer. Ainsi, dans les régions d'élevage et/ou dans les régions viticoles, les pratiques agricoles peuvent être à l'origine de l'accroissement des

concentrations en Cu et Zn dans l'horizon de surface (SOGREAH, 2007⁴). Dans les régions très industrielles ou minières, ponctuellement des concentrations importantes en divers éléments traces comme le cadmium (Cd), le plomb (Pb) ou encore l'arsenic (As) peuvent être mises en évidence suite à des dépôts de déchets (scories) ou des retombées atmosphériques.

Qu'elle soit diffuse ou localisée, la contamination a non seulement des effets sur les organismes du sol mais également des répercussions sur les autres milieux comme l'air ou l'eau et plus largement les écosystèmes terrestres (transferts de contaminants vers les autres organismes via les chaînes trophiques).

Dans ce contexte, les besoins sont nombreux, tant pour caractériser la contamination du sol et ses effets que pour évaluer les transferts dans les chaînes trophiques et apprécier ainsi la contamination globale d'un milieu et d'un écosystème. Il s'agira ainsi de caractériser ou de proposer des outils d'étude sur :

- le devenir (adsorption, transfert, dégradation) des contaminants (organiques, minéraux et biologiques) dans les sols,
- l'exposition des organismes du sol et des réseaux trophiques ayant pour base le sol,
- les effets des contaminants à différents niveaux (ex : cellulaire, individuels, populationnels, communautaires) sur les organismes du sol,
- la modélisation de l'exposition et des effets.

Ces éléments sont nécessaires pour évaluer les risques pour les écosystèmes terrestres liés à la contamination des sols ou plus largement à l'évaluation des pratiques agricoles (ex : introduction d'espèces modifiées génétiquement). Ils sont également nécessaires pour contrôler l'état d'imprégnation des écosystèmes, leur résistance et leur résilience.

Ces besoins de recherche, identifiés par ailleurs par les appels à projet PNETOX, trouvent aujourd'hui un écho important puisque le projet de directive cadre pour la protection des sols propose l'harmonisation des méthodes d'évaluation des risques pour les écosystèmes liés aux sols contaminés, et préconise le développement de recherches sur la biodiversité des sols et les effets des pressions anthropiques sur elle.

Synthèse des travaux de la thématique « Ecosystèmes terrestres »

2. Projets examinés

Dans le cadre de cette synthèse des travaux relevant de la thématique « écosystèmes terrestres », neuf projets de recherche ont été examinés :

APR 2001

• **Laurent Brückler** - Analyse couplée de la dissipation des pesticides dans le sol et de leur impact écotoxicologique sur les Nématodes

• **James Devillers** - Utilisation de l'abeille domestique (*Apis mellifera*) pour caractériser le niveau de contamination de l'environnement par les xénobiotiques industriels à caractère hydrophobe

• **Yvan Moëgne-Loccoz** - Impact des inocula bactériens (*Azospirillum* naturels et génétiquement modifiés) stimulateurs des cultures sur le fonctionnement biologique du sol
APR 2003

• **Josep Escarré** - Éléments traces métalliques (ETM) dans le continuum sol-plante, espèces tolérantes et restauration des sites industriels

• **Denis Faure** - Mesure et procédures d'évaluation de l'impact sur l'environnement des anti-virulents ciblant le quorum-sensing

• **Philippe Hinsinger** - Biodisponibilité du cuivre pour des plantes cultivées dans des sols à antécédent viticole - Méthodes d'évaluation et déterminants biologiques et biogéochimiques

• **Stéphane Le Calvé** - Étude modèle de l'exposition de végétaux à la pollution atmosphérique : utilisation de la réponse enzymatique comme bio-indicateur

• **Jean-Claude Leclerc** - La végétation des friches métallurgiques : caractéristiques écophysiological et influence sur la mobilité des métaux lourds

• **Roland Marmeisse** - Réponses adaptatives des communautés microbiennes du sol aux toxiques : approche métagénomique

3. Ecosystèmes et milieux concernés, facteurs de perturbation

3.1 - Le sol, support des écosystèmes terrestres

Les projets soutenus par le programme PNETOX (2001 et 2003) couvrent une gamme étendue de situations environnementales représentatives de différents écosystèmes terrestres. Ils s'intéressent majoritairement

aux relations entre le sol et les organismes du sol ou vivant sur le sol (ex : plantes). Deux autres projets ont cependant considéré des organismes (ex : abeilles) ou des expositions via d'autres milieux (ex : l'air).

Les sources de contamination diffuse et ponctuelle ont toutes les deux été abordées à travers la caractérisation de sites :

- en Région Méditerranéenne dont la pollution par les éléments traces métalliques (ETM) résulte de la cessation de l'exploitation des mines. Sur ces sites, l'effet de la contamination est aggravé par la présence d'un substrat grossier et filtrant et par la forte aridité due à la sécheresse estivale (projet : « Éléments traces métalliques (ETM) dans le continuum sol-plante, espèces tolérantes et restauration des sites industriels (EMETER) » coordination **J. Escarré**)

- de sites métallurgiques industriels aujourd'hui à l'état de friches. Des études ont été conduites pour déterminer le rôle des plantes en tant que bio-indicateurs de la pollution des sols (projet « La végétation des friches métallurgiques : caractéristiques écophysiological et influence sur la mobilité des métaux lourds », coordination **JC Leclerc. O Faure**).

- De sites agricoles, moins extrêmes, présentant une gamme contrastée de propriétés, notamment en ce qui concerne le pH et le statut organique (projet « Biodisponibilité du cuivre pour des plantes cultivées dans des sols à antécédent viticole - Méthodes d'évaluation et déterminants biologiques et biogéochimiques », coordination **P. Hinsinger**).

Le sol étant un milieu complexe et hétérogène, il convient de ne pas considérer seulement les différences de structure et de texture qui conditionnent l'adsorption et la rétention des contaminants métalliques (coordination **J. Escarré**) ou organiques (projet « Analyse couplée de la dissipation des pesticides dans le sol et de leur impact écotoxicologique sur les Nématodes », coordination **L. Brückler**). Pour les contaminants organiques, la dégradation biologique et/ou physico-chimique est également à prendre en compte tout comme les produits qui en sont issus afin d'évaluer leur persistance dans les sols et donc leurs effets.

Les travaux sur les écosystèmes terrestres ont souvent été conduits en combinant des approches de terrain et de laboratoire, en microcosmes (coordinations **P. Hinsinger ; J. Escarré ; JC Leclerc et O. Faure**) ou en batch (coordination **L. Brückler**) qui permettent de contrôler plus précisément les différents paramètres biotiques et abiotiques. Par ailleurs, cela permet également de manipuler sans risque pour l'environnement des substances toxiques que celles-ci soient les polluants eux-mêmes ou des homologues radioactifs destinés à suivre leur minéralisation

et métabolisation (coordination **L. Brückler**). Des travaux en plein champ ou en conditions de laboratoires ont été développés dans le but d'une part, d'évaluer la spéciation/localisation des contaminants ou des molécules dérivés de leur dégradation dans les phases constitutives du sol (ex : liquide, solide à sorption rapide, les résidus liés) et d'autre part, de développer puis de valider des modèles cinétiques décrivant leur devenir et leur distribution dans les différents compartiments du sol afin de prévoir l'exposition et les effets sur les organismes (coordinations **L. Brückler ; P. Hinsinger**).

Grâce au recours à de nouvelles approches microbiologiques, d'autres travaux visaient à démontrer le potentiel adaptatif des micro-organismes pro- et eucaryotes des sols soumis à des stress de pollution et leur double rôle d'abord comme indicateurs de la contamination des sols mais aussi comme opérateurs actifs impliqués dans la remédiation de sites pollués (projet « Réponses adaptatives des communautés microbiennes du sol aux toxiques : Approche métagénomique » coordination **R. Marmeisse**).

3.2 - Les facteurs de perturbation

Les contaminants étudiés dans ces programmes de recherche sont soit des pesticides organiques comme le parathion (coordination **L. Brückler**) ou minéraux comme le cuivre (fongicide largement utilisé dans les exploitations viticoles (coordination **P. Hinsinger**)), soit des éléments traces en mélange (coordinations **J. Escarré ; JC Leclerc et O. Faure**) issus d'anciennes installations industrielles.

En parallèle, de nouveaux anti-virulents naturels d'origine bactérienne ciblant des pathogènes végétaux bactériens (projet « Mesure et procédures d'évaluation de l'impact sur l'environnement des anti-virulents ciblant le quorum-sensing » coordination **D. Faure**) ont également été étudiés, mais aussi des agents biologiques comme les bactéries rhizosphériques du genre *Azospirillum* qui présentent un effet promoteur de la croissance végétale (projet « Impact des inocula bactériens (*Azospirillum* naturels et génétiquement modifiés) stimulateurs des cultures sur le fonctionnement biologique du sol » coordination **Y. Moëgne-Loccoz**).

3.3 - Les systèmes biologiques étudiés

Plusieurs projets de recherche liés aux écosystèmes terrestres ont considéré le système « sol-plante ». La plante est en effet la base de l'alimentation humaine et animale ce qui justifie l'ensemble des travaux concernant le rôle du sol

sur la dynamique des contaminants (ex : pesticides et éléments traces) et leurs impacts toxicologiques sur les plantes d'intérêt agronomique mais aussi sur d'autres organismes biologiques non-cibles (ex : microflore ou faune du sol). Quand ils ne concernent pas l'impact de ces substances sur les végétaux ou les organismes du sol les travaux réalisés dans le cadre des programmes PNETOX visent à déterminer le rôle des plantes comme bio-indicateurs de la pollution du sol (coordination **J. Escarré ; JC. Leclerc et O. Faure**) ou de l'air (projet « Etude modèle de l'exposition de végétaux à la pollution atmosphérique : utilisation d'une réponse enzymatique comme bioindicateur » coordonné par **S. Le Calvé**) soit directement du fait de la réponse d'un système enzymatique ou de la présence d'une espèce / consortium d'espèces végétales sur un sol contaminé. La concentration des polluants par les abeilles lors des activités de butinage (projet « Utilisation de l'abeille domestique (*Apis mellifera*) pour caractériser le niveau de contamination de l'environnement par les xénobiotiques industriels à caractère hydrophobe » coordonné par **J. Devillers**) a également été utilisée comme indicatrice de la contamination « globale » d'un environnement. Enfin, d'autres projets PNETOX ont permis d'aborder le rôle actif en remédiation que peuvent avoir les végétaux (phytoremédiation) qui, du fait de leurs propriétés d'accumulation dans les parties aériennes participent à l'épuration du sol (coordination **J. Escarré ; JC. Leclerc et O. Faure**) et les microorganismes du sol qui participent directement à la dégradation des composés organiques (coordination **R. Marmeisse**).

4. Connaissance des effets toxiques

4.1 - Adaptation génétique des plantes aux contaminations métalliques

Les écosystèmes pollués par les éléments traces métalliques (ETM) tels que zinc, plomb, cadmium, suite à la cessation de l'exploitation des mines dans la région de Saint Laurent le Minier (Gard) représentent des sites d'étude intéressants pour lesquels la contamination par les ETM présente des âges variables : le reconquête de ces milieux par les végétaux est donc différente en fonction de la date d'abandon du site (projet coordonné par **J. Escarré**). Cette étude répond ainsi parfaitement à certains des objectifs affichés par PNETOX qui étaient l'étude des effets toxiques à long terme des faibles doses et des mélanges.

Synthèse des travaux de la thématique « Ecosystèmes terrestres »

Les trois sites miniers étudiés datent d'époques d'exploitation très différentes: Petra Alba qui a été abandonné depuis environ 600 ans, Avinières depuis plus d'un siècle alors que la fin de l'exploitation des mines à Malines date de moins de 20 ans (1992). Ainsi, la presque totalité de points échantillonnés sur les trois sites présentent des valeurs de contamination supérieures aux valeurs fixées par l'Arrêté du 8 janvier 1998, fixant les prescriptions pour les épandages de boues en agriculture⁵ et dans tous les cas supérieures à celles obtenues dans des stations témoins non contaminées localisées à proximité des sites miniers.

Il est intéressant de noter qu'en dépit des différences de substrat sur chacun des trois sites un certain nombre d'espèces végétales (parmi lesquelles *Thlaspi caerulescens* - le tabouret bleuâtre, brassicacée, *Festuca arvensis* - la fétuque de Coste, graminée) se développent sur tous les sols contaminés. Cependant ces mêmes plantes sont également identifiées en dehors des zones contaminées. Les auteurs expliquent ces résultats par le développement d'une tolérance aux métaux qui ne peut relever que d'une adaptation génétique puisque des individus de la même espèce mais en provenance de sols non contaminés, sont incapables de croître sur des substrats contenant des concentrations élevées de métaux. Il y aurait donc ici adaptation génétique de certains individus d'une population à une forte contamination par différents métaux.

4.2 - Bioindicateurs et marqueurs moléculaires des contaminations métalliques des sols

Les effets génétiques liés aux métaux ne se limitent pas aux seuls végétaux puisque les auteurs (J. Escarré et collaborateurs) décrivent la colonisation racinaire de la légumineuse métallo-tolérante *Anthyllis vulneraria* par un symbiote bactérien particulier *Mesorhizobium metallidurans* classé comme définissant une nouvelle espèce génétique bactérienne. Cette bactérie présente des caractères génétiques distinctifs et par ailleurs peut se développer en présence de fortes quantités de zinc et de cadmium ce que ne peuvent réaliser les espèces phylogénétiquement les plus proches comme *Mesorhizobium tianshanense* et *M. mediterraneum*. Ces résultats suggèrent une forte adaptation de certaines populations bactériennes du sol à la contamination par des éléments traces et ce, même pour des sites présentant des durées différentes de contamination par des métaux (les écosystèmes en place étant donc exposés sur des périodes très différentes). Ces résultats répondent bien aux objectifs de PNETOX visant à révéler les effets des contaminants sur les individus, les populations et les

communautés y compris au niveau génétique. Ils confirment tout l'intérêt qu'aurait une étude étendue à d'autres représentants de la microflore tellurique sur ces sites pollués tant pour identifier les taxons bactériens s'y développant que pour en répertorier les mécanismes génétiques à la base de l'adaptation. Ces travaux permettraient également de vérifier si *Mesorhizobium metallidurans* peut être considérée comme un véritable bio-marqueur (et certains de ses gènes comme des marqueurs moléculaires) de la présence de ces polluants ou bien si ce rôle doit être attribué à une structure particulière de la communauté bactérienne façonnée spécifiquement par la présence des polluants. Les nouvelles approches en microbiologie du sol basées sur l'extraction directe de l'ADN bactérien hors de la matrice tellurique et son exploitation par des techniques haut-débit comme les puces à ADN permettraient alors de déboucher sur le développement d'outils de diagnostic sensibles, fiables et peu coûteux. Ces approches ont été abordées et utilisées avec succès par le projet coordonné par R. Marmeisse.

4.3 - Réaction des communautés du sol aux contaminations biologiques

Les thématiques prioritaires de PNETOX que sont l'étude des effets toxiques à long terme des faibles doses et le développement d'outils de diagnostic et de prédiction d'effets sur les individus, les populations et les communautés y compris au niveau génétique ont également été abordées dans le projet coordonné par Y. Moëne-Loccoz consacré à l'étude de l'impact de l'inoculation des céréales par des souches naturelles ou génétiquement modifiées (GM) de la bactérie PGPR *Azospirillum*. L'inoculum bactérien utilisé est limité en ce qui concerne le nombre de cellules, correspondant à la notion de faibles doses, les effets sur les populations cibles (champignons phytopathogènes par exemple) et non cibles (communauté bactérienne dans son ensemble) sont mesurables par des outils d'écologie moléculaire de plus en plus sensibles et spécifiques et sur des périodes de temps de plusieurs années (long terme). Ces outils permettent aussi de vérifier l'impact que peut avoir l'introduction d'un nouveau microorganisme sur le patrimoine génétique des populations indigènes en y détectant les éventuels gènes qui auraient pu être transférés à partir de l'inoculum, surtout quand celui-ci est formé de bactéries génétiquement modifiées. Les résultats ont confirmé la capacité de la souche sauvage d'*Azospirillum* à coloniser la plante et stimuler la prolifération racinaire mais sans que ces changements conduisent à des modifications significatives du rendement ou des quantités d'azote laissées dans le sol après la récolte.

Les résultats ont confirmé la capacité de la souche sauvage d'*Azospirillum* à coloniser la plante et stimuler la prolifération racinaire mais sans que ces changements conduisent à des modifications significatives du rendement ou des quantités d'azote laissées dans le sol après la récolte. Si quelques changements dans la structure de la communauté bactérienne ont pu être mis en évidence par l'application d'une technique de profilage de l'ADN, le traitement n'a en revanche apporté la première année aucune modification du niveau de contamination des grains de maïs par les *Fusarium* pathogènes, ni de la concentration en mycotoxine désoxynivalénol qui résulte de l'infection par le pathogène. La seconde année, la souche introduite initialement a colonisé le maïs non-inoculé et un effet résiduel sur la communauté bactérienne indigène ainsi qu'un effet positif sur la croissance du maïs ont été mis en évidence. Des protocoles similaires d'inoculation avec une souche génétiquement modifiée pour exprimer le gène *ipdC* (indole-3-pyruvate décarboxylase, enzyme clef de la synthèse de l'auxine acide indole acétique (AIA)) et d'étude d'impact ont confirmé que l'inoculation bactérienne, indépendamment du statut GM du microorganisme inoculé pouvait effectivement occasionner la perturbation de la structure de la communauté microbienne rhizosphérique, principalement fongique. D'autres études seraient cependant nécessaires pour vérifier la rémanence de cet effet sur les années suivantes, tant pour la colonisation des racines et de l'effet positif pour la plante que cela entraîne que pour l'effet potentiellement négatif sur la structure de la communauté bactérienne, son possible dysfonctionnement fonctionnel et une dispersion des gènes du transgène.

En plus du suivi des populations microbiennes et fongiques, principales impactées par l'introduction de bactéries génétiquement modifiées ou non, le projet s'est également intéressé au suivi des populations de mésofaune (Collemboles et Acariens) et de macrofaune totale (incluant les vers de terre mais également les invertébrés du sol tels que les araignées ou les limaces, les larves de diptères). Il apparaît que l'introduction de microorganismes n'a pas d'effet sur la diversité et le fonctionnement des communautés de faune du sol.

4.4 - Adaptation génétique microbienne aux contaminations chimiques

Le projet coordonné par R. Marmeisse visait à comprendre la réponse adaptative de l'ensemble des microorganismes du sol à la présence d'un toxique. Son originalité était de s'intéresser aux communautés d'organismes procaryotes et eucaryotes, cultivables ou non, en développant une

approche métagénomique basée sur le clonage et l'analyse des acides nucléiques (ADN et ARN) extraits directement de sols contaminés par des ETM (sol d'une ancienne fonderie de zinc) ou par du lindane (insecticide organochloré) pour identifier les gènes conférant la résistance ou les capacités de dégradation de différents contaminants ciblés.

C'est ainsi qu'a été développée et validée une stratégie expérimentale originale de métatranscriptomique basée sur l'extraction directe des ARN messagers polyadénylés eucaryotes des sols et leur conversion en ADNc qui sont clonés dans un vecteur d'expression de levure en vue d'un criblage génétique ou fonctionnel de la banque (complémentation de mutants de levure sensibles aux métaux étudiés). Les auteurs décrivent le potentiel de cette approche qui a permis d'isoler une thiorédoxine "environnementale" provenant d'un organisme fongique apparenté au groupe des levures hemiascomycètes. Plusieurs gènes conférant une résistance au cadmium ont été isolés et sont en cours de caractérisation. Le séquençage aléatoire d'inserts des banques a, lui aussi, permis d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans la résistance aux métaux : un transporteur transmembranaire d'origine végétale, une glutathion transférase, une péroxirédoxine, plusieurs thiorédoxines.

Une approche comparable à la métatranscriptomique mais métagénomique car basée sur l'extraction, le clonage et le criblage de l'ADN a permis aussi de mieux comprendre le potentiel adaptatif bactérien basé sur la création *de novo* de gènes bactériens impliqués dans la dégradation de composés xénobiotiques. C'est le cas du gène *linA* impliqué dans les deux premières étapes de la dégradation du pesticide lindane qui résulterait de la combinaison dans une même bactérie de fragments d'ADN acquis par transfert horizontal. L'approche métagénomique a permis d'identifier ces différents fragments d'ADN dans les génomes de bactéries dans tous types de sols démontrant que le potentiel génétique existe dans ces environnements mais que la combinaison fonctionnelle *linA* n'est sélectionnée que dans les sols des sites de production où la présence en forte concentration du lindane accroît la valeur adaptative du microorganisme qui a su modéliser moléculairement un tel gène.

Les travaux réalisés dans le cadre de ce projet (coordination R. Marmeisse) ont permis de montrer tout l'intérêt des approches métagénomiques et métatranscriptomiques pour identifier chez les procaryotes et eucaryotes du sol de nouveaux modes de résistance et/ou de détoxification des polluants. Les gènes identifiés et leurs produits sont susceptibles d'être directement utilisés en biotechnologie pour éliminer ou inactiver *in situ* les polluants. Ce sont également des candidats de choix pour servir de bio-indicateurs de l'état sanitaire de l'environnement. Les résultats obtenus montrent toute la pertinence des travaux

Synthèse des travaux de la thématique « Ecosystèmes terrestres »

faisant suite à ce projet basé sur le séquençage à grande échelle des banques métagénomiques qui permettra de dessiner un profil global de la réponse métabolique d'une communauté face à un toxique. Les retombées de ces approches de plus en plus exhaustives concernent tant le domaine fondamental en permettant une meilleure compréhension du fonctionnement des écosystèmes que celui des applications en mettant à disposition de nouvelles ressources génétiques utilisables dans des programmes de bioremédiation.

4.5 - Bioindicateurs et marqueurs moléculaires des contaminations atmosphériques

Ce projet encore en cours, coordonné par **S. Le Calvé**, s'est intéressé à caractériser les effets de divers contaminants atmosphériques sur des végétaux : la vesce et l'arabette des dames (respectivement, *Vicia sativa*, fabacée et *Arabidopsis thaliana*, brassicacée). Ainsi, l'influence de différents contaminants atmosphériques (formaldéhyde et benzaldéhyde) sur une activité enzymatique (ω -hydroxylase) de la vesce a été mise en évidence : une dose modérée de formaldéhyde de 0,2 ppm induit une réponse 51 fois supérieure au témoin. L'augmentation de cette activité enzymatique a également pour conséquence une modification de la composition des cuticules des épicotyles des plantules de vesce. D'autres types de polluants vont être testés, comme l'ozone O₃, largement impliquée dans les phénomènes de pollution atmosphérique. Un éventuel effet synergique entre les polluants pourrait aussi être envisagé. Ces premiers résultats acquis sont encourageants car ils permettent d'ores et déjà d'envisager à terme l'utilisation de ces végétaux pour surveiller l'air intérieur ou extérieur.

5. Caractérisation des expositions et des risques

5.1 - Echantillonneurs naturels des polluants chimiques

Le projet coordonné par **J. Devillers** illustre les différentes facettes que peut prendre la prise en compte des expositions aux contaminants. Les abeilles qui butinent jusqu'à 12 km de leur ruche, échantillonnent ainsi aléatoirement l'environnement pour collecter du nectar, du pollen, du miellat, de l'eau, etc. En étant ainsi au contact d'un vaste ensemble de polluants, ces insectes sont des

échantillonneurs puissants non biaisés et le projet avait pour objectif de définir si ces insectes pourraient être utilisés pour détecter les polluants organiques et inorganiques de l'environnement. Les travaux réalisés ont clairement montré que les abeilles pouvaient être utilisées pour caractériser le niveau de contamination de l'environnement par les xénobiotiques, une typologie des milieux pouvant être dessinée grâce à l'analyse du profil en éléments inorganiques transportés par ces insectes. L'utilisation des butineuses pour caractériser le niveau de pollution de l'environnement est une alternative d'autant plus intéressante que le protocole de collecte des abeilles est simple, rapide et qu'il ne nécessite pas un appareillage très spécifique et coûteux ni une compétence particulière. Il ne perturbe pas la colonie et de ce fait, un suivi dans le temps, avec des prélèvements réguliers, peut tout à fait être envisagé. Ce programme a contribué à mettre au point des méthodes d'analyses des hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAPs) et d'un certain nombre d'éléments inorganiques dans les abeilles, les miels et les cires et a permis de proposer une stratégie alternative et complémentaire d'autres méthodes pour caractériser le niveau de contamination de l'environnement.

5.2 - Biodisponibilité des métaux dans le sol

Deux projets ont abordé plus particulièrement les thématiques concernant le développement de méthodes d'évaluation de la biodisponibilité des polluants pour les plantes, mais aussi de leur transfert au sein de réseaux trophiques en lien avec les variations des conditions environnementales.

La notion de biodisponibilité est primordiale car elle conditionne l'évaluation de l'exposition des organismes. La biodisponibilité est généralement définie comme le degré auquel des substances chimiques présentes dans le sol peuvent être absorbées ou métabolisées par un récepteur humain ou écologique, ou être disponibles pour une interaction avec les systèmes biologiques (ISO 17402, 2008⁶). La principale difficulté réside dans le fait que la biodisponibilité est spécifique d'un organisme cible et d'un contaminant. Elle dépend en plus des aspects suivants : le temps d'exposition, le transfert de contaminants du sol vers l'organisme, leur accumulation dans l'organisme cible et les effets ultérieurs. Par ailleurs, certains organismes comme les végétaux peuvent également modifier les caractéristiques du sol (ex : modifications du pH) rendant ainsi les contaminants plus ou moins disponibles. La biodisponibilité est donc un procédé dynamique qui peut être décrit à l'aide des trois notions suivantes :

a) disponibilité du contaminant dans le sol (= disponibilité environnementale);

b) absorption du contaminant par l'organisme (= biodisponibilité environnementale);

c) dans les organismes, accumulation et/ou effet du contaminant (= biodisponibilité toxicologique).

Différentes méthodes peuvent être employées pour évaluer la biodisponibilité : (i) les méthodes chimiques (ex : méthodes d'extraction) qui déterminent la fraction disponible d'une classe de contaminants et/ou (ii) les méthodes biologiques qui exposent les organismes aux échantillons de sol afin de mesurer les effets et/ou les transferts.

Ainsi le projet coordonné par **P. Hinsinger** a pris en compte la biodisponibilité de Cu (et de ses différentes formes) pour des plantes cultivées (principalement le blé dur) dans différentes parcelles de sols contrastés mais tous à antécédents viticoles. Les sols viticoles sont contaminés par le cuivre (Cu) suite aux apports répétés de fongicides cupriques (contamination diffuse). Au contraire, les sites étudiés dans le second projet coordonné par **JC. Leclerc** et **O. Faure** ont été soumis à de fortes contaminations par des éléments métalliques car situés sur des anciennes décharges d'entreprises métallurgiques aujourd'hui à l'état de friches post-industrielles. La biodisponibilité des métaux sera donc étudiée pour des plantes se développant naturellement sur ces sols. Dans l'un et l'autre projet, des approches de terrain et de laboratoire ont été adoptées pour répondre aux problématiques de biodisponibilité des métaux pour les végétaux. L'acquisition d'informations sur la biodisponibilité des éléments traces métalliques est essentielle car les risques de transferts et d'effets dépendent moins des concentrations totales des polluants présents dans les sols que de leur biodisponibilité. Ainsi les 2 projets se sont intéressés à caractériser les teneurs « totales » en éléments métalliques, les fractions phyto-disponibles (disponibilité environnementale) pour les différents métaux des friches industrielles et la spéciation et la mobilité de Cu dans les sols viticoles contrastant par leur pH.

5.2.1 - Spéciation et évaluation de la disponibilité environnementale des ETM dans les sols

L'application de méthodes standardisées d'extraction a permis de confirmer la très forte contamination en éléments traces des sols des friches post-industrielles et avec des valeurs des fractions extractibles par le mélange acétate d'ammonium et/ou EDTA suggérant que ces métaux sont potentiellement fortement phytodisponibles ce qui fait de ces sites d'excellents modèles pour étudier le comportement des plantes en réponse aux contraintes imposées par de fortes concentrations en métaux.

Pour les sols agricoles, différentes méthodes analytiques et numériques ont été utilisées pour étudier la spéciation et la

mobilité de Cu en fonction du pH. Les auteurs soulignent les très importantes différences observées selon les méthodes utilisées mais des valeurs élevées en Cu total ont été observées pour tous les types de sols. Par l'application de méthodes de sorption-désorption de Cu, il a été possible de mesurer les concentrations de Cu²⁺ qui se sont avérées élevées, et de montrer que les formes dominantes de Cu en solution étaient des formes complexées par les matières organiques dissoutes, ce qui permet d'expliquer la concentration de Cu élevée en sols calcaires. Ces différentes méthodes analytiques fournissent des informations intéressantes concernant les interactions entre les métaux et les particules de sol mais permettent difficilement d'évaluer la fraction de métaux interagissant avec les organismes vivants.

5.2.2 - Détermination de la phytodisponibilité des métaux par mesure des concentrations métalliques foliaires (biodisponibilité environnementale et toxicologique)

La stratégie choisie par les opérateurs du projet coordonné par **JC Leclerc** et **O. Faure** pour aborder ce problème de mobilité des métaux a été de cibler un ensemble d'espèces végétales présentes sur un site contaminé plutôt qu'une seule espèce bio-indicatrice afin d'en déterminer les concentrations métalliques foliaires. D'une espèce à l'autre sur un même site les valeurs de concentrations foliaires métalliques sont très similaires avec cependant quelques espèces montrant des valeurs nettement supérieures pour un ou plusieurs métaux. Ces espèces capables de concentrer certains métaux, indépendamment de la biodisponibilité du métal peuvent alors être qualifiées d'accumulatrices. Les concentrations foliaires des autres espèces non accumulatrices peuvent par contre être considérées comme indicatrices de la phytodisponibilité des métaux.

Ces résultats sont confirmés par ceux obtenus sur le blé dur poussant sur les sols viticoles (coordination **P. Hinsinger**), les valeurs mesurées pouvant être admises comme indicatrices de la biodisponibilité du cuivre. Les résultats sont d'autant plus intéressants que les valeurs observées tant au champ qu'au laboratoire dépendent totalement du niveau de contamination du sol (corrélation positive avec la teneur en Cu total), qu'il n'y avait pas de différences majeures entre sols acides et alcalins et aucun effet du pH du sol n'a pu être mis en évidence. La combinaison de ces données a permis de confirmer que la chlorose observée sur les champs était bien en lien avec la phytotoxicité du Cu, du fait notamment d'un antagonisme Cu-Fe. La présence conjointe sur des sols pollués de plantes accumulatrices et d'autres indicatrices de la biodisponibilité métallique renvoie

Synthèse des travaux de la thématique « Ecosystèmes terrestres »

également aux résultats montrés dans le projet coordonné par J. Escarré sur les sites miniers du Gard, l'accumulation étant telle pour certaines plantes qu'elles peuvent constituer un danger pour les animaux sauvages ou d'élevage qui les consommeraient. Signalons enfin que ces techniques d'évaluation de la biodisponibilité appliquées au Cu sur blé dur semblent remettre en cause la validité d'autres techniques d'estimation comme la DGT (Diffusive Gradient in Thin films) dont les résultats montrent un effet pH du sol très important alors que ce n'est pas le cas pour la biodisponibilité évaluée par la mesure de l'accumulation dans les plantes. Les auteurs signalent cependant que dans le cas du blé dur l'indépendance de la biodisponibilité vis-à-vis du pH pouvait s'expliquer par la capacité de cette plante à modifier le pH de sa rhizosphère.

5.2.3 - Caractérisation de biomarqueurs physiologiques et moléculaires d'exposition aux métaux (biodisponibilité toxicologique)

Une étape importante dans la caractérisation de biomarqueurs d'exposition consiste à étudier les modifications physiologiques et moléculaires chez les végétaux induites par les métaux lourds.

Si les chloroses observées chez le blé dur du fait d'un antagonisme Cu-Fe (travaux coordonnés par **P. Hinsinger**) ont été déjà évoquées, une étude beaucoup plus systématique a été menée sous la coordination de **JC Leclerc** et **O. Faure** et ses collaborateurs pour trouver des biomarqueurs pertinents d'exposition. Ont ainsi été étudiés l'impact des métaux lourds sur le fonctionnement du système photosynthétique, sur les teneurs en acides aminés libres et en acides ascorbiques, sur l'induction d'effets génotoxiques et enfin sur le protéome. Les résultats ont montré que le fonctionnement du système photosynthétique était fortement inhibé par la présence d'éléments métalliques dans le sol comme l'ont mis en évidence les mesures des échanges gazeux et des principaux paramètres de la fluorescence chlorophyllienne. L'hypothèse retenue pour étudier les teneurs en acides aminés libres vient de résultats montrant que la production de certains acides aminés libres, notamment l'histidine et la proline, constituait chez les végétaux une réaction de défense contre les stress métalliques. L'histidine permet la chélation du Ni et son transfert de la solution du sol vers les parties aériennes et intervient en complexant certains éléments métalliques participant ainsi à la détoxification intracellulaire. La proline agit en tant qu'antioxydant, participe à la régulation osmotique, à la stabilisation de macromolécules et des composés des parois cellulaires.

D'une façon générale l'élévation du niveau de proline est souvent corrélée au degré de tolérance de la plante vis-à-vis de différents stress abiotiques et notamment à l'exposition à des éléments métalliques. Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet ont montré une augmentation significative des teneurs foliaires en acides aminés libres pour les différentes espèces étudiées se développant sur les sols contaminés sans qu'il soit pourtant possible de montrer une relation directe entre teneurs en acides aminés totaux et niveau de tolérance des plantes vis-à-vis des éléments métalliques. De la même façon, évaluer les teneurs en acide ascorbique des plantes pour déterminer si ces valeurs pourraient constituer un marqueur d'exposition aux métaux, est lié à son rôle antioxydatif qui assure aux plantes une protection contre différents stress abiotiques et biotiques, éliminant l'oxygène singulet, les peroxydes, les radicaux hydroxyles. L'augmentation de la concentration en acide ascorbique peut ainsi être dépendante de la formation de H₂O₂ dans les feuilles. Les résultats obtenus sur 4 espèces de plantes confirment les hypothèses avec des concentrations foliaires en acide ascorbique supérieures quand les plantes sont cultivées sur des sols contaminés par rapport à des sols témoins mais ces travaux devraient être complétés avec les espèces indigènes des sites pollués. Les éléments métalliques peuvent également provoquer des dommages plus ou moins graves dans la structure et le fonctionnement du génome ce qui a conduit les auteurs à étudier chez deux espèces végétales les aberrations nucléaires induites par la présence d'éléments métalliques. La formation de micronoyaux a pu être mise en évidence chez les deux espèces végétales cultivées en présence de Cd et de Cu mais avec des différences significatives entre les deux espèces, *Vicia faba* (la fève) étant beaucoup plus sensible que *Pisum sativum* (le pois). Mais chez les deux espèces la fréquence d'apparition des micronoyaux augmente avec la concentration en métal, le Cd induisant deux fois plus de micronoyaux que le Cu. D'autres anomalies chromosomiques de type clastogène et aneugène ont été observées chez les deux espèces comme la présence de fragments chromosomiques non rattachés à l'appareil mitotique, de ponts chromosomiques dus à une mauvaise séparation des chromatides sœurs à l'anaphase ou de chromosomes collants pendant la métaphase. Enfin, cette étude a été complétée sur une espèce bien représentée sur un des sites, *Agrostis tenuis* (l'agrostide commune, graminée), par l'analyse de son protéome, la toxicité métallique devant nécessairement induire une modification de la synthèse ou de l'activité de nombreuses protéines, en particulier celles impliquées dans la chélation intracellulaire des métaux, dans la

réponse antioxydative et dans les mécanismes de réparation cellulaire. La toxicité de l'As étudiée dans cette étude se manifeste par la sous expression de plusieurs polypeptides et la surexpression de protéines particulières dont une première analyse a révélé qu'il s'agissait de l'Oxygen-Evolving Enhancer protein, de la RuBisCO petite et grande sous unités, de la RuBisCO activase et de l'ATP synthase.

5.2.4 - Modélisation de la biodisponibilité environnementale des métaux (cas du Cu)

De tels processus rhizosphériques, ainsi que d'autres non étudiés dans le projet coordonné par **P. Hinsinger**, comme l'exsudation de ligands organiques tels que les phytosidérophores, connus pour leur forte capacité de complexation de Cu, expliquent sans doute en partie les écarts importants qui ont pu être constatés entre les prélèvements de Cu observés et ceux calculés selon un modèle numérique de type Claassen-Barber. Le modèle a généralement surestimé les prélèvements observés. Une partie des écarts observés tient aussi à la sensibilité du modèle au pouvoir tampon du sol, dont la mesure s'est avérée entachée de très fortes incertitudes du fait de la méthode de détermination utilisée. Les simulations ont été conduites avec diverses estimations de la concentration en Cu en solution, qui est un autre paramètre-clé et dont les auteurs avaient déjà noté la forte dépendance vis-à-vis de la méthode de mesure. Aucune des méthodes mises en œuvre n'a cependant permis de rendre compte de façon satisfaisante des prélèvements mesurés avec les plantes. Un autre travers majeur du modèle utilisé est la non prise en compte de la spéciation du métal, puisqu'il raisonne sur un élément (ou une espèce chimique seule). Or, les résultats obtenus suggèrent une forte contribution, au moins indirecte, du pool que constituent les complexes organiques de Cu en solution, capables de tamponner l'appauvrissement en Cu²⁺ qui se produit dans la rhizosphère du fait de l'absorption de Cu par la plante. Ce constat renforce l'intérêt de développer un modèle de biodisponibilité de Cu qui rendrait compte de ces effets de la spéciation et de la participation au moins indirecte des complexes entre matières organiques dissoutes et Cu en solution dans les sols.

5.3 - Modélisation de la biodisponibilité et des effets du parathion sur les nématodes du sol

Les travaux de recherche coordonnés par **L. Brückler** avaient pour but d'analyser conjointement la dissipation

et l'impact toxicologique du parathion (insecticide de la famille des organophosphorés) et de l'un de ses métabolites principaux (le paraoxon) sur les nématodes du sol. L'objectif était à terme de modéliser les phénomènes pour prévoir les effets toxiques sur les populations de nématodes du sol.

Dans un premier temps, l'étude de la biodégradation du parathion et de sa sorption (incluant la sorption de paraoxon) dans les différentes phases du sol (liquide, solide à sorption rapide, résidus liés) a été réalisée afin de proposer un modèle cinétique décrivant le devenir du pesticide dans les sols. Ce modèle a été ensuite validé au laboratoire à l'aide d'expérimentations en batch (suivi de l'adsorption, de la désorption des molécules de parathion et paraoxon marquées au ¹⁴C et des cinétiques de minéralisation et de métabolisation sur une durée de 56 jours). Dans une seconde phase, ce modèle cinétique a été utilisé pour prévoir l'impact toxicologique du parathion et du paraoxon sur des nématodes du sol en utilisant la variable [concentration dans la phase liquide du sol x temps de contact avec les nématodes] comme prédicteur du pourcentage de nématodes paralysés dans le sol. Les simulations réalisées ont montré que les effets de sorption des molécules étaient dominants et conditionnaient alors les impacts toxicologiques, différents selon les propriétés des sols. Des simulations appliquées à une série de « sols virtuels » aux propriétés de sorption et biodégradation contrastées indiquent des effets variables selon les sols pour des temps courts (moins de 5 jours) mais des risques toxicologiques critiques pour des durées d'application plus longues (10 à 15 jours). Dans une troisième phase, et pour prendre en compte les phénomènes de transport des pesticides dans le sol, le modèle cinétique décrivant l'allocation du parathion et du paraoxon dans différents compartiments du sol a été couplé avec un modèle de transferts couplés d'eau, de chaleur, et un modèle de convection/dispersion (modèle PASTIS). Le modèle intégré résultant a été calibré à l'aide d'expérimentations sur colonnes de sols (19 jours). Les résultats expérimentaux ont montré, conformément aux résultats précédents, que le parathion était fortement adsorbé et dégradé sous forme de plusieurs métabolites. La molécule mère et les produits résultant de sa dégradation restaient localisés dans les premiers cm du profil de sol. Les résultats théoriques ont confirmé ces conclusions, indiquant par exemple que les pesticides restaient localisés dans les couches très superficielles du sol même dans le cas d'une simulation à long terme (11 mois), à cause essentiellement des effets de sorption. En conséquence, l'ensemble des résultats théoriques et expérimentaux indique que des impacts toxicologiques sont probablement localisés dans les horizons de surface (quelques cm de profondeur).

Conclusions générales

Les projets soutenus par les deux appels à propositions de recherche PNETOX réussis ont permis d'apporter un certain nombre de réponses concernant les questions que pose la dissémination des substances toxiques et agents biologiques dans les environnements terrestres. Ces projets ont pris en compte le devenir des substances dans le sol lui-même et dans les organismes les plus exposés à ces substances que sont les végétaux, les microorganismes et la faune du sol. Ils se sont intéressés à des pollutions diffuses comme celles que l'on peut rencontrer sur des terrains agricoles qui ont pu être comparées à celles résultant de contaminations locales, aiguës du fait d'activités industrielles ou minières. Les écosystèmes miniers étudiés ont permis d'aborder le facteur temporel de la contamination avec des sites pollués depuis des centaines d'années alors que d'autres révélaient au contraire l'impact de pollutions beaucoup plus récentes. Toute une gamme de contaminants chimiques a été prise en compte entre les différents projets, des éléments métalliques en situation de mono ou de poly-contaminations aux molécules organiques chlorées ou phosphorées (pesticides) auxquels il convient d'ajouter les « contaminants » biologiques que peuvent représenter les microorganismes bénéfiques pour la croissance des plantes mais dont l'impact sur les autres composantes biotiques des écosystèmes n'avait pas encore été évalué.

Ces projets se caractérisent aussi par la pertinence des outils techniques et numériques utilisés qui ont permis

des percées incontestables de la connaissance quant au devenir de ces substances dans l'environnement, de leur impact sur les organismes cibles, des mécanismes adaptatifs déployés par les organismes directement exposés que sont les plantes et les microorganismes. Les données expérimentales générées vont permettre d'affiner les différents modèles prédictifs du devenir des composés toxiques. Ces connaissances fondamentales seront directement applicables pour définir le niveau des pollutions, non plus comme la simple valeur d'une concentration chimique dans un milieu donné mais en considérant la biodisponibilité du produit pour les organismes exposés.

Les outils et modèles utilisés permettent désormais de disposer d'approches et de méthodes pour évaluer les risques pour les écosystèmes terrestres. En effet, le milieu terrestre souffrait d'un retard méthodologique par rapport aux milieux aquatiques qui a été en partie comblé par le programme PNETOX. Ainsi, différents projets ont permis de développer des méthodes d'évaluation des impacts sur biodiversité des sols, de la microflore totale (ex : extraction directe de l'ADN du sol, analyse de la structure des communautés et de leurs fonctionnalités) à la faune du sol (diversité et activité). Par ailleurs des approches chimiques et des modèles de caractérisation de la biodisponibilité et des effets ont été également développés. Une batterie d'outils et de méthodes est donc désormais disponible et transposable pour appréhender les pollutions des milieux terrestres à différents niveaux, des bio-indicateurs pour détecter et quantifier les polluants présents, des indicateurs de la biodisponibilité pour déterminer la part susceptible d'interagir avec les organismes, des biomarqueurs pour prendre en compte les modifications physiologiques et moléculaires induites par ces contaminants.

L'ensemble de ces outils et méthodes pourrait être assez vite utilisables dans le cadre de processus réglementaires puisque plusieurs textes demandent déjà à évaluer la mobilité/disponibilité des éléments trace dans les sols (ex: Article 11 de l'arrêté du 8 Janvier 1998) et que la Commission Européenne dans sa communication sur la stratégie thématique de protection des sols demande à évaluer la perte de biodiversité des sols.

Le programme PNETOX a également contribué à renforcer l'expertise nationale sur l'écotoxicologie terrestre, la bioindication et l'évaluation de la biodisponibilité. Certains participants ont notamment contribué aux travaux de la norme internationale 17402 (Lignes directrices pour la sélection et l'application des méthodes d'évaluation de la biodisponibilité des contaminants dans le sol et les matériaux du sol) et au programme national ADEME sur les bioindicateurs de qualité des sols. Leurs compétences seront encore sollicitées sur de nouveaux textes normatifs (ex : proposition de nouveaux sujets de travail sur la modélisation de la biodisponibilité, sur les effets de la matière organique soluble des sols, sur l'utilisation d'extractants chimiques pour évaluer la fraction biodisponibilité des éléments traces et des substances organiques apolaires) ou dans le cadre des travaux pilotés par l'ADEME sur la bioindication de la qualité des sols agricoles ou industriels.

Les retombées du programme ne se limitent pas à la seule observation aussi poussée soit-elle de la présence et de l'impact des contaminants puisqu'au moins deux pistes sont ouvertes pour remédier activement aux problèmes de contamination chimique. Déjà des programmes de bioremédiation des sites pollués par les éléments traces se développent, basés sur l'utilisation des plantes accumulatrices qui peuvent épurer même des sols très contaminés. En microbiologie, les approches métagénomiques révèlent toutes les potentialités génétiques encore inconnues des microorganismes du sol et qui pourraient être employées dans le cadre de programmes de biotechnologie visant à remédier aux déficiences des microorganismes indigènes pour dégrader naturellement des composés xénobiotiques ou d'autres polluants organiques. Cependant chaque projet souligne également la nécessité de poursuivre les efforts de recherche. L'écotoxicologie est à l'interface de beaucoup de disciplines, de la chimie, de la pédologie et des différentes composantes de la biologie. Elle bénéficie ainsi des avancées dans ces différents domaines et les résultats et perspectives affichés dans les différents projets qui ont reçu le soutien de PNETOX montrent bien tout le potentiel en devenir. La balle est cependant dans le camp des institutionnels pour que ces perspectives puissent se concrétiser.

Références

- 1 • Rapport de synthèse de l'Évaluation des Écosystèmes pour le Millénaire, Mars 2005 (disponible sur le www.maweb.org).
- 2 • Thematic Strategy for Soil Protection, Communication from the commission to the council, the european parliament, the european economic and social committee and the committee of the regions, Septembre 2006 (disponible à l'adresse : http://ec.europa.eu/environment/soil/pdf/com_2006_0231_en.pdf)
- 3 • Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council establishing a framework for the protection of soil and amending Directive 2004/35/EC, Septembre 2006 (disponible à l'adresse : http://ec.europa.eu/environment/soil/pdf/com_2006_0232_en.pdf)
- 4 • SOGREAH, 2007. Bilan des flux de contaminants entrant sur les sols agricoles de France métropolitaine - Bilan qualitatif de la contamination par les éléments traces métalliques et les composés traces organiques & Application quantitative pour les éléments traces métalliques. Rapport final au contrat n°03 75 C 0004. 283 pages. (document disponible sur demande à l'ADEME)
- 5 • Arrêté du 8 janvier 1998 fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles pris en application du décret n° 97-1133 du 8 décembre 1997 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées.
- 6 • ISO 17402. 2008. Qualité du sol - Lignes directrices pour la sélection et l'application des méthodes d'évaluation de la biodisponibilité des contaminants dans le sol et les matériaux du sol.



APR 2001

Analyse couplée de la dissipation des pesticides dans le sol et de leur impact écotoxicologique sur les Nématodes

Partenaires

• UMR Ecologie des Invertébrés, INRA/UAPV, Avignon: L. Belzunces • Unité de recherche Santé végétale et environnement, UMR 1112 R.O.S.E, Antibes : M. Amichot • Unité Environnement et Grandes Cultures, UMR INRA - INA PG 1091, Grignon : E. Barriuso

Coordinateur

• Laurent Brückler
INRA - Département Environnement et Agronomie
Domaine St Paul, Site Agroparc
84 914 Avignon Cedex 9
Laurent.Bruckler@avignon.inra.fr

Mots clés

Pesticides, Parathion, Toxicologie, Nématodes, Sol, Modélisation

Objectifs

La prévision de la dynamique des pesticides dans les sols et de leur impact toxicologique sur des organismes biologiques (non cibles) est un enjeu environnemental important. Le but de ce projet était d'analyser la dissipation et l'impact toxicologique d'un pesticide (le parathion, insecticide de la famille des organophosphorés, ayant des effets toxicologiques sur de nombreux groupes d'espèces animales), et de l'un de ses métabolites principaux (le paraoxon).

Résultats

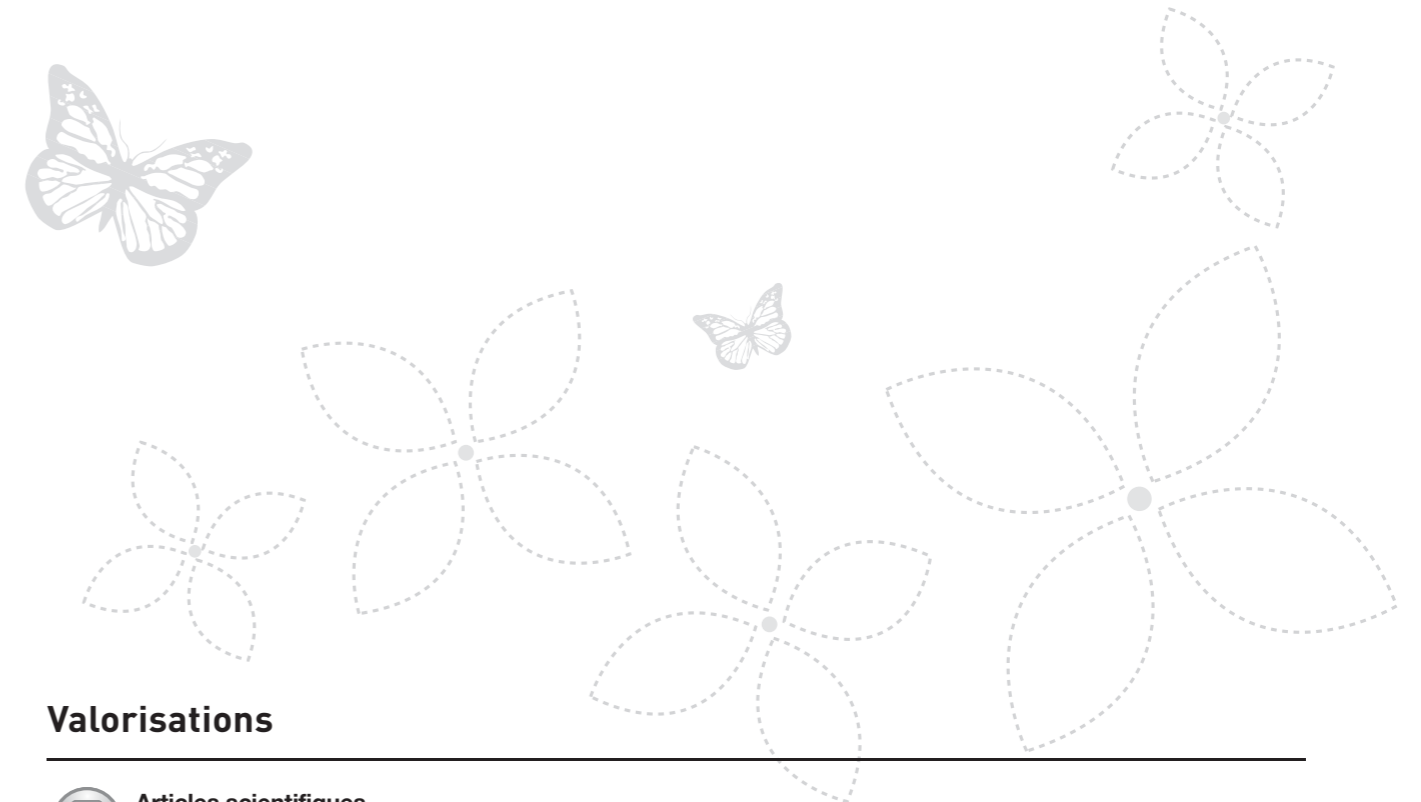
Le travail de recherche a combiné 3 phases principales : (i) Dans une première phase, un modèle cinétique décrivant la sorption et, *in fine*, la distribution du parathion et du paraoxon dans différents compartiments du sol (phase liquide, phase solide à sorption rapide, résidus liés) a été proposé. Ceci a été possible en prenant en compte simultanément les phénomènes de biodégradation et sorption du parathion, et de production, sorption, et biodégradation du paraoxon issu du parathion. La validation expérimentale du modèle a été obtenue en laboratoire à l'aide d'expérimentations en batch (suivi de l'adsorption et de la désorption des molécules de parathion et paraoxon marquées au ¹⁴C) et du suivi des cinétiques de minéralisation et de métabolisation sur une durée de 56 jours. Les résultats expérimentaux montrent, pour les 2 molécules (parathion et paraoxon), des cinétiques d'adsorption rapides (quelques heures) et la formation plus lente de résidus liés. Par ailleurs, la production de plusieurs métabolites (dont le paraoxon et le p-nitrophenol) a été observée. Après estimation des paramètres du modèle, nous avons pu reconstituer, par simulation, la cinétique de production et de dissipation du paraoxon dans le sol étudié. Les simulations indiquent que l'ordre de grandeur

de la concentration du paraoxon est environ 100 fois plus faible que la concentration initiale du parathion apporté, ce qui est conforme aux observations expérimentales. (ii) Dans une seconde phase, nous avons utilisé le modèle cinétique proposé pour prévoir l'impact toxicologique du parathion et du paraoxon sur des nématodes du sol. Pour cela, nous avons préalablement montré que la variable [concentration dans la phase liquide du sol x temps de contact avec les nématodes] était un prédicteur robuste du pourcentage de nématodes paralysés dans le sol et constituait ainsi une variable quantitative et effective d'action toxicologique. Les simulations réalisées ont montré que les effets de sorption des molécules étaient dominants et conditionnaient ainsi des impacts toxicologiques différentiels selon les propriétés des sols. Plus généralement, des simulations appliquées à une série de « sols virtuels » aux propriétés de sorption et biodégradation contrastées indiquent des effets variables selon les sols pour des temps courts (moins de 5 jours) mais des risques toxicologiques critiques pour des durées d'application plus longues (10 à 15 jours). (iii) Dans une troisième phase, et pour prendre en compte les phénomènes de transport des pesticides dans le sol, le modèle cinétique décrivant l'allocation du parathion et du paraoxon dans différents compartiments du sol a été couplé avec un modèle de transferts couplé d'eau, de chaleur, et un modèle de convection/dispersion (PASTIS). Le modèle intégré résultant a été calibré à l'aide d'expérimentations sur colonnes de sols (19 jours). Les résultats expérimentaux ont montré, conformément aux résultats précédents, que le parathion était fortement adsorbé et dégradé sous forme de plusieurs métabolites. La molécule mère et les produits résultant de sa dégradation restaient localisés dans les premiers cm du profil de sol. Les résultats théoriques ont confirmé ces conclusions, indiquant par exemple que les pesticides restaient localisés dans les couches très superficielles du sol même dans le cas d'une simulation à long terme (11 mois), à cause essentiellement des effets de sorption. En conséquence, l'ensemble des résultats théoriques et expérimentaux indique que des impacts toxicologiques sont probablement localisés dans les horizons de surface (quelques cm de profondeur).

Perspectives scientifiques identifiées

Dans le domaine environnemental, et en termes de devenir, l'apport principal de ce travail est la caractérisation ainsi que la modélisation des processus de dissipation du parathion et de son métabolite principal le paraoxon dans le sol. Ces caractérisations nous ont permis d'évaluer la cinétique de la concentration du parathion et de ses métabolites dans la solution du sol, qu'on assimile à la fraction du pesticide biodisponible à la fois pour les organismes vivants (responsables de sa biodégradation), et pour les cibles potentielles capables de révéler son action toxique (les nématodes dans notre cas). Le modèle couplé de transport et de dissipation du parathion dans le sol nous a permis de prendre en compte les phénomènes de transport diffusif et convectif du pesticide. Ce modèle est capable de simuler les profils de concentration du parathion et de son métabolite (en phase aqueuse ou adsorbée) dans le sol, mais une version stochastique de ce modèle quantifiant la propagation d'erreurs sur le diagnostic relatif à l'impact toxicologique serait un progrès significatif. La modélisation proposée pourrait être validée sur d'autres situations expérimenta-

les, elle pourrait également prendre en compte plusieurs métabolites. Mais dans ce dernier cas, il s'agirait d'un autre modèle qui devrait être appuyé par une description expérimentale fine de toutes les voies métaboliques d'évolution de la molécule mère, et de leur paramétrisation. D'un autre côté, des expériences d'adsorption, désorption et biodégradation de parathion à long terme (1 année ou plus), nous apporteraient des renseignements cruciaux sur le devenir des résidus liés dans le sol, notamment leur remobilisation, et donc leur éventuelle accessibilité à la fois pour la biomasse dégradante du sol et pour les espèces sensibles à leur présence dans le sol. Dans le domaine écotoxicologique, les résultats ont montré que les concentrations de parathion et des métabolites trouvés dans les solutions extraites du sol n'ont qu'un rapport lointain avec des concentrations éventuellement utilisées dans certains tests de toxicité, et qu'en conséquence, les effets qui en découlent sont différents. Enfin, la modélisation du couplage entre devenir et impact du parathion sur les nématodes a été possible, grâce à la variable [concentration x temps]. La généralisation aux autres espèces de nématodes supposerait de connaître les réponses respectives et la variabilité de la sensibilité ou de la résistance de ces espèces.



Valorisations



Articles scientifiques

- Saffih-Hdadi K., Bruckler L., Barriuso E. (2003) Modeling of sorption and biodegradation of parathion and its metabolite paraoxon in soil. *Journal of Environmental Quality*, 32 : 2207-2215.
- Saffih-Hdadi K., Bruckler L., Amichot M., Belzunces L. (2005) Modeling impact of parathion and its metabolite paraoxon on the nematode *Caenorhabditis elegans* in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 6, 1387-1394.
- Saffih-Hdadi K., Bruckler L., Lafolie F., Barriuso E. (2006) A model for linking the effects of parathion in soil to its degradation and bioavailability kinetics. *Journal of Environmental Quality*, 35 : 253-267.

Thèse

- Saffih-Hdadi K. (2003) Analyse couplée du devenir du parathion et du paraoxon dans le sol et de leur impact écotoxicologique sur les Nématodes. Thèse de doctorat, Université d'Avignon et des pays du Vaucluse, Avignon.

APR 2001

Utilisation de l'abeille domestique (*Apis mellifera*) pour caractériser le niveau de contamination de l'environnement par les xénobiotiques industriels à caractère hydrophobe

Partenaire

• Université Bordeaux 1, UMR 5255 :
Hélène Budzinski

Coordinateur

• James Devillers
CTIS - 3 Chemin de la Gravière - 69140 Rillieux La Pape
j.devillers@ctis.fr

Mots clés

PCB, Éléments inorganiques, Miels, Abeilles, Cires, Niveau de contamination de l'environnement

Objectifs

Au cours de son activité de collecte, l'abeille butineuse prospecte des surfaces importantes de son environnement. Selon son âge, elle récolte du nectar, des miellats produits par les pucerons, du pollen ou des matières cireuses sur les bourgeons des plantes pour élaborer la propolis. Certaines collectent également de l'eau en quantité importante. Cette eau est puisée à la surface des mares et des cours d'eau, dans les flaques, aux aisselles des feuilles, voire dans les lisiers et autres milieux putrides. Lors de ses différents voyages, la butineuse entre obligatoirement en contact avec tous les xénobiotiques qui contaminent les différents milieux qu'elle visite. Ces polluants sont retenus à la surface de son corps (i.e., cuticule, soies, pattes) et/ou absorbés pouvant, selon leur nature, provoquer la mort de l'animal au cours du vol de retour, ou aussitôt après son arrivée à la ruche, ou s'accumuler dans son organisme. Ces polluants, de nature variée, sont souvent rapportés à la ruche et peuvent contaminer les autres membres de la colonie par contacts directs, trophallaxie, etc. De la même façon, selon leurs propriétés physico-chimiques (e.g., lipophilie), les xénobiotiques sont également susceptibles de s'accumuler dans les autres individus peuplant la ruche mais aussi dans la cire et le miel. Il est admis que l'analyse des substances naturelles récoltées par les butineuses donne une idée précise de la composition floristique des milieux explorés et de leur degré d'ouverture. De la même façon, on suspecte que les abeilles butinant dans des zones polluées collectent de nombreuses substances lipophiles qui auront tendance à persister sur et dans leur organisme, ceux des autres membres de la colonie et/ou dans certains produits de la ruche. Cependant, peu d'études ont été réalisées sur ce sujet : il s'agit essentiellement d'études sur certains pesticides dans des conditions expérimentales particulières. Dans ces conditions, l'objectif de notre étude était de rechercher la présence de

xénobiotiques hydrophobes chez des abeilles butinant près de sources de pollutions avérées ou non afin de rendre compte du degré de contamination de ces insectes et de voir si ces organismes et leurs produits pouvaient être utilisés pour caractériser le niveau de contamination de l'environnement.

Résultats

Des échantillons d'abeilles, de miels et/ou de cires provenant de 63 ruches ne transhumant pas situées dans des sites apparemment non pollués et à proximité de sites pollués variés (e.g., autoroutes, zones industrielles, ville de Paris) ont été analysés pour déterminer leurs concentrations en éléments inorganiques (n = 28), HAP (n = 28) et PCB (n = 7). Différentes analyses multivariées ont été pratiquées afin d'effectuer des typologies des échantillons.

Notre étude montre clairement que les abeilles peuvent être utilisées pour caractériser le niveau de contamination de l'environnement par les xénobiotiques. Ainsi, une typologie des milieux peut être obtenue en analysant le profil en éléments inorganiques des abeilles. Pour les HAP, la discrimination existe mais elle est moins nette, ceci pouvant peut-être en partie s'expliquer, dans le cas présent, par le fait que les prélèvements ont été effectués en pleine activité apicole et que les enfumoirs utilisés par les apiculteurs pouvaient être fortement contaminés par des HAP. Une étude plus approfondie serait nécessaire pour quantifier exactement le biais susceptible d'être introduit par les enfumoirs sur les concentrations trouvées en HAP sur les abeilles. Le problème, dans la pratique, est complexe car les apiculteurs utilisent des combustibles variés dans leurs enfumoirs. Néanmoins, du fait des concentrations mesurées dans les goudrons d'enfumoirs, ceux-ci mériteraient d'être nettoyés régulièrement et non en fin de saison comme c'est généralement le cas. Cela contribuerait aux bonnes pratiques apicoles.

Il n'y a pas de différence significative entre les concentrations en PCB trouvées dans les abeilles butinant des milieux pollués et celles évoluant dans des environnements supposés exempts de pollution. Ceci n'est pas surprenant du fait du caractère ubiquiste de la contamination

environnementale par les PCB.

L'utilisation des butineuses pour caractériser le niveau de pollution de l'environnement est d'autant plus intéressante que le protocole de collecte des abeilles est simple, rapide et qu'il ne nécessite pas un appareillage très spécifique et coûteux ni une compétence particulière. Il ne perturbe pas la colonie et de ce fait, un suivi dans le temps, avec des prélèvements réguliers, peut tout à fait être envisagé. Les concentrations en éléments inorganiques et en HAP trouvées dans les miels sont le plus souvent très inférieures à celles mesurées dans les butineuses. Les résultats obtenus sur les cires montrent qu'elles sont significativement plus contaminées que les miels. Même si ces résultats sont intéressants, ils sont à considérer avec prudence. En effet, selon la stratégie de prélèvement adoptée, lors de la visite d'un rucher, une ruche était choisie au hasard et dans celle-ci, des prélèvements d'abeilles, de miel et de cire étaient effectués. Les cadres trop vieux étaient écartés mais nous avons aussi rencontré des ruches dans lesquelles des cadres d'origines différentes, dont certains d'occasion, étaient mélangés. Même si ces ruches étaient présentes depuis plusieurs années, on peut supposer que certaines cires pouvaient porter la trace de contaminations passées.

Il est intéressant de remarquer que les échantillons faiblement contaminés en HAP le sont généralement aussi en éléments inorganiques révélateurs de phénomènes de pollution. L'inverse est aussi généralement vrai pour les échantillons fortement contaminés.

Lors de la première année de ce programme, il a été démontré que lorsqu'une ruche neuve, comportant un essaim constitué d'une jeune reine de moins d'un an, était placée dans un milieu pollué, il était nécessaire d'attendre plus d'un mois pour effectuer une typologie représentative de ce milieu à partir de l'analyse des éléments inorganiques et HAP contenus dans les butineuses. Il est donc possible d'installer des ruches n'importe où, en vue de caractériser le niveau de contamination de l'environnement. C'est cette stratégie que nous préconisons.

Perspectives identifiées

La réalisation de ce programme de recherche a permis de combler un certain nombre de lacunes. Ainsi, pour la première fois, la présence de HAP a été recherchée dans des abeilles, des miels, et des cires d'origines variées. De la même façon, très peu d'études ont porté sur la détection et la quantification de PCB dans les abeilles et les produits de la ruche. Notre étude réalisée sur les butineuses

est la plus complète jusqu'à ce jour, en ce qui concerne le nombre d'échantillons et de PCB analysés. Enfin, alors que la présence d'éléments inorganiques est souvent recherchée dans les miels (surtout celle des métaux lourds), nous en avons également recherché dans les abeilles et les cires.

Ce programme a contribué à mettre au point des méthodes d'analyses des HAP dans les abeilles, les miels et les cires. Celle dans les abeilles a été particulièrement difficile à réaliser du fait de la complexité de cette matrice biologique. Il en a été de même pour la mise au point de l'analyse des PCB dans ces insectes. L'élaboration d'un protocole analytique permettant de rechercher et quantifier un nombre important d'éléments inorganiques dans les abeilles, les miels et les cires a été également long et difficile.

Enfin, et surtout, ce programme a permis de mettre au point une stratégie, simple à utiliser et peu coûteuse pour caractériser le niveau de contamination de l'environnement à partir de l'analyse des abeilles qui, par leur activité de butinage, effectuent un véritable échantillonnage multiple de l'environnement. Les résultats obtenus sont concluants même s'ils sont perfectibles. En particulier, l'intérêt de l'analyse conjointe des miels et de la cire reste à établir d'une façon plus formelle en contrôlant mieux l'origine des ruches utilisées. De la même façon, maintenant que les analyses sont au point et suffisamment précises, il serait intéressant de recommencer à tester conjointement des éléments inorganiques et des HAP dans des abeilles, des miels et des cires, afin de déterminer, au moyen d'analyses multivariées, si la recherche de ces deux types d'éléments est nécessaire où s'il est possible d'optimiser le nombre de polluants à rechercher.



Valorisations



Articles scientifiques

- Devillers, J. & Pham-Delègue, M.H. (2002) **Honey Bees : Estimating the Environmental Impact of Chemicals**, Taylor & Francis, London.
- Anonymes (2004) **Les Abeilles et l'Environnement**, Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable.
- Devillers, J. & Budzinski, H. (2007) Honey bees as indicators of environmental pollution (soumis).
- Devillers, J. & Budzinski, H. (2008) Utilisation de l'abeille pour caractériser le niveau de contamination de l'environnement par les xénobiotiques, **Bulletin Technique Apicole** (sous presse).

APR 2001

Impact des inocula bactériens (*Azospirillum* naturels et génétiquement modifiés) stimulateurs des cultures sur le fonctionnement biologique du sol

Partenaires

- CNRS Marseille : J. Cortet (actuellement ENSAIA Nancy)
- ACTA, La Saulsaie, Montluel : A. Chabert
- Ecole Polytechnique Fédérale (ETH), Zürich, Suisse : G. Défago

Coordinateur

- Yvan Moëgne-Loccoz
UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne,
Université Lyon 1 - 69622 Villeurbanne
moenne@biomserv.univ-lyon1.fr

Mots clés
Azospirillum,
Phytostimulateurs,
OGM, Rhizosphère, Sol

Objectifs

L'utilisation d'engrais azotés en agriculture peut conduire à des problèmes de pollution par le nitrate. Dans ce contexte, l'inoculation des semences par des bactéries *Azospirillum*, qui fixent l'azote et produisent des phytohormones, stimule le développement du système racinaire et permet à la plante de mieux utiliser l'engrais azoté. L'objectif du projet était de déterminer l'impact écotoxicologique de cette biotechnologie environnementale, en considérant les *Azospirillum* naturels déjà utilisés par les agriculteurs (analyse au champ) et le cas de souches d'*Azospirillum* génétiquement modifiées pour en améliorer les propriétés phytostimulatrices (analyse en microcosmes).

Résultats

L'impact de l'inoculation par *Azospirillum* a été apprécié au niveau de différents compartiments biologiques du sol, à savoir la communauté bactérienne totale de la rhizosphère (Y. Moëgne-Loccoz, Lyon 1), les populations de *Fusarium* neurotoxigènes associées aux cultures (G. Défago, ETH Zürich), la microfaune (J. Cortet, CNRS Marseille) et la macrofaune du sol (A. Chabert, ACTA), ainsi qu'au niveau des conditions de développement de la plante (Y. Moëgne-Loccoz, Lyon 1).

Résultats 1 : L'impact écotoxicologique de la souche sauvage *Azospirillum lipoferum* CRT1 a été analysé au champ, à 3 niveaux de fertilisation azotée. L'inoculation a stimulé la prolifération racinaire, et a eu un effet positif (mais transitoire) sur la croissance des parties aériennes. L'inoculation, tout comme la fertilisation azotée, n'a pas eu

d'effet significatif sur le rendement, ce qui est lié vraisemblablement à une fertilisation azotée très élevée les années précédant l'expérience. L'inoculation n'a pas eu d'effet significatif sur les niveaux résiduels d'azote minéral dans le sol après récolte.

La communauté microbienne joue un rôle clef dans le fonctionnement biologique du sol. En modifiant le développement (rhizogénèse) et le fonctionnement (nutrition azotée) du système racinaire, l'inoculum était susceptible de modifier les caractéristiques de la rhizosphère, et donc vraisemblablement celles des populations microbiennes colonisant cet habitat microbien. Les résultats de l'étude du polymorphisme de la taille de l'intergène ribosomique (RISA) de la communauté bactérienne indiquent que l'inoculation a conduit à des modifications de la structure génétique de la communauté bactérienne de la rhizosphère. Ces modifications étaient plus importantes que les différences d'une plante à l'autre, mais restaient inférieures aux différences observées d'une année sur l'autre.

Certaines populations de *Fusarium* phytopathogènes associées aux céréales produisent au niveau des grains des mycotoxines (comme la désoxynivalénol) qui peuvent affecter le système nerveux des animaux supérieurs et de l'homme; l'inoculation n'a pas eu d'effet sur le niveau de contamination des grains de maïs par les *Fusarium* pathogènes et la concentration en désoxynivalénol, mais tous deux étaient influencés par l'interaction entre inoculation et niveau de fertilisation azotée.

La microfaune et la méso/macrofaune du sol jouent un rôle important dans le recyclage des résidus de culture et la structuration du sol; l'inoculation n'a pas affecté la faune du sol, mais a eu un effet significatif (bien que d'intensité faible à moyenne) sur la décomposition et la teneur en azote des résidus de culture et leur colonisation par la mésofaune (analyse en sac de litière).

Résultats 2 : L'impact de souches d'*Azospirillum brasilense* génétiquement modifiées (GM) pour augmenter la production bactérienne de phytohormones a été étudié. Il s'agit de dérivés GM d'*A. brasilense* Sp245 (fournis par J. Vanderleyden, Université de Leuven, Belgique), chez qui une copie du gène *ipdC* (indole-3-pyruvate décarboxylase, enzyme clef de la synthèse de l'auxine acide indole acétique (AIA)) a été mis sous le contrôle du promoteur constitutif fort PnptII ou du promoteur plante-inductible PsbpA (induit en réponse à certains exsudats racinaires). Deux expériences d'inoculation du blé ont été réalisées, en microcosmes de sol non-stérile (conditions contrôlées).

L'effet de l'inoculation sur la plante a varié selon la souche (GM ou pas) et/ou les conditions expérimentales considérées. Les résultats des analyses de type RISA indiquent que l'inoculation a eu dans certains cas un impact sur la communauté microbienne rhizosphérique (bactérienne et/ou fongique), notamment dans le cas de la construction PsbpA (promoteur plante-inductible). Les effets écologiques sur les champignons étaient plus importants que ceux sur les bactéries rhizosphériques, et dans le cas des champignons mycorrhiziens ces effets étaient positifs. L'impact des souches GM était souvent comparable à celui de la souche sauvage, mais il différait selon les conditions expérimentales. Dans la seconde expérience, le premier cycle de croissance (blé inoculé) a également été suivi d'un deuxième cycle de croissance végétale (blé non-inoculé), pour analyser la possibilité d'effets résiduels des souches GM. Aucun effet résiduel n'a été observé, malgré la colonisation de la plante non-inoculée par les souches inoculées précédemment.

Perspectives scientifiques identifiées

Les principaux enseignements du projet sont les suivants :

1. L'effet de l'inoculation sur la plante varie selon la souche (y compris : GM ou non) et les conditions expérimentales considérées. Cet effet est important au niveau des racines mais relativement faible au niveau des parties aériennes.
2. L'inoculation a eu dans plusieurs cas un impact sur la communauté microbienne rhizosphérique (bactérienne et/ou fongique), qu'il s'agisse de souches naturelles ou GM.
3. Les effets écologiques sur les champignons étaient plus importants que ceux sur les bactéries rhizosphériques, et certains de ces effets étaient bénéfiques : effets sur les champignons mycorrhiziens, et (en interaction avec la fumure azotée) au niveau des *Fusarium* producteurs de mycotoxines.
4. L'impact des souches GM était souvent comparable à celui de la souche sauvage, sachant que ces impacts différaient selon les conditions expérimentales.
5. L'inoculum peut s'établir dans le sol et coloniser la plante suivante (non-inoculée), et dans certains cas un effet résiduel peut être observé au niveau de cette dernière.



Valorisations



Articles scientifiques

- Moëgne-Loccoz Y., Woo S.L., Okon Y., Bally R., Lorito M., Lemanceau P., Hartmann, A. (2005) Free-living plant-beneficial microorganisms and soil quality. Dans : **Microbiological Methods for Assessing Soil Quality** (J. Bloem, D.W. Hopkins, A. Benedetti, Eds.) / 9. Plant-microbe interactions and soil quality (P. Lemanceau, Y. Moëgne-Loccoz, Eds.). CABI Publishing, pp. 270-295.
- Russo A., Felici C., Toffanin A., Götz M., Collados C., Barea J.M., Moëgne-Loccoz Y., Smalla K., Vanderleyden J., Nuti, M. (2005) Effect of *Azospirillum* inoculants on arbuscular mycorrhiza establishment in wheat and maize plants. **Biology and Fertility of Soils**, 41 : 301-309.
- El Zembrany H., Cortet J., Lutz M.P., Chabert A., Baudoin E., Haurat J., Maughan N., Félix D., Défago G., Bally R., Moëgne-Loccoz Y. (2006) Field survival of the phytostimulator *Azospirillum lipoferum* CRT1 and functional impact on maize crop, biodegradation of crop residues, and soil faunal indicators in a context of decreasing nitrogen fertilisation. **Soil Biology and Biochemistry**, 38 : 1712-1726.
- Lerner A., Herschkovitch Y., Baudoin E., Nazaret S., Moëgne-Loccoz Y., Okon Y., Jurkevich, E. (2006) Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on rhizobacterial communities analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis and automated ribosomal intergenic spacer analysis. **Soil Biology and Biochemistry**, 38 : 1212-1218.
- El Zembrany H., Czarnes S., Hallett P., Alamercury S., Bally R. Jocteur Monrozier L. (2007) Early changes in root characteristics of maize (*Zea mays*) following seed inoculation with the PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1. **Plant and Soil**, 291 : 109-118.

APR 2003 – Projet financé par l'ADEME

Eléments traces métalliques (ETM) dans le continuum sol – plante, espèces tolérantes et restauration des sites industriels (“EMETER”)

Partenaires

• **Cefe-CNRS, Montpellier** : M. Debussche, A. Dos Santos, C. Collin, V. Sarda • **Université Libre de Bruxelles** : Claude Lefèbvre, Pierre Meerts, W. Gruber, N. Noret • **INRA, UR251, Pessac** : F. van Oort, J. Kireche, S. Breuil, M. Pernes, A. Trouvé, A. Jaulin, N. Wolff J. Labanowski, J. Sebastia • **Ecole des Mines de Paris, Fontainebleau** : M. Thiry, A. Raulo, L. Mingault • **Laboratoire de Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM), Montpellier** : J.C. Cleyet-Marel, C. Vidal, L. Maure, A. Galiana, P. de Lajudie, B. Brunel, G. Béna • **Institut des Sciences de l'Evolution (ISEM), Université Montpellier II, Montpellier** : C. Petit, O. Ronce, G. Jiménez

Coordinateur

• **José Escarré**
CEFE-CNRS
1919 Route de Mende
34293 Montpellier Cedex 5
jose.escarre@cefe.cnrs.fr

Mots clés
Eléments traces métalliques (ETM), Spéciation des métaux, Phytoremédiation, Hyperaccumulation, Symbioses bactériennes

Objectifs

Ce projet, a pour but d'étudier l'évolution dans le temps des écosystèmes pollués par les éléments traces métalliques (ETM : Zn, Pb, Cd), suite à la cessation de l'exploitation des mines dans la région de Saint Laurent le Minier (Gard). Le travail comprend des études de la dynamique de la végétation et du sol à l'échelle de l'écosystème, associées à des recherches sur l'adaptation des populations d'espèces végétales locales à ces environnements extrêmes (tolérance, hyperaccumulation, symbioses fixatrices d'azote), dans le but de les utiliser pour la restauration des écosystèmes pollués. Ces sites sont soumis à de fortes contraintes climatiques, ce qui rend difficile l'utilisation en phytoremédiation des végétaux des régions plus septentrionales à climat tempéré sans sécheresse estivale prononcée.

Résultats

Les sites ont été abandonnés depuis 600 ans à Petra Alba, un siècle aux Avinières et en 1992 à Malines et ont des valeurs en ETM supérieures à celles des stations témoins (depuis 5000 mg kg⁻¹ pour le Zn et Pb à Petra Alba, jusqu'à 100 000 mg kg⁻¹ dans les bassins de décantation des Avinières).

Les matériaux parentaux sont hétérogènes : dolomies (Avinières et Malines) et schistes à Petra Alba, et présentent différents types de spéciation : métaux inclus dans les structures cristallographiques aux Avinières et métaux

sorbés sur des constituants organiques et minéraux mal cristallisés à Petra Alba. Sur ce site, un sol de type Ranko-sol s'est formé au cours des 600 ans avec une bonne activité de la microflore et de la faune. L'altération des schistes ne produit pas de phases métallifères cristallisées et les métaux libérés sont essentiellement associés à la matière organique et aux hydroxydes de fer.

Des espèces végétales tolérantes aux ETM se trouvent sur ces sites miniers. Certaines sont capables d'accumuler des fortes concentrations d'ETM (notamment *Thlaspi caerulescens*, une espèce hyperaccumulatrice de Zn, Cd et Ni) et sont dangereuses pour les animaux herbivores qui d'après nos essais ne les détectent pas (Noret et al. 2007). Nous avons montré qu'il était possible de revégétaliser les déblais d'exploitation minière, grâce à l'installation d'un couvert végétal d'écotypes tolérants (mais non accumulateurs de ETM) avec notamment deux espèces de graminées (*Festuca arvensis* et *Koeleria vallesiana*) et d'une légumineuse, *Anthyllis vulneraria*. Concernant cette espèce nous avons mené des recherches sur son symbiote bactérien qui a été isolé, identifié et dont la tolérance aux métaux a été vérifiée. Des tests d'hybridation d'ADN nous ont conduits à identifier la bactérie symbiotique comme une nouvelle espèce *Mesorhizobium metallidurans* (Vidal et al. 2008). Toutes les souches appartenant à cette nouvelle espèce bactérienne, se caractérisent par leur capacité à croître en présence de fortes quantités de zinc et de cadmium, ce qui les différencie très clairement des espèces phylogénétiquement les plus proches, *Mesorhizobium tianshanense* et *M. mediterraneum* qui ne sont pas capables de se développer en présence de métaux lourds.

Enfin un travail de recherche spécifique a été mené sur *Thlaspi caerulescens*. L'espèce a deux écotypes dans la région, l'un métal-tolérant colonise les sols riches en métaux et l'autre se développe sur des sites non contaminés. Le but était de comprendre l'importance relative des flux géniques et de la sélection naturelle sur l'évolution et le maintien de la diversité génétique entre et dans les populations de *T. caerulescens*. Les recherches ont montré que la diversité génétique pour la plupart des traits

quantitatifs à valeur adaptative est très faible dans la population non tolérante. Au contraire, dans la population tolérante, la variabilité génétique existe pour ces traits malgré une faible diversité pour les marqueurs neutres (microsatellites). Ce contraste entre diversité neutre et sélectionnée pourrait suggérer un épisode de sélection homogénéisante forte dans le site non pollué et au contraire une sélection diversifiante au sein du site pollué (Jimenez Ambriz et al, 2007).

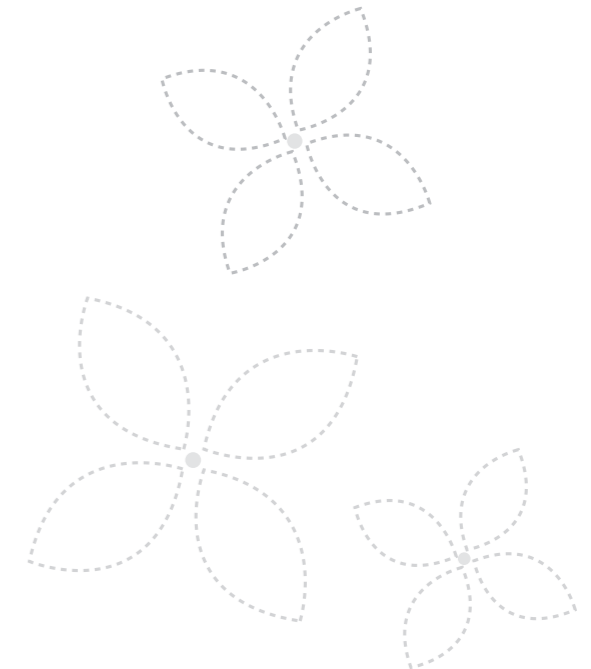
Cette étude a montré l'importance de la pollution polymétallique dans les trois sites étudiés. Nous avons mis aussi en évidence les processus impliqués directement ou indirectement dans la solubilisation, la complexation et le transfert des éléments métalliques par des études *in situ*. Enfin, nous avons montré qu'il était possible de revégétaliser les déblais d'exploitation minière très contaminés, tout en limitant de la sorte l'érosion et le lessivage grâce à un couvert végétal mis en place avec deux espèces locales de graminées et de la légumineuse *Anthyllis vulneraria*, associée à son symbiote, *Mesorhizobium metallidurans*.

Perspectives scientifiques identifiées

La réhabilitation du site passe par la revégétalisation du site des Avinières en utilisant les deux graminées et *Anthyllis vulneraria*. L'utilisation d'espèces ligneuses est aussi envisagée afin de développer un couvert beaucoup plus important et stratifié. L'ajout de bois raméal fragmenté (BRF) mélangé au substrat contaminé pourrait accélérer la colonisation du site par les végétaux présents sur place.

Actions de transfert et perspectives pratiques

Le rapport a été transmis à l'ADEME, ainsi qu'à l'INERIS, et contribue à une réflexion sur l'utilisation de la phytostabilisation dans la gestion des anciens sites miniers.



Valorisations



Articles scientifiques

- Jiménez-Ambriz G., Petit C., Bourrié I., Dubois S., Olivier I., Ronce O. (2007) Life history variation in the heavy metal tolerant plant *Thlaspi caerulescens* growing in a network of contaminated and noncontaminated sites in southern France : role of gene flow, selection and phenotypic plasticity. **New Phytologist**, 173:199-215.
- Noret N., Josens G., Escarré J., Lefèbvre C., Panichelli S., Meerts P. (2007a) Development of Issoria lathonia (Lepidoptera: Nymphalidae) on zinc accumulating and non-accumulating *Viola* species (Violaceae). **Environmental Toxicology and Chemistry**, 26 : 565-571.
- Noret N., Meerts P., Vanhaelen M., Dos Santos A., Escarré J. (2007b) Do metal-rich plants deter herbivores? A field test of the defence hypothesis. **Oecologia**, 152: 92-100.
- Vidal C., Chantreuil C., Berge O., Maure L., Escarré J., Béna G., Brunel B., Cleyet-Marel J.C. (2008) *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a novel metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metalcolours soil in Languedoc, France. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, (en révision).

Thèses

- Jiménez-Ambriz G. (2006) Hétérogénéité environnementale et polymorphisme chez *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae) : Etude conjointe de la diversité génétique neutre et sélectionnée chez une espèce tolérante aux métaux lourds, Thèse de doctorat en Sciences (Biologie des Organismes et des Populations), Université Montpellier II, France, 146p.
- Noret N. (2007) L'hyperaccumulation des métaux lourds par les plantes calaminaires : une défense contre les herbivores ? Test de l'hypothèse avec *Thlaspi caerulescens* et *Viola calaminaria*, Thèse de Doctorat en Sciences (Biologie des Organismes et des Populations), Université Libre de Bruxelles (Belgique) et Université Montpellier II, France, 101p.
- Vidal C. (2008) La symbiose fixatrice d'azote *Anthyllis vulneraria*-*Rhizobium* : une association adaptée à la restauration des anciens sites miniers du Gard pollués par les métaux lourds. Thèse en cours.

APR 2003

Mesure et procédures d'évaluation de l'impact sur l'environnement des anti-virulents ciblant le quorum-sensing

Partenaires

- CNRS, Institut des Sciences du Végétal, Gif-sur-Yvette :
Amélie Cirou, Yves Dessaux
- Université de Rouen, Laboratoire de Microbiologie du froid, Evreux :
Stéphanie Diallo, Xavier Latour, Nicole Orange

Coordinateur

- Denis Faure
CNRS, Institut des Sciences du Végétal (Gif-sur-Yvette)
Batiment 23, avenue de la Terrasse
91198 Gif-sur-Yvette cedex
faure@isv.cnrs-gif.fr

Mots clés

Impact environnemental, Ingénierie écologique, Communautés bactériennes, Biodégradation, Pathogènes

Objectifs

Afin de réduire l'impact environnemental et toxicologique des intrants utilisés massivement en agriculture, de nouveaux principes actifs sont recherchés et proposés selon le paradigme de l'anti-virulence. Ce projet visait à évaluer l'impact environnemental de deux de ces molécules, la gamma-caprolactone (GCL) et la gamma-heptalactone (GHL). Ces molécules ciblent la régulation quorum-sensing, impliquée dans l'expression de la virulence chez de nombreux pathogènes bactériens. Cette régulation quorum-sensing implique la synthèse et la perception de signaux moléculaires par les bactéries : les N-acyl-homoserine lactones (NAHL). Nous avons étudié l'impact de la GCL et la GHL sur les communautés bactériennes au cours de la croissance de plants de pomme de terre.

Résultats

Nous présentons ici les résultats obtenus au cours de trois campagnes d'analyse en 2005, 2006 et 2007. Les populations étudiées sont les populations cibles et non-cibles de ces anti-virulents. Les populations cibles sont les bactéries dégradant le signal NAHL, les populations non-cibles étudiées sont les bactéries produisant les signaux NAHL, et les populations cultivables/non-cultivables totales, dont les *Pseudomonas* fluorescents. Les principaux résultats sont d'une part l'identification de la structure génétique des populations cibles et des populations dégradant les anti-virulents qui contribuent à la disparition de l'agent chimique introduit ; d'autre part l'analyse de l'impact des anti-virulents sur les populations cultivables/non-cultiva-

bles totales par DGGE. Ces travaux nous permettent de définir les populations bio-indicatrices de l'effet de ces molécules sur les communautés bactériennes. Enfin, nous avons mis au point une méthode de détection de ces molécules par HPLC-MS qui nous a permis de vérifier la biodégradabilité des anti-virulents *in situ*. Ces travaux montrent qu'il est possible de définir de nouvelles méthodes, associant des approches chimiques et biologiques, adaptées à l'évaluation de l'impact environnemental de composés xénobiotiques choisis pour leur faible impact environnemental.

Actions de transfert et perspectives pratiques

Ce projet a été valorisé sous la forme de communications scientifiques, mais aussi d'un brevet (CNRS), et d'un partenariat CNRS-industrie. En effet, grâce au partenariat que nous avons développé avec le principal opérateur national de la filière « Plants de pomme de terre », le Comité Nord-Plants de pomme de terre (CNPPT), nous avons pu évaluer l'impact de la GCL dans des conditions de culture strictement identiques à celles utilisées pour la production industrielle hors sol des plants de pommes de terre. Actuellement, ce projet se continue sur deux axes complémentaires : (1) une collaboration avec le CNPPT dans le cadre d'une valorisation industrielle ; (2) la mesure de l'impact de ces composés sur la structure et le fonctionnement des populations bactériennes par une approche métagénomique avec le soutien du CNRS via le programme interdisciplinaire « Ecosphère Continentale et Côtière » et celui du CNPPT via une bourse CIFRE accordée à Amélie Cirou.



Valorisations



Articles scientifiques

- Cirou A., Diallo S., Kurt C., Latour X. Faure D. (2007) Growth promotion of quorum-quenching bacteria in the rhizosphere of *Solanum tuberosum*. **Environmental Microbiology** 9 : 1511-1522.
- Faure D., Dessaux Y. (2007) Quorum sensing as a target for developing biocontrol strategies towards the plant pathogen *Pectobacterium*. **European Journal of Plant Pathology**, 119 :353-365.

Publications de transfert

- Latour X., Faure D., Diallo S., Cirou A., Smadja B., Dessaux Y., Orange N. (2008) Lutte contre les maladies bactériennes de la pomme de terre dues aux *Pectobacterium* spp. (*Erwinia carotovora*). **Cahiers de l'Agriculture**. Sous presse
- Latour X., Diallo S., Smadja B., Orange N. Faure D. (2007) Nouvelles perspectives de lutte contre la jambe noire et les pourritures molles. **La Pomme de Terre Française**. Avril/Mai 551 : 42-43.

Brevet

- Faure D., Cirou A., Dessaux Y. (2007) «Chemicals promoting the growth of N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria». USA n° 60/885, 727

Thèse

- Diallo, S. (2007) Etude du signal de quorum sensing de la bactérie psychrotrophe *Pectobacterium atrosepticum*. Application de ces connaissances à la protection de la pomme de terre Thèse de doctorat, Université de Rouen, France.

APR 2003

Biodisponibilité du cuivre pour des plantes cultivées dans des sols à antécédent viticole - Méthodes d'évaluation et déterminants biologiques et biogéochimiques

Partenaires

- UMR 1222 INRA-SupAgro BSR, Montpellier :
- M. Bravin, A. Michaud
- CNRS-Université Denis Diderot (Paris VII), UMR 7047 LGE, Paris :
- M.F. Benedetti, D. Jouvin
- INRA-ENITA Bordeaux – UMR 1221 TCEM, Bordeaux :
- A. Schneider, L. Denaix

Coordinateur

- Philippe Hinsinger
- INRA, UMR 1222 (INRA-SupAgro)
- Biogéochimie du Sol et de la Rhizosphère
- Place Viala
- 34060 Montpellier cédex
- philippe.hinsinger@supagro.inra.fr

Mots clés
Biodisponibilité,
Cuivre, Modélisation,
Racine, Spéciation

Objectifs

L'objectif général était d'évaluer la biodisponibilité du cuivre (Cu) pour des plantes cultivées, au travers de diverses méthodes, physiques, chimiques et biologiques, ainsi que les liaisons entre biodisponibilité et spéciation de Cu dans une gamme de sols contrastés à antécédent viticole. L'objectif spécifique était de comparer ces divers indicateurs de biodisponibilité et leur dépendance vis-à-vis des propriétés du sol. Un second objectif spécifique était de modéliser le transfert sol-plante de Cu, en fonction des formes de Cu considérées comme biodisponibles. En terme d'application, l'objectif était avant tout de porter un regard critique sur les indicateurs de biodisponibilité. Un second objectif appliqué a consisté à expliquer les liens entre phytotoxicité de Cu et symptômes de chlorose ferrique observés en sols calcaires par les céréaliculteurs.

Résultats

Le contexte de l'étude correspondait aux sols du Languedoc-Roussillon actuellement utilisés pour la céréaliculture (blé dur) suite à l'arrachage de grandes surfaces de vigne (>150 000 ha depuis 1975). Ces sols à antécédent viticole avaient été contaminés par Cu, suite aux apports répétés de fongicides cupriques pour lutter notamment contre le mildiou de la vigne.

Les effets de Cu sur la plante ont été mesurés *ex situ* (en conditions contrôlées en microcosmes) et *in situ* au champ dans une gamme de parcelles d'agriculteurs permettant *in fine* de valider les indicateurs écotoxicologiques retenus. Les sols de ces parcelles ont couvert une gamme de propriétés, notamment pH et statut organique qui sont supposées influencer le plus la spéciation de Cu

en phase solide, i.e. sa distribution sous différentes formes dans les sols. Lors des échantillonnages en 2006, l'observation, exclusivement en sols carbonatés (calcaires), d'une phytotoxicité a priori imputable à Cu nous a amenés à inclure *in fine* des sols calcaires, en plus de la gamme de sols acides à neutres, l'ensemble couvrant ainsi des valeurs de pH comprises entre 4 et 8. La spéciation de Cu dans le sol et en solution a été appréhendée par différentes approches analytiques et numériques. Ces données ont été confrontées à des indicateurs biologiques de biodisponibilité mesurés au niveau du végétal. La modélisation de la spéciation et de la mobilité de Cu a été conduite afin d'identifier les paramètres pertinents parmi ceux mesurés. La hiérarchie des paramètres déterminant la biodisponibilité a aussi été appréhendée par des analyses statistiques multivariées. *In fine*, après détermination des paramètres physiologiques décrivant l'absorption de Cu par la plante (selon un formalisme de type Michaelis-Menten), le transfert sol-plante de Cu a été modélisé selon une approche de type Claassen-Barber.

Les principales avancées méthodologiques accomplies concernent les méthodes d'évaluation de la biodisponibilité de Cu. De façon surprenante, il a en effet été observé chez l'espèce étudiée, le blé dur, que la biodisponibilité de Cu était avant tout dépendante de la teneur totale en Cu du sol, sans effet net du pH, malgré l'importante gamme de pH des sols étudiés (de 4 à 8). Ce résultat a été obtenu en estimant la biodisponibilité aussi bien au travers des teneurs en Cu dans les plantes (racines et parties aériennes) échantillonnées au champ qu'au travers du flux de Cu absorbé par les plantes cultivées en pot ou en biotest pendant 8 jours en conditions standardisées (RHIZOtest). Ainsi, cette méthode biologique d'estimation s'est avérée nettement plus pertinente que des indicateurs chimiques ou physiques classiquement utilisés pour estimer la disponibilité de Cu, tels que la concentration en Cu libre dans la solution du sol mesurée à l'aide d'une électrode spécifique (ISE) ou le flux de Cu mesuré par la technique DGT (Diffusive Gradient in Thin films) qui sont toutes deux très sensibles au pH du sol : elles prédisent ainsi une forte

augmentation de la biodisponibilité de Cu dans les sols les plus acides, qui n'est pas constatée au travers des mesures de contamination des plantes.

Les principales avancées cognitives correspondent à l'explicitation des résultats paradoxaux obtenus quant à l'absence d'effet du pH du sol sur la biodisponibilité de Cu. En sols acides, l'analyse du sol rhizosphérique, i.e. le sol situé à proximité des racines et soumis à leur influence, échantillonné au champ autant qu'en biotest, a révélé que dans les sols les plus acides, les racines avaient considérablement alcalinisé leur environnement immédiat: le pH de la rhizosphère était jusqu'à 1-1,8 unités pH plus élevé que dans le reste du sol, expliquant la réduction de biodisponibilité constatée au niveau de la plante. En sol calcaire en revanche, la forte biodisponibilité de Cu pourrait s'expliquer par le rôle joué par les exsudats racinaires propres aux céréales (et autres graminées) que sont les phytosidérophores et aux interactions entre dynamiques de Cu et Fe (fer) dans la rhizosphère. Nous avons mis en évidence un antagonisme entre ces deux métaux, qui explique que dans ces sols calcaires où la disponibilité de Fe est faible, des niveaux modérés de contamination en Cu (Cu total de l'ordre de 200 mg kg⁻¹) peuvent résulter en une phytotoxicité se manifestant par une chlorose ferrique induite, susceptible de pénaliser le rendement des cultures de céréales telles que le blé dur. Une phytotoxicité (rhizotoxicité) a été aussi constatée en pot dans le sol le plus acide, sans pouvoir toutefois être sûr qu'il ne s'agissait pas de toxicité aluminique. Enfin, les essais de modélisation conduits à l'aide d'un modèle de transfert sol-plante du type Claassen-Barber se sont avérés peu probants, sans doute parce qu'ils ne prennent pas en compte ces processus rhizosphériques et les modifications de spéciation qu'ils peuvent induire dans l'environnement des racines.

Actions de transfert et perspectives pratiques

Des essais préliminaires conduits en partenariat avec ARVALIS ont montré qu'il existait une grande variabilité de sensibilité à cette chlorose ferrique induite par la phytotoxicité de Cu parmi les cultivars commerciaux de blé dur, et une plus faible sensibilité chez le blé tendre, qui demandent à être confirmés en essais multi-locaux. Ces résultats ouvrent des perspectives appliquées pour lutter contre ce problème fréquemment rencontré en région Languedoc-Roussillon, mais aussi sur un plan cognitif pour comprendre le déterminisme de ces différences de sensibilité. Une autre perspective méthodologique concerne le développement du biotest (RHIZOtest) conduit dans ce cadre, qui mériterait d'être poursuivi à des fins de normalisation éventuelle, pour la mesure de la biodisponibilité de métaux pour des plantes cultivées. Enfin, une perspective évidente consiste à enrichir les modèles existants de transfert sol-plante en vue de prendre en compte les modifications de spéciation de métaux qui sont susceptibles de se produire au niveau de la rhizosphère.

Valorisations

Articles scientifiques

- Bravin M.N., Michaud A.M., Larabi B., Hinsinger P. (2008) Rhizotest: a plant-based biotest to account for rhizosphere processes for assessing metal bioavailability. **Environmental Science & Technology** (soumis).
- Bravin M.N., Le Merrer B., Denaix L., Schneider A., Hinsinger P. (2008) Copper uptake kinetic in hydroponically-grown durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) as compared with soil ability to supply Cu. **Plant and Soil** (en préparation).
- Michaud A.M., Bravin M.N., Galleguillos M. & Hinsinger P. (2007) Copper uptake and phytotoxicity as assessed in situ for durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cultivated in Cu-contaminated, former vineyard soils. **Plant and Soil**, 298 : 99-111.

Thèse

- Michaud A. (2007) Interaction entre biodisponibilité, phytotoxicité du cuivre et nutrition en fer de graminées - mécanismes physiologiques et rhizosphériques. Thèse de Doctorat Science du Sol, Université Montpellier 2

APR 2003 - Projet financé par l'ADEME

Étude modèle de l'exposition de végétaux à la pollution atmosphérique : utilisation de la réponse enzymatique comme bio-indicateur (BIO-ATMO)

Partenaire

• Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP), Strasbourg :
Franck Pinot

Coordinateur

• Stéphane Le Calvé
Centre de Géochimie de la Surface (CGS),
Equipe de Physico-Chimie de l'Atmosphère
1 rue Blessig
67084 Strasbourg Cedex
slecalve@illite.u-strasbg.fr

Mots clés

Atmosphère, Pollution Photochimique, Végétaux, Biomarqueurs, Cutine

→ Objectifs

Ce projet a débuté à l'automne 2005 et a été financé par l'ADEME pendant 3 ans dans le cadre du programme PNETOX. Les objectifs de ce projet étaient de mesurer la réponse induite des ω -hydroxylases d'acides gras chez les plantes après exposition à une pollution chimique gazeuse, comme cela avait déjà été observé après une exposition chimique en phase aqueuse, et d'utiliser cette induction de l'activité enzymatique comme biomarqueur de pollution atmosphérique. Les ω -hydroxylases étant des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la cutine, qui constitue avec les cires la première barrière physique du végétal contre les stress environnementaux, nous attendions également une modification de la cutine consécutive à l'induction de ces enzymes.

→ Résultats

Débutées en utilisant une chambre de simulation atmosphérique, les expositions de plantules de vesces (*Vicia sativa*) ont ensuite pris place au sein d'un banc de dilution, qui s'est révélé plus adapté. Nous avons ainsi montré que l'activité ω -hydroxylase était induite par le formaldéhyde et le benzaldéhyde, et qu'elle ne l'était pas par le dioxyde d'azote et le benzène. L'induction de cette activité enzymatique dépend de la concentration du polluant dans l'air, mais aussi de la durée d'exposition des plantules. Nous avons déterminé une durée d'exposition optimale située entre 48 et 72 heures, bien qu'une durée comprise entre 18 et 24 heures semble suffisante pour détecter un début d'induction. Consécutivement à ces augmentations d'activité ω -hydroxylase, des modifications de la composition en acides gras de la cutine des plantes ont été

observées, validant l'hypothèse d'une réaction de défense du végétal vis-à-vis du stress chimique gazeux. De plus, des expositions au formaldéhyde en milieu liquide ont permis de montrer que la phase aqueuse présente dans les boîtes d'exposition pouvait également jouer un rôle dans l'induction des enzymes.

Enfin, des expositions de plants d'*Arabidopsis thaliana* au formaldéhyde nous ont permis de détecter une induction d'hydroxylases d'acides gras identifiées comme étant des in-chain hydroxylases, système enzymatique très peu décrit chez cette espèce.

→ Actions de transfert et perspectives pratiques

Ces résultats, qui seront complétés prochainement par des expositions à l'ozone, ouvrent des perspectives intéressantes. Si les concentrations élevées en formaldéhyde et en benzaldéhyde nécessaires à l'induction des ω -hydroxylases d'acides gras mènent à penser que ce système sera difficilement exploitable en tant que biomarqueur de pollution atmosphérique, les modifications biochimiques observées chez les plantes exposées élargissent nos connaissances sur les impacts physiologiques que peuvent avoir les épisodes de pollution atmosphérique sur la végétation, sauvage ou cultivée. Les ω -hydroxylases constituent ainsi un bon repère du niveau de stress général perçu par la plante.

Les résultats de nos travaux commencés à la fin de l'année 2005 feront l'objet d'au moins deux publications, dont une est actuellement en préparation.



Copyright : Laurent Mignaux - MEEEDDAT

Valorisations



Articles scientifiques

• Kastner P.E., Le Calvé S., Diss L., Franke R., Schreiber L., Pinot F., ω -hydroxylases in *Vicia sativa* seedlings. Effect on cutin composition. **Plant Physiology** (en préparation).

APR 2003 - Projet financé par l'ADEME

La végétation des friches métallurgiques : caractéristiques écophysiologicals et influence sur la mobilité des métaux lourds

Partenaires

• Département SPIN, Equipe GENERIC, Ecole Nationale Supérieure des Mines de St-Etienne : Estéban REMON, Jean-Luc BOUCHARDON
 • Laboratoire de Physiologie et Biotechnologies Végétales (UPBV, EA 3296), Université Blaise Pascal/IUT de l'Université d'Auvergne, IUT de Clermont-Ferrand : Adnane HITMI • ERTAC, Physiologie et Génétique Végétales, Université Blaise Pascal, Aubière : Gérard LEDOIGT, Pascale GOUPIL, Isabelle DUQUESNOY • ENITAC, Département Agriculture et Espaces, Lempdes : Agnès PIQUET

Coordinateurs

• Jean-Claude Leclerc et Olivier Faure
 Laboratoire d'Ecophysologie Appliquée (Université Jean Monnet)
 Dpt SPIN - GENERIC, Ecole Nationale Supérieure des Mines de St-Etienne
 158 Cours Fauriel
 42023 St Etienne Cedex
 ofaure@emse.fr

Mots clés

Eléments trace métalliques, Bioaccumulation, Bioindication, Plantes, Phytosociologie, Photosynthèse, Fluorescence chlorophyllienne, Réponse au stress

qualité des sols. Par ailleurs, les contaminants métalliques provoquent des perturbations du fonctionnement photosynthétique, se traduisant par une diminution de la photosynthèse nette et une augmentation de la fluorescence chlorophyllienne.

→ Objectifs

Ce projet a pour but d'évaluer les potentialités des végétaux supérieurs en tant qu'indicateurs biologiques de pollution des sols. Dans ce cadre, nous nous sommes focalisés sur l'étude de la réponse au stress métallique, en adoptant simultanément une approche de terrain (étude écophysiologicals de la végétation de sites ateliers contaminés par différents métaux ou métalloïdes) et une approche de laboratoire (analyse des perturbations cellulaires et moléculaires en conditions contrôlées).

→ Perspectives identifiées

Ces paramètres, simples à mesurer sur le terrain, pourraient renseigner efficacement sur l'état physiologique des plantes se développant sur un site contaminé et constituer ainsi des biomarqueurs d'effet faciles à évaluer. Enfin, plusieurs paramètres facilement quantifiables pourraient également constituer des biomarqueurs potentiels. En particulier les concentrations en histidine, proline ou acide ascorbique sont manifestement modifiées dans des conditions de stress métallique. De même, l'induction de micronoyaux et la surexpression de certaines protéines de stress sont autant de pistes qui ont été étudiées.

→ Résultats

En premier lieu, les résultats obtenus ont mis en évidence que les végétaux colonisant les sites métallurgiques pourraient être utilisés en tant que bioindicateurs d'accumulation. Effectivement, les concentrations métalliques foliaires dans un échantillon représentatif de la végétation indigène peuvent constituer « l'empreinte chimique » d'un site. Cette empreinte chimique, comparée à celle obtenue en milieu non contaminé, fournit des informations originales concernant la mobilité potentielle des métaux dans les sols et complète avantageusement les méthodes d'extraction chimique classiquement réalisées dans les études de sol. En second lieu, nous avons pu montrer que les sols métallurgiques ont un effet visible sur la structure des communautés végétales et que des associations phytosociologiques inhabituelles pourraient constituer un bioindicateur pertinent de la



Valorisations



Articles scientifiques

- Remon E., Bouchardon J-L., Cornier B., Guy B., Leclerc J-C., Faure, O. (2005) Soil characteristics, heavy metal availability and vegetation recovery at a former metallurgical landfill: implications in risk assessment and site restoration. **Environmental Pollution**, 137 : 316-323.
- Vernay P., Gauthier-Moussard C., Hitmi A. (2007) Interaction of bioaccumulation of heavy metal chromium with water relation, mineral nutrition and photosynthesis in developed leaves of *Lolium perenne* L. **Chemosphere**, 68 : 1563-1575.
- Remon E., Bouchardon J-L., Faure, O. (2007) Multi-tolerance to heavy metals in *Plantago arenaria* Waldst. & Kit.: adaptative versus constitutive characters. **Chemosphere**, 69 : 41-47.
- Jean L., Bordas F., Gautier-Moussard C., Vernay P., Hitmi A., Bollinger J-C. (2008) Effect of citric acid and EDTA on chromium and nickel uptake and translocation by *Datura innoxia*. **Environmental Pollution**, 153 : 555-563.
- Vernay P., Gauthier-Moussard C., Jean L., Bordas F., Faure O., Ledoigt G., Hitmi, A. (2008) Effect of chromium speciation on phytochemical and physiological parameters in *Datura innoxia*. **Chemosphere**, 72 : 763-771.
- Remon E., Bouchardon J-L., Jolu J., Goupil P., Hitmi A. Faure O. Suitability of plants as indicators of metal bioavailability and effect in contaminated soils, en préparation.

Thèse

- Remon E. (2006) Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques : vers de nouvelles méthodes de biodépollution. Thèse de l'Université Jean Monnet, Saint-Etienne 158 pp.

Réponses adaptatives des communautés microbiennes du sol aux toxiques : approche métagénomique

Partenaires

- **Ecologie Microbienne Université Lyon 1 :**
L. Fraissinet-Tachet, J. Bailly, E. David, F. Lehembre
- **Interactions Arbres Micro-organismes, UMR Université Nancy 1 – INRA :**
D. Blaudez, M. Chalot, D. Doillon
- **Génomique Microbienne Environnementale, Laboratoire Ampère, UMR 5005, Ecole Centrale de Lyon – Université Lyon 1 – CNRS :**
M. David, I. Navarro, T. M. Vogel

Coordinateur

- **Roland Marmeisse**
Ecologie Microbienne, UMR Université Lyon 1 – CNRS, USC INRA
Bâtiment André Lwoff
43 Boulevard du 11 Novembre 1918
69622 Villeurbanne Cedex
roland.marmeisse@univ-Lyon1.fr

Mots clés

Microorganismes, Adaptation, Métagénomique, Métaux lourds, Lindane

Objectifs

L'objectif est de comprendre la réponse adaptative de l'ensemble des microorganismes du sol à la présence d'un toxique. Son originalité est de s'intéresser aux communautés aussi bien d'organismes procaryotes qu'eucaryotes, cultivables ou non, en développant une approche métagénomique basée sur l'analyse des acides nucléiques extraits directement de sols. Au sein des banques d'acides nucléiques "environnementaux" sont recherchés les gènes conférant une résistance aux toxiques ciblés : métaux lourds dans le cas des eucaryotes et composés chlorés tel que les solvants chlorés (ex. : tetrachloroéthylène) et le lindane dans le cas des procaryotes.

Résultats

Afin d'étudier l'adaptation des communautés de microorganismes eucaryotes du sol à des pollutions par des métaux lourds, nous avons développé une stratégie expérimentale originale de métatranscriptomique. Celle-ci est basée sur l'extraction des ARN messagers polyadénylés eucaryotes des sols et leur conversion en ADNc qui sont clonés. Ces banques d'ADNc environnementales renferment les gènes exprimés par les différents microorganismes eucaryotes au moment du prélèvement, dont des gènes conférant une adaptation à des polluants. Ces gènes sont recherchés par différentes approches : séquençage systématique des inserts de la banque ou encore complémentation fonctionnelle de mutants de

levure sensibles aux métaux étudiés.

Cette stratégie a été validée pour la première fois à partir de différents sols. Trois banques métatranscriptomiques contenant chacune plus de 10⁶ clones ont été produites. Le séquençage d'ADN ribosomiques 18S amplifiés des ADN et ARN des sols montrent que les organismes présents appartiennent aux différents grands phyla du domaine eucaryotes dont certains sont peu pris en compte en écotoxicologie tels les cercozoaires au sein desquels nos résultats suggèrent la présence d'un nouveau groupe non encore décrit.

La stratégie de complémentation de mutants de levure sensibles au zinc ou au cadmium a tout d'abord été validée à partir de banques d'ADNc d'organismes fongiques modèles. Cette approche a permis d'isoler différentes catégories de gènes impliqués dans la "détoxification" des métaux comme des gènes codant des transporteurs transmembranaires, des métallothionéines ou encore des thiorédoxines permettant de réduire l'impact du stress oxydatif induits par le cadmium.

A partir des banques environnementales, la complémentation de mutants de levure a permis d'isoler une thiorédoxine fonctionnelle provenant d'un organisme apparenté au groupe des levures hemiascomycètes. D'autres gènes conférant une résistance au cadmium sont en cours de caractérisation. Le séquençage aléatoire a, lui aussi, permis d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans la résistance aux métaux : un transporteur transmembranaire d'origine végétale, une glutathione transférase, une peroxyrédoxine, des thiorédoxines.

Le lindane, quant à lui présente la caractéristique d'être un polluant dont la structure chimique ne présente aucune similarité avec les "molécules du vivant". Il est postulé que sa dégradation effective dans les sols aurait nécessité l'apparition *de novo* de gènes codant des enzymes permettant sa dégradation. Un gène bactérien, nommé *linA*, est connu pour coder une telle activité. L'objectif était d'explorer le métagénome de sols contaminés ou non par du lindane pour isoler soit de nouvelles formes de

gène *linA*, soit des fragments "ancestraux" de ce gène qui, une fois ré-assemblés, donnent naissance à une séquence *linA* fonctionnelle.

Aucun clone possédant la capacité à dégrader le lindane n'a été identifié au sein du métagénome d'un sol non pollué. Une recherche de ce gène au sein de cette même banque par une approche moléculaire (PCR) s'est aussi révélée infructueuse. Un gène *linA* (responsable de la première étape de la dégradation et donc à la résistance au lindane) ne semble donc pas "préexister" à la pollution. Par contre, le gène *linA* se retrouve bien dans le métagénome du sol pollué. L'analyse du métagénome du sol non pollué a été poursuivie par la recherche de fragments de la séquence *linA* qui pourraient après recombinaison et sélection positive être à l'origine d'un gène fonctionnel dans un sol pollué. Cette recherche s'est avérée fructueuse et nous avons mis en évidence la présence d'un pool génétique proche de certains domaines de *linA*. Ces fragments ont pu être utilisés avec succès pour reconstruire artificiellement des gènes *linA* fonctionnels. La similarité entre des divers gènes de déshalogenases nous a amené à étudier tous les membres de cette classe afin de trouver des similarités. L'alignement de ces gènes a permis de définir des motifs en commun entre les gènes. La recherche de ces motifs dans les pyroséquences des métagénomiques de sol permettra de clarifier la probabilité de leur présence en l'absence de pression de sélection.

Perspectives scientifiques identifiées

L'approche métagénomique en écotoxicologie ouvre la perspective d'identifier de nouveaux modes de résistance et/ou de détoxification des polluants. Cette perspective, déjà illustrée par l'exemple du gène *linA*, sera poursuivie aussi bien pour le lindane que pour les métaux. L'identification de nouveaux modes de résistance peut en partie résulter du fait que cette approche prend en compte l'entière diversité des microorganismes du sol, cultivables ou non, connus ou inconnus.

Cette approche sera complétée par un séquençage à grande échelle des banques environnementales afin d'obtenir un profil global de la réponse métabolique d'une communauté face à un toxique. De plus, les gènes "donneurs de motifs" pour l'évolution des gènes de

déshalogenases seront recherchés dans les membranes à haute densité des clones de banques métagénomiques de sols non pollués.

Actions de transfert et perspectives

Une approche métagénomique exhaustive est susceptible d'identifier de nouveaux marqueurs moléculaires d'exposition aux toxiques ainsi que de définir quels sont les marqueurs moléculaires les plus pertinents à étudier au sein des différents grands groupes phylogénétiques. Les gènes identifiés et leurs produits sont susceptibles d'être utilisés soit directement en biotechnologie pour éliminer ou inactiver les polluants présents dans des sols ou des eaux contaminés. Ils peuvent aussi être utilisés indirectement dans une stratégie de sélection assistée par marqueur pour sélectionner des organismes plus résistants aux toxiques pouvant être utilisés en remédiation / revégétalisation de sites contaminés.



Valorisations



Publications scientifiques

- Lombard N., Bailly J., Marmeisse R. and Simonet P. (2006) La métagénomique des communautés microbiennes. **Biofutur**, 268 : 24-27.
- Boubakri H., Beuf M., Simonet P., Vogel T.M. (2006) Development of metagenomic DNA shuffling for the construction of a xenobiotic gene. **Gene** 21 : 87-94.
- Bailly J., Fraissinet-Tachet L., Verner M.-C., Debaud J.-C., Lemaire M., Wesolowski-Louvel M., Marmeisse R. (2007) Soil eukaryotic functional diversity, a metatranscriptomic approach. **The ISME Journal**, 1 : 632-42.
- Bellion M., Courbot M., Jacob C., Guinet F., Blaudez D., Chalot M. (2007) Metal induction of a Paxillus involutus metallothionein and its heterologous expression in *Hebeloma cylindrosporum*. **The New Phytologist**, 174 : 151-158.
- Lefevre F., Robe P., Jarrin C., Ginolhac A., Zago C., Auriol D., Vogel T. M., Simonet P., Nalin R. (2008) Drugs from hidden bugs: Discovery from untapped resources. **Research in Microbiology**, 159 : 153-161.

Présentation générale du Programme PNETOX



Depuis 1996, le Programme national d'écotoxicologie (PNETOX) contribue au soutien d'actions de recherche finalisées visant à améliorer l'évaluation des dangers et des risques liés à la présence de substances toxiques dans l'environnement. Il répond en cela aux interrogations des pouvoirs publics et des gestionnaires face, notamment, aux réglementations nouvelles ou en cours d'élaboration (directive cadre et loi sur l'eau, directive biocides, directive REACH, ...).

Ce programme est piloté par deux instances : un comité d'orientation et un conseil scientifique.

Le comité d'orientation est chargé de définir les orientations du programme, de déterminer les projets prioritaires à partir de l'évaluation scientifique réalisée par le conseil scientifique et d'accompagner les actions d'animation, d'évaluation et de valorisation. Il est composé de représentants des directions concernées du ministère et de ses établissements publics, d'autres ministères et organismes impliqués ainsi que des utilisateurs de la recherche*.

Le conseil scientifique a pour missions de reformuler en questions de recherche les priorités exprimées par le comité d'orientation, sous forme d'appels à propositions de recherche, d'expertiser les réponses et de proposer et mettre en œuvre des actions d'animation, d'évaluation et de valorisation du programme. Présidé par Marc Babut (CEMAGREF), il est composé d'experts en écologie, écotoxicologie, microbiologie et modélisation**.

L'animation scientifique du programme est assurée par l'INERIS (Jean-Marc Porcher, Catherine Gondcaille, Vanessa Veg).

* Ministères chargés de l'environnement, de l'agriculture, de la recherche, Collège des DIREN, IFEN, Agences de l'eau, ADEME, IFREMER, INRA, associations et industriels.

** Claude Amiard-Triquet (CNRS), Marc Babut (CEMAGREF), Marc Benedetti (Université Paris VII), François Brechignac (IRSN), Thierry Caquet (INRA, Président du CS Pesticides), Yves Dessaux (CNRS), James Devillers (CTIS), François Galgani (IFREMER), Jeanne Garric (CEMAGREF), Philippe Garrigues (CNRS), Philippe Hartemann (INSERM), Jean-François Humbert (INRA), Lucile Jocteur-Monrozier (CNRS), Jean-Marie Mouchel (CEREVE), François Ramade (CNRS), Jean-Louis Rivière (INRA), Pascal Simonet (CNRS), Eric Thybaud (INERIS), Paule Vasseur (CSE)



Crédits photos :

Copyright© Laurent Mignaux - MEEDDAT, Droits réservés (Photo centrale de la couverture et 3^{ème} de couverture) INERIS, Droits réservés SXC.HU (p25,89,95)

Conception : la Boîte à Meuh ! Bousbecque

Impression : Nord' Imprim certifié label Imprim'vert sur papier cyclus avec des encres végétales

Colloque de restitution du Programme National d'Ecotoxicologie

Lille Grand Palais • 13 et 14 octobre 2008



→ Ecotoxicologie Terrestre et Aquatique : de la recherche à la gestion des milieux

Le Programme National d'Ecotoxicologie (PNETOX) a été lancé en 1996 par le ministère chargé de l'environnement. Ce colloque vise à rassembler chercheurs, représentants des services de l'Etat et des collectivités, des secteurs agricole, industriels et du milieu associatif autour de deux questions principales :

- Comment la connaissance produite et les méthodes mises au point permettent aujourd'hui de **mieux gérer les milieux naturels** ?
- Quelle nouvelle connaissance produire dans le futur pour **répondre aux enjeux de demain dans la gestion des milieux naturels** ?



INERIS
maîtriser le risque
pour un développement durable

