

Appel d'offre interne 2008
Fédération de Recherche ECCOREV n°3098

**ECOTOXICOLOGIE ET GENOTOXICITÉ DES SÉDIMENTS
D'UN CONTINUUM RIVIÈRE - ÉTANG**

Contexte de la recherche

Les métaux sont utilisés par l'homme et rejetés dans l'environnement depuis l'antiquité. Souvent indispensables au métabolisme des êtres vivants à l'état de traces (Fe, Cu, Zn, Ni, Co, Mn, Cr, et Ti), ils deviennent toxiques lorsque leurs concentrations dépassent des seuils dont le niveau dépend en grande partie de l'état physico-chimique de l'élément considéré. Certains comme le Pb, le Cd ou le Hg sont particulièrement nocifs à la vie. La toxicité de ces métaux est très variable selon leur nature, leur spéciation dans le milieu (état d'oxydo-réductions, phases adsorbées ou précipitées, phases particulières biodisponibles ou fixées...) et leurs voies de pénétration dans les organismes (ingestion, respiration, contact dermique). Cette diversité d'impact conduisant à une diversité de symptômes est une des difficultés des études toxicologiques dans la recherche « effet-cause » des polluants. Une des manières d'y remédier dans le cas d'une étude concrète d'un milieu naturel est d'aborder le système dans sa globalité en définissant conjointement les types et la spéciation des divers polluants organiques ou métalliques pouvant avoir un effet sur les organismes, en étudiant les voies et les processus de transferts potentiels et en caractérisant les symptômes par différents types de tests écotoxicologiques et/ou génotoxicologiques. Cette approche globale est difficile puisqu'il faut déconvoluer l'effet des divers polluants présents dans le milieu, mais elle est la seule qui permette d'appréhender les mécanismes et leurs effets dans le contexte réel.

De nombreuses études toxicologiques ont ainsi montré l'impact de certains métaux ou métalloïdes présents dans les sédiments sur des organismes aquatiques. Pourtant, des polluants organiques tels que les HAP et les PCB sont très souvent présents eux aussi dans le sédiment et il est nécessaire de les prendre en compte dans les tests afin d'évaluer la toxicité globale du système.

Un des sites aquatiques les plus impactés de la région est sans conteste l'étang de Berre. La zone de Berre-Fos constitue en effet le deuxième pôle industriel en France et cet environnement a été fortement altéré durant les dernières décennies par l'industrialisation et l'urbanisation très importante de son pourtour. L'étang et ses affluents (Cadière, Touloubre, Arc) ont reçus d'importants apports en métaux, HAP et PCB, en faisant un des sites les plus pollués du Sud-Est (Agence de l'eau RMC). Plusieurs études passées (GIPREB) et en cours (thèse S Rigaud, CEREGE) ont ainsi révélées les fortes teneurs de ces polluants dans les sédiments de l'étang ainsi que dans ceux de la Cadière (Aoudene et al., 2008). Pour cette rivière, des premiers travaux sur la toxicité de ces xénobiotiques réalisés récemment par les équipes de l'IMEP et du LBME ont montré que les organismes vivants en étaient affectés et que certains tests (ELISA, Ames, micronoyaux) permettaient d'évaluer le niveau d'exposition de ces organismes.

Le but du projet soumis à ECCOREV vise à continuer les études de la toxicité des sédiments de cet hydrosystème en améliorant cependant les approches des équipes impliquées grâce à différents points:

- réunir quatre équipes de la fédération sur un même objectif de recherche, chacune de ces équipes ayant déjà travaillé sur le site mais de façon séparée jusqu'à présent.
- disposer pour chacun des sites étudiés de la totalité des mesures sur les principaux xénobiotiques, leur spéciation dans le sédiment, leurs teneurs dans les organismes et leurs influences toxiques et génotoxiques par le biais de divers tests : mise en évidence de biomarqueurs cellulaires et tissulaires du stress métallique, tests courts de génotoxicité utilisant des modèles procaryotes et eucaryotes.
- Confronter la réponse de ces divers tests à l'ensemble des mesures obtenues sur le sédiment afin de mieux comprendre les processus de transferts sédiments-organismes
- aborder pour la première fois le rôle de ces polluants dans un hydrosystème bassin versant-étang saumâtre dans sa globalité.

Objectifs de la demande incluant la description de la suite prévue pour le projet

Il s'agit de favoriser la coopération scientifique entre quatre unités de recherche de la fédération ECCOREV travaillant sur le transfert des polluants dans l'environnement et leur impacts sur les organismes vivants :

- Le Centre Européen de Recherche et d'Enseignement des Géosciences de l'Environnement (CEREGE),
- L'Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléoécologie, UMR-CNRS 6116 IMEP, représenté par une équipe du département 2 *Organisation et Vulnérabilité des Systèmes Ecologiques*: "Biomarqueurs & Bioindicateurs Environnementaux" (Animateur d'équipe: Pr A. THIERY), Université de Provence désignée ci-après comme "*équipe IMEP-BBE*"
- le Laboratoire de "Biogénotoxicologie & Mutagenèse Environnementale", EA 1784 (Dir: Pr A. BOTTA), *Faculté de Pharmacie*, désigné ci-après comme "*équipe LBME*"
- Le Laboratoire de Chimie Analytique de l'Environnement LCAE UMR 6263 ISM2-AD2EM de l'université Paul Cézanne Aix-Marseille III

Ces équipes ont jusqu'ici travaillé séparément sur la zone d'étude proposée, excepté le travail de l'IMEP et du LBME sur la rivière de la Cadière (voir ref biblio demandeurs). Afin d'accroître la collaboration scientifique entre ces équipes dans ECCOREV, la demande concerne non pas l'achat d'un équipement commun mais le financement de missions, prélèvements, analyses et tests toxicologiques sur des sédiments.

Les prélèvements seront réalisés dans l'étang de Berre et la rivière de la Cadière. Ceux dans l'étang seront réalisés avec la participation du GIP-REB (Groupement d'intérêt pour la réhabilitation de l'étang de Berre) qui dispose d'un bateau de recherche et grâce aux études actuellement menées dans la cadre d'une thèse Région-GIPREB du CEREGE (thésard S. Rigaud, Dir JM Garnier). Le nombre de sites sera restreint à moins d'une dizaine afin de pouvoir tester rapidement sur une année l'approche conjointe proposée : prélèvements, analyses du sédiment et des organismes, recherche des biomarqueurs de stress, tests génotoxiques (incluant pour ces deux derniers points les adaptations spécifiques entre milieu d'eau douce et d'eaux saumâtres) et interprétations.

La réalisation de ce projet permettra de mettre en place une collaboration pluri-disciplinaire s'inscrivant dans les axes 1 et 3 de la fédération. Le groupement crée et les résultats obtenus constitueront la base nécessaire pour répondre à un appel d'offre national type ANR (Contaminants-Écosystème et Santé) ou CNRS-INSU (EC2CO-CYTRIX) dont les problématiques concernent directement le sujet proposé. Les objectifs précis d'un tel projet découleront en partie des résultats obtenus ici et pourront portés par exemple sur : la contamination métallique et organique d'un système modèle "bassin versant/river/étang" en région méditerranéenne, les processus de transfert de polluants sédiment-organismes, la pertinence des tests écotoxicologiques et génotoxiques sur des organismes similaires entre milieu d'eau douce et d'eau saumâtre.... Dans le cadre d'un tel projet, des collaborations feront appel à d'autres partenaires nationaux notamment pour les études écotoxicologiques chez les bactéries ou les vertébrés aquatiques (amphibiens, poissons) avec qui des contacts sont déjà pris : IFREMER Nantes ; laboratoire de microbiologie IRD Luminy; SMAB écotoxicologie Nantes ; Laboratoire de parasitologie fonctionnelle et évolutive, CNRS-Univ Perpignan. Enfin, un aspect important qui pourra être développé par la suite concerne l'étude de la dégradation microbienne souvent incomplète en milieu anaérobie (cas des sédiments étudiés ici) et la relation entre l'activité microbienne et la transformation des métaux (et/ou des polluants organiques) dans le sédiment.

Réalisations prévues, description courte du mode d'interaction prévu entre les équipes

Le plan de travail prévu est le suivant :

Juin 2008: réunion de préparation du projet : choix des sites de prélèvements, choix des techniques de prélèvements adaptées à l'ensemble des analyses prévues. Discussion sur le choix le plus pertinent des organismes à suivre : faune benthique (nereis, turitelles,...), larves de chironomides...

Juillet à Septembre 2008: durant l'été une campagne de prélèvements de sédiments sera réalisée dans le Cadière et dans l'étang de Berre (aide du GIP-REB pour les prélèvements par bateau). Ces deux sites seront prélevés conjointement. En cas de retard pour le prélèvement sur l'étang, ceux de la Cadière pourront être menés tout de suite afin de disposer des premiers échantillons. Préparation du matériel biologique et sédimentaire.

Septembre-novembre 2008: premières analyses des sédiments (métaux, polluants organiques), adaptations des tests et biomarqueurs aux différents organismes sélectionnés (cette phase commencera dès les premiers échantillons reçus).

Novembre – janvier 2008: premier résultats sur la recherche des niveaux de contaminations sur le vivant, sur les biomarqueurs cellulaires et tissulaires marqueurs de résistance au stress, sur les tests courts de génotoxicité.

Avril-mai 2009 : interprétations, discussions communes, rédactions d'articles.

Rôle des participants :

CEREGE : l'équipe Sol-eaux-Déchets-Développement Durable du CEREGE est spécialisée dans l'étude de la dispersion des métaux et métalloïdes dans l'environnement. Elle sera responsable de l'analyse des prélèvements dans l'étang de Berre, de l'analyse de métaux (Pb, Cd, Zn, Ni, Fe, Al, Mn, Mo, Cr) dans les sédiments de l'étang et de la rivière. L'analyse sera réalisée sur la fraction totale ainsi que sur des extractions séquentielles qui permettront d'évaluer la distribution des métaux sur différentes phases du sédiment (résiduelle, organiques, oxydes-hydroxydes, lessivables) et ainsi mieux appréhender leur impact potentiel sur les organismes. Si les prélèvements le permettent en terme de quantité, la mesure des métaux sera faite sur les organismes biologiques sélectionnés. Une thèse en cours (financement Région-GIP REB) sur la spéciation des métaux et leur biodisponibilité dans les sédiments de l'étang de Berre servira de support à ce travail (Thèse S. Rigaud). Cet étudiant participera à l'ensemble des travaux en collaboration avec les autres équipes et constituera ainsi une personne relais dédiée à 100 % à ce projet.

IMEP-BBE : l'équipe évaluera les risques liés à la dispersion des métaux dans l'environnement sur la faune aquatique. Les effets précoces seront évalués par une approche biomarqueurs. Pour les métaux, les protéines de stress métallothionéines (MTs), seront recherchées. En tant que ligands privilégiés des métaux, les MTs participent à leur détoxification en les stockant momentanément sous forme non biodisponible dans la cellule.

Les recherches seront menées chez des invertébrés aquatiques représentatifs des divers compartiments (eau & sédiments) en tenant compte également de leur position trophique afin de répondre au problème de bioamplification. Les recherches permettront également d'identifier les organes cibles des métaux. Les MTs seront détectées par immunohistochimie et quantifiées par des tests ELISA.

LBME : l'équipe étudiera l'activité génotoxique des sédiments par deux types de tests à court terme :

- le test d'Ames, qui permet d'évaluer les capacités des polluants à induire des mutations reverses sur des souches de *Salmonella Typhimurium*,
- le test de numération des micronoyaux qui permet de mesurer les capacités des polluants à induire des mutations chromosomiques ou des pertes de chromosomes dans des cellules d'ovaires de hamster chinois en culture.

L'utilisation des souches TA 102 et TA 104 en l'absence et en présence de mélange métabolisant dans le test d'Ames permettra de détecter plus spécifiquement l'activité mutagène imputable aux métaux, alors que l'utilisation du test de numération des micronoyaux en absence et en présence de mélange métabolisant permettra de détecter l'activité clastogène des sédiments due aux agents génotoxiques directs et indirects. Cependant, l'extension de ces deux tests à d'autres souches (test d'Ames) ou à des modes opératoires

utilisant différentes méthodes d'extraction pourra éventuellement être envisagée pour détecter une contamination due aux hydrocarbures aromatiques polycycliques ou à d'autres polluants.

Dans un second temps, l'utilisation d'autres tests de génotoxicité comme le test des comètes sur cellules obtenues à partir d'organismes aquatiques ou le test de numération des micronoyaux sur cellules de plantes ou de vertébrés exposés *in situ* pourra fournir des indications sur le degré d'imprégnation des organismes à cette pollution génotoxique.

LCAE : Le Laboratoire de Chimie Analytique de l'Environnement (LCAE) de l'unité ISM2/AD2EM possède de fortes compétences dans l'étude de l'origine, de la nature, de la distribution et du devenir de composés xénobiotiques présents dans l'environnement (air, eau, sol, sédiments, organismes). Il est en particulier qualifié dans la détermination qualitative et quantitative des hydrocarbures saturés et des hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques (HAP).

Le LCAE sera responsable de l'analyse des hydrocarbures saturés et des HAP en termes quantitatifs et en terme de caractérisation des origines, des alkyl benzènes (traceurs de rejet), des 7 PCB prioritaires CEE et des C₁₀-C₁₃ polychloroparaffines au niveau des sédiments, des eaux et de certains organismes. Des mesures de bioaccumulation seront également réalisées sur des organismes choisis ?

L'interdisciplinarité du consortium permettra, à l'échelle d'un hydrosystème rivière-étang saumâtre, d'appréhender les mécanismes de transferts des métaux (et hydrocarbures) des sédiments vers les organismes, d'évaluer leurs effets biologiques précoces, leur bioaccumulation et bioamplification dans une partie de la chaîne trophique, d'estimer leurs effets génotoxiques et d'étendre l'utilisation de ces tests génotoxiques à des problématiques de contamination des zones côtières.

Plan financier de la demande :

ÉQUIPE	Montant HT	Justification
IMEP-BBE	2200 euros	Missions terrains & analyses <i>in situ</i> : Anticorps; Consommables de laboratoires; séances de microscopies et consommables.
LBME	2000 euros	Matériel et réactif pour test d'Ames et de numération de micronoyaux, missions.
CEREGE	2500 euros	Consommables pour prélèvements et laboratoire ; 50 analyses métaux par ICP-MS sur sédiments et organismes
LCAE	2200 euros	Missions terrain, consommables, réactifs d'analyse et fluides.
TOTAL DEMANDÉ ECCOREV	8700 euros	

Description du consortium: liste des participants (avec leur statut et le pourcentage d'implication), court CV du porteur de chaque équipe incluant la liste de trois publications les plus pertinentes pour le projet.

Liste des participants :

Équipe	Participant	Statut	Pourcentage d'implication
IMEP-BBE	THIERY Alain*	Pr	30 %
IMEP-BBE	DE JONG Laetitia	MCF, HDR	30 %
IMEP-BBE	MOREAU Xavier	MCF	30 %
CEREGE	RADAKOVITCH Olivier*	MCF	15 %
CEREGE	GARNIER Jean-marie	CR	15 %
CEREGE	RIGAUD Sylvain	Thèsard	50 %
LBME	DE MEO Michel*	MCF, HDR	30 %
LBME	DI GIORGIO Carole	MCF, HDR	30 %
LCAE	DOUMENQ Pierre	Pr	15 %
LCAE	GUEYDON Céline	Thèsard	15 %

*** porteurs du projet par équipe**

Alain THIÉRY, 55 ans

Professeur, 68^e section CNU, UMR-CNRS 6116, FR ECCOREV 3098, Marseille

Responsabilités administratives:

Directeur de l'Equipe Biodiversité & Environnement (2003-2007). Responsable de 4 convention inter-Universitaires. Responsable de l'équipe Bioindicateurs & Biomarqueurs Environnementaux (UMR 6116). Directeur de 2 thèses CIFRE.

Publications en rapport avec le sujet:

SAEZ G., DE JONG L., MOREAU X., SARRAZIN L., WAFO E., SCHEMBRI T., LAGADEC V., DIANA C., MONOD J-L. & THIÉRY A. 2008. Evaluation of pollutant exposure by chemical and biological markers in a Mediterranean French urban stream: a step for *in situ* calibration of multixenobiotic resistance transporter expression as biomarker in Chironomidae larvae. *Environmental Research* (in press).

AOUADENE A., DI GIORGIO C., SARRAZIN L., MOREAU X., DE JONG L., GARCIA F., THIÉRY A., BOTTA A. & DE MÉO M. 2008. Evaluation of the genotoxicity of river sediments from industrialized and unaffected areas using a battery of short-term bioassays. *Environmental and Molecular Mutagenesis* (in press).

Moreau X., Saez G., Thiéry A., Clos-Faybesse O., Guiraudie-Capraz G., Bienboire-Frosini C., Martin C. & De Jong L. 2008. ELISA detection of multixenobiotic resistance transporter induction in indigenous freshwater Chironomidae larvae (Diptera): a biomarker calibration step for *in situ* monitoring of xenobiotic exposure. *Environmental Pollution* (in press).

De Méo Michel, 59 ans

Maître de conférences HC, HDR, 41^e section CNU, EA 1784 ECCOREV, faculté de Pharmacie, 27 Bd. Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05

Responsabilités administratives:

Directeur de la composante pharmacie de l'EA 1784 " biogénotoxicologie et Mutagenèse Environnementale". Directeur de deux thèses d'Université

Publications en rapport avec le sujet:

- Di Giorgio, C., Nikoyan, A., Decome, L., Botta, C., Robon, M., Reboul, J.P., Sabatier, A.S., Matta, A. and De Méo, M. 2008. DNA-damaging activity and mutagenicity of 16 newly synthesized thiazolo[5,4-a]acridine derivatives with high photo-inducible antitumoral activity. *Mutation Res.*, **650**: 104-114.
- Aouadene, A, C. Di Giorgio, L. Sarrazin, X. Moreau, L. De Jong, F. Garcia, A. Thiery, A. Botta and M. De Méo. 2008. Evaluation of the genotoxicity of river sediments in an industrial site of Southern France by the Salmonella mutagenicity test, the micronucleus assay and the alkaline comet assay. *Mol. Environ. Mutagen.*, (in press).
- Nikoyan, A., M. De Méo, I. Sari-Minodier, F. Chaspoul, P. Gallice and A. Botta. 2007. Evaluation of a battery of Salmonella tester strains for biomonitoring polycyclic aromatic hydrocarbons, nitroarènes and aromatic amines. *Mutation Res.*, **626**: 88-101.

Radakovitch Olivier, 41 ans

Maître de conférences 1^{er} C, section 35 CNU, CEREGE-UMR 6635, CNRS-Univ Paul Cézanne Aix-marseille III, BP 80, Europole de l'arbois, 13545 Aix-en-provence

Responsabilités administratives:

Membre du Conseil scientifique du GIP-REB, membre du département Environnement faculté des sciences. Co-directeur de 5 thèses d'université.

Publications en rapport avec le sujet:

- Miralles J., Veron A., Radakovitch O., Deschamps P., Tremblay P., Hamelin B. 2006. Atmospheric lead fallout over the last century recorded in Gulf of Lions sediments (Mediterranean Sea). *Marine Pollution Bulletin*. 52, 11, 1364-1371.
- Schmidt S., Jouanneau JM, Weber O., Lecroart P., Radakovitch O., Gilbert F., Jezequel D. 2007. Sediment dynamic at the water-sediment interface of the Thau Lagoon (South France): from seasonal to century time scales using radiogenic and cosmogenic nuclides. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 72, 3, 534-542.
- Radakovitch O., Roussiez V., Ollivier P., Ludwig W, Grenz C., Probst, J.L. 2008. Particulate heavy metals input from rivers and associated sedimentary deposits on the Gulf of Lion continental shelf. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 77, 285-295

Doumenq, Pierre, 45 ans

Professeur 2^{em} C, section 31, AD2EM ISM2 6223, Univ Paul Cézanne Aix-marseille III, BP 80, Europole de l'arbois, 13545 Aix-en-provence

Responsabilités administratives

R:esponsable Equipe AD2EM UMR 6263 ISM2

Directeur adjoint Département Environnement FST Université Paul Cézanne

Directeur de 3 thèses d'Université

Publications en rapport avec le sujet:

- S. BUCO, M. MORAGUES, M. SERGENT, P. DOUMENQ, G. MILLE, (2007). An experimental design approach for optimizing poly aromatic hydrocarbon analysis in contaminated soils by pyrolyse-gas chromatography-mass spectrometry. *Environ. Res.*, 104, 209-215.
- G. MILLE, L. ASIA, M. GUILIANO, L. MALLERET, P. DOUMENQ (2007). Hydrocarbons in coastal sediments from Mediterranean sea (Gulf of Fos, France). *Mar. Pollut. Bull.*, 54, 566-575.
- N. MAZZELLA, J. MOLINET, A.D. SYAKTI, J. C. BERTRAND and P. DOUMENQ (2007). Assessment of the effects of hydrocarbon contamination on the sedimentary bacterial communities and determination of the polar lipid fraction purity : relevance of intact phospholipid analysis. *Mar. Chem.*, 103, 304-317.