

**EXPOSITION CHRONIQUE DES STADES PRECOCES DE  
DEVELOPPEMENT DE L'HUITRE JAPONAISE AUX  
CONTAMINANTS INDUSTRIELS EN MANCHE.  
MARQUEURS DE STRESS A DES NIVEAUX INTEGRES  
ET MOLECULAIRES.**

Alexandre Devos

Novembre 2013

ISRN/IRSN-2013/165

Pôle RadioProtection - ENVironnement (PRP-ENV)  
Service de recherche et d'Expertise sur les RISques  
environnementaux (SERIS)  
Laboratoire de Radioécologie de Cherbourg-Octeville (LRC)



**Université de Caen Basse-Normandie**

Ecole doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement

**Thèse de doctorat**

présentée et soutenue le 5 novembre 2013

par

**Alexandre DEVOS**

Pour obtenir le

**Doctorat de l'Université de Caen Basse-Normandie**

**Spécialité** : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions

**EXPOSITION CHRONIQUE DES STADES PRECOCES DE DEVELOPPEMENT DE  
L'HUITRE JAPONAISE AUX CONTAMINANTS INDUSTRIELS EN MANCHE.  
MARQUEURS DE STRESS A DES NIVEAUX INTEGRES ET MOLECULAIRES.**

Directeur de thèse : *Bruno Fiévet*

Co-directeur de thèse : *Jean-Marc Lebel*

**Jury**

**Dr. Stéphane Betoulle**  
**Pr. Paco Bustamante**  
**Pr. Maria João Bebianno**  
**Pr. Pascal Sourdain**  
**Pr. Jean-Marc Lebel**  
**Dr. Bruno Fiévet**

Université de Reims  
Université de La Rochelle  
Universidade do Algarve  
Université de Caen  
Université de Caen  
IRSN

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Co-directeur de Thèse  
Directeur de Thèse



# Remerciements

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements les plus sincères au Docteur Bruno Fiévet, directeur de la thèse et coordinateur du projet *ChronExpo*. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour m'avoir encadré et s'être toujours montré disponible au cours de ces années passées au LRC. Ça a été pour moi un grand honneur de travailler et d'apprendre à tes côtés.

Je remercie sincèrement le Professeur Jean-Marc Lebel, co-directeur de la thèse. Merci beaucoup Jean-Marc pour vos conseils et encouragements.

Je remercie le Professeur Pascal Sourdain, directeur du laboratoire de BIOlogie des Mollusques marins et des Ecosystèmes Associés (BIOMEA, Caen), de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de thèse. Je remercie également le Docteur Stéphane Betoulle et le Professeur Paco Bustamante d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie le Professeur Maria João Bebianno d'avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Je remercie également Claire Voiseux pour la grande aide qu'elle m'a apporté au cours de ces travaux. Merci beaucoup Claire pour tes conseils et ton écoute. Ça a été un réel plaisir de travailler avec toi.

Je remercie vivement Lorna Dallas et le Professeur Awadhesh Jha pour leur accueil chaleureux lors de mes missions à l'Université de Plymouth. Lorna, merci encore pour ta gentillesse et ton implication dans notre collaboration. J'ai beaucoup apprécié de travailler avec toi et garderai un excellent souvenir de mes rencontres au Davy Building.

Merci également à Claire Dumont, Charles Lepabic, Antoine Mottier et Katherine Costil pour leurs soutiens et leurs aides dans le développement des mesures d'activités enzymatiques.

Je tiens également à remercier Blandine Diss, responsable des écloséries de la Société Atlantique de MARiculture de Barfleur, ainsi que Emilie Vetois et toute l'équipe de la SAtMar, pour nous avoir fourni le matériel biologique et le phytoplancton nécessaires aux expérimentations. Merci d'avoir mis à notre disposition votre savoir-faire et nous avoir régulièrement prodigué de précieux conseils.

Merci également à Catherine Lecomte-Pradines, Rodolphe Gilbin et Arnaud Martin-Guérin du Laboratoire d'Ecotoxicologie des radionucléides (IRSN, Cadarache) pour avoir préparé et mis à notre disposition les structures d'exposition externe au césium 137. Merci également à Nicolas Dubourg pour son savoir-faire lors des calculs de doses.

Je tiens aussi à remercier Christelle Caplat pour m'avoir formé à l'utilisation du spectromètre d'absorption atomique et pour sa contribution au dosage du zinc dans les échantillons d'huîtres et d'eau de mer.

Merci également à Luc Solier pour sa grande rigueur et son appui technique en métrologie nucléaire au cours des expérimentations au LRC.

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à Dominique Boust et Denis Maro, directeur et directeur-adjoint du Laboratoire de Radioécologie de Cherbourg-Octeville, pour leurs soutiens et l'intérêt qu'ils ont porté à cette thèse. J'adresse également mes sincères remerciements à toute l'équipe du LRC qui a contribué à ce que cette thèse soit une agréable expérience.

Enfin, je remercie chaleureusement mes proches, mes amis, ma petite sœur et mon petit frère pour leurs encouragements et soutien.

Par-dessus tout, je tiens à remercier celle qui, à tous moments, m'a apporté force et réconfort. Merci beaucoup à toi Fionie.



## Résumé

---

Exposition chronique des stades précoces de développement de l'huître japonaise aux contaminants industriels en manche.

Marqueurs de stress à des niveaux intégrés et moléculaires.

Ce travail de thèse porte sur les effets chroniques de contaminants industriels en mer de la Manche, dont les radionucléides, sur les stades précoces de développement de l'huître japonaise *Crassostrea gigas*. La conception de dispositifs expérimentaux originaux a permis d'étudier en laboratoire la croissance d'un grand nombre de larves et de naissains. L'accent a été mis sur l'utilisation conjointe des marqueurs de stress à des niveaux intégrés et moléculaires. Les premières expositions à des contaminants non radioactifs ont mis en évidence une réponse sensible et précoce de la croissance des juvéniles vis-à-vis d'un métal (zinc). Par la suite, les juvéniles ont été exposés plusieurs semaines à des débits de doses de rayonnements ionisants et des activités en radionucléide supérieurs de plusieurs ordres de grandeur aux niveaux susceptibles d'être rencontrés dans l'environnement marin. Une approche éco-génotoxicologique a permis d'apporter des éléments de réponse quant aux effets des rayonnements ionisants sur l'ADN. Les résultats suggèrent fortement que des mécanismes biochimiques agissent efficacement contre les dommages radio-induits dès les premiers jours de vie de l'huître japonaise. Il reste encore des interrogations quant aux effets à long terme des dommages à l'ADN sur les niveaux d'organisation biologique supérieurs.

**Mots-clés :** exposition chronique, rayonnement ionisant, marqueurs intégrés et moléculaires, juvéniles, *Crassostrea gigas*, écotoxicologie.

## Abstract

---

Chronic Exposure of Early Stages of Development of Japanese Oyster to Contaminants from the Industry in the English Channel.  
Stress Markers at Integrated and Molecular Level.

This thesis explores the effects of pollutants from the industry in the English Channel, in particular radionuclides, on the early stages of development of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. Original experimental devices were designed to study in laboratory controlled conditions the growth of a large number of larvae and spats. Emphasis was given to a joint use of stress markers at integrated and molecular levels. First exposures to non-radioactive pollutants revealed a highly sensitive response of the growth of juveniles exposed to a metal (zinc). Thereafter, juveniles were exposed for several weeks to dose rates of ionizing radiation and radionuclide activities several orders of magnitude higher than the levels likely to be encountered in the marine environment. An eco-genotoxicological approach contributed to the understanding of the effects of ionizing radiations on DNA. The results strongly suggest that biochemical mechanisms act efficiently against radio-induced damages as early as the first days of life of the Japanese oyster. It still remains a lack of information about the long-term effects of DNA damages to higher level of biological organization.

**Keywords:** chronic exposure, ionizing radiation, integrated and molecular markers, juveniles, *Crassostrea gigas*, ecotoxicology.

## Publications scientifiques

---

Devos A, Voiseux C, Caplat C, Fiévet B. 2012. Effect of chronic exposure to zinc in young spats of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 31: 2841-2847. (acceptée).

Devos A, Dallas L, Voiseux C, Lecomte-Pradines C, Jha A, Fiévet B. Growth, stress gene expression and genotoxic responses in Pacific oyster *Crassostrea gigas* chronically exposed to ionizing radiation. (en préparation).

## Communications à des congrès internationaux

---

Devos A, Voiseux C, Lecomte-Pradines C, Fiévet B. Chronic Exposure of Early Stages of Development of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) to Ionizing Radiations. International Symposium on Environmental Radioactivity: Implications for Environmental & Human Health. 4-5 septembre 2012 – Plymouth, Royaume-uni. Présentation affichée.

Devos A, Voiseux C, Lecomte-Pradines C, Fiévet B. Exposition chronique des stades précoces de développements de l'huître du Pacifique (*Crassostrea gigas*) aux rayonnements ionisants. ECOBIM, congrès francophone en écotoxicologie. 5-8 juin 2012 – Reims, France. Présentation orale.

Devos A, Voiseux C, Caplat C, Fiévet B. Effect of Chronic Exposure to Zinc in Young Spat of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). 6<sup>th</sup> SETAC World Congress. 21-24 mai 2012 – Berlin, Allemagne. Présentation affichée.

# Sommaire

---

<b>CHAPITRE I. INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>9</b>
I.1 CONTEXTE.....	11
I.1.1 Présentation de la mer de la Manche, contexte géographique .....	11
I.1.2 Définition "exposition chronique".....	12
I.1.3 Industrie nucléaire .....	13
I.2 RAYONNEMENTS IONISANTS .....	16
I.2.1 Rappels et généralités.....	16
I.2.2 Effets des R.I. du niveau sub-cellulaire aux conséquences macroscopiques.....	18
I.2.3 Le nouveau concept de la radioprotection .....	21
I.2.4 La problématique des faibles doses .....	22
I.3 STRATEGIE, CHOIX ET OBJECTIFS.....	24
I.3.1 Présentation de l'huître japonaise <i>Crassostrea gigas</i> .....	24
I.3.2 Choix du modèle biologique .....	27
I.3.3 Choix des paramètres biologiques moléculaires/cellulaires et intégrés.....	29
I.3.4 Objectifs .....	31
I.4 DEMARCHE EXPERIMENTALE.....	31
<b>CHAPITRE II. DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DU MODELE EXPERIMENTAL POUR LA REALISATION D'EXPOSITIONS CHRONIQUES EN MILIEU CONTROLE .....</b>	<b>35</b>
II.1 METHODE EXPERIMENTALE .....	37
II.1.1 Matériel biologique : appui technique de la Société Atlantique de Mariculture .....	37
II.1.2 Nutrition des larves et naissains .....	38
II.1.3 Présentation des cages accueillant les larves et les naissains .....	39
II.1.4 Protocoles de mesure des différents paramètres biologiques.....	41
II.2 EXPOSITIONS CHRONIQUES DE JUVENILES A UN METAL : LE ZINC.....	55
II.2.1 Introduction sur le zinc.....	55
II.2.2 Structure d'exposition utilisées lors des expositions de naissains et larves au zinc .....	55
II.2.3 Effets chroniques du zinc sur les naissains.....	59
II.2.4 Effets chroniques du zinc sur les larves .....	70
II.2.5 Discussion sur les effets chroniques du zinc sur les juvéniles d'huîtres japonaises .....	75

II.2.6	Conclusion sur les effets chroniques du zinc sur les juvéniles d'huîtres japonaise .....	81
II.3	EXPOSITIONS CHRONIQUES DE JUVENILES A UN MOLLUSCICIDE : LE METHIOCARB .....	82
II.3.1	Introduction sur le methiocarb. ....	82
II.3.2	Modalités d'exposition et structures utilisées lors des expositions de juvéniles de <i>Crassostrea gigas</i> au methiocarb.....	83
II.3.3	Effets du methiocarb sur les juvéniles .....	84
II.3.4	Discussion sur les effets chroniques du methiocarb sur les juvéniles d'huîtres japonaises .	88
II.4	CONCLUSIONS .....	89
<b>CHAPITRE III. EFFETS DES RAYONNEMENTS IONISANTS SUR LES STADES PRECOCS DE DEVELOPPEMENT DE L'HUITRE JAPONAISE.....</b>		<b>91</b>
III.1	INTRODUCTION.....	93
III.2	EXPOSITION CHRONIQUE DE JUVENILES DE <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> A UNE SOURCE EXTERNE DE RAYONNEMENTS GAMMA .....	95
III.2.1	Introduction .....	95
III.2.2	Matériels et méthodes.....	95
III.2.3	Effets des expositions chroniques des juvéniles à une source externe de rayonnements gamma .....	101
III.3	EXPOSITION CHRONIQUE PAR BALNEATION DE JUVENILES A UN EMETTEUR ALPHA : L'AMERICIUM 241 .....	106
III.3.1	Introduction .....	106
III.3.2	Matériels et méthodes.....	108
III.3.3	Résultats des expositions de naissains à l'euporium .....	111
III.3.4	Résultats des expositions de naissains à l'américium 241 .....	113
III.3.5	Résultats des expositions de larves à l'euporium.....	117
III.3.6	Résultats des expositions de larves à l'américium 241 .....	121
III.4	DISCUSSION .....	124
<b>CHAPITRE IV. EFFETS GENOTOXIQUES DU TRITIUM SUR DE JEUNES HUITRES <i>CRASSOSTREA GIGAS</i>.....</b>		<b>127</b>
IV.1	INTRODUCTION.....	129
IV.1.1	Stratégie et objectifs.....	129
IV.1.2	Le tritium .....	130
IV.1.3	Evaluation de la Génotoxicité potentielle des rayonnements ionisants par l'utilisation du test des comètes.....	134

IV.2	METHODE EXPERIMENTALE .....	137
IV.2.1	Dispositif expérimental utilisé lors des expositions de jeunes huîtres japonaise au tritium .....	137
IV.2.2	Contrôle de la qualité et mesures de l'activité en tritium de l'eau de mer .....	140
IV.2.3	Estimation du debit de dose.....	141
IV.2.4	Mesure des activités en tritium dans les tissus mous .....	141
IV.2.5	Mesures du taux de filtration.....	143
IV.2.6	Mesures de l'expression transcriptionnelle de gènes ciblés .....	144
IV.2.7	Mesure des dommages à l'ADN par le test des comètes.....	145
IV.3	RESULTATS .....	151
IV.3.1	Paramètres de qualité et mesures de l'activité en tritium dans les échantillons d'eau de mer .....	151
IV.3.2	Distribution du tritium dans les tissus mous et estimation du débit de dose.....	153
IV.3.3	Taux de filtration.....	156
IV.3.4	Expression transcriptionnelle de gènes ciblés.....	157
IV.3.5	Test des comètes.....	159
IV.4	DISCUSSION .....	161
IV.4.1	Débits de dose et distribution en tritium dans les tissus mous .....	161
IV.4.2	Test des comètes en milieu alcalin .....	162
<b>CHAPITRE V. DISCUSSION SUR LES EFFETS DES RAYONNEMENTS IONISANTS ...</b>		<b>167</b>
<b>CONCLUSION - PERSPECTIVES.....</b>		<b>177</b>
<b>REFERENCES .....</b>		<b>183</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>		<b>199</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>		<b>203</b>
<b>ANNEXES .....</b>		<b>205</b>
<b>ANNEXE A : EXPOSITION CHRONIQUE DE LARVES DE <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> A UN GEOTEXTILE .....</b>		<b>207</b>
<b>ANNEXE B: EFFECT OF CHRONIC EXPOSURE TO ZINC IN YOUNG SPATS OF THE PACIFIC OYSTER (<i>CRASSOSTREA GIGAS</i>) .....</b>		<b>211</b>



# **CHAPITRE I. INTRODUCTION GENERALE**



Ces travaux de thèse se sont déroulés au sein de l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, au Laboratoire de Radioécologie de Cherbourg-Octeville. Ils s'inscrivent dans le projet CHRONEXPO (*CHRONic EXPOsure*) financé par le programme européen INTERREG IVa. Ce projet contribue à la préservation de l'environnement de la mer de la Manche en réunissant conjointement plusieurs équipes scientifiques complémentaires dans le but d'évaluer l'impact des expositions chroniques des organismes marins aux polluants d'origine anthropique.

## I.1 CONTEXTE

### I.1.1 PRESENTATION DE LA MER DE LA MANCHE, CONTEXTE GEOGRAPHIQUE

Espace maritime partagé par le Royaume-Uni et la France, la mer de la Manche (*English Channel* en anglais), et un bras de mer de 75 000 km<sup>2</sup> reliant l'océan Atlantique à la mer du Nord. En 2005, presque 20% du trafic mondial des navires déclarés passaient par la Manche ce qui lui confère le statut de zone maritime parmi les plus fréquentées du globe. Ses activités portuaires d'envergure internationale, de frêts et d'exploitations des ressources vivantes en font une zone économique dynamique. La pêche professionnelle y est intense étant donnée la présence de nombreuses espèces commerciales. En effet, les conditions environnementales caractéristiques que l'on y rencontre permettent l'établissement de zones de nurseries et de frayères importantes mais aussi de voies de migration pour les oiseaux et certains poissons et mammifères.

La configuration bathymétrique et le trait de côte de la Manche participent à la création de structures particulières (fronts, gyres, tourbillons, etc.) gouvernant l'advection et la dispersion des organismes et des polluants. C'est une mer macrotidale où les courants des marées sont parmi les plus importants du globe. La faible profondeur et l'influence des vents se traduisent par un renouvellement rapide des masses d'eau. Ces deux facteurs contribuent à une dispersion efficace des rejets d'origine terrestres directs ou acheminés par les fleuves et cours d'eau qui y affluent ; les plus importants étant la Seine, la Somme (France) et la Tamar (Angleterre).

Les contaminants rencontrés dans l'environnement de la Manche résultent des multiples activités industrielles en pleine mer (trafic maritime, pêche) et sur le littoral (agriculture, industrie nucléaire, etc.) mais aussi d'activités non industrielles (rejets d'eau municipale usée en baie de Seine, par exemple). Par conséquent, une combinaison de contaminants tels que des métaux, polluants organiques persistants (pesticides, polychlorobiphényles, hydrocarbures aromatiques polycycliques, etc.), perturbateurs endocriniens, radionucléides, et autres, peuvent se retrouver dans le milieu marin en concentrations non négligeables.

Considérant l'ensemble de ses caractéristiques, la Manche se révèle un environnement exposé à un risque réel de pollution. Ces pollutions peuvent être de différentes intensités. Dans le cas de pollutions accidentelles, les répercussions seraient très rapidement ressenties à la fois par l'environnement et l'homme. Des accidents aux conséquences lourdes surviennent rarement mais régulièrement dans

différentes mers du monde : naufrage du navire Erika (Océan Atlantique, 1999), explosion de la Plateforme BP *DeepWater Horizon* (Golfe du Mexique, 2010) ou accident de la centrale nucléaire de Fukushima (Océan Pacifique, 2011), par exemple. Ce type de pollution correspond à la définition donnée par le Groupe d'Experts sur les Aspects Scientifiques de la Protection de l'Environnement Marin (GESAMP 1991). Celui-ci définit la pollution marine comme "l'introduction par l'homme, directement ou indirectement, dans le milieu marin (estuaires compris), de substances ou d'énergie provoquant des effets nuisibles tels que des dommages aux ressources biologiques, risques pour la santé humaine, entraves aux activités humaines, notamment à la pêche, altérations de la qualité d'utilisation de l'eau de mer et réductions des agréments".

### ***1.1.2 DEFINITION "EXPOSITION CHRONIQUE"***

Les pollutions aiguës s'ajoutent à un autre type de pollution, générée par le fonctionnement normal des industries et entraînant, à terme, le déversement de contaminants qui se retrouvent en faibles concentrations dans le milieu marin. Par conséquent, les organismes marins sont continuellement exposés à ces faibles teneurs en contaminants. Ces pollutions dites "chroniques" sont qualifiées par Elliot (2003) de "diffuses à faibles niveaux d'apports ne pouvant être reliées à un incident particulier (rivières, atmosphère) ; et pouvant contribuer à 90% des apports totaux et souvent la cause d'effets sublétaux difficilement identifiables". De nos jours, c'est de ce type de pollution et leurs effets potentiels sur la faune et la flore marine dont les instances internationales de protection environnementale doivent tenir compte. Pour exemple, la commission OSPAR vise à protéger la région Atlantique Nord-Est, dont la Manche, ainsi que ses ressources. La Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM) étend cette préoccupation à l'ensemble des environnements marins des états membres de l'Union Européenne. Alors que les effets de pollutions aiguës ont généralement été étudiés, la problématique des effets chroniques de faibles concentrations de contaminants souffre actuellement d'un réel manque de données. Aussi, il est primordial que des recherches aient lieu dans ce sens et plus particulièrement au cours d'expositions en conditions sublétales en laboratoire.

Parmi l'ensemble des contaminants susceptibles d'être rencontrés dans l'environnement marin, les radionucléides d'origine anthropique suscitent un intérêt constant de la communauté scientifique, des instances de régulations et du public (Polikarpov 1998). A l'heure actuelle, de nombreuses interrogations demeurent quant aux effets chroniques des faibles doses de rayonnements ionisants sur les organismes vivant alors même que l'énergie nucléaire a été identifiée comme une stratégie de choix pour réduire les émissions de CO<sub>2</sub> atmosphérique, sources du réchauffement climatique (Howard *et al.* 2004). Ces travaux de thèse s'inscrivent plus particulièrement dans cette dynamique de recherche sur les effets des radionucléides sur les organismes marins.

### ***I.1.3 INDUSTRIE NUCLEAIRE***

La radioactivité a été découverte par Henri Becquerel en 1896. Par la suite, l'énergie nucléaire et ses applications (civiles et militaires) ont très grandement contribué à l'établissement de la civilisation moderne. Aujourd'hui, elle est largement utilisée dans divers secteurs :

- la santé : stérilisation du matériel, traitement des cancers par radiothérapie, imagerie médicale,
- l'industrie agro-alimentaire : stérilisation des denrées,
- le bâtiment : gammagraphie d'ouvrages de construction,
- l'énergie : électricité, cycle du combustible, propulsion nucléaire.

La France est la deuxième puissance électronucléaire au monde derrière les Etats-Unis. Elle est dotée d'un parc de production de 58 réacteurs nucléaires qui assure 78% de sa production d'électricité, lui permettant d'atteindre un taux d'indépendance énergétique voisin de 50%. Elle n'a ainsi plus recours à l'importation de quantités massives de combustibles fossiles pour produire son électricité (source : [www.cea.fr](http://www.cea.fr)).

On distingue usuellement deux sources de radioactivité : la radioactivité naturelle et la radioactivité artificielle. La radioactivité naturelle désigne l'ensemble des isotopes radioactifs présents depuis la formation de la Terre dans le sol et l'atmosphère (générés par les rayonnements cosmiques). Au début du 20<sup>ème</sup> siècle, les premiers isotopes radioactifs artificiels ont été créés dans les réacteurs nucléaires ou les accélérateurs de particules. Chaque isotope radioactif, qu'il soit naturel ou artificiel, est caractérisé par le type de rayonnement qu'il émet, son énergie et sa période radioactive. D'un point de vue radiologique, chaque radionucléide doit être pris en compte, qu'il soit d'origine artificielle ou naturelle.

L'industrie nucléaire est principalement représentée dans le Nord-Cotentin par la présence de la centrale nucléaire EDF de Flamanville et l'usine de recyclage des combustibles usés d'AREVA La Hague. Trois autres centrales nucléaires se trouvent également sur le littoral français de la mer de la Manche : Penly, Paluel et Gravelines (de l'ouest vers l'est). Chacune de ces installations rejette en fonctionnement normal, et de manière contrôlée, des radionucléides venant s'ajouter à la radioactivité naturelle. Ces quantités de radionucléides artificiels rejetés ont considérablement diminuées au cours des 25 dernières années. Ces changements sont dus aux modifications apportées aux techniques de retraitement des combustibles usés, notamment grâce à une amélioration des procédés de filtration. La [figure 1](#) présente l'évolution des rejets de l'usine de recyclage d'AREVA La Hague entre 1966 et 2000. Les activités exprimées en Becquerel en  $^{106}\text{Ru}$ ,  $^{125}\text{Sb}$ ,  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{90}\text{Sr}$ ,  $^{137}\text{Cs}$  et  $^{99}\text{Tc}$  dans les rejets liquides de l'usine d'AREVA ont diminué au cours des deux décennies précédant l'an 2000. En revanche, au cours de cette période, les activités rejetées annuellement en  $^3\text{H}$ ,  $^{129}\text{I}$  et  $^{14}\text{C}$  ( $^{14}\text{C}$  non présenté) ont augmenté, au prorata du tonnage de combustible recyclé.

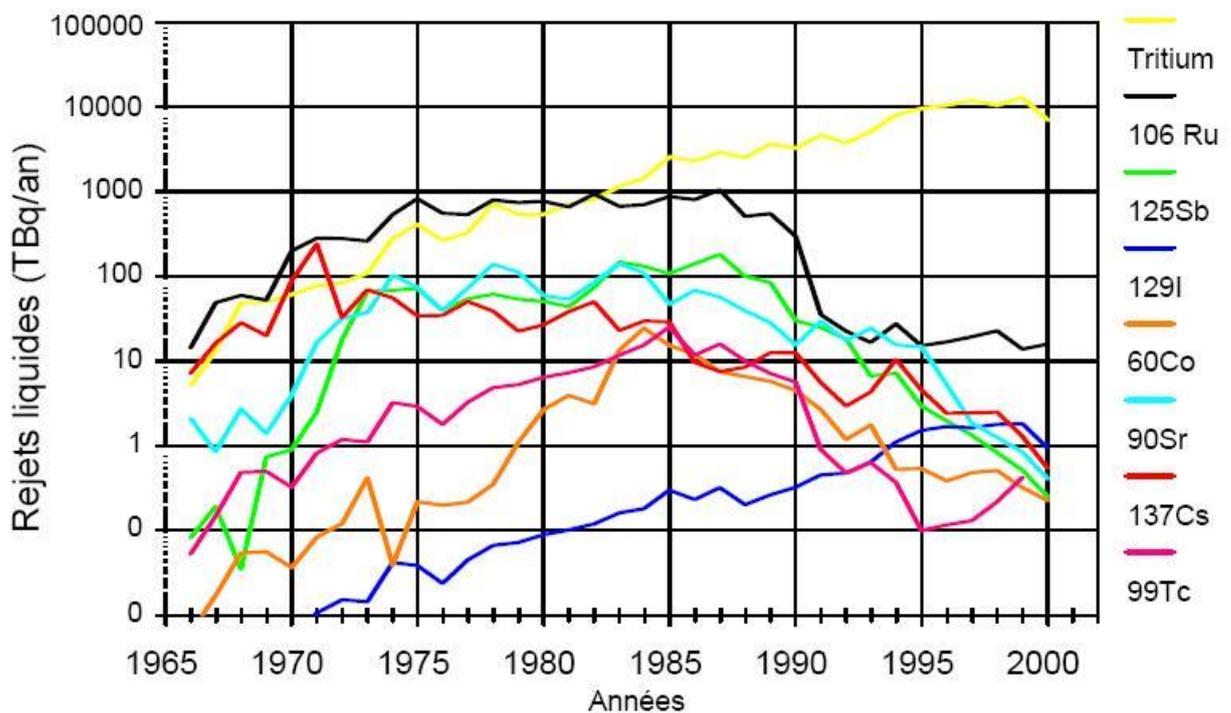


Figure 1 : historique des rejets annuels liquides d'AREVA La Hague.

L'ensemble des quatre centrales nucléaires françaises bordant la mer de la Manche rejettent moins de  $0,3 \cdot 10^{15}$  Bq.an<sup>-1</sup> de tritium liquide dans l'environnement. Par comparaison, les rejets liquides contrôlés de tritium de l'usine de recyclage des combustibles usés d'AREVA s'élèvent à environ  $1 \cdot 10^{16}$  Bq.an<sup>-1</sup>. En 2003, l'usine de recyclage des combustibles usés de Sellafield (Royaume-Uni) a rejeté jusqu'à  $3,73 \cdot 10^{14}$  Bq de tritium liquide en Mer d'Irlande (Commission Européenne 2005). A titre illustratif, la figure 2 cartographie des mesures d'activités volumiques en tritium (<sup>3</sup>H) dans la Manche, la mer Celtique et la mer d'Irlande (Bailly du Bois et Dumas 2005). Les résultats montrent l'influence des rejets des usines de traitement de combustibles usés de La Hague en Manche et de Sellafield en Mer d'Irlande. Au voisinage de l'usine de Sellafield, les activités en <sup>3</sup>H sont presque de 3 ordres de grandeur plus importantes que les activités mesurées dans l'océan Atlantique. Elles sont contenues dans une région de la mer d'Irlande moins propice à une circulation dynamique des masses d'eau.

Les activités en tritium à proximité de la centrale nucléaire de Flamanville et de l'usine AREVA La Hague sont supérieures de seulement un ordre de grandeur à celles rencontrées en pleine océan Atlantique. Ceci illustre le fort pouvoir de dilution et de dispersion des masses d'eau du Raz Blanchard, passage d'un des courants de marée les plus puissants d'Europe, à proximité de l'usine. A l'est du Nord-Cotentin, des activités en tritium relativement plus élevées ont été mesurées selon un gradient de concentration positif allant de l'ouest à l'est de la Manche. Des activités maximales supérieures à  $5000$  Bq.m<sup>-3</sup> ont été mesurées aux abords de la centrale électronucléaire de Paluel (à environ 25 km au nord de Fécamp). Elles peuvent s'expliquer par à une dilution ponctuellement moins efficace des rejets de l'usine d'AREVA qui se déplace vers l'est de la Manche ou par l'influence des centrales nucléaires de

Paluel et Gravelines ou encore de la Seine dont les activités en tritium peuvent prendre des valeurs comprises entre 6000 et 9000 Bq.L<sup>-1</sup> (Bailly du Bois, communication personnelle).

Le débit de dose résultant de ces activités en tritium plus élevées près de Paluel est cependant très faible par rapport au débit de dose lié à l'ensemble de la radioactivité naturelle dans l'eau de mer.

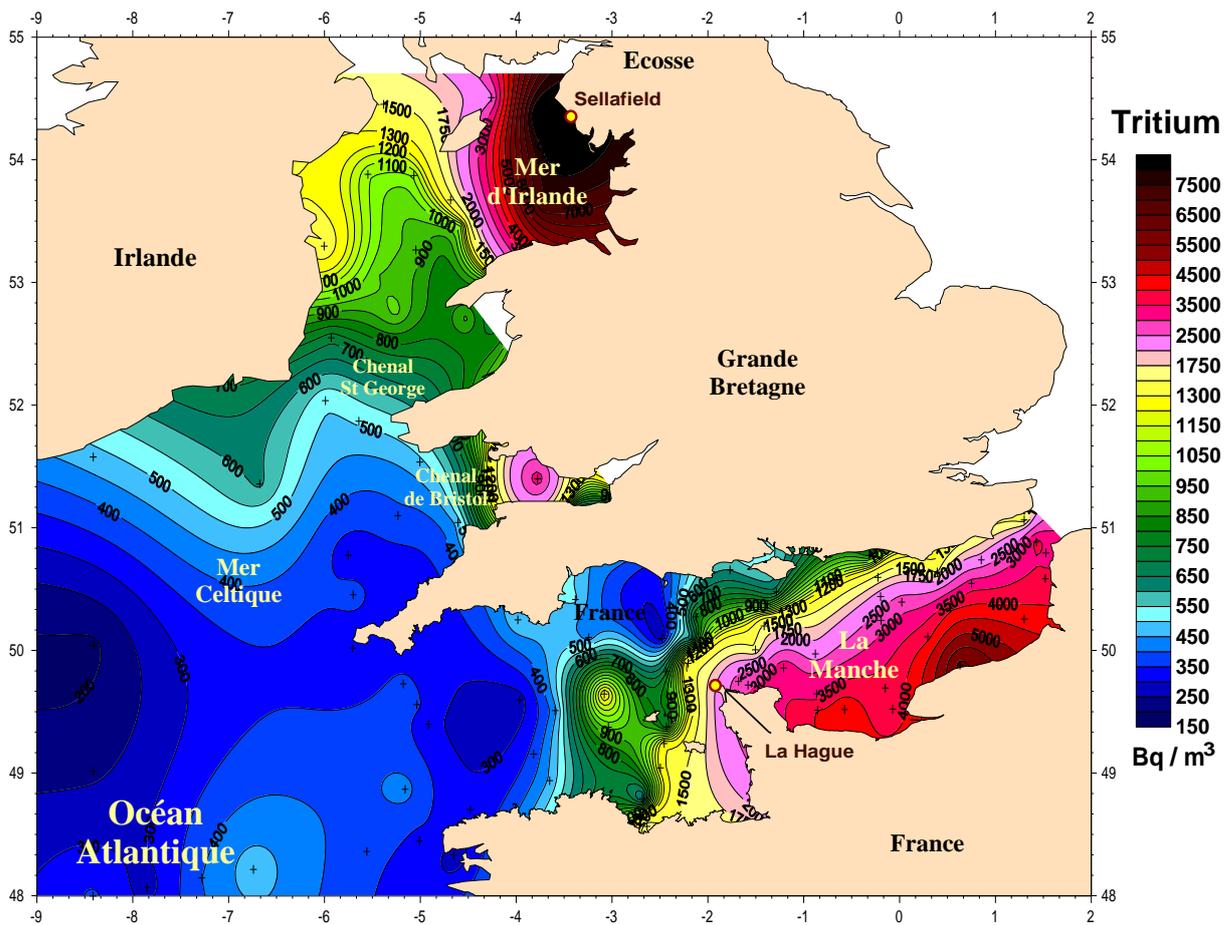


Figure 2 : activités en tritium dans l'eau de mer de la Manche, la mer Celtique et la mer d'Irlande (d'après Bailly du Bois et Dumas 2005).

Même si la tendance actuelle est à la diminution des niveaux de radioactivité rejetés dans l'environnement par les activités humaines, des questions subsistent quant aux conséquences de l'exposition chronique à ces faibles doses additionnelles de radioactivité.

## I.2 RAYONNEMENTS IONISANTS

### I.2.1 RAPPELS ET GENERALITES

#### I.2.1.1 Différents types de rayonnements ionisants et modes d'exposition

Les rayonnements sont dits "ionisants" (RI) lorsqu'ils peuvent extraire des électrons de la matière. Ce phénomène a lieu quand les rayonnements ont une énergie associée supérieure à 10 électronvolts (eV). Lorsqu'un noyau atomique est énergiquement instable, il peut se désintégrer en un noyau plus stable en libérant de l'énergie sous forme de rayonnements. La désexcitation nucléaire conduit à des émissions (particulaires ou électromagnétiques) d'énergies variées.

Les particules ainsi émises peuvent être des particules alpha (noyaux d'hélium) ou des neutrons. Celles-ci n'ont pas de charge électromagnétique contrairement aux particules bêta moins (électron) et bêta plus (positron). Les rayonnements gamma et X sont quant à eux deux types de rayonnements électromagnétiques.

Le pouvoir de pénétration des RI dans la matière diffère selon la nature et l'énergie du rayonnement considéré. On retient généralement que les particules alpha ont une distance de parcours faible dans la matière par opposition aux rayonnements bêta, gamma et neutron.

Par conséquent, plusieurs types d'expositions peuvent être définis selon la nature du rayonnement. Dans le cas d'une irradiation, le corps est exposé à une source externe de RI. Ce type d'exposition concerne principalement les rayonnements gamma et quelques bêta de forte énergie. Dans le cas d'une contamination, le corps est exposé à une source interne de rayonnements. Dans ce cas, des radionucléides entrent dans le corps par ingestion ou inhalation. C'est par le biais d'une contamination interne que les rayonnements alpha peuvent potentiellement impacter la matière vivante.

#### I.2.1.2 Unités de mesures et radioprotection

L'activité nucléaire est le nombre de désintégrations nucléaires par unité de temps. Le Becquerel est une unité d'activité équivalente à 1 désintégration par seconde. Elle peut être rapportée à une unité de masse ( $\text{Bq.kg}^{-1}$ ) ou de volume ( $\text{Bq.L}^{-1}$ ), par exemple.

La période physique ( $T_p$ ) est la "carte d'identité" du radionucléide. Il correspond au temps au bout duquel l'activité du radionucléide a diminué de moitié par rapport à son activité initiale.

La période biologique ( $T_b$ ) est le temps au bout duquel la moitié de la masse d'un radionucléide a été éliminée d'un organisme par des processus uniquement physiologiques.

La dose absorbée est la quantité d'énergie cédée par les RI par unité de masse de matière irradiée. Elle s'exprime en Gray (Gy) et équivaut à l'absorption d'un Joule dans 1 kilogramme de matière homogène.

Le débit de dose est la dose absorbée reçue par unité de temps (Gy par heure, Gy par jour, Gy par an, par exemple).

La dose équivalente ( $H_T$ ) correspond au produit de la dose absorbée (par un organisme, un organe, un tissu) par un facteur de pondération (noté  $W_R$ ) tenant compte de la nature et du niveau d'énergie des RI. Elle prend en considération la nature du rayonnement et la sensibilité des différents organes. Elle s'exprime en Sievert (notée Sv).

Afin d'illustrer cette notion de dose, la [figure 3](#) prend pour exemple les estimations de doses annuelles et les origines des expositions de la population française aux RI.

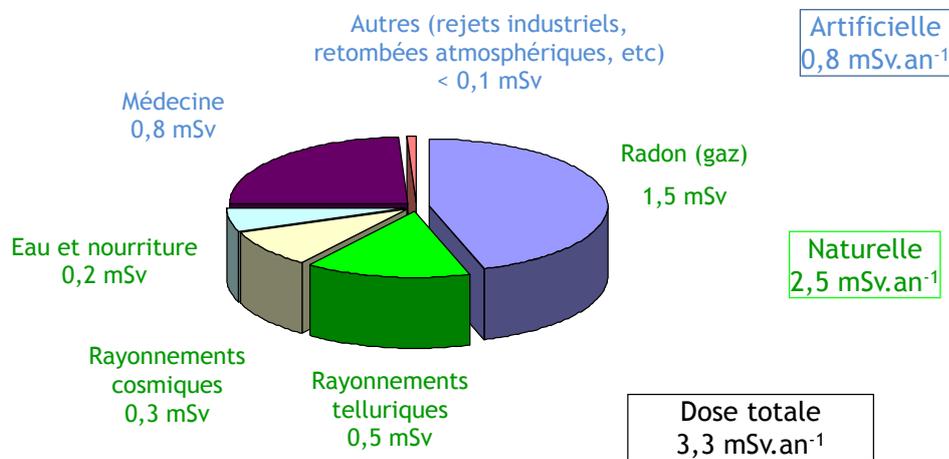


Figure 3 : doses annuelles et origines des expositions de la population française aux RI (Source IRSN 2005).

La dose totale reçue s'élève en moyenne à  $3,3 \text{ mSv.an}^{-1}$ . La radioactivité naturelle explique à elle seule près des trois quarts de la dose reçue et le Radon représente à lui seul  $1,5 \text{ mSv.an}^{-1}$ . La radioactivité artificielle explique près d'un quart de la dose annuelle totale et est très majoritairement due aux traitements médicaux. A titre d'exemple, une seule radiographie du thorax génère une dose de  $0,02 \text{ mSv}$  et un scanner du crâne une dose de  $2,3 \text{ mSv}$ , soit en quelques secondes l'équivalent de la dose annuelle naturelle. Par opposition, l'impact des rejets de l'industrie nucléaire est très faible avec un débit de dose annuel inférieur à  $0,1 \text{ mSv}$ .

## 1.2.2 EFFETS DES R.I. DU NIVEAU SUB-CELLULAIRE AUX CONSEQUENCES MACROSCOPIQUES

### 1.2.2.1 Ionisation et mécanisme d'interaction de la radioactivité avec la matière

Lorsque les RI émis par une source radioactive entrent en contact avec la matière, ils peuvent arracher certains électrons aux atomes et provoquer la perte de leur neutralité électrique. Les atomes se transforment ainsi en ions. Ce phénomène d'ionisation est le principal mécanisme par le biais duquel la radioactivité interagit avec la matière ; d'où l'expression de "rayonnements ionisants" utilisée pour qualifier les rayonnements dus à la radioactivité.

### 1.2.2.2 Action des radiations sur la cellule et ses composants

Lorsque les molécules sont ionisées et excitées, elles forment des ions à radical libre (*radical peroxyde*  $ROO^\circ$ , entre autres) très réactifs du fait de la présence d'électrons non appariés. Elles vont alors réagir entre elles et avec les molécules voisines, ce qui va entraîner une perturbation de l'état chimique des constituants cellulaires. Les constituants cellulaires vont être atteints :

- soit directement par les rayonnements,
- soit indirectement, *via* les radicaux libres issus de l'ionisation directe des constituants cellulaires (figure 4).

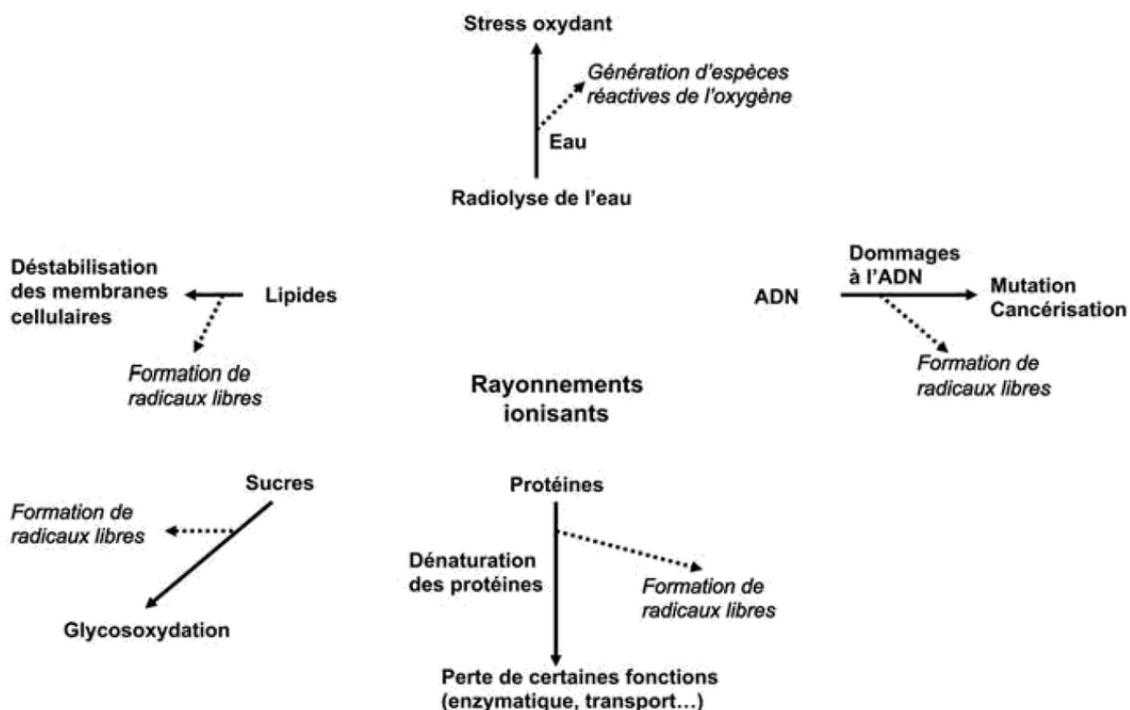


Figure 4 : effets des rayonnements ionisants au niveau subcellulaire (d'après Amiard 2011).

Les effets indirects correspondent principalement à une attaque des macromolécules par les radicaux libres issus de la radiolyse de l'eau, constituant majoritaire des cellules. La radiolyse de l'eau génère des espèces réactives à l'oxygène (ERO). Parmi ces ERO, le radical  $\text{OH}^\bullet$ , l'anion superoxyde  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$  et le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  sont particulièrement réactifs du fait de leur fort pouvoir oxydant.

Que ce soit par effet direct ou indirect, les radiations ionisantes perturbent la structure des macromolécules donc perturbent les fonctions de la vie cellulaire. Les conséquences des radiations sur l'organisme dépendent de la dose absorbée, du temps d'exposition, du type de rayonnement et de la nature des cellules irradiées.

La modification radio-induite de la structure des protéines conduit à une altération de leur fonction (enzymatique, de transport, structurale, hormonale, etc.). Ces modifications radio-induites entraînent des perturbations de la physiologie cellulaire et peuvent contribuer au processus de létalité. Les peroxydations lipidiques radio-induites sont quant à elles à l'origine d'une diminution de la fluidité membranaire ayant pour conséquence une altération des propriétés du système membranaire de la cellule. Les ERO peuvent également attaquer les mucopolysaccharides notamment les protéoglycanes du cartilage. Par ailleurs, le glucose peut être oxydé et libérer des cétoaldéhydes,  $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{OH}^\bullet$ . Ce phénomène de glycosoxydation est particulièrement dommageable chez les sujets diabétiques (Favier 2003).

L'endommagement de la structure de l'ADN par les RI peut se faire directement par un dépôt d'énergie ou indirectement par le biais de la radiolyse de l'eau et la génération de radicaux libres d'oxygène (figure 5).

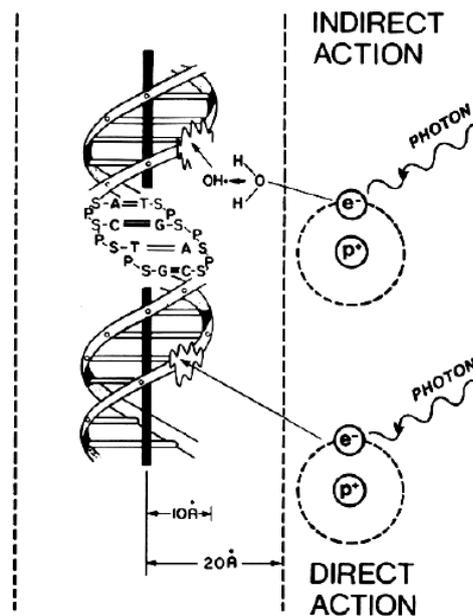


Figure 5 : effets direct ou indirect des RI sur l'ADN.

Les lésions induites peuvent être de différentes natures :

- des cassures simple brin (CSB), considérées comme non-létales car réparables par les mécanismes de réparation grâce à des ligases et des polymérases. Le taux de formation de CSB varie linéairement avec la dose et est plus faible lorsque le transfert linéique d'énergie (TEL) du rayonnement augmente (Tubiana *et al.* 1986).
- des pontages protéines/ADN. L'irradiation des cellules provoque la formation de liaisons covalentes supplémentaires entre l'ADN et les histones ou d'autres protéines nucléaires (Oleinick *et al.* 1986). A faible dose, l'irradiation de cellules de mammifères provoque quatre fois plus de pontages ADN-protéines que de cassures doubles brins (Barker *et al.* 2005). Des mécanismes de réparation, notamment par excision de nucléotides, prennent en charge ce type de dommage dans les cellules.
- les altérations de bases. Elles sont non létales mais peuvent être à l'origine d'une mutation en cas de non-réparation ou de réparation fautive. Ces lésions sont réparées par des mécanismes d'excision-resynthèse faisant intervenir des endonucléases, glycosylases, polymérases et ligases.
- des cassures double brin (CDB), ou cassures des deux chaînes d'ADN, sont considérées comme dommageables et sont létales pour la cellule si elles ne sont pas ou mal réparées. Des erreurs dans la réparation, en plus de générer des mutations par délétion ou insertion, peuvent également provoquer des réarrangements chromosomiques aberrants (Varga *et Aplan* 2005) et une instabilité génomique (Elliot *et Jasin* 2002, Thompson *et Schild* 2002).
- les sites à dommages multiples (MDS, *Multiple Damaged Site*) dont le concept a été introduit par Ward (1988), sont considérés comme des lésions graves pour la cellule. Ils se forment lorsqu'il y a combinaison de deux ou plusieurs dommages sur une courte distance (1-4 nm). La plus simple correspond à une CDB (deux CSB sur des brins opposés). Au contraire des lésions isolées qui sont généralement réparées efficacement, la réparation d'une lésion à l'intérieur d'un site à dommages multiples est nettement moins efficace (Wallace 1997). En outre, Blaisdell *et Wallace* (2001) ont montré que les MDS créés chez *Escherichia coli* par irradiation sont convertis en CDB par la glycosylase Fpg lors du processus de réparation par excision de base.

### 1.2.2.3 Effets chimique et radiologique

Les radionucléides présentent deux types de toxicité :

- une éventuelle toxicité chimique, liée à la nature de l'élément et,
- une toxicité radiologique, due à l'effet physique du rayonnement ionisant.

Au niveau subcellulaire, il y a convergence des deux types de toxicité car les mécanismes de défense mis en jeu sont communs. En effet, les dommages provoqués par les polluants chimiques aussi divers soient-ils, sont liés à l'apparition d'ERO, de phénomènes de dénaturation des composants cellulaires, d'altération de l'ADN, etc. et déclenchent les mêmes processus de réparation et de détoxification que les

radiations. En situation de contamination interne par un radionucléide, il sera donc difficile de différencier l'origine chimique ou radiologique des effets observés. Pour distinguer ces deux types d'effets, il est nécessaire de tester, parallèlement au radionucléide, les effets de son isotope stable (toxicité chimique seule) ou, lorsque cela n'est pas envisageable, les effets d'une exposition externe aux RI (c'est-à-dire sans contamination de l'organisme) à un débit de dose similaire.

#### *1.2.2.4 Effets stochastiques et effets déterministes*

Les manifestations pathologiques d'une radioexposition sont habituellement classées en deux groupes distincts :

- les effets déterministes, prévisibles et quantifiables, car il existe une relation quantitative entre la dose et l'effet observé et,
- les effets stochastiques, dont la quantification est statistique à cause de leur caractère aléatoire.

Les effets déterministes surviennent peu de temps après l'irradiation (de quelques heures à quelques semaines) et apparaissent de manière obligatoire à partir d'une dose seuil. Au-delà du seuil, la gravité de l'effet est proportionnelle à la dose. Il peut être réversible selon l'importance de la dose. Les effets sont différents selon que l'irradiation est globale (délivrée à l'ensemble de l'organisme) ou partielle (localisée à une région de l'organisme). Ces types d'effets sont plutôt bien décrits chez les modèles de vertébrés supérieurs en réponse à de fortes doses d'irradiation.

Pour exemple, une radioexposition globale aiguë du corps entier à une dose absorbée de 1 à 2 Gy engendre chez l'humain des asthénies, nausées, vomissements 3 à 6 heures après l'exposition. Une dose absorbée supérieure à 10 Gy entraîne de lourdes lésions cérébrales s'accompagnant d'un coma puis de la mort en 14-36 heures. Une radioexposition localisée à une dose de 2 Gy chez l'homme provoque une stérilité temporaire de 1 à 2 ans alors qu'une dose de 5-6 Gy occasionne une stérilité permanente.

Les effets stochastiques sont des effets généralement retardés, visibles plusieurs années voire dizaines d'années après le début de l'exposition. Ils présentent une évolution lente et à caractère aléatoire. Ils sont non spécifiques et le plus souvent non réversibles. Dans ce cas, c'est leur probabilité d'apparition, et non leur gravité, qui est fonction de la dose reçue. Ces effets résultent de mutations engendrées par des lésions non ou mal réparées au niveau des molécules de l'ADN.

Quand une mutation survient au sein d'une cellule somatique, cette dernière peut potentiellement être à l'origine d'un cancer radio-induit. Lorsque la mutation touche une cellule germinale, elle peut de surcroît se transmettre et s'exprimer sous la forme d'anomalies dans la descendance (non irradiée) du parent irradié.

### **1.2.3 LE NOUVEAU CONCEPT DE LA RADIOPROTECTION**

Au cours des 50 dernières années, les normes appliquées par les instances internationales en charge de la protection de l'environnement contre les rayonnements ionisants ont évolué. Dans les années 70, ces instances considéraient que si les niveaux d'exposition dans l'environnement étaient sans danger pour

l'homme, alors l'environnement était protégé (CIPR 1977, Whicker et Bedford 1995). Depuis la fin du 20<sup>ème</sup> siècle, l'absence de démonstration scientifique de cette hypothèse et la montée en puissance des préoccupations environnementales ont conduit à remettre en question cette affirmation (CIPR 1991, Pentreath 1998, Whicker et Bedford 1995). Plusieurs organisations internationales ont tenté de déterminer des limites telles que des "valeurs estimées sans effet observé" (IAEA 1976, NCRP 1991, Comité Scientifique des Nations Unies pour l'Etude des Effets des Rayonnements Ionisants UNSCEAR 1996). D'après ces travaux, un débit de dose inférieur à 400  $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  ne présenterait pas de danger pour la faune et flore terrestres et aquatiques en situation d'exposition chronique (IAEA 1992). Cependant, plusieurs études récentes suggèrent que cette limite nécessite d'être confirmée. En effet, une augmentation significative du nombre de micronoyaux et de cassures à l'ADN a été observée chez des larves de moules *Mytilus edulis* exposées pendant 4 jours à de l'eau de mer contaminée au tritium ( $^3\text{H}$ ) à un débit de dose de 12,5  $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  (Jha et al. 2005). De même, des larves de *M. edulis* exposées pendant 17 à 23h au tritium à un débit de dose minimum de 1,25  $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$  ont présenté une augmentation des dommages génotoxiques (échanges de chromatides sœurs, aberrations chromosomiques) et cytotoxiques (baisse de l'indice de prolifération cellulaire) accompagnée d'une augmentation du nombre d'anomalies développementales (Hagger et al. 2005). Par conséquent, le débit de dose théorique de 10  $\text{mGy}\cdot\text{j}^{-1}$  proposé par l'UNSCEAR comme valeur de référence est vraisemblablement à revoir dans la mesure où les techniques de détection plus fines au niveau subcellulaire permettent de mettre en évidence des effets radio-induits à des débits de doses plus faibles.

#### ***1.2.4 LA PROBLEMATIQUE DES FAIBLES DOSES***

Le domaine de dose qui est à l'origine de la relation linéaire sans seuil (RLSS) de la Commission Internationale de Protection contre les Radiations (CIPR) correspond pour l'être humain à des doses supérieures à 100 mSv pour les adultes et 50 mSv pour les enfants (figure 6). Pour des doses plus faibles, la CIPR retient le principe d'une extrapolation linéaire. Le domaine de l'irradiation naturelle est situé entre 1 et 10 mSv. Actuellement, la controverse sur les effets des faibles doses de RI et la RLSS est encore vive et ne relève pas uniquement de raisons scientifiques mais aussi de considérations sociétales et économiques.

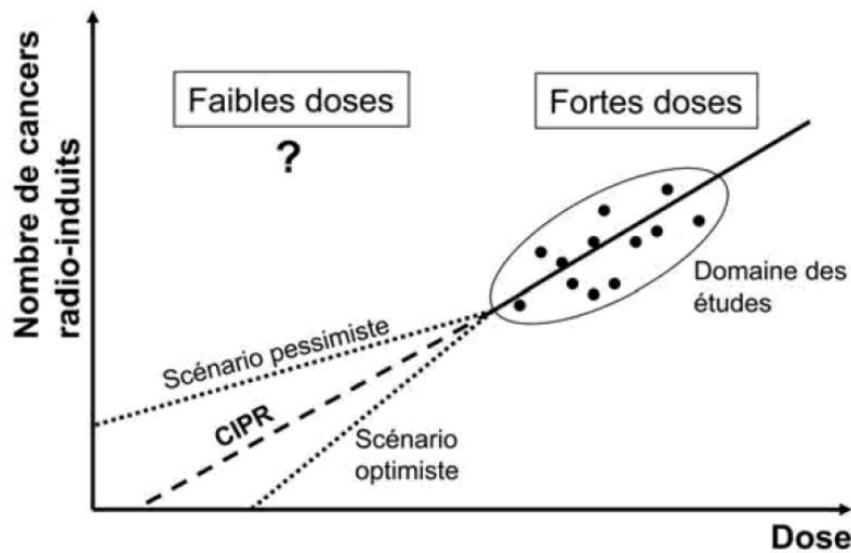


Figure 6 : schéma illustrant le principe de l'extrapolation à l'aide d'une relation dose-effet linéaire sans seuil.

Quoiqu'il en soit, depuis de nombreuses années, la démonstration de l'existence de mécanismes de préservation du génome (essentiellement : réparation de l'ADN et mort programmée des cellules dont l'ADN a été altéré) (Moustacchi 2000, Christmann *et al.* 2003) a conduit à la remise en cause de la validité de ce principe (Trott et Rosemann 1999, Tubiana *et al.* 2007). En outre, des études montrent que l'efficacité par unité de dose des processus de réparation et/ou de mort cellulaire dirigée n'est pas constante selon la dose et le débit de dose. Ces systèmes de réparation de l'ADN sont bien plus efficaces à faibles débits de dose qu'à fort débit de dose (Collis *et al.* 2004, Rothkamm et Löbrück 2003). Les recherches conduites au niveau des faibles doses ont été essentiellement focalisées sur le risque lié à la pathologie cancéreuse (issues de l'étude épidémiologique des populations irradiées à Hiroshima et à Nagasaki en 1944).

Aujourd'hui, il est clair que l'extrapolation des connaissances sur les effets des fortes doses vers les faibles doses est discutable. Les effets d'expositions chroniques à de faibles doses de RI restent encore mal compris. Outre les effets biologiques sous forme de cancers et mutations radioinduits, il existe un manque de connaissance avéré quant aux autres indicateurs biologiques pouvant servir à évaluer de manière précoce et sensible les effets de ces faibles doses.

Dans un but de protection de l'environnement marin, il est actuellement crucial de comprendre les effets chroniques de tels niveaux d'exposition en particulier chez des modèles biologiques d'intérêt tel que les invertébrés marins (Dallas *et al.* 2012).

## I.3 STRATEGIE, CHOIX ET OBJECTIFS

Les océans recouvrent plus de 70% de la surface de la Terre. Ils correspondent au dernier grand compartiment dans lequel se déversent les contaminants générés par l'homme. Par conséquent, les organismes aquatiques sont susceptibles d'être exposés à différents types de contaminants, dont des radionucléides qui viennent s'ajouter à la radioactivité naturelle. Leurs activités sont en général plus importantes dans les rejets liquides que dans les rejets atmosphériques ([Commission Européenne 2005](#)).

Les invertébrés rassemblent environ 90% des espèces vivantes de notre planète. De plus, les invertébrés aquatiques sont des "espèces-clés" dans beaucoup d'écosystèmes ([Lonsdale et al. 2009](#)). Ces organismes constituent une importante source de nourriture pour l'homme ([Barnes et Rawlinson 2009](#), [Ren et al. 2010](#)) et sont couramment utilisés comme modèles biologiques lors de tests toxicologiques ([Depledge 1998](#)). Au cours de ces travaux de thèse, le modèle biologique qui a été retenu est l'huître japonaise *Crassostrea gigas*.

### I.3.1 PRESENTATION DE L'HUITRE JAPONAISE *CRASSOSTREA GIGAS*

#### I.3.1.1 Contexte historique

L'huître japonaise, *Crassostrea gigas*, également nommée huître du Pacifique ou huître creuse, est une espèce à forte valeur ajoutée produite massivement en aquaculture. Originaire du Japon, elle a été introduite dans un but commercial en France en 1966 mais également dans de nombreuses régions du globe comme aux Etats-Unis, Canada, Afrique du Sud, Chine, Australie et Nouvelle-Zélande. Elle a été introduite en France pour faire face aux mortalités importantes des deux espèces endémiques alors cultivées, l'huître portugaise *Crassostrea angulata* et l'huître plate *Ostrea edulis*, décimées par des épizooties. Des programmes d'introduction telle que l'opération "RESUR" avaient pour but de prélever des huîtres en baie de Vancouver afin de repeupler les parcs ostréicoles français. Des populations sauvages se sont rapidement implantées dans les bassins de Marennes-Oléron et d'Arcachon puis progressivement étendues dans les autres régions comme la Bretagne ou le Cotentin.

#### I.3.1.2 Production

Sa croissance rapide, sa résistance aux fortes turbidités et aux variations de température en ont fait un produit d'élevage particulièrement intéressant. Aujourd'hui, la France est le 4<sup>ème</sup> pays producteur mondial d'huîtres japonaises après la Chine, le Japon et la Corée et le premier producteur européen. La production de *Crassostrea gigas* équivaut à elle seule à 98% de la production ostréicole française, soit 128 000 tonnes en 2003 ([FAO 2005](#)). La Basse-Normandie est la 2<sup>ème</sup> région productrice d'huîtres japonaises en France avec 21,1% (27 000 t) de la production nationale après le bassin de Marennes-Oléron qui en produit 29,7% (38 000 t). La production ostréicole en Manche repose essentiellement sur l'élevage larvaire réalisé en éclosérie afin d'alimenter les parcs à huîtres en juvéniles pour le

grossissement. La Société Atlantique de Mariculture (SAtMar), située à Gatteville dans le département de la Manche, est une importante installation qui produit ces stades juvéniles. Elle est située à plusieurs dizaines de kilomètres du point de rejet de l'usine AREVA NC.

### 1.3.1.3 Classification, habitat et biologie

L'embranchement des mollusques rassemble plus de 100 000 espèces. Il regroupe des animaux métazoaires (pluricellulaires), protostomiens (le blastopore évolue en bouche), triploblastiques (l'embryon s'organise en trois feuillettes), coelomates (présence d'une cavité coelomique) et hyponeuriens (système nerveux ventral) à symétrie bilatérale. L'espèce de l'huître japonaise *Crassostrea gigas* appartient à la classe des Bivalves, caractérisée par une coquille à deux valves articulées par une charnière. Elle fait partie de l'ordre des Filibranchia, de la super-famille des Ostreoidae, de la famille des Ostreidae, du genre *Crassostrea*.

Les huîtres peuvent coloniser les zones intertidales et infralittorales ainsi que les zones estuariennes. Elles sont donc particulièrement adaptées aux variations de température (eurytherme), de salinité (euryhaline), aux variations de quantité et qualité de nourriture et à l'exondation. L'adulte vit fixé sur un substrat dur. Ce sont des organismes filtreurs microphages qui se nourrissent principalement de phytoplancton, phytobenthos, ciliés, flagellés, détritiques dont la taille est comprise entre 2 et 8 µm. Un individu adulte filtre plusieurs litres d'eau de mer chaque heure et ce mode de vie expose particulièrement ces organismes aux polluants présents dans le milieu sous forme dissoute. Ainsi les huîtres sont connues pour leur pouvoir d'accumulation des contaminants biodisponibles (Gagnaire 2005). En raison de sa sédentarité et de sa physiologie relativement bien connue, elle fait partie des espèces bioindicatrices pour la surveillance des écosystèmes marins (Oubella 1996).

Les sexes sont le plus souvent séparés et l'huître a tendance à présenter un hermaphrodisme successif protandrique (Buroker 1983). Dans l'environnement, plusieurs phases caractérisent le cycle de reproduction saisonnier de *Crassostrea gigas*. En Normandie, la première phase dite de "repos sexuel" a lieu en automne-hiver mais elle est très peu marquée, voire quasi-inexistante en Baie des Veys (Costil et al. 2005). C'est pendant cette phase que peut avoir lieu le changement de sexe. La deuxième phase se caractérise par la reprise de la gamétogenèse à partir des cellules germinales des tubules gonadiques au moment où le tissu de réserve est bien développé et riche en glycogène (Berthelin et al. 2000). Au printemps, les conditions environnementales favorables stimulent la gamétogenèse. Cette troisième phase aboutit à la maturité sexuelle des huîtres où les gonades peuvent représenter près de 50% de la masse viscérale (4<sup>ème</sup> phase). La ponte (5<sup>ème</sup> phase) a lieu de la fin du printemps à l'été en allant du sud vers le nord. La fécondation est externe et est caractérisée par la libération des ovocytes et des spermatozoïdes dans le milieu (Figure 7).

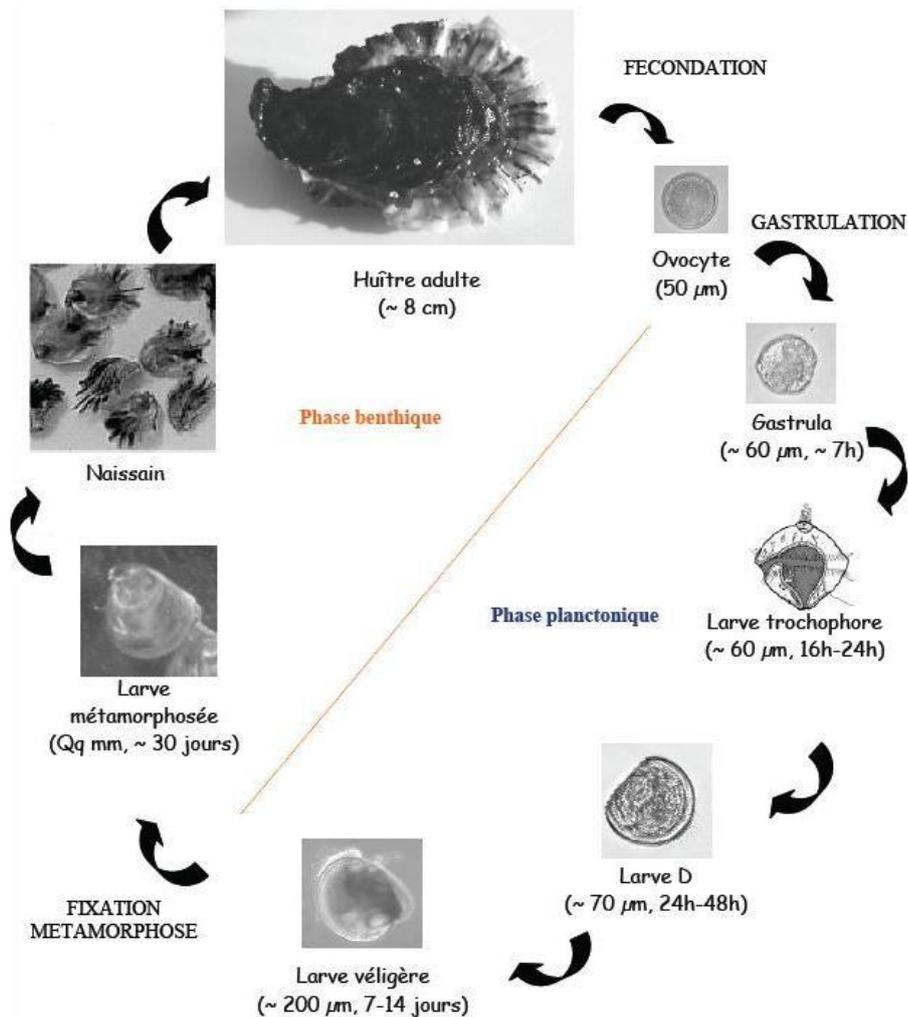


Figure 7 : cycle de vie de *Crassostrea gigas* (d'après Lejart 2009 selon Fabioux 2004).

L'embryon se développe en passant par les stades de morula, blastula, gastrula puis par la larve trochophore caractéristique des Trochozoaires. Une journée après la fécondation, cette dernière se différencie en larve D puis en larve véligère qui possède une coquille et un velum cilié assurant les rôles de locomotion et de nutrition. A ce stade, la larve est nageuse mais vers le 20<sup>ème</sup> jour, elle se transforme en larve pédivéligère dont le pied lui permet de se fixer au substrat. Après fixation, la larve se métamorphose en naissain : le pied et le velum se résorbent, le manteau et les branchies apparaissent et la calcification de la coquille s'intensifie. Le naissain ainsi formé s'apparente à l'adulte à la différence qu'il ne possède pas d'organe sexuel mature.

Le cycle biologique de l'huître japonaise est désormais bien connu et il est possible de le reproduire en laboratoire ou en éclosérie où une quantité importante de jeunes est produite chaque année. Ainsi, la SATMar fournit aux ostréiculteurs du naissain calibré en taille tout au long de l'année en conditionnant les géniteurs grâce à un cycle artificiel de température.

### 1.3.2 CHOIX DU MODELE BIOLOGIQUE

La sensibilité des organismes aux effets létaux des RI est très variable. Une classification générale a été mise au point d'après le volume chromosomique interphase des cellules sensibles (UNSCEAR 1996, IAEA 1997). Ces résultats et d'autres résultats d'irradiations expérimentales montrent que les mammifères sont les plus sensibles, suivis des oiseaux, des poissons, des reptiles et des insectes (figure 8). Les espèces les moins sensibles aux doses aiguës de RI sont les mousses, les lichens, les algues, les micro-organismes tels que les bactéries et les virus mais également le groupe des mollusques.

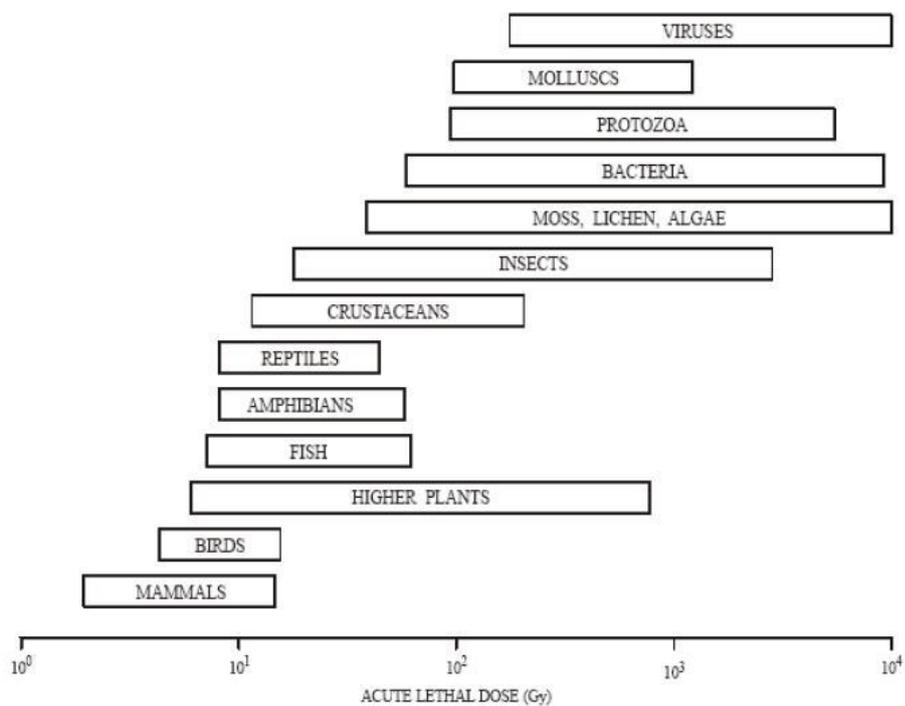


Figure 8 : approximations de doses létales pour différents groupes taxonomiques et indication comparative de leur radiosensibilité (UNSCEAR 1996).

Ces données de l'UNSCEAR suggèrent que le taxon des mollusques rassemble des espèces particulièrement radiorésistantes au même titre que certaines bactéries ou insectes. Ce groupe se distingue ainsi des groupes de vertébrés plus radiosensibles.

D'un point de vue écotoxicologique, les organismes disposant d'une relative résistance à certains agents de stress présentent de réels avantages. Ils peuvent être exposés à des niveaux somme toute élevés sans déclarer de mortalité ce qui donne à l'expérimentateur l'accès à l'étude de paramètres physiologiques pouvant apporter des informations sur les mécanismes moléculaires/cellulaires impliqués dans la réponse de l'organisme au stress.

De précédentes études ont porté sur les effets potentiels des RI sur l'huître *Crassostrea gigas*. [Emilie Farcy \(Thèse 2006\)](#) a étudié l'impact radiologique potentiel de radionucléides rejetés par les installations nucléaires dans le Nord-Cotentin sur l'expression transcriptionnelle de gènes codant pour des marqueurs de stress susceptibles de témoigner d'un éventuel effet d'une irradiation chronique bas niveau. L'approche utilisée combinait des études de terrain avec des expérimentations en milieu contrôlé. Les mesures réalisées sur des huîtres prélevées dans leur environnement ont révélé que les variations de ces marqueurs ne semblent pas être influencées par les rejets de l'industrie nucléaire. En laboratoire, l'exposition d'huîtres à des concentrations en radionucléides plus élevées que dans l'environnement a permis de mettre en évidence une induction transcriptionnelle de gènes codant pour des métallothionéines (MT) et le transporteur MXR en situation d'exposition chronique ([Farcy et al. 2011](#)). L'induction transcriptionnelle de ces deux gènes a été confirmée en réponse à de fortes doses d'irradiation aigue. Il restait néanmoins des interrogations quant aux conséquences que pouvaient avoir de tels effets à des niveaux d'organisation biologique supérieurs.

L'une des perspectives proposées par [E. Farcy \(2006\)](#) était d'étudier des stades précoces de développement de l'huître creuse car ils sont susceptibles d'être plus sensibles que les adultes. Une telle approche permet la mise en relation d'observations obtenues au niveau moléculaire (ARNm, dosages enzymatiques, génotoxicité) et de mesures à un niveau plus intégré (anomalies de développement, croissance).

Les stades précoces de développement de l'huître creuse, et plus particulièrement les stades de vie depuis la larves D âgée de 24 heures post-fécondation jusqu'aux naissains âgés de quelques semaines, présentent plusieurs avantages :

1) les stades précoces de développement sont susceptibles d'être plus sensibles que les adultes.

En effet, les stades précoces de développement sont métaboliquement plus actifs et présentent un *turnover* cellulaire plus rapide par rapport aux stades plus avancés ([Jha et al. 1996](#)).

2) les stades précoces de développement sont de toute petite taille par rapport aux adultes.

Par conséquent, il est possible de miniaturiser les dispositifs d'élevage en laboratoire ce qui est critique lorsque sont testés les effets de certains produits toxiques dont les volumes d'effluents doivent être minimisés avant d'être traités.

Leur taille extrêmement petite rend cependant délicate leur manipulation ; c'est certainement l'une des raisons pour lesquelles les juvéniles sont moins étudiés que les stades adultes, en plus du fait que la séparation de la chair et de la coquille (donc l'accès aux différents tissus et organes) est difficile.

3) les stades précoces de développement grandissent très rapidement.

Ils présentent un rythme de divisions cellulaires intense. La croissance de leur coquille peut être appréciée sur un pas de temps relativement cours (de l'ordre du jour) alors que chez les adultes, elle n'est ressentie qu'après une longue période (mois).

4) les stades précoces de développement peuvent être exposés aux contaminants dès les premiers instants de leur vie.

C'est une problématique majeure des expériences en laboratoire réalisées dans cette thèse. Elle pose la question du temps nécessaire à l'expérimentation pour rester pertinent en terme de chronicité d'exposition. Les espèces marines vivent pour la plupart plusieurs années dans l'environnement naturel et peuvent être exposées toute leur vie aux contaminants. Ces longues périodes de temps sont difficilement compatibles avec les conditions d'exposition en laboratoire. Or, l'utilisation des stades précoces de développement permet d'exposer les animaux tout au long de leur vie, depuis un âge précoce et sur une période de temps raisonnable.

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons tiré avantage de la précocité de développement des juvéniles de *Crassostrea gigas* lors de l'élaboration de nos protocoles expérimentaux pour l'étude des effets chroniques de contaminants, dont les radionucléides. La plupart des expérimentations sur les stades précoces de développement de *Crassostrea gigas* étudient des paramètres biologiques tels que le développement embryo-larvaire ou la métamorphose. Ces tests ont lieu après des périodes d'exposition de seulement quelques dizaines d'heures (Mai *et al.* 2012, Mottier *et al.* 2012). A titre d'exemple, les tests de métamorphose, de même que le test AFNOR XP-T90-382 (2009) couramment utilisé en écotoxicologie pour évaluer les effets de matrices potentiellement contaminées (eau de mer, éluviat sédimentaire) sur le développement embryo-larvaire de larves d'huître, sont des tests se déroulant sur des périodes de temps inférieures à 48 heures.

L'un des défis de ces travaux de thèse était d'envisager les stades précoces de développement de *Crassostrea gigas* comme modèle biologique pour la réalisation d'exposition en milieu contrôlé couvrant au minimum les deux premières semaines de vie de l'animal.

### **1.3.3 CHOIX DES PARAMETRES BIOLOGIQUES MOLECULAIRES/CELLULAIRES ET INTEGRES**

En écotoxicologie, la compréhension des effets des contaminants sur les êtres vivants en général, et sur les stades précoces de développement de l'huître creuse en particulier, requiert l'observation de paramètres biologiques à différents niveaux organisationnels (Figure 9). Ces paramètres doivent d'une part témoigner de l'état de santé général des animaux (réponse globale de l'organisme) mais aussi attester d'effets plus subtils pouvant passer inaperçus à un niveau d'organisation biologique supérieur (perturbations biochimiques à l'échelle moléculaire, cellulaire). Ces changements biologiques peuvent survenir de manière décalée dans le temps. C'est pourquoi il est indispensable de privilégier des temps d'expérimentation relativement importants lors de l'évaluation de ces effets en laboratoire.

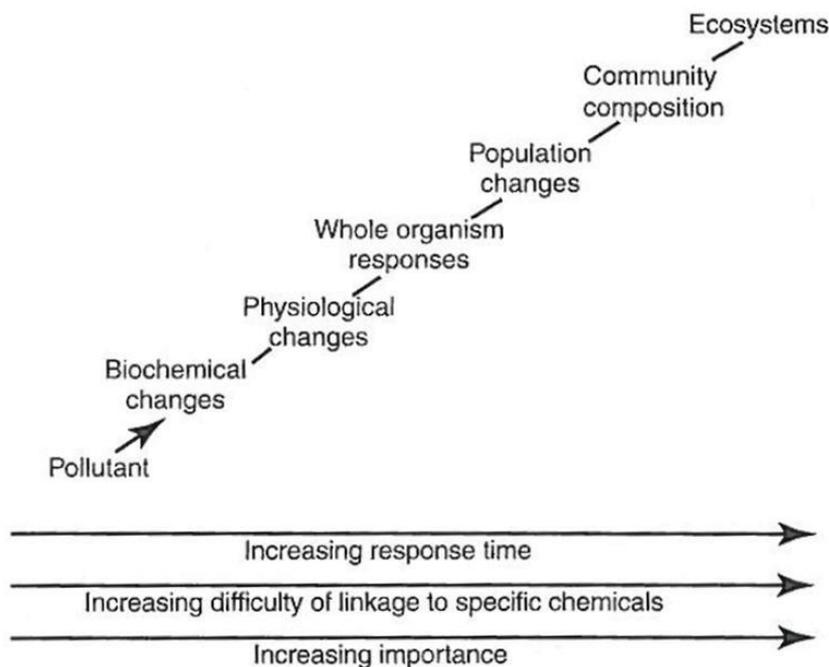


Figure 9 : relation schématique des liens entre les réponses à différents niveaux organisationnels (d'après Walker *et al.* 2006).

Ce type d'approche multiparamétrique permet d'apporter des informations quant aux mécanismes impliqués dans la réponse de l'organisme vis-à-vis du stress étudié. Il permet également d'émettre des hypothèses quant aux conséquences du contaminant à l'échelle populationnelle et son impact potentiel sur l'écosystème.

Plusieurs cibles et paramètres biologiques ont été retenus pour l'étude des effets chroniques de faibles doses de contaminants industriels en Manche (dont les radionucléides) sur les stades précoces de développement de l'huître creuse :

- un paramètre intégré, la croissance des larves et naissains d'huîtres, a été suivi au cours du temps. Elle a été considérée parallèlement aux mesures de mortalité.

- la mesure d'activités enzymatiques :

- Les activités de type Phénoloxydase,

- L'activité spécifique Glutathion S-transférase,

- L'activité des enzymes antioxydantes.

- l'expression transcriptionnelle de 9 gènes ciblés impliqués dans la réponse des cellules au stress (Farcy 2006) :

- Protéines chaperonnes - hsp70, hsp90, hsc72.

- Régulation du cycle cellulaire - p53.

- Mécanismes de détoxification cellulaire - Gène de résistance aux xénobiotiques (MXR)

Cytochrome P450,

Glutathion-S-transférase.

Régulation du stress oxydatif - Superoxyde dismutase,

Métallothionéine.

- la mesure du niveau de dommages à l'ADN par le test des comètes sur les hémocytes de jeunes huîtres. En effet, compte tenu des contraintes techniques liées aux prélèvements et à la séparation des cellules, cette approche a été menée sur des huîtres âgées de deux ans.

### ***1.3.4 OBJECTIFS***

Le premier objectif de ces travaux de thèse était de développer et valider, à l'aide de contaminants radioactifs, un modèle biologique marin et un protocole expérimental adapté à l'étude en laboratoire des effets chroniques des rayonnements ionisants. Les stades précoces de développement de l'huître creuse ont ainsi été retenus du fait de leur nombreux avantages pour réaliser des expositions chroniques en laboratoire.

Le deuxième objectif relève du choix des paramètres biologiques étudiés. Ils doivent être potentiellement sujets à une modification par les RI et couvrir différents niveaux d'organisation biologiques depuis des niveaux moléculaires jusqu'à l'organisme dans son ensemble. Pour ce faire, il a fallu développer des techniques permettant de suivre au cours du temps la croissance d'un grand nombre d'individus.

Dans un troisième temps, l'objectif était de tenter d'établir une relation quantitative entre le niveau d'exposition chronique aux radionucléides et des effets délétères pour un organisme marin modèle. Dans le cas d'une réponse positive, la question est posée quant à l'existence d'un effet à un niveau d'organisation biologique différent.

## **I.4 DEMARCHE EXPERIMENTALE**

La [figure 10](#) récapitule la stratégie déployée au cours de ses travaux de thèse sur l'exposition chronique des stades précoces de développement de l'huître japonaise *Crassostrea gigas* aux contaminants industriels en Manche. L'accent a été mis sur l'étude conjointe de marqueurs biologiques intégrés et moléculaires.

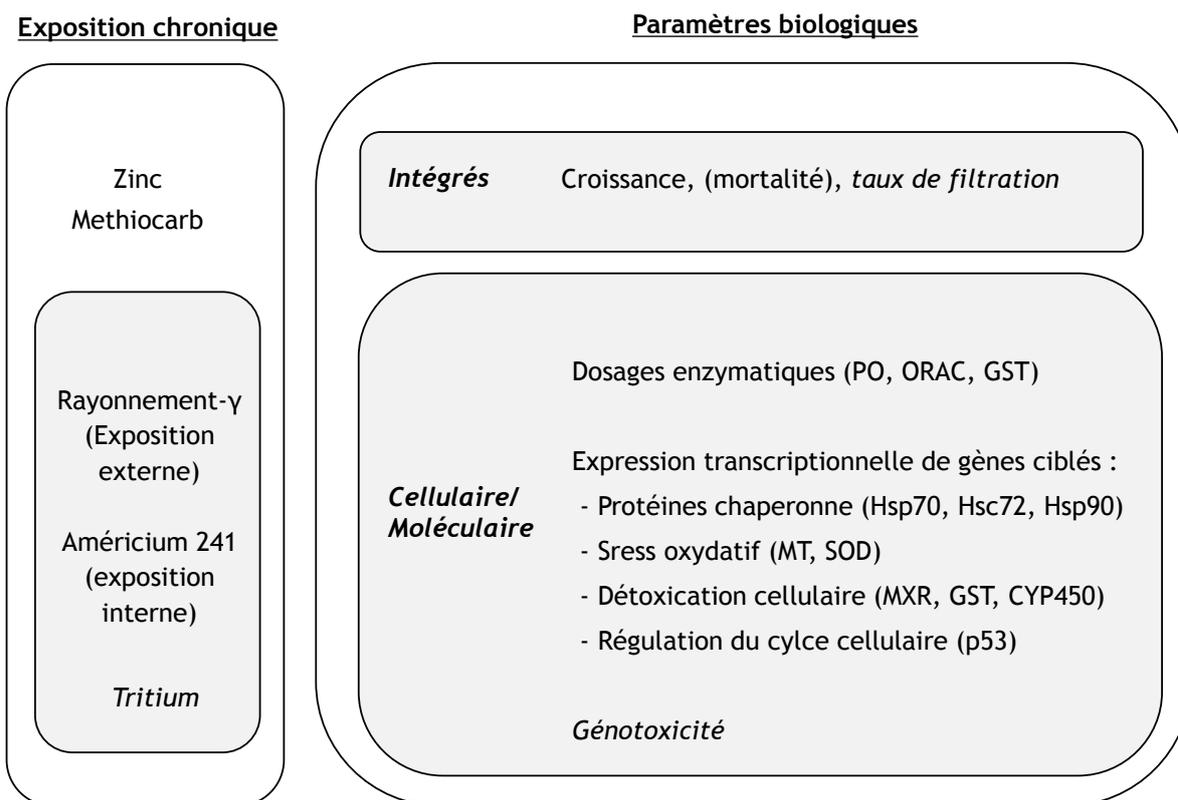


Figure 10 : illustration de la démarche expérimentale entreprise lors de ces travaux de thèse.

La démarche expérimentale entreprise lors de ces travaux de thèse s'est articulée autour de 3 parties majeures :

1) La première partie concerne le développement de la structure zootechnique et la validation du modèle expérimental pour la réalisation d'expositions chroniques en milieu contrôlé. Ces travaux préparatoires ont été réalisés en utilisant deux contaminants test : le zinc (un métal) et le methiocarb (un molluscicide). Ces deux contaminants sont présents en faibles concentrations en Manche. Des interrogations persistent quant à leurs effets chroniques sur les jeunes stades de développement d'organismes marins tels que l'huître.

Au cours de cette phase, plusieurs défis techniques ont dû être relevés. Le premier était d'élever des juvéniles depuis le début de leur vie et ce pendant plusieurs semaines dans le but de reproduire les conditions d'exposition dans l'environnement. En effet, lors de cette phase préparatoire, l'accent a été mis sur le fait que le protocole expérimental doit permettre d'exposer les huîtres en conditions chroniques, c'est-à-dire dans des conditions d'exposition sublétales, où le contaminant testé n'entraîne pas la mort des organismes.

Il était également nécessaire de développer une méthode permettant de mesurer, de manière conservative, la croissance de plusieurs sous-populations d'organismes microscopiques. Ceci a été rendu possible par l'utilisation de micro-cages et d'un logiciel d'imagerie permettant de traiter un grand nombre d'individus. A terme, il était également important de réduire le plus possible la taille des

dispositifs expérimentaux (afin d'augmenter l'activité en contaminant utilisé), tout en faisant en sorte de conserver de bonnes conditions d'élevage en laboratoire.

Ces travaux sur le zinc et le methiocarb ont servi de prototype pour les expériences d'expositions aux rayonnements ionisants, plus difficiles à mettre en place du fait des contraintes qui découlent de l'utilisation de la radioactivité.

II) La deuxième partie de la démarche expérimentale s'oriente plus spécifiquement vers les recherches des effets chroniques des RI sur les stades précoces de développement de *Crassostrea gigas*. Deux approches ont été utilisées pour cette étude. La première est une exposition externe à une source de rayonnement gamma (du Césium 137). Dans ce cas de figure, seul l'effet radiologique est mesuré et il est possible d'évaluer le débit de dose reçu par les animaux avec précision. La deuxième approche est une exposition des juvéniles par balnéation à de l'américium 241. Dans ce cas-là, les deux effets chimiques et radiologiques de l'américium 241 sont pris en compte.

III) Dans une troisième partie, la problématique de l'impact génotoxique de RI et ses conséquences potentielles aux niveaux d'organisation biologique supérieurs (santé individuelle, population) est abordée. Lors de cette approche, de jeunes huîtres ont été contaminées de manière chronique à de l'eau tritiée. Les effets génotoxiques du tritium sur l'ADN des hémocytes d'huîtres ont ensuite été évalués. Cette étude a été complétée par une approche comparative où les effets génotoxiques du tritium sur les hémocytes d'huîtres ont pu être comparés avec le niveau de dommage observé chez les hémocytes de moules (*Mytilus edulis*) exposées au tritium dans les mêmes conditions.



**CHAPITRE II. DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DU  
MODELE EXPERIMENTAL POUR LA REALISATION  
D'EXPOSITIONS CHRONIQUES EN MILIEU CONTROLE**



## II.1 METHODE EXPERIMENTALE

### II.1.1 MATERIEL BIOLOGIQUE : APPUI TECHNIQUE DE LA SOCIETE ATLANTIQUE DE MARICULTURE

Les juvéniles (larves et naissains) d'huître japonaise utilisés au cours de ces travaux de thèse proviennent d'une éclosérie locale : la Société Atlantique de Mariculture, SAtMar (Barfleur, Normandie, France). La fécondation est réalisée par la SAtMar à partir de 60 paires différentes de géniteurs potentiels. Les juvéniles sont collectés le jour suivant la fécondation dans le cas des larves et le jour suivant la métamorphose dans le cas des naissains.

Lors du transport vers le laboratoire, les larves sont placées dans un tube eppendorf contenant 1,5 mL d'eau de mer tandis que les naissains sont placés dans un tissu humide et l'ensemble des animaux est gardé au frais avec un peu de glace dans une boîte en polystyrène.

Les larves et naissains sont ensuite acclimatés une nuit au laboratoire dans leur structure d'élevage respective avant de démarrer les expositions chroniques. Ces structures, conçues spécifiquement dans le cadre de la thèse pour ce matériel biologique, sont identiques dans toutes les expériences et sont présentées en détails dans la partie II.2.2 de ce chapitre.

Les larves âgées d'un jour post fécondation (*jpf*) et les naissains âgés d'un jour post métamorphose (*jpm*) sont élevés dans un milieu composé d'eau de mer et d'un mélange de phytoplanctons. La concentration et la composition spécifique (espèces de microalgues) des mélanges ont été choisies en fonction du stade de développement des juvéniles selon les conseils de l'éclosérie (cf. II.1.2).

D'une manière générale, il est délicat de maintenir en bonne santé des organismes vivants âgés de seulement quelques heures dans des conditions contrôlées de laboratoire. Les jeunes stades de développement sont tellement sensibles aux paramètres environnementaux, qu'une variation si infime soit-elle d'un de ces paramètres, peut avoir des conséquences lourdes sur la croissance et la survie de l'ensemble de la population. Il existe de nombreux ouvrages décrivant les précautions techniques à prendre en considération lors de la mise en place de tests écotoxicologiques sur les stades précoces de développement d'organismes marins (Woelke 1972, Calabrese 1984, Widdows 1993, Krassoi *et al.* 1996). Dans tous les cas, il s'agit de reproduire les conditions de vie naturelles de l'organisme et d'éliminer l'influence de tous les matériaux potentiellement toxiques.

Plusieurs précautions ont été prises lors de ces travaux de thèse, à commencer par l'eau de mer utilisée. Celle-ci a été systématiquement prélevée dans l'environnement naturel à proximité de l'éclosérie. L'eau de mer utilisée lors des expérimentations sur les naissains a été échantillonnée par mer calme à marée haute puis stockée à l'obscurité au laboratoire tandis que l'eau de mer utilisée lors des expérimentations sur les larves a été fournie directement par l'éclosérie. Elle y est filtrée puis stérilisée par de la lumière ultraviolette.

Avant d'être mise en contact avec les juvéniles, l'eau de mer est préalablement amenée à une température de 23,5°C. Cette valeur est d'environ 2°C plus faible que la température utilisée en éclosion. Elle permet aux larves de devenir compétentes à la métamorphose en naissains après seulement 14 jours de vie. Dans l'environnement marin de la Manche, la température de l'eau de mer a fluctué en 2007 entre  $8,8 \pm 0,1^\circ\text{C}$  en période hivernale et  $18,1 \pm 0,3^\circ\text{C}$  en période estivale (Mottin 2010). Par conséquent, les larves du milieu naturel mettent plus de temps pour se développer jusqu'à la métamorphose. Ainsi, nous avons retenu 23,5°C comme valeur de température de l'eau de mer pour nos travaux d'exposition car elle permet de mesurer des changements rapides de la taille des larves mais n'est pas trop élevée afin de minimiser le développement éventuel d'une prolifération bactérienne ou d'agents pathogènes perturbant le bon développement larvaire.

Lors de ces expérimentations, tous les aquariums et vaisselles utilisés étaient exclusivement en matière plastique (polypropylène, polychlorure de vinyle) et/ou en verre. Ils étaient rincés, baignés plusieurs jours dans de l'eau de mer puis lavés abondamment avec de l'eau très chaude (supérieure à 70°C), refroidis puis utilisés avec les juvéniles. Aucun procédé chimique n'a été utilisé pour laver ou stériliser le matériel de même qu'aucun antibiotique n'a été ajouté à l'eau de mer.

Les changements de milieu des aquariums avaient lieu les lundis, mercredis et vendredis pour empêcher toute pollution par les déchets métaboliques des huîtres.

## II.1.2 NUTRITION DES LARVES ET NAISSAINS

Les juvéniles d'huître japonaise étant exposés en laboratoire sur de longues durées, il était indispensable de leur fournir régulièrement un apport en phytoplancton. Celui-ci a été contrôlé et standardisé pour pallier tout stress lié à la nutrition (SAtMar, Helm *et al.* 2006, Robert et Gérard 1999). En effet, ce facteur doit être correctement maîtrisé car il est susceptible d'induire un biais considérable dans l'analyse du lien entre l'effet observé et le contaminant testé.

Trois espèces de microalgues étaient fournies par l'éclosion : une diatomée (*Chaetoceros calcitrans*) et deux haptophytes (*Pavlova lutheri*, et *Pseudoisochrysis*). Parallèlement aux renouvellements en eau de mer des aquariums, un volume adapté de phytoplancton était mis à disposition des juvéniles. Un système d'approvisionnement automatique a été élaboré à partir d'une pompe péristaltique afin de nourrir les jeunes huîtres au cours des week-ends.

La densité cellulaire était suivie par spectrophotométrie (absorbance de la chlorophylle *a* à 700 nm) dans les aquariums tout le long des expérimentations afin de garantir un approvisionnement en algues identique entre chaque groupe d'exposition. De plus, la densité algale a été maintenue au-dessus d'un seuil limite de concentration de  $5,6 \cdot 10^4$  cellules/mL<sup>-1</sup> pour s'assurer que l'ensemble des juvéniles disposait de suffisamment de nourriture jusqu'au prochain changement de milieu (Helm *et al.* 2006, Robert et Gérard 1999).

### II.1.3 PRESENTATION DES CAGES ACCUEILLANT LES LARVES ET LES NAISSAINS

Les stades précoces de développement de l'huître japonaise ont régulièrement été utilisés en écotoxicologie au cours des dernières décennies. La plupart de ces travaux portaient sur les effets en laboratoire de contaminants tels que des métaux ou biocides (Brereton *et al.* 1973, Watling 1982, Watling 1983, His *et al.* 1999). La plus grande partie de ces études a été réalisée sur des périodes de temps relativement courtes allant de quelques heures à quelques jours. Or, les tests écotoxicologiques portant sur les effets chroniques de faibles doses de contaminants devraient idéalement couvrir toute la durée vie de l'organisme afin de reproduire les conditions d'exposition environnementales.

La méthode d'échantillonnage traditionnellement utilisée lors des expérimentations sur les stades précoces de développement d'invertébrés marins est l'échantillonnage sans remise parmi une population finie. En effet, les mesures au cours du temps des différents paramètres (mortalité, anomalies de développement, croissance, etc.) se font fréquemment à partir d'échantillonnages destructifs.

Contrairement aux études précédentes sur les stades précoces de développement de l'huître japonaise, toutes les mesures de croissance réalisées lors de ces travaux de thèse ont été faites à partir d'échantillonnages avec remises de plusieurs populations qui, du fait de leurs grandes tailles, pouvaient être considérées comme infinies. Cette méthode permet une appréciation statistique robuste des effets observés. Elle a également l'avantage de restreindre le nombre d'animaux dans les aquariums et donc le volume des milieux de cultures mis en jeu, ce qui sera un grand atout lors des expérimentations faisant intervenir des traceurs radioactifs.

Dans un premier temps, l'un des défis techniques de ces travaux de thèse a donc été d'élaborer un système permettant de manipuler plusieurs sous-populations de juvéniles durant plusieurs semaines, tout en minimisant le stress infligé aux animaux lors des mesures. Ces dispositifs sont de petites cages développées à partir de tubes en matière plastique et de tamis aux maillages très fins (44 à 500  $\mu\text{m}$ ) obtenues auprès de l'industrie alimentaire (figure 11).

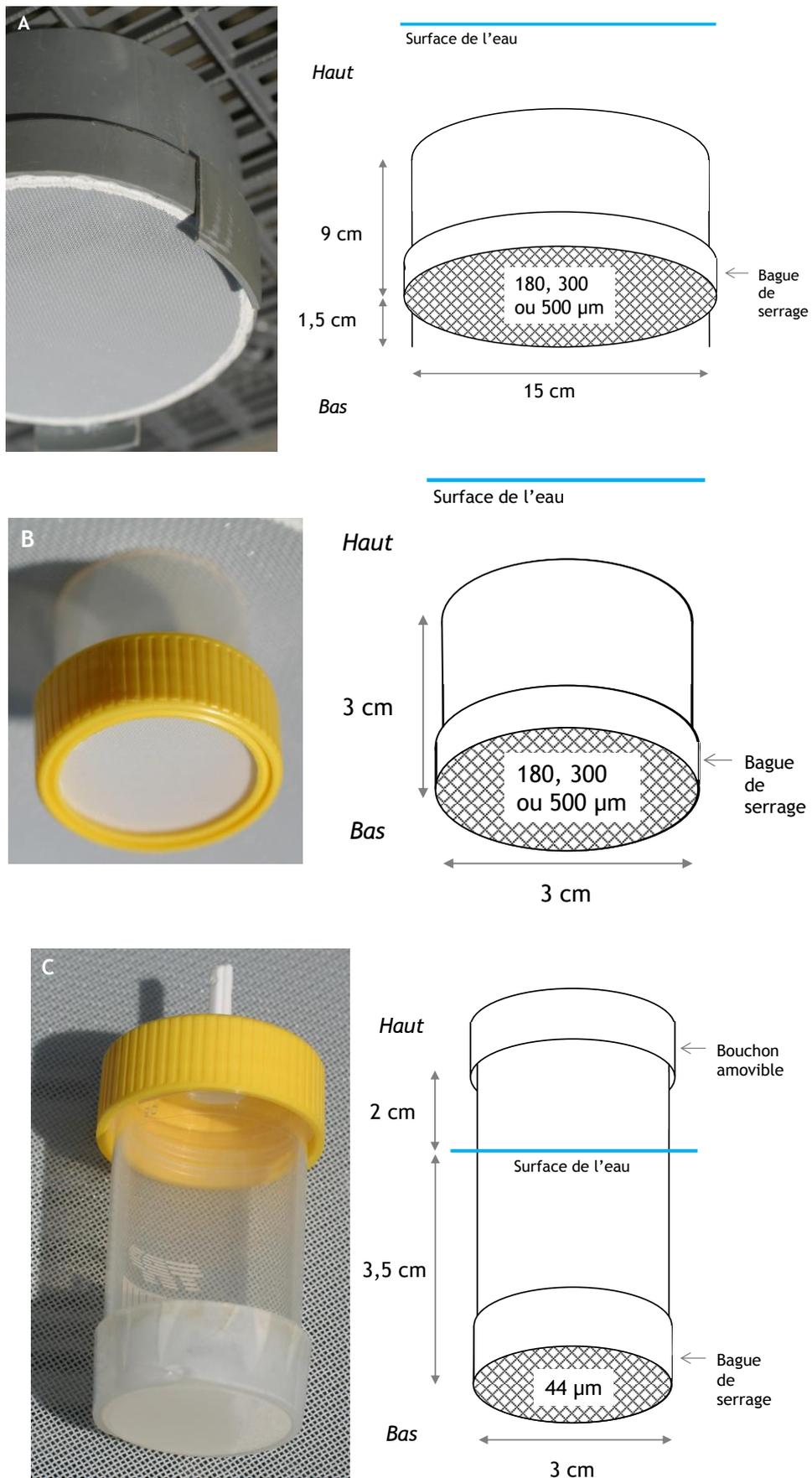


Figure 11 : photos et dessins techniques des cages accueillant les naissains (A et B) et les larves (C).

Un gros tamis en polychlorure de vinyle/nylon (diamètre, 15 cm) est utilisé pour élever quelques milliers de naissains (figure 11-A). De plus petites tamis (diamètre, 3 cm) en polypropylène/nylon sont consacrés aux mesures de la mortalité et de la croissance de plusieurs dizaines de naissains selon des échantillonnages avec remises (figure 11-B). Les naissains, dont la taille juste après la métamorphose est voisine du demi-millimètre, ont un mode de vie benthique et sédimentent facilement au fond de la colonne d'eau. Par conséquent, les tamis utilisés pour les naissains sont complètement immergés dans l'eau de mer. Les tamis utilisés pour les larves (diamètre, 3 cm) sont, quant à eux, suspendus à la surface de l'eau (figure 11-C). Effectivement, la larve de *C. gigas* est pélagique et se déplace dans les trois dimensions de la colonne d'eau, c'est pourquoi il est impératif que l'environnement de la cage soit complètement clos. Différentes tailles de maillage de 44, 180, 300 et 500  $\mu\text{m}$  sont adaptées aux tamis à mesure que les juvéniles grandissent.

## **II.1.4 PROTOCOLES DE MESURE DES DIFFERENTS PARAMETRES BIOLOGIQUES**

### **II.1.4.1 Suivi de la croissance des juvéniles de *C. gigas***

#### ***Plate-forme photographique***

Dans le but de pallier la forte variabilité interindividuelle, plusieurs sous-populations d'environ 40-50 individus sont isolées dans plusieurs petits tamis puis disposées dans de petits aquariums appelés "unités expérimentales" (UE). Le suivi de la croissance est réalisé en utilisant une loupe binoculaire (Leica M205C) munie d'une caméra numérique (Leica D420) reliée à un ordinateur disposant d'un logiciel d'acquisition d'image (Leica Application Suite).

Dans le cas des naissains, le tamis est d'abord extrait de son unité expérimentale puis les naissains sont placés dans un pilulier contenant quelques millilitres d'eau de culture (figure 12). Le pilulier est placé sous la loupe binoculaire. Les naissains y sont dénombrés et, le cas échéant, les morts sont retirés. Les naissains sont ensuite placés les uns à côté des autres, en prenant garde qu'ils ne se chevauchent pas. Une photo est ensuite prise. Cette étape est réalisée pour chacun des tamis de chaque UE. L'utilisation du programme d'analyse d'image *ImageJ*, (Rasband 1997-2011, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>), permet d'automatiser les mesures de taille d'un grand nombre de naissains. Pour cela, l'échelle de la photo est calibrée (figure 12-1) puis l'image est transformée en codage 8-Bits (figure 12-2). L'outil *Threshold* permet ensuite de définir la nuance de gris pour laquelle le contour des naissains est le plus contrasté (figure 12-3). Cette étape aboutit à une image binaire où les ombres des naissains se trouvent sur un fond blanc. Le programme mesure ensuite l'aire et le diamètre de *Feret* (c'est-à-dire la longueur maximale d'une forme irrégulière) de chaque naissain.

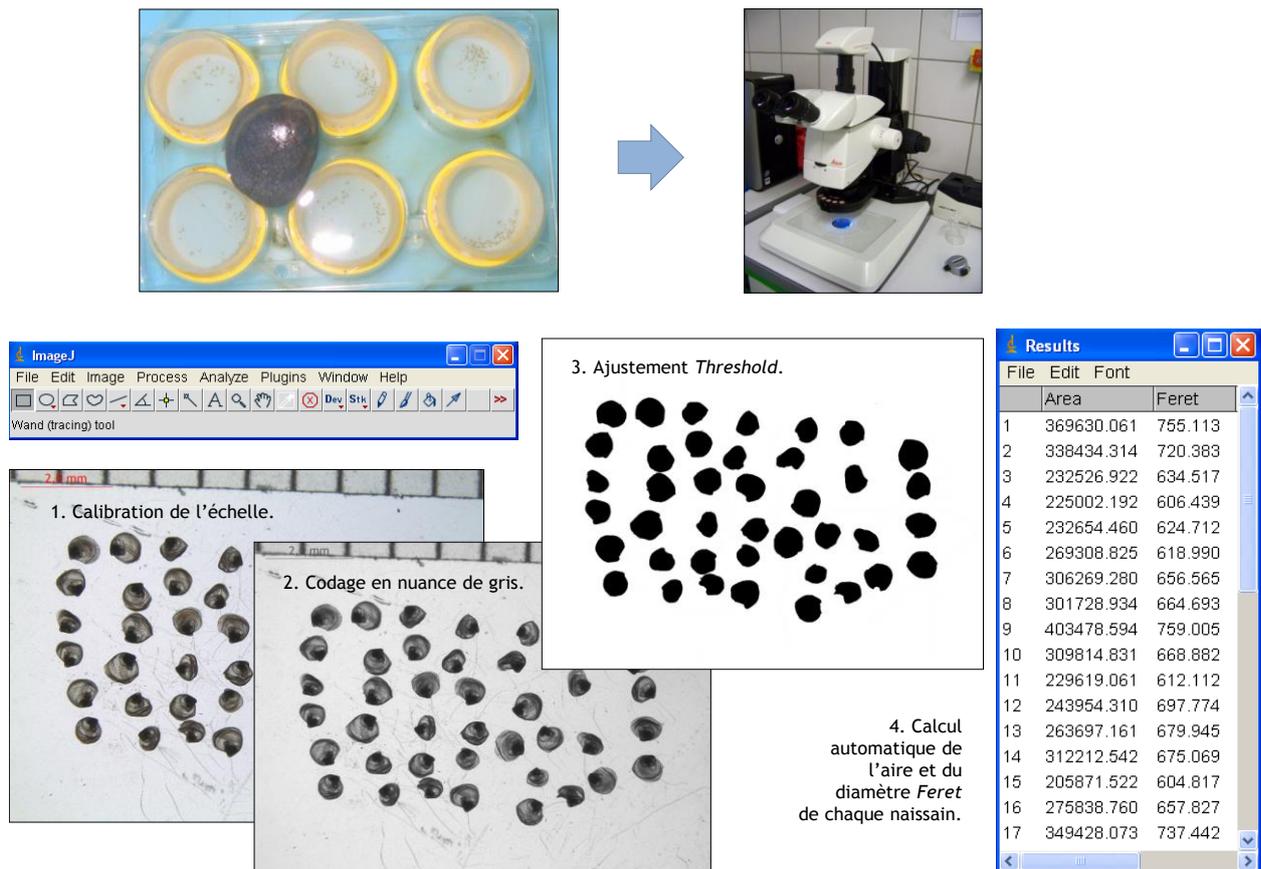


Figure 12 : mesures conservatives et automatisées de la croissance des naissains.

Le principe de mesure de la croissance des larves est similaire à celui des naissains mais il est plus délicat à mettre en œuvre du fait de la très petite taille des larves et de leur comportement de nage.

Au début de l'expérience, environ 50 larves sont placées dans chaque tamis grâce à une pipette (0,5-10  $\mu$ L). A différents temps de l'exposition, le tamis est placé dans un pilulier ou un puits d'une plaque de culture cellulaire avec quelques millilitres de milieu de culture (figure 13). Les larves nageuses sont rassemblées au centre du tamis par un faible mouvement de vortex manuel puis la cage est très délicatement extraite du milieu de culture et placée dans un autre pilulier sec. A cet instant-là, les larves se trouvent dans une fine pellicule d'eau suffisamment épaisse pour les protéger de toute dessiccation mais trop fine pour leur permettre de nager. Une cellule de comptage en spirale est utilisée pour dénombrer les larves lors de leur observation à la loupe binoculaire. Les larves sont prises en photo directement dans leur tamis puis la longueur, correspondant à la distance entre la charnière et l'extrémité opposée de la coquille, est mesurée plus tard grâce au logiciel d'analyses Leica.

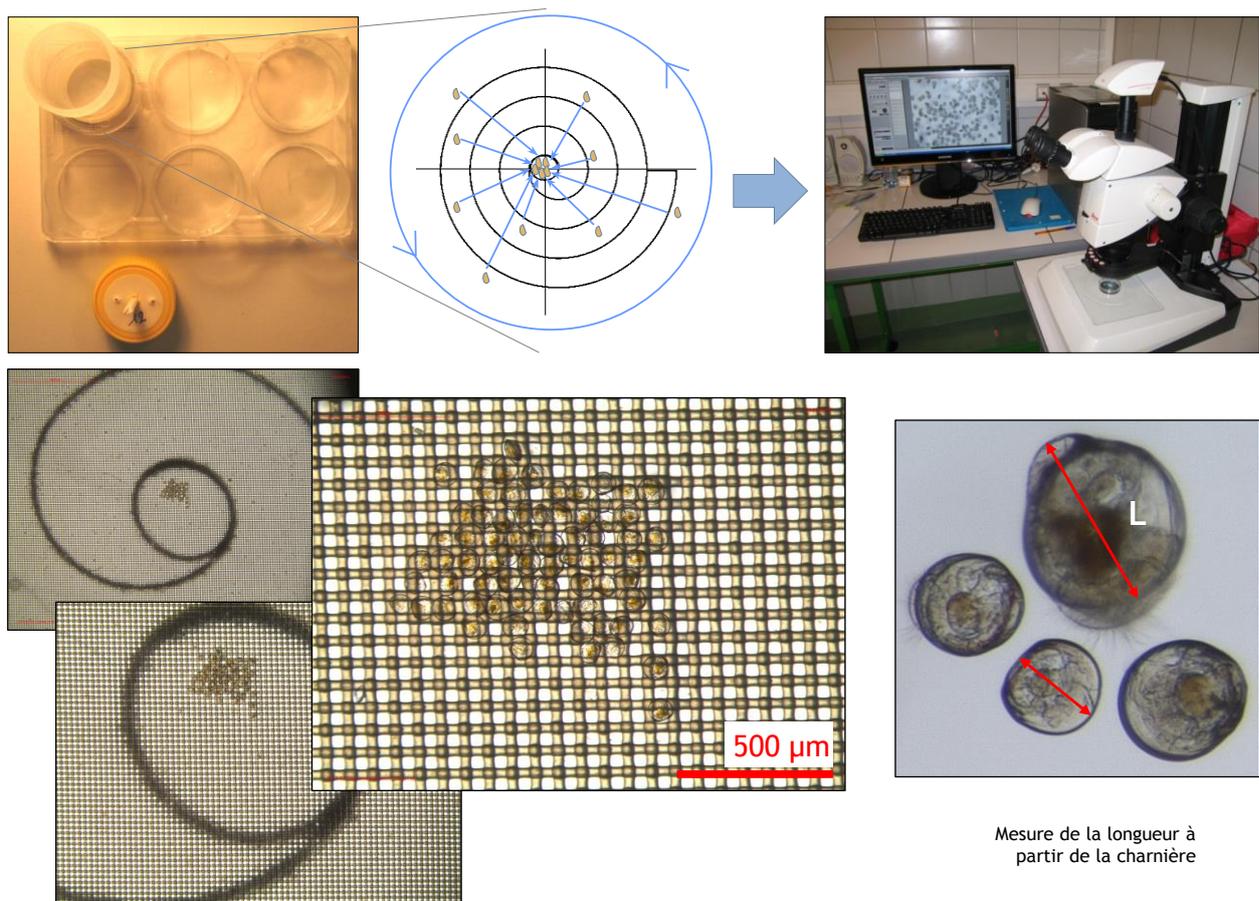


Figure 13 : mesures conservatives de la croissance des larves.

### *Variabilité interindividuelle*

Le type de reproduction des organismes vivants peut être décrit d'après le modèle évolutif *r/K* de [MacArthur et Wilson \(1967\)](#). La stratégie de reproduction de l'huître japonaise correspond dans ce cas à la stratégie adaptative de type *r* qui consiste à l'organisme à produire rapidement un grand nombre de descendants dont seul un faible pourcentage atteindra la maturité sexuelle.

Une autre caractéristique de la stratégie de reproduction de type *r* est la forte variabilité interindividuelle de la progéniture, en particulier au regard de la croissance. A titre illustratif, voici en [figure 14](#) les classes de tailles prises pour une population de larves *témoin* de plus de 200 individus au cours de deux semaines post-fécondation.

Les larves sont de tailles homogènes en début d'exposition (2,5 *jpf*). Au cours de l'exposition, la variabilité interindividuelle se traduit par un étalement de la gamme de tailles prises par les larves. Survient alors la difficulté de caractériser les différentes populations en utilisant une grandeur statistique comme la longueur moyenne, par exemple. En effet, la distribution des tailles détermine le choix des méthodes statistiques à employer. Les analyses statistiques réalisées sur le jeu de données de la [figure 14](#) concluent à l'acceptation de l'hypothèse d'une distribution normale des résidus à

chaque date (Shapiro-Wilk,  $p > 0.05$ ). Les histogrammes de tailles des larves sont ainsi considérés unimodaux du début à la fin de l'exposition.

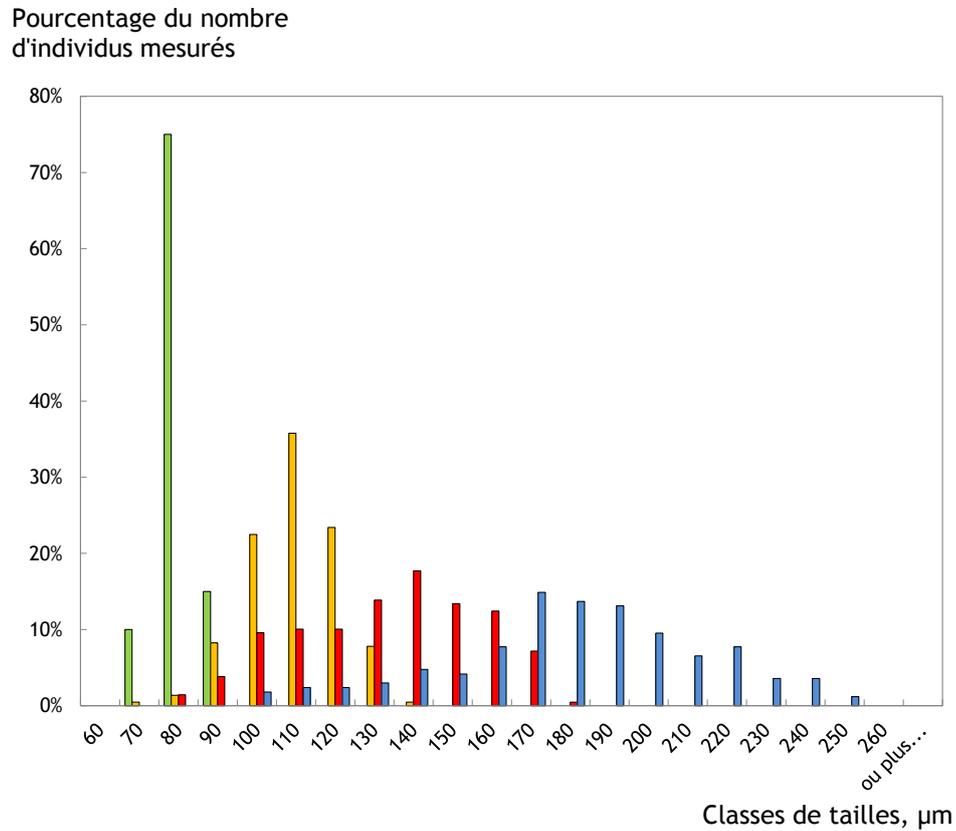


Figure 14 : histogramme de taille d'un lot de larves élevées dans les conditions *témoin* de laboratoire. A 2,5 jpf, l'effectif de la population étudiée est supérieur à 200.

Jours post fécondation : ■ 2,5 jpf ; ■ 7,5 jpf ; ■ 10,5 jpf ; ■ 16 jpf.

Chez des naissains pour lesquels le temps d'exposition dépassait deux semaines, il est arrivé que l'hypothèse d'une distribution normale des résidus au-delà de cette date ne soit plus respectée (distribution polymodale) auquel cas des outils statistiques adéquats ont été utilisés lors de l'analyse des données (cf. II.1.4.5). Néanmoins, la faible occurrence d'une distribution polymodale des tailles des juvéniles nous a orienté vers le choix de la longueur moyenne comme grandeur statistique.

## Sensibilité et reproductibilité des modèles naissains et larves

Les figures 15 et 16 représentent la croissance et la survie de plusieurs lots de naissains et larves exposés en laboratoire en condition *témoin*. Pour chaque modèle, les conditions d'élevage sont similaires entre les lots (température, nutrition, fréquence des changements d'eau, photopériode, etc.).

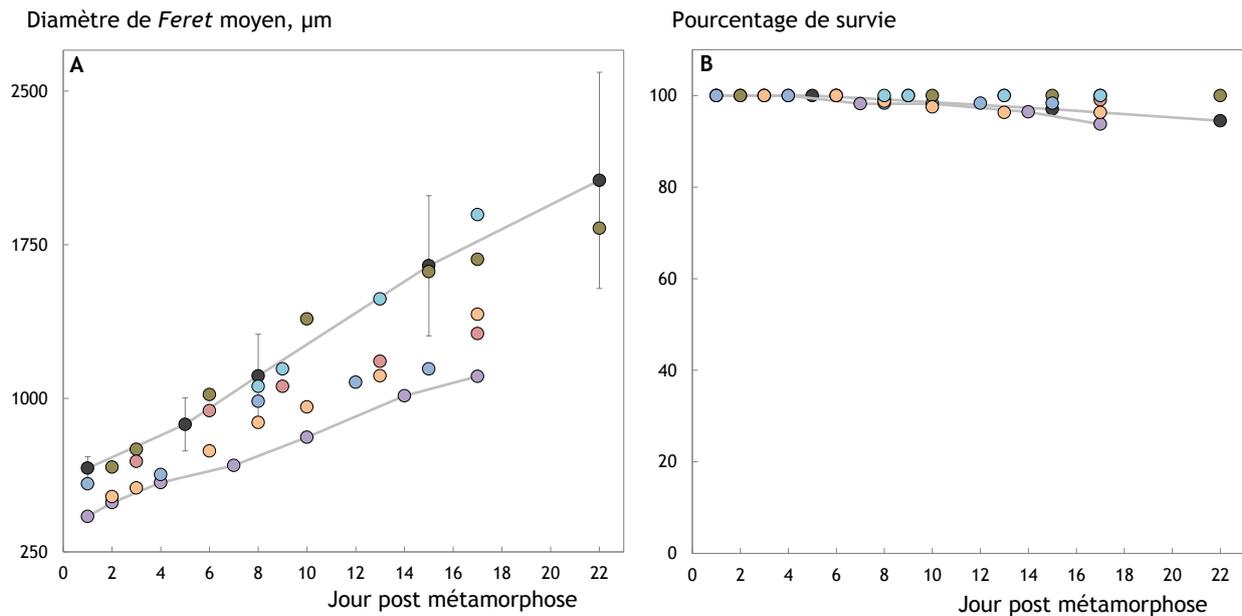


Figure 15 : diamètres de *Feret* moyen et pourcentages de survie de 7 lots de naissains exposés aux conditions *témoin* de laboratoire.

Effectif lors de la 1<sup>ère</sup> mesure : ● I :  $n=240$  ( $\pm$  ET), ● II :  $n=122$ , ● III :  $n=120$ ,  
● IV :  $n=240$ , ● V :  $n=79$ , ● VI :  $n=117$ , ● VII :  $n=80$ .

Considérant, la taille des naissains entre 9 et 10 *jpm* (figure 15), la valeur moyenne du diamètre de *Feret* calculée à partir des diamètres de *Feret* moyen de 5 lots de naissains est de  $1072 \pm 215,9$  µm. Il existe une légère différence de la taille moyenne des naissains à 9-10 *jpm* mais cette hétérogénéité est visible dès 1 *jpm*. Globalement, la croissance des naissains est similaire d'une expérimentation à une autre. Au même âge, les pourcentages de survie moyens sont élevés et homogènes :  $99,1 \pm 1,20\%$  ( $n=5$ ). Ainsi, le modèle *naissain* est reproductible au regard de la croissance et de la survie.

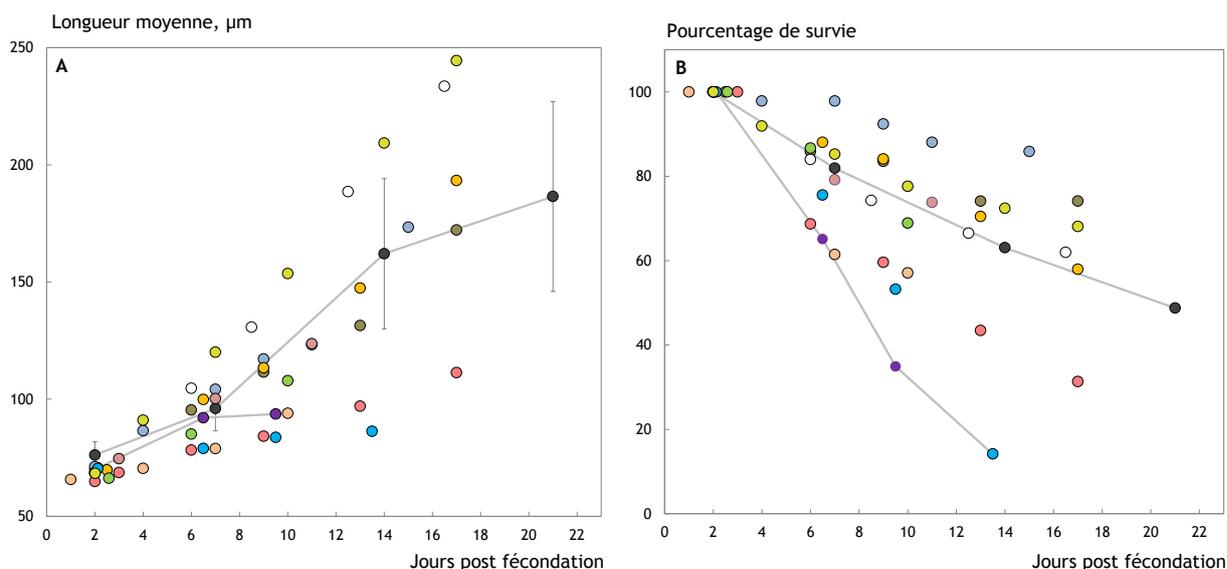


Figure 16 : Longueur moyenne et pourcentage de survie de 12 lots de larves exposées aux conditions témoin de laboratoire.

Effectif lors de la 1<sup>ère</sup> mesure : ● I :  $n=105$  ( $\pm$  ET), ● II :  $n=83$ , ● III :  $n=92$ , ● IV :  $n=164$ ,  
 ● V :  $n=198$ , ● VI :  $n=389$ , ○ VI :  $n=206$ , ● VII :  $n=176$ ,  
 ● IX :  $n=180$ , ● X :  $n=233$ , ● XI :  $n=163$ , ● XII :  $n=208$ .

Concernant le modèle *larve*, la valeur moyenne des longueurs calculée entre 9 et 10 *jpf* à partir des longueurs moyennes de 8 lots est de  $108,1 \pm 22,58$   $\mu\text{m}$ . Au même âge, le pourcentage de survie moyen est de  $69,3 \pm 19,1\%$ . Les courbes de croissance et de survie des différents lots de larves sont plus disparates que celles du modèle *naissain*. Au-delà de 10 *jpf*, certains lots de larves présentent un taux de survie si faible qu'ils compromettent la validité de l'expérimentation. Par exemple, le lot de larves n°10 (cercles bleus foncés) a une croissance quasiment nulle entre 6,5 et 13,5 *jpf* corrélée à un pourcentage de survie de seulement 14,1 % à 13,5 *jpf*.

Le modèle *larve* est moins reproductible que le modèle *naissain* dans nos conditions *témoin* d'élevage en laboratoire mais est, de fait, probablement plus sensible aux contaminations que ne le sont les naissains.

#### II.1.4.2 Mesures de la mortalité

Les mesures de mortalité sont réalisées lors de mesures de croissance à partir des petits tamis, pour chaque traitement expérimental. Tous les individus sont discriminés individuellement selon leur état de survie. La mortalité est détectée par observation directe sous la loupe binoculaire de quelques critères visuels. L'absence de glande digestive contrastée, de mouvements d'ouverture et/ou de fermeture des valves, de mouvements de pseudopode ou de vélum en dehors des valves, de même que la présence éventuelle de microorganismes charognards dans la coquille et la disparition totale des

tissus mous entre les valves sont autant d'indices qui permettent de discriminer un individu vivant d'un individu mort. La mortalité est également confirmée par l'absence de croissance de la coquille. Les naissains morts sont écartés après identification tandis que les larves mortes, plus petites, sont laissées dans le tamis et recomptées à chaque fois.

#### *II.1.4.3 Mesure d'expression transcriptionnelle de gènes ciblés par RT-PCR*

Lors de ces travaux de thèse, l'expression transcriptionnelle de 9 gènes ciblés a été choisie comme paramètre d'intérêt pour l'étude des effets potentiels de contaminants à un niveau moléculaire. Ces gènes codent pour des protéines chaperonnes (hsp70, hsp72, hsp90), des protéines impliquées dans des mécanismes de détoxification cellulaire (GST, P450, MXR), des métallothionéines (MT1 et MT2), dans la régulation du stress oxydatif (SOD) et du cycle cellulaire (p53).

#### *Extraction des ARNs totaux*

A chaque échantillonnage, une masse d'environ 30 mg de juvéniles d'huîtres est immédiatement égouttée, plongée dans du TRI-REAGENT (Sigma Aldrich) dans un tube eppendorf de 1,5 mL puis stockée à -80°C jusqu'à l'extraction des ARN totaux. Le TRI-REAGENT préserve les molécules d'ARN de l'échantillon de toute dégradation due aux RNases.

L'extraction des ARN totaux est réalisée selon la méthode TRI-REAGENT en suivant les instructions du fournisseur. Les échantillons sont décongelés puis manipulés dans la glace jusqu'à l'étape de rétrotranscription. Une première étape de broyage s'effectue dans le TRI-REAGENT à l'aide d'un piston exempt de RNase. Une centrifugation de 10 minutes à 12 000 g (4°C) permet d'éliminer les débris tissulaires non dissous. Un volume de 200 µL de chloroforme est ajouté au surnageant puis l'ARN est séparé de l'ADN et des protéines par centrifugation à 12 000 g (4°C) pendant 15 minutes. L'ARN est précipité par ajout de 500 µL d'isopropanol. Les échantillons sont ensuite centrifugés 10 minutes à 12 000 g (4°C). Le culot d'ARN est remis en suspension puis lavé à l'éthanol 75% dilué dans l'eau traitée au DEPC (DiEthylPyroCarbonate). Une centrifugation de 10 minutes à 12 000 g (4°C) permet de sédimenter les ARN. Le culot d'ARN est séché dans une cloche à dessiccation durant une heure puis est ensuite dissout dans un volume d'eau DEPC adaptée à la quantité présumée d'ARN.

#### *Quantification des acides nucléiques extraits*

Le dosage de l'ARN s'effectue à l'aide d'un spectrophotomètre UV. Une unité d'absorption optique à 260 nm correspond à une concentration en ARN de 40 µg.L<sup>-1</sup>. Le degré de pureté des ARN est apprécié grâce au rapport A260 nm (absorbance des acides nucléiques) / A280 nm (absorbance des acides aminés tyrosine et tryptophane des protéines) avec une valeur optimale de 2.

### *Traitement à la DNase I (Sigma-Aldrich)*

L'ARN est ensuite rétro-transcrit en ADNc. Les molécules d'ADNc, qui correspondent à une image qualitative et quantitative des ARN des huîtres à un temps donné, sont analysées par PCR quantitative. L'échantillon doit donc impérativement être dépourvu d'ADN génomique (ADNg) qui pourrait interférer avec l'étape de quantification. Pour ce faire, avant l'étape de synthèse de l'ADNc, 550 ng d'ARN totaux, contenus dans 8  $\mu\text{L}$  d'eau DEPC, sont traités 15 minutes à température ambiante avec 1  $\mu\text{L}$  de DNase I (Sigma-Aldrich ; 1  $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) et avec 1  $\mu\text{L}$  de tampon 10X. La réaction de digestion de l'ADNg est stoppée par ajout d'1  $\mu\text{L}$  de solution STOP (STOP Solution : 50 mM EDTA, Promega). La désactivation de la DNase I résulte de la chélation des ions calcium et magnésium par l'EDTA. Une incubation de 10 minutes à 70°C permet de dénaturer la DNase. Les échantillons sont replacés dans la glace. Un volume d'1  $\mu\text{L}$ , soit 50 ng d'ARN, est mis de côté pour vérifier l'efficacité du traitement DNase et l'absence de contamination par de l'ADNg. Les 500 ng d'ARN traités à la DNase contenus dans les 10  $\mu\text{L}$  restant sont utilisés pour la rétro-transcription.

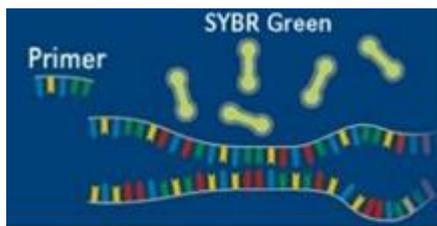
### *Transcription inverse des ARN totaux*

La rétro-transcription de l'ARN comporte une étape d'hybridation d'amorces aléatoires (*random priming*). Une dénaturation de l'ARN est réalisée en présence de 1  $\mu\text{L}$  d'amorces aléatoires (0,5  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , Promega) pendant 5 minutes à 70°C, afin d'éliminer les structures secondaires, puis les échantillons sont rapidement transférés dans la glace. Pendant la descente rapide en température, les oligonucléotides (random primers) s'hybrident par complémentarité aux brins d'ARN.

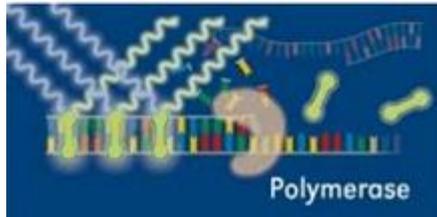
La réaction de rétro-transcription se fait dans un volume final de 25  $\mu\text{L}$ , en présence de 5  $\mu\text{L}$  de tampon 5X Promega (contenant 50 mM de Tris-HCl pH 8,3 à 25°C, 75 mM KCl et 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM DTT), 1  $\mu\text{L}$  de M-MLV Rev Transcriptase (Moloney Murine Leucemia Virus Reverse Transcriptase 200  $\text{U}/\mu\text{L}$ , Promega), 1,25  $\mu\text{L}$  de désoxyribonucléotide (dNTP 10mM) et 0,625  $\mu\text{L}$  de RNAsin (Recombinant RNAsin Ribonuclease Inhibitor 40  $\text{U}/\mu\text{L}$ ). La polymérisation est réalisée à 37°C pendant 1 heure.

### *Quantification en PCR temps réel*

La PCR (*Polymerisation Chain Reaction*) en temps réel repose sur le principe de base de la PCR classique ; c'est-à-dire sur l'amplification cyclique d'un fragment d'ADN cible par une enzyme polymérase thermostable. Cette technique présente l'avantage de visualiser le signal d'amplification à chaque cycle de polymérisation. Pour cela, la PCR en temps réel utilise une sonde fluorescente : le SYBR-Green. Sous sa forme libre, le SYBR Green n'est pas fluorescent mais il émet un signal lorsqu'il est incorporé à l'ADN double brin (Figure 17). Ainsi, en s'insérant entre les brins des amplicons formés, le SYBR Green permet sa quantification en temps réel, l'émission du marqueur fluorescent étant proportionnelle à la quantité d'amplicons formés.



Au début de l'amplification, le mélange réactionnel contient de l'ADN dénaturé, les amorces spécifiques du gène à amplifier et la sonde fluorescente (SybrGreen) sous sa forme libre.



Lors de la phase d'élongation, les amorces puis le marqueur de fluorescence se lient au brin d'ADN néosynthétisé ce qui augmente proportionnellement la fluorescence. Cette fluorescence est mesurée à l'issue de chaque cycle d'amplification.

Figure 17 : schéma illustrant la propriété du SYBR Green à émettre de la fluorescence lorsqu'il est lié à l'ADN double brin (modifié d'après [www.dkfz.de](http://www.dkfz.de)).

Le [tableau 1](#) recense les amorces utilisées lors des différentes quantifications qui seront présentées dans ce manuscrit. Les séquences et efficacités des amorces de ces gènes ont été déterminées par [Farcy \(2006\)](#).

La technique de quantification des ARN décrites ici nécessite un choix d'ARN de référence à utiliser et dont l'expression doit rester stable ([Thellin et al. 1999](#)). Les ARN de référence testés sont :

- l'ARNm codant pour l'actine, une protéine du cytosquelette,
- l'ARNm codant pour la GAPDH, une enzyme impliquée dans la glycolyse.
- l'ARN ribosomal 18S, qui rend compte du niveau d'ARN total.

**Tableau 1** : séquence et numéro d'accèsion GenBank des amorces utilisées en RT-PCR (pour *C. gigas*).  
 \* : gène (ou ARN) de référence.

Gène (ou ARN)	Numéro d'accèsion	Amorce sens	Amorce antisens
Actine*	AF026063	5' GCCCTGGACTTCGAACAA 3'	5' CGTTGCCAATGGTGATGA 3'
18S*	AB064942	5' CGGGGAGGTAGTGAC GAA 3'	5' ACCAGACTTGCCCTCCAA 3'
GAPDH*	AJ544886	5' TTGTCTTGCCCTCTTGC 3'	5' CGCCAATCCTTGTTGCTT 3'
Hsp70	AJ305315	5' AGCAAGCCAGCACAGCA 3'	5' GCGATGATTTCCACCTTC 3'
Hsc72	AF144646	5' GAGGATCGCAGCCAAGAA 3'	5' TATCGCCCTCGCTGATCT 3'
Hsp90	AJ431681	5' GGAGAGCAAACCCTCACC 3'	5' TGGCAATGGTTCCAAGGT 3'
GST	AJ557140	5' AACGCCACCATTACGAC 3'	5' AAGACCCACCCAATGCT 3'
MXR	AJ422120	5' CCGAGAACATCCGCTACG 3'	5' GCCCTGTGGGAGTTCCTT 3'
CytP450	AF075692	5' CCCTGGGAGTTCAAACCTG 3'	5' CGAGCGCAAATCCAATAAA 3'
p53	AM236465	5' ACCCAGCTCCGACTCATTT 3'	5' TCATGGGGGATGATGACAC 3'
SOD	AJ496219	5' AACCCCTTCAACAAAGAGCA 3'	5' TTTGGCGACACCGTCTTC 3'
MT1&2	AJ243263 AJ242657	5' TGTCTGATCCATGTAAGTCAAGT 3'	5' TCAGGCTGCAAAGTCAAGTG 3'

L'amplification est réalisée grâce au kit MyiQ supermix BIORAD à partir de 5 µL d'ADN complémentaire (ADNc) dilué, correspondant à la rétro-transcription de 5 ng d'ARN totaux, en présence de 7,5 µL de mélange d'amplification Supermix 2X iQ SybrGreen, 0,5 µM des paires d'amorces oligonucléotidiques spécifiques de l'ADNc à quantifier.

Les conditions d'amplification sont les suivantes : 90 secondes à 95°C (activation de la polymérase), 40 cycles de 15 secondes à 95°C et 45 secondes à 60°C pour l'hybridation des amorces et l'élongation. A la fin de la PCR, la courbe de fusion des amplicons est effectuée entre 55 et 95°C avec une incrémentation de 0,5°C par cycle. Cette courbe permet de vérifier que le Tm de l'amplicon correspond à celui du produit attendu.

Les courbes d'amplification issues de la PCR permettent de déterminer un seuil correspondant au moment où le niveau de fluorescence est assez bas pour être en phase exponentielle et suffisamment élevé pour se détacher du bruit de fond. Ce moment correspond à un certain nombre de cycles appelé Ct (Cycle threshold).

Afin de calculer l'expression du gène cible par rapport à celle du gène référent, la méthode du  $\Delta Ct$  est la suivante:

$$\text{Niveau normalisé d'ARNm du gène d'intérêt} = 2^{-(\text{Ct gène référent} - \text{Ct gène d'intérêt})}$$

Ct = nombre de cycles correspondant au moment où le signal sort du bruit de fond et dépasse le seuil fixé.

#### *II.1.4.4 Protocole de mesure d'activités enzymatiques d'intérêts*

Les effets d'un contaminant peuvent être étudiés au niveau protéique fonctionnel pour prendre en compte les régulations ayant lieu aux niveaux post-transcriptionnelle et/ou post-traductionnel.

Trois types d'activités enzymatiques ont été testés lors de ces travaux de thèse :

1) les phénoloxydases (PO), qui sont des enzymes-clés d'une cascade biochimique ubiquitaire intervenant dans les défenses immunitaires, les processus de réparation des blessures et les mécanismes de reconnaissance du soi/non-soi chez les invertébrés (Söderhäll et Cerenius 1998, Cerenius *et al.* 2006). Une activité de type PO a été détectée dans l'hémolymphe de *C. gigas* (Luna-González *et al.* 2003, Hellio *et al.* 2007), à différents stades de développement (Thomas-Guyon *et al.* 2009). Il a été montré que cette activité pouvait être modulée *in vitro* par des métaux lourds (Gagnaire *et al.* 2004).

2) la glutathion-S-transférase qui participe à la détoxification de phase II de la cellule. Elle catalyse la conjugaison de certaines molécules, dont des xénobiotiques, qu'elle reconnaît selon leur spécificité avec une molécule ubiquiste dans les cellules : le glutathion (Hugget *et al.* 1992). Le complexe ainsi formé est plus hydrosoluble, généralement moins toxique, et plus rapidement éliminé par l'organisme. Son niveau d'expression transcriptionnelle est également suivi lors de ces travaux de thèse (voir section II.1.4.3).

3) le pouvoir antioxydant global des tissus par la mesure de l'indice "ORAC" (Capacité d'Absorption des Radicaux libres Oxygénés).

L'activité des trois systèmes enzymatiques est mesurée à partir de l'ensemble des tissus des juvéniles puisqu'il est difficile d'isoler un seul type de tissu à partir d'individus aussi petits.

#### *Extraction des protéines*

Après avoir été égouttés, les juvéniles sont pesées par lots de  $100 \pm 5$  mg puis broyées et homogénéisées à l'aide d'un micro-potter dans un tampon adapté à l'activité enzymatique étudiée. Les échantillons sont centrifugés à 9 000 g pendant 25 min (4°C), puis le surnageant est aliquoté et congelé à -80°C. Un aliquot de chaque extrait est utilisé pour le dosage de protéines totales de l'échantillon.

## Dosage de l'activité phénoloxydase

Le terme PO fait référence à un large groupe d'enzymes. Selon la spécificité du substrat, le groupe des PO comprend les tyrosinases, les catécholases et les laccases (Walker et Ferrar 1998). La méthode de dosage utilisée lors de ces travaux de thèse est inspirée du protocole mis au point par Luna-Acosta (2011). Le substrat utilisé est commun aux différentes PO : il s'agit de la DL-Dihydroxyphénylalanine (DL-Dopa). L'enzyme transforme ce substrat en dopaquinone qui absorbe la lumière à 490 nm (Coles et Pipe 1994, Cheng *et al.* 2004, Gagnaire *et al.* 2004, Hellio *et al.* 2007).

Chez *C. gigas*, ce substrat des PO peut être utilisé par les PO mais aussi par les cytochromes oxydases et les peroxydases. La spécificité du dosage est éprouvée grâce à deux modulateurs des activités de type PO : la TPCK (activateur) et la tropolone (inhibiteur) (Thomas-Guyon *et al.* 2009). En effet, les PO peuvent être présentes dans l'organisme sous forme constitutive ou induite. La TPCK active la proPO en changeant sa conformation tridimensionnelle tandis que la tropolone inhibe les activités PO (tyrosinases, catécholases et laccases) par chélation du cuivre.

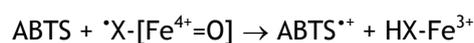
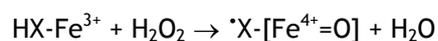
Les protéines des échantillons sont extraites d'après le protocole décrit précédemment page 47 dans un tampon Tris-HCl salé (0,1 M Tris-HCl, 450 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 26 mM MgCl<sub>2</sub>) ajusté à pH 7. Les inhibiteurs de protéases inhibent les activités PO, c'est pourquoi ils sont exempts de cette préparation. Les manipulations préliminaires aux dosages ont été conduites dans la glace. Le même tampon est utilisé lors des étapes d'incubation en présence de substrat (DL-Dopa 10 mM) et de modulateurs (TPCK 1g.L<sup>-1</sup> et tropolone 10 mM).

La lecture des absorbances à 490 nm se fait toute les 10 mn pendant 3 h d'incubations à 25 °C dans une microplaque 96 puits. Des mesures de cinétiques *témoin* permettent de prendre en compte le phénomène d'auto-oxydation du substrat lors des calculs d'activités. Une unité enzymatique d'activité PO peut être définie comme la quantité d'enzymes qui catalyse la production d'une μmole de produit par minute (Pomerantz 1963). Ainsi, en appliquant la loi de Beer-Lambert (le coefficient d'extinction molaire de DL-DOPA étant de 3 600 L.mol.cm<sup>-1</sup>), on peut exprimer l'activité des PO en μmol.min.mg<sup>-1</sup> de protéines totales.

## Index du pouvoir antioxydant global des tissus (test ORAC)

La mesure du potentiel antioxydant des tissus est réalisée d'après les recommandations du kit *Antoxydant Assay Kit CS0790* de Sigma-Aldrich.

Le principe du dosage repose sur la formation d'un radical ferryl myoglobine (\*X-[Fe<sup>4+</sup>=O]), à partir de la métmyoglobine (HX-Fe<sup>3+</sup>) et du peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, qui oxyde le ABTS (acide 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonique)) et produit un radical cationique ABTS<sup>•+</sup>. Ce dernier est un chromogène soluble vert dont l'absorbance est mesurée à 405 nm.



Les molécules antioxydantes présentes dans les tissus inhibent la production du radical cationique  $ABTS^{•+}$  et la coloration verte décroît en proportion. Un analogue soluble de la vitamine E, le Trolox, est utilisé comme antioxydant standard et contrôle positif.

Les protéines sont extraites, selon le protocole présenté en page 47, dans un tampon d'extraction ORAC 1X (Sigma A3605) auquel est ajouté un cocktail d'inhibiteur de protéases (Sigma P8340) dilué 100 fois. Une gamme étalon de 0 à 0,42 mM de Trolox est fabriquée dans le tampon ORAC 1X. En parallèle, une solution de métmyoglobine est fabriquée dans le même tampon ORAC 1X. Ensuite, une solution de substrat  $ABTS + H_2O_2$  est préparée à la dernière minute dans un tampon citrate-phosphate pH 5. Les mesures se font au lecteur microplaque en mettant en présence 20  $\mu L$  de métmyoglobine, 10  $\mu L$  d'étalon Trolox (0 - 0,42 mM), ou 10  $\mu L$  d'échantillon et 150  $\mu L$  de réactif  $ABTS + H_2O_2$ . La lecture se fait à 405 nm toutes les 30 secondes pendant 30 minutes. Les données retenues pour les analyses sont celles obtenues lorsque la pente de la gamme étalon est la plus importante. Les données d'absorbance obtenues pour les échantillons sont rapportées à la gamme de Trolox afin de déterminer l'activité des enzymes antioxydantes, exprimée en équivalent de concentration de Trolox. L'activité des enzymes antioxydantes est ensuite rapportée à la concentration en protéines totales de l'échantillon et finalement exprimée en  $mmole$  d'équivalent Trolox.min.mg<sup>-1</sup> de protéines totales.

### *Dosage de l'activité glutathion-S-transférase (biotransformation de phase II)*

Les mesures d'activités de la glutathion-S-transférase sont réalisées selon la technique d'[Habig et al. \(1974\)](#). Celle-ci quantifie la cinétique de formation d'un conjugué (le 1-Glutathion-2,4-Dinitrobenzène) entre un substrat modèle, le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) et le glutathion :



Le produit de conjugaison absorbe la lumière à 340 nm. Le tampon d'extraction est composé de 25 mM d'Hepes, 10 mM de NaCl, 0,1 mM de DTT et de 1  $\mu g \cdot mL^{-1}$  d'aprotinin (Sigma-Aldrich) et ajusté à pH 7,4. Un volume de 50  $\mu L$  d'échantillon est placé dans un puits d'une microplaque. L'échantillon est complété avec un volume de 200  $\mu L$  de solution de réaction : 1 mM de GSH, 1 mM CDNB, 125 mM NaCl dans du tampon Hepes 10 mM. L'augmentation de l'absorbance à 340 nm est mesurée toutes les minutes pendant 30 mn, immédiatement après l'ajout de la solution de réaction. Les résultats d'activité de la GST sont calculés à partir des pentes des courbes obtenues au cours des dix premières minutes d'incubation. L'activité volumique de la GST est calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire du CDNB (9,6  $mM \cdot cm^{-1}$ ) puis l'activité spécifique est calculée en rapportant l'activité volumique à la concentration en protéines totales de l'échantillon.

### *Dosages des protéines totales (Bradford)*

Chacune des trois activités enzymatiques présentées précédemment est rapportée à la quantité en protéines totales de l'échantillon. Le dosage est réalisé selon la technique de [Bradford \(1976\)](#) adapté au lecteur microplaque d'après [Galgani et Bocquene \(1991\)](#). Ce dosage colorimétrique repose sur la formation d'un complexe entre le bleu de Coomassie du réactif et les acides aminés aromatiques des protéines.

Un volume de 250  $\mu\text{L}$  de la solution chromogène du kit *Biorad protein assay* préalablement diluée 4 fois est ajouté à 130  $\mu\text{L}$  d'échantillon dans une microplaque de 96 puits. Le dosage est réalisé en triplicats. Une gamme étalon de 0 à 6  $\mu\text{g}$  est réalisée à partir d'une solution mère de BSA ( $1,42 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) dans le même tampon que celui de l'échantillon, c'est-à-dire dans le même que celui utilisé pour la mesure d'activité enzymatique. La mesure des absorbances est réalisée à la longueur d'onde de 595 nm juste après ajout du réactif de Bradford.

#### *II.1.4.5 Statistiques*

Toutes les analyses statistiques, dont les comparaisons entre échantillons et les ajustements de modèles, ont été réalisés avec le logiciel R ([R Development Core Team \(2008\)](#), <http://www.R-project.org>). Le test de Shapiro-Wilk a été utilisé pour tester la normalité des distributions des données avant d'utiliser l'analyse de la variance (ANOVA) pour comparer les échantillons. Lorsque l'hypothèse de normalité est rejetée, un test de Kruskal-Wallis est substitué à l'ANOVA.

L'ajustement du modèle de Gompertz aux changements de taille des juvéniles d'huîtres au cours du temps, ainsi que l'ajustement de la courbe dose-réponse aux valeurs de taux de croissance des juvéniles, ont été réalisés en utilisant la fonction *drm()* de la librairie *drc* du logiciel R ([Ritz et Streibig 2005](#)). L'estimation de l'intervalle de confiance à 95% de la valeur d'EC50 obtenue à partir de l'ajustement aux courbes doses-réponses a été réalisée en utilisant la fonction *nlsboot()* de la librairie *nlstools* de R ([Baty et Delignette-Muller 2011](#), <http://www.R-project.org>).

## II.2 EXPOSITIONS CHRONIQUES DE JUVENILES A UN METAL : LE ZINC

### II.2.1 INTRODUCTION SUR LE ZINC

Au cours de cette thèse, le zinc a été retenu comme contaminant test pour valider le modèle biologique *naissain* et *larve* et préparer les expérimentations sur les rayonnements ionisants, plus contraignantes à mettre en place.

Le zinc est un élément trace essentiel aux organismes vivants (Mikac-Dević 1970), mais il devient toxique à forte concentration. Sa concentration dans l'environnement marin côtier est influencée par de multiples activités humaines (Brereton *et al.* 1973), dont les peintures antisalissures et les anodes sacrificielles (Bird *et al.* 1996). Les effets d'expositions chroniques au zinc sur les bivalves filtreurs ont été étudiés par plusieurs auteurs et portaient sur la biodisponibilité, l'accumulation tissulaire, les cinétiques de transferts et les liens du zinc avec les métallothionéines (Geffard *et al.* 2001, Geffard *et al.* 2002a et b, Baudrimont *et al.* 2005, Bustamante et Miramand 2005, Caplat *et al.* 2012). De nombreuses études ont porté sur la toxicité du zinc sur les stades précoces de développement dont la plupart impliquaient des larves (Watling 1982, Watling 1983, Burgeot *et al.* 1995, Roesijadi *et al.* 1997, Johnson *et al.* 2001, Geffard *et al.* 2002c, Baudrimont *et al.* 2005, Geffard *et al.* 2007, Quiniou *et al.* 2007).

L'une des problématiques majeures du zinc est sa spéciation chimique dans l'environnement marin naturel et les conséquences qu'elle engendre sur sa biodisponibilité vis à vis des animaux filtreurs. La plupart des expérimentations d'exposition en laboratoire utilisaient des éluions de sédiments ou du  $ZnCl_2$  comme source primaire de zinc. Sur la base de cette littérature, nous avons sélectionné le zinc sous forme de  $ZnCl_2$  comme polluant test pour des expérimentations d'exposition à long terme sur les stades précoces de développement de l'huître japonaise. A un niveau intégré, cette étude a permis de dériver des valeurs de concentrations effectives à 50% (CE50) pour le modèle *naissain* et *larve* à partir d'analyses de courbes doses-réponses. Lors de l'approche moléculaire, des mesures d'activités enzymatiques et d'expression transcriptionnelle de gènes ciblés par PCR quantitative ont été réalisées sur le modèle *naissain*.

### II.2.2 STRUCTURE D'EXPOSITION UTILISEES LORS DES EXPOSITONS DE NAISSAINS ET LARVES AU ZINC

#### II.2.2.1 Structure d'exposition des naissains

Lors de cette étude, 20 000 naissains âgés de 1 *jpm* ont été fournis par l'écloserie. La population a été divisée dans 6 UEs (figure 18-A). Les animaux des 6 petits tamis étaient utilisés pour le contrôle de la

mortalité et les mesures conservatives de la croissance ; ceux du grand tamis étaient utilisés pour les mesures destructives (concentration en zinc dans les naissains, mesures de paramètres moléculaires). L'ensemble des 7 tamis étaient placés dans un bac en plastique (figure 18-B) contenant 5 litres d'eau de mer en circulation grâce à une pompe et régulée à 23,5°C.

Après avoir débuté les mesures au temps zéro de l'exposition (naissains âgés de 17 *jpf*, 1 *jpm*), l'exposition chronique au zinc a commencé à 2 *jpm* et a duré 10 semaines. En termes de biomasse, chaque bac contenait moins de 1 g d'huîtres (avec coquille) au début et moins de 15 g à la fin. Une UE a été utilisée comme *témoin* tandis que 5 autres ont été contaminées avec différentes quantités de chlorure de zinc ( $ZnCl_2$  ; Sigma-Aldrich) pour augmenter la concentration dans l'eau de mer jusqu'à 33,0  $\mu M$ .

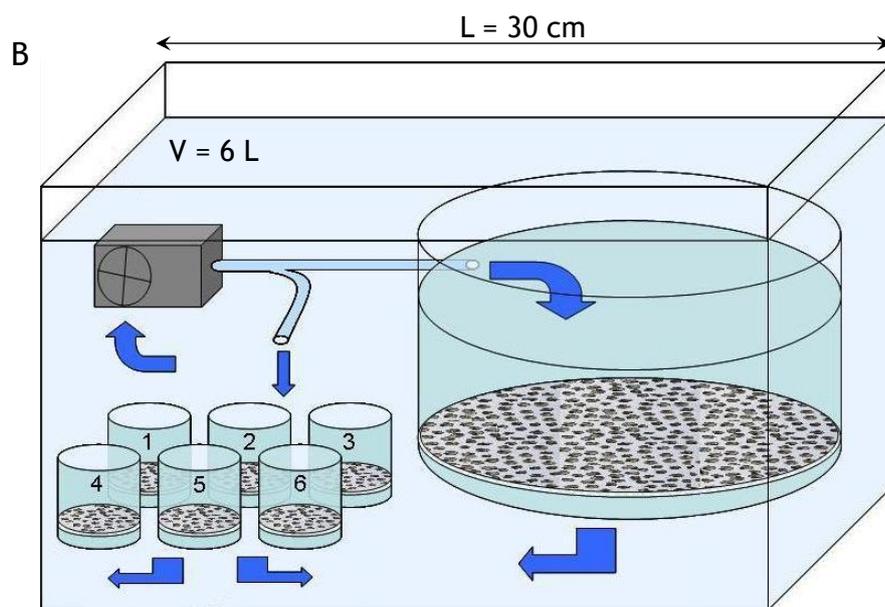
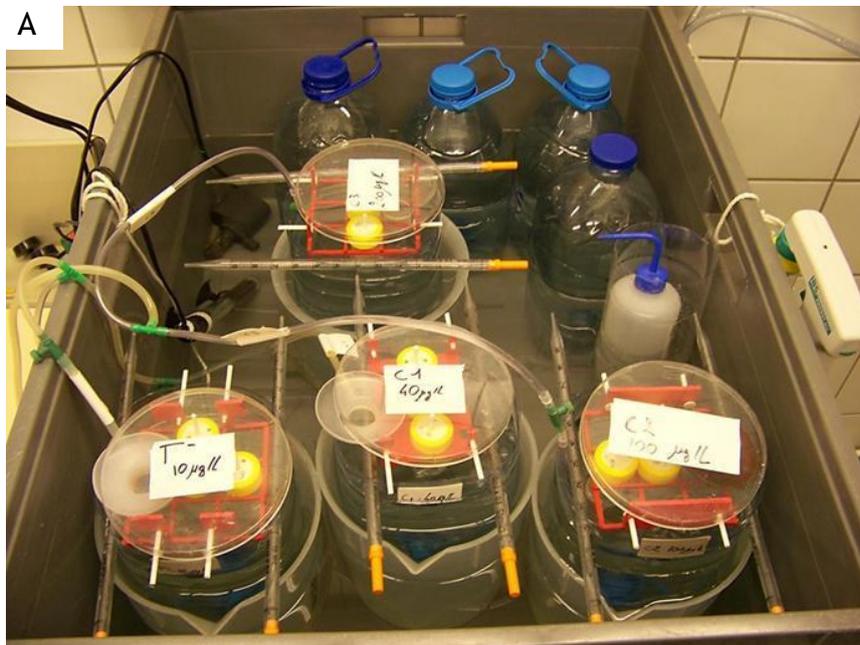


Figure 18 : A - structure d'exposition chronique de naissains au zinc, B - schéma d'une UE de la plateforme d'élevage miniature utilisée au cours d'expositions chroniques de naissains au zinc.

### II.2.2.2 Structure d'exposition des larves

Des larves âgées de 1 *jpf* ont été fournies par l'écloserie puis acclimatées toute une nuit dans une bouteille d'élevage cylindro-conique. Le jour d'après, la population a été divisée dans 4 UEs (figure 19-A). Les larves sont disposées dans des petits tamis à raison de 3 tamis par UE (figure 19-B). Chaque bouteille cylindro-conique constitue une UE contenant 4 litres d'eau de mer régulée à 23,5°C. Un système de bullage est installé dans chaque UE (figure 19-C). Après avoir débuté les mesures au temps zéro, l'exposition chronique au zinc a commencé à 2 *jpf* et a duré 2 semaines. Une UE a été utilisée comme *témoin* tandis que 3 autres ont été contaminées avec différentes quantités de chlorure de zinc pour augmenter la concentration dans l'eau de mer jusqu'à 4,18  $\mu\text{M}$ .



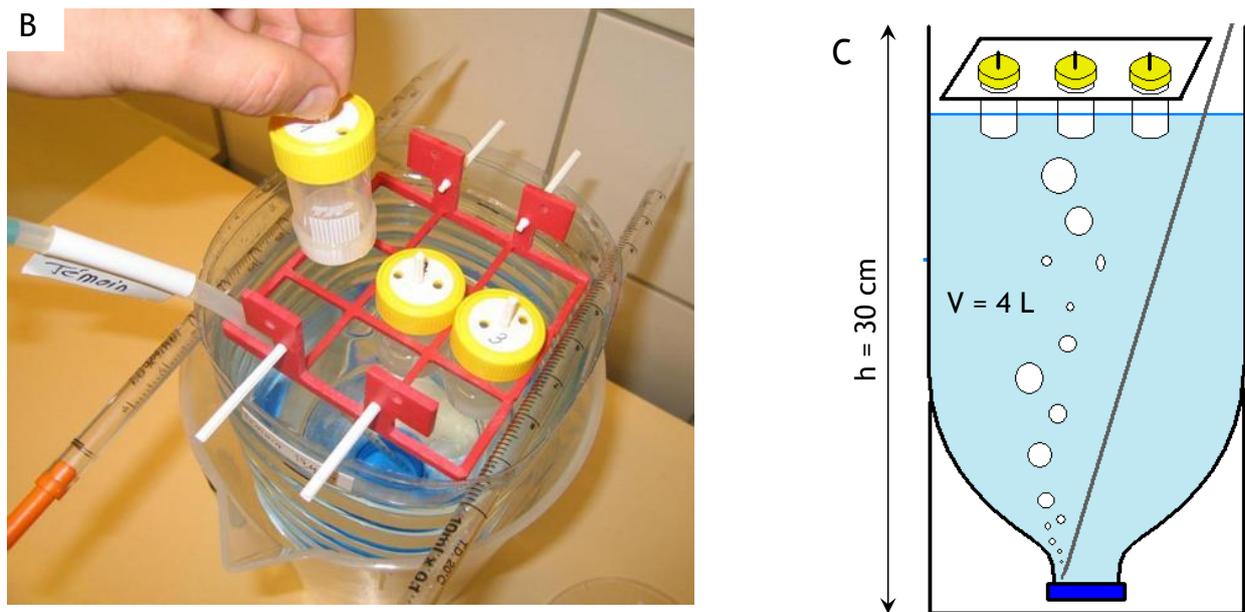


Figure 19 : A - structure d'exposition chronique de larves au  $ZnCl_2$ , B - UE de la plateforme d'élevage miniaturisée utilisée au cours d'expositions chroniques de larves, C - schéma d'une UE.

La figure 20 récapitule la façon dont se sont déroulées les expérimentations sur le zinc. Après une journée d'acclimatation, des naissains (2 *jpm*) et des larves (2 *jpf*) ont été exposés pendant 70 et 15 jours à différentes concentrations en zinc, respectivement. Les milieux de cultures, composés d'eau de mer (EDM) et de phytoplancton, étaient renouvelés intégralement les lundis, mercredis et vendredis. Une pompe péristaltique approvisionnait les naissains en microalgues au cours du week-end. Les prélèvements et mesures étaient réalisés selon un pas de temps rapproché en début d'exposition puis de plus en plus espacé à mesure que l'exposition progressait.

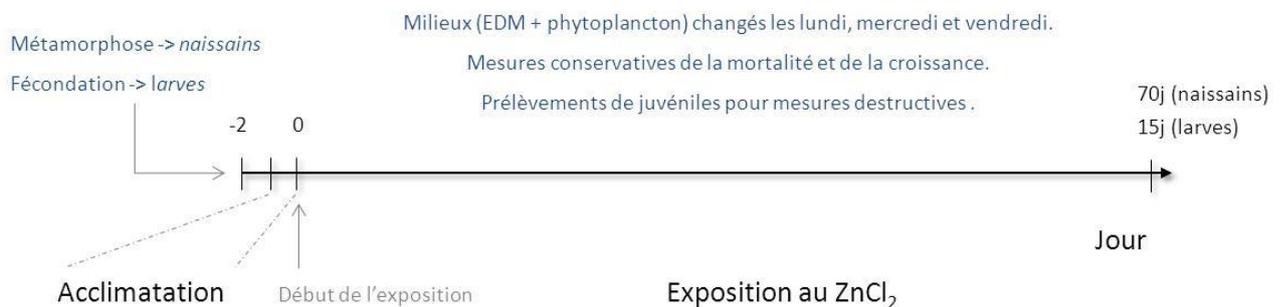


Figure 20 : descriptif temporel des expositions de naissains et de larves au zinc.

## II.2.3 EFFETS CHRONIQUES DU ZINC SUR LES NAISSAINS

### II.2.3.1 Protocole et résultats des mesures des concentrations en zinc dans le milieu d'exposition des naissains

Ces mesures ont été réalisées avec l'aide de Christelle Caplat au Centre de Corrosion Marine et Biologique (laboratoire Corrodys, Cherbourg).

Pour chaque unité expérimentale, des échantillons d'eau de mer sont prélevés juste avant et après chaque changement d'eau. Un volume de 50 mL d'eau de mer est prélevé dans un tube à centrifugation en polypropylène à usage unique, puis quelques gouttes d'acide nitrique y sont ajoutés (69%, Normapur grade). Les concentrations en zinc dans l'eau de mer sont mesurées par spectrométrie d'absorption atomique en mode flamme (SAA-F, mélange d'air et d'acétylène gazeux) à une longueur d'onde de 213,9 nm et avec une fente de 1 nm. L'appareil utilisé est un Varian AA240F doté d'une lampe au deutérium afin de corriger l'absorption non spécifique. Tous les échantillons étalons sont dilués à partir d'une solution étalon stock (solution de zinc étalon,  $1,000 \pm 0,005 \text{ g.L}^{-1}$  ; Analytika) dans de l'eau MilliQ. La méthode d'étalonnage par ajouts dosés est utilisée pour contrôler la qualité des mesures.

**Tableau 2** : concentrations en Zinc (en  $\mu\text{M}$ ) dans l'eau de mer des unités expérimentales lors des expositions de naissains (moyenne  $\pm$  ET).

	Naissains (n=14)
<i>témoin</i>	0.302 $\pm$ 0.102
Z1	3.89 $\pm$ 0.29
Z2	7.45 $\pm$ 0.41
Z3	11.4 $\pm$ 0.5
Z4	15.5 $\pm$ 0.7
Z5	33.0 $\pm$ 1.0

Le [tableau 2](#) rassemble les concentrations en zinc, exprimées en  $\mu\text{M}$ , mesurées dans l'eau de mer des 6 bacs. Les données correspondent aux valeurs moyennes de mesures effectuées à partir d'échantillons d'eau prélevés lors des changements de milieux des jours 0, 3, 5, 7, 11, 17, 24 et 38 de l'exposition. Aucune différence significative n'est observée entre les moyennes de concentrations en zinc mesurées avant et après les changements d'eau de chaque bac (test de Shapiro-Wilk,  $p > 0.05$  ; ANOVA,  $p > 0.05$ ).

Par conséquent, les concentrations en zinc dans le milieu sont considérées constantes tout le long de l'expérience.

### *II.2.3.2 Protocole et résultats des mesures des concentrations en zinc dans les naissains*

Les naissains d'huîtres sont échantillonnés à partir des gros tamis ([figure 18](#)) à différents temps d'exposition puis égouttés. Selon la taille des naissains, leur nombre par échantillon variait de 25 à 2500, afin d'obtenir une masse minimale de 20 mg de matériel sec. La limitation en matériel biologique disponible a restreint l'échantillonnage de répliqués à 25 échantillons, mais cela a été suffisant pour permettre l'estimation de la répétabilité des mesures en zinc dans les naissains.

Les naissains collectés sont placés dans des tubes à centrifugation jetables d'1,5 mL, lyophilisés et pesés. Au laboratoire Corrodys (Cherbourg), une masse de 20 mg de naissains entiers (dont la coquille) est ensuite transférée dans une bombe en téflon contenant 5 mL de solution de minéralisation fraîchement préparée à partir d'un volume d'acide nitrique (69%) et de trois volumes d'acide chlorhydrique ( $\geq 37\%$ ). Les bombes en téflons sont gardées à température ambiante pendant 24h puis placées dans un four à micro-ondes (1 000 W) à température contrôlée (200°C) pendant 35 min. La précision des analyses est contrôlée en utilisant des tissus d'huîtres références certifiés NIST-1566b (National Institute of Standards and Technology) traités de la même manière que les échantillons testés.

La [figure 21](#) représente les variations au cours du temps des concentrations en zinc dans les naissains exposés aux différentes concentrations en zinc données dans le [tableau 2](#). Les données sont exprimées en  $\mu\text{mol.kg}^{-1}$  de poids sec de naissain entier.

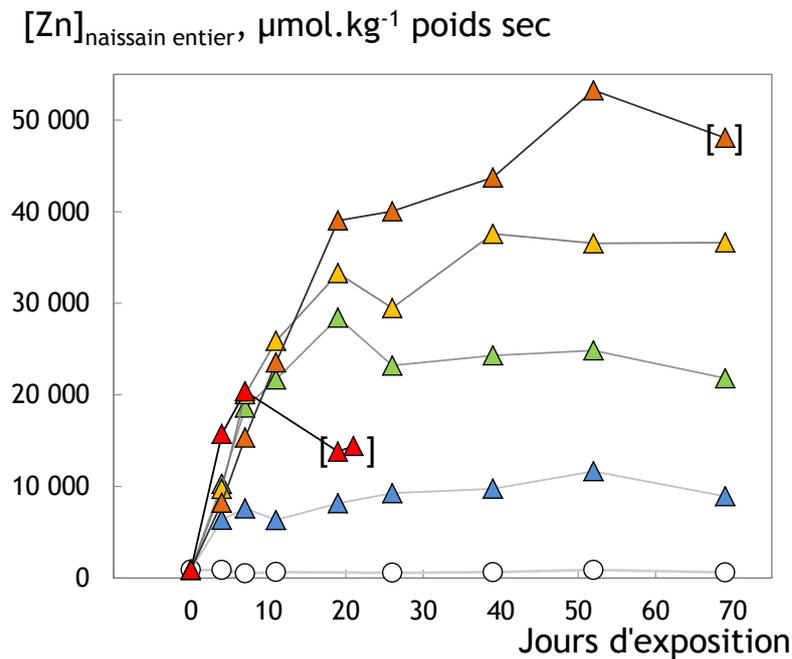


Figure 21 : concentration en zinc mesurée dans les naissains entiers (parties molles et coquille,  $\mu\text{mol.kg}^{-1}$  de poids sec) exposés à différents niveaux de concentration en zinc dans l'eau de mer. Les données entre crochets correspondent aux échantillons présentant une forte mortalité.

Concentrations en Zn :  $\circ$  témoin :  $0,3 \mu\text{M}$ ,  $\triangle$  Z1 :  $3,89 \mu\text{M}$ ,  $\triangle$  Z2 :  $7,46 \mu\text{M}$ ,  $\triangle$  Z3 :  $11,4 \mu\text{M}$ ,  $\triangle$  Z4 :  $15,5 \mu\text{M}$ ,  $\triangle$  Z5 :  $33,0 \mu\text{M}$ .

Des mesures en triplicats ont été réalisées pour 25 échantillons dont l'écart-type relatif s'échelonne de 0,01 à 36,80%, pour une valeur moyenne de 7,51% ( $n=25$ ). Les dernières valeurs pour les concentrations Z4 et Z5 étaient associées à une forte mortalité (figure 22) et doivent être interprétées avec précaution. Après 69 jours d'exposition, un ratio entre les concentrations en zinc dans les naissains et celles de l'eau de mer est calculé en triplicata (à l'exception de Z5) pour déterminer les facteurs de concentrations en zinc dans les naissains entiers. En assumant qu'un litre d'eau de mer pèse un kilogramme, les facteurs de concentrations sont de 2 022, 2 295, 2 924, 3 213 et 3 101 pour les naissains exposés aux concentrations *témoin*, Z1, Z2, Z3, et Z4, respectivement.

### II.2.3.3 Suivi de la mortalité des naissains exposés au zinc

La figure 22 représente les pourcentages de survie des naissains exposés aux six concentrations en zinc en fonction du temps. Afin d'effectuer les analyses statistiques, les valeurs de moyennes et d'écart-types sont calculées après séparation des données de chaque unité expérimentale en fonction des six sous-ensembles de 40 naissains placés dans les six petits tamis. Après avoir confirmé la distribution normale des données (test de Shapiro-Wilk,  $p>0,05$ ), une analyse de variance univariée est menée afin d'estimer la significativité statistique des différences entre les groupes exposés aux six concentrations. Par comparaison avec le lot *témoin* ( $0,3 \mu\text{M}$ ), les concentrations en zinc de  $3,89$ ,  $7,46$  et  $11,44 \mu\text{M}$

n'induisent pas de mortalité significative au cours des 53 premiers jours d'exposition ( $p=0,887$ ). La mortalité devient significative après 6 j à 33,0  $\mu\text{M}$  ( $p<0,001$ ), après 26 j à 15,5  $\mu\text{M}$  ( $p<0,001$ ), et après 53 j à 7,46  $\mu\text{M}$  ( $p=0.003$ ).

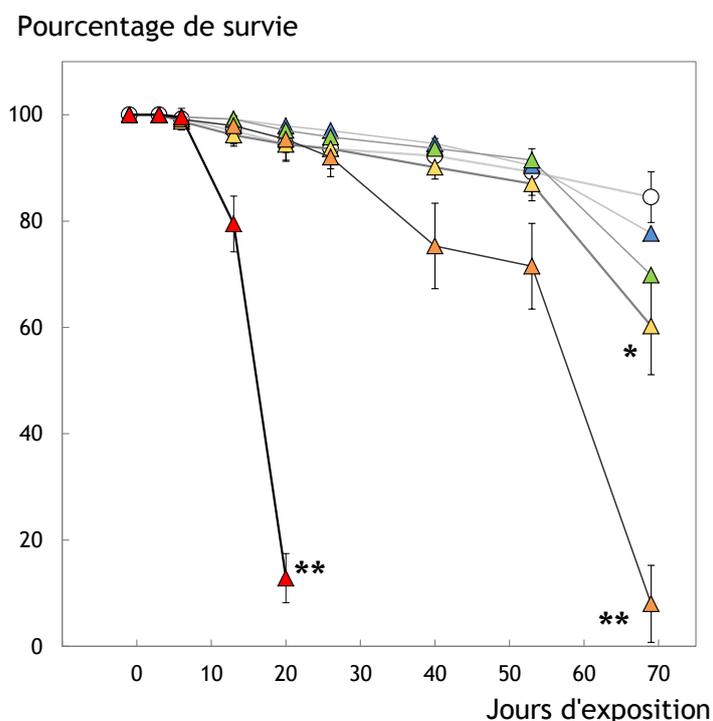


Figure 22 : pourcentage de survie moyen ( $\pm ET$  ;  $n=6$ ) des naissains exposés à 6 niveaux de concentration en zinc dans l'eau de mer.

Au jour zéro de l'exposition, les naissains étaient âgés de 2 jpm et la population comportait 240 individus. Le symbole \* indique une différence statistiquement significative (\*\* :  $p<0.001$  ; \* :  $p<0.01$ ) avec les valeurs témoin (ANOVA,  $n=6$ ).

Concentrations en Zn :  $\circ$  témoin : 0,3  $\mu\text{M}$ ,  $\triangle$  Z1 : 3,89  $\mu\text{M}$ ,  $\triangle$  Z2 : 7,46  $\mu\text{M}$ ,  $\triangle$  Z3 : 11,4  $\mu\text{M}$ ,  $\triangle$  Z4 : 15,5  $\mu\text{M}$ ,  $\triangle$  Z5 : 33,0  $\mu\text{M}$ .

#### II.2.3.4 Suivi de la taille moyenne des naissains exposés au zinc

A différentes dates, pour chaque concentration, six moyennes ( $\pm ET$ ) sont calculées à partir des six réplicas de petits tamis de 40 naissains de même qu'une moyenne globale ( $\pm ET$ ) est calculée à partir de l'ensemble des 240 individus. Les courbes de croissances de la figure 23 sont construites à partir des moyennes globales ( $n=240$  au début), et le modèle de Gompertz est ajusté à chaque jeu de données (Winsor 1932). Le jour précédent le début de l'exposition au zinc, la taille moyenne des naissains est de  $668 \pm 5,18 \mu\text{m}$  ;  $n=1440$ . Le taux de croissance maximal est observé chez les naissains témoin dont le diamètre moyen final était de  $2794 \pm 874 \mu\text{m}$  ( $n=215$ ) 40 jours après le début de l'exposition. La croissance la plus faible est observée chez les naissains exposés à la plus forte concentration en zinc Z5 : diamètre moyen  $722 \pm 49 \mu\text{m}$  après 20 jours d'exposition ;  $n=30$ . Dans le lot de naissains Z5, la

mortalité atteint 100% au-delà de 20 jours d'exposition. Les lots intermédiaires sont également affectés ; la croissance des naissains est ralentie à mesure que les concentrations en zinc de l'eau de mer augmentent. L'impact du zinc sur la taille des naissains est visible dès le troisième jour d'exposition.

Le modèle de croissance selon Gompertz décrit une évolution sigmoïde de la taille des naissains exposés aux concentrations *témoin*, Z1 et Z2. Aux concentrations supérieures, aucune inflexion claire du modèle n'est observée et les données sont plutôt linéaires. Le taux de croissance maximal observé pour le lot *témoin* est donné par la pente du modèle de Gompertz ajusté 7 jours après le début de l'exposition. La valeur de cette pente était de  $71,9 \pm 5,1 \mu\text{m}\cdot\text{j}^{-1}$  (moyenne  $\pm$  ET,  $n=6$ ). Cette date de 7 jours d'exposition est également utilisée pour calculer, à partir des pentes du modèle de Gompertz, les taux de croissance moyens chez les autres groupes de naissains exposés au zinc.

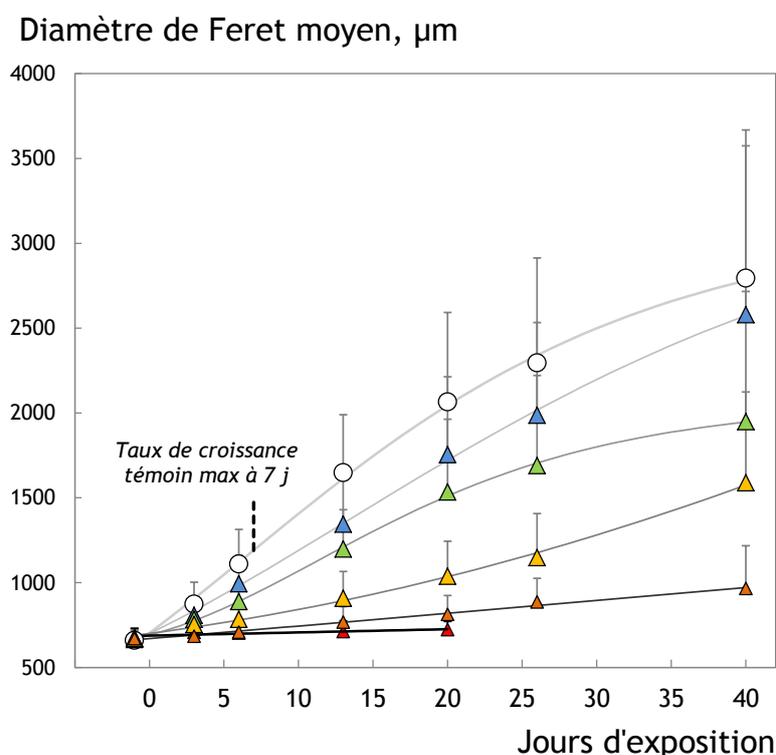


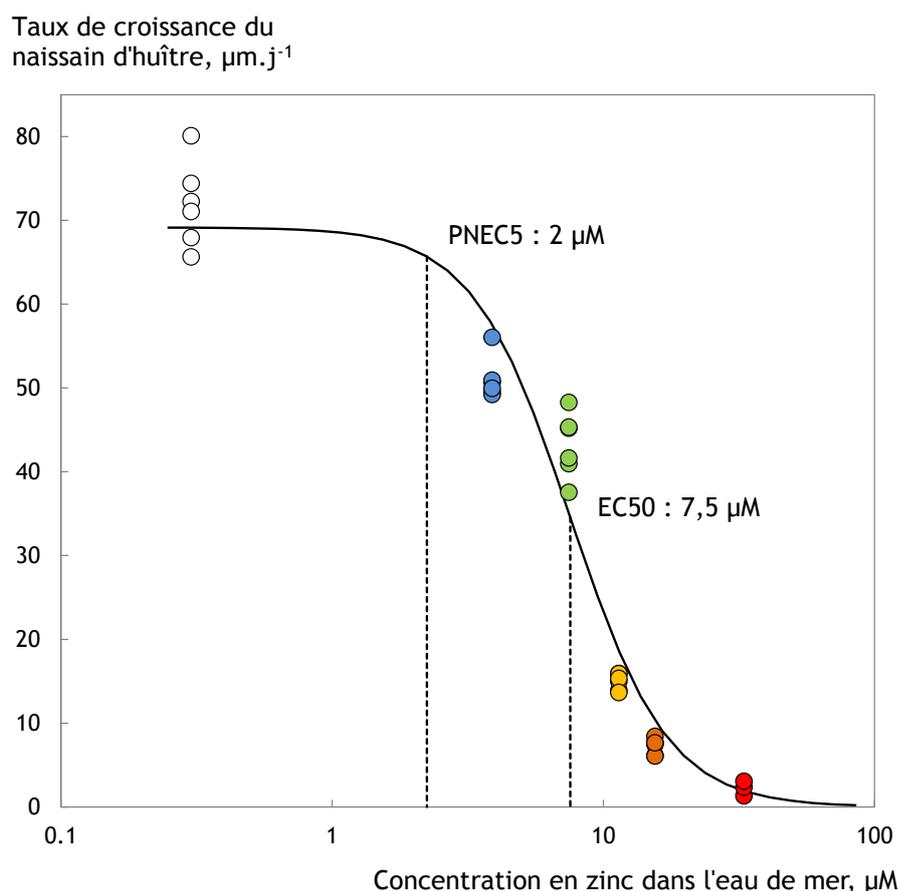
Figure 23 : croissance des naissains exposés à 6 concentrations en zinc dans l'eau de mer. Les valeurs sont les diamètres de *Feret* moyen et les barres d'erreurs supérieures rendent compte de l'écart-type. Les lignes continues correspondent aux ajustements du modèle de Gompertz.

Concentrations en Zn :  $\circ$  *témoin* : 0,3  $\mu\text{M}$ ,  $\triangle$  Z1 : 3,89  $\mu\text{M}$ ,  $\triangle$  Z2 : 7,46  $\mu\text{M}$ ,  
 $\triangle$  Z3 : 11,4  $\mu\text{M}$ ,  $\triangle$  Z4 : 15,5  $\mu\text{M}$ ,  $\triangle$  Z5 : 33,0  $\mu\text{M}$ .  
 — Modèle de Gompertz

### II.2.3.5 Impact du zinc sur le taux de croissance des naissains

Les données de taux de croissances à 7 jours, calculées pour chacun des six lots de naissains ( $n=40$  au début), ont été représentées en fonction de la concentration en zinc dans le milieu. La courbe dose-réponse de la [figure 24](#) a été dérivée de ces données par l'ajustement d'un modèle log-logistique.

La concentration en zinc qui réduit de 50% le taux de croissance des naissains (CE50) est calculée à partir de ces données et vaut  $7,55 \pm 0,42 \mu\text{M}$  (estimation  $\pm$  erreur standard,  $n=6$  à chaque concentration). Lors de l'ajustement du modèle log-logistique, le test de Shapiro-Wilk et le diagramme *Quantile-Quantile* ont rejeté l'hypothèse de normalité des résidus ce qui rend plus délicat le calcul d'une valeur d'erreur standard statistiquement cohérente. Pour ce faire, l'outil statistique bootstrap du logiciel R a été utilisé pour calculer des intervalles de confiance à 95% de la CE50 allant de 6,78 à 8,34.

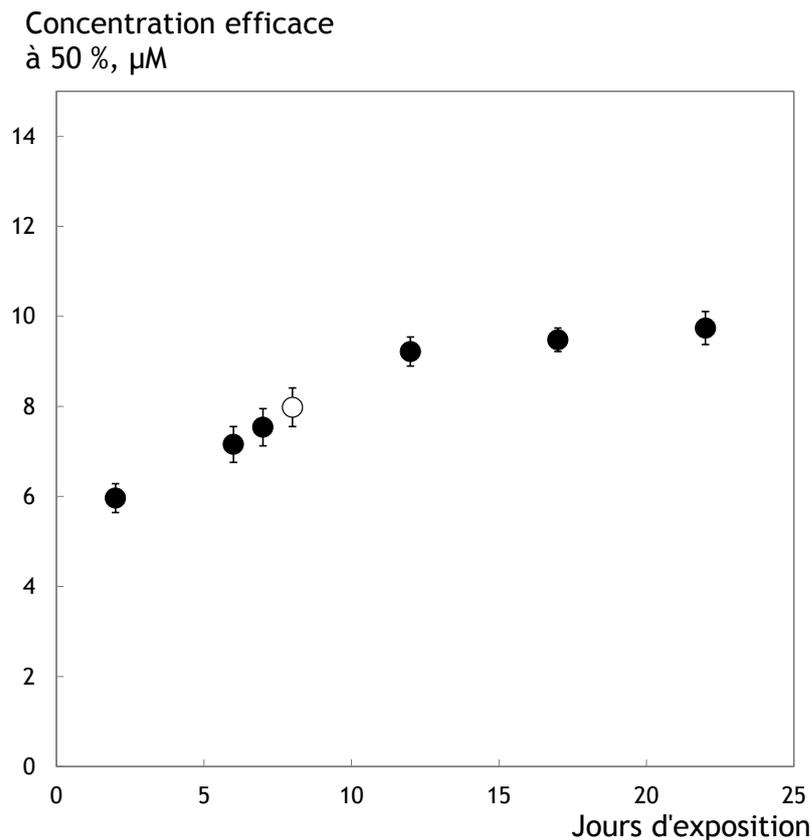


**Figure 24** : courbe dose-réponse illustrant l'effet chronique de la concentration en zinc dans l'eau de mer sur la croissance des naissains.

EC50 = concentration effective médiane ; PNEC5 = 5<sup>ème</sup> centile de la concentration prédite sans effet.

Concentrations en Zn :  $\circ$  témoin :  $0,3 \mu\text{M}$ ,  $\bullet$  Z1 :  $3,89 \mu\text{M}$ ,  $\bullet$  Z2 :  $7,46 \mu\text{M}$ ,  
 $\bullet$  Z3 :  $11,4 \mu\text{M}$ ,  $\bullet$  Z4 :  $15,5 \mu\text{M}$ ,  $\bullet$  Z5 :  $33,0 \mu\text{M}$ .  
— modèle log-logistique à 4 paramètres

L'influence du temps d'exposition choisi lors du calcul des taux de croissance sur la valeur de la CE50 est illustrée en [figure 25](#). Les traitements de données ont été répétés à différents temps pour des valeurs de taux de croissance calculés depuis le 2<sup>ème</sup> jusqu'au 22<sup>ème</sup> jour d'exposition. Les valeurs de CE50 associées varient de 6,0 à 9,7  $\mu\text{M}$ , respectivement.



**Figure 25** : sensibilité de la CE50 chez les naissains exposés chroniquement au zinc (estimation  $\pm$  ES,  $n=6$ ).

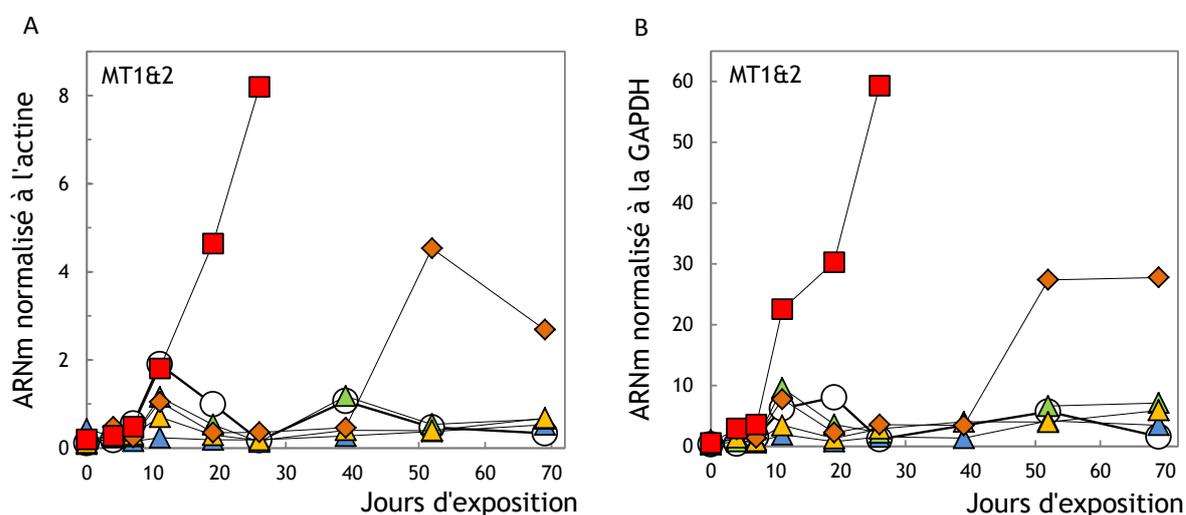
○ valeur de CE50 retenue pour l'étude

### II.2.3.6 Suivi des mesures d'expression transcriptionnelle des 9 gènes ciblés chez les naissains exposés à six concentrations en zinc

La [figure 26](#) représente les résultats des mesures d'expression transcriptionnelle de MT1 et MT2 des naissains au cours des 69 jours d'exposition aux 6 niveaux de contamination en zinc. Les données sont très similaires quand elles sont normalisées aux trois ARN de référence. Avant le début de l'exposition des naissains au zinc, les niveaux d'expression des gènes MT1 et MT2 des naissains *témoin* sont cohérents avec ceux d'huîtres adultes élevées en laboratoire dans des conditions *témoin* ([Farcy et al. 2011](#)) et également avec ceux d'huîtres prélevées de l'environnement naturel à la même période de l'année ([Farcy et al. 2007](#)). Le niveau d'expression des métallothionéines dans les naissains *témoin*

reste stable tout le long de l'expérimentation et dans les gammes de 0,1-1,9 et 0,3-8,0 une fois normalisés à l'actine et la GAPDH, respectivement.

Les niveaux de MT1 et MT2 dans les naissains exposés aux concentrations Z1, Z2 et Z3 sont semblables à ceux mesurés dans les *témoin* tout le long de l'expérimentation. Depuis le jour 0 jusqu'au jour 39 de l'exposition, le même niveau d'ARNm a été mesuré dans les naissains exposés à la concentration Z4, mais il augmente après 52 jours d'exposition pour atteindre une valeur 5 (normalisée à actine) ou 10 (normalisée à la GAPDH) fois plus importante que la valeur *témoin*. La même observation est faite à propos des naissains exposés à la plus forte concentration en zinc (Z5). Après 11 jours d'exposition, le niveau d'ARNm commence à augmenter pour atteindre un niveau 50 fois plus important que le niveau *témoin* après 26 jours d'exposition.



**Figure 26** : niveau d'expression transcriptionnelle des gènes codant pour les métallothionéines (MT1 et MT2) en réponse à une exposition chronique à différentes concentrations en zinc de l'eau de mer.

Les données sont normalisées aux ARNm de références de l'actine (A) et du glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GADPH) (B).

Concentrations en Zn : —○— *Témoin* : 0,3  $\mu\text{M}$ , —▲— Z1 : 3,89  $\mu\text{M}$ , —△— Z2 : 7,46  $\mu\text{M}$ , —▲— Z3 : 11,4  $\mu\text{M}$ , —◇— Z4 : 15,5  $\mu\text{M}$ , —■— Z5 : 33,0  $\mu\text{M}$ .

Au cours de cette étude, les niveaux d'expression transcriptionnelle de tous les autres gènes ciblés (hsp70, hsp72, hsp90, SOD, GST, P450, MXR, p53) normalisés à l'actine, à la GAPDH et à l'ARNr 18S ne montrent pas de réponse claire liée à l'exposition des naissains au zinc. Comparé au groupe *témoin*, aucun changement n'est observé au regard du niveau d'exposition au zinc et du temps d'exposition (données non représentées).

Lors de cette première exposition de naissains au zinc, les valeurs de concentrations mesurées dans l'eau de mer allaient de 0,302  $\mu\text{M}$  (*témoin*) à 33  $\mu\text{M}$  (Z5). La croissance s'est révélée être un paramètre sensible et précoce par opposition à l'expression transcriptionnelle des 9 gènes de stress ciblés qui n'ont pas apporté plus d'information que les données de mortalité.

Par la suite, l'expérimentation a été répétée en utilisant les mêmes concentrations ainsi que de nouvelles concentrations inférieures à Z1 (3,89  $\mu\text{M}$ ). Cette nouvelle expérience avait pour but de 1) tester la reproductibilité du modèle *naissain* au regard de la croissance, 2) tester les effets potentiels du zinc sur la croissance à des niveaux d'exposition plus bas (0,91 et 1,58  $\mu\text{M}$ ), 3) confirmer ou infirmer les mesures d'expression transcriptionnelle des MT (qPCR), 4) explorer les mécanismes de régulation au niveau post-traductionnel via les mesures d'activités de la phénoloxydase et la GST après 20 jours d'exposition. A cette date, les valeurs de concentrations en zinc dans les naissains sont quasiment constante ([figure 21](#)). L'index ORAC a également été utilisé à cette même date, aux concentrations *témoin*, Z1 et Z2, pour estimer le pouvoir antioxydant des tissus.

Les résultats de cette deuxième expérimentation ont montré que 1) la mesure de croissance des naissains *témoin* et exposés au zinc est un paramètre très reproductible, 2) des niveaux d'exposition inférieurs à Z1 n'ont pas d'effet sur la croissance des naissains, 3) parmi les 9 gènes ciblés, seuls les ARNm de MT1&2 sont surexprimés, tardivement, aux plus fortes concentrations de la même manière que la première expérience.

Les données relatives aux mesures d'activités enzymatiques sont exposées dans la partie suivante.

### ***II.2.3.7 Effets du zinc sur trois activités enzymatiques chez le naissain***

Lors des études d'activité enzymatiques, chaque mesure a été réalisée à partir de 3 échantillons de plusieurs dizaines de naissains.

La [figure 27](#) représente les activités des PO mesurées chez des naissains exposés pendant 20 jours à trois niveaux de contamination en zinc (0,302, 3,89 et 7,45  $\mu\text{M}$ ). La TPCK et la tropolone ont été utilisées comme modulateur de l'activité PO.

Il existe un gradient d'effet positif du zinc sur l'activité de la PO chez les trois groupes de naissains. L'activité PO augmente de près d'un facteur 2 chez les naissains exposés à 7,45  $\mu\text{M}$  par rapport au groupe *témoin* ( $p < 0,0005$  ; test-t de student). Aucune différence significative de l'activité PO n'a été observée chez des naissains exposés à la concentration intermédiaire de 1,59  $\mu\text{M}$  (données non représentées). La TPCK induit une légère diminution de l'activité PO chez les groupes de naissains exposés à 0,302 et 3,89  $\mu\text{M}$  de zinc tandis qu'il ne semble pas avoir d'effet à la plus forte concentration. La tropolone engendre une réduction drastique de l'activité PO chez les trois groupes de naissains qui redescend à un niveau basal inférieur à 5  $\mu\text{mole}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  protéines totales.

Activité spécifique des PO à 20 jpe,  
 $\mu\text{mole}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  protéines totales

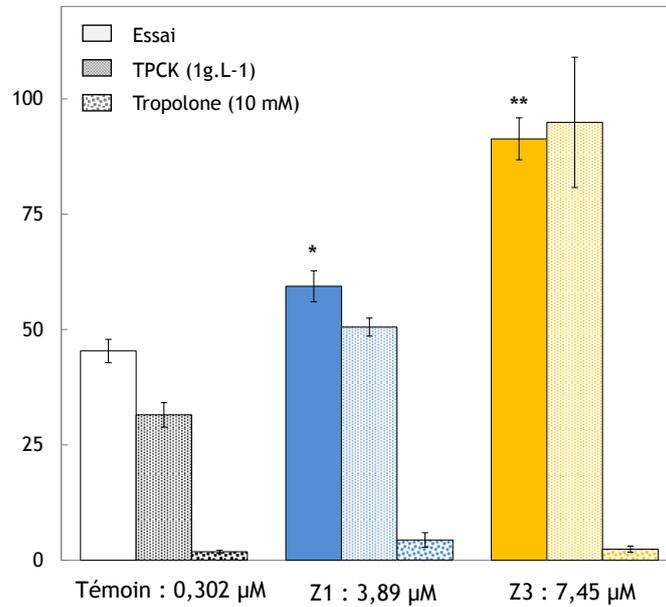


Figure 27 : Activité spécifique des phénoloxydases.  
 \*  $p < 0,005$  ; \*\*  $p < 0,0005$  ; test-t de student vs. *témoin*.

La figure 28 rassemble les mesures d'activités des enzymes antioxydantes chez des naissains exposés 20 jours à 0,302, 3,89 et 7,45  $\mu\text{M}$  de zinc. Le niveau d'activité des enzymes antioxydantes est significativement augmenté, d'un facteur 2 par rapport au groupe *témoin*, dès 3,89  $\mu\text{M}$  (ANOVA,  $p < 0,005$  ;  $n=3$ ). Le niveau d'activité à la concentration de 7,45  $\mu\text{M}$  reste le même qu'à 3,89  $\mu\text{M}$ .

Activité des enzymes antioxydantes à 20 jpe,  
 $\text{mmole}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  protéines totales

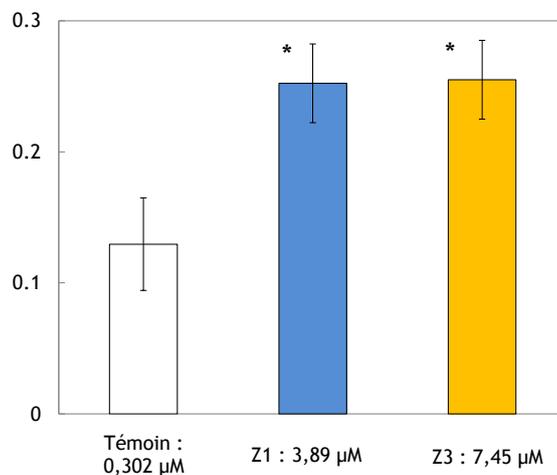
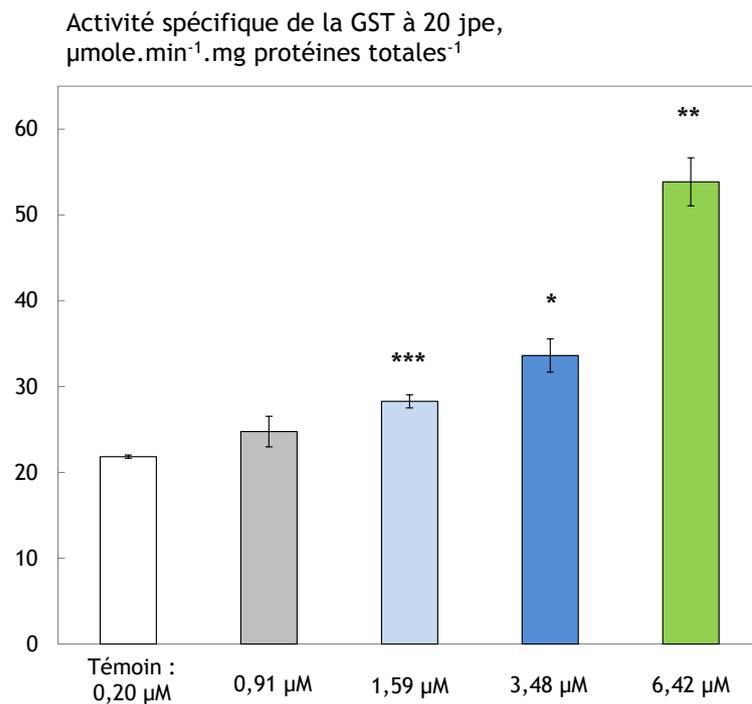


Figure 28 : Activité des enzymes antioxydantes.  
 \*  $p < 0,005$  ; ANOVA.

La [figure 29](#) représente les niveaux d'activité spécifique de la GST mesurés chez des naissains exposés 20 jours à des concentrations en zinc allant de 0,20 à 6,42  $\mu\text{M}$ . Une réponse dose-dépendante positive de l'activité de la GST vis-à-vis du zinc a été observée dès la plus faible concentration de 0,91  $\mu\text{M}$  et est significative dès 1,59  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,0005$  ; test-t de student). Le niveau de l'activité de la GST est environ 2,5 fois plus important chez les naissains exposés à 6,42  $\mu\text{M}$  par comparaison avec le groupe témoin.



**Figure 29 :** Activité spécifique de la GST.  
 Comparaisons avec le groupe *Témoin* : Test-t de student avec correction de Welch si hétéroscédasticité ; \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,005$  ; \*\*\*  $p < 0,0005$ .

A titre informatif, les tendances évolutives des paramètres intégrés et moléculaires, mesurés après 20 jours d'exposition au zinc, sont comparées dans le [tableau 3](#). La mortalité et l'expression transcriptionnelle des 9 gènes ciblés ne sont pas affectées aux plus faibles concentrations. La taille des naissains est affectée négativement à partir de 3,48  $\mu\text{M}$ . Les activités phénoloxydases et d'enzymes antioxydantes sont stimulées à partir de 3,89  $\mu\text{M}$  de zinc. Ces deux paramètres ne sont pas plus sensibles que la croissance après 20 jours d'exposition. La GST est quant à elle significativement stimulée dès 1,59  $\mu\text{M}$  de zinc ce qui en fait le paramètre le plus sensible à ce temps d'exposition.

**Tableau 3** : tableau récapitulatif illustrant les tendances de variations des différents paramètres biologiques étudiés lors des expositions de naissains au zinc.

		Concentration moyenne en zinc, $\mu\text{M}$					
		0.91	1.59	3.48	3.89	6.42	7.45
Mortalité							
Croissance							
Activités enzymatiques	PO						
	ORAC						
	GST						
Niveau d'ARNm de MT1&2							

	Non significativement différent du groupe <i>témoin</i>
	Significativement différent du groupe <i>témoin</i>
	Donnée indisponible

## II.2.4 EFFETS CHRONIQUES DU ZINC SUR LES LARVES

### II.2.4.1 Concentration en zinc dans le milieu d'exposition des larves

Le [tableau 4](#) rassemble les concentrations en zinc, exprimées en  $\mu\text{M}$ , mesurées dans l'eau de mer des quatre bacs d'exposition des larves. Les données correspondent aux valeurs moyennes de mesures effectuées à partir d'échantillons d'eau prélevés lors des changements de milieux. Aucune différence significative n'est observée entre les moyennes de concentrations en zinc mesurées avant et après les changements d'eau de chaque bac (test de Shapiro-Wilk,  $p > 0.05$  ; ANOVA,  $p > 0.05$ ). Par conséquent, les concentrations en zinc dans le milieu sont considérées constantes tout le long de l'expérience.

**Tableau 4**: concentrations en Zinc (en  $\mu\text{M}$ ) dans l'eau de mer des unités expérimentales lors des expositions des larves et naissains (moyenne  $\pm$  ET).

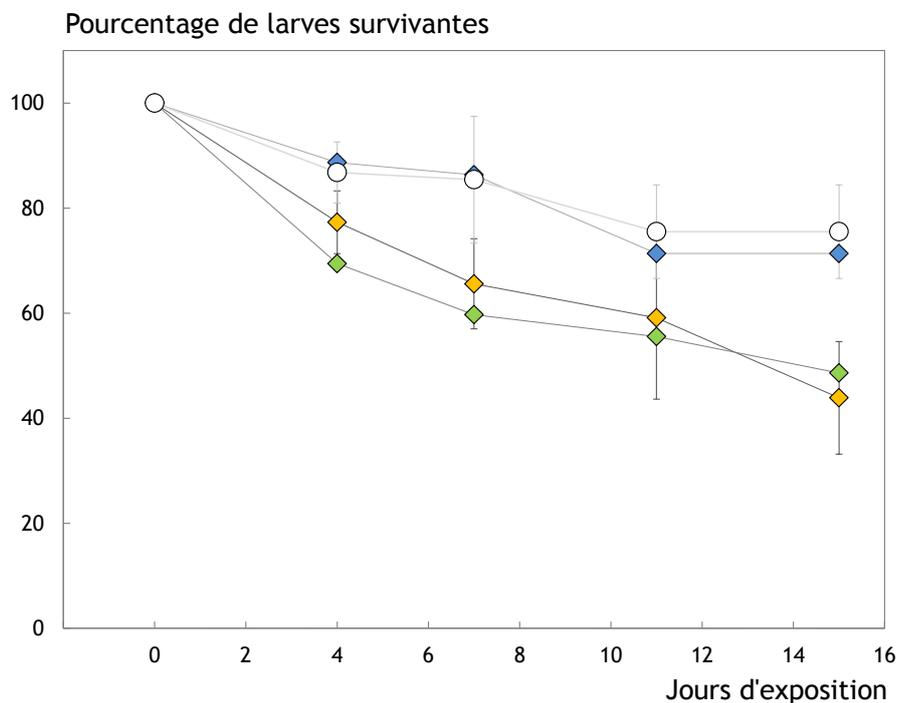
	Larves (n=6)
<i>Témoin</i>	0.317 $\pm$ 0.016
<i>Za</i>	0.86 $\pm$ 0.03
<i>Zb</i>	1.67 $\pm$ 0.06
<i>Zc</i>	4.18 $\pm$ 0.21

#### II.2.4.2 Suivre de la mortalité des larves exposées au zinc

La [figure 30](#) représente les pourcentages de survie des larves exposées aux quatre concentrations en zinc en fonction du temps. Le pourcentage de survie du groupe *témoin* est de 85,4% après 7 jours et de 75,5% après 15 jours d'expérimentation. Les larves exposées à la concentration *Za* présentent un pourcentage de survie comparable au pourcentage de survie *témoin*.

Lors du 4<sup>ème</sup> jour d'exposition, les populations de larves exposées aux concentrations *Zb* et *Zc* présentent des pourcentages de survie plus faibles que le groupe *témoin* valant 69,4% et 77,3%, respectivement. Cette tendance à la diminution du pourcentage de survie chez les groupes *Zb* et *Zc* se confirme aux dates ultérieures. Après 15 jours d'exposition, le pourcentage de larves survivantes est de 48,6% et 43,9% pour les larves exposées à *Zb* et *Zc*, respectivement.

Les analyses statistiques sont réalisées à partir des valeurs de survie de chacune des trois sous-populations de larves placées dans les trois cages de chaque UE. Malgré les tendances suggérées par la représentation graphique ([Figure 30](#)), les différences entre les pourcentages de survie des quatre groupes d'exposition (correspondant aux quatre concentrations en zinc dans l'eau de mer) ne sont pas statistiquement significatives après 15 jours d'exposition (ANOVA,  $p > 0.05$ ).



**Figure 30** : pourcentage de larves survivantes exposées à 4 niveaux de concentration en zinc ( $ZnCl_2$ ) dans l'eau de mer.

Au jour zéro de l'exposition, les larves étaient âgés de 2 *jpf*, et la population de chaque lot comptait une centaine d'individus.

Concentrations en Zn : —○— *témoin* (moy.  $\pm$ ET,  $n=3$ ) : 0,317  $\mu$ M, —◇— *Za* : 0,867  $\mu$ M,  
—◇— *Zb* : 1,67  $\mu$ M, —◇— *Zc* (moy.  $\pm$ ET,  $n=3$ ) : 4,18  $\mu$ M;

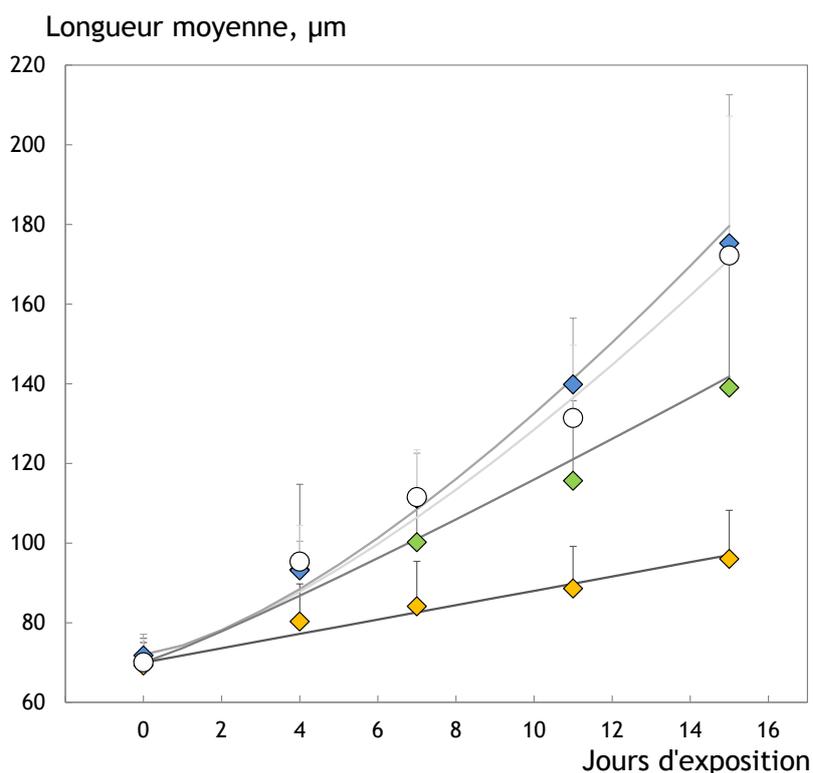
### II.2.4.3 Suivi des longueurs moyennes des larves exposées au zinc

La [figure 31](#) rassemble les données de croissances observées chez des larves exposées aux quatre concentrations en zinc. Le premier jour de l'exposition au zinc, la longueur moyenne des larves est de  $71 \pm 5,7 \mu\text{m}$  ( $n=404$ ).

Les taux de croissance maximum sont observés chez les larves exposées aux concentrations en zinc *témoin* et *Za*. Leurs longueurs moyennes finales sont respectivement de  $172 \mu\text{m}$  ( $\pm 35,0 \mu\text{m}$  ;  $n=63$ ) et  $175 \mu\text{m}$  ( $\pm 37,3 \mu\text{m}$  ;  $n=87$ ) après 15 jours d'exposition. La croissance la plus faible est observée chez les larves exposées à la plus forte concentration en zinc *Zc* : diamètre moyen de  $96,0 \pm 12,2$  après 15 jours d'exposition ;  $n=54$ . La croissance des larves exposées à la concentration *Zb* est également affectée mais à un degré intermédiaire.

La croissance des larves est ralentie à mesure que les concentrations en zinc dans l'eau de mer augmentent. L'impact du zinc sur la longueur des larves du groupe *Zc* est visible dès le 4<sup>ème</sup> jour d'exposition tandis que le groupe de larves *Zb* se démarque du groupe *témoin* à partir de la 2<sup>ème</sup> semaine d'exposition. Les courbes de croissances des larves exposées aux conditions *témoin* et *Za* sont très proches l'une de l'autre et suggèrent que le zinc n'induit pas de ralentissement de la croissance larvaire à cette concentration. Un léger effet hormétique non significatif du zinc sur la croissance larvaire est observé à la concentration (*Za*).

Un modèle de croissance exponentiel est utilisé pour décrire l'évolution de la taille moyenne des larves exposées aux concentrations *témoin*, *Za* et *Zb* tandis qu'un modèle linéaire est utilisé pour décrire la croissance des larves exposées à la plus forte concentration *Zc*. En effet, aucune inflexion des courbes de croissances n'est observée chez l'ensemble des larves. Ainsi, le taux de croissance maximal est observé pour le lot *témoin* à la toute fin de l'expérimentation. Les taux de croissance des larves *témoin* ont été calculés à partir des pentes du modèle exponentiel ajusté à 7 et 14 jours d'exposition au zinc. Les valeurs des pentes sont de  $6,06 \pm 0,24 \mu\text{m}\cdot\text{j}^{-1}$  et  $7,63 \pm 0,29 \mu\text{m}\cdot\text{j}^{-1}$  (moyenne  $\pm$  ET,  $n=2$ ), respectivement. La date de 7 jours d'exposition est utilisée pour calculer les taux de croissance moyens des autres groupes.



**Figure 31** : croissance des larves exposées à 4 concentrations en zinc ( $\text{ZnCl}_2$ ) dans l'eau de mer. Les valeurs correspondent aux longueurs moyennes et les barres d'erreurs supérieures rendent compte de l'écart-type. Les lignes continues correspondent aux ajustements à un modèle exponentiel.

Concentrations en Zn :  $\circ$  témoin ( $n_{j_0}=83$ ) :  $0,317 \mu\text{M}$ ,  $\blacklozenge$  Za ( $n_{j_0}=119$ ) :  $0,867 \mu\text{M}$ ,  
 $\blacklozenge$  Zb ( $n_{j_0}=72$ ) :  $1,67 \mu\text{M}$ ,  $\blacklozenge$  Zc ( $n_{j_0}=130$ ) :  $4,18 \mu\text{M}$ .  
 modèle exponentiel

#### II.2.4.4 Impact du zinc sur le taux de croissance des larves

La **figure 32** présente les données de taux de croissance moyens ( $\pm$  ET) calculées pour chaque lot de larves à 7 jours d'exposition en fonction de la concentration en zinc dans le milieu. La concentration qui réduit de 50% le taux de croissance des larves (EC50) est dérivée à partir de ces données est vaut  $2,65 \pm 0,22 \mu\text{M}$  (estimation  $\pm$  erreur standard,  $n=3$ ). L'outil statistique bootstrap du logiciel R a été utilisé pour obtenir un intervalle de confiance à 95% de l'EC50 allant de 2,30 à 3,01  $\mu\text{M}$ .

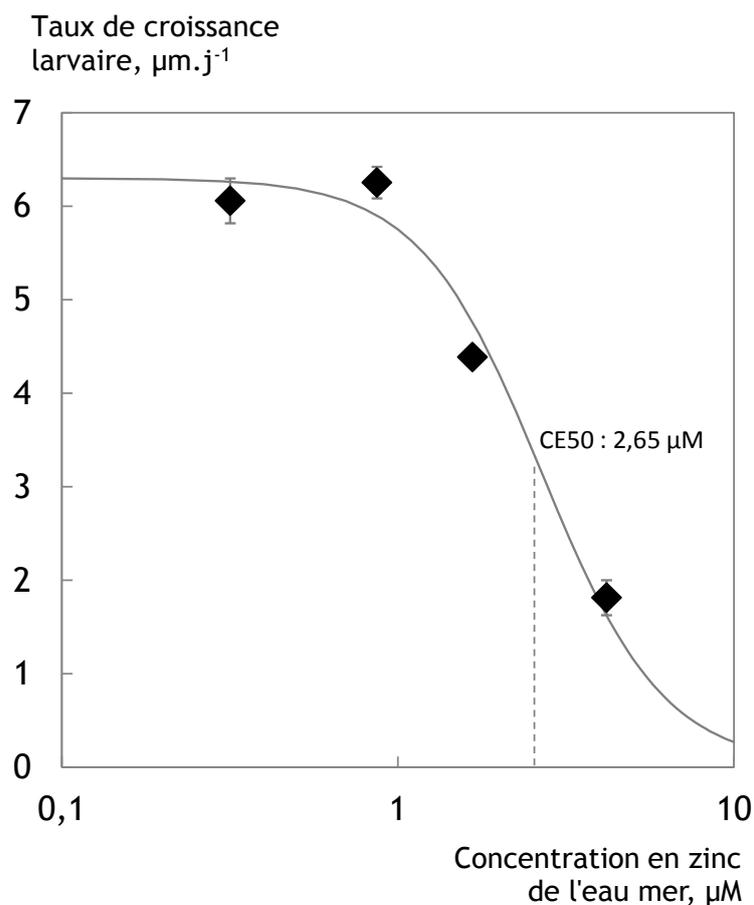


Figure 32 : courbe dose-réponse illustrant l'effet chronique de la concentration en zinc dans l'eau de mer sur la croissance des larves.

EC50 = concentration effective médiane.

— modèle log-logistique à 4 paramètres

A titre informatif, le traitement des données a été répété pour les taux de croissance calculés pour chaque lot après 14 jours d'exposition. La valeur de CE50 correspondante est de  $2,03 \pm 0,22 \mu\text{M}$  (estimation  $\pm$  erreur standard,  $n=3$ ) et est donc inférieure à celle de  $2,65 \mu\text{M}$  calculée à 7 jours d'exposition.

Lors des expositions chroniques de larves au zinc, il n'a pas été possible d'apprécier convenablement des paramètres cellulaires, moléculaires et de concentration en zinc. En effet, la mesure de ces paramètres au cours du temps aurait nécessité un nombre de larves et un volume plus important de nos unités expérimentales. Or, l'une des principales contraintes à laquelle il a fallu se tenir lors du développement de notre modèle biologique a été la miniaturisation des aquariums et la réduction à l'extrême des volumes mis en jeu pour préparer les expérimentations radio-marquées. Notre attention a donc été principalement portée sur les mesures conservatives de la croissance et de la mortalité larvaires.

## II.2.5 DISCUSSION SUR LES EFFETS CHRONIQUES DU ZINC SUR LES JUVENILES D'HUITRES JAPONAISES

### II.2.5.1 Concentration en zinc de l'eau de mer

Les concentrations en zinc, dans l'eau de mer de surface en plein océan, sont généralement inférieures à  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Brüggmann *et al.* 1983). A proximité des côtes, l'eau de mer est influencée par de nombreux processus liés aux activités humaines. Les peintures antisalissure des bateaux et les anodes sacrificielles peuvent augmenter la concentration en zinc dans l'eau de mer, particulièrement à proximité des ports (Bird *et al.* 1996). Dans le Nord Cotentin (Normandie), des valeurs de concentrations en zinc comprises entre 3 et  $12 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ont récemment été observées (Mottin 2010). Au cours de nos études, les valeurs de concentrations mesurées avoisinaient  $21 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $0,3 \mu\text{M}$ ). Les concentrations en zinc de notre eau de mer *témoin* étaient supérieures à celles mesurées en plein océan mais dans la gamme de concentrations attendue dans une eau de mer influencée par les activités humaines.

La PNEC5 calculée à partir de la courbe dose-réponse établie lors des expositions des naissains au zinc ( $2 \mu\text{M}$ ), ainsi que l'EC50 dérivée des données de croissance larvaires ( $2,65 \mu\text{M}$ ), sont beaucoup plus importantes que la concentration en zinc mesurée dans notre milieu de culture *témoin* ( $0,3 \mu\text{M}$ ). La valeur de PNEC5 des données de croissance larvaire n'a pas été dérivée de la courbe dose-réponse car il n'est pas exclu qu'un effet hormétique du zinc existe aux plus faibles concentrations.

### II.2.5.2 Concentration en zinc dans les juvéniles

Le but de ces expérimentations était d'exposer chroniquement en laboratoire des larves et des naissains à un contaminant test : le zinc. Le zinc était ajouté dans l'eau de mer sous forme de  $\text{ZnCl}_2$  où il se dissout en ion  $\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})^{2+}$  et forme des complexes avec des ligands organiques et inorganiques (Moore et Ramamoorthy 1984, Ellwood et Van den Berg 2000).

Les suivis des concentrations en zinc dans les milieux d'exposition de chaque UE ont montré qu'elles étaient constantes et que l'incorporation par les juvéniles n'engendraient pas de diminution significative des teneurs en zinc dans l'eau. Les dispositifs d'exposition des larves ne permettaient pas d'élever une quantité suffisante d'individus pour réaliser un suivi des teneurs en zinc dans l'animal. Nous ne pourrions donc qu'extrapoler les résultats de concentrations obtenues chez les naissains vers les larves. Les mesures de concentrations dans l'eau de mer des naissains ont été réalisées jusqu'au jour 38 d'exposition. Au-delà de cette date, les teneurs en zinc dans la chair et la coquille des naissains étaient stables ; il n'y a donc aucune raison de suspecter une modification des teneurs en zinc dans l'eau de mer après cette date.

La spéciation chimique du zinc dans l'eau de mer et ses mécanismes d'incorporation dans les huîtres sont nombreux et complexes (Rainbow et Luoma 2011). Par conséquent, il était important de contrôler les teneurs en zinc dans les naissains. L'eau de mer et la nourriture sont notamment deux voies d'entrée du zinc dans les naissains. La petite taille des jeunes naissains n'a toutefois pas permis de

dissocier les parties molles de la coquille lors des mesures au SAA-F qui ont par conséquent été rapportées à l'ensemble de l'animal (chair et coquille).

Les cinétiques d'incorporation du zinc dans les naissains entiers apportent plusieurs informations. La teneur en zinc dans les naissains augmente rapidement en fonction du gradient de concentration de l'eau de mer ; elle semble se stabiliser après 3 semaines d'exposition. La concentration en zinc dans les naissains exposés à 33,0  $\mu\text{M}$  de zinc (UE Z5) présente néanmoins une évolution différente due à la forte mortalité dont a été atteint le groupe. L'explication la plus probable repose sur l'augmentation du nombre d'individus morts (figure 22) qui a entraîné une sous-estimation de l'incorporation en zinc (figure 21, données entre parenthèses) due à la réduction du rapport partie molle/coquille des naissains entiers. Cependant, ce biais montre que la contribution des parties molles n'était pas masquée par celle de la coquille. La forte mortalité observée chez les naissains exposés à 15,5  $\mu\text{M}$  (UE Z4) après 10 semaines (figure 22) induit le même biais et se traduit par une diminution de la teneur en zinc.

Chez les groupes de naissains n'ayant pas subi de forte mortalité (groupes *témoin*, Z1, Z2, et Z3), les rapports de concentrations en zinc entre les naissains et l'eau de mer augmentent en fonction du gradient de l'eau de mer et prennent des valeurs allant de 2022 (*témoin*) à 3213 (Z3) L.  $\text{kg}^{-1}$  de poids sec à la fin de l'exposition. Ces données indiquent que l'état d'équilibre n'a pas encore été atteint alors que les concentrations en zinc dans les naissains semblent s'être stabilisées (figure 21).

Les résultats obtenus peuvent également être biaisés avec des différences dues à la partition du zinc entre les parties molles et la coquille. En effet, les temps de demi-vie biologique du zinc dans les tissus d'huîtres se comptent en années (Geffard *et al.* 2002a). L'hypothèse que l'état d'équilibre ne soit pas encore atteint est également soutenue par le fait que la bioaccumulation du zinc est généralement inversement corrélée à la concentration en zinc dans le milieu (McGeer *et al.* 2003, DeForest *et al.* 2007). D'après la littérature, le ratio de concentration en zinc dans des mollusques (en L. $\text{kg}^{-1}$  de poids frais), peut atteindre des valeurs de l'ordre de  $10^5$  (Ancellin *et al.* 1979). Enfin, la distribution en zinc dans les différents organes de l'huître peut être hétérogène (Bustamante et Miramand 2005).

### II.2.5.3 Nutrition

En plus de la nécessité de changer fréquemment le milieu d'exposition, afin d'éviter tout risque de pollution des UEs par les produits du métabolisme des huîtres, il était important d'apporter la nourriture indispensable au bon développement des juvéniles.

Lors de la première semaine de vie des larves, le régime alimentaire se constituait d'un mélange de *P. lutheri* et de *Pseudl. galbana* puis *P. lutheri* a été remplacée par *C. calcitrans* à compter de la deuxième semaine. Les naissains étaient nourris quant à eux d'un mélange de *P. lutheri* et *C. calcitrans*. L'approvisionnement normalisé en phytoplancton a été rendu possible grâce à la proximité de l'écloserie qui fournissait des cultures constantes. La densité cellulaire était suivie tout le long des périodes d'exposition en prenant garde d'apporter exactement la même quantité de phytoplancton

dans chaque UE lors des changements de milieu. La densité cellulaire était maintenue au-dessus de  $5,6 \cdot 10^4$  cellules par  $\text{mL}^{-1}$  (Robert et Gérard 1999, Helm *et al.* 2006) afin d'assurer que les juvéniles puissent se nourrir à volonté tout le long des expérimentations.

#### II.2.5.4 Croissance et courbe dose-réponse

La croissance des larves et naissains d'huître japonaise présente une forte variabilité. A titre d'exemple, les valeurs d'écart-type relatifs mesurés chez les naissains (normalisées à la valeur moyenne) à partir d'une large population ( $n=240$  individus au début), augmentent à mesure que les naissains grandissent et passent d'une valeur de 8% (16 *jpf*) à 30% (58 *jpf*). La croissance d'un grand nombre d'individu était suivie au cours du temps ce qui permet une bonne appréciation statistique de ce paramètre malgré sa forte variabilité.

Les mesures conservatives de la croissance à partir de ces grandes populations de juvéniles (au début de l'exposition :  $n=240$  naissains et  $n \approx 100$  larves) ont permis d'obtenir des données robustes de mortalité et de distribution des tailles au cours du temps. Un paramètre de masse ou de volume aurait été idéal pour étudier la croissance des naissains. A défaut, le traitement de photos numériques a permis la mesure des diamètres de *Feret* et d'aires de naissains d'un grand nombre d'échantillons. Les mesures d'aires sont intéressantes car elles permettent de tenir compte de la forme hétérogène de la coquille des naissains. Elles donnent des résultats très similaires à ceux obtenus à partir des diamètres de *Feret*. Ce dernier a été finalement choisi pour représenter les données de croissance de ces travaux de thèse.

La croissance des juvéniles a été analysée en ajustant un modèle de Gompertz (naissains) ou exponentiel (larves) aux valeurs moyennes de tailles de chaque réplicas (6 tamis pour les naissains et 3 pour les larves) à différents temps d'exposition. Pour ce qui est des naissains, le taux de croissance maximal a été obtenu par ajustement du modèle de Gompertz aux données de croissance *témoin* au 7<sup>ème</sup> jour de l'exposition. De la même manière, ce temps de 7 jours a été retenu pour calculer les taux de croissance des naissains contaminés au zinc mais également pour calculer les taux de croissance, à partir des pentes des ajustements exponentiels, des groupes de larves *témoin* et contaminées au zinc.

Plusieurs arguments nous ont orienté vers le choix de ce temps. Premièrement, le taux de croissance maximal était observé à 7 jours pour le groupe de naissains *témoin*. Deuxièmement, après 7 jours d'exposition, le taux de survie des naissains est de 100% et ce même à la plus forte concentration en zinc. Une trop forte mortalité serait source d'un biais car les survivants pourraient être sélectionnés pour leur résistance au zinc ou leur capacité réduite à incorporer correctement le zinc, ce qui aurait pu leur être défavorable dans des conditions environnementales normales. Dans ce dernier cas, les teneurs en zinc dans les parties molles ne sont certainement pas corrélées au gradient de concentration de l'eau de mer. La concentration dans les naissains entiers ne peut être représentative de l'incorporation en zinc dans les parties molles, comme cela a été discuté précédemment. Troisièmement, au jour 7 de l'exposition, les teneurs en zinc dans les naissains entiers mesurées par SAA-F étaient à peu près en relation avec le niveau de contamination de l'eau de mer. L'équilibre de

concentration n'est cependant pas atteint et la contribution relative de la coquille et des compartiments mous était susceptible d'avoir des cinétiques différentes. Ainsi, les taux de croissance calculés à 7 jours d'exposition ont été utilisés pour calculer les courbes dose-réponse et les valeurs de CE50. L'influence du temps sur l'EC50 des naissains a été estimée lors d'une analyse de sensibilité. Les calculs ont été répétés à différents temps pour des valeurs de taux de croissance prises les jours 2 à 22 ; les valeurs d'EC50 varient de 6,0 à 9,7  $\mu\text{M}$ , respectivement. Elles peuvent être comparées aux intervalles de confiance à 95% données précédemment 6,8 à 8,3  $\mu\text{M}$  pour la CE50 obtenue à 7 jours. Pour ce qui est des larves, l'EC50 varie de 2,65 à 2,03  $\mu\text{M}$  entre 7 et 14 jours d'exposition, respectivement.

Alors que les courbes dose-réponse illustrent la toxicité de forts niveaux de zinc sur la croissance des juvéniles, une concentration trop faible en zinc induirait également une réduction de la croissance et une mortalité. Du fait de l'effet hormétique potentiel du zinc, il est important de ne pas extrapoler les courbes dose-réponse précédentes en-dessous des plus faibles concentrations utilisées. Les expérimentations sur les larves ont notamment montré un léger effet hormétique non significatif à la concentration  $Z_a$  de 0,86  $\mu\text{M}$ . Les effets des très faibles doses de zinc doivent donc être étudiés plus en détails.

Lors de ces travaux, la CE50 du zinc dans l'eau de mer au regard de la croissance a été estimé à 7,55  $\mu\text{M}$  (497  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) pour les naissains et 2,65  $\mu\text{M}$  (173  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) pour les larves. A titre de comparaison, d'autres études ont montré que des concentrations en zinc de 0,76 à 3,06  $\mu\text{M}$  induisaient un effet graduel sur la croissance des premiers stades de développement larvaires de *C. gigas*, ainsi que sur le nombre d'anomalies développementales et la mortalité. La croissance était stoppée à la plus forte concentration (Brereton *et al.* 1973). Watling (1982) a observé la croissance de larves de *C. gigas* âgées de 6 *jpf* exposées à différentes concentrations en zinc et a calculé une EC50 de 1,22  $\mu\text{M}$  (96h) et une concentration létale à 50% de 1,53  $\mu\text{M}$  (96h). Ces observations suggèrent que les stades de développement précédant la métamorphose de l'huître japonaise sont plus sensibles au zinc que les jeunes naissains.

### II.2.5.5 Mesures d'expression transcriptionnelle de gènes ciblés

Des études sur des adultes ont couramment porté sur des paramètres biologiques différents de la croissance. Par exemple, Mottin (2010) a exposé des huîtres japonaises adultes durant 10 semaines à une concentration en zinc dans l'eau de mer de 8,11  $\mu\text{M}$ , et n'a pas observé de mortalité, mais une réduction du nombre d'hémocytes, une augmentation de 85% de la production d'espèce réactives à l'oxygène et une augmentation du niveau d'expression transcriptionnel des gènes codant pour MT1&2, MXR et SOD. Une autre étude a montré que des huîtres adultes exposées à des concentrations en zinc allant de 0,0153 à 1529  $\mu\text{M}$  pendant 48h présentaient des profils électrophorétiques de protéines spécifiques de chaque concentration (Meiller et Bradley 2002).

Dans la présente étude sur les jeunes naissains d'huîtres, l'analyse des expressions transcriptionnelles de gènes ciblés n'a pas permis de mettre en évidence un effet dose-dépendant entre la concentration en zinc de l'eau de mer et les niveaux d'expression transcriptionnelle des 9 gènes de stress excepté

pour les métallothionéines (MT1&2). Le peu de matériel biologique disponible n'a pas permis de réaliser de réplicat mais les extractions d'ARN ont été réalisées à partir d'échantillons de plusieurs dizaines d'individus. Il n'a pas été possible de dériver de barre d'erreur de ces mesures et les résultats sont uniquement représentés graphiquement sans traitement statistique. Cependant, les variations du niveau témoin de notre étude, ainsi que de précédentes données recueillis par [Farcy \(2007, 2011\)](#) sur des échantillons d'huîtres adultes traités avec les mêmes amorces, permettent d'estimer la variabilité du signal. Aucune mesure n'a été réalisée sur le modèle *larve* du fait du manque de matériel disponible.

Les gènes codant pour les métallothionéines MT1&2 sont supposés être stimulés lors d'une pollution métallique ([Kägi 1991](#), [Vasseur et Cossu-Leguille 2003](#)). Néanmoins, une augmentation des ARNm de MT1 et MT2 a seulement été observée aux plus fortes concentrations expérimentales, 15,5 et 33,0  $\mu\text{M}$  à 52 et 18 jours d'exposition, respectivement. D'autres auteurs ont observé que des gènes codant pour des MT étaient surexprimés dans des branchies d'huîtres *C. gigas* adultes après exposition au zinc ([Bourdineaud et al. 2006](#), [Marie et al. 2006a, 2006b](#)). Une augmentation de protéines de métallothionéines chez des huîtres a également été démontrée après exposition au zinc ([Geffard et al. 2001, 2002a, 2002b](#)) dont des larves ([Geffard et al. 2007](#)). [Mottin \(2010\)](#) a observé une augmentation des niveaux d'ARNm codant pour des MT après 4 semaines d'expositions à 8,11  $\mu\text{M}$  de zinc ; le niveau maximal atteint une valeur 20 fois supérieures au groupe *témoin* après 7 semaines d'exposition. [Marie et al. \(2006\)](#) a rapporté une augmentation significative de la concentration en MT chez *Corbicularia fuminea*, un bivalve d'eau douce exposée durant 24 jours à 15,3  $\mu\text{M}$  de zinc dans l'eau alors qu'à cette concentration aucune variation significative de MT n'a été observé chez la moule zébrée *Dreissena polymorpha*, à la fois au niveau du transcriptome et du protéome. Dans d'autres études, [Marie et al. \(2006b\)](#) ont aussi rapporté l'absence d'effet d'une contamination à 15,3  $\mu\text{M}$  de zinc sur de jeunes huîtres âgés d'un an. Dans cette dernière étude, le zinc (15,3  $\mu\text{M}$ ) se révèle ne pas avoir d'effet sur le niveau d'expression des gènes *CgMT1* et *CgMT2* après 14 jours d'exposition alors que de tels niveaux augmentent d'un facteur 7 en présence de cadmium (0,133  $\mu\text{M}$ ).

Le retard apparent et la faible sensibilité des réponses des gènes codant MT1&2 dans la présente étude sont quelques peu déconcertant. L'hypothèse selon laquelle l'incorporation dans les tissus mous était plus faible qu'attendu, sur la base des mesures sur les naissains entiers, n'est pas suffisante pour expliquer nos résultats. Dans les conditions contrôlées de notre laboratoire, la concentration en zinc dans l'eau de mer était l'unique variable de toutes les UEs. De plus, la croissance des juvéniles était clairement dépendante de la concentration en zinc dans l'eau de mer. Celle-ci a été affectée dès les premiers niveaux de contamination après seulement quelques jours d'exposition. Il doit être gardé à l'esprit que la régulation des MT chez les huîtres exposées aux métaux se fait aux niveaux transcriptionnel et traductionnel ([Marie et al. 2006b](#)). De plus, il n'est pas exclu qu'une autre isoforme de métallothionéine, la *CgMT3* (non reconue par les amorces utilisées lors de ces travaux), puisse avoir une implication dans la réponse de l'huître au zinc ([Marie et al. 2006c](#)).

### II.2.5.6 Activité enzymatique

Les mesures d'activités enzymatiques ont eu lieu sur des échantillons de naissains prélevés après 20 jours d'exposition. L'activité de la GST semble être un bon indicateur de la pollution métallique. En effet, les mesures d'activité de la GST ont montré un effet graduel du zinc visible dès  $0,91 \mu\text{M}$  alors qu'aucun signal n'a été mis en évidence au regard de son expression transcriptionnelle. La GST est par conséquent légèrement plus sensible que la croissance à ce temps de l'exposition (20 jours). Le gradient d'effet du zinc sur la croissance des naissains est visible dès 3 jours d'exposition. Il aurait été intéressant de mesurer l'activité de la GST à cette date pour comparer la précocité des deux paramètres. La mesure ponctuelle des activités enzymatiques est moins informative que les suivis temporels de la croissance, la mortalité et des mesures d'expressions transcriptionnelle des 9 gènes de stress ciblés qui ont été réalisées tout le long de la période d'exposition. Ils apportent cependant des informations quant aux mécanismes de défense mis en jeu lors d'une contamination chronique au zinc.

Après 20 jours d'exposition, les concentrations en zinc dans les naissains ont atteint leurs valeurs maximales même si l'état d'équilibre avec l'eau de mer n'est pas encore atteint. A cette date, les mesures d'activités enzymatiques antioxydantes et de types phénoloxydase sont toutes les deux stimulées aux concentrations Z1 et Z2. Or, les phénoloxydases ont déjà été décrites comme possédant un rôle antioxydant en plus de leurs rôles de détoxification et leurs implications dans le système immunitaire des invertébrés (Luna-Acosta 2010). Ainsi, il n'est pas exclu que les activités de type PO constituent une part non négligeable du signal ORAC. La tropolone s'est révélé être un puissant inhibiteur de l'activité PO tandis que la TPCK ne l'a pas modulé significativement. L'activité PO est un paramètre qui requiert des études plus complètes afin de définir précisément ses rôles et mécanismes d'action en réponse à ce type de contamination. Mottin (2010) a observé une augmentation significative de la production d'ERO chez des huîtres (*C. gigas*) adultes exposées à  $8,11 \mu\text{M}$  de zinc à 1 et 5 semaines. En parallèle à cette même expérimentation, elle a observé une tendance générale à l'augmentation de l'activité PO. Bouilly *et al.* (2006) ont observé une augmentation de l'activité PO dans l'hémolymphe de *C. gigas* suite à une exposition de 66 jours à  $500 \text{ ng.L}^{-1}$  de Cd.

Il n'en reste pas moins que ces paramètres (PO et index ORAC) sont moins sensibles que la croissance à ce stade de l'exposition.

## II.2.6 CONCLUSION SUR LES EFFETS CHRONIQUES DU ZINC SUR LES JUVENILES D'HUITRES JAPONAISE

Au cours de cette étude, le zinc a été utilisé comme contaminant test pour valider le modèle biologique des naissains et larves de *C. gigas* lors d'expositions chroniques afin de préparer les expérimentations sur les rayonnements ionisants. L'accent a été mis sur la mesure en parallèle de paramètres intégrés et moléculaires. Chacune des expérimentations présentées dans ce chapitre a été répétée et confirme les résultats.

Les activités enzymatiques mesurées chez les naissains après 20 jours d'exposition ont montré d'une part, une augmentation des activités PO et de l'index ORAC, et d'autre part, que la GST semblait être régulée au niveau post transcriptionnelle.

Nous nous attendions à ce que les niveaux d'expression transcriptionnelle des 9 gènes de stress présentent un signal sensible et précoce par rapport à la croissance. Il n'est pas exclu que d'autres gènes ou isoformes puissent être plus sensibles que les marqueurs que nous avons sélectionnés. MT1 et MT2 restent cependant des cibles pertinentes qui ont montré à plusieurs reprises être surexprimées suite à une pollution au zinc.

Dans cette étude, l'expression transcriptionnelle des MT s'est révélée moins informative que la croissance. Cette dernière a été affectée dès les premiers jours d'exposition aux plus faibles concentrations en zinc (dès 3,89  $\mu\text{M}$  pour les naissains et 1,67  $\mu\text{M}$  pour les larves) par comparaison avec le groupe *témoin*. Le modèle *larve* s'est montré plus sensible que le modèle *naissain*. Les mesures automatisées de la croissance ont permis de contourner le biais lié à la forte variabilité des modèles *larve* et *naissain*. Des analyses statistiques robustes ont ainsi pu être utilisées pour dériver des paramètres écotoxicologiques.

Ces travaux sur le zinc ont démontré l'intérêt d'utiliser les stades précoces de développement pour étudier les effets chroniques de contaminants dans les conditions contrôlées de laboratoire. Les expérimentations sur les larves ont duré deux semaines, soit toute la durée de vie des larves. Certaines larves se sont même fixées au maillage de leur tamis à la fin des 2 semaines d'exposition. Les naissains tout juste métamorphosés ont quant à eux été élevés plus de 10 semaines. La croissance de ces stades précoces de développement s'est révélée être un paramètre très sensible.

La prochaine étape consistera à élaborer une structure d'exposition miniature permettant de réduire au maximum le volume des UE. En effet, plus les volumes mis en jeu sont petits, plus le niveau d'exposition des juvéniles aux rayonnements ionisants pourra être augmenté tout en respectant les contraintes radiologiques de la zone d'expérimentation.

## II.3 EXPOSITIONS CHRONIQUES DE JUVENILES A UN MOLLUSCICIDE : LE METHIOCARB

### II.3.1 INTRODUCTION SUR LE METHIOCARB.

La mise au point de nouveaux petits aquariums a été réalisée avec un second contaminant test : le mercaptodiméthure ou methiocarb ( $C_{11}H_{15}NO_2S$ ). Il est utilisé en cultures maraîchères comme molluscicide. Ses toxicités aiguës et chroniques envers des organismes aquatiques tels que *Daphnia magna* sont élevées (EC50 48h :  $8 \mu\text{g.L}^{-1}$  ; NOEC 21 jours :  $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) ([Pesticide Properties DataBase](#)) (tableau 5). Cette molécule est un inhibiteur des cholinestérases. Elle est utilisée contre certains gastéropodes stylommatophores (escargots et limaces). Le methiocarb peut se retrouver dans l'environnement marin après avoir été lessivé des sols. Par conséquent, la question se pose de savoir si ce molluscicide peut également impacter les huîtres, organismes appartenant au même embranchement.

Tableau 5 : principales caractéristiques du methiocarb.

Nom usuel	methiocarb (mercaptodiméthure)
Type de pesticide	Insecticide, Molluscicide
Famille chimique	Carbamate
Formule brute	$C_{11}H_{15}NO_2S$
Solubilité - dans l'eau à 20°C ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	27
DT50 sol (jours)	35
DT50 par photolyse dans l'eau (jours) à pH 7	11
Coefficient de partage octanol / eau à pH 7, 20°C, LogP:	3,18
<i>Daphnia magna</i> - Toxicité aiguë 48h EC50 ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	8
<i>Daphnia magna</i> - Toxicité chronique NOEC 21 jours ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	0,1

Les travaux présentés dans cette section avaient pour objectif, outre celui de tester les effets du methiocarb sur les juvéniles (larves et naissains) d'huître creuse, de développer une structure miniature permettant de réaliser des expositions chroniques en milieu contrôlé. D'un point de vue technique, la principale contrainte à laquelle il a fallu faire face était la réduction à l'extrême du volume des milieux de culture utilisés pour élever les juvéniles. Celui-ci devait être suffisamment élevé pour garantir de bonnes conditions d'élevage, et le plus faible possible pour augmenter l'intensité

des niveaux d'expositions, dans l'intention d'exposer les juvéniles à des sources de rayonnements ionisants.

### II.3.2 MODALITES D'EXPOSITION ET STRUCTURES UTILISEES LORS DES EXPOSITIONS DE JUVENILES DE CRASSOSTREA GIGAS AU METHIOCARB

#### II.3.2.1 Préparation de la solution et concentrations en methiocarb

Le methiocarb est très peu soluble dans l'eau (27 mg.L<sup>-1</sup>) mais beaucoup plus dans les solvants organiques tels que l'acétone ou le DMSO. Ce dernier a été utilisé pour préparer la solution mère ayant servi à contaminer les milieux.

Les différentes concentrations en methiocarb testées sont présentées dans le [tableau 6](#). Elles s'échelonnent de 0 ("*témoin-EDM*") à 2000 µg.L<sup>-1</sup> ("*M5*"). Les effets potentiellement toxiques du DMSO seul ont été testés sur des lots de juvéniles. Ainsi, les UEs "*témoin-DMSO*" ont été contaminées avec la même quantité de DMSO (0,004% du volume total) que celle administrée lors de la plus forte contamination en methiocarb (*M5*).

**Tableau 6** : concentrations nominales en methiocarb dans l'eau de mer des unités expérimentales lors des expositions des larves et naissains.

Unité expérimentale	Concentration nominale en methiocarb ajoutée dans le milieu d'exposition (µg.L <sup>-1</sup> )		Quantité de DMSO (% du volume total)
	Larves	Naissains	
<i>témoin-EDM</i>	0	0	0
<i>témoin-DMSO</i>	0	0	0,004
<i>M1</i>	10	-	0,00002
<i>M2</i>	100	100	0,0002
<i>M3</i>	500	500	0,001
<i>M4</i>	-	1000	0,002
<i>M5</i>	2000	2000	0,004

### II.3.2.2 Unités expérimentales miniatures

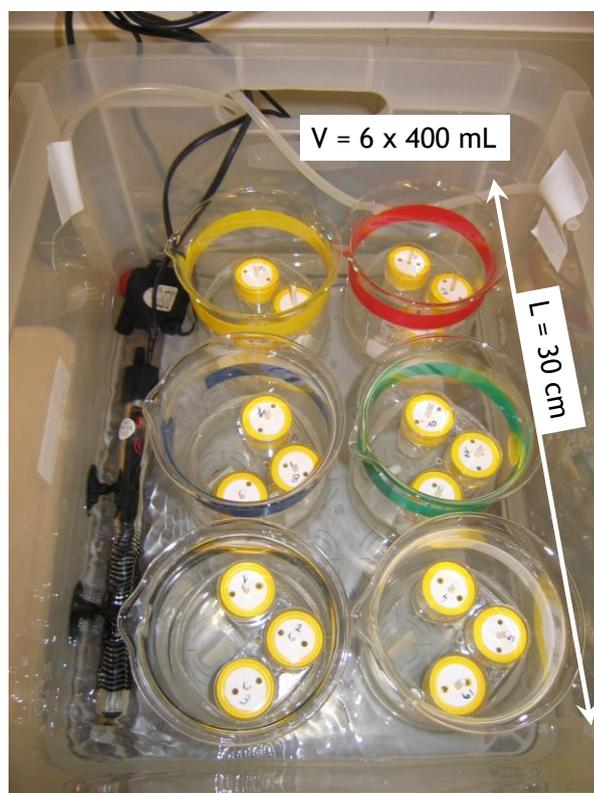


Figure 33 : dispositif expérimental miniature utilisé lors des expositions chroniques de juvéniles au methiocarb.

Le dispositif expérimental se compose de 6 béchers contenant chacun un barreau aimanté, 3 cages ainsi que 400 mL de milieu de culture (figure 33). L'ensemble des béchers est placé dans un bain-marie régulé à 23,5°C.

### II.3.3 EFFETS DU METHIOCARB SUR LES JUVENILES

#### II.3.3.1 Suivi de la mortalité des juvéniles exposées au methiocarb

La figure 34 représente les pourcentages de survie des larves exposées aux conditions *témoin* (eau de mer et DMSO) et à quatre concentrations en methiocarb en fonction du temps. Pour chaque traitement, les valeurs correspondent aux moyennes des pourcentages de survie issues de deux sous populations d'environ 100 individus. Le pourcentage de survie du groupe *témoin* est dans la gamme des valeurs attendues et évolue de 92,0% à 86,0% à 7 et 13 jours d'exposition, respectivement. Les groupes de larves exposées au traitement *témoin-DMSO* et à la plus faible concentration de methiocarb ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) présentent des pourcentages de survies similaires. Leurs survies est plus faible que le groupe témoin à partir du 5<sup>ème</sup> jour d'exposition et diminue fortement le 13<sup>ème</sup> jour d'exposition pour atteindre des valeurs proches de 60%. De la même manière, les pourcentages de survie des larves exposées aux

concentrations intermédiaires en methiocarb (100 et 500  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) évoluent selon un même schéma. Ils diminuent dès le 2<sup>ème</sup> jour d'exposition et sont encore plus faibles la 2<sup>ème</sup> semaine d'exposition. Le 13<sup>ème</sup> jour, il ne reste que 35 et 30% de larves vivantes dans les groupes exposés à 100 et 500  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de methiocarb, respectivement. La survie des larves exposées à la plus forte concentration (2000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) est très rapidement impactée : il ne reste que 9% de larves vivantes le 2<sup>ème</sup> jour d'exposition. Aucune différence statistique n'est calculée à partir des données obtenues le 13<sup>ème</sup> jour d'exposition (Kruskal-Wallis ;  $p > 0.05$ ).

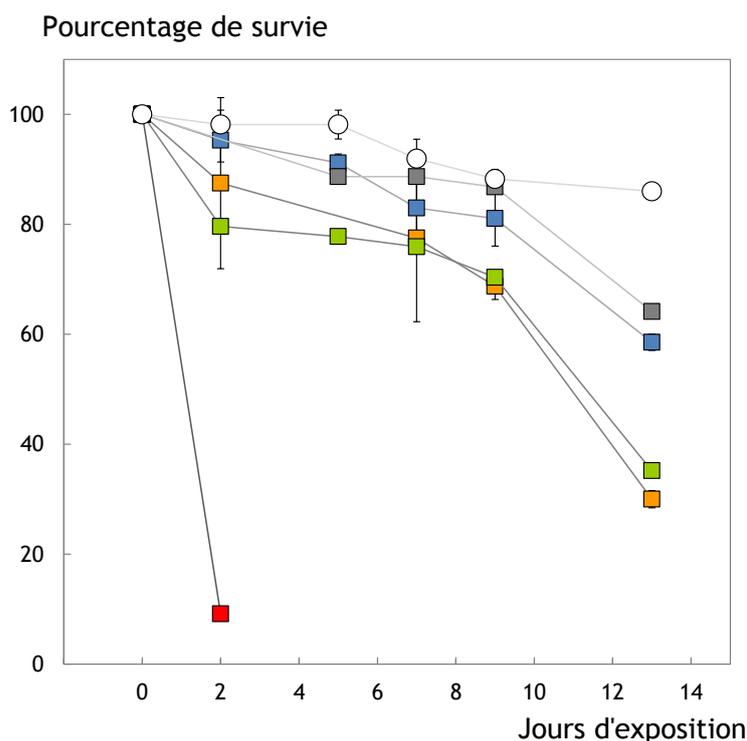


Figure 34 : pourcentage de survie de larves exposées à quatre niveaux de concentration en methiocarb dans l'eau de mer.

Au temps *zéro* de l'exposition, les larves étaient âgées de 2 *jpf*, et la population comptait une centaine d'individus.

Concentrations en methiocarb ajouté au milieu ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) : ○ témoin-EDM : 0, ■ témoin-DMSO : 0, ■ M1 : 10, ■ M2 : 100, ■ M3 : 500, ■ M5 : 2000.

### II.3.3.2 Suivi de la croissance des juvéniles exposées au methiocarb

La figure 35 rassemble les données de croissance mesurées chez des larves exposées aux conditions *témoin* (eau de mer et DMSO) et quatre concentrations en methiocarb en fonction du temps. Le jour précédent le début de l'exposition au methiocarb, la longueur moyenne des larves est de  $71 \pm 4,9 \mu\text{m}$  ( $n=513$ ). Le groupe de larves exposées aux conditions *témoin* (eau de mer) présente la croissance la plus rapide avec une longueur moyenne finale de  $173 \pm 31,7 \mu\text{m}$  ( $n=76$ ). Les larves exposées à la plus forte concentration ne grandissent pas et meurent au cours des 3 premiers jours d'exposition.

Les groupes de larves exposées aux concentrations intermédiaires en methiocarb et à la condition *témoin-DMSO* présentent des courbes de croissance comparables entre elles tout le long de l'expérimentation. Le dernier jour de l'exposition, leurs longueurs moyennes sont clairement plus faibles que les longueurs moyennes des larves exposées à l'eau de mer uniquement.

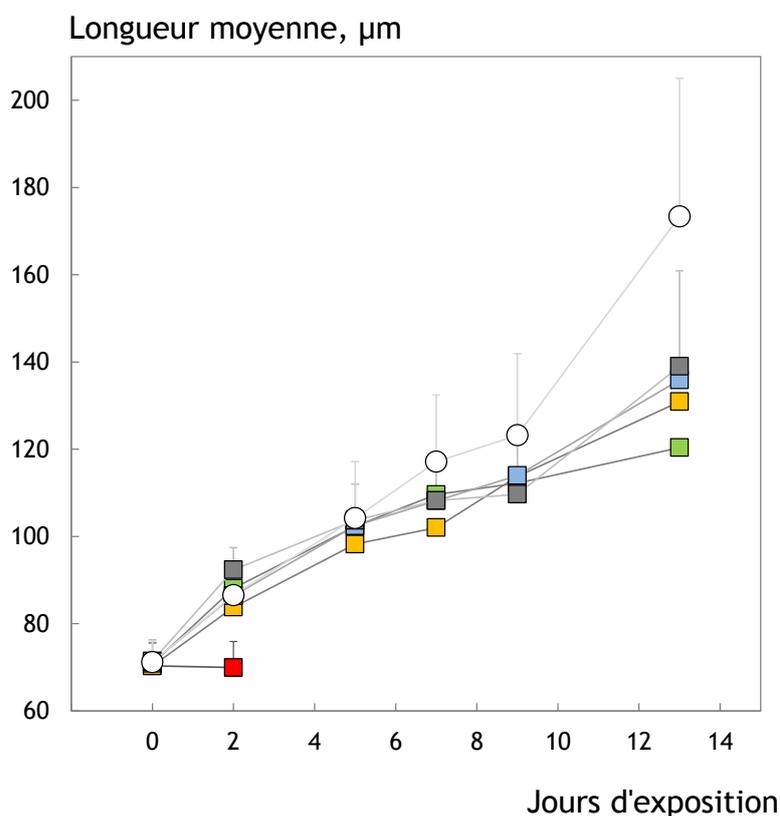


Figure 35 : croissance des larves exposées à 4 concentrations en methiocarb dans l'eau de mer. Les valeurs sont les longueurs moyennes et les barres d'erreurs supérieures rendent compte de l'écart-type.

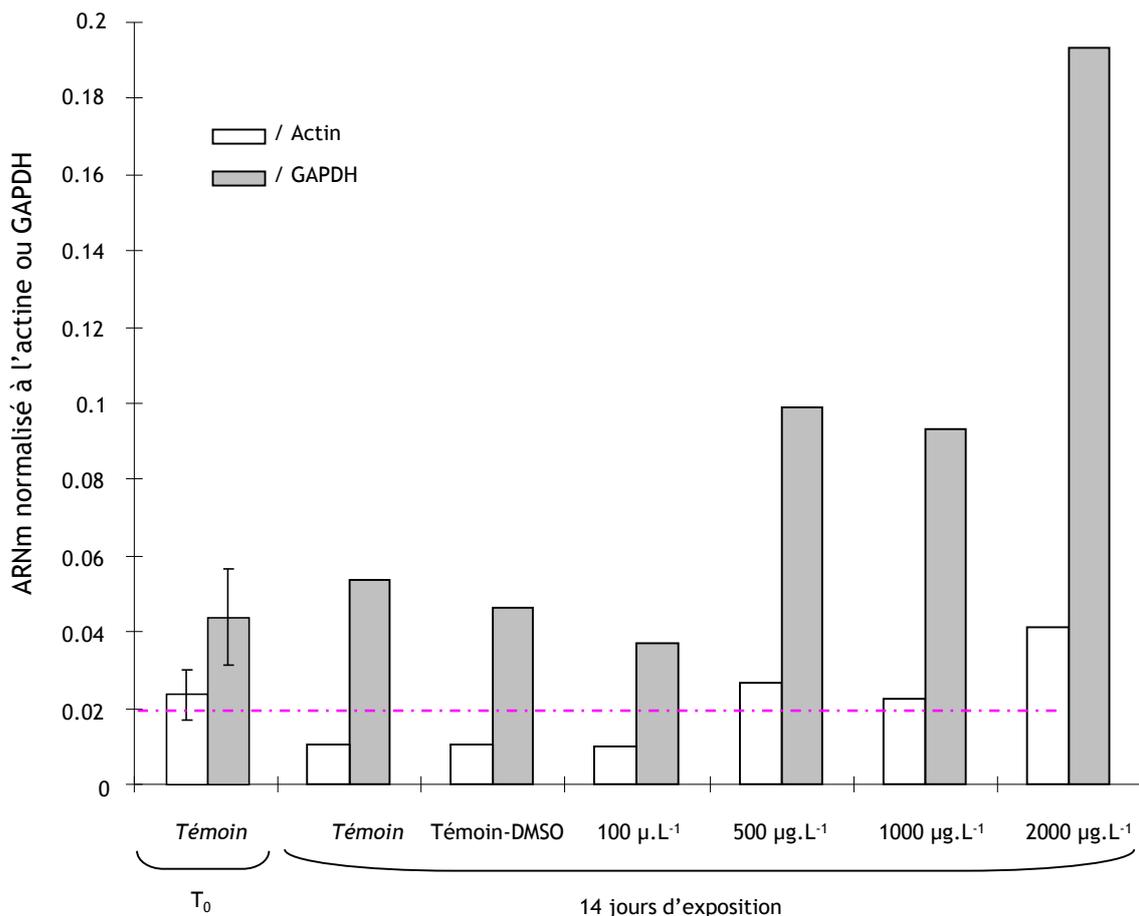
Concentrations en methiocarb ajouté au milieu ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) :  $\circ$  Témoin-EDM : 0,  $\square$  Témoin-DMSO : 0,  $\square$  M1 : 10,  $\square$  M2 : 100,  $\square$  M3 : 500,  $\square$  M5 : 2000.

### II.3.3.3 Mesures d'expression transcriptionnelle des 9 gènes ciblés chez les naissains exposés au methiocarb

La figure 36 représente les résultats d'expression transcriptionnelle de MXR des naissains avant et après deux semaines d'expositions aux deux traitements *témoin* (eau de mer et DMSO) et à quatre concentrations en methiocarb. Les données sont très comparables quand elles sont normalisées aux trois ARN de références utilisés : actine, GAPDH et ARN 18S (non illustrées). Après deux semaines d'exposition, le manque de matériel biologique disponible n'a pas permis de répliquer les mesures mais les ARN extraits correspondent aux pools de plusieurs dizaines d'individus. Les niveaux d'expression

*témoin* sont cohérents avec ceux rencontrés chez des d’huîtres adultes élevés en laboratoire dans des conditions *témoin* (Farcy *et al.* 2011) et prélevées dans l’environnement naturel (Farcy *et al.* 2007).

Les niveaux de MXR mesurés chez les naissains *témoin-EDM*, *témoin-DMSO* et exposés à 100 µg.L<sup>-1</sup> de methiocarb sont similaires les uns aux autres et prennent des valeurs avoisinant 0,01 ou 0,05, normalisée à l’actine et la GAPDH, respectivement. La dose de DMSO du lot *témoin-DMSO*, correspondant à la plus forte dose de DMSO (ajoutée avec les 2000 µg.L<sup>-1</sup> de methiocarb), n’a pas d’effet sur le niveau d’expression transcriptionnelle de MXR. Les naissains exposés aux concentrations de 500 et 1000 µg.L<sup>-1</sup> montrent un niveau d’expression transcriptionnelle deux fois plus important que les niveaux *témoin* à 14 jours d’expositions. Cette induction du gène MXR, en réponse à la contamination en methiocarb, et confirmée chez le groupe exposé au plus fort niveau de methiocarb (2000 µg.L<sup>-1</sup>) puisque ce dernier voit son niveau d’ARNm de MXR augmenter d’un facteur quatre par rapport aux niveaux témoins. Les niveaux d’expression transcriptionnelle des autres gènes ciblés étaient similaires aux valeurs *témoin* après 14 jours d’exposition au methiocarb.



**Figure 36** : niveau d’expression transcriptionnel du gène codant MXR en réponse à une exposition chronique de 14 jours à différentes concentrations en methiocarb. Les données sont normalisées aux ARNm de références de l’actine et du glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GADPH).

--- : niveau d’expression transcriptionnel mesuré dans des huîtres de l’environnement naturel à la même époque de l’année (Farcy *et al.* 2007).

### II.3.4 DISCUSSION SUR LES EFFETS CHRONIQUES DU METHIOCARB SUR LES JUVENILES D'HUITRES JAPONAISES

Les données obtenues sur les larves montrent un effet aigue du methiocarb à la plus forte concentration (2000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) induisant la mort de toutes les larves au cours des deux premiers jours d'exposition.

Le DMSO s'est révélé être toxique pour les larves au regard de la mortalité et de la croissance et ce malgré sa forte dilution dans les milieux d'expositions (concentration finale de 0,004%). Les données sur les larves doivent donc être considérées avec précautions.

A titre de comparaison, [His et al. \(1999\)](#) ont exposé des œufs fertilisés de *C. gigas* et *Paracentrotus lividus* pendant 24h à des concentrations de methiocarb allant jusqu'à 200  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Un effet modéré mais significatif a été observé chez les embryons et larves de *P. lividus*. Le taux d'anormalités larvaires était de 8,2% pour le groupe *témoin* et 13,0% pour le groupe exposés à 200  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de methiocarb. Aucun effet n'a été observé chez *C. gigas*.

Lors de ces travaux, aucun effet n'a été observé au regard de la mortalité et de la croissance des naissains au cours des 14 jours d'exposition à différentes concentrations en methiocarb allant de 250 à 2000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . La question se pose quant à la biodisponibilité de ce polluant vis à vis des juvéniles.

Après deux semaines d'exposition, ni la croissance, ni la mortalité des naissains n'ont été affectées. Le niveau d'expression transcriptionnelle du gène codant MXR était plus élevé chez les naissains exposés aux plus fortes concentrations en methiocarb (500, 1000 et 2000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) après 14 jours d'exposition.

Les protéines de transport du système MXR (*MultiXenobiotic Resistance*) appartiennent à une famille vaste de protéines, que l'on retrouve dans tout le règne vivant : la famille ABC (ATP binding cassette). Le système MXR est défini comme un mécanisme de défense global, qui réagit face à un cumul de composés organiques d'origine naturelle et anthropique. Chez *C. gigas*, [Minier et al. \(2002\)](#) ont montré que le système MXR apparaissait au cours du développement larvaire et qu'il devenait pleinement fonctionnel après la métamorphose.

Au cours de ces travaux, le faible volume des unités expérimentales n'a pas permis de mesurer les concentrations de methiocarb réellement présentes dans les milieux d'exposition. En effet, la concentration en methiocarb est susceptible de changer entre chaque renouvellement en eau en partie à cause du phénomène de photolyse dont fait l'objet la molécule au cours du temps, mais aussi à cause d'éventuels phénomènes d'adsorption sur les parois des UEs, d'évaporation ou encore de dégradation ou de métabolisation par les juvéniles. Par conséquent, il est probable que les concentrations réelles en methiocarb dans les milieux d'exposition aient été inférieures aux valeurs nominales.

## II.4 CONCLUSIONS

Les travaux de ce chapitre avaient pour but de développer un modèle biologique adapté à la réalisation d'expositions chroniques en laboratoire, d'une part, et permettant la mesure en parallèle de paramètres biologiques depuis des niveaux moléculaires jusqu'à des niveaux intégrés, d'autre part.

Les structures et protocoles d'exposition ont permis la réalisation d'expositions chroniques sur plusieurs semaines. Au cours des travaux sur le zinc et le methiocarb, de petites cages ont été utilisées pour mesurer de manière non destructive la croissance de plusieurs sous-populations de juvéniles. Les travaux sur le zinc ont mis en évidence une réponse sensible et précoce de la croissance des larves et naissains de *C. gigas* vis-à-vis des contaminants chimiques. De plus, les volumes des unités expérimentales ont été réduits le plus possible.

En complément de ces travaux, des manipulations "à blanc", identiques aux expérimentations faisant intervenir des rayonnements ionisants, ont été réalisées pour confirmer la bonne croissance des larves et naissains témoins dans les petites structures. En outre, ces expériences ont permis d'apprendre les gestes et les réflexes à appliquer lors de la manipulation de contaminants radioactifs.

Au cours d'une de ces expériences préparatoires, des larves ont été exposées à du géotextile (destinés aux travaux de bâtiments, de génie civile et d'agriculture) afin d'apporter des éléments de réponses à l'écloserie de la SATMar à propos de sa toxicité potentielle sur le développement des larves. Les résultats de ces travaux sont présentés en annexe.



**CHAPITRE III.      EFFETS DES RAYONNEMENTS  
IONISANTS SUR LES STADES PRECOCES DE  
DEVELOPPEMENT DE L’HUITRE JAPONAISE**



### III.1 INTRODUCTION

Au cours des 50 dernières années, moins de 100 articles ont porté sur les effets des RI sur les invertébrés aquatiques et ce malgré leur pertinence environnementale avérée et le fait qu'ils soient exposés en continu aux radionucléides (Dallas *et al.* 2012). Bien que de nombreux articles portent sur l'accumulation de radionucléides chez quelques organismes aquatiques (Durand *et al.* 1994, Valette-Silver et Lauenstein 1995, Boisson *et al.* 1997, Burger *et al.* 2006, Metian *et al.* 2011), ceux abordant leurs effets biologiques sont en nombre limité, mais en constante augmentation depuis les années 2000 (Dallas *et al.* 2012). En outre, il est difficile de comparer les études entre elles. En effet, celles-ci considèrent des groupes d'organismes invertébrés divers au cours de durée d'exposition différentes et à des débits de doses et des doses très hétérogènes et pas toujours précisément estimés.

A ce stade de l'étude, nous disposons d'un modèle biologique dont la croissance s'est révélée être un paramètre très sensible vis-à-vis des conditions environnementales (Devos *et al.* 2012). Nous disposons également d'une batterie de 9 gènes de stress dont deux, MT et MXR, ont été désignés comme candidats potentiels pour l'étude des effets des RI en situation de chronicité et faible dose chez l'huître creuse Farcy *et al.* (2011).

Les travaux réalisés au cours de cette thèse portent sur les effets chroniques des RI sur les juvéniles de *C. gigas*. Ils se sont articulés autour de deux approches complémentaires :

- La première a consisté en une exposition des juvéniles à une source externe de rayonnements gamma. Dans cette situation, seul l'effet radiologique est pris en compte. Cette source externe permet aux juvéniles d'être exposés aux RI dans des conditions bien définies car la dose et le débit de dose sont déterminés avec précision.
- La deuxième approche, qui est une contamination interne des juvéniles par l'américium 241 (émetteur alpha et gamma), reproduit de façon qualitative le mode d'exposition environnemental. Dans ce cas, les effets chimiques et radiologiques de l'américium 241 sont indissociables. L'exposition par balnéation des organismes, et plus particulièrement des mollusques bivalves comme l'huître creuse, peut les rendre particulièrement vulnérables aux expositions internes. En effet, leurs surfaces corporelles, appareil respiratoire et nutritif (branchies), et organes internes (l'huître creuse possède un système vasculaire ouvert) sont en contact très étroit avec l'eau de mer environnante. Cette approche ne permet cependant pas une appréciation fine de la dose administrée aux tissus.

Se pose ensuite la question du débit de dose à utiliser lors d'expositions chroniques en laboratoire. Le [tableau 7](#) représente un modèle conceptuel proposé par [Polikarpov \(1998\)](#) visant à classer les débits de doses des expositions chroniques aux RI dans la nature.

La "zone d'incertitude biologique" correspond à la zone dont les niveaux d'irradiation sont réduits et inférieurs aux débits de doses naturel.

La "zone de bien-être" correspond aux débits de dose naturelle.

La "zone de masquage physiologique" est définie comme la zone où les rejets dus aux activités anthropiques peuvent empiéter sur le niveau de radiation naturelle et où des changements mineurs peuvent être détectés, par exemple au niveau fonctionnel, morphologique, ou liés à la fréquence d'apparition de maladies, mais n'induisant pas d'effet délétère à l'échelle de la population.

La "zone de masquage écologique" correspond aux débits de doses pouvant significativement affecter, de manière réversible (réduction de la fécondité, par ex.), ou non réversible (pathologie, par ex.), la santé de certains individus tout en restant généralement imperceptible à l'échelle populationnelle.

La dernière zone est la zone de "dommage des écosystèmes" et correspond aux débits de dose supérieurs à  $4 \text{ Gy.an}^{-1}$  où des effets individuels et populationnels sont ressentis et peuvent perturber l'écosystème dans son ensemble.

**Tableau 7** : modèle conceptuel de classification des débits de doses lors d'expositions chroniques aux rayonnements ionisants en milieu naturel.

<i>Polikarpov (1998)</i>	Débit de dose en $\text{Gy.an}^{-1}$
Zone d'incertitude biologique	$<10^{-5}$ à $4.10^{-5}$
Zone de bien-être	$4.10^{-5}$ à $5.10^{-3}$
Zone de masquage physiologique	$5.10^{-3}$ à $5.10^{-2}$
Zone de masquage écologique	$5.10^{-2}$ à 4
Zone de dommage des écosystèmes	4 à $> 3000$

Une première étape consiste à identifier des cibles biologiques potentielles pouvant être impactées par une exposition chronique aux RI. Si des effets sont perceptibles, alors les niveaux d'exposition sont réduits pour tendre vers des valeurs plus pertinentes d'un point de vue environnemental et s'approcher des faibles débits de doses des zones de masquage physiologique et/ou écologique.

Dans ce but, nous avons utilisé les niveaux d'expositions maximum dont nous disposons dans nos conditions d'expérimentation en laboratoire. Ils sont de l'ordre de plusieurs centaines de Grays par an et entrent dans la dernière catégorie de la classification de Polikarpov.

## III.2 EXPOSITION CHRONIQUE DE JUVENILES DE *CRASSOSTREA GIGAS* A UNE SOURCE EXTERNE DE RAYONNEMENTS GAMMA

### III.2.1 INTRODUCTION

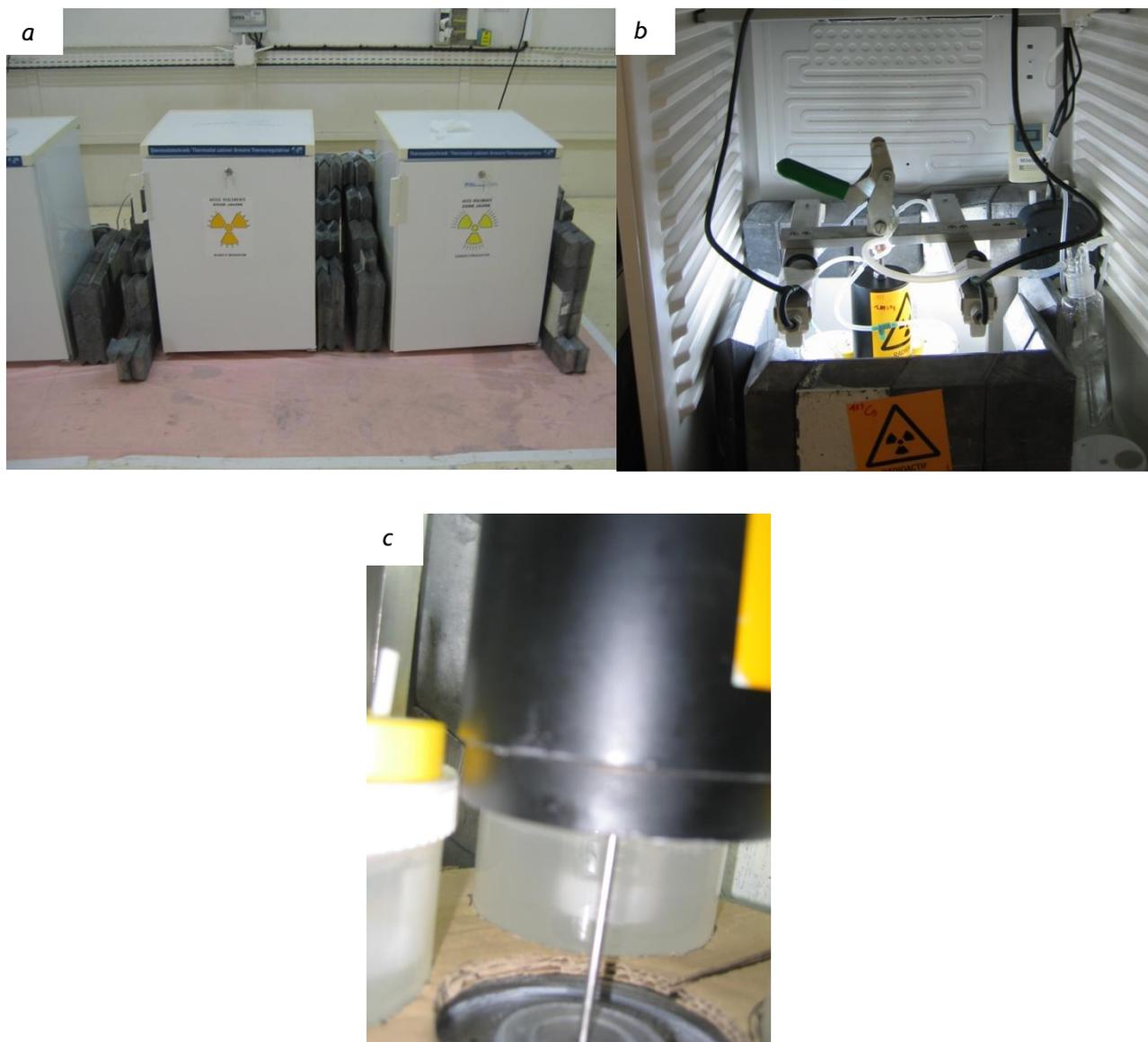
Les travaux d'expositions à une source externe de rayonnement gamma ont été réalisés en collaboration avec le Laboratoire d'écotoxicologie des radionucléides (LECO) de l'IRSN situé sur le Centre d'Etudes Nucléaires de Cadarache, dans les Bouches du Rhône. Le LECO a mis à notre disposition deux structures dans lesquelles les juvéniles d'huîtres ont été exposés aux rayonnements gamma pendant deux semaines.

Les débits de doses de RI rencontrés aux abords de la péninsule de la Hague sont compris entre 0,9 et 3,5 mGy.an<sup>-1</sup> (entre 0,1 et 0,4 µGy.h<sup>-1</sup>, environ) (Chambers *et al.* 2003). Ils correspondent à la "zone de bien-être" de la classification de Polikarpov (1998). Ils sont environ cent milles à quatre cents mille fois plus faibles que les débits de doses utilisés lors de cette étude exploratoire qui avoisinaient une valeur de 30 mGy.h<sup>-1</sup>.

### III.2.2 MATERIELS ET METHODES

#### III.2.2.1 Chambres d'irradiation chronique

Les deux irradiateurs utilisés lors de ces travaux consistent en des chambres d'incubation climatisées (figure 37-a). Chaque irradiateur dispose en son centre d'une structure composée de briques et d'un château de plomb amovible confinant les rayonnements ionisants (figure 37-b). Sous chacun des châteaux de plomb se trouve une source scellée linéaire de Césium 137 de 1,85 GBq (CERCA-LEA, Framatome ANP, Pierrelatte, France) (figure 37-c).



**Figure 37** : photographies des chambres d'irradiations chroniques aux rayonnements gamma.  
*a* : vue d'ensemble des deux irradiateurs (portes fermées), *b* : vue intérieur d'un irradiateur (porte ouverte), *c* : détail de la source linéaire de Césium 137 (1,85 GBq), émettrice de rayonnements gamma, en position d'irradiation (château de plomb soulevé).

### III.2.2.2 Unité expérimentale, dosimètres thermoluminescents (TLD)

Deux chambres d'irradiation identiques ont été utilisées pour les naissains et pour les larves. Le débit de dose étant inversement proportionnel à la distance séparant les animaux de la source, il nous a fallu concevoir un système permettant d'élever les juvéniles au plus près de la source de  $^{137}\text{Cs}$  en tenant compte de l'espace exigü des irradiateurs.

Forts de l'expérience acquise au cours des travaux sur le zinc (Devos *et al.* 2012) et sur le methiocarb (Chapitre 2), nous avons conçu de nouveaux petits aquariums adaptées aux contraintes spatiales des irradiateurs. Ceux-ci sont présentés dans les figure 38-a1 et b1. Ils constituent plusieurs unités expérimentales utilisées pour élever les naissains et les larves, respectivement. Elles sont fabriquées à partir de géométrie en plastique. Les cages présentées dans la partie II.1.3 du chapitre 2 ont été réutilisées pour suivre au cours du temps la croissance de plusieurs sous-populations de juvéniles.

Contrairement aux dispositifs utilisés précédemment lors des travaux sur le zinc et le methiocarb, ces UE n'hébergent qu'une seule cage. Le volume des UE des modèles *naissain* et *larve* a été réduit au minimum. Il est passé de 5000 à 140 mL et de 4000 à 230 mL, respectivement. Chaque UE était équipée d'une canne de bullage permettant d'aérer et de créer une circulation du milieu. Pour limiter les phénomènes d'évaporation, l'air administré dans le milieu des UE était préalablement saturé en humidité grâce à un système de barboteur. Le nombre d'UE utilisées lors des irradiations des juvéniles était de six pour les naissains et de quatre dans le cas des larves. Chacune des cages contenait 40 naissains, ou une cinquantaine de larves. Les UE étaient placées à équidistance et le plus près possible de la source d'irradiation (figure 38-a2 et b2). L'exposition externe aux rayonnements gamma débutait lorsque le château de plomb était soulevé (figure 38-b2). Le débit de dose était très nettement diminué lorsque le château de plomb était en position basse. Au cours de l'expérience d'irradiation, il était brièvement maintenu dans cette position basse lorsqu'il était nécessaire d'intervenir sur les UE, par exemple lors des changements de milieu ou des mesures de croissance.

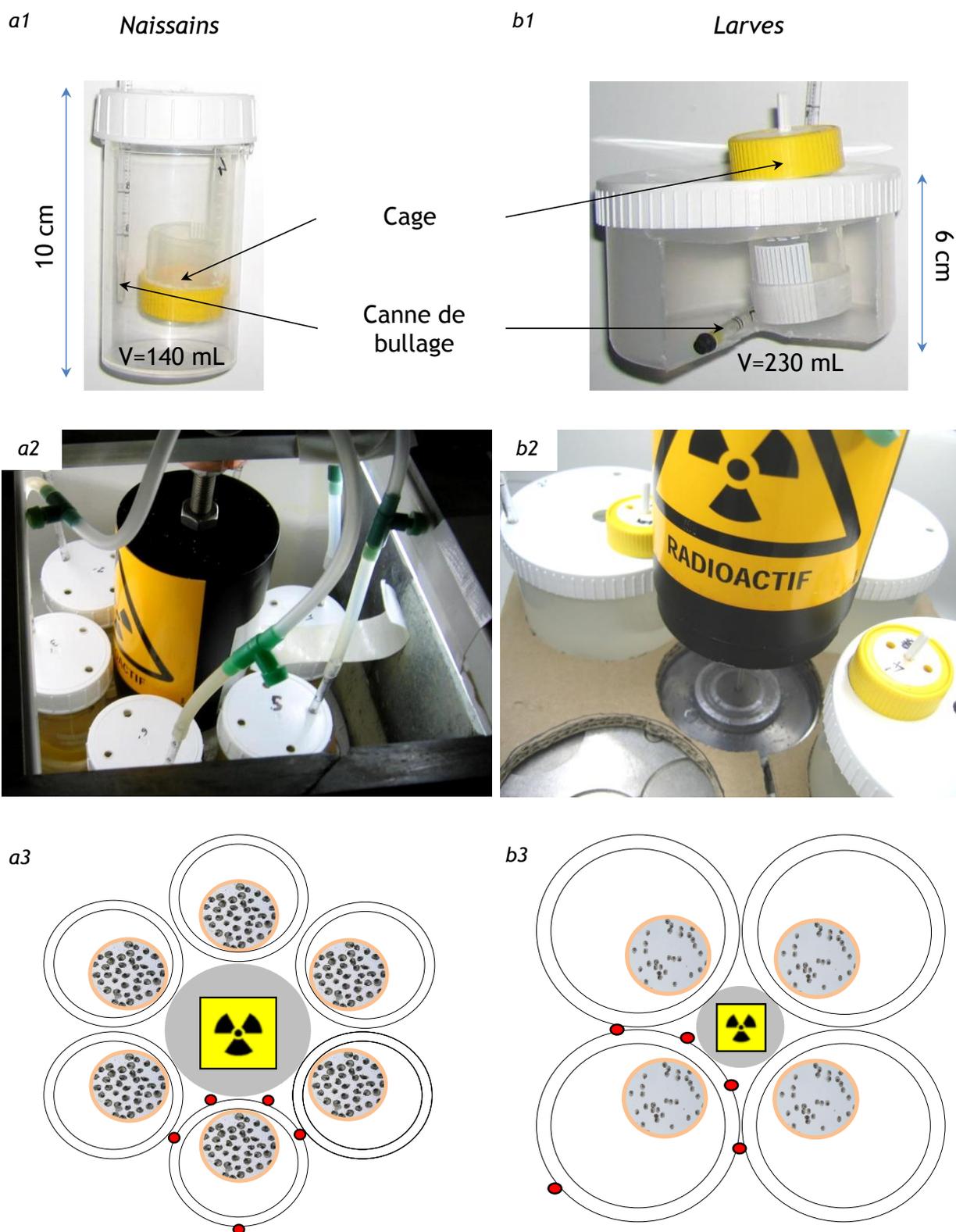


Figure 38 : photographies et schémas détaillés illustrant les UEs et leurs agencements autour des sources de  $^{137}\text{Cs}$  lors des expositions des naissains (a) et larves (b). Les points rouges symbolisent les positions des dosimètres thermoluminescents utilisés pour le calcul du débit dose au centre des tamis.

Les débits de dose auxquels étaient exposés les animaux ont été estimés grâce à des dosimètres thermoluminescents (TLD GR207 type, analysé sur lecteur LTM, les deux provenant de FIMEL, Vélizy, France). Ces dosimètres ont été fournis et analysés par l'IRSN PRP-HOM/SDE (Fontenay aux Roses). Plusieurs dosimètres ont été placés sur la face externe de la paroi des UE accueillant les naissains et les larves (figure 38-a3 et b3, respectivement).

Les TLD contiennent du fluorure de lithium. Ce composé chimique intègre l'énergie des rayonnements ionisants qui créent des défauts de sa structure cristalline. En chauffant le TLD, les défauts se résorbent et la structure du cristal se rétablit. Cette phase s'accompagne d'une émission de lumière proportionnelle à la dose reçue par le TLD. Les calculs permettent ensuite de transposer les mesures obtenues par les TLD depuis les parois vers le centre de la cage. Il est à noter qu'en terme de dose, la composition chimique des TLD se comporte de façon très similaire à celle des tissus biologiques. Par conséquent, les valeurs de débits de dose au centre des cages, calculés à partir des TLD, peuvent être directement rapportés aux naissains et larves. Afin d'éviter tout risque d'irradiation croisée, un mur de plomb de plusieurs dizaines de centimètres d'épaisseur était dressé entre les deux irradiateurs.

Dans la pièce jouxtant les deux chambres d'irradiations se trouvait un dispositif d'élevage *témoin* identique à celui exposé à la source de  $^{137}\text{Cs}$  (figure 39). La photopériode et la température étaient contrôlées dans chaque irradiateur de même que dans le bain-marie accueillant les larves et naissains *témoin*. La photopériode était de 12h de lumière suivies de 12h d'obscurité ; la température était régulée à 23,5°C.

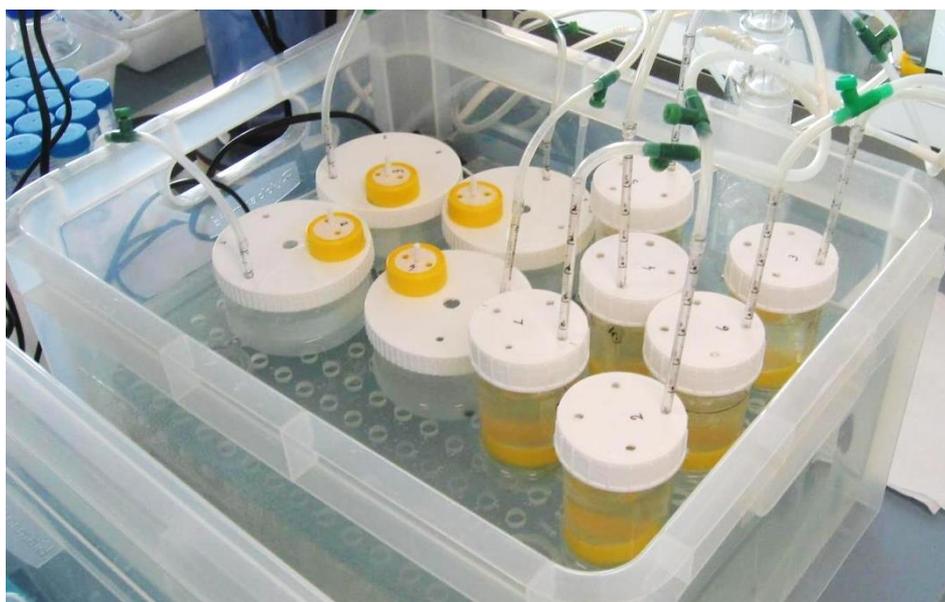


Figure 39 : photo de la structure d'exposition *témoin*.

### III.2.2.3 Transport des juvéniles et du phytoplancton

Pour l'approvisionnement en matériel biologique (larves, naissains et phytoplancton), il nous a fallu faire face à la grande distance géographique séparant l'écloserie de la SAtMar de Barfleur à la plateforme d'irradiation externe de Cadarache. Durant la dizaine d'heures qu'a duré le transport, les larves âgées d'un jour post fécondation étaient placées dans une bouteille en plastique en présence d'eau de mer et de phytoplancton (*Pseudoisochrysis* et *Pavlova lutheri*) aéré. Les naissains âgés d'un jour post métamorphose étaient transportés dans un tissu humide réfrigéré. Les bombonnes de phytoplancton (*Pseudoisochrysis*, *Pavlova lutheri* et *Chaetoceros calcitrans*) étaient constamment brassées par bullage d'air. La dizaine de litres d'eau de mer nécessaire à ces travaux a été puisée dans l'environnement marin proche de l'écloserie et était transportée dans des bouteilles à l'obscurité.

### III.2.2.4 Protocole d'exposition externe des juvéniles de *C. gigas* aux rayonnements gamma

La [figure 40](#) est une frise chronologique décrivant le déroulement des expositions externe de naissains et de larves aux rayonnements gamma.

Après une journée de transport, les naissains (2 *jpm*) et les larves (2 *jpf*) ont été acclimatés une journée dans les structures présentée en partie II.2.2.1 du chapitre 2. Les juvéniles étaient nourris comme indiqué dans la partie II.1.2 du chapitre 2. L'exposition externe aux rayonnements  $\gamma$  a duré 14 jours. Les milieux de culture (eau de mer et phytoplancton) étaient intégralement renouvelés les lundis, mercredis et vendredis. La croissance et la survie des juvéniles étaient régulièrement mesurées à partir des cages. A la fin de l'expérimentation, les naissains étaient conservés congelés (-80°C) pour réaliser des mesures d'expression transcriptionnelle de gènes ciblés par RT-PCR.

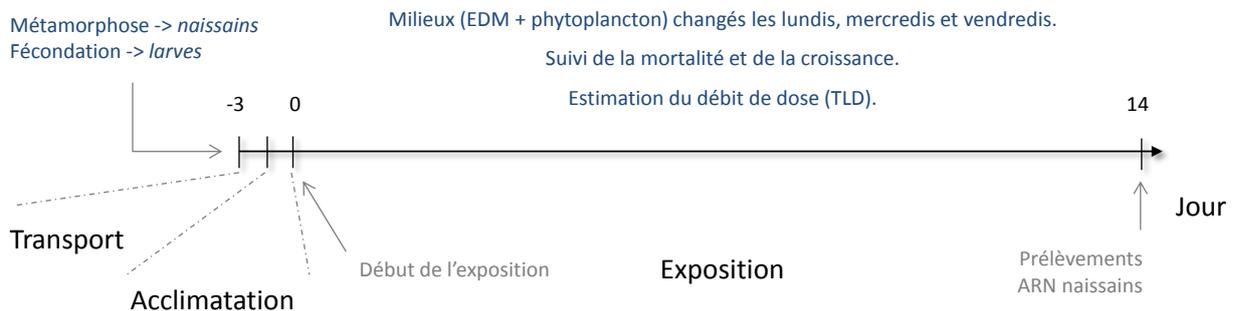


Figure 40 : descriptif temporel des expositions de naissains et de larves à une source externe de rayonnements gamma.

### III.2.3 EFFETS DES EXPOSITIONS CHRONIQUES DES JUVENILES A UNE SOURCE EXTERNE DE RAYONNEMENTS GAMMA

#### III.2.3.1 Estimation du débit de dose au centre des cages (TLD)

Les débits de dose aux centres des cages ont été estimés en utilisant des dosimètres thermoluminescents. Des TLD étaient placés sur les UE *naissain* et *larve* exposées à la source de  $^{137}\text{Cs}$ . D'autres dosimètres ont également permis de contrôler l'ambiance radiologique dans la pièce voisine hébergeant le dispositif d'élevage *témoin*. Le débit de dose calculé à partir des TLD *témoin* est celui attendu et correspond au débit de dose naturel.

Le [tableau 8](#) ci-dessous rassemble les valeurs de débits de dose horaire, annuel et les doses totales reçues par les juvéniles. Au cours des 14 jours d'exposition, les naissains étaient soumis à un débit de dose de  $27,4 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$  ( $239,6 \text{ Gy}\cdot\text{an}^{-1}$ ) et les larves à un débit de dose de  $29,3 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$  ( $256,4 \text{ Gy}\cdot\text{an}^{-1}$ ). Ainsi, après 14 jours d'exposition externes aux rayonnements gamma, la dose totale administrée aux juvéniles s'élevait à 9,18 et 9,83 Gy, pour les naissains et les larves, respectivement.

**Tableau 8** : débits de dose calculés au centre des cages lors des expositions des naissains et larves à une source externe de rayonnements gamma.

Naissains			Larves		
Débit de dose		Dose totale	Débit de dose		Dose totale
$\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ (moy. $\pm$ ET, $n=6$ )	$\text{Gy}\cdot\text{an}^{-1}$	Gy	$\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ (moy. $\pm$ ET, $n=5$ )	$\text{Gy}\cdot\text{an}^{-1}$	Gy
$27,4 \pm 3,4$	239,6	9,18	$29,3 \pm 3,3$	256,4	9,83

Ces débits de doses sont classés selon [Polikarpov \(1998\)](#) dans la "zone de dommages des écosystèmes" caractérisée par des débits de dose compris entre 4 et plus de 3000 Gy par an. Ils sont cent mille à quatre cent mille fois plus élevés que les débits de doses mesurés dans l'environnement marin du cap la Hague et dont les valeurs sont comprises entre 0,9 et  $3,5 \text{ mGy}\cdot\text{an}^{-1}$  ("zone de bien être" selon la classification de Polikarpov).

#### III.2.3.2 Suivi de la mortalité des juvéniles exposés à une source externe de rayonnements gamma

La [figure 41](#) représente les moyennes de pourcentages de survie au cours du temps chez des naissains (a) et des larves (b) exposés aux conditions *témoin* et à une débit de dose de rayonnement gamma externes de  $27,3$  et  $29,3 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ , respectivement. Après 14 jours d'exposition, les pourcentages de survie des naissains *témoin* et irradiés sont similaires et prennent pour valeurs 99 et 95%,

respectivement. Le 6<sup>ème</sup> jour d'exposition, ce pourcentage s'élève à 60% chez les larves témoins et 46% chez les larves irradiées. Il est de 31 et 25% le 14<sup>ème</sup> jour d'exposition, respectivement.

La mortalité observée chez les larves *témoin* est quelque peu élevée mais est similaire au taux de mortalité observé le même jour dans l'écloserie auprès des larves issues de la même fécondation. Les courbes sont distinctes lors de mesures du 6<sup>ème</sup> jour d'exposition mais les pourcentages de survie des deux lots sont à nouveau similaires du 9<sup>ème</sup> jusqu'au dernier jour de l'exposition. La tendance est à une très légère diminution du pourcentage de survie chez les juvéniles irradiés. Les résultats restent néanmoins très similaires d'un groupe à l'autre. En outre, aucune différence significative des pourcentages de survie des naissains et larves n'est calculée après 14 jours d'exposition à une dose totale de rayonnements gamma externes de 9,2 et 9,8 Gy, respectivement (ANOVA 1 facteur ;  $p > 0,05$ ,  $n = 6-4$  naissain-larve).

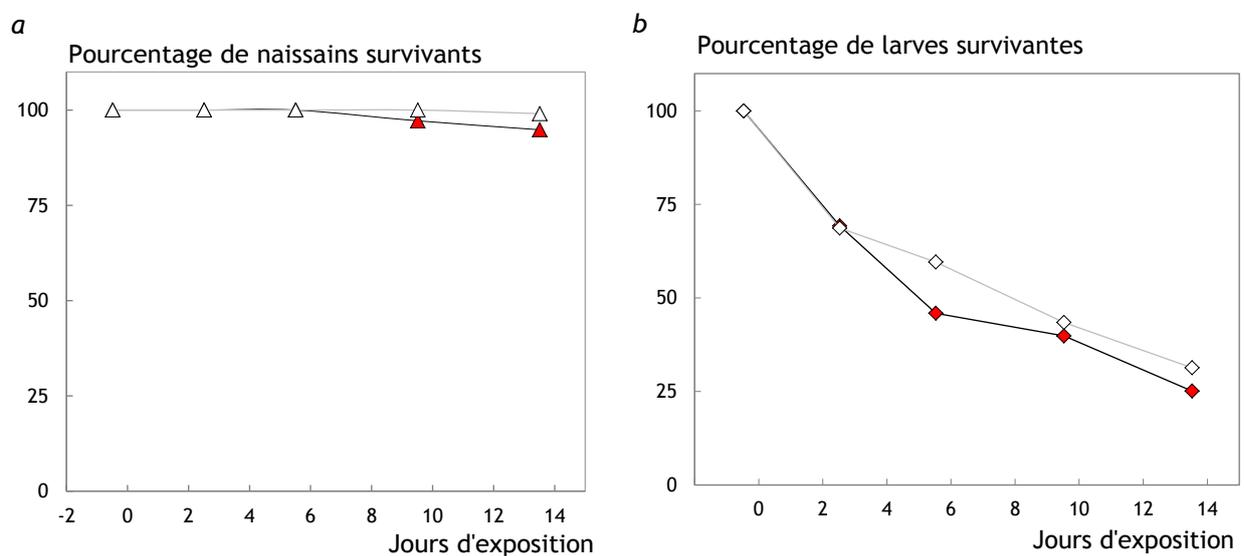


Figure 41 : suivi temporel de la survie des juvéniles *témoin* et exposés à une source externe de rayonnements gamma.

- a) △ naissains *témoin* ( $n_{j_0}=240$ ) ; ▲ naissains 27,3 mGy.h<sup>-1</sup> ( $n_{j_0}=200$ ) ;  
 b) ◇ larves *témoin* ( $n_{j_0}=170$ ) ; ◆ larves 29,3 mGy.h<sup>-1</sup> ( $n_{j_0}=205$ ).

Les 4 UE disposaient chacune d'un nombre élevé de larves en début d'expérimentation. Ainsi, malgré la mortalité naturelle intrinsèque au modèle *larve*, il restait suffisamment d'individus à la fin de l'exposition pour réaliser des mesures de tailles et des traitements statistiques robustes.

### III.2.3.3 Suivi de la croissance des juvéniles exposés à une source externe de rayonnements gamma

Les résultats relatifs aux mesures de croissance des juvéniles *témoin* et irradiés sont présentés en figures 42 et 43. Les données de tailles sont illustrées sous forme de boîte de Tukey. Que ce soit pour le modèle *naissain* ou *larve*, la gamme des tailles prises par les animaux augmente à mesure que

l'expérience progresse comme le montre l'écart interquartile grandissant (chapitre 2 partie 1.4.1). Au début de l'exposition le diamètre de *Feret* moyen des naissains est de  $690 \pm 54 \mu\text{m}$  (moy.  $\pm$  ET,  $n=440$ ). Les naissains exposés aux conditions *témoin* et exposés au débit de dose de rayonnement gamma externes de  $27,3 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$  présentent des croissances semblables tout le long de l'expérimentation. Après 14 jours d'exposition, le diamètre de *Feret* moyen des naissains diffère de  $10 \mu\text{m}$  entre les deux groupes. Il est de  $1314 \pm 319 \mu\text{m}$  (moy.  $\pm$  ET,  $n=210$ ) pour le groupe *témoin* et de  $1324 \pm 310 \mu\text{m}$  ( $n=165$ ) pour le groupe irradié. Après 14 jours d'exposition à une dose totale de  $9,2 \text{ Gy}$  de rayonnements gamma externes, aucune différence statistique n'est constatée à partir de ces données (test-T de Welch,  $p>0,05$ ).

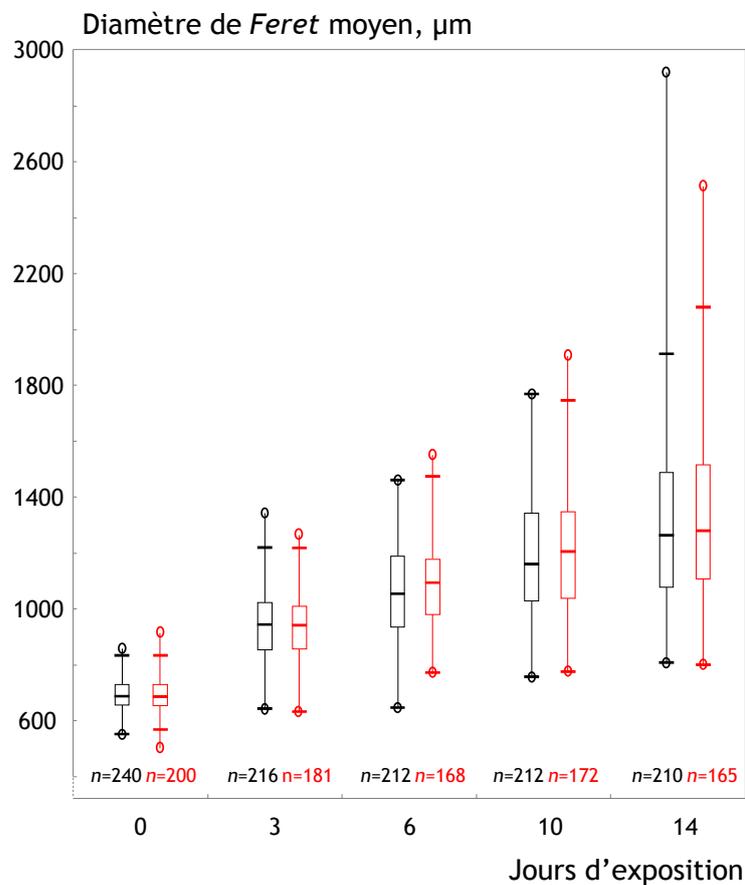


Figure 42 : suivi temporel de la croissance de naissains *témoin* et exposés à une source externe de rayonnements gamma.

■ *témoin* ; ■ rayonnement gamma externes :  $27,3 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ .

Les données de croissance des larves *témoin* et exposées à une source externe de rayonnements gamma sont représentées sur la figure 43. Au début de l'exposition, la longueur moyenne des larves est de  $68,8 \pm 5 \mu\text{m}$  (moy.  $\pm$  ET,  $n=429$ ). Les larves exposées aux conditions *témoin* et au débit de dose de rayonnement gamma externes de  $29,3 \text{ mGy}\cdot\text{h}^{-1}$  présentent des croissances semblables tout le long de

l'expérimentation. Après 14 jours d'exposition, la longueur moyenne des larves irradiées est de 11  $\mu\text{m}$  plus élevées que pour le groupe *témoin*. Elle est de  $111 \pm 35,1 \mu\text{m}$  (moy.  $\pm$  ET,  $n=62$ ) pour le groupe *témoin* et de  $122 \pm 33,3 \mu\text{m}$  ( $n=58$ ) pour le groupe irradié. Après 14 jours d'exposition à une dose totale de 9,8 Gy de rayonnements  $\gamma$ -externes, il n'y a pas de différence statistique entre les deux groupes (test-T de Welch,  $p>0,05$ ).

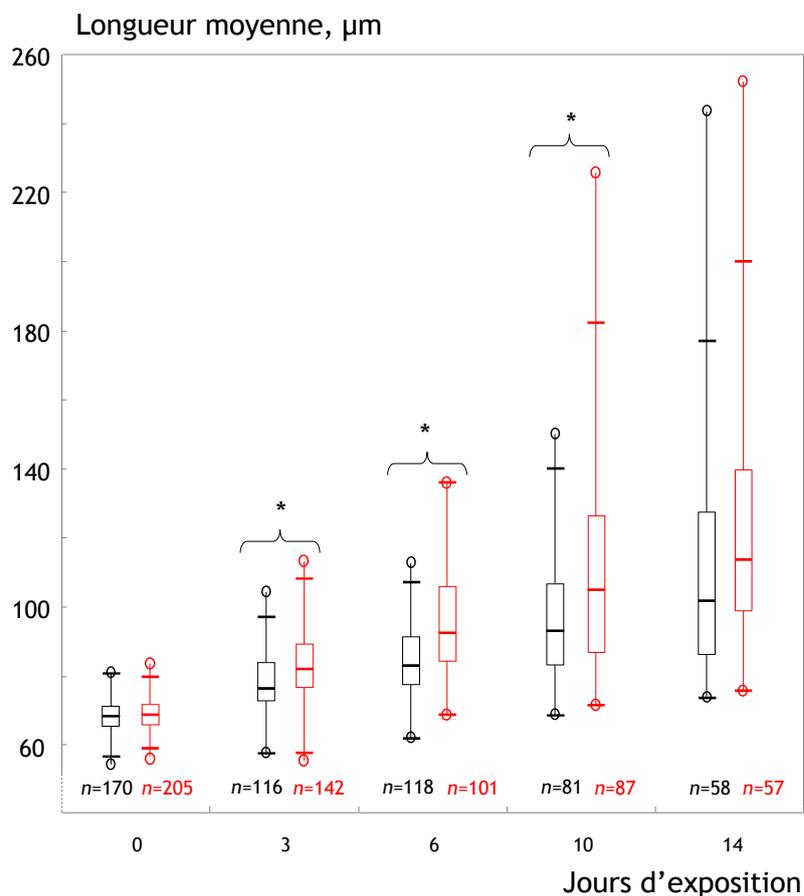


Figure 43 : suivi temporel de la croissance de larves *témoin* et exposés à une source externe de rayonnements gamma.

■ *témoin* ; ■ rayonnements  $\gamma$ -externes : 29,3 mGy.h<sup>-1</sup>.

\* test-T de Welch,  $p<0,05$ .

### III.2.3.4 Mesures de l'expression transcriptionnelle des 9 gènes ciblés chez les naissains exposés à une source externe de rayonnements gamma

La figure 44 représente les niveaux d'expression transcriptionnelle de MT1&2 et MXR mesurés chez des naissains après 14 jours d'exposition à une dose totale de 9,2 Gy de rayonnements gamma externes. Les données sont très similaires quel que soit l'ARN de référence utilisé. Avant le début de l'irradiation des naissains ( $T_0$ ), les niveaux d'expression du gène de MT1&2 sont cohérents avec ceux d'huîtres adultes issus de l'environnement (Farcy *et al.* 2007). Au même moment, le niveau d'expression du gène MXR est deux fois plus élevé que le niveau environnemental. Cette variation reste très faible et s'explique par le fait que les mesures à  $T_0$  correspondent à un réplicat de mesure à partir

d'échantillons de plusieurs dizaines de naissains entiers. Malgré cela, l'effectif élevé permet d'apprécier convenablement le niveau d'expression transcriptionnelle des 9 gènes à  $T_0$ .

Les mesures après 14 jours d'exposition sont réalisées en duplicata. Les niveaux d'expression transcriptionnelle à 14 jours sont également dans la gamme des niveaux environnementaux (trait pointillé vert). Par comparaison avec l'étude de [Farcy et al. \(2011\)](#), ces niveaux sont bien inférieurs aux niveaux mesurés chez des huîtres adultes exposés 100 minutes à une dose totale de rayonnements gamma externes de 20 Gy pour lesquels une augmentation significative des niveaux d'expressions par rapport au témoin avait été mesurée (trait pointillé rouge).

Les mesures des niveaux d'expression transcriptionnelle des autres gènes ciblés sont également tous dans la gamme des niveaux environnementaux. Aucune différence d'expression n'a pu être mise en évidence que ce soit au regard du temps ou des conditions d'exposition.

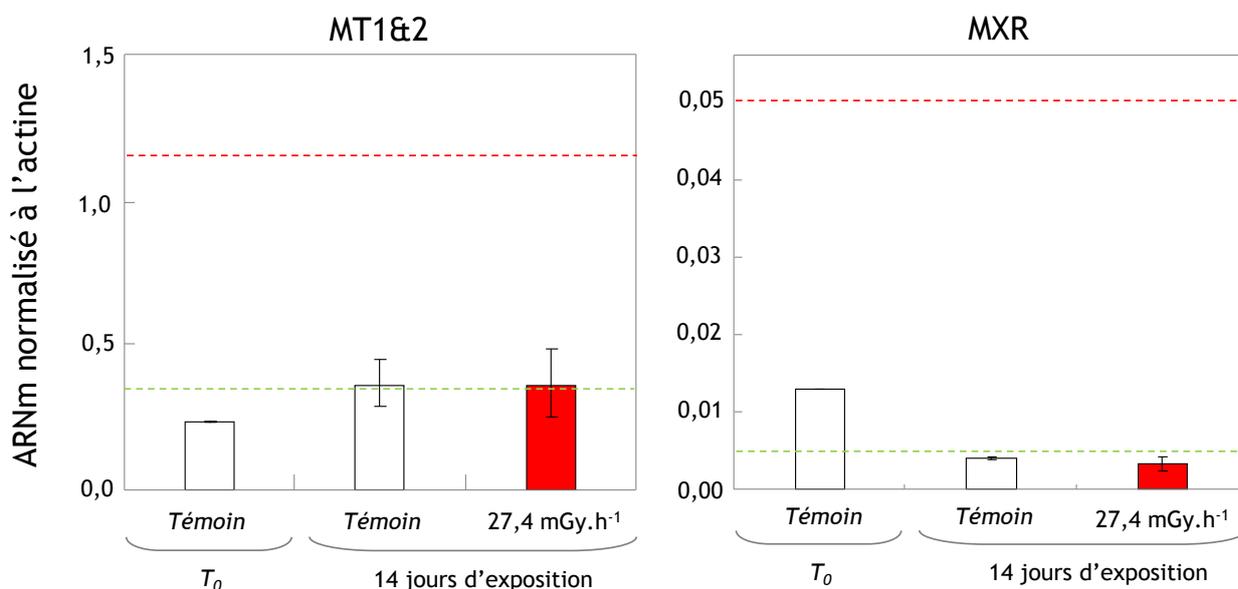


Figure 44 : niveau d'expression transcriptionnelle des gènes codant pour MT1&2 (a) et MXR (b) en réponse à une exposition de 14 jours à un débit de dose de rayonnements gamma externes de 27,3 mGy.h<sup>-1</sup>.

Les données sont normalisées à l'ARNm de référence de l'actine.

- ARNm normalisé à l'actine chez des huîtres adultes issues de l'environnement ([Farcy et al. 2007](#)),
- ARNm normalisé à l'actine chez des huîtres adultes ayant reçues 20 Gy en 100 min ([Farcy et al. 2011](#)).

## III.3 EXPOSITION CHRONIQUE PAR BALNEATION DE JUVENILES A UN EMETTEUR ALPHA : L'AMERICIUM 241

### III.3.1 INTRODUCTION

Les effets des radionucléides émetteurs de particules alpha, dont la durée de vie de certains dépasse celle de la plupart des organismes vivants, n'ont été que peu étudiés alors que leurs propriétés physiques font qu'ils interagissent plus efficacement avec la matière organique lorsque le radionucléide est internalisé dans l'organisme. Cette étude est consacrée aux effets chroniques de l'américium 241 ( $^{241}\text{Am}$ ) sur les jeunes stades de développement de l'huître creuse.

Alors que de nombreuses études ont porté sur les phénomènes d'incorporation et de bioaccumulation de  $^{241}\text{Am}$  au sein d'invertébrés aquatiques (Metian *et al.* 2011, Ryan 2002, Güngör *et al.* 2001, Miramand *et al.* 1986, Warnau *et al.* 1996, Milcent *et al.* 1996, Bjerregaard *et al.* 1986, Guary *et al.* 1981), peu de données traitent des effets toxiques de  $^{241}\text{Am}$  sur la vie marine.

L'américium 241 est un actinide (numéros atomiques compris entre 89 et 103 inclus). Sa période radioactive avoisine 432 années. Il se désintègre en neptunium 237 en émettant une particule alpha (noyau d'hélium) à forte énergie de désintégration (5,638 MeV) mais à faible distance de l'atome (quelques  $\mu\text{m}$ ). Par conséquent, lorsqu'il est incorporé dans l'organisme,  $^{241}\text{Am}$  est un radionucléide à très fort pouvoir radiotoxique. Il s'agit d'un radionucléide artificiel. Il est retrouvé dans l'environnement naturel du fait de rejets directs ou de la décroissance de plutonium 241 ( $T_{1/2} = 14,2$  ans). Les essais d'armes nucléaires atmosphériques auraient générés quelques  $5.10^{14}$  Bq d' $^{241}\text{Am}$ , principalement retombés dans l'hémisphère nord (Pentreath 1988). Dans l'industrie nucléaire civile,  $^{241}\text{Am}$  est principalement rejeté sous contrôle dans l'environnement lors du recyclage des combustibles nucléaires usés. Les rejets d' $^{241}\text{Am}$  dans le milieu marin étaient de  $3,5.10^9$  Bq en 1999 pour l'usine de recyclage de la Hague et de  $5.10^{10}$  Bq en 1997 pour l'usine de Sellafield. Son activité volumique dans l'eau de mer est de l'ordre de  $40 \text{ mBq.m}^{-3}$ .

L'objectif de cette étude était de tester les effets d'une contamination interne en  $^{241}\text{Am}$  sur la croissance et la survie de plusieurs sous populations de juvéniles depuis le début de leur vie jusqu'à deux semaines d'exposition. Parallèlement aux mesures d'effets, des mesures conservatives de l'activité en  $^{241}\text{Am}$  ont été menées au niveau du corps entier des naissains. Considérant le manque de connaissances sur la radiotoxicité de  $^{241}\text{Am}$ , les juvéniles ont dans un premier temps été exposés à la concentration maximale en  $^{241}\text{Am}$  utilisable dans le laboratoire, afin d'identifier des cibles biologiques potentielles. Si des effets sont perceptibles à ce fort niveau d'exposition, alors les effets de doses intermédiaires sont ensuite étudiés.  $^{241}\text{Am}$  est également un émetteur de rayonnements gamma. Son activité dans l'eau de mer et dans les huîtres peut donc aisément être suivie par spectrométrie gamma de façon non-destructive.

### III.3.1.1 Source commerciale d'américium 241

La source commerciale d' $^{241}\text{Am}$  utilisée lors de ces travaux était contenue dans une ampoule scellée en verre de 5 mL (CERCA LEA). L'activité initiale de la source était de  $800 \text{ KBq}\cdot\text{mL}^{-1}$  d' $^{241}\text{Am}$  dilué dans une solution d'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$  1N).

La source d'Am contenait également un autre élément chimique employé comme stabilisateur : l'euporium sous forme de chlorure ( $\text{EuCl}_3$ ). La concentration en  $\text{EuCl}_3$  dans la source était de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  soit 50  $\mu\text{g}$  dans toute la source. L'Eu est un lanthanide (numéros atomiques compris entre 57 et 71 inclus) également dénommé "terre-rare". Cet élément chimique, non radioactif, est potentiellement toxique pour les organismes vivants. De telles teneurs en euporium nous ont contraint à tester, parallèlement aux expériences sur l' $^{241}\text{Am}$ , les effets d'une contamination unique à l'euporium chez les juvéniles d'huîtres.

L'Eu est un analogue chimique des actinides trivalents. Ses propriétés chimiques sont proches de celles du calcium, élément essentiel dans les cellules. L'Eu et l'Am sont généralement sous forme trivalente mais peuvent changer de degré d'oxydation et présenter des formes physico-chimiques dont le comportement diffère de celui des terres-rares strictement trivalentes. L'Eu trivalent est la seule forme stable dans l'eau. Il peut former de nombreux composés parmi lesquels  $\text{Eu}(\text{OH})_3$  est le plus stable en milieu alcalin (RAI et SERNE 1978). Au pH de l'eau de mer, la thermodynamique prévoit la précipitation de  $\text{Eu}(\text{OH})_3$  pour des concentrations en  $\text{Eu}^{3+}$  supérieures ou égales à  $10^{-9} \text{ M}$ .

Chez les animaux, l'Am se dépose préférentiellement dans le foie et sur le squelette (Garnier-Laplace et Roussel-Debet 2001). L'Am est considéré présent dans l'eau de mer sous forme trivalente  $\text{Am}(\text{III})$  et est largement associé aux matières particulaires dont le Kd est élevé (coefficient de distribution eau-particule) (Ryan 2002). Miramand *et al.* (1991) ont étudié le transfert de l'Am depuis l'eau de mer vers la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* et ont observé par histo-radiographie la microlocalisation de l'Am. Cette étude suggère que la pénétration de l'Am dans les tissus de ce bivalve a lieu principalement par la voie digestive même lorsque le vecteur contaminant est l'eau de mer. Miramand et Germain (1986), et plus récemment Zuykov *et al.* (2009), ont montré une accumulation préférentielle de l' $^{241}\text{Am}$  dans le peristroacum inorganique des coquilles de bivalve.

Les naissains et larves d'huîtres creuses ont été exposés à une eau de mer contaminée en  $^{241}\text{Am}$  à raison d'environ  $50 \text{ Bq}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Cette concentration est environ 1 milliard de fois plus importante que la concentration en  $^{241}\text{Am}$  susceptible d'être rencontré dans l'environnement marin de la presqu'île du Nord Cotentin. Si des effets sont visibles à de tels niveaux d'exposition alors les effets potentiels de niveaux intermédiaires seront ensuite étudiés.

## III.3.2 MATERIELS ET METHODES

### III.3.2.1 Quelques précautions

Plusieurs précautions ont été prises lors de ces travaux sur l'<sup>241</sup>Am.

Les UE étaient constituées de verre afin de minimiser l'adsorption de l'Am sur les parois. Au cours de la semaine précédant l'arrivée des juvéniles au laboratoire, les UE étaient exposées à un milieu composé d'eau de mer et d'<sup>241</sup>Am afin de saturer au maximum les sites de fixation de ce dernier sur les parois des UE avant l'introduction des juvéniles.

La source d'<sup>241</sup>Am était diluée dans une solution d'acide nitrique (HNO<sub>3</sub> 1N). Lors de la contamination du milieu en <sup>241</sup>Am, nous avons pris soin d'ajouter une quantité équivalente en soude (NaOH 1N). Des contrôles par mesure du pH du milieu avant et après contamination nous ont confortés dans l'absence de variation du pH. Une ultime précaution a consisté à ajouter un volume équivalent de HNO<sub>3</sub> et NaOH dans les milieux destinés aux élevages des juvéniles *témoin*.

### III.3.2.2 Dispositif d'exposition des naissains à l'<sup>241</sup>Am

La [figure 45](#) rassemble des photos du dispositif d'exposition à l'<sup>241</sup>Am chez les naissains. Pour limiter les risques de contaminations par d'éventuels aérosols, nous avons substitué le bullage (UE exposées au rayonnement gamma externe ; partie 2 de ce chapitre) par une agitation lente avec un barreau magnétique. Chaque UE était recouverte avec un parafilm (sans toutefois bloquer la circulation de l'air).

Plusieurs répliqués d'UE contenaient un tamis accueillant 40 naissains ([figure 45-a](#)). Les tamis étaient placés sous une loupe binoculaire ([figure 45-b](#)) puis une photo était prise afin de mesurer la taille des naissains ([figure 45-c et d](#)).

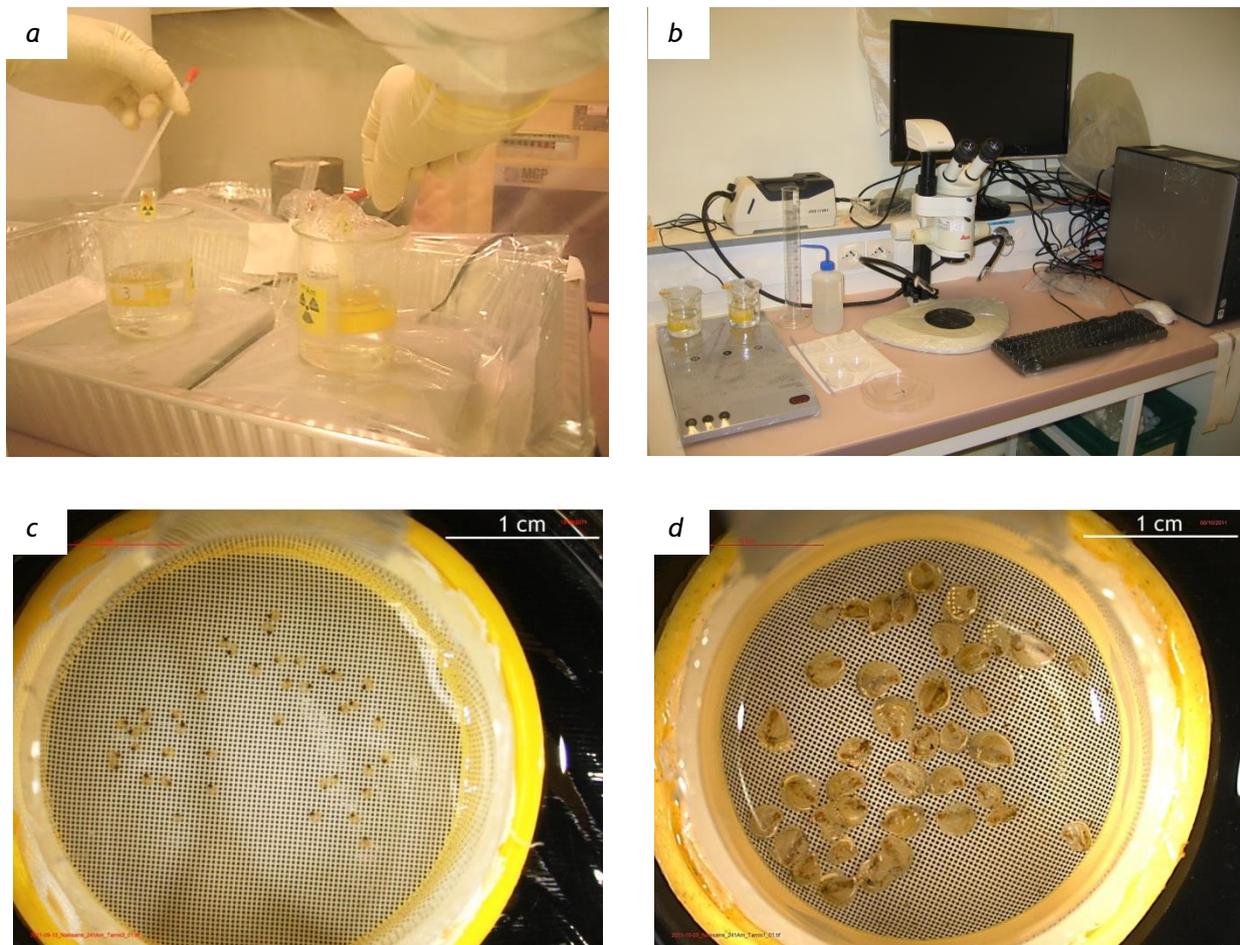


Figure 45 : photos du dispositif d'exposition par baignation en milieu contrôlé (a), de la plate-forme de mesure de croissance (b) et d'une population de 40 naissains en début (c) et fin (d) d'exposition lors des expositions de juvéniles à l'américium 241.

### III.3.2.3 Spectrométrie gamma : mesures d'activité en $^{241}\text{Am}$ dans l'eau de mer et les naissains contaminés

Tout au long de l'expérience, des mesures d'activité en  $^{241}\text{Am}$  ont été effectuées en spectrométrie gamma GeHP (Figure 46). Pour se faire, les naissains étaient prélevés temporairement de leur cage puis placés au fond d'un tube eppendorf d'1,5 mL. L'eau de mer contaminée était totalement aspirée pour ne laisser que les naissains "à sec". Après pesée et comptage de l'activité en  $^{241}\text{Am}$ , les naissains contaminés étaient replacés dans leurs cages et UE respectives. Afin d'éviter tous biais lié à cette étape d'exondation, les naissains *témoin* ont subi le même traitement.

Les mesures d'activités dans l'eau de mer se faisaient par comptage de 50 g de milieu d'exposition à la fin et au début de chaque changement du milieu.



Figure 46 : photo du détecteur germanium coaxial de type N utilisé lors des expositions de juvéniles à l'américium 241.

#### III.3.2.4 Protocole d'exposition chronique des juvéniles à l'<sup>241</sup>Am

Le protocole d'exposition des juvéniles d'huîtres à l'américium 241 est décrit en figure 47. Après avoir passé 24 heures dans les structures d'acclimatation (partie II.2.2.1 du chapitre 2), les naissains (2 *jpm*) et les larves (2 *jpf*) étaient distribués dans leur cages respectives puis mesurés en taille juste avant le début de l'exposition à l'<sup>241</sup>Am. Les juvéniles étaient nourris d'après les recommandations de la partie II.1.2 du chapitre 2. Les milieux de culture (eau de mer et phytoplancton) étaient intégralement renouvelés les lundis, mercredis et vendredis. La croissance et la survie des juvéniles étaient régulièrement mesurées à partir des cages. Lors des changements de milieu, les activités en <sup>241</sup>Am étaient mesurées en fin et début de chaque changement de milieu de même que l'activité en <sup>241</sup>Am dans les naissains entiers était mesurée aux jours 0, 6, 10 et 15 de l'expérimentation.

Deux raisons expliquent le fait que les mesures de radioactivité aient eu lieu sur les naissains entiers : 1) il est très difficile de séparer la chair de la coquille d'animaux aussi petits. 2) les naissains utilisés pour ces mesures de radioactivité sont les mêmes que ceux utilisés pour les mesures de croissance.

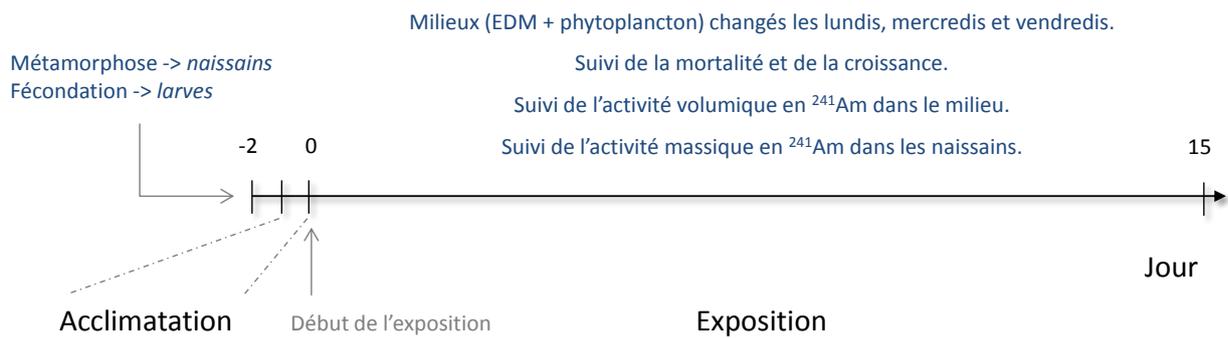


Figure 47 : descriptif temporel des expositions de naissains et larves à de fortes concentrations en  $^{241}\text{Am}$ .

### III.3.3 RESULTATS DES EXPOSITIONS DE NAISSAINS A L'EUROPIUM

#### III.3.3.1 Suivi de la mortalité des naissains exposés à l'europium

La figure 48 représente les moyennes de pourcentage de survie au cours du temps chez des naissains exposés aux conditions *témoin* et à 2,18 nM d'europium. Cette concentration en Eu correspond à la concentration à laquelle les huîtres sont exposées lors de la contamination en  $^{241}\text{Am}$ . Les mesures sont réalisées en duplicata à partir de deux sous populations de 40 individus. Le pourcentage de survie des deux groupes de naissains est affecté au-delà du 4<sup>ème</sup> jour d'exposition. Après 15 jours d'exposition, les pourcentages de survie des naissains *témoin* et exposés à 2,18 nM d'Eu sont similaires et prennent pour valeurs 96 et 95%, respectivement.

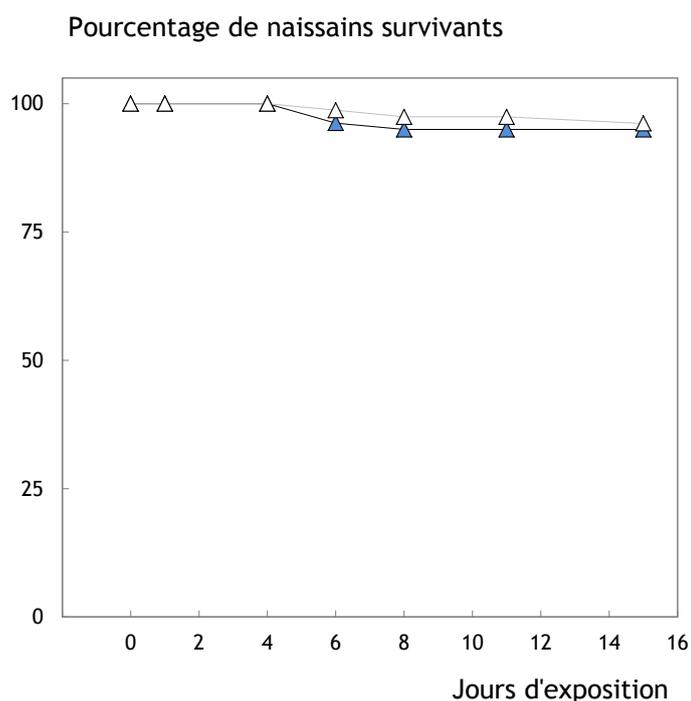


Figure 48 : suivi temporel de la survie des naissains *témoin* et exposés à l'europlum.

—△— *témoin* ; —▲— Eu : 2,18 nM.

### III.3.3.2 Suivi de la croissance des naissains exposés à l'europlum

La figure 49 représente les données de croissance des naissains exposés aux conditions *témoin* et à 2,18 nM d'europlum. Dans chaque traitement, les données correspondent à deux sous-populations de 40 naissains. Les données relatives aux naissains exposés à l'Eu sont volontairement décalées en abscisse par rapport aux données *témoin* mais l'ensemble des mesures est réalisé au même moment.

Au début de l'exposition, le diamètre de *Feret* moyen des naissains est de  $564 \pm 68 \mu\text{m}$  (moy.  $\pm$  ET,  $n=160$ ). Les naissains exposés aux conditions *témoin* et à 2,18 nM d'Eu présentent des croissances semblables tout le long de l'expérimentation. Après 15 jours d'exposition, les diamètres de *Feret* moyens de chaque population de naissains sont semblables. A cette date, l'une des deux sous-populations de naissains *témoin* présente un diamètre de *Feret* moyen un peu plus faible se traduisant d'un point de vue statistique par une différence significative entre les groupes *témoin* et exposés à l'Eu (test-T de Student ;  $p < 0,05$ ). Cependant, cette différence n'a pas de sens d'un point de vue biologique et n'a pas été confirmée lors d'une seconde expérience.

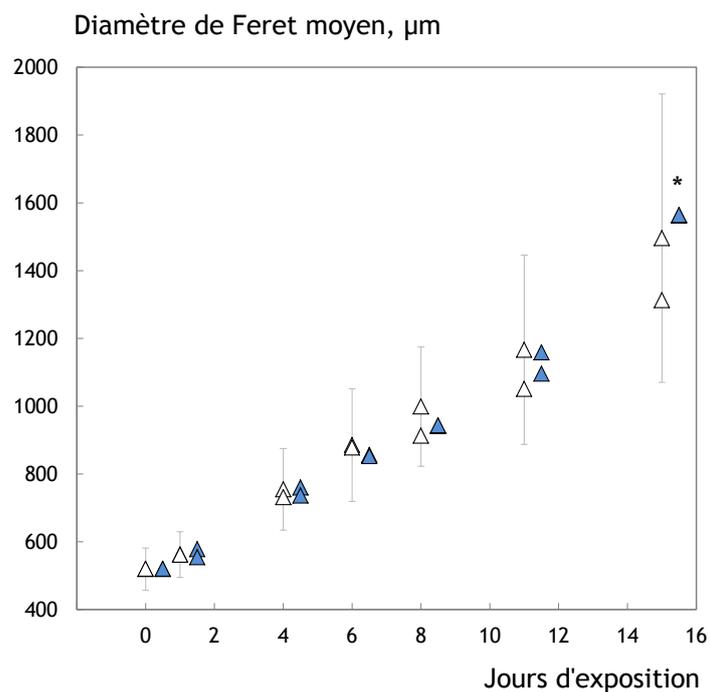


Figure 49 : suivi temporel de la croissance par tamis de naissains *témoin* et exposés l'euporium.

△ *témoin* :  $n_{j_0}=2 \times 40$  ; ▲ Eu : 2,18 nM -  $n_{j_0}=2 \times 40$ .

Ces expérimentations préliminaires sur l'euporium ont montré que ce dernier n'impactait ni la mortalité ni la croissance des naissains à des niveaux d'exposition équivalent à la quantité en Eu ajoutée conjointement à la contamination en  $^{241}\text{Am}$ .

L'effet de l' $^{241}\text{Am}$  a donc ensuite été testé sur le modèle *naissain*.

### III.3.4 RESULTATS DES EXPOSITIONS DE NAISSAINS A L'AMERICIUM 241

#### III.3.4.1 Suivi de l'activité en américium 241 dans les naissains entiers

La figure 50 représente les facteurs de concentration des quelques 120 naissains exposés à l' $^{241}\text{Am}$  au cours du temps. Seule la dernière mesure a pu être réalisée en séparant trois lots de 40 naissains.

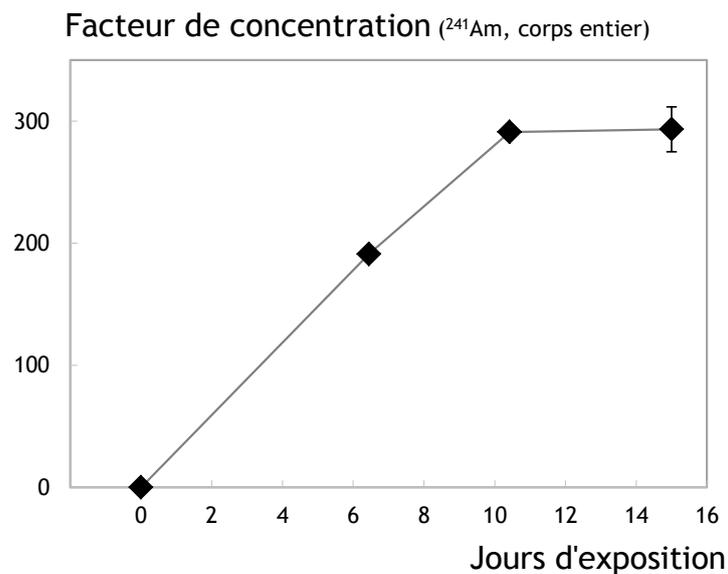


Figure 50 : suivi temporel de l'activité en <sup>241</sup>Am dans les naissains entiers.

La quantité de radioactivité accumulée dans les naissains entiers a augmenté de manière linéaire au cours des 10 premiers jours de l'exposition. Après deux semaines de baignades le facteur de concentration est de  $293 \pm 18$  (moy.  $\pm$  ET,  $n=3$ ). La courbe d'accumulation semble s'infléchir même si l'équilibre n'est vraisemblablement pas encore atteint.

#### III.3.4.2 Suivi de la mortalité des naissains exposés à l'américium 241

La figure 51 représente les moyennes des pourcentages de survie au cours du temps des naissains exposés aux conditions *témoin* et à  $56 \pm 8.6$  ( $n=13$ ) Bq.mL<sup>-1</sup> d'américium 241. Les mesures sont réalisées en triplicata à partir de trois sous-populations de 40 individus. Le pourcentage de survie des deux groupes de naissains est affecté au-delà du 2<sup>ème</sup> jour d'exposition. Après 15 jours d'exposition, les pourcentages de survie des naissains *témoin* et exposés à 56 Bq.mL<sup>-1</sup> d'<sup>241</sup>Am sont similaires et prennent pour valeurs 94 et 96 %, respectivement. Il n'existe pas de différence significative des pourcentages de survie entre les deux groupes de naissains (test-t de Student ;  $p>0,05$ ,  $n=3$ ).

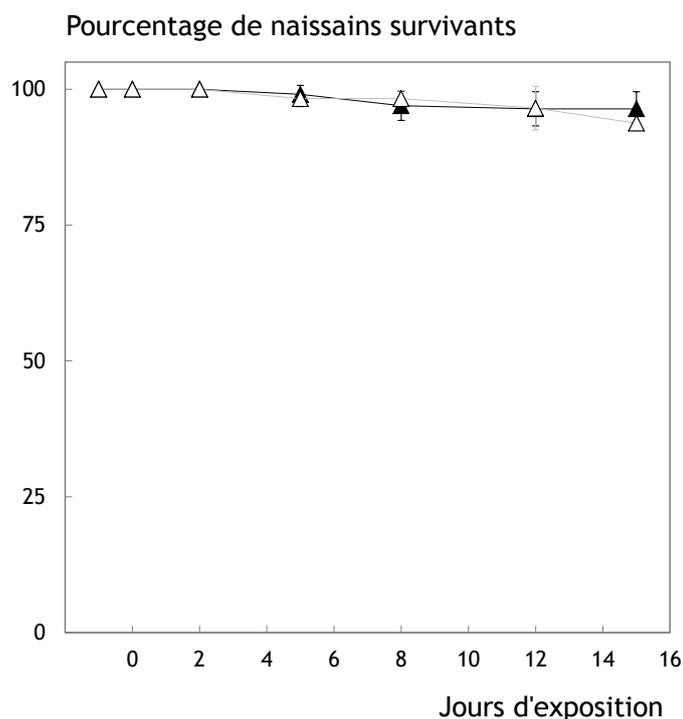


Figure 51 : suivi temporel de la survie des naissains *témoin* et exposés à l'<sup>241</sup>Am.

—△— *témoin* ; —▲— <sup>241</sup>Am : 56 Bq.mL<sup>-1</sup>.

### III.3.4.3 Suivi de la croissance des naissains exposés à l'américium 241

La figure 52 représente les données de croissance des naissains exposés aux conditions *témoin* et à 56 Bq.mL<sup>-1</sup> d'<sup>241</sup>Am. Dans chaque traitement, les données correspondent à trois sous-populations de 40 naissains. Le jour précédant le début de l'exposition, le diamètre de *Feret* moyen des naissains est de  $423 \pm 46 \mu\text{m}$  ( $n=240$ ). Les naissains exposés aux conditions *témoin* et à 56 Bq.mL<sup>-1</sup> d'<sup>241</sup>Am présentent des croissances similaires tout le long de l'expérimentation. Après 15 jours d'exposition, les diamètres de *Feret* moyens de chaque population de naissains sont semblables et prennent pour valeurs  $1107 \pm 174 \mu\text{m}$  (moy.  $\pm$  ET,  $n=101$ ) et  $1081 \pm 164 \mu\text{m}$  ( $n=107$ ) pour les naissains *témoin* et exposés à l'<sup>241</sup>Am, respectivement. Il n'y a pas de différence statistique des moyennes de diamètres de *Feret* à 15 jours d'exposition entre les groupes *témoin* et exposés (test-t de Student ;  $p>0,05$ ,  $n=3$ ).

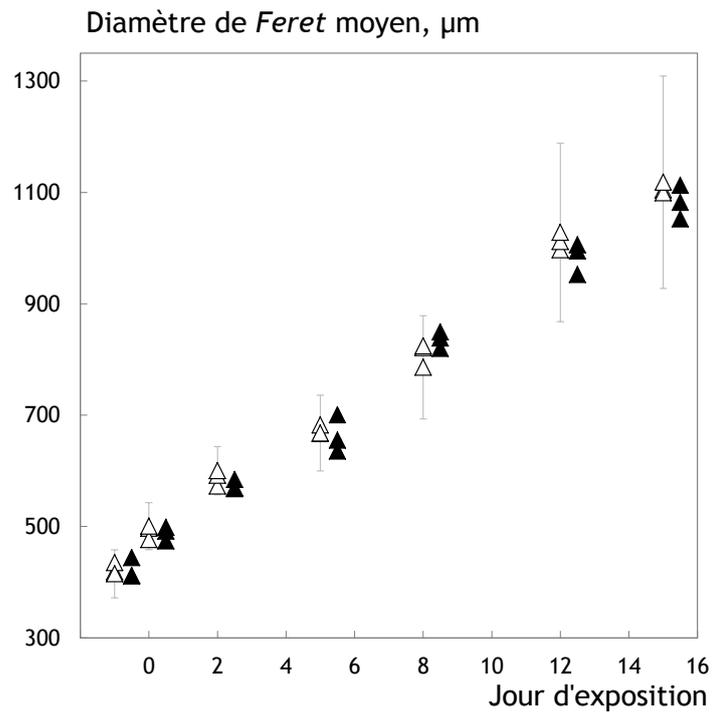


Figure 52 : suivi temporel de la croissance par tamis de naissains *témoin* et exposés à l'<sup>241</sup>Am.

△ *témoin* :  $n_{j_0}=3 \times 40$  ; ▲ <sup>241</sup>Am : 56 Bq.mL<sup>-1</sup> -  $n_{j_0}=3 \times 40$ .

Ces expériences sur les naissains ont été répétées trois fois. Les résultats sont très cohérents entre eux.

Les facteurs de concentration des naissains entiers après deux semaines d'exposition prennent des valeurs comprises entre 246 et 293.

Aucun effet sur la croissance et la mortalité n'a été observé lors de ces expositions à une activité en <sup>241</sup>Am près d'un milliard de fois plus importante que dans l'eau de mer naturelle au Cap de La Hague.

### III.3.5 RESULTATS DES EXPOSITIONS DE LARVES A L'EUROPIUM

Les larves sont plus sensibles que les naissains vis-à-vis des conditions environnementales. L'étude sur le zinc, présentée dans la partie 2 du chapitre 2 de ce manuscrit, a mis en évidence que l'EC50 de la croissance larvaire était plus faible que celle calculée chez les naissains (pour des durées et conditions d'exposition identiques).

Il existe un taux de mortalité naturel et intrinsèque au modèle *larve* relativement élevé par rapport au modèle *naissain* chez qui seuls quelques individus *témoin* peuvent mourir au cours des deux semaines suivant la métamorphose. Les mesures de croissance larvaire doivent donc impérativement être prises en compte conjointement avec les données de mortalité. Par conséquent, et ce afin de mieux apprécier les effets potentiels de l'Eu seul sur les larves, nous avons exposé des larves à 6 niveaux de contaminations en Eu.

Le [tableau 9](#) rassemble les concentrations nominales en Eu allant du niveau *témoin* au niveau *Eu5* dont la concentration est environ 10 fois plus importante que celle administrée conjointement à une contamination en  $^{241}\text{Am}$  de  $40 \text{ Bq.mL}^{-1}$ .

**Tableau 9** : concentrations nominales en europium (pM) dans l'eau de mer des unités expérimentales lors des expositions de larves.

\* [De Baar et al. 1983](#) : concentration en europium dans l'eau de mer de surface en Atlantique Nord.

Unité expérimentale	Concentration nominale en Eu (pM)
<i>Témoin</i>	* 0,615
<i>Eu1</i>	19
<i>Eu2</i>	97
<i>Eu3</i>	390
<i>Eu4</i>	1940
<i>Eu5</i>	19400

La [figure 53](#) est une photo des 6 UE expérimentales utilisées lors des expositions à l'Eu seul. Chaque UE est un béccher en verre préalablement exposé à l'Eu avant d'accueillir les larves afin de saturer les sites de fixation de l'Eu des parois. Les UE baignent dans un bain marie régulé à  $23,5^{\circ}\text{C}$ . Trois sous-populations d'environ cinquante larves sont disposées dans les UE.



Figure 53 : photo de la structure d'exposition utilisée lors d'expositions de larves à différentes concentrations en Eu.

### III.3.5.1 Suivi de la mortalité des larves exposées à l'euprium

La figure 54 représente les pourcentages de survie des larves exposées aux six concentrations en Eu en fonction du temps. La concentration la plus faible correspond au traitement *témoin* tandis que la concentration *Eu5* correspond à une concentration supérieure d'un facteur 10 à la concentration à laquelle se déroulent les expositions à l' $^{241}\text{Am}$ . Les données relatives aux larves exposées à *Eu4* et *Eu5* sont légèrement décalées en abscisse par rapport aux autres concentrations mais l'ensemble des

mesures a été réalisé au même moment. Les données correspondent aux moyennes calculées à partir des trois sous-ensembles de larves des petits tamis de chaque UE.

Les pourcentages de survie du lot *témoin* sont cohérents avec les valeurs attendues chez ce modèle. Après une semaine d'exposition, le pourcentage de survie *témoin* est de 84% et il est de 58% après deux semaines. Les larves exposées aux milieux contaminés en Eu présentent des pourcentages de survie systématiquement plus faibles que le groupe *témoin* dès 4 jours d'exposition.

L'impact de l'Eu sur la survie des larves n'est pas dose-dépendant puisque la survie des larves du groupe *Eu3* est plus affectée que celle du groupe *Eu4*. Les concentrations *Eu3* et *Eu5* ont le plus d'impact sur la mortalité des larves qui, après 15 jours d'exposition, présentent un pourcentage de survie de 28 et 32%, respectivement. Le dernier jour de l'exposition, il n'y a pas de différence significative des données de survie entre les 6 groupes (ANOVA 1 facteur ;  $p > 0,05$ ,  $n=3$ ).

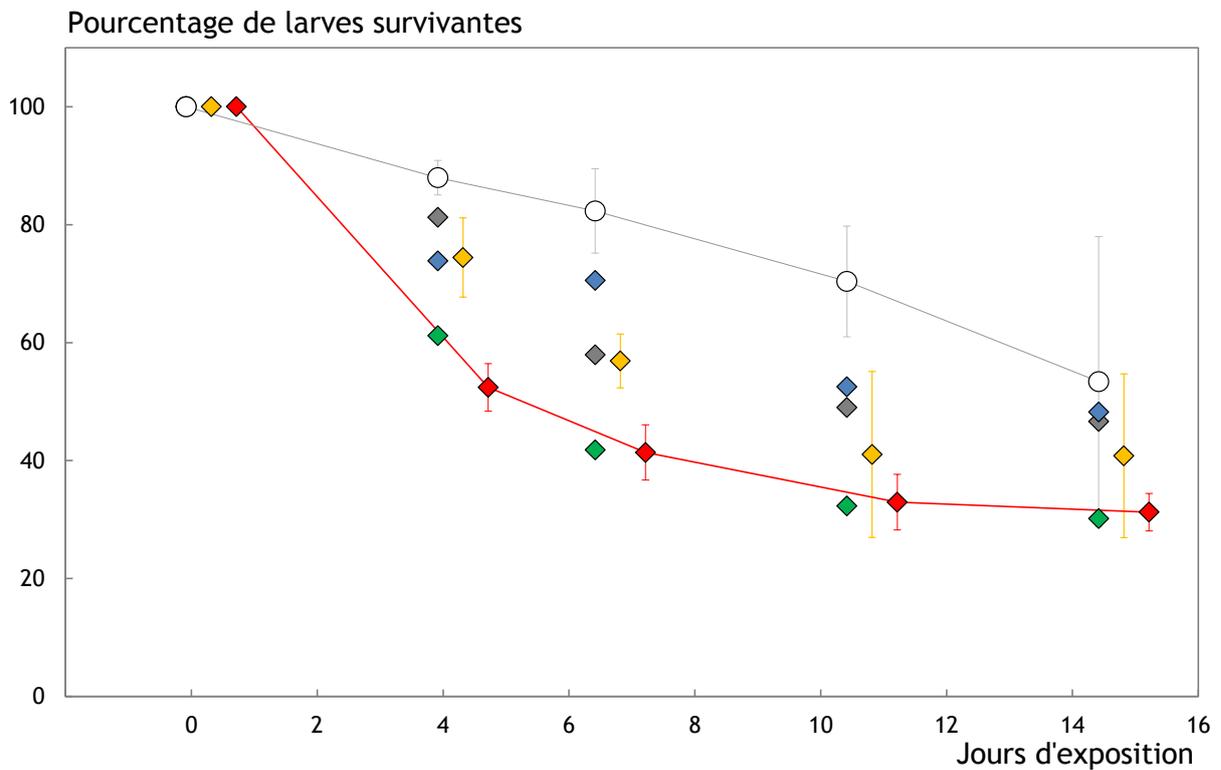


Figure 54 : suivi temporel de la survie des larves *témoin* et exposés à 5 niveaux de contamination en Eu.

○ *témoin* (moy. ± ET, n=3) ; ◆ *Eu1* ; ◆ *Eu2* ;  
 ◆ *Eu3* ; ◆ *Eu4* (moy. ± ET, n=3) ; ◆ *Eu5* (moy. ± ET, n=3).

### III.3.5.2 Suivi de la croissance des larves exposées à l'euporium

La figure 55 représente les données de croissance des larves exposées aux six concentrations en Eu. Dans chaque traitement, les données sont issues de trois sous-populations. Au début de l'exposition, la longueur moyenne des larves est de  $70 \pm 5,5 \mu\text{m}$  (moy.  $\pm$  ET,  $n=1111$ ). Les larves *témoin* et exposées aux 5 niveaux de contamination en Eu présentent des croissances semblables tout le long de l'expérimentation. Après 15 jours d'exposition, les longueurs moyennes des larves de chaque groupe sont très semblables. Elles prennent pour valeurs  $193 \pm 52,5 \mu\text{m}$  (moy.  $\pm$ ET,  $n=102$ ) et  $198 \pm 63 \mu\text{m}$  ( $n=67$ ) pour les larves *témoin* et exposés à la plus forte concentration *Eu5*, respectivement. Aucune différence statistique des longueurs moyennes des larves n'a été mise évidence lors de cette expérimentation (ANOVA 1 facteur : normalité des résidus rejetée, test de Kruskal-Wallis ;  $p>0,05$ ,  $n=3$ ).

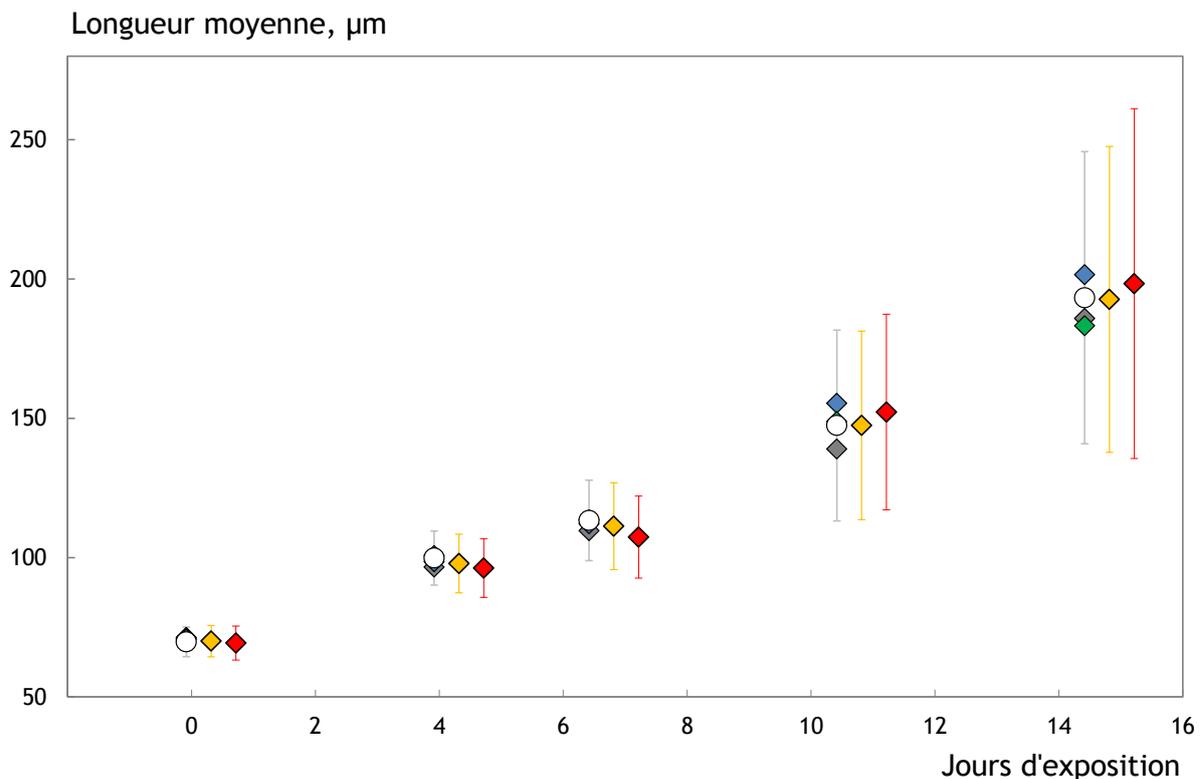


Figure 55 : suivi temporel de la croissance des larves *témoin* et exposées à 5 niveaux de contamination en Eu (longueur moyenne  $\pm$  ET).

○ *témoin* :  $n_{J_0}=176$  ; ◆ *Eu1* :  $n_{J_0}=133$  ; ◆ *Eu2* :  $n_{J_0}=193$  ;  
◆ *Eu3* :  $n_{J_0}=200$  ; ◆ *Eu4* :  $n_{J_0}=200$  ; ◆ *Eu5* :  $n_{J_0}=209$ .

L'expérience a été répétée deux fois et a abouti aux mêmes conclusions. La concentration en Eu, correspondant à celle utilisée conjointement avec une contamination en  $^{241}\text{Am}$  de l'eau à hauteur de  $57 \text{ Bq.mL}^{-1}$ , n'a pas d'effets sur la croissance, mais il persiste des doutes quant à ses effets sur la

mortalité ce qui illustre une fois encore l'importance de considérer les données de croissance et de mortalité ensemble.

### III.3.6 RESULTATS DES EXPOSITIONS DE LARVES A L'AMERICIUM 241

De la même manière que lors des expositions de larves à l'Eu seul (partie III.3.5 de ce chapitre), les UE contaminés à l' $^{241}\text{Am}$  l'ont été une semaine avant de recevoir les larves afin de minimiser l'adsorption de l' $^{241}\text{Am}$  sur les parois en verre. La [figure 56](#) représente les UE exposées au mélange  $^{241}\text{Am}$  et Eu, à l'Eu seul (*témoin-Eu*), et à de l'eau de mer non contaminée (*témoin*). La température était réglée à  $23,4 \pm 0,4^\circ\text{C}$  (moy.  $\pm$  ET,  $n=315$ ).

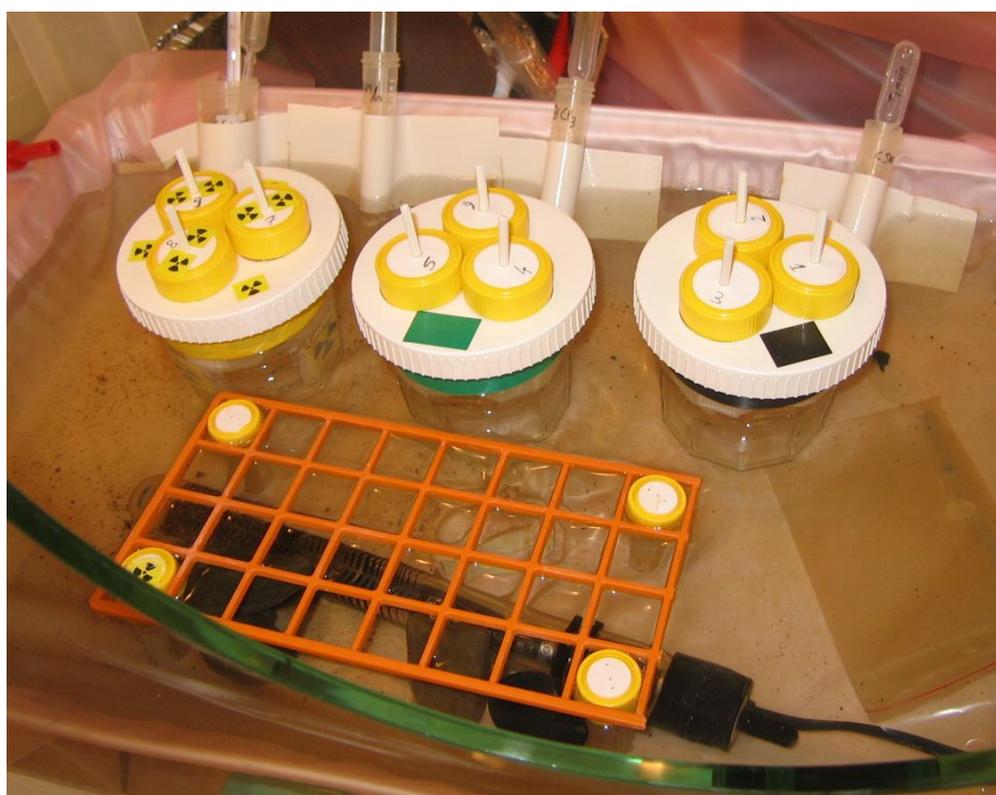


Figure 56 : photo du dispositif d'exposition utilisé lors des contaminations en  $^{241}\text{Am}$ .

#### III.3.6.1 Suivi de la mortalité des larves exposées à l'américium 241

La [figure 57](#) représente les pourcentages de survie au cours du temps des larves exposées aux traitements *témoin*, *témoin-Eu* et à un mélange d'Eu (2,18 nM) et d' $^{241}\text{Am}$  à  $57 \pm 26$  ( $n=14$ )  $\text{Bq.mL}^{-1}$ . Les données correspondent aux moyennes calculées à partir des trois sous-ensembles de larves des

petits tamis de chaque UE. Les pourcentages de survie du lot *témoin* sont cohérents avec les valeurs attendues chez ce modèle. Le 8<sup>ème</sup> jour d'exposition, le pourcentage de survie *témoin* est de 88% et il est de 70% le 14<sup>ème</sup> jour. Les larves *témoin-Eu* et les larves exposées à l'<sup>241</sup>Am présentent des taux de survie similaires aux valeurs *témoin* au cours des 8 premiers jours d'exposition. Le 14<sup>ème</sup> jour d'exposition, les pourcentages de survie moyens des larves *témoin-Eu* et exposées à l'<sup>241</sup>Am diffèrent légèrement du groupe *témoin* et prennent pour valeurs 77 et 58%, respectivement. Le dernier jour de l'exposition, il n'y a cependant pas de différence significative des données de survie entre les 3 groupes (ANOVA 1 facteur ;  $p > 0,05$ ,  $n=3$ ).

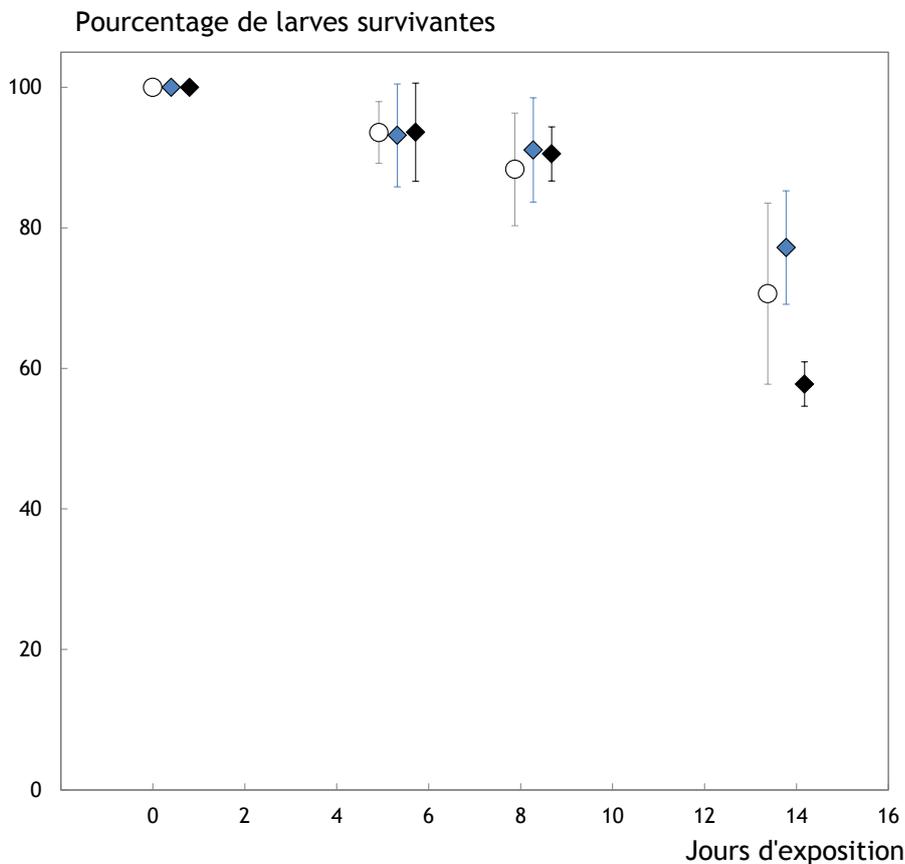


Figure 57 : suivi temporel de la survie des larves *témoin* (○), *témoin-Eu* (◆) et exposées à 57 Bq.mL<sup>-1</sup> d'<sup>241</sup>Am (◆).

### III.3.6.2 Suivi de la croissance des larves exposées à l'américium

La figure 58 représente les données de croissance de trois groupes de larves exposées aux traitements *témoin*, *témoin-Eu* et à un mélange d'Eu et d'<sup>241</sup>Am à 57 Bq.mL<sup>-1</sup>. Dans chaque traitement, les données sont issues de trois sous-populations. Au début de l'exposition, la longueur moyenne des larves est de  $75 \pm 4,7 \mu\text{m}$  (moyenne  $\pm$ ET,  $n=20$ ). Le groupe de larves *témoin* se démarque des groupes *témoin-Eu* et

$^{241}\text{Am}$  par une croissance plus rapide visible dès le 8<sup>ème</sup> jour d'exposition. Après 14 jours d'exposition, la longueur moyenne de l'ensemble des larves *témoin* est de  $176 \pm 32,5 \mu\text{m}$  (moyenne  $\pm$ ET,  $n=168$ ) alors qu'elle n'est que de  $144 \pm 30,6$  ( $n=170$ ) et de  $135 \pm 19,7$  ( $n=124$ ) chez les larves exposées à l'Eu et au mélange Eu et  $^{241}\text{Am}$ , respectivement. A cette date, la longueur moyenne des larves *témoin* diffère significativement de celle des larves exposées au mélange Am et Eu et à l'Eu uniquement (ANOVA 1 facteur, test-t d'appariement,  $p < 0,05$ ,  $n=3$ ). Il n'existe pas de différence significative entre les longueurs moyennes des larves des groupes *témoin-Eu* et  $^{241}\text{Am}$  (ANOVA 1 facteur,  $p > 0,05$ ,  $n=3$ ).

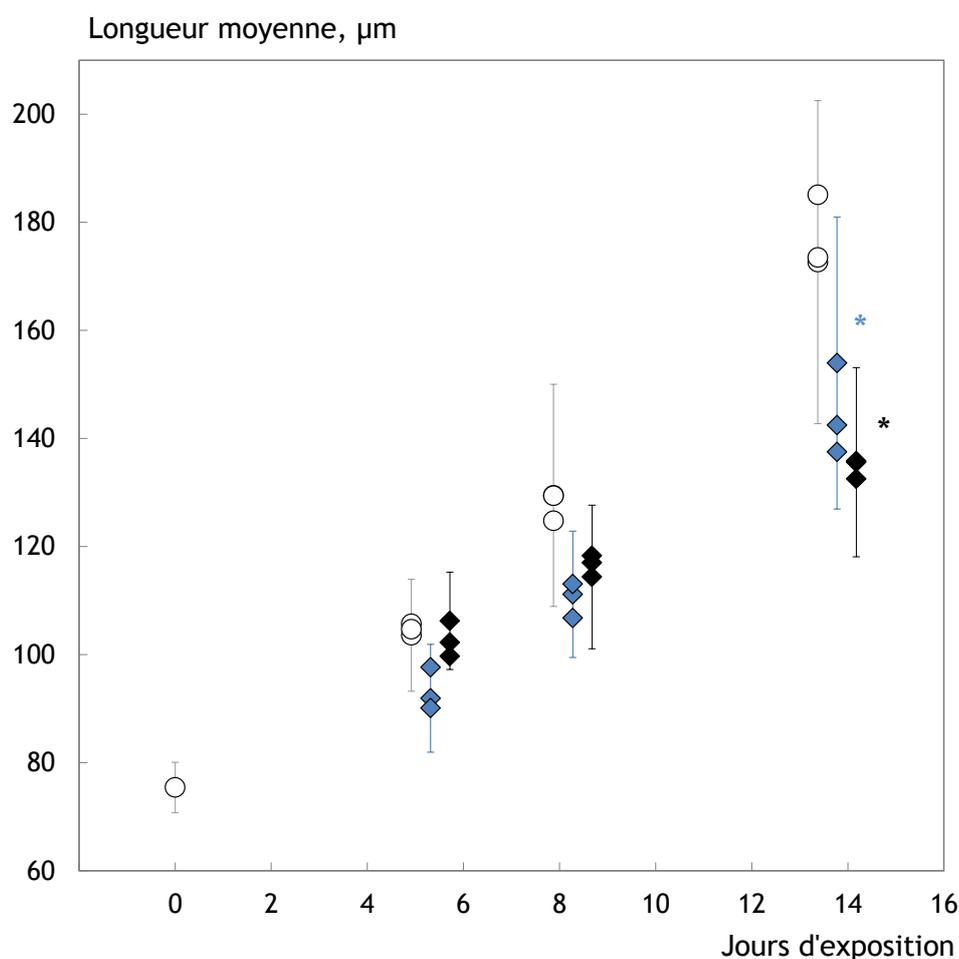


Figure 58 : suivi temporel de la croissance des larves *témoin*, *témoin-Eu* et exposées  $57 \text{ Bq.mL}^{-1}$  d' $^{241}\text{Am}$  (longueur moyenne  $\pm$  ET).

○ *témoin* :  $n_{j_0}=218$  ; ◆ *témoin-Eu* :  $n_{j_0}=201$  ◆  $^{241}\text{Am}$  :  $57 \text{ Bq.mL}^{-1}$  -  $n_{j_0}=200$

Malgré une réponse peu claire des larves vis-à-vis de l'Eu, nous n'avons pas observé d'effet drastique de l' $^{241}\text{Am}$  sur la croissance et la mortalité larvaire après deux semaines d'exposition.

Une seconde expérience aux résultats très similaires a confirmé l'ensemble de ces observations.

### III.4 DISCUSSION

Ces travaux ont porté dans un premier temps sur les effets chroniques d'un débit de dose de rayonnements gamma externe d'environ  $30 \text{ mGy.h}^{-1}$  sur les stades précoces de développement de *C. gigas* au cours d'expositions d'une durée de deux semaines. Dans un deuxième temps, les juvéniles d'huître ont été exposés sur une même période de temps à une eau de mer contaminée à plus de  $50 \text{ Bq.mL}^{-1}$  d' $^{241}\text{Am}$ . Ces niveaux d'exposition étaient les plus élevés techniquement possibles au laboratoire.

Dans les deux cas, nous n'avons pas observé d'effet significatif du paramètre d'exposition radiologique (rayonnement gamma externe ou  $^{241}\text{Am}$  interne) sur la croissance et la mortalité des juvéniles alors que les débits de doses mis en jeu s'inscrivaient dans la "zone de dommage des écosystèmes" selon la classification de Polikarpov (1998).

Lors de l'irradiation gamme externe, les niveaux d'expressions transcriptionnelles des 9 gènes de stress ciblés n'ont pas présenté de fluctuation significative par rapport au groupe *témoin* et par rapport au niveau d'expression mesuré chez des huîtres adultes issues de l'environnement.

Un doute subsiste quant à l'impact de l'Eu sur le modèle *larve*. Cependant nous n'avons pas observé de différence significative vis-à-vis de la croissance et la mortalité entre les groupes de larves exposées au mélange  $^{241}\text{Am}$  et Eu et les groupes de larves exposées à l'Eu seul. Par conséquent, nous n'avons pas mis en évidence d'effet spécifique de l' $^{241}\text{Am}$  à ce niveau d'exposition chez ce modèle.

D'une manière générale, l'effet biologique observé chez un organisme vivant résulte de la dose à laquelle il a été exposé. Ainsi, dans le cas de l' $^{241}\text{Am}$ , la question se pose de savoir si les larves et naissains ont incorporé de l' $^{241}\text{Am}$  au cours des deux semaines qu'a duré l'exposition.

Lors de ces expositions à fortes doses, nous cherchions à utiliser l'activité maximale manipulable en milieu confiné. C'est pourquoi le volume des UE a été minimisé afin d'atteindre des niveaux d'activité maximum en  $^{241}\text{Am}$  dans l'eau de mer. Ce dispositif n'a permis de travailler que sur un nombre limité d'individus, mais suffisamment élevé pour pallier la forte variabilité interindividuelle lors des mesures de croissance. La quantité de matériel était néanmoins si restreinte qu'il s'est avéré impossible de disposer de suffisamment de larves pour y mesurer l'activité en  $^{241}\text{Am}$ .

Lors de cette expérimentation, nous avons concentré notre attention sur la croissance et la survie des animaux en réponse au stress radiologique. Si nous avons observé des effets sur la croissance des juvéniles à ces niveaux d'exposition en  $^{241}\text{Am}$ , nous aurions obligatoirement étendu ces expériences afin d'explorer en détail la question de l'incorporation ainsi qu'une relation dose/effet avec des doses en  $^{241}\text{Am}$  plus faibles. La petite taille des larves empêche la distinction chair-coquille. Il aurait été cependant envisageable d'étudier l'incorporation de l' $^{241}\text{Am}$  chez de individus plus âgés puis d'extrapoler ces données chez les jeunes stades de développement (en s'appuyant sur la théorie de l'allométrie, par exemple).

Nous disposons cependant de quelques données d'activité en  $^{241}\text{Am}$ , non pas dans les larves, mais dans les naissains exposés à l' $^{241}\text{Am}$ . Le facteur de concentration calculé dans les naissains entiers était

compris entre 246 et 293 après deux semaines d'exposition à une eau de mer contaminée à environ 50 Bq.mL<sup>-1</sup> d'<sup>241</sup>Am. Par comparaison, des facteurs de concentration compris entre 110 et 450 ont été mesurés à partir des parties molles de *Mytilus edulis* prélevées dans l'environnement (Pentreath 1984). Des moules *Mytilus galloprovincialis* exposées en laboratoire à 1 Bq.mL<sup>-1</sup> pendant 50 jours présentaient des facteurs de concentration compris entre 150 et 200 (Güngör *et al.* 2001). Un facteur de concentration de 62 a été mesuré chez *Pecten maximus* après 7 jours d'exposition à de l'eau marquée par 0,3 Bq.mL<sup>-1</sup> d'<sup>241</sup>Am (Metian *et al.* 2011). La même étude explique que 93% de l'<sup>241</sup>Am est présent dans la coquille et seulement 7% dans l'ensemble des parties molles. De la même manière, des moules de l'espèce *galloprovincialis* exposées 28 jours à 2400 Bq.mL<sup>-1</sup> présentent des teneurs en Am de 91,2% dans la coquille contre 8,9 % dans les tissus mou (Guary *et Fowler* 1981).

La probable répartition hétérogène de l'<sup>241</sup>Am dans les structures biologiques de l'huître, de même que la faible distance de parcours des particules alpha de l'<sup>241</sup>Am, rendent les calculs de dose très incertains dans ce type d'exposition. D'après ces éléments de la littérature, il est fortement probable qu'une fraction importante de l'<sup>241</sup>Am se soit préférentiellement retrouvée au niveau de la coquille des larves et naissains et qu'une faible portion n'ait atteint les cibles biologiques sensibles potentielles.

En revanche, dans le cas des irradiations externes, les débits de doses très élevés ont forcément atteint les tissus visés des huîtres. Or, aucun effet délétère n'a été constaté, que ce soit au niveau biologique intégré (mortalité, croissance), ou au niveau transcriptionnel des gènes de stress analysés.

Considérant l'ensemble de ces résultats, la question se pose désormais de savoir si des effets subtils, tels que des variations du niveau de dommage à l'ADN, sont envisageables à ces débits de doses alors même que la croissance des juvéniles n'est pas impactée. En effet, certaines études démontrent l'existence d'effets génotoxiques du tritium chez la moule *M. edulis* à des niveaux de débit de dose relativement faibles (Jha *et al.* 2005). Le choix a été fait de poursuivre l'investigation des effets des RI en ciblant d'autres paramètres biologiques et ainsi de laisser en suspens les interrogations quant à l'accumulation et la distribution de l'<sup>241</sup>Am dans les tissus des juvéniles d'huître.

Au sein du projet *ChronExpo*, l'opportunité était offerte de rejoindre l'équipe du professeur Jha de l'université de Plymouth. L'étude des effets génotoxiques sur les stades précoces de développement n'est pas facile compte tenu de la nécessité de travailler sur des cellules isolées, et de préférence de même type cellulaire. Ainsi, au cours de cette collaboration, nous avons choisi de tester les effets chroniques du tritium sur des huîtres suffisamment âgées pour avoir accès aux hémocytes. Parallèlement à cette approche génotoxique, une étude comparative de la réponse biologique au niveau intégré a été abordée par la mesure du taux de filtration.

Outre la forte pression sur le tritium dont fait actuellement l'objet la communauté scientifique, cette étude originale vise également à comparer la radiosensibilité de deux espèces de bivalves marins, *C. gigas* et *Mytilus galloprovincialis*, chez qui des travaux sont réalisés à l'Université de Plymouth.



**CHAPITRE IV.    EFFETS GENOTOXIQUES DU TRITIUM  
SUR DE JEUNES HUITRES *CRASSOSTREA GIGAS***



## IV.1 INTRODUCTION

Les études des effets chroniques des rayonnements ionisants sur les stades précoces de développement de l'huître creuse ont été abordées dans le chapitre 3 de cette thèse. Les larves et naissains n'ont été affectés ni au niveau intégré (croissance), ni au niveau moléculaire (expression transcriptionnelle de gènes impliqués dans la réponse de l'organisme au stress), alors que les niveaux d'expositions maximum ont été employés.

La forte résistance des juvéniles d'huîtres vis-à-vis des rayonnements ionisants (RI) n'a pas permis d'établir de courbes dose-réponse. Les 9 gènes de stress étudiés par RT-PCR après 14 jours d'exposition n'ont pas montré de modification significative de leur niveau d'ARNm par rapport à l'expression de l'actine. En outre, ils n'ont pas permis d'apporter d'éléments de réponse quant aux mécanismes intervenant dans cette résistance. La mesure de l'expression transcriptionnelle au niveau de l'animal entier, sans distinction de l'expression dans les organes, voire les types cellulaires, suppose de très forts changements pour rester visibles avec une analyse globale. Les débits de doses administrés aux juvéniles étaient d'environ 30 mGy.h<sup>-1</sup>. Il est très probable que de tels niveaux d'énergie soient à l'origine de modifications à l'échelle moléculaire même si ces perturbations restent imperceptibles à un niveau d'organisation biologique supérieur. L'ADN est une autre cible moléculaire des RI qui n'a pas encore été analysée dans ces travaux. Cette cible représente l'ultime maillon moléculaire susceptible de subir des dommages pouvant éventuellement passer inaperçu à un niveau d'organisation biologique intégré mais dont les conséquences délétères pourraient conduire à un impact à l'échelle des populations.

Les travaux présentés dans ce chapitre visent à mieux comprendre les effets potentiels des rayonnements ionisants sur une structure cellulaire critique des organismes vivants, l'ADN. En parallèle, l'état de santé général des organismes est considéré.

Ces travaux ont été menés en collaboration avec Lorna Dallas et Awadhesh Jha de la *School of Biomedical and Biological Sciences* de l'Université de Plymouth au Royaume-Uni. Durant ces expérimentations, de jeunes huîtres ont été exposées à différentes concentrations en tritium au cours d'une période de 14 jours.

### IV.1.1 STRATEGIE ET OBJECTIFS

L'objectif principal de ces travaux est d'apporter des éléments de réponses à propos des effets d'une exposition chronique à de faibles débits de doses de rayonnements ionisants sur l'huître creuse. Cette étude s'est déroulée selon une approche éco-génotoxicologique. Les cibles biologiques étudiées prennent en considération des niveaux d'organisations fins (molécules, cellules) ainsi que des marqueurs témoignant d'éventuelles conséquences macroscopiques (individu, écosystème).

L'étude s'articule autour de trois paramètres biologiques. Dans un premier temps, la génotoxicité du tritium est évaluée à partir des hémocytes d'huîtres en utilisant le test des comètes en conditions alcalines. Ensuite, le taux de filtration est utilisé comme indice physiologique témoignant de la santé

apparente des huîtres. Enfin, les réponses au niveau transcriptionnelle sont étudiées pour des gènes codant des protéines chaperonnes (hsp70, hsp90, hsc72), des protéines impliquées dans les mécanismes de détoxification cellulaire (MXR, CyP450, GST), dans la régulation du cycle cellulaire (p53) et dans la régulation du stress oxydatif (MT, SOD).

Le tritium inorganique est un contaminant intéressant pour plusieurs raisons. D'un point de vue radiotoxicologique, le tritium sous forme d'eau tritiée n'a aucune toxicité chimique puisqu'il s'agit d'un isotope de l'hydrogène. Ainsi, seuls les effets radiologiques sont pris en compte. L'eau étant un composé essentiel à la vie, elle est présente en grande quantité dans les tissus biologiques. Par conséquent, l'eau tritiée est susceptible d'impacter l'ensemble des tissus d'un même organisme.

Lors de ces travaux, nous avons eu l'opportunité de profiter de l'expérience du laboratoire anglais en matière de génotoxicité et plus particulièrement du savoir-faire dans la réalisation du test des comètes. Les données de génotoxicité obtenues sur les huîtres ont ainsi pu être comparées aux données obtenues chez un autre modèle d'invertébré marin couramment utilisé à Plymouth : la moule *Mytilus edulis*.

## IV.1.2 LE TRITIUM

### IV.1.2.1 Contexte et sources de tritium

Depuis le milieu des années 80, l'industrie nucléaire a significativement diminué les activités de la plupart des radionucléides de ses effluents liquides. Cependant, le tritium est encore largement relâché dans l'environnement et ce de manière proportionnelle à l'activité de production d'électricité et de recyclage du combustible nucléaire. L'activité en tritium des rejets liquides issus des centrales nucléaires bordant la Manche s'élève à environ  $0,3 \cdot 10^{15}$  Bq.an<sup>-1</sup>. L'usine de recyclage des combustibles usés d'AREVA est quant à elle responsable d'un rejet de l'ordre de  $10^{16}$  Bq.an<sup>-1</sup> de tritium sous forme liquide. Dans un futur plus ou moins proche, les rejets en tritium risquent d'augmenter sensiblement avec l'installation de nouveaux réacteurs (par exemple les Réacteurs Pressurisés Européens ou EPR) et les développements de la fusion nucléaire "ITER" (Réacteur Expérimental Thermonucléaire International), qui accroîtront encore plus l'intérêt du grand public pour ce radionucléide.

Les rejets liquides des industries nucléaires britanniques, de même que les retombées atmosphériques des essais d'armes nucléaires de 1945 à 1980 sont également des sources de tritium en Manche (UNSCEAR 2000). Enfin, ce radionucléide est produit naturellement dans la haute atmosphère par l'action des rayonnements cosmiques sur les atomes d'azote, d'oxygène et d'argon présents dans l'air. Il a été estimé que la production naturelle annuelle de tritium est d'environ  $7,4 \cdot 10^{16}$  Bq (UNSCEAR 1993).

Le tritium est majoritairement produit par les activités humaines sous forme d'eau tritiée. Cependant, certaines industries rejettent d'autres formes chimiques du tritium. C'est le cas par exemple de l'usine GE Healthcare (ex Nycomed Amersham plc) de Cardiff (Grande-Bretagne) qui synthétise des molécules

tritiées pour l'industrie pharmaceutique (acides aminés, acides gras, lipides, précurseurs d'acides nucléiques, hydrates de carbone, prostaglandines, vitamines, stéroïdes, alcaloïdes, etc.) ([Rapport IRSN 2009](#)). Cette usine a effectué des rejets de molécules tritiées dans le milieu marin jusqu'à la fin des années 90. Ces composés ayant une forte affinité pour la matière organique, ils étaient facilement incorporés par les espèces marines et pouvaient être à l'origine de facteur de concentration très élevés dans les organismes par comparaison au tritium présent dans l'eau de mer sous forme d'eau tritiée.

Ainsi, la spéciation chimique du tritium rejeté par les industries est un facteur clé pour comprendre son transfert dans les différents compartiments de l'environnement et son transfert vers les organismes qui y vivent.

#### *IV.1.2.2 Propriétés physico-chimiques et interactions du tritium avec la matière organique*

Le tritium est un isotope radioactif de l'hydrogène. Il possède un proton et deux neutrons. Lors de sa désintégration, il forme de l'hélium en émettant un rayonnement bêta de très faible énergie (en moyenne 5,7 keV) dont le pouvoir pénétrant est faible (environ 0,56  $\mu\text{m}$  dans l'eau). Sa période de demi-vie est de 12,32 ans. D'un point de vue chimique, il se comporte de la même manière que l'hydrogène et se présente sous trois formes :

- l'eau tritiée "HTO" (*Hydrogen Tritium Oxygen*) qui est légèrement plus "lourde" que l'eau sous forme  $\text{H}_2\text{O}$ . Dès que le tritium est sous forme HTO, il intègre le cycle biogéochimique de l'hydrogène. C'est la forme la plus abondante du tritium dans le milieu naturel et les espèces vivantes.

- le tritium gazeux "HT" (*Hydrogen Tritium*) qui pourrait prendre de l'importance avec le développement des recherches sur la production d'énergie par fusion nucléaire (ITER). Après oxydation, le tritium gazeux peut se transformer en HTO et rejoindre le cycle de l'eau.

- le tritium organiquement lié "OBT" (*Organically Bound Tritium*) également rencontré sous l'appellation "TOL". L'hydrogène étant un constituant majeur de la matière vivante (avec le carbone, l'oxygène et l'azote), il s'incorpore aux molécules organiques par échange avec l'hydrogène labile ou au cours de processus physiologiques tels que la photosynthèse ou le cycle de Krebs, par exemple.

Par conséquent, on considère que le tritium peut se retrouver sous deux formes dans la matière vivante ([IAEA 1981](#), [Murphy Jr 1993](#), [Belot et al. 1996](#)):

- le tritium "libre" sous forme d'eau tritiée HTO qui est défini comme étant le tritium de la fraction liquide extraite de l'échantillon par dessiccation (lyophilisation),

- le tritium "organiquement lié" OBT, constitué du tritium de la matière sèche (après lyophilisation) et considéré comme lié ou intrinsèquement incorporé aux molécules organiques.

Les travaux de Baumgärtner *et al.* (2000, 2001, 2004) montrent néanmoins qu'une part importante du tritium OBT n'est pas systématiquement liée chimiquement à des atomes de carbone mais peut simplement se trouver physiquement bloqué dans les "replis" des polymères de grande taille comme l'ADN.

Il est à noter que certains auteurs définissent deux sous-fractions supplémentaires du tritium lié à la matière vivante. Elles prennent en considération les forces de liaisons du tritium avec les molécules organiques. Ces auteurs distinguent ainsi le tritium organiquement lié, échangeable avec l'eau cellulaire ou la vapeur d'eau, du tritium organiquement lié non échangeable.

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons considéré le tritium des tissus mous des huîtres sous deux formes : HTO et OBT. Cette dernière fait référence à la totalité du tritium organiquement lié (échangeable et non échangeable).

#### *IV.1.2.3 Activités en tritium dans l'environnement et niveaux d'exposition en laboratoire*

L'usine de recyclage des combustibles usés d'AREVA La Hague est la source principale de tritium en Manche. A proximité de son émissaire, l'activité volumique moyenne en tritium mesurée dans l'eau de mer est de l'ordre de  $10 \text{ Bq.L}^{-1}$  et prend des valeurs en Manche comprises entre 0,3 et  $30 \text{ Bq.L}^{-1}$  (Rapport IRSN/DEI 2009). En 2004, le bruit de fond lié au tritium des eaux de surfaces de l'Atlantique Nord était compris entre 0,131 et  $0,164 \text{ Bq.L}^{-1}$ . Ces niveaux d'activités en tritium rencontrés dans l'environnement peuvent être comparés avec la limite de  $10\,000 \text{ Bq.L}^{-1}$  recommandée dans les eaux de boissons par l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO 2011).

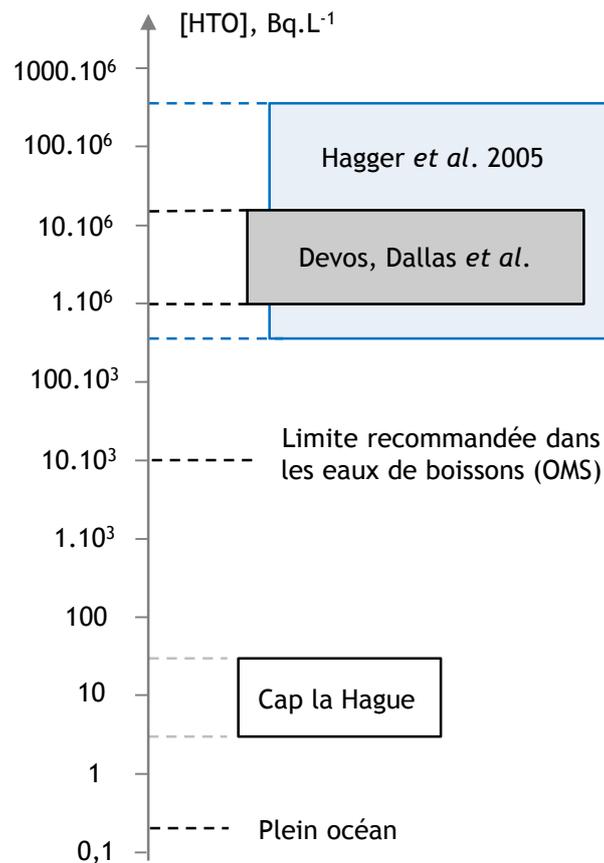


Figure 59 : ordres de grandeur des activités volumiques en tritium rencontrées dans l'environnement et exemples de niveaux d'exposition utilisés en laboratoire.

En laboratoire, plusieurs expérimentations ont permis de tester les effets de fortes doses d'eau tritiée sur des mollusques marins. Par exemple, [Hagger et al. \(2005\)](#) ont exposé des stades précoces de développement de *Mytilus edulis* à des niveaux d'activités en tritium compris entre 0,37 et 370 MBq.L<sup>-1</sup> ([Figure 59](#)). Lors de nos expérimentations, nous avons également utilisé des niveaux d'exposition élevés par rapport aux activités en tritium susceptibles d'être rencontrées dans le milieu marin (expérience de la thèse à Plymouth : [Devos, Dallas et al.](#)). Cependant, les débits de dose résultant de ces fortes activités en tritium étaient de l'ordre de 10-100 μGy.h<sup>-1</sup> (cf. [IV.3.2 Estimation du débit de dose](#) de ce chapitre). Ces débits de doses sont par conséquent inférieurs à la limite de 400 μGy.h<sup>-1</sup> définie par [l'IAEA \(1992\)](#), en dessous de laquelle il n'y aurait pas de risque pour la faune et la flore terrestre et aquatique en situation d'exposition chronique.

## IV.1.3 EVALUATION DE LA GENOTOXICITE POTENTIELLE DES RAYONNEMENTS IONISANTS PAR L'UTILISATION DU TEST DES COMETES

### IV.1.3.1 Génotoxicité et rayonnements ionisants

D'après le Centre International de Recherche sur le Cancer, le terme "génotoxicité" décrit les effets, directs et indirects, ayant lieu au niveau de l'ADN. Ces effets peuvent induire des mutations (géniques, chromosomiques, génomiques, par recombinaison), des événements indirectement associés à la mutagénèse (synthèse non programmée de l'ADN ou échange de chromatides sœurs), mais aussi des modifications de la structure primaire de l'ADN (cassures, adduits) pouvant conduire à des mutations. Ces modifications peuvent avoir des conséquences à plusieurs niveaux d'organisation biologique depuis des niveaux moléculaires jusqu'à l'échelle individuelle. En outre, des effets délétères sur le développement et la reproduction peuvent compromettre la dynamique de croissance des populations de même que des effets génotoxiques sont susceptibles d'entraîner une perte de la diversité génétique et avoir des implications à long terme sur les populations naturelles (Würgler et Kramers 1992, Anderson et Wild 1994).

Parmi les agents génotoxiques présents dans l'environnement, les radiations ionisantes sont responsables de la formation de molécules excitées et ionisées pouvant entraîner divers types de dommages, directs ou indirects. Ils sont considérés comme une source importante de cassures double brins (Frankenberg-Schwager 1990). Pour ce qui est du tritium, le parcours moyen de son rayonnement bêta est du même ordre de grandeur que la dimension du noyau cellulaire. Par conséquent, lorsque le tritium se retrouve intégré à l'ADN du noyau cellulaire (par des nucléotides marqués au tritium) ou dans les molécules d'eau qui entourent celui-ci, 70% de l'énergie se libère dans le noyau (NCRP 1979).

Les dommages génotoxiques peuvent être abordés à deux niveaux : d'une part en mesurant l'ampleur des dommages au niveau de l'ADN génomique lorsqu'ils apparaissent, ou bien a posteriori, après que les mécanismes de réparation aient exercé leur activité et donc en observant les altérations "irréversibles et définitives" du matériel génétique cellulaire. Les contraintes techniques sont très différentes dans ces deux approches. Dans le premier cas, les dommages observés se font sur des cellules en cours de division, lorsque la chromatine est condensée (ex: aberrations chromosomiques, micro-noyaux,...) ou sans contrainte sur le stade cellulaire (ex: cassures simple brin ou double brin par le test des comètes,...). Dans le second cas, il s'agit d'analyser les conséquences en termes de mutations au niveau individuel, comme au niveau de la descendance.

Dans le cadre de cette thèse, le choix s'est porté vers le test des comètes pour quantifier les dommages à l'ADN sur les hémocytes de jeunes huîtres suffisamment grandes pour permettre de prélever l'hémolymphe par ponction dans le muscle adducteur.

#### IV.1.3.2 Présentation du test des comètes

Le test des comètes, ou *Single Cell Gel Electrophoresis*, est une technique d'électrophorèse sur microgel d'agarose utilisée pour détecter le degré de dommage à l'ADN à l'échelle cellulaire. Sa flexibilité et la diversité d'utilisation de l'essai des comètes, démontrées au cours des 20 dernières années, rendent cette technique de plus en plus populaire.

Cette méthode a d'abord été mise au point par [Ostling et Johanson \(1984\)](#) qui ont développé le premier essai d'électrophorèse sur microgel en conditions neutres où seules les cassures doubles brins peuvent être détectées. Le test a ensuite été optimisé par [Singh et al. \(1988\)](#). La technique a été adaptée en conditions alcalines afin de détecter des cassures doubles brins, simple brin et certaines lésions alcalines labiles (pH>13). Dans certains cas, le test des comètes peut être utilisé pour mesurer d'autres types de dommages tels que des lésions de bases ou encore quantifier le taux de réparation de l'ADN.

Le test des comètes présente plusieurs avantages :

- il peut être employé, *in vitro* et *in vivo*, sur n'importe quelle cellule nucléée eucaryote (et certains procaryotes). En outre, il peut être déployé auprès d'organismes aquatiques pour évaluer la qualité écologique d'un milieu ([Collins et al. 1997](#), [Dixon et al. 2002](#), [Jha 2004](#)),
- seules quelques milliers, voire centaines, de cellules par échantillon sont nécessaires,
- le test peut se faire sans connaissance préalable du caryotype ou de la position de la cellule dans son cycle cellulaire,
- il permet d'estimer le degré de dommage à l'ADN au niveau de la cellule et favorise une analyse statistique robuste,
- il présente une bonne sensibilité pour mesurer différents types de dommage à l'ADN et étudier les capacités de réparation de la cellule ([Singh et al. 1988](#)).
- la technique est financièrement moins onéreuse que d'autres mesures de génotoxicité (aberrations chromosomiques, échange de chromatides sœurs, par exemple).

L'inconvénient majeur du test réside dans le fait qu'il nécessite de travailler à partir d'une suspension cellulaire. Or, la dissociation des tissus (branchies, glandes digestives, stade larvaire ou embryonnaire, etc.) ou de matrice telle que la thèque d'ovocytes, peut provoquer des dommages artéfactuels et une surestimation potentielle du niveau de dommage du groupe *témoin*. Il est donc impératif de valider au préalable les conditions d'isolement des cellules à chaque nouveau type cellulaire étudié.

Le test de comètes, dans sa version de base, ne permet pas de connaître précisément le mode d'action du génotoxique étudié. Un autre désavantage serait le manque de standardisation du protocole et l'existence de trop nombreux index permettant d'exprimer les résultats finaux (niveau de dommage). Par conséquent, il est souvent délicat de comparer des études issues de laboratoires différents, y compris pour un même type de cellule d'une même espèce.

Néanmoins, ces désavantages intrinsèques au test des comètes ne sont pas insurmontables et leurs incidences sur les résultats finaux peuvent être grandement minimisées en amont de l'étude (test préliminaire, optimisation et validation du protocole, concertation entre les différents acteurs de l'étude, etc.).

#### *IV.1.3.3 Natures des dommages détectés par le test des comètes*

La nature des dommages détectés par le test des comètes est régie par le pH du tampon dans lequel se conduisent le déroulement de l'ADN et sa migration électrophorétique.

Le test des comètes utilisé lors de ces travaux de thèse a eu lieu dans des conditions alcalines (pH>13). Dans ces conditions, les liaisons hydrogènes de la double-hélice d'ADN sont dénaturées ce qui permet de quantifier les cassures simples brins, double brins ainsi que la majorité des sites alcali-labiles. De la même manière, quand le pH est inférieur à 12,1 le test détecte les cassures simples et doubles brins. Lorsque le pH est inférieur à 9, seules les cassures double brins sont présent compte.

D'autres effets peuvent être étudiés grâce au test des comètes. Les phénomènes d'apoptose, de nécrose ou de pontages à l'ADN (*cross-link*), peuvent être visualisés par une diminution de la migration de l'ADN (Singh 2000). L'utilisation conjointe du test des comètes avec certaines enzymes bactériennes, par exemple l'endonucléase III (reconnaissant les bases pyrimidiques oxydées) ou la T4 endonucléase V (spécifique des dimères de pyrimidines) permet d'augmenter le taux de migration de l'ADN en lien avec le type de dommage dont l'enzyme est spécifique. Ce type d'approche permet d'investiguer les mécanismes d'action du génotoxique étudié (Collins 2004).

## IV.2 METHODE EXPERIMENTALE

### IV.2.1 DISPOSITIF EXPERIMENTAL UTILISE LORS DES EXPOSITIONS DE JEUNES HUITRES JAPONAISE AU TRITIUM

#### IV.2.1.1 Matériel biologique et période de dépuración

Les huîtres adultes utilisées au cours des expositions au tritium étaient fournies par la SAtMar. Elles étaient âgées d'environ deux ans et avaient une longueur de  $65 \pm 4,8$  mm ( $n=27$ ). Le matin du premier jour d'élevage au laboratoire, plus d'une centaine d'individus ont été prélevés sur la zone d'élevage à proximité de l'écloserie. Lors des étapes de transport, les huîtres étaient disposées à plat dans une boîte en polystyrène contenant du fucus (algue brune) fraîchement prélevé. Au laboratoire, les huîtres ont été réparties dans 3 bacs en polypropylène à raison de 40 individus par bac (figure 60). Chaque bac contenait environ 50 L d'eau de mer. Un système de bullage, une pompe à eau et un groupe à froid équipaient chaque bac pour créer un mouvement d'eau réfrigérée. La température de l'eau de mer du milieu naturel au moment du prélèvement des huîtres était d'environ 9°C. L'eau de mer des bacs a été graduellement augmentée jusqu'à une valeur de 15°C, température à laquelle se sont déroulées les expositions au tritium, en présence des huîtres et sur une période d'une semaine. Les huîtres ont ensuite été maintenues à 15°C durant 2 semaines. Les 50 litres d'eau de mer de chaque bac étaient intégralement renouvelés les lundis, mercredis et vendredis. Conjointement au changement d'eau, les huîtres étaient nourries avec une petite quantité d'un mélange de microalgues constitué de *Chaetoceros calcitrans* et de *Pavlova lutheri*.



3 bacs de 50 L contenant chacun 40 huîtres.

Eau de mer circulante ventilée et maintenue à 15°C.

Figure 60 : photos d'un bac de 50 L d'eau de mer réfrigérée à 15°C et contenant 40 huîtres.

#### IV.2.1.2 Structure d'exposition au tritium, protocole d'échantillonnage et d'analyse

La structure d'exposition au tritium se composait de 9 béchers en verre. Chaque bécher contenait deux litres d'eau de mer dans lesquels étaient disposées 10 huîtres prélevées au hasard parmi la centaine d'huîtres disponible (figure 61-a). Les huîtres étaient placées à plat avec la valve creuse vers le bas. Les béchers étaient placés en espace confiné dans des barquettes en plastique (pour éviter tout risque de contamination en d'écoulement). Un bullage doux a été installé dans chacun des béchers (figure 61-b). Les béchers étaient recouverts d'un film alimentaire transparent pour contenir les aérosols générés par le bullage et éviter toute contamination entre les béchers. Le dispositif se trouvait dans une chambre climatisée à 15°C. La photopériode était de 12 heures d'obscurité suivie de 12 heures de lumière.



Figure 61 : structure d'exposition des jeunes huîtres au tritium.  
a - Vue d'ensemble des 9 béchers,  
b - Détail d'un bécher contenant 10 huîtres avec sa canne de bullage.

Après deux semaines d'acclimation dans les grands bacs de 50 litres, les huîtres sont placées dans les béciers d'exposition de deux litres et laissées à acclimater dans cette configuration durant 2 jours (figure 62-a). Deux jours plus tard, l'exposition au tritium débutait. Les changements de milieu avaient lieu les jours 3, 6, 9 et 12 de l'exposition. Deux heures avant chaque changement d'eau, les huîtres étaient nourries avec l'équivalent de 0,5 L de *Chaetoceros calcitrans* et 0,5 L de *Pseudoisochrysis*.

Chaque bécier s'est vu assigner au hasard un code chiffré correspondant à un degré de contamination en tritium. Les effets potentiels de trois traitements sont étudiés en triplicats au cours d'une période 14 jours. Trois béciers *témoin* contenaient de l'eau de mer non contaminée tandis que trois béciers étaient contaminés à 1 MBq.L<sup>-1</sup> et trois autres à 15 MBq.L<sup>-1</sup> de tritium (figure 62-b).

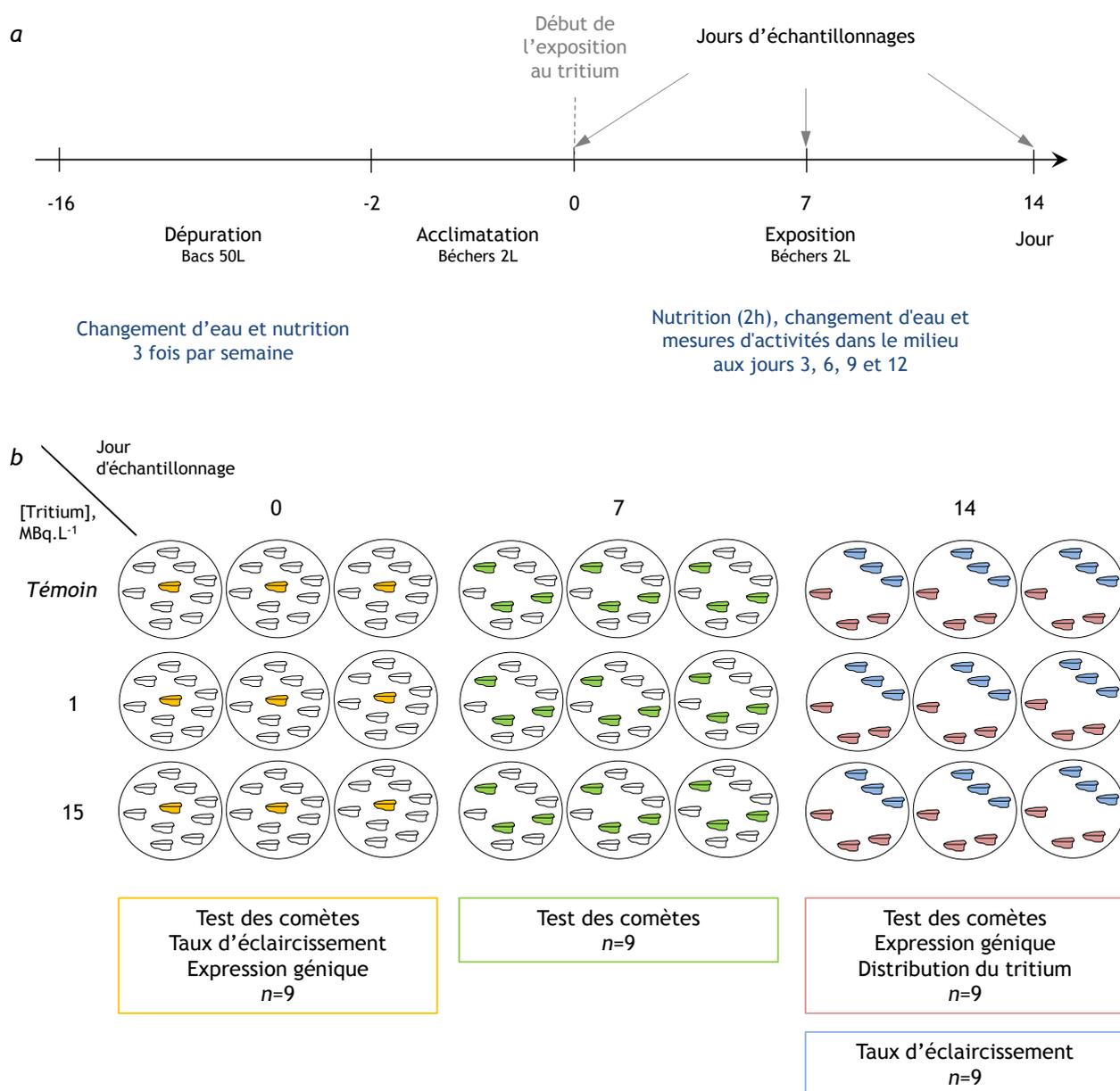


Figure 62 : descriptif temporel (a) et plan d'échantillonnage (b) utilisé lors de l'exposition chronique de jeunes huîtres au tritium.

Quelques heures avant le début de l'exposition au tritium, une huître a été prélevée dans chacun des 9 béchers et utilisée pour les mesures *témoin* (figure 62-b). Les huîtres ont d'abord servi aux mesures du taux de filtration puis leur hémolymphe a été extraite et utilisée pour le test des comètes. Elles ont ensuite été disséquées en vue des mesures d'expression transcriptionnelle.

Après une semaine d'exposition, le test de génotoxicité a été réitéré à partir de trois huîtres prélevées au hasard dans chaque bécher.

Le 14<sup>ème</sup> jour d'exposition, trois huîtres, parmi les six restantes dans chaque bécher, ont servi aux mesures du taux de filtration alors que les 3 dernières ont été utilisées pour les mesures des niveaux de dommages à l'ADN par le test des comètes, et les dissections.

Les résultats de chaque paramètre correspondent ainsi aux mesures réalisées à partir de 3 huîtres issues de 3 béchers, soit 9 individus pour chaque type de mesure.

#### ***IV.2.2 CONTROLE DE LA QUALITE ET MESURES DE L'ACTIVITE EN TRITIUM DE L'EAU DE MER***

Les travaux impliquant des marqueurs radioactifs sont sources de contraintes concernant l'activité maximale manipulable et le volume d'effluents généré. Au cours de ces expérimentations, l'eau des béchers a été intégralement renouvelée tous les trois jours. En outre, le volume d'eau utilisé pour élever les dix huîtres par bécher était relativement faible. Par conséquent, une attention particulière a été portée sur la qualité de l'eau lors des expositions des huîtres au tritium. Pour vérifier les bonnes conditions d'élevage de la structure d'exposition (bécher de 2 L, figure 61-a), une expérience "à blanc" a été réalisée dans les mêmes conditions mais n'impliquait pas de tritium. La température, le pH, la salinité, la teneur en oxygène dissout et en nitrates ont été contrôlés avant et après chaque renouvellement du milieu.

Lors de l'exposition au tritium, l'activité radioactive dans l'eau de mer a été mesurée après chaque changement de milieu. Un volume de 100 µL d'eau de mer a été prélevé de chaque bécher et additionné à un volume de 5 mL de cocktail de scintillation liquide Ultima-gold (Canberra-Packard, Sigma-Aldrich Ltd., St. Louis, USA). L'activité dans l'échantillon est déterminée après comptage par scintillation liquide sur un compteur Beckman 65000. Le comptage se déroule jusqu'à l'obtention d'une incertitude de mesure inférieure à 5%. Si cette valeur n'est pas atteinte au bout de deux heures, le compteur à scintillation enregistre le résultat de la mesure et passe à l'analyse de l'échantillon suivant.

### IV.2.3 ESTIMATION DU DEBIT DE DOSE

Le débit de dose  $D_\beta$  ( $\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ ) reçu au niveau des tissus mous des huîtres exposés au tritium peut-être estimé d'après l'équation de [Strand et al. \(1977\)](#) :

$$D_\beta = \frac{2,13 \cdot \varepsilon\beta \cdot C}{3,7 \cdot 10^6}$$

où :  $\varepsilon\beta$  est l'énergie beta moyenne du tritium ( $=0,00569$  MeV),  
 $C$  est l'activité volumique du tritium (en  $\text{Bq}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  
2,13 et  $3,7 \cdot 10^6$  sont des facteurs de conversions unitaires.

A titre comparatif, des valeurs de débits de doses ont également été calculées avec les outils ERICA ([www.ERICA-tool.com](http://www.ERICA-tool.com)) et le programme EDEN ([IRSN](#)).

### IV.2.4 MESURE DES ACTIVITES EN TRITIUM DANS LES TISSUS MOUS

Afin d'estimer la distribution du tritium dans les tissus mous, des huîtres de chaque groupe d'exposition ont été disséquées après prélèvement de l'hémolymphe. Pour chaque huître, le muscle adducteur, les branchies et le manteau ont été séparés du reste de la chair (glande digestive, gonade, palpes labiaux...) pour constituer quatre types de tissus ([figure 63](#)). Chaque tissu a été pesé (pour connaître le poids frais), placé dans une fiole à scintillation, congelé à  $-80^\circ\text{C}$  puis placé dans un lyophilisateur. Lors de cette étape, les tissus ont été lyophilisés en fonction de l'exposition qu'ils ont subie : *témoin*, 1 ou 15  $\text{MBq}\cdot\text{L}^{-1}$ . L'eau cellulaire a été récupérée du lyophilisateur pour y mesurer l'activité en tritium libre. Les tissus secs ont été de nouveau pesés puis réhydratés pendant 30 minutes à température ambiante avec 100  $\mu\text{L}$  d'eau milliQ. Les tissus réhydratés ont été ensuite repris dans 1 mL de soluène<sup>®</sup> 350 (Perkin Elmer). Les fioles ont été placées dans un incubateur réglé à  $55^\circ\text{C}$  durant 48 heures jusqu'à solubilisation complète des tissus. Ensuite, un volume de 10 mL de cocktail pour scintillation liquide Ultima-gold (Canberra-Packard, Sigma-Aldrich Ltd., St. Louis, USA) a été ajouté à la fiole. Afin de neutraliser la base forte du soluène<sup>®</sup>, un volume de 100  $\mu\text{L}$  d'acide acétique glacial a été ajouté. A ce stade, les échantillons ont été incubés à l'obscurité pendant 90 minutes puis le comptage d'émission bêta a démarré dans le compteur à scintillation liquide Beckman 65000 disposant d'une courbe de *quenching* (courbe de correction d'atténuation par chimioluminescence). Les comptages se déroulaient jusqu'à l'obtention d'une incertitude de mesure inférieure à 5% où, dans le cas des échantillons de très faible activité (*témoin*), durant 2 heures.

Les activités en tritium dans les tissus ont par conséquent été mesurées sous forme HTO et OBT comme résumé sur la [figure 63](#).

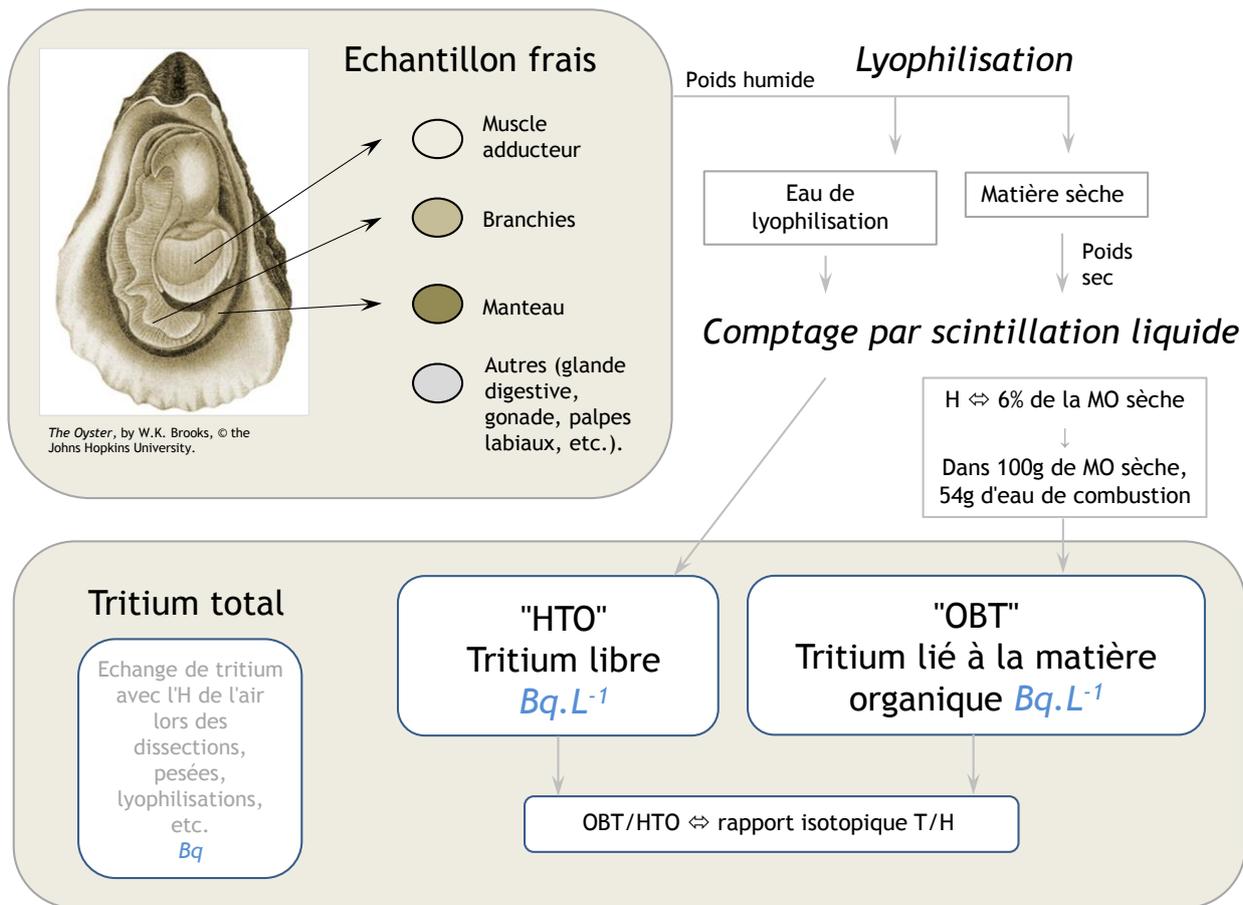


Figure 63 : différentes étapes de préparation des échantillons d'huîtres pour la mesure du tritium par scintillation liquide.

L'activité dans l'eau cellulaire HTO (tritium libre), récupérée après la lyophilisation des échantillons, est directement rapportée au volume et exprimée en  $MBq.L^{-1}$ . L'activité en tritium liée à la matière organique OB est également exprimée en  $MBq.L^{-1}$  et correspond à l'activité mesurée dans l'échantillon sec rapportée au volume d'eau que formerait le tritium si la matière organique sèche avait été totalement oxydée par combustion. En effet, considérant que l'hydrogène représente environ 6% de la matière organique sèche, il est possible de calculer la masse d'eau que formerait l'hydrogène issu de la combustion du tissu sec :

*Soit un échantillon de 100g de tissu lyophilisé contenant 6% d'hydrogène (ou 6g d'H, ou 6 moles d'H). Pour former de l'eau, ces 6g d'H ont besoin de 3 moles d'oxygène apportées lors de la combustion soit 48g d'oxygène. Ainsi, lors de la combustion de 100g de tissu sec, il se forme l'équivalent de 54g d'eau.*

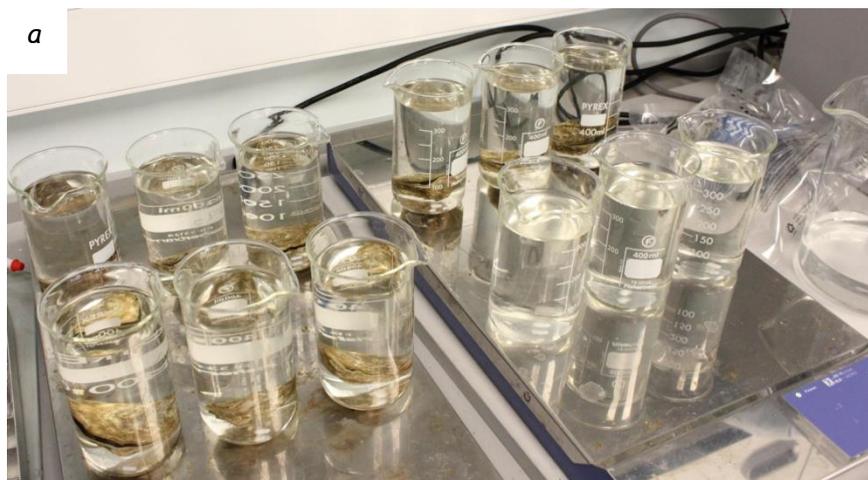
En exprimant les activités dans la même unité ( $MBq.L^{-1}$ ), il est possible de comparer HTO et OB, ce qui revient à comparer le rapport isotopique T/H. Ce rapport est un indicateur permettant de vérifier la conservation du rapport isotopique T/H lors du transfert du tritium depuis l'eau de mer vers la matière organique.

Il est très probable que les traitements des échantillons pour les mesures de tritium dans les tissus se soient accompagnés d'un transfert de tritium depuis les tissus vers l'atmosphère. Ces pertes d'activité en tritium dans les tissus n'ont pas pu être estimées.

#### IV.2.5 MESURES DU TAUX DE FILTRATION

Le taux de filtration, ou "taux de nutrition" selon les auteurs, a été choisi pour témoigner de l'état de santé global de l'huître. Celui-ci se calcule en mesurant, à deux temps différents, la concentration en cellules algales présentes dans le milieu filtré par l'huître. Le protocole de mesure du taux de filtration a été adapté à partir des travaux réalisés par [Donkin et al. \(2003\)](#) et [Scarlett et al. \(2008\)](#).

Les huîtres, dont les longueurs de coquilles ont préalablement été mesurées, sont placées individuellement dans des béchers en verre disposés sur une plaque d'agitation ([figure 64](#)). Chaque bécher contenait 350 mL d'eau de mer non contaminée en tritium et préalablement régulée à 15°C. Un petit barreau aimanté se trouvait dans chaque bécher pour créer un faible courant d'eau. Après une phase d'acclimatation de 30 minutes, toutes les huîtres avaient leurs valves entrouvertes. Au temps zéro de l'expérience, un volume adapté d'une solution algale d'*Isochrysis* a été ajouté dans chaque bécher pour atteindre une concentration de l'ordre de  $10^4$  cellules.mL<sup>-1</sup>. Un volume de 20 mL de surnageant a été prélevé dans chaque bécher quelques secondes après l'ajout des algues puis placé dans une fiole pour y dénombrer les cellules algales. Au cours de la période de filtration de 20 minutes, toutes les huîtres devaient garder leurs valves entre-ouvertes. Après cette période, les surnageants ont de nouveau été prélevés pour y mesurer le nombre de cellules. Les particules algales (3-10 µm) sont analysées en taille et en nombre à l'aide d'un compteur de particules Beckman Z2.



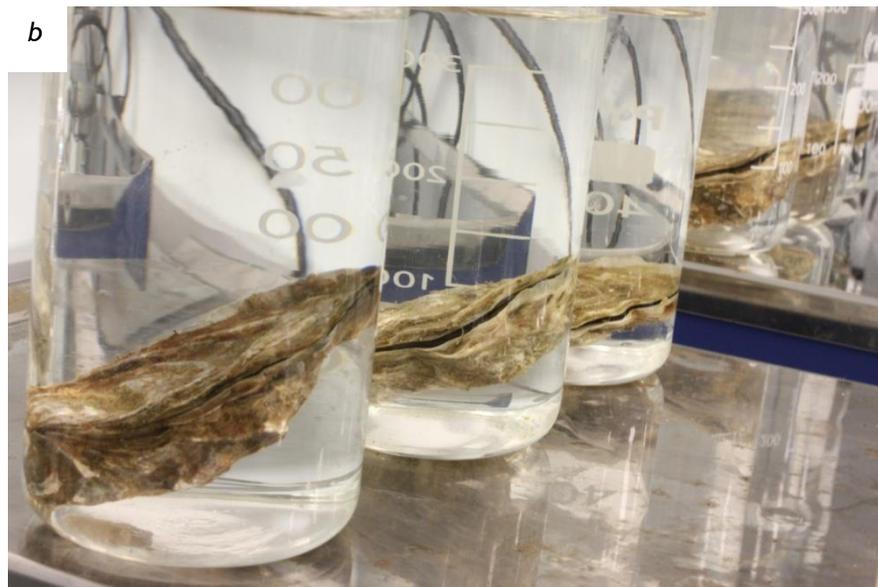


Figure 64 : dispositif utilisé lors des mesures individualisées de taux de filtration  
 a - vue d'ensemble des béchers *témoin* à J0 ; b - vue détaillée des huîtres en train de filtrer.

Le taux de filtration est exprimé en "litre par heure". Il a été calculé pour chaque huître d'après la formule suivante :

$$\text{Taux de filtration (L.h}^{-1}\text{)} = \left( V * \frac{60}{t} \right) \cdot (\ln t_i - \ln t_f)$$

où : V = volume de milieu dans le bécher (L)

t = durée du test (min)

$t_i$  = concentration algales initiale

$t_f$  = concentration algale finale

#### IV.2.6 MESURES DE L'EXPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE DE GENES CIBLES

Les jeux d'amorces présentés dans la partie II.1.4.3 du chapitre 2 pour les mesures d'expression transcriptionnelle lors des travaux sur le zinc ont à nouveau été utilisés durant ces travaux sur le tritium. Ces amorces ciblent de manière spécifique des séquences de gènes codant pour des protéines de chocs thermiques (hsp70, hsp72, hsp90), des protéines impliquées dans les mécanismes de détoxification cellulaire (GST, P450, MXR), dans la régulation du stress oxydatif (SOD), du cycle cellulaire (p53) et des métallothionéines (MT1 et MT2).

Les extractions des ARN totaux ont été réalisées à partir d'échantillons de branchies d'environ 25 mg. Après avoir été prélevé de l'animal, l'échantillon est placé dans un tube eppendorf puis plongé rapidement dans l'azote liquide avant d'être stocké à -80°C.

Lors de l'extraction des ARN, les échantillons ont été manipulés dans la glace. L'extraction a été faite à l'aide de membranes de silices du kit *GeneElute™ Mammalian Total RNA MiniPrep Kit* (Sigma, RTN350). Les échantillons ont été broyés et homogénéisés avec un homogénéisateur (8 000-10 000 rpm) rincés

alternativement à la soude 10M, l'éthanol absolu et l'eau DEPC entre chaque échantillon. La solution de lyse se composait de guanidine thiocyanate et de 2-mercaptoethanol. Ce mélange facilite la libération des ARN et inactive les RNases. Les lysats ont été centrifugés au travers d'une colonne de filtration afin d'enlever les débris cellulaires et de digérer les molécules d'ADN. Les ARN totaux des filtrats ont ensuite été récupérés dans une colonne en silice à haute affinité. Ils ont ensuite subi 3 étapes de lavages par centrifugation avant d'être élués dans l'eau DEPC et congelés à -80°C. Le dosage des ARN a été fait sur un spectrophotomètre NanoDrop®. Le degré de pureté des échantillons a pu être apprécié grâce au rapport A260 nm/A280 nm (valeur optimale de 2 pour une préparation pure d'ARN).

Les échantillons d'ARN totaux ont ensuite subi un traitement à la DNase avant d'être rétro-transcrits en ADNc. Ces derniers ont ensuite été amplifiés par PCR temps-réel. L'ensemble de ces étapes a eu lieu dans les mêmes conditions que celles décrites dans le [chapitre 2, partie 1.4.3](#) de cette thèse.

#### ***IV.2.7 MESURE DES DOMMAGES A L'ADN PAR LE TEST DES COMETES***

Cette méthode semi-quantitative a permis d'estimer le degré de dommage à l'ADN chez des hémocytes d'huîtres en mesurant le nombre de dommages des brins d'ADN. Pour cela, les cellules sont suspendues dans un gel d'agarose. Elles subissent une phase de lyse au cours de laquelle les membranes plasmique et nucléaire, les protéines (dont les histones) et les ARN, sont dénaturés afin de libérer le matériel nucléaire sous formes de boucles d'ADN super-enroulées et liées à la matrice nucléaire. Ces "pelotes d'ADN" sont ensuite incubées dans un tampon d'électrophorèse fortement basique facilitant la détorsion de l'ADN et l'exposition des sites sensibles aux agents alcalins. Les brins d'ADN relâchés sont ensuite soumis à un faible courant électrique (électrophorèse) puis révélés par l'ajout d'un intercalant à l'ADN.

Si la molécule d'ADN présente des cassures, alors le brin super-enroulé se désagrège en de courts fragments. Ces derniers sont entraînés par le champ électrique vers l'anode en raison des groupements phosphates chargés négativement à leurs extrémités. Si l'ADN est intègre, alors le faible nombre d'extrémités libres chargées et la grande taille des fragments empêchent sa migration dans la matrice d'agarose.

Les analyses sont réalisées visuellement sous un microscope à fluorescence. Un noyau avec peu de cassures de ses brins d'ADN se présente sous la forme d'une sphère compacte ([figure 65-a](#)). A l'opposé, un noyau dont l'ADN est endommagé présente un motif rappelant une tête et une queue de comète ([figure 65-b](#)). L'intensité de cette dernière est directement corrélée au nombre de cassures à l'ADN.

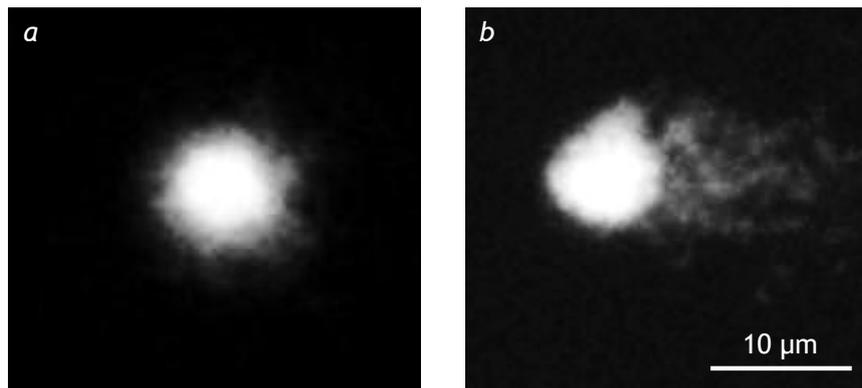


Figure 65 : exemple d'observations de noyaux d'hémocytes *témoin* (a) et exposés à un agent génotoxique (b).  
Exposition *in vitro* d'hémocytes de *C. gigas* à un tampon physiologique salin (a) et à 50 mM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (b).

#### IV.2.7.1 Prélèvement des hémocytes d'huître creuse

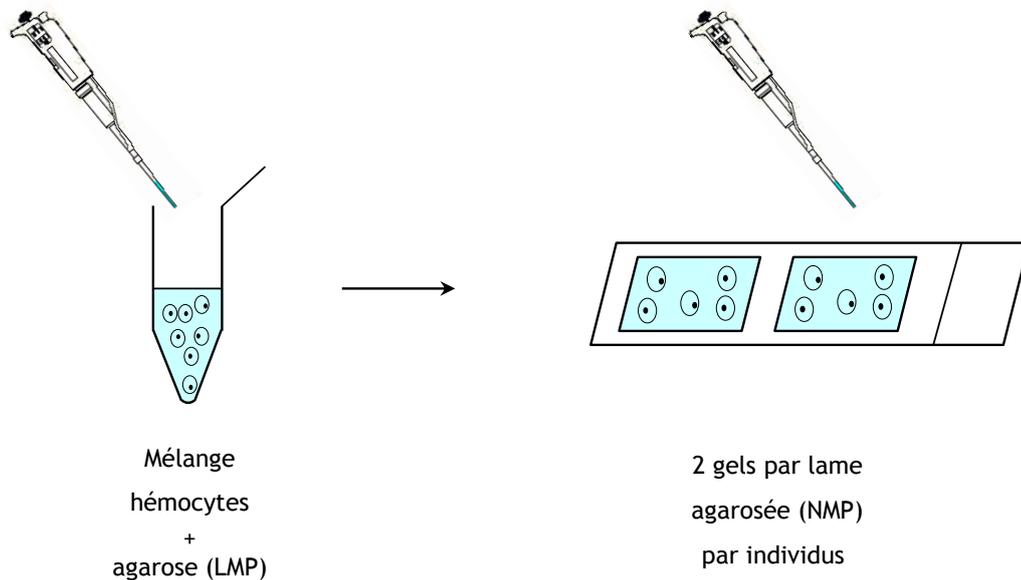
L'huître est très délicatement entre-ouverte au niveau de la charnière et entièrement vidée de son eau inter-valvaire afin d'éviter toute contamination. Les valves sont très légèrement écartées afin de visualiser le muscle adducteur. Un volume de tampon physiologique salin (20 mM Hepes, 435 mM NaCl, 100 mM MgSO<sub>4</sub> anhydre, 10 mM KCl et 10 mM CaCl<sub>2</sub>) d'environ 100 μL est préalablement prélevé dans une seringue de 1 mL équipée d'une aiguille (21G Terumo®). La seringue est utilisée pour prélever l'hémolymphe de l'animal au niveau du sinus veineux du muscle adducteur (figure 66). Après avoir retiré l'aiguille de la seringue, le prélèvement est rapidement transféré dans un tube eppendorf dont les parois sont tapissées de silicone pour éviter toute adhésion cellulaire. Un volume de 150 μL du mélange d'hémolymphe et de tampon physiologique est transféré dans un tube eppendorf de 500 μL gardé dans la glace.



Figure 66 : prélèvement d'hémolymphe au niveau du sinus veineux du muscle adducteur. Le pouce gauche maintient la charnière légèrement ouverte.

#### IV.2.7.2 Préparation des lames agarosées

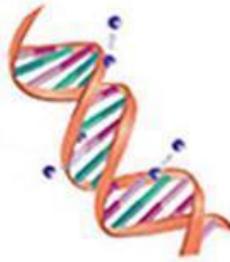
Les préparations d'hémolymphes sont ensuite centrifugées à environ 350G durant 2 min à 4°C. Après avoir écarté le surnageant, les cellules sont reprises et mélangées dans 150 µL d'agarose à faible point de fusion (agarose *Low Melting Point* 37°C ; 0,75% poids/volume). La suspension de cellules dans l'agarose est déposée en duplicat sur une lame de microscope dont la surface a préalablement été recouverte d'une fine couche d'agarose à point de fusion normal (agarose *Normal Melting Point* 60°C ; 1,5% poids/volume). Les lames sont soigneusement identifiées ; les échantillons sont traités "à l'aveugle" jusqu'à la fin du test. Chaque gel est recouvert d'une lamelle puis réfrigéré à 4°C à l'obscurité pendant 1 heure.



#### IV.2.7.3 Lyse cellulaire

La lyse cellulaire s'effectue à l'aide d'un tampon de lyse composé d'un mélange de détergents et de sels ajusté à pH 10 (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris base, 1% N-lauryl-sarcosine, 1% Triton et 10% DMSO). Les lames sont placées dans une cuve de Coplin après avoir délicatement retiré les lamelles. Les gels sont ensuite incubés dans le tampon de lyse à 4°C durant 1 heure. La sarcosine dissout les lipides de la membrane cytoplasmique tandis que le triton solubilise les protéines telles que les histones.

Lyse cellulaire 1h :  
Dissolution des membranes  
Solubilisation des protéines  
Libération de l'ADN



#### *IV.2.7.4 Déroulement des "pelotes d'ADN", électrophorèse*

Cette étape se fait dans des conditions alcalines. Le tampon d'électrophorèse est un mélange de 1 mM d'EDTA et 10 M de NaOH dans l'eau distillée et ajusté à pH 13. Les lames sont immergées dans ce tampon à l'intérieur la chambre électrophorétique sans application de tension. L'ADN se déroule par rupture des liaisons hydrogènes. Après 20 minutes, l'ADN désentrelacé (chargé négativement) est soumis à un champ électrique à raison de  $1 \text{ V.cm}^{-1}$  et migre vers l'anode.

Lors de ces travaux, les voltages et ampérages des différentes électrophorèses étaient exactement de 26 V et 290 mA. Le temps de migration des molécules d'ADN dans les gels était de 20 minutes.

Milieu alcalin, ph tampon = 13 :  
20 min, 0 V, 0 mA -> ADN désentrelacé  
20 min, 26 V, 290 mA -> électrophorèse



#### *IV.2.7.5 Neutralisation, lavage et séchage des gels*

Les lames placées dans des cuves de Coplin sont immergées 5 min à trois reprises dans un tampon de neutralisation (0,4 M Tris base ; pH=7,5). Cette étape est nécessaire pour retrouver une conformation bicaténaire de l'ADN permettant un marquage de l'ADN avec un agent intercalant des bases.

Le lavage consiste en une succession de 3 rinçages à l'eau distillée. Les lames sont ensuite déshydratées dans l'éthanol pour permettre leur conservation jusqu'à l'observation au microscope à épifluorescence.

#### IV.2.7.6 Coloration de l'ADN, analyses

L'ADN de chaque gel est révélé en ajoutant 400 ng de bromure d'éthidium (EtBr). Le bromure d'éthidium est un intercalant de l'ADN. Le complexe ADN-EtBr absorbe la lumière verte à la longueur de 520 nm et émet une lumière orange à la longueur d'onde de 610 nm (Cosa *et al.* 2001). Le logiciel utilisé pour mesurer les comètes est Comet Assay IV® (<http://www.perceptive.co.uk/cometassay/fr/>). L'information de l'image est codée en 8-bit (figure 67 en haut à droite). Une valeur de gris est attribuée à chaque pixel de la comète. La relation entre la valeur de gris d'un pixel et l'intensité lumineuse (émise par le complexe ADN-EtBr) détectée par la caméra est linéaire. Le calcul de l'intensité de fluorescence est réalisé pour la tête et la queue de chaque comète comme illustré dans la figure 67. Celui-ci tient compte du bruit de fond du signal au voisinage de la tête et queue de comète.

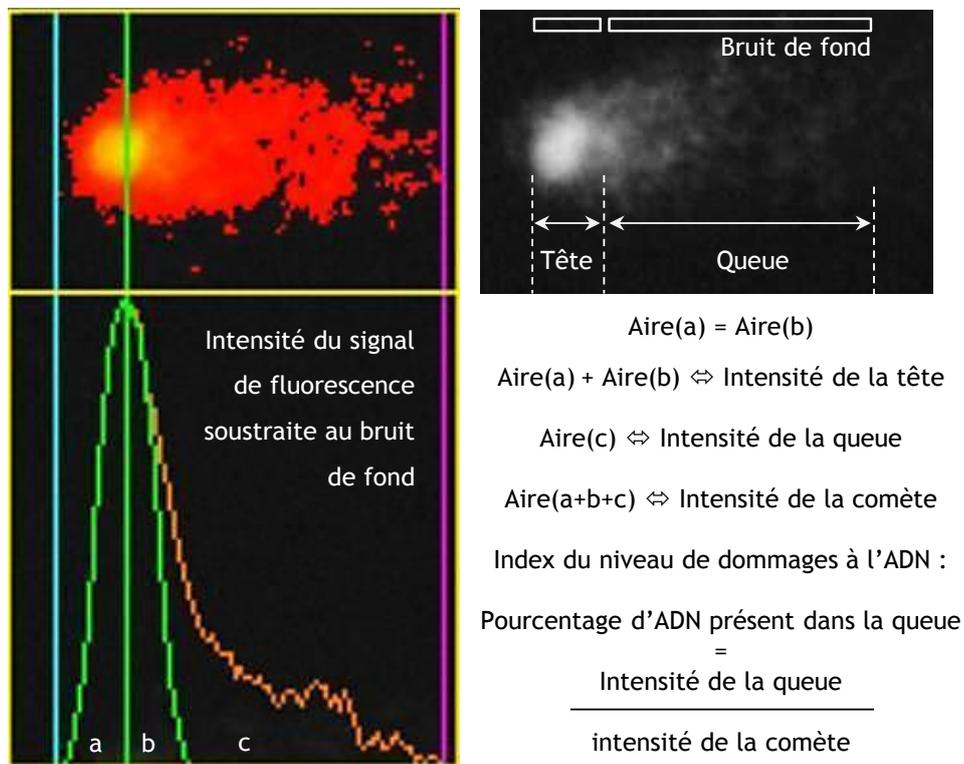


Figure 67 : calcul du niveau de dommages à l'ADN, exprimé en pourcentage d'ADN présent dans la queue, lors du traitement du signal de fluorescence sur le logiciel Comet Assay IV.

L'index retenu pour exprimer le niveau de dommage à l'ADN dans les cellules est le pourcentage d'ADN présent dans la queue de comète. Il a été choisi parmi plusieurs dizaines d'autres paramètres rencontrés dans la littérature : *Length/heigh*, *Olive tail moment*, *Tail extent*, *Tail moment*, *Tail inertia*, *Comet optical intensity*, etc. (Kumaravel *et al.* 2009). Le pourcentage d'ADN dans la queue est reconnu pour sa bonne linéarité avec le niveau d'exposition sur une gamme raisonnable. Il présente l'avantage de pouvoir visualiser directement l'allure de la comète.

Un nombre de 50 cellules par gel (100 cellules par lame soit 100 cellules par individu) est mesuré selon les recommandations de [Lovell et al. \(1999\)](#).

Plusieurs paramètres du test peuvent avoir un impact sensible sur le niveau de dommages mesuré. Il s'agit par exemple des valeurs de voltage et ampérage auxquelles sont soumis les pelotes d'ADN mais aussi le biais lié à l'appréciation de l'expérimentateur dans la mesure de la queue de comètes. Les différences liées à ces légères variations du protocole n'ont pas d'impact sur le résultat du test à condition que les échantillons *témoin* et exposés soient traités de la même manière au même moment. Dans ces conditions, le test des comètes est tout à fait reproductible.

Pour comparer de manière quantitative les résultats de tests réalisés à différentes dates, il est primordial de s'assurer que ces paramètres ont été maîtrisés et contrôlés à chaque session de test. Dans le cas contraire, seuls des comparaisons qualitatives sont envisageables.

#### *IV.2.7.7 Validation du test des comètes sur l'huître creuse (incubation des hémocytes dans le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)*

Avant de reprendre les cellules dans 150 µL d'agarose (LMP), celles-ci sont mises en présence d'un volume de 100 µL d'une solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrée à 10, 50 ou 100 µM. Les préparations de cellules sont incubées 1h à 4°C à l'obscurité puis les cellules sont récupérées après centrifugation à environ 350G pendant 2 min.

## IV.3 RESULTATS

### IV.3.1 PARAMETRES DE QUALITE ET MESURES DE L'ACTIVITE EN TRITIUM DANS LES ECHANTILLONS D'EAU DE MER

#### IV.3.1.1 Qualité de l'eau de mer

Une expérience préliminaire dans les conditions *témoin* d'exposition a été réalisée pour suivre au cours de temps différents paramètres physico-chimiques susceptibles d'être impactés par les produits du métabolisme des huîtres. En effet, les conditions en volume restreint, la taille relativement importante des organismes étudiés par rapport au volume de confinement, ainsi que la faible fréquence des changements de milieu (dû essentiellement aux contraintes radiologiques limitant les volumes des effluents) peuvent potentiellement être source de stress supplémentaire pour les animaux et, par conséquent, introduire un biais potentiel dans l'analyses des effets liés à l'eau tritiée.

Notre attention a porté sur la température, le pH, la salinité, la teneur en oxygène dissous et sur l'estimation des teneurs en nitrates. La température a été relevée toutes les heures tandis que les autres paramètres étaient mesurés tous les trois jours avant et après chaque changement de milieu. Le [tableau 10](#) rassemble les données relatives aux différents paramètres de qualité de l'eau de mer mesurés lors d'une expérimentation de 14 jours à partir de deux bécchers *témoin*. Chacun des bécchers accueillait 12 huîtres d'une longueur moyenne de  $72 \pm 5,0$  mm ( $n=24$ ). Les autres paramètres tels que la photopériode, la nutrition, le bullage et l'évaporation de l'eau des bécchers ont également été contrôlés.

**Tableau 10** : paramètres physico-chimiques mesurées dans l'eau de mer des bécchers exposés aux conditions contrôles durant 14 jours.

	Température, °C	pH	Salinité	Oxygène dissout, mg.L <sup>-1</sup>
Moyenne ( $\pm$ ET)	15,0 $\pm$ 0,13	7,76 $\pm$ 0,36	36,2 $\pm$ 0,16	8,71 $\pm$ 0,58
Valeur minimale	14,7	7,23	36,0	7,17
Valeur maximale	15,4	8,14	36,5	9,28
N	312	22		

Lors de ces expérimentations, la température a été maintenue à 15°C. Les mesures réalisées toutes les heures restent très proches de 15°C.

Les mesures de pH suggèrent une légère tendance à l'acidification du milieu entre les débuts et fins d'exposition. Au cours de ces expérimentations, les valeurs pH mesurées dans les milieux d'exposition étaient comprises entre 7,23 et 8,14 ce qui ne correspond pas à une acidification excessive.

Les mesures de salinité et oxygène dissous ne présentent pas de variations systématiques (augmentation ou diminution) et restent stables au cours du temps. Les teneurs moyennes en oxygène dissous mesurées au cours de cette étude sont de 8,7 mg.L<sup>-1</sup> et témoignent d'une bonne aération du milieu.

Les estimations des teneurs en nitrates dans l'eau ont été réalisées à partir du kit de dosage colorimétrique *Tetra*<sup>®</sup> test NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Ce test a permis de vérifier que les teneurs en nitrates n'excédaient pas 12,5 mg.L<sup>-1</sup>, soit le premier échelon de la gamme.

D'une manière générale, les valeurs des paramètres testés sont dans la gamme de valeurs rencontrées dans l'environnement marin à la même période de l'année. La bonne qualité de l'eau de mer utilisée a également été observée par le fait qu'aucune mortalité n'est survenue que ce soit lors de l'expérimentation préliminaire ou au cours des périodes de dépuraction (bacs de 50 L), d'acclimatation et d'exposition au tritium (bêchers de 2 L).

Aucune ponte n'a été observée lors de ces travaux.

#### IV.3.1.2 *Activité en tritium dans l'eau de mer contaminée*

Au cours de l'exposition des huîtres au tritium, des échantillons d'eau ont été prélevés avant et après chaque renouvellement en eau. Les activités en tritium étaient constantes entre les débuts et fins de chaque période d'exposition.

Le [tableau 11](#) rassemble les activités moyennes en tritium calculées à partir de l'ensemble des répliqués de bêchers.

**Tableau 11** : activités volumiques en tritium (HTO) dans les milieux d'exposition.

Activité volumique en tritium (HTO) (MBq.L <sup>-1</sup> )	
Nominale	Mesurée (moyenne ± ET ; n=15)
0	<LD
1	0,91 ± 0,10
15	13,8 ± 0,85

Les moyennes d'activités mesurées par scintillation liquide sont en dessous de la limite de détection (LD) en conditions *témoin* (0 MBq.L<sup>-1</sup>) et légèrement inférieures aux valeurs nominales de 1 et 15 MBq.L<sup>-1</sup> des bêchers exposés. En considérant chaque bêcher individuellement, l'activité en tritium n'a jamais fluctué de plus de 10% par rapport à la valeur nominale.

## IV.3.2 DISTRIBUTION DU TRITIUM DANS LES TISSUS MOUS ET ESTIMATION DU DEBIT DE DOSE

### IV.3.2.1 Activité en tritium dans la fraction liquide extraite des tissus par lyophilisation (sous forme HTO)

Les tissus ont été traités au lyophilisateur selon leur groupe d'exposition : *témoin*, 1 et 15 MBq.L<sup>-1</sup>. A l'issue de la lyophilisation, l'eau extraite a été aliquotée et l'activité en tritium y a été mesurée en triplicat. Le pourcentage moyen d'eau dans les tissus a été mesuré par pesée. Il est homogène entre les quatre types de tissus et est de 80% ± 3,3 (n=108). L'eau tissulaire extraite par lyophilisation représente donc 80% du poids frais total des tissus.

La [figure 68](#) rassemble les activités moyennes mesurées dans l'eau tritiée (HTO) récupérée après l'étape de lyophilisation. Les activités mesurées dans cette eau, qui correspond à l'eau cellulaire des huîtres, sont près de deux fois plus faibles que les activités mesurées dans les milieux d'expositions et prennent respectivement pour valeurs 0,44 et 5,72 MBq.L<sup>-1</sup> pour les milieux contaminés à 0,91 et 13,8 MB.L<sup>-1</sup>.

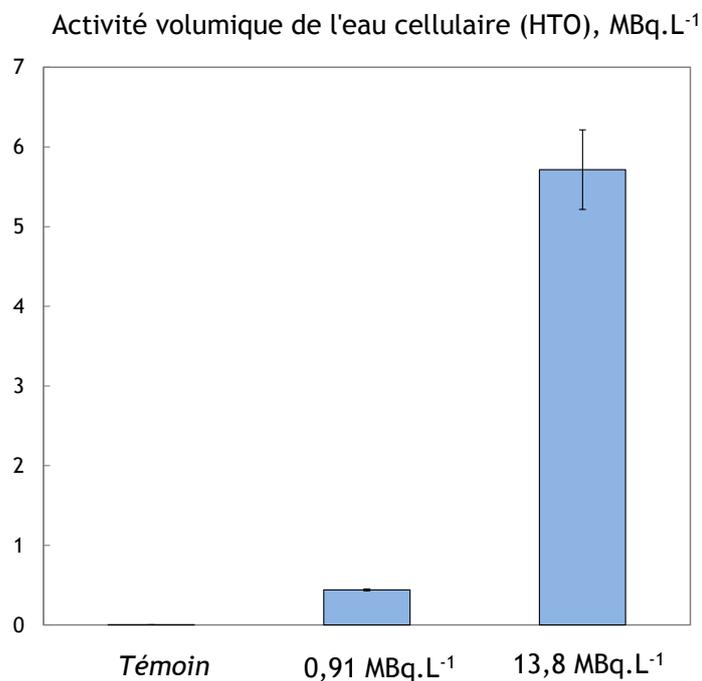


Figure 68 : activité en tritium (HTO ; MBq.L<sup>-1</sup>) mesurée dans l'eau de lyophilisation des huîtres  
Moyenne ± ET, n=3.

#### IV.3.2.2 Activité en tritium de la fraction organique des tissus (sous forme OBT)

La figure 69 rassemble les données d'activité en tritium lié à la matière organique (OBT) exprimées en MBq.L<sup>-1</sup> d'eau de combustion dans les branchies, le manteau, le muscle adducteur et le reste des tissus mous de *C. gigas*.

Les teneurs en OBT des tissus respectent le gradient d'exposition. Elles sont significativement différentes entre les trois groupes (Kruskal-Wallis,  $p < 0,01$ ). Aucune différence significative n'a été observé entre l'OBT des tissus d'huîtres issus d'un même traitement (Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ). Les teneurs en OBT mesurées dans les tissus d'huîtres exposés aux conditions *témoin* sont nulles. Elles sont de l'ordre de 0,3 et 2,8 MBq.L<sup>-1</sup> dans les tissus des huîtres exposées à 0,91 et 13,8 MBq.L<sup>-1</sup>, respectivement. L'OBT dans le muscle adducteur des huîtres exposées à la plus forte dose de tritium se démarque néanmoins positivement après 14 jours d'exposition.

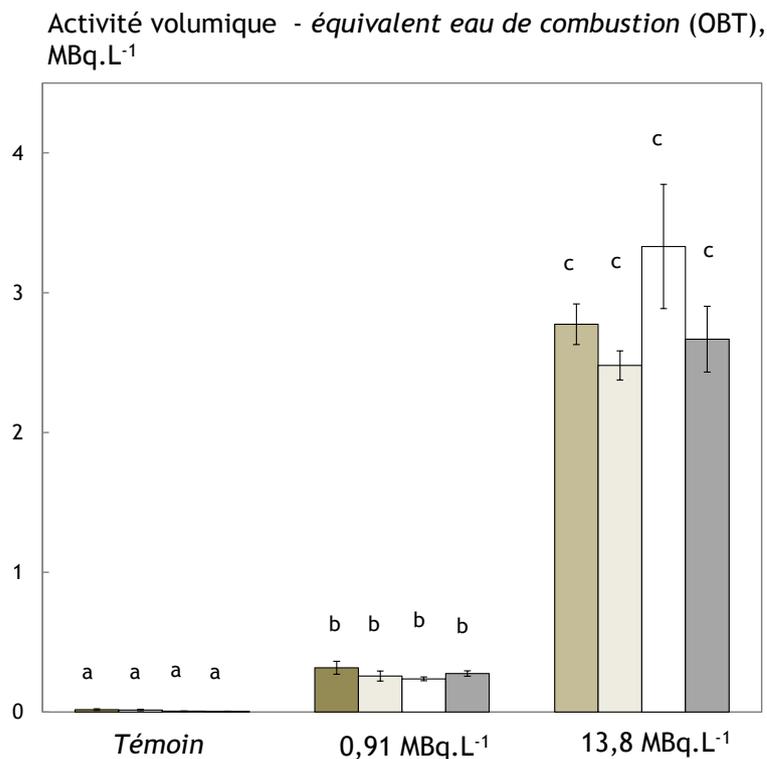


Figure 69 : activité volumique en tritium (OBT) dans les tissus exprimée en MBq.L<sup>-1</sup> d'eau de combustion.

Moyenne  $\pm$  ES,  $n=9$  ; Kruskal-Wallis,  $p < 0,01$  ; comparaisons des paires selon Wilcoxon rank sum test,  $p < 0,01$ . Les moyennes ne partageant pas les mêmes lettres sont significativement différentes.

■ branchies, ■ manteau, □ muscle adducteur, ■ autres.

### IV.3.2.3 Estimation du débit de dose

Pour calculer les débits de doses au niveau des tissus mous des huîtres, il convient de considérer les activités en tritium mesurées dans l'HTO des huîtres (figure 68). Celles-ci s'élèvent à 0,44 MBq.L<sup>-1</sup> chez les huîtres exposées à 0,91 MBq.L<sup>-1</sup> d'eau de mer tritiée et 5,72 MBq.L<sup>-1</sup> pour les huîtres exposées à 13,8 MBq.L<sup>-1</sup> d'eau de mer tritiée. Les valeurs d'HTO dans les huîtres sont plus de deux fois plus faibles que les valeurs d'HTO de l'eau de mer.

Ce résultat n'est pas celui attendu. En effet, les échanges d'eau entre l'eau de mer et les tissus mous des huîtres sont supposés être très rapides. Après deux semaines de baignade dans l'eau de mer tritiée, les huîtres devraient présenter des valeurs d'HTO très similaires à celle de l'HTO de l'eau de mer. Fiévet *et al.* (2013) ont effectivement observé que, dans le milieu naturel du Nord-Cotentin, l'HTO d'algues (*Fucus serratus*) et de patelles (*Patella sp*) suivaient très fidèlement les variations en HTO de l'eau de mer liées aux rejets contrôlés de l'usine d'AREVA La Hague. Par conséquent, il est très probable que des échanges en tritium des échantillons avec l'hydrogène de l'atmosphère aient eu lieu au cours de la phase de lyophilisation ce qui a introduit un biais dans la quantification de l'HTO des huîtres.

En conséquence, afin de ne pas sous-estimer les valeurs de débits de doses, ces derniers ont été calculés, non pas à partir des données d'HTO dans les huîtres, mais à partir des activités volumiques en tritium (HTO) mesurées dans l'eau de mer.

L'estimation du débit de dose reçu par les tissus mous des huîtres exposées au tritium a été abordée à l'aide de trois outils de calcul : l'équation proposée par Strand *et al.* (1977), l'outil ERICA et le programme EDEN.

Les paramètres définis dans les calculs de débits de doses et les résultats qui s'y rapportent sont présentés dans le tableau 12. Ces calculs se fondent sur deux suppositions : 1) le tritium est uniformément distribué dans les tissus mous tout le long de l'exposition, 2) la concentration en tritium dans les tissus mous est la même que celle de l'eau de mer.

Tableau 12 : estimation du débit de dose reçu par les huîtres.

<sup>a</sup> Equation selon Strand *et al.* 1977.

<sup>b</sup> ERICA-tool : « *Crassostrea* » custom organism ; Kd = 0 ; CF = 1 ; Occupancy factor = 1,0 water.

<sup>c</sup> EDEN software : Dose per Unit Conversion (DPUC) = 2,34.10<sup>-11</sup> Gy/J/Bq/kg - valeur calculée pour la chair (L=4,5 cm ; l=2 cm ; h=1cm).

Activité volumique (MBq.L <sup>-1</sup> )	Débit de dose (μGy.h <sup>-1</sup> )			Dose totale à 7 jours (mGy)			Dose totale à 14 jours (mGy)		
	Equation <sup>a</sup>	ERICA <sup>b</sup>	EDEN <sup>c</sup>	Equation <sup>a</sup>	ERICA <sup>b</sup>	EDEN <sup>c</sup>	Equation <sup>a</sup>	ERICA <sup>b</sup>	EDEN <sup>c</sup>
(moy. ±ET, n=15)									
0,004 ± 0,003	0,013	0,033	0,004	0,002	0,006	0,001	0,004	0,011	0,001
0,91 ± 0,10	2,981	7,508	0,887	0,501	1,261	0,149	1,002	2,523	0,298
13,8 ± 0,85	45,20	113,9	13,46	7,594	19,13	2,260	15,19	38,25	4,521

D'après l'équation de Strand *et al.* (1977), les huîtres exposées à  $0,91 \text{ MBq.L}^{-1}$  d'eau tritiée étaient soumises à un débit de dose d'environ  $3 \text{ }\mu\text{Gy.h}^{-1}$  ; celles exposées à  $13,8 \text{ MBq.L}^{-1}$  étaient exposées à un débit de dose d'environ  $45 \text{ }\mu\text{Gy.h}^{-1}$ . Ces valeurs encadrent celle de  $10 \text{ }\mu\text{Gy.h}^{-1}$  recommandée par Anderson *et al.* (2009) et qui correspond à un débit de dose générique prédit sans effets. Elles sont cependant environ 100 fois plus faibles que la valeur de  $400 \text{ }\mu\text{Gy.h}^{-1}$  retenue comme limite à ne pas dépasser par l'IAEA (1992). Les débits de doses calculés avec l'outil ERICA sont supérieurs de plus d'un facteur deux aux débits de doses obtenues selon l'équation de Strand tandis que le programme EDEN minimise ces données d'environ un facteur 3.

### IV.3.3 TAUX DE FILTRATION

Les mesures de taux de filtration, exprimées en  $\text{L.h}^{-1}$ , ont été réalisées avant et après 14 jours d'exposition au tritium (figure 70). Les résultats sont les mêmes lorsque les données sont rapportées à la longueur de chaque huître. Ils correspondent aux mesures individualisées à partir de 9 huîtres dans chaque traitement expérimental. Au cours des 20 minutes qu'ont duré les tests de filtration, toutes les huîtres étaient entre-ouvertes. Au sein d'un même groupe expérimental, les taux de filtration des huîtres se sont révélés être assez hétérogènes. Les individus exposés à la concentration intermédiaire en tritium ( $0,91 \text{ MBq.L}^{-1}$ ) présentaient un taux de filtration moyen presque deux fois plus élevé que les taux observés chez les huîtres *témoin* et exposées à  $13,8 \text{ MBq.L}^{-1}$ . Malgré cet écart graphique, aucune différence significative du taux de filtration n'a été mise en évidence à partir de l'ensemble de ces données (Kruskal-Wallis,  $p>0,05$ ,  $n=9$ ).

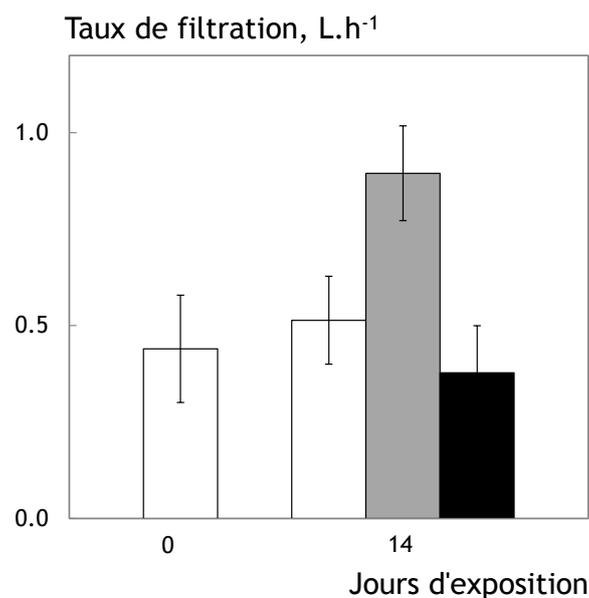


Figure 70 : taux de filtration moyen mesurés chez des huîtres *C. gigas* avant et après 14 jours d'exposition au tritium.

Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards calculées à partir des moyennes de 9 mesures.

□ *Témoin*, ■ 0,91  $\text{MBq.L}^{-1}$ , ■ 13,8  $\text{MBq.L}^{-1}$ .

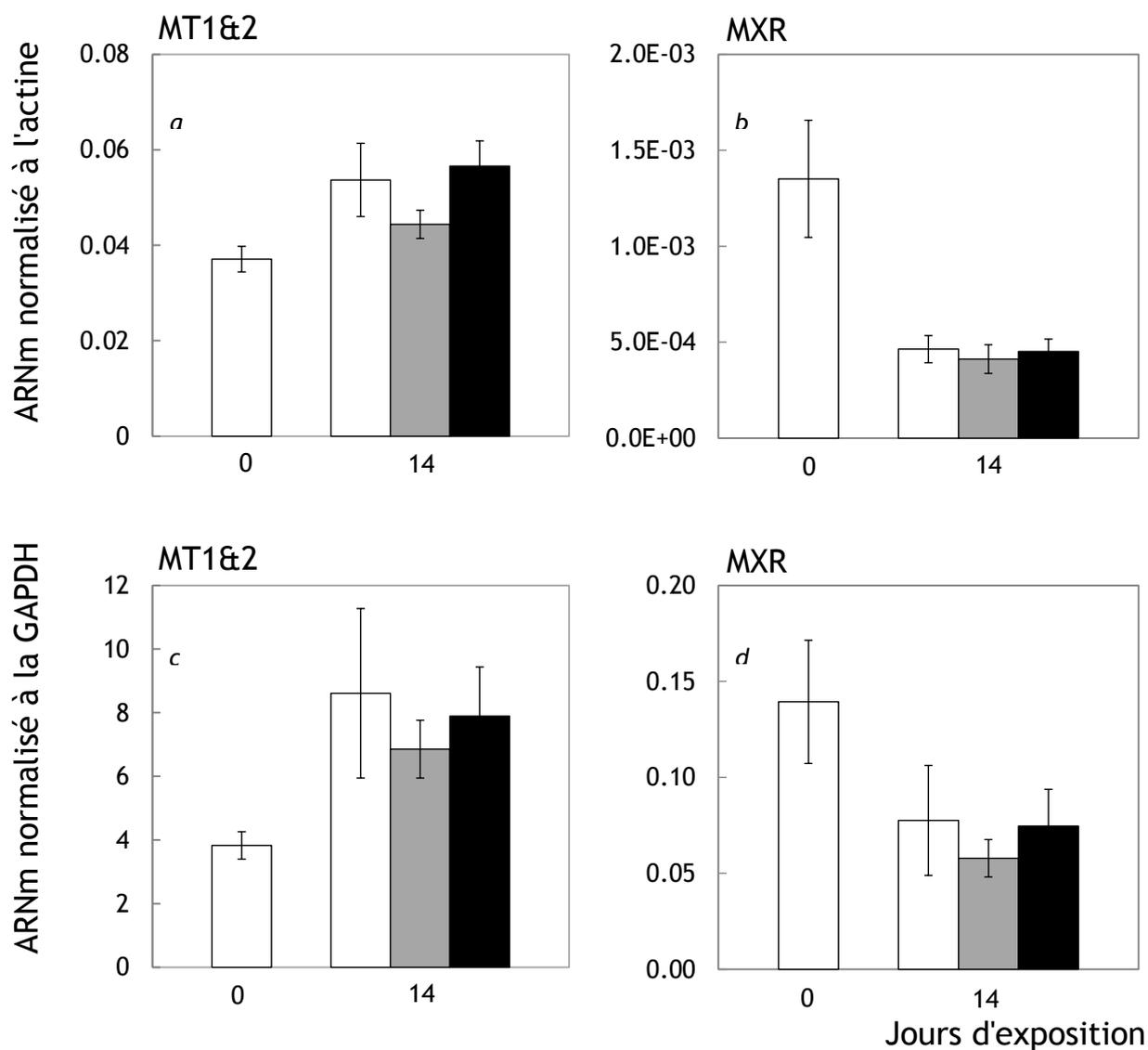
#### IV.3.4 EXPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE DE GENES CIBLES

Les mesures d'expression transcriptionnelle des 9 gènes ciblés ont été réalisées avant et après l'exposition au tritium.

Aucun des 9 gènes n'a vu son niveau d'expression différer significativement en réponse au tritium par rapport au groupe *témoin* après 14 jours d'exposition. Un effet significatif du temps entre le début et la fin de l'exposition a cependant été observé sur les niveaux d'expression transcriptionnelle de certains gènes. Parmi les 9 gènes ciblés, il a été choisi de ne présenter dans ce chapitre que les résultats portant sur les gènes MT1&2 et MXR (figure 71). En effet, ces deux gènes sont susceptibles de voir leur niveau d'ARN augmenter en réponse à une irradiation (Farcy *et al.* 2011).

Les données sont similaires entre les 3 gènes de référence utilisés : actine, GAPDH et ARN18S (non représenté). Les niveaux d'ARNm mesurés lors de ces travaux sur le tritium sont dans la gamme des niveaux mesurés à la même période de l'année dans les branchies d'huîtres issues de l'environnement naturel (Farcy *et al.* 2007).

Les données à 14 jours d'exposition sont très similaires entre les trois groupes. Aucune différence significative avec le groupe *témoin* n'a été mise en évidence à cette date. Par comparaison avec le niveau du groupe *témoin* en début de l'exposition, les niveaux d'expression transcriptionnelle mesurée pour MT1&2 sont plus élevés après 14 jours d'exposition. Il existe une seule différence significative pour le niveau mesuré chez les huîtres exposées à  $13,8 \text{ MBq.L}^{-1}$  (normalisation à l'actine) par rapport au niveau *témoin* au début de l'exposition (ANOVA 1 facteur, test d'appariement,  $p < 0,05$ ,  $n=9$ ). De la même manière, les niveaux d'expression transcriptionnelle de MXR chez les huîtres *témoin* et exposées sont plus faibles à la fin des 14 jours d'exposition par rapport au niveau du groupe *témoin* en début d'exposition. Aucune différence significative n'a pour autant été calculée à partir de ces données (ANOVA 1 facteur, test d'appariement,  $p > 0,05$ ,  $n=9$ ).



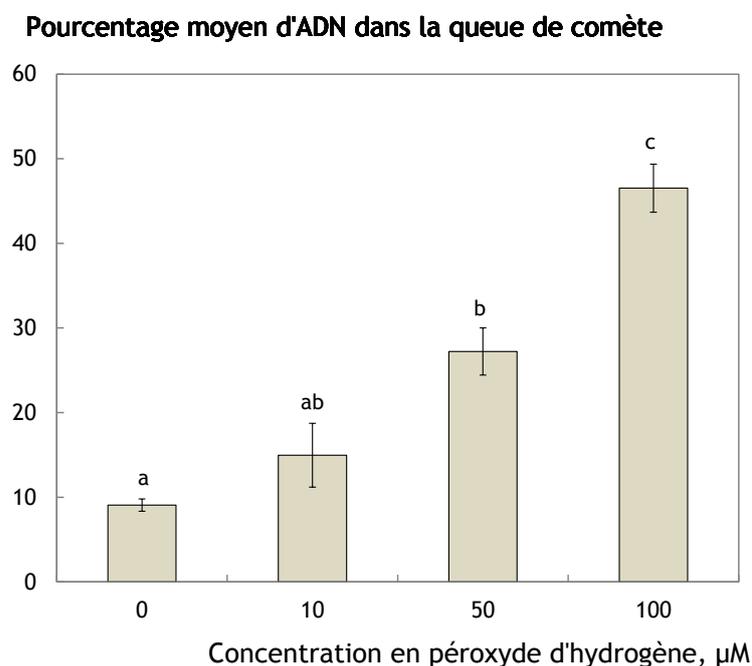
**Figure 71** : niveaux d'expression transcriptionnelle des gènes codant pour les métallothionéines (MT1 et MT2) et MXR en réponse à une exposition chronique à trois niveaux de contamination en tritium (moy.±ET, n=9).

Les données sont normalisées aux ARNm de l'actine (*a* et *b*) et du glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (*c* et *d*).

□ Témoin, ◻ 0,91 MBq.L<sup>-1</sup>, ◼ 13,8 MBq.L<sup>-1</sup>.

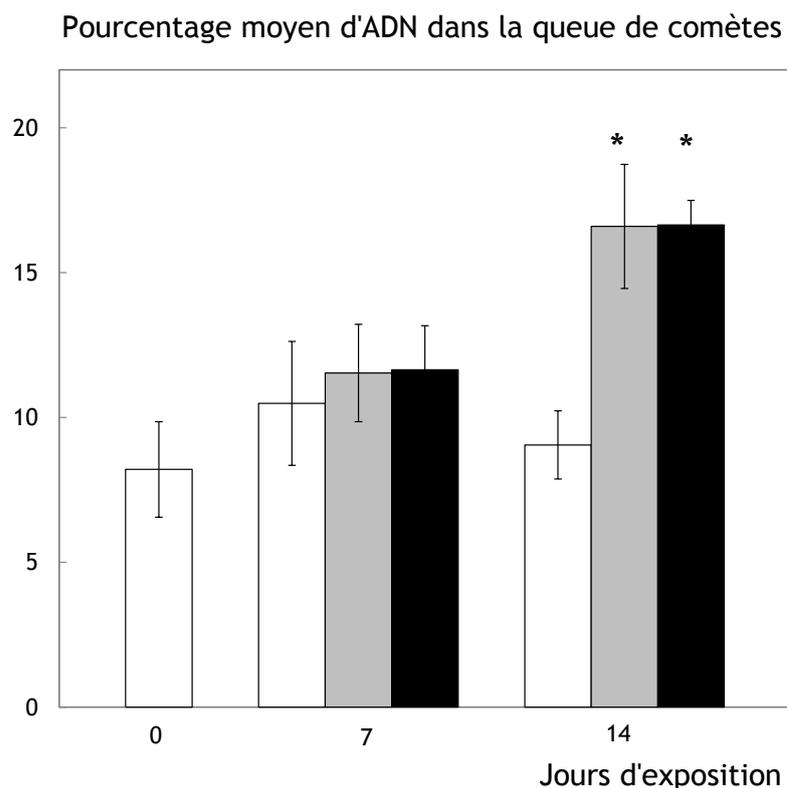
### IV.3.5 TEST DES COMETES

Dans un premier temps, le test des comètes a été validé sur des hémocytes d'huîtres de *C. gigas* exposés au peroxyde d'hydrogène (figure 72). Cette expérience préliminaire a démontré que les hémocytes présentaient une réponse dose-dépendante vis-à-vis de la concentration en  $H_2O_2$ . Le pourcentage d'ADN dans la queue des comètes *témoin* est de  $9,07 \pm 1,26$  (moy.  $\pm$  ES,  $n=9$  huîtres). Il atteint une valeur de  $46,5 \pm 4,92$  (moy.  $\pm$  ES,  $n=9$  huîtres) chez les hémocytes d'huîtres exposés à  $100 \mu M$  d' $H_2O_2$ .



**Figure 72** : induction de cassures à l'ADN (exprimées en % d'ADN dans la queue de comète) dans les hémocytes de *C. gigas* après exposition à différentes concentrations en  $H_2O_2$ . Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards calculées à partir des moyennes de 9 mesures. Les moyennes ne partageant pas les mêmes lettres sont significativement différentes (ANOVA 1 facteur, test d'appariement,  $p < 0,05$ ,  $n=9$ ).

La figure 73 présente les résultats relatifs aux tests des comètes réalisés sur des hémocytes d'huîtres exposées aux conditions *témoin*, à  $0,91$  et à  $13,8 MBq.L^{-1}$  d'eau tritiée au cours d'une exposition d'une durée de 14 jours.



**Figure 73** : induction de cassures à l'ADN (exprimées en % d'ADN dans la queue de comète) dans les hémocytes de *C. gigas* après exposition à différents niveaux de contaminations en tritium. Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards calculées à partir des moyennes de 9 mesures. Les astérisques (\*) symbolisent une différence significative ( $p < 0,05$ ) avec les groupes *témoin* à  $J_0$  et  $J_{14}$  (ANOVA 1 facteur, test d'appariement,  $p < 0,05$ ,  $n=9$ ).

□ *Témoin*, ■ 0,91 MBq.L<sup>-1</sup>, ■ 13,8 MBq.L<sup>-1</sup>

Les données de pourcentage d'ADN dans la queue de comète reflètent le degré de dommages de l'ADN (cassures simple brin, double brin et sites alkali-labiles). Le niveau de dommage à l'ADN du groupe témoin est cohérent avec le niveau de dommage attendu et généralement observé chez les hémocytes en condition d'exposition *témoin*. Il est compris entre 8,21 ( $\pm 1,65$ ) et 10,5% ( $\pm 2,14$ ) tout le long de l'expérimentation. Par comparaison avec le groupe *témoin*, les niveaux de dommages à l'ADN observés après 7 jours d'exposition semblent plus élevés mais les différences ne sont pas statistiquement significatives (ANOVA 1 facteur, test d'appariement,  $p > 0,05$ ,  $n=9$ ) par comparaison avec le groupe *témoin*.

Le niveau de dommage maximal est observé chez les deux groupes exposés après 14 jours d'exposition. A cette date, les pourcentages moyens d'ADN dans la queue de comète sont supérieurs de 7,5% chez les hémocytes d'huîtres exposés au tritium (0,91 et 13,8 MBq.L<sup>-1</sup>) par comparaison avec le niveau de dommage rencontré dans les hémocytes d'huîtres *témoin*. Cette différence est significative après 14 jours d'exposition (ANOVA 1 facteur, test d'appariement,  $p < 0,05$ ,  $n=9$ ).

## IV.4 DISCUSSION

### IV.4.1 DEBITS DE DOSE ET DISTRIBUTION EN TRITIUM DANS LES TISSUS MOUS

Lors de cette étude, les huîtres ont été exposées à de fortes activités en tritium sur une période de temps relativement courte par rapport à leur âge (environ deux ans). Dans ces conditions, l'incorporation du tritium dans les molécules organiques (tritium organiquement lié ou OBT) est faible, pour des raisons de cinétique de transfert, et l'essentiel de la dose (80 à 90%) est imputable à l'eau tritiée (HTO de l'huître). Lors d'une étude de terrain sur les dynamiques de transferts du tritium entre l'eau de mer et les organismes marins, les temps demi-vie de l'OBT de deux espèces d'algues brunes ont été estimés. Ils prenaient pour valeur 128 et 118 jours pour *Fucus serratus* et *Laminaria digitata*, respectivement (Fiévet *et al.* 2013).

D'après ces informations, il est évident que les 14 jours qu'ont duré l'exposition des huîtres au tritium n'a pas suffi pour qu'un état d'équilibre entre l'HTO et l'OBT de l'huître soit atteint. En outre, le ratio OBT/HTO est inférieur à 1 alors qu'il devrait tendre vers l'unité en situation d'équilibre. Il en est par conséquent de même pour le ratio isotopique T/H qui tend vers la même valeur entre l'eau de mer et la matière organique. Pour ce qui est des effets isotopiques du tritium, dûs à la différence de masse des noyaux que certaines réactions chimiques / biologiques pourraient discriminer, ils ont jusqu'à présent été considérés comme mineurs (Baumgärtner *et al.* 2001, Campbell *et al.* 2009, Chih *et al.* 2001, Mathur-De Vré et Binet 1984).

Au cours de ce travail, il n'a pas été observé de distribution préférentielle du tritium dans les quatre types de tissus d'huîtres disséqués (muscle adducteur, branchies, manteau, autres tissus) à l'exception d'une tendance à une activité en tritium plus élevée dans l'OBT du muscle adducteur (différence non significative) chez les huîtres exposés à 13,8 MBq.L<sup>-1</sup>. Jha *et al.* (2005), ont relevé des teneurs en tritium (exprimées en Bq.g<sup>-1</sup> de poids secs) dans les tissus lyophilisés de moules exposées 96h à 3,7, 37, et 148 MBq.L<sup>-1</sup>. L'activité la plus importante a été mesurée dans la glande digestive suivie par les branchies, le manteau, le muscle adducteur, le pied et le byssus. Ces différences entre tissus ne font que traduire les différentes cinétiques de transfert du tritium entre l'eau de mer et ces compartiments distincts tant que l'équilibre n'est pas atteint.

En termes de débit de dose, ceux calculés au cours de nos travaux couvrent des gammes de valeurs classées selon Polikarpov (1998) dans la zone de masquage physiologique (0,57 à 5.7 µGy.h<sup>-1</sup>) et la zone de masquage écologique (5,7 à 456 µGy.h<sup>-1</sup>).

#### IV.4.2 TEST DES COMETES EN MILIEU ALCALIN

Le test des comètes a beaucoup été appliqué aux hémocytes de mollusques bivalves pour évaluer les effets génotoxiques potentiels de produits chimiques et de contaminants à la fois en laboratoire et sur le terrain (Lee *et al.* 2003). En milieu marin, la plupart de ces études portaient sur la moule *Mytilus edulis*. Elles ont démontré que le test des comètes était une méthode sensible et reproductible pour détecter des dommages à l'ADN des hémocytes après exposition à différents agents génotoxiques (Dixon *et al.* 2002, Lee *et al.* 2003). Cela a également été le cas lors de notre étude comme le montrent les résultats des tests des comètes sur les hémocytes exposés au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et au tritium.

D'une manière générale, il est admis que le pourcentage d'ADN dans la queue des comètes du groupe exposé aux conditions *témoin* ne doit pas excéder des valeurs voisines de 10%. Lors de ces travaux, les niveaux de dommages à l'ADN des hémocytes des huîtres *témoin* étaient compris entre 8,21 et 10,5%.

A titre comparatif, le [tableau 13](#) rassemble les niveaux de dommages à l'ADN mesurés dans différents types cellulaires (principalement des hémocytes ou coelomocytes) de plusieurs espèces d'invertébrés aquatiques en condition *témoin*. Nos résultats sont similaires aux données de tests des comètes obtenues sur les spermatozoïdes et les cellules d'embryons de *C. gigas* (Akcha *et al.* 2012, Mai *et al.* 2012). Ils sont également très semblables aux niveaux de dommage *témoin* observés chez la moule *Mytilus edulis* qui, d'après les données du [tableau 13](#), prennent pour valeur 9,5% ± 0,9 (moyenne ± ET, n=10). Des niveaux de dommages comparables ont été mesurés chez d'autres animaux marins tels que des vers polychètes, des échinodermes et un crustacé.

Tableau 13 : niveaux de dommages à l'ADN, exprimés en "pourcentage d'ADN dans la queue de la comète", observés chez les hémocytes ou coelomocytes (à l'exception de *C. gigas*) d'invertébrés aquatiques en conditions *témoin*.

Organisme	Espèce	Type cellulaire	Type d'exposition	Durée de l'exposition	Valeur <i>témoin</i> (% <i>tail DNA</i> )	Référence
Huître	<i>Crassostrea gigas</i>	Spermatozoïdes	<i>In vivo</i>	1 h	9%	Akcha <i>et al.</i> 2012
	<i>Crassostrea gigas</i>	Embryons	<i>In vivo</i>	16 h	8-9%	Mai <i>et al.</i> 2012
Moule	<i>Mytilus edulis</i>	Hémolymph	<i>In vivo</i>	7 j	6%	Hagger <i>et al.</i> 2005
	<i>Mytilus edulis</i>	Hémolymph	<i>In vivo</i>	96 h	9%	Jha <i>et al.</i> 2005
	<i>Mytilus edulis</i>	Hémolymph	<i>In vivo</i>	5 semaines	8%	Taban <i>et al.</i> 2004
	<i>Mytilus edulis</i>	Hémolymph	<i>In vivo</i>	7 j	10%	Mamaca <i>et al.</i> 2005
	<i>Mytilus edulis</i>	Hémolymph	<i>In vivo</i>	10 j	10-15%	Emmanouil <i>et al.</i> 2007
	<i>Mytilus edulis</i>	Hémolymph	<i>In vivo</i>	3 j	9,8%	Tran <i>et al.</i> 2007
	<i>Mytilus edulis</i>	Hémolymph	<i>In vivo</i>	24 h	13%	Pruski et Dixon 2003
	<i>Mytilus edulis</i>	Hémolymph	<i>In vivo</i>	7 j	5%	Canty <i>et al.</i> 2009
	<i>Mytilus edulis</i>	Hémolymph	<i>In situ</i>	Vie	12%	AlAmri <i>et al.</i> 2012
	<i>Perna viridis</i>	Hémolymph	<i>In vivo</i>	12 j	22%	Siu <i>et al.</i> 2004
	<i>Dressena polymorpha</i>	Hémolymph	<i>In vivo</i>	96 h	11%	Binelli <i>et al.</i> 2008
<i>Dressena polymorpha</i>	Hémolymph	<i>In vivo</i>	96 h	10%	Parolini <i>et al.</i> 2010	
<i>Dressena polymorpha</i>	Hémolymph	<i>In vivo</i>	21 j	10%	Juhel <i>et al.</i> 2007	
<i>Unio tumidus</i>	Hémolymph	<i>In vivo</i>	24 h	3%	Štambuck <i>et al.</i> 2008	
Palourde	<i>Tapes semidecussatus</i>	Hémolymph	<i>In vivo</i>	21 j	10-15%	Hartl <i>et al.</i> 2004
Polychète	<i>Nereis virens</i>	Coelomocytes	<i>In vitro</i>	1 h	13%	Lewis et Galloway 2008
	<i>Nereis diversicolor</i>	Coelomocytes	<i>In vitro</i>	1 h	14%	Lewis et Galloway 2008
Oursin	<i>Strongylocentrotus droebachiensis</i>	Coelomocytes	<i>In vivo</i>	4 semaines	10,5%	Taban <i>et al.</i> 2004
Etoile de mer	<i>Asteria rubens</i>	Coelomocytes	<i>In vivo</i>	7 j	5%	Canty <i>et al.</i> 2009
Crustacé	<i>Astacus leptodactylus</i>	Hémolymph	<i>In vivo</i>	7 j	5%	Malev <i>et al.</i> 2010



Le niveau de dommage basal, mesuré dans la queue de comètes *témoin*, doit être considéré au regard du protocole utilisé lors de la réalisation du test. Un niveau de dommage de 10%, même s'il est cohérent avec les données de la littérature, n'en reste pas moins élevé d'un point de vue biologique. En effet, selon les conditions expérimentales, les résultats peuvent sensiblement varier, sans pour autant changer la conclusion de l'étude. Par exemple, des concentrations élevées en EDTA, ou l'utilisation de protéinase K, après la phase de lyse, réduit le bruit de fond des cassures des brins d'ADN chez la moule ([Machella et al. 2006](#)). Le protocole d'isolation de l'ADN lui-même est donc une source supplémentaire de dommages au niveau de l'ADN. Par conséquent, des doutes persistent à propos de la signification du niveau de dommage *témoin* et notamment de l'impact du protocole d'extraction de l'ADN sur le nombre de cassures mesurées.

Au sein d'un même organisme, le niveau de dommage basal est susceptible de varier selon la nature, la fonction et le taux de renouvellement de la cellule étudiée. Ainsi, la question se pose de savoir quel aurait été le niveau de dommage d'un type cellulaire différent des hémocytes. De même, il peut exister des différences entre les espèces. Par exemple, il a été observé un niveau basal de dommages à l'ADN de l'escargot (*Helix aspersa*) et du bar (*Dicentrarchus labrax*) plus faible par comparaison à la moule (*Mytilus galloprovincialis*). En outre, il a été suggéré que les fluides internes des moules pouvaient augmenter le niveau basal de cassure à l'ADN par le biais de processus oxydatif et/ou enzymatique ([Machella et al. 2006](#)).

Le test des comètes en milieu alcalin utilisé lors de ces travaux détecte les cassures simple-brin, double-brins et la majorité des sites alcali-labiles. Par contre, il ne permet pas de connaître la proportion d'un type de dommage par rapport à un autre. Par conséquent, pour un niveau de dommage à l'ADN donné, les répercussions sur un niveau d'organisation supérieur ne seront vraisemblablement pas les mêmes selon que ces dommages, par exemples des cassures, sont de nature simples ou doubles brins. Les premières sont en effet mieux et plus fidèlement réparées par la machinerie cellulaire.

La discussion quant aux effets des rayonnements ionisants sur les organismes marins est développée au cours du chapitre 5 de ce manuscrit de thèse et reprend les données des travaux sur les juvéniles (chapitre 3) et celles de l'approche génotoxique (chapitre 4).

Le chapitre 5 abordera, entre autres, des problématiques liées à la radiorésistance chez les organismes vivants, des mécanismes de défense et de réparation des lésions radio-induites ainsi que de la pertinence écotoxicologique lié à l'étude des cassures des brins d'ADN.



# **CHAPITRE V. DISCUSSION SUR LES EFFETS DES RAYONNEMENTS IONISANTS**



## *Contexte*

Ce travail de thèse porte sur les effets chroniques des rayonnements ionisants sur les stades précoces de développement et les jeunes adultes d'une espèce de mollusque largement répartie dans le milieu marin en Manche, l'huître japonaise *C. gigas*. Dans l'environnement marin du Nord-Cotentin, les huîtres et autres organismes vivants sont exposés tout au long de leur vie à de faibles concentrations de radionucléides artificiels. Cette radioactivité artificielle s'ajoute à la radioactivité naturellement présente dans l'environnement marin.

Les invertébrés ont fait l'objet de peu d'études concernant les effets des RI, particulièrement en ce qui concerne les effets d'expositions chroniques à de faibles doses. Une partie de ce chapitre de discussion portera sur les effets des rayonnements ionisants chez des invertébrés aquatiques (marins et dulçaquicoles). La forte hétérogénéité des espèces étudiées, des conditions d'expositions choisies (type de radiation, dose, débit de dose, durée) et des paramètres biologiques ciblés rendront souvent délicate la comparaison des données entre elles. La problématique liée à la significativité et les conséquences des cassures de l'ADN, révélées pas le test des comètes, sera également abordée. Une autre partie du chapitre portera sur la radiorésistance, les mécanismes impliqués dans la défense et la réparation des lésions radio-induites et fera appel à des connaissances acquises chez plusieurs taxons.

## *Radioprotection*

Chez l'espèce humaine, l'évaluation des risques chroniques liés aux RI se fait principalement par des études d'effets au niveau de l'individu. Les conséquences d'expositions à de faibles doses de RI sur l'induction de pathologies telles que des cancers constituent aujourd'hui une cible d'étude privilégiée.

Dans un but de protection de l'environnement, il convient de considérer l'ensemble des êtres vivants de l'écosystème comme étant susceptible d'être exposés à des contaminants d'origine anthropique. Dans ce contexte, l'étude des effets potentiels des RI sur la faune et flore marines doivent apporter des éléments de réponses quant aux effets pouvant survenir à l'échelle populationnelle, voire écosystémique. En parallèle, il est également important de prendre en compte les effets potentiels des RI à un niveau d'organisation cellulaire et moléculaire car ils permettent de comprendre les mécanismes biologiques impliqués. Une telle approche favorisera l'obtention d'informations sur la genèse des effets radio-induits sur les organismes vivants et leurs conséquences sur les populations.

## *Approche en laboratoire*

Les travaux de cette thèse ont été réalisés en laboratoire. Cette approche rend possible l'étude de gammes d'exposition depuis des niveaux environnementaux jusqu'à des niveaux très élevés (de plusieurs ordres de grandeur) par rapport au niveau naturel. Cette approche est nécessaire à la caractérisation des réponses biologiques d'un organisme en fonction de l'intensité du stress radiologique auquel il est exposé. Ceci permet l'établissement de paramètres écotoxicologiques indispensables à l'élaboration de normes de protection environnementale.

## *Modèle biologique*

Au cours de cette thèse, l'huître japonaise *Crassostrea gigas* a été sélectionnée comme modèle biologique pour l'étude des effets des RI sur les organismes marins. Contrairement à de nombreuses autres espèces marines, son cycle de vie est maîtrisé et la fécondation peut être induite artificiellement. Ainsi, les stades précoces de développement de *C. gigas* peuvent être exposés dès les premières heures de vie, pendant plusieurs semaines, ce qui permet la réalisation d'expositions chroniques. Les juvéniles présentent un métabolisme élevé qui les rendent potentiellement plus sensibles que les adultes. Leur croissance rapide constitue une cible biologique particulièrement intéressante car elle peut rendre compte d'effets à l'échelle populationnelle. En outre, des travaux préliminaires ont mis en évidence une réponse rapide et précoce de la croissance des juvéniles vis-à-vis des contaminants chimiques (Devos *et al.* 2012).

D'un point de vue radiologique, l'huître est considérée comme très radiorésistante mais les doses létales d'irradiation ne sont pas précisément connues (UNSCEAR 1996). Par exemple, dans certains pays comme les Etats-Unis, le Japon ou la Chine, les huîtres *C. virginica* sont exposées à des doses aiguës de RI (de l'ordre de la centaine ou du millier de Grays) lors de processus de "radioconservation", afin de tuer les pathogènes du type *Vibrio sp.* présents dans la chair et de les rendre propres à la consommation. A titre d'exemple, Longwell et Stiles (1970) ont administré des doses allant de 2 à 200 Gy, pendant 1 et 2h à l'aide d'un irradiateur au  $^{137}\text{Cs}$ , à du naissain de *Crassostrea virginica* âgé d'environ 9 mois. Cette gamme de dose n'a pas permis d'établir de DL50 (dose entraînant la mort de 50% de la population étudiée) pour ce modèle. D'après ces observations, on peut estimer que les huîtres adultes peuvent survivre à plusieurs centaines de Grays.

Les premiers travaux de la thèse visaient plus spécifiquement à analyser les effets des RI à un niveau intégré. La croissance des larves et naissains a été étudiée en réponse à de hauts niveaux d'exposition en RI. Malgré les forts débits de doses mis en jeu et la longue période d'exposition (couvrant la quasi-totalité de la vie de l'organisme), les juvéniles d'huîtres se sont révélés être également très radiorésistants. La croissance de plusieurs échantillons de populations de larves et naissains n'a pas été affectée par des débits de doses de rayonnement gamma externe ( $^{137}\text{Cs}$ ) et des concentrations en  $^{241}\text{Am}$  supérieures de plusieurs ordres de grandeurs à ceux rencontrés dans l'environnement marin.

D'un point de vue moléculaire, aucun des gènes marqueurs de stress cellulaire étudiés n'a vu son niveau d'expression transcriptionnelle varier significativement.

La mesure de l'expression des gènes au niveau de l'organisme entier lisse les éventuelles variations pouvant exister dans les différents types cellulaires. En outre l'analyse par RT-PCR est très sélective et d'autres isoformes des gènes ciblés pourraient très bien être impliqués préférentiellement. Par ailleurs, l'expression transcriptionnelle des gènes peut varier de manière transitoire en réponse à un stress environnemental et constituer une réponse adaptative rapide. Par exemple, la brève induction d'un gène au niveau transcriptionnel peut se traduire par une augmentation transitoire de la concentration cellulaire de l'ARNm puis de la protéine codée par le gène dont la durée de vie pourrait être plus longue que le pic d'expression transcriptionnelle du gène qui la code. L'étude de la réponse au niveau protéique, parallèlement aux mesures des niveaux d'ARNm, serait nécessaire pour mieux comprendre la réponse des gènes ciblés vis-à-vis du stress radiologique.

### *Comparaisons avec d'autres travaux*

Dans la littérature, la plupart des études sur les effets des rayonnements ionisants ont porté sur la mortalité comme paramètre biologique principal (Dallas *et al.* 2012). Ce paramètre est à considérer avec attention lors d'expositions aiguës mais n'a plus la même pertinence dans le cas d'un scénario d'exposition chronique. Lors de ces travaux de thèse, la mortalité des stades précoces de développement a été contrôlée car elle pouvait induire un biais dans l'analyse des données de croissance. En outre, la mortalité intrinsèque au modèle *larve* était relativement élevée et a été considérée avec précaution. Les résultats n'ont pas mis en évidence d'effet des RI sur la mortalité des juvéniles aux doses et débits de doses testés.

Une survie plus faible après irradiation a été rapportée chez des invertébrés aquatiques à des doses aiguës de 5 Gy chez le copépode *Diatomus clavipes* (Bardill *et al.* 1977) et à des débits de doses chroniques de 0,3 mGy.h<sup>-1</sup> chez la descendance de la daphnie *Daphnia magna* (Alonzo *et al.* 2008). D'après Dallas *et al.* (2012), les valeurs de DL50, calculées pour des organismes aquatiques, sont très variables et s'échelonnent de 2,1 (*Palaemonetes pugio*) à 2780 Gy (*Artemia salina*) chez deux crustacés pour des durées de 40 à 1 jours, respectivement (Engel *et al.* 1974, Iwasaki *et al.* 1971).

Récemment, des travaux sur les effets d'expositions d'invertébrés marins à des émetteurs de rayonnement alpha ont été publiés. Une espèce de polychète (*Hediste diversicolor*) et une de mollusque (*Perna perna*) ont respectivement été exposés aux rayonnements alpha du <sup>226</sup>Ra et du <sup>210</sup>Po (Grung *et al.* 2009, Godoy *et al.* 2008). Aucun effet radiologique n'a été mis en évidence au cours de ces études. Massarin *et al.* (2010) ont examiné les effets d'un mélange d'isotopes d'uranium chez *Daphnia magna*. Les doses mises en jeu (inférieures ou égales à 20 µGy.h<sup>-1</sup>), ont conduit l'auteur à conclure que la radiotoxicité de l'uranium était négligeable au regard de sa toxicité chimique. Ce point de vue est partagé par d'autres auteurs qui ont étudié la toxicité de l'uranium chez *D. magna* (Zeman *et al.* 2008).

L'absence d'effet sur la croissance et l'expression transcriptionnelle des gènes ciblés aux plus fortes doses n'a pas permis de dériver de courbe dose réponse. Les juvéniles irradiés présentent une croissance similaire aux individus *témoin* mais il n'est pas exclu que des effets soient survenus au niveau d'autres paramètres biologiques de stress moléculaire.

A ce stade de la thèse, la suite de ces travaux s'est plus spécifiquement focalisée sur les effets de RI au niveau moléculaire. A ce niveau, l'un des dommages les plus importants est l'induction de lésions à l'ADN telles que des cassures simple et double brins.

Pour mesurer ces types de dommages, il est nécessaire de travailler sur des cellules isolées, comme des hémocytes (souvent utilisés en écotoxicologie), et à partir desquels le test des comètes peut être appliqué. L'accès aux hémocytes a été rendu possible en travaillant avec des huîtres suffisamment âgées pour y prélever (par ponction dans le muscle adducteur) le volume d'hémolymphe nécessaire au test. Ainsi, de jeunes huîtres ont été exposées chroniquement à de l'eau tritiée. L'avantage du tritium est qu'il ne présente pas de toxicité chimique. Ainsi, les travaux sur l'eau tritiée ne prenaient en compte que les effets radiologiques, de manière analogue aux expositions des juvéniles à la source externe de  $^{137}\text{Cs}$ .

En parallèle, la réponse des huîtres au niveau transcriptionnel (RT-PCR) a été étudiée. A un niveau intégré, le taux de filtration a été retenu comme indice physiologique de l'état de santé apparent des organismes.

En considérant les débits de doses calculés pour le tritium selon d'autres études ([Jha et al. 2005](#), [Hagger et al. 2005](#), [Strand et al. 1977](#)) les niveaux d'exposition appliqués lors de ces travaux étaient 500 à 10 000 fois plus faibles que le débit de dose de rayonnement gamma testés sur les juvéniles. Ces débits de doses pour le tritium sont classés selon [Polikarpov \(1998\)](#) dans la zone de "masquage physiologique" et la zone de "masquage écologique".

### *Dommages et réparation de l'ADN*

Les cassures simple et double brins de l'ADN sont des dommages couramment mesurés par le test des comètes. S'ils sont mal réparés, de tels dommages peuvent provoquer des aberrations chromosomiques. Des aberrations peuvent mener à la mort de la cellule et l'établissement de conditions pathophysiologiques ([Fadeel et al. 1999](#)). [Depledge \(1998\)](#) fait référence à six conséquences préjudiciables d'une exposition aux génotoxiques (dont les RI) pour les invertébrés : la perte de gamètes par mort cellulaire, la mortalité des embryons suite à des mutations létales, un développement anormal, le développement de tumeurs ou de cancers, l'apparition de mutations transmissibles pouvant causer une augmentation ou une diminution de la diversité génétique et des changements dans l'expression affectant la fitness (valeur sélective) de l'organisme. Cette dernière peut être définie comme la contribution d'un gène ou d'un génotype à la génération suivante, relativement à la contribution des autres génotypes de la même population et au même moment.

Des phénomènes de cassures de l'ADN ont continuellement lieu au sein des cellules vivantes. A titre d'exemple, on estime entre mille et plus d'un million le nombre de lésions par jour pour une cellule "saine" ([Lodish et al. 2004](#)). L'importance de ces lésions est telle que la cellule elle-même ne pourrait

poursuivre son cycle ou donnerait naissance à des cellules-filles non viables si n'intervenaient pas différents processus de réparation (Tan *et al.* 1999, Thomas *et al.* 1997). Ces réparations peuvent être des réparations directes de la lésion, des réparations par excision de base, des réparations par excision de nucléotides, des réparations des mésappariements, des réparations par recombinaison homologue et des réparations dite "non-homologue end-joining". En outre, des études menées sur des lignées cellulaires de mammifères exposées à un précurseur de l'ADN marqué au tritium (<sup>3</sup>H-Thymidine) ont montré que des cassures doubles brins (provoquées par exemple par le tritium) sont principalement réparées par le processus de recombinaison homologue (Saintigny *et al.* 2008).

Afin de comprendre les effets des RI au niveau de l'ADN et leurs conséquences pour l'organisme, il paraît nécessaire de connaître les niveaux de dommages à l'ADN auxquels font face les cellules en conditions de vie "naturelle". Burkart *et al.* (1999) ont fait des découvertes à ce sujet sur des cellules de mammifères. Leurs données, présentées dans le [tableau 14](#), correspondent aux nombres de dommages endogènes par noyau de cellule et par jour comparés aux nombres de dommages radio-induits après une irradiation aigue à une dose de 1 Gray.

**Tableau 14** : Comparaison des dommages endogènes et des dommages radio-induits de l'ADN (modèle mammifère - cellule humaine) (d'après Ward 1988, Burkart *et al.* 1999).

Type de dommages	Dommage endogène (.noyau de cellule <sup>-1</sup> .jour <sup>-1</sup> )	Dommage radio-induits (.Gy <sup>-1</sup> ↔ dose aigue)
Cassures simple brin	> 10 000	1 000
Pertes de bases	12 600	-
Dommage de bases	3 000	2 000
Cassures double brin	8	40

Environ 10 000 lésions de l'ADN par noyau de cellule humaine et par jour sont causées par le métabolisme cellulaire et les réactions chimiques. Ces lésions n'entraînent pas d'effets apparents. Une dose aigue de 1 Gy entraîne 5 fois plus de cassures doubles brins de l'ADN par rapport à une cellule non exposée, ce qui paraît peu au regard de la dose administrée. A titre informatif, une dose aigue de 1 Gy réparti sur le corps entier d'un humain peut avoir des effets chez un individu sain (asthénie, nausées, vomissements) alors qu'une dose de 4 Gy est considérée comme mortelle.

Les données du tableau précédent ([tableau 14](#)) ont été obtenues lors d'expositions aiguës et ne sont pas directement représentatives des effets observés en condition d'exposition chronique. Cependant, elles posent la question de l'impact du nombre de cassure à l'ADN sur les niveaux d'organisation biologiques supérieurs. En outre, à partir de quels niveaux d'exposition ces cassures ne sont-elles plus régulées par les mécanismes de réparations endogènes des cellules ?

## Mesure des cassures à l'ADN

Le test des comètes a l'avantage d'identifier de manière simultanée, par les mesures des cassures de brins d'ADN, les cellules apoptotiques mais aussi les cellules dont l'ADN a été réparé (Figure 74). Dans les cellules germinales, des cassures à l'ADN peuvent mener à des changements héréditaires irréversibles alors que dans les cellules somatiques, des effets cancérigènes peuvent survenir. Plusieurs études en écotoxicologie aquatique ont relié l'induction d'aberrations chromosomiques avec des effets au niveau de la survie et du développement durant l'embryogenèse chez des espèces d'invertébrés et de poissons (Jha *et al.* 2000a, Perry *et al.* 1988, Cameron et Berg 1992, Anderson et Wild 1994, Jha *et al.* 2000, Hager *et al.* 2002, Hagger *et al.* 2005). Il a également été mis en évidence que l'exposition de sperme et spermatozoïdes de poissons aux rayonnements ionisants induit des mutations dans les cellules somatiques d'embryons F1 en développement et menant à des conséquences létales potentiellement dues à une induction de cassures de brins d'ADN (Shimada et Shima 2004). Si elles sont mal réparées, les cassures de l'ADN peuvent avoir des effets sur la *fitness* et le succès reproductif des organismes exposés. Ceci peut éventuellement être à l'origine d'effets délétères sur la survie de la population à long terme et, par conséquent, détériorer la qualité de l'écosystème (Figure 74).

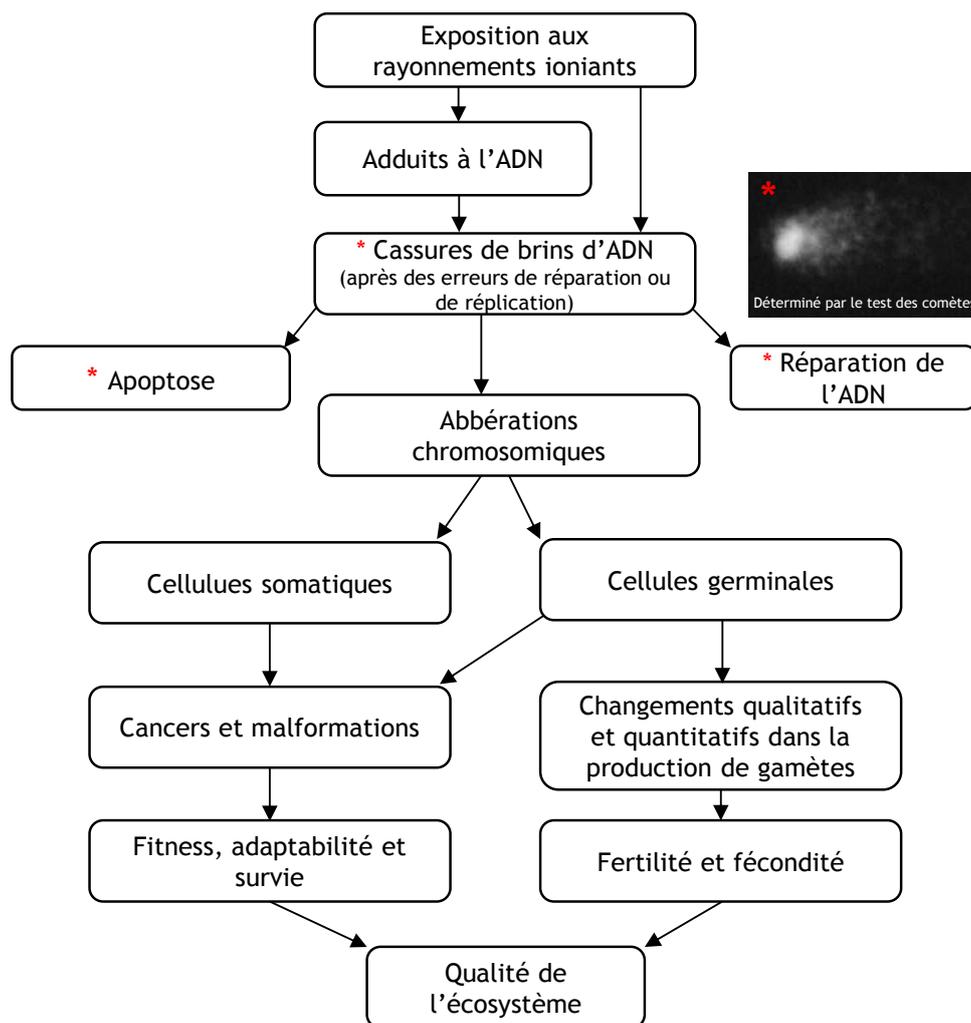


Figure 74 : signification et conséquences des cassures de brins d'ADN (d'après Jha 2008).

L'existence d'une relation entre les dommages à l'ADN et d'éventuelles conséquences au niveau populationnel a été abordée par les travaux de [Theodorakis et Shugart \(1998\)](#) et [Theodorakis \(2003\)](#) dans lesquels les auteurs montrent que la contamination en radionucléides entraîne un stress affectant le succès de la reproduction et une modification de la structure génétique à la base d'un mécanisme d'adaptation ou de résistance aux radiations. Ces auteurs ont montré une corrélation significative entre le potentiel mutagène des sédiments, la quantité de dommages à l'ADN du poisson *Lepomis auritus* et la composition de la communauté piscicole. Il est important de souligner qu'il s'agit dans ce cas de corrélations et non de relations directes de cause à effet.

Chez les invertébrés, l'étude de [Lewis et Galloway \(2009\)](#) relie les dommages à l'ADN sur des spermatozoïdes de *Mytilus edulis* et *Arenicola marina*, révélés par le test des comètes, à une perturbation du succès reproducteur. Les auteurs soulignent que la susceptibilité génétique des spermatozoïdes peut avoir des conséquences significatives sur la santé à long terme des populations naturelles.

[Wessel et al. \(2007\)](#) ont démontré qu'il existait une corrélation positive entre l'embryotoxicité et la génotoxicité, déterminée par le test des comètes, sur des stades embryo-larvaires de *C. gigas* après exposition à un hydrocarbure aromatique polycyclique (le Benzo(a)pyrène) et un pesticide (l'Endosulfan). Les dommages à l'ADN ont aussi été associés avec des effets sur la croissance et la reproduction lors d'une approche environnementale. Par exemple, des moules *M. edulis* collectées dans des sites pollués de la baie de San Diego (Etats-Unis) présentaient des niveaux de dommage à l'ADN, déterminés par le test des comètes, ainsi qu'une réduction du taux de croissance, qui étaient corrélés au niveau de contamination du site ([Steinert et al. 1998a,b](#)).

D'une manière générale, il a été suggéré que le test des comètes pouvait être corrélé à des effets sur la croissance, le développement, et la reproduction chez des organismes variés et qu'il pouvait être utilisé comme un paramètre d'alerte précoce pour l'exposition de populations à des toxiques ([Jha 2008](#)).

Ces travaux de thèse ont mis en évidence une augmentation significative du nombre de dommages à l'ADN par rapport au groupe *témoin*. Après 14 jours d'exposition, le pourcentage d'ADN dans la queue de comètes des hémocytes d'huîtres *témoin* était de  $9,1 \pm 1,2\%$  (moy.  $\pm$ ES ;  $n=9$ ). Ce pourcentage s'élevait à  $16,6 \pm 2,1\%$  ( $n=9$ ) chez les hémocytes d'huîtres exposées à  $0,91 \text{ MBq.L}^{-1}$  d'eau tritiée et à  $16,6 \pm 0,8\%$  ( $n=9$ ) chez les hémocytes d'huîtres exposées à  $13,8 \text{ MBq.L}^{-1}$ .

Parallèlement aux dommages à l'ADN des hémocytes, aucune différence significative n'a été observée au regard du taux de filtration. Les résultats obtenus pour ce paramètre physiologique intégré sembleraient indiquer que cette fonction vitale de l'huître n'est pas affectée.

Ces résultats sont très similaires à ceux obtenus chez une autre espèce de mollusque marin filtreur, *Mytilus edulis* pour lesquels les données ont été obtenues dans les mêmes conditions d'exposition, de prélèvement et d'analyses que les travaux sur *C. gigas* (Dallas - communication personnelle).

Les travaux de cette thèse sur le tritium ont mis en évidence un effet des RI sur le niveau de dommages à l'ADN à des débits de doses bien moins élevés que ceux utilisés avec les larves et naissains. Lors des expositions à l'eau tritiée et aux rayonnements gamma externes, seule la composante radiologique a été étudiée. Par conséquent, nous pouvons prudemment émettre l'hypothèse selon laquelle les larves et naissains d'huître exposés aux rayonnements gamma ont certainement subi un niveau de dommage à l'ADN sans conséquence sur leur croissance et sur la population. Il faut cependant garder à l'esprit le fait que les mesures de génotoxicité ont été réalisées à partir d'un type unique de cellule (les hémocytes circulants) dont la sensibilité vis-à-vis des RI peut différer de celle d'un autre type cellulaire.

Ces résultats confirment une fois encore la forte radiorésistance des huîtres de *C. gigas* et particulièrement celle des stades précoces de développement vis-à-vis des RI ce qui suggèrent qu'il existe des mécanismes de régulation du stress radio-induit efficaces dès les premiers jours de vie de l'huître.

### **Radiorésistance**

Parmi les organismes les plus radiorésistants, des rotifères de la classe des *bdelloïdes* présentent une radiorésistance élevée (Gladyshev et Meselson 2008, Krisko et al. 2012). De même, la bactérie *Deinococcus radiodurans* peut survivre à des doses de plusieurs milliers de Grays. De telles doses ont pour conséquences le fractionnement des chromosomes en centaines de fragments. Cette radiorésistance s'explique par le fait que *D. radiodurans* dispose d'un système de réparation très efficace. En outre, elle disposerait de plusieurs copies de chromosomes, lui permettant de reconstituer par homologie les chromosomes endommagés (Minton 1994).

La forte résistance de *D. radiodurans* vis-à-vis des radiations gamma s'expliquerait par une accumulation de manganèse au sein de la bactérie. Daly (2009), dont les travaux portent également sur *D. radiodurans*, propose un nouveau modèle de radiotoxicité selon lequel les protéines sont les cibles biologiques les plus importantes dans la hiérarchisation des macromolécules affectées par les RI. En effet, Daly et al. (2010) ont montré que des extraits de cytosol de *D. radiodurans*, exempt de toutes protéines, empêchent l'oxydation des protéines à des doses massives de RI. A l'opposé, cet effet disparaît en utilisant des extraits cytosoliques de bactéries sensibles aux RI. Cette étude a montré qu'une interaction synergique entre des peptides, du manganèse et des phosphates préservait l'activité d'enzymes multimériques exposées à 50 000 Gy, c'est-à-dire à des conditions d'exposition détruisant largement l'ADN.

## **CONCLUSION - PERSPECTIVES**



L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier les effets d'expositions chroniques de stades précoces de développement de l'huître japonaise à des contaminants industriels en Manche. L'accent a été mis sur l'utilisation conjointe des marqueurs de stress à des niveaux intégrés et moléculaires lors d'expositions de jeunes huîtres aux rayonnements ionisants.

Pour cela, nous avons développé, à l'aide de deux contaminants tests (le zinc et le methiocarb), un modèle biologique marin et un protocole expérimental adapté à l'étude en laboratoire des effets chroniques de contaminants en conditions d'expositions sublétales. Une attention toute particulière a été donnée au développement de moyens de mesures conservatives de la croissance de juvéniles d'huîtres. La conception de dispositifs expérimentaux originaux a permis de maintenir en milieu contrôlé des larves et naissains d'huîtres jusqu'à des durées d'exposition de 10 semaines. Les expositions au zinc ont rendu possible la dérivation de courbes dose-réponse vis-à-vis de la croissance des juvéniles. Les expositions au methiocarb ont permis de miniaturiser à l'extrême le dispositif d'exposition en amont des travaux sur des rayonnements ionisants. Une induction transcriptionnelle du gène MXR a été observée chez les naissains exposés aux plus fortes concentrations en methiocarb.

L'étude des effets des rayonnements ionisants s'est déroulée en deux temps. Des larves et naissains ont été exposés aux plus forts débits de doses de rayonnement gamma, d'une part, et aux plus fortes concentrations en américium 241, d'autre part, compatibles avec l'expérimentation au laboratoire. Ni la croissance, ni l'expression transcriptionnelle des 9 gènes ciblés impliqués dans la réponse cellulaire au stress (hsp70, hsp90, hsc72, p53, MXR, Cyp450, GST, SOD, MT1&2) n'ont été significativement modifiées à des débits de doses de plusieurs ordres de grandeur supérieurs aux débits de dose susceptibles d'être rencontrés dans l'environnement marin.

Lors de la seconde approche, de jeunes huîtres ont été exposées à de fortes concentrations de tritium pendant 14 jours. En outre, le test des comètes après 14 jours d'exposition a révélé un nombre de cassures à l'ADN plus élevé chez les huîtres exposées au tritium par rapport au groupe *témoin*. Parallèlement aux mesures de génotoxicité, le taux de filtration n'a pas été significativement impacté. Les résultats de ces expériences se sont révélés similaires aux données obtenues chez la moule *M. edulis* et suggèrent que la radiosensibilité des deux espèces est proche (Dallas - communication personnelle).

Les effets radiologiques ont été étudiés lors d'expositions externes aux rayonnements gamma et internes à l'eau tritiée. Dans chaque cas, des mesures de débits de doses ont été réalisés. Les forts débits de doses mis en jeu auprès des juvéniles n'ont pas induit de différence de croissance alors que des débits de dose 10 000 fois plus faibles ont entraîné des effets génotoxiques significatifs. Par conséquent, il est certain qu'au cours des premières semaines de leur développement, les juvéniles d'huîtres disposent déjà de mécanismes biochimiques efficaces capables de prendre en charge les dommages à l'ADN et d'empêcher une cascade d'évènements pouvant impacter un niveau d'organisation biologique supérieur tel que la croissance.

Les mutations sont des évènements qui peuvent être l'une des conséquences des dommages à l'ADN. De futures études sur les effets des RI pourraient porter sur les taux de mutations. Ces dernières sont détectables par des techniques de biologie moléculaire. Par exemple, les mutations intervenant sur

certaines gènes, comme p53, qui intervient dans la régulation du cycle cellulaire (la mutation de p53 est corrélée à une prédisposition au cancer) ont été détectées chez le flet en milieu contaminé (Cachot *et al.* 2000). L'observation de profils RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), éventuellement couplée à la méthode de PCR quantitative, permettrait également de détecter des dommages génomiques après exposition à des substances génotoxiques. Cette technique a été utilisée chez la daphnie, la moule *Mytilus galloprovincialis* (Atienzar et Jha, 2006) ainsi que sur le poisson zèbre *Danio rerio* (Orioux *et al.* 2011).

D'autres types d'effets, tels que les effets *bystanders* ou transgénérationnels, également appelés "effets non ciblés" pourraient être une cible d'étude lors de futurs travaux. D'autant que ces effets "non ciblés" semblent survenir aux faibles doses. A titre d'exemple, des poissons non-irradiés ont développé des réponses de types *bystanders* (induction de la mort cellulaire) après avoir été mis en présence d'individus irradiés (Mothersill *et al.* 2006, 2007).

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons été confrontés à la difficulté de relier des résultats obtenus au niveau moléculaire (dommage à l'ADN révélés par le test des comètes) à des données mesurées au niveau intégré (taux de filtration). Il reste encore de nombreuses interrogations quant aux effets à long terme des dommages à l'ADN sur les niveaux d'organisation biologique supérieurs. Par conséquent, un prolongement de ce travail de thèse pourrait consister à exposer des stades embryo-larvaires d'huîtres à des sources de rayonnements ionisants au cours d'une approche intégrée reliant différents niveaux d'organisation biologique depuis des niveaux génotoxiques, cytotoxiques et du développement.

Enfin, l'huître creuse, malgré ses très nombreux avantages lors d'études écotoxicologiques, ne devient mature sexuellement qu'après une période de temps relativement longue ce qui ne facilite pas les études portant sur plusieurs générations d'individus. Une alternative serait d'utiliser une espèce d'amphipode marin, par exemple le gammare *Gammarus duebeni*, qui a déjà été utilisé par Hoppenheit (1973) et dont le cycle de vie plus court permettrait l'accès aux études en milieu marin des effets des rayonnements ionisants sur plusieurs générations.





## REFERENCES

- Adam-Guillermin C, Antonelli C, Bailly du Bois P, Beaugelin-Seiller K, Boyer P, Fiévet B, Garnier-Laplace J, Gurriaran R, Le Dizes-Maurel S, Maro D, Masson M, Pierrard O, Renaud P, Roussel-Debet. Le tritium dans l'environnement. Rapport IRSN/DEI, 2009.
- AFNOR, 2009. Bio indicateur de la toxicité potentielle de milieu aqueux. XP-T90-382. AFNOR, La Plaine-Saint-Denis, France, p. 19.
- Akcha F, Spagnol C, Rouxel J. 2012. Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. *Aquatic Toxicology* 106-107:104-113.
- AlAmri OD, Cundy AB, Di Y, Jha AN, Rotchell JM. 2012. Ionizing radiation-induced DNA damage response identified in marine mussels, *Mytilus sp.* *Environmental Pollution* 168:107-112.
- Alonzo F, Gilbin R, Zeman FA, Garnier-Laplace J. 2008. Increased effects of internal alpha irradiation in *Daphnia magna* after chronic exposure over three successive generations. *Aquatic Toxicology* 87:146-156.
- Anderson SL, Wild GC. 1994. Linking genotoxic responses and reproductive success in ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives* 102 Suppl 12: 9-12.
- Andersson P, Garnier-Laplace J, Beresford NA, Copplestone D, Howard BJ, Howe P, et al. 2009. Protection of the environment from ionizing radiation in a regulatory context (protect): proposed numerical benchmark values. *Journal of Environmental Radioactivity* 100:1100-8.
- Atienzar FA, Jha AN. 2006. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 613: 76-102.
- Bailly du Bois P, Dumas F. 2005. Fast hydrodynamic model for medium- and long-term dispersion in seawater in the English Channel and southern North Sea, qualitative and quantitative validation by radionuclide tracers. *Ocean Modelling* 9: 169-210.
- Bardill EA, Blaylock BG, Gehrs CW, Trabalka JR. 1977. Effects of acute ionizing radiation on selected life stages of the calanoid copepod *Diaptomus clavipes* Schacht. Oak Ridge, TN: Oak Ridge National Laboratory.
- Barnes DKA, Rawlinson KA. 2009. Traditional coastal invertebrate fisheries in south-western Madagascar. *Journal of Marine Biology Association UK* 89:1589-96.
- Baty F, Delignette-Muller ML. 2011. nlstools: tools for nonlinear regression diagnostics. The R Project for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Baudrimont M, Schäfer J, Marie V, Maury-Brachet R, Bossy C, Boudou A, Blanc G. 2005. Geochemical survey and metal bioaccumulation of three bivalve species (*Crassostrea gigas*, *Cerastoderma edule* and *Ruditapes philippinarum*) in the Nord Médoc salt marshes (Gironde estuary, France). *Science of the Total Environment* 337:265-280.

- Baumgärtner F. 2000. Theoretical foundation and experimental proof of the accumulating transfer of tritium from water into DNA and other biomolecules *in vitro* and *in vivo*. *Radiation Biology and Radioecology*, 40:495-499.
- Baumgärtner F, Kardinal C, Müllen G. 2001. Distribution of tritium between water and exchangeable hydrogen bridges of biomolecules. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 249:513-517.
- Baumgärtner F, Donhaerl W. 2004. Non-exchangeable organically bound tritium (OBT): its real nature. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 379:204-209.
- Beaugelin-Seiller K, Jasserand F, Garnier-Laplace J, Gariel JC. 2004. EDEN: Software to calculate the dose rate of energy for the non-human biota, due to the presence of radionuclides in the environment. p. 87-96.
- Belot Y. 1996. Institut de Protection et de Sûreté N. Le tritium - de l'environnement à l'homme. Les Ulis: Ed. de Physique.
- Berthelin C, Kellner K, Mathieu M. 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (west coast of France). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 125 (3), 359-69.
- Bird P, Comber SDW, Gardner MJ, Ravenscroft JE. 1996. Zinc inputs to coastal waters from sacrificial anodes. *Science of the Total Environment* 181: 257-264.
- Binelli A, Riva C, Cogni D, Provini A. 2008. Assessment of the genotoxic potential of benzo(a)pyrene and pp'-dichlorodiphenyldichloroethylene in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Mutation Research* 649: 135-145.
- Bjerregaard P, Topcuoğlu S, Fisher NS, Fowler SW. 1985. Biokinetics of americium and plutonium in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series* 21: 99-111.
- Boisson F, Hutchins DA, Fowler SW, Fisher NS, Teyssie JL. 1997. Influence of temperature on the accumulation and retention of 11 radionuclides by the marine alga *Fucus vesiculosus* (L.). *Marine Pollution Bulletin* 35: 313-321.
- Bouilly K, Gagnaire B, Bonnard M, Thomas-Guyon H, Renault T, Miramand P, Lapègue S. 2006. Effects of cadmium on aneuploidy and hemocyte parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology* 78: 149-156.
- Bourdineaud JP, Baudrimont M, Gonzalez P, Moreau JL. 2006. Challenging the model for induction of metallothionein gene expression. *Biochimie* 88: 1787-1792.
- Bradford, MM. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Brereton A, Lord H, Thornton I, Webb JS. 1973. Effect of zinc on growth and development of larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology* 19: 96-101.
- Brügmann L, Danielsson L-G, Magnusson B, Westerlund S. 1983. Intercomparison of different methods for the determination of trace metals in seawater. *Marine Chemistry* 13: 327-339.

- Burgeot T, His E, Galgani F. 1995. The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 342: 125-140.
- Burger J, Gochfeld M, Kosson DS, Powers CW, Jewett S, Friedlander B, Chenelot H, Volz CD, Jeitner C. 2006. Radionuclides in marine macroalgae from Amchitka and Kiska Islands in the Aleutians: establishing a baseline for future biomonitoring. *Journal of Environmental Radioactivity* 91: 27-40.
- Burkart W, Jung T, Frasc G. 1999. Damage pattern as a function of radiation quality and other factors. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 322: 89-101.
- Buroker, NE. 1983. Sexuality with respect to shell length and group size in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Malacologia* 23, 271-279.
- Bustamante P, Miramand P. 2005. Subcellular and body distributions of 17 trace elements in the variegated scallop *Chlamys varia* from the French coast of the Bay of Biscay. *Science of the Total Environment* 337: 59-73.
- Calabrese A. 1984. Ecotoxicological testing with marine molluscs. G. Persoone, E. Jaspers, C. Claus (Eds.), *Ecotoxicological Testing for the Marine Environment*, Vol. 1. State University of Ghent and Institute for Marine Scientific Research, Bredene, Belgium. pp. 455-477.
- Cameron P, Berg J. 1992. Morphological and chromosomal aberrations during embryonic development in dab *Limanda limanda*. *Marine Ecology Progress Series* 91: 163-169.
- Campbell BJ, Li C, Sessions AL, Valentine DL. 2009. Hydrogen isotopic fractionation in lipid biosynthesis by H<sub>2</sub>-consuming *Desulfobacterium autotrophicum*. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73 (10), 2744-2757.
- Canty MN, Hutchinson TH, Brown RJ, Jones MB, Jha AN. 2009. Linking genotoxic responses with cytotoxic and behavioural or physiological consequences: differential sensitivity of echinoderms (*Asterias rubens*) and marine molluscs (*Mytilus edulis*). *Aquatic Toxicology* 94: 68-76.
- Caplat C, Mottin E, Lebel J-M, Serpentine A, Barillier D, Mahaut M-L. 2012. Impact of a Sacrificial Anode as Assessed by Zinc Accumulation in Different Organs of the Oyster *Crassostrea gigas*: Results from Long- and Short-Term Laboratory Tests. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 62: 638-649.
- Chambers DB, Muller E, Saint-Pierre S, Le Bar S. 2003. Assessment of Marine Biota Doses Arising from the Radioactive Sea Discharges of the COGEMA La Hague Facility. A Comprehensive Case Study (Consensus Appraisal). *International Conference on Protection of the Environment from the Effects of Ionizing Radiation*, Stockholm, Sweden, 159-174.
- Chih HW, Neil E, Marsh N. 2001. Tritium partitioning and isotope effects in adenosylcobalamin-dependent glutamate mutase. *Biochemistry* 40 (43): 13060-13067.
- Christmann M., Tomicic M.J., Roos W.P. and Kaina B., 2003, Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 193(l-2):3-34.
- CIPR. 1977. International Commission on Radiological Protection (ICRP). "1977 Recommendations" (ICRP Publication 26) Ann. ICRP. 1 (1). Oxford : Pergamon Press.

- CIPR. 1991. International Commission of Radiological Protection (ICRP). "1990 Recommendations" (ICRP Publication 60) ANN. ICRP. 21 (1/3). Oxford : Pergamon Press.
- Coles JA, Pipe RK. 1994. Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Fish and Shellfish Immunology* 4: 337-52.
- Collins AR, Dobson VL, Dušinská M, Kennedy G, Štětina R. 1997. The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 375: 183-193.
- Collins AR. 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology* 26(3): 249-61.
- Collis SJ, Schwaninger JM, Ntambi AJ, Keller TW, Nelson WG, Dillehay LE, DeWeese TL. 2004. Evasion of early cellular response mechanisms following low level radiation- induced DNA damage. *The Journal of Biological Chemistry* 279:49624-49632.
- Cosa G, Focsaneanu KS, McLean JRN, McNamee JP, Scaiano JC. 2001. Photophysical Properties of Fluorescent DNA-dyes Bound to Single- and Double-stranded DNA in Aqueous Buffered Solution. *Photochemistry and Photobiology* 73: 585-599.
- Costil K, Royer J, Ropert M, Soletchnik P, Mathieu M. 2005. Spatio-temporal variations in biological performances and summer mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Normandy (France). *Helgoland Marine Research* 59 (4), 286-300.
- Dallas LJ, Keith-Roach M, Lyons BP, Jha AN. 2012. Assessing the impact of ionizing radiation on aquatic invertebrates: a critical review. *Radiation Research* 177: 693-716.
- Daly MJ. 2009. A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*. *Nature Reviews Microbiology* 7: 237-245.
- Daly MJ, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Kiang JG, Fukumoto R, Lee D-Y, Wehr NB, Viteri GA, Berlett BS, Levine RL. 2010. Small-Molecule Antioxidant Proteome-Shields in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS ONE* 5(9): e12570.
- De Baar HJW, Bacon MP, Brewer PG, Bruland KW. 1985. Rare earth elements in the Pacific and Atlantic Oceans. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 49(9): 1943-1959.
- DeForest DK, Brix KV, Adams WJ. 2007. Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. *Aquatic Toxicology* 84: 236-246.
- Depledge MH. 1998. The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. *Mutation Research* 399: 109-22.
- Devos A, Voiseux C, Caplat C, Fievet B. 2012. Effect of chronic exposure to zinc in young spats of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 31: 2841-2847.
- Dixon DR, Pruski AM, Dixon LR, Jha AN. 2002. Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis* 17: 495-507.

- Donkin P, Smith EL, Rowland SJ. 2003. Toxic Effects of Unresolved Complex Mixtures of Aromatic Hydrocarbons Accumulated by Mussels, *Mytilus edulis*, from Contaminated Field Sites. *Environmental Science & Technology* 37: 4825-4830.
- Durand JP, Milcent MC, Goudard F, Paquet F, Germain P, Nafissi T, Pieri J. 1994. Chemical behaviour of three radionuclides (cesium, americium and technetium) and their uptake at the cytosolic level in aquatic organisms. *Biochemistry and Molecular Biology International* 33: 521-534.
- Elliott M. 2003. Biological pollutants and biological pollution--an increasing cause for concern. *Marine Pollution Bulletin* 46: 275-280.
- Ellwood MJ, Van den Berg CMG. 2000. Zinc speciation in the Northeastern Atlantic Ocean. *Marine Chemistry* 68: 295-306.
- Emmanouil C, Sheehan TM, Chipman JK. 2007. Macromolecule oxidation and DNA repair in mussel (*Mytilus edulis* L.) gill following exposure to Cd and Cr(VI). *Aquatic Toxicology* 82: 27-35.
- Engel DW, Shelton MG, White JC. Effect of ionising radiation on grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Radiation Research* 1974: 59:72.
- Fabioux C. 2004. Origine et développement des cellules germinales chez l'huître *Crassostrea gigas*. Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale, Brest. 210 pages.
- Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. 1999. Apoptosis in Human Disease: A New Skin for the Old Ceremony? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 266 (3): 699-717.
- FAO 2005, Aquaculture Production: quantities 1950-2002, Fishstat Plus, *Place Fishstat Plus*.
- Farcy E. 2006. Étude de l'impact des radionucléides rejetés par les installations nucléaires du Nord Cotentin sur l'huître creuse *Crassostrea gigas* analyse de l'expression de marqueurs moléculaires de stress. Thèse de doctorat de l'Université de Caen Basse-Normandie/Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire. 310 pages.
- Farcy E, Voiseux C, Robbes I, Lebel JM, Fievet B. 2011. Effect of ionizing radiation on the transcription levels of cell stress marker genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Radiation Research* 176: 38-48.
- Favier A. 2003. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Actualité Chimique* novembre-décembre, 108-115.
- Fiévet B, Pommier J, Voiseux C, Bailly du Bois P, Laguionie P, Cossonnet C, Solier L. 2013. Transfer of Tritium Released into the Marine Environment by French Nuclear Facilities Bordering the English Channel. *Environmental Science & Technology* 47 (12): 6696-6703.
- Frankenberg-Schwager M. 1990. Induction, repair and biological relevance of radiation-induced DNA lesions in eukaryotic cells. *Radiation and Environmental Biophysics* 29: 273-292.
- Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Renault T. 2004. *In vitro* effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology* 16: 501-512.

- Gagnaire B. 2005. Etude de l'effet des polluants sur les paramètres hématocytaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*- Interactions entre environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses. Thèse de Doctorat de l'Université de la Rochelle. 377 pages.
- Galgani F, Bocquene G. 1991. Semi-automated colorimetric and enzymatic assays for aquatic organisms using microplate readers. *Water Research* 25: 147-150.
- Garnier-Laplace J, Roussel-Debet S. 2001. Fiche radionucléides américium 241 et environnement. [http://www.irsn.fr/EN/Research/publications-documentation/radionuclides-sheets/Documents/Americium\\_Am241\\_v1.pdf](http://www.irsn.fr/EN/Research/publications-documentation/radionuclides-sheets/Documents/Americium_Am241_v1.pdf)
- Geffard A, Amiard-Triquet C, Amiard JC, Mouneyrac C. 2001. Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of oysters (*Crassostrea gigas*) from a clean and a metal-rich site. *Biomarkers* 6(2): 91-107.
- Geffard A, Amiard JC, Amiard-Triquet C. 2002a. Kinetics of metal elimination in oysters from a contaminated estuary. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 131: 281-293.
- Geffard A, Amiard JC, Amiard-Triquet C. 2002b. Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker: seasonal and intersite fluctuations. *Biomarkers* 7: 123-137.
- Geffard A, Geffard O, His E, Amiard JC. 2002c. Relationships between metal bioaccumulation and metallothionein levels in larvae of *Mytilus galloprovincialis* exposed to contaminated estuarine sediment elutriate. *Marine Ecology Progress Series* 233: 131-142.
- Geffard A, Geffard O, Amiard JC, His E, Amiard-Triquet C. 2007a. Bioaccumulation of metals in sediment elutriates and their effects on growth, condition index, and metallothionein contents in oyster larvae. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53: 57-65.
- Geffard A, Quéau H, Dedourge O, Biagianti-Risboug S, Geffard O. 2007b. Influence of biotic and abiotic factors on metallothionein level in *Gammarus pulex*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 145: 632-640.
- Geffard O, Geffard A, His E, Budzinski H. 2003. Assessment of the bioavailability and toxicity of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals applied to *Crassostrea gigas* embryos and larvae. *Marine Pollution Bulletin* 46: 481-490.
- GESAMP. 1991. Groupe mixte d'experts OMI/FAO/Unesco/OMM/OMS/AIEA/ONU/PNUe chargé d'étudier les aspects scientifiques de la pollution des mers. Rapport et Etudes GESAMP N° 44: 0-43.
- Gladyshev E, Meselson M. 2008. Extreme resistance of bdelloid rotifers to ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 5139-5144.
- Guary JC, Fowler SW. 1981. Americium-241 and plutonium-237 turnover in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) living in field enclosures. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 12: 193-203.
- Güngör N, Tuğrul B, Topcuoğlu S, Güngör E. 2001. Experimental studies on the biokinetics of <sup>134</sup>Cs and <sup>241</sup>Am in mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Environment International* 27: 259-264.

- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130-7139.
- Hagger JA, Atienzar FA, Jha AN. 2005. Genotoxic, cytotoxic, developmental and survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusc, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 74: 205-217.
- Hagger JA, Fisher AS, Hill SJ, Depledge MH, Jha AN. 2002. Genotoxic, cytotoxic and ontogenetic effects of tri-n-butyltin on the marine worm, *Platynereis dumerilii* (Polychaeta: Nereidae). *Aquatic Toxicology* 57: 243-255.
- Hartl MG, Coughlan BM, Sheehan D, Mothersill C, van Pelt FN, O'Reilly SJ, Heffron JJ, O'Halloran J, O'Brien NM. 2004. Implications of seasonal priming and reproductive activity on the interpretation of Comet assay data derived from the clam, *Tapes semidecussatus* Reeves 1864, exposed to contaminated sediments. *Marine Environmental Research* 57: 295-310.
- Hellio C, Bado-Nilles A, Gagnaire B, Renault T, Thomas-Guyon H. 2007. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) *in vitro*. *Fish & Shellfish Immunology* 22: 433-440.
- Helm MM, Bourne N, Lovatelli A. (comp./éd.). 2006. Ecloserie de bivalves. Un manuel pratique. FAO Document technique sur les pêches. No. 471. Rome, FAO. 184 pages.
- His E, Beiras R, Seaman MNL. 1999. The Assessment of Marine Pollution-Bioassays with Bivalve Embryos and Larvae. Pages 1-178 in A.J. Southward PAT, Young CM, eds. *Advances in Marine Biology*, vol. Volume 37 Academic Press.
- Hoppenheit M. 1973. Effects on fecundity and fertility of single sublethal x irradiation of *Gammarus duebeni* females. Krippner, Monica (ed) *Radioactive Contamination Of The Marine Environment. Proceedings Of A Symposium*. Seattle, Washington, U.s.a., July 10-14, . 786p. Illus. Maps. International Atomic Energy Agency: Vienna, Austria; (dist. In U.s.a. By Unipub, Inc: New York, N.y.). 479-486.
- Howard D, Lewis E, Keller B, Smith C. 2004. *Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans*. Oxford, MD: NOAA, National Ocean Service, National Centers for Coastal Ocean Service, Center for Coastal Environmental Health and Biomolecular Research, Cooperative Oxford Laboratory.
- Huggett RJ, Kimerle RA, Mehrle PM Jr., Bergman HL. 1992. *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and histological markers of anthropogenic Stress*. Boca Raton, Fla., Lewis Publishers. 347 pages.
- IAEA, 1981. Tritium in some typical ecosystems. Technical report 207, IAEA, Vienne.
- IAEA, 1992. Effects of ionizing radiation on plants and animals at levels implied by current radiation protection standards, International Atomic Energy Agency, Vienna
- Iwasaki T, Muruyama T, Kumamoto Y, Kato Y. 1971. Effects of fast neutrons and Co-60 gamma rays on *Artemia*. *Radiation Research* 45: 288-98.
- Jha AN, Hutchinson TH, Mackay JM, Elliott BM, Dixon DR. 1996. Development of an in vivo genotoxicity assay using the marine worm *Platynereis dumerilii* (Polychaeta: Nereidae). *Mutation Research* 359: 141-150.

- Jha AN. 2004. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutation Research* 552: 1-17.
- Jha AN. 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23: 207-221.
- Jha AN, Hagger JA, Hill SJ. 2000a. Tributyltin induces cytogenetic damage in the early life stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35: 343-350.
- Jha AN, Dogra Y, Turner A, Millward GE. 2005. Impact of low doses of tritium on the marine mussel, *Mytilus edulis*: genotoxic effects and tissue-specific bioconcentration. *Mutation Research* 586: 47-57.
- Jha AN, Cheung VV, Foulkes ME, Hill SJ, Depledge MH. 2000b. Detection of genotoxins in the marine environment: adoption and evaluation of an integrated approach using the embryo-larval stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Mutation Research* 464: 213-228.
- Johnson I, Harman M, Forrow D, Norris M. 2001. An assessment of the feasibility of using image analysis in the oyster embryo-larval development test. *Environmental Toxicology* 16: 68-77.
- Juhel G, O'Halloran J, Culloty SC, O'Riordan R M, Davenport J, O'Brien NM, James KF, Furey A, Allis O. 2007. In vivo exposure to microcystins induces DNA damage in the haemocytes of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, as measured with the comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 48: 22-29.
- Kägi JHR. 1991. Overview of metallothionein. Pages 613-626 in James F. Riordan BLV, ed. *Methods in Enzymology*, vol. Volume 205 Academic Press.
- Krassoi R, Everett D, Anderson I. 1996. Protocol for Using Doughboy Scallop *Chlamys Asperrima* (Mollusca: Pectinidae) L. to Test the Sublethal Toxicity of Single Compounds and Effluents. CSIRO for National Pulp Mills Research Program. 48 pages.
- Krisko A, Leroy M, Radman M, Meselson M. 2012. Extreme anti-oxidant protection against ionizing radiation in bdelloid rotifers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(7): 2354-7.
- Kumaravel TS, Vilhar B, Faux SP, Jha AN. 2009. Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology* 25(1): 53-64.
- Lee RF, Steinert S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/ comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research* 544: 43-64.
- Lejart M. 2009. Etude du processus invasif de *Crassostrea gigas* en Bretagne : Etat des lieux, dynamique et conséquences écologiques. Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne occidentale, Brest.
- Lewis C, Galloway T. 2009. Reproductive Consequences of Paternal Genotoxin Exposure in Marine Invertebrates. *Environmental Science & Technology* 43: 928-933.
- Lewis C, Galloway T. 2008. Genotoxic damage in polychaetes: a study of species and cell-type sensitivities. *Mutation Research* 654: 69-75.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J. 2004. *Molecular Biology of the Cell*, WH Freeman: New York, NY. 5th ed., p963.

- Longwell AC, Stiles SS. 1970. The genetic system and breeding potential of the commercial American oyster. *Endeavour* 29: 94-99.
- Lovell DP, Thomas G, Dubow R. 1999. Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of in vivo and in vitro comet studies. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 19: 109-119.
- Lonsdale DJ, Cerrato RM, Holland R, Mass A, Holt L, Schaffner RA, Pan J, Caron DA. 2009. Influence of suspension-feeding bivalves on the pelagic food webs of shallow, coastal embayments. *Aquatic Biology* 6:263-79.
- Luna-Acosta A. 2010. Les phénoloxydases chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* biomarqueurs potentiels de stress environnemental. Thèse de doctorat de l'Université de la Rochelle.
- Luna-Acosta A, Bustamante P, Godefroy J, Fruitier-Arnaudin I, Thomas-Guyon H. 2010. Seasonal variation of pollution biomarkers to assess the impact on the health status of juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* exposed in situ. *Environmental Science and Pollution Research International* 17: 999-1008.
- Luna-González A, Maeda-Martínez AN, Vargas-Albores F, Ascencio-Valle F, Robles-Mungaray M. 2003. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. *Fish & Shellfish Immunology* 15: 275-282.
- MacArthur R, Wilson EO. 1967. *The Theory of Island Biogeography*, Princeton University Press (2001 reprint), ISBN 0-691-08836-5.
- Machella N, Battino M, Pisanelli B, Regoli F. 2006. Influence of the SCGE protocol on the amount of basal DNA damage detected in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 47: 579-586.
- Mai H, Cachot J, Brune J, Geffard O, Belles A, Budzinski H, Morin B. 2012. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Marine Pollution Bulletin* 64: 2663-2670.
- Malev O, Srut M, Maguire I, Stambuk A, Ferrero EA, Lorenzon S, Klobucar GI. 2010. Genotoxic, physiological and immunological effects caused by temperature increase, air exposure or food deprivation in freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Toxicology Pharmacology* 152: 433-443.
- Mamaca E, Bechmann RK, Torgrimsen S, Aas E, Bjørnstad A, Baussant T, Floch SL. 2005. The neutral red lysosomal retention assay and Comet assay on haemolymph cells from mussels (*Mytilus edulis*) and fish (*Symphodus melops*) exposed to styrene. *Aquatic Toxicology*, 2005. 75(3): 191-201.
- Marie V, Baudrimont M, Boudou A. 2006a. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere* 65: 609-617.
- Marie V, Gonzalez P, Baudrimont M, Bourdineaud JP, Boudou A. 2006b. Metallothionein response to cadmium and zinc exposures compared in two freshwater bivalves, *Dreissena polymorpha* and *Corbicula fluminea*. *Biometals* 19: 399-407.

- Marie V, Gonzalez P, Baudrimont M, Boutet I, Moraga D, Bourdineaud JP, Boudou A. 2006c. Metallothionein gene expression and protein levels in triploid and diploid oysters *Crassostrea gigas* after exposure to cadmium and zinc. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(2): 412-8.
- Massarin S. 2010. Etude des effets de l'uranium sur le budget énergétique et la dynamique de population de *Daphnia magna*. Thèse de doctorat de l'Université d'Aix Marseille 2/Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire.
- Mathur-De Vré R, Binet J. 1984. Molecular aspects of tritiated water and natural water in radiation biology. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 43 (2): 161-193.
- McGeer JC, Brix KV, Skeaff JM, DeForest DK, Brigham SI, Adams WJ, Green A. 2003. Inverse relationship between bioconcentration factor and exposure concentration for metals: implications for hazard assessment of metals in the aquatic environment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 1017-1037.
- Meiller JC, Bradley BP. 2002. Zinc concentration effect at the organismal, cellular and subcellular levels in the eastern oyster. *Marine Environmental Research* 54: 401-404.
- Metian M, Warnau M, Teyssié J-L, Bustamante P. 2011. Characterization of <sup>241</sup>Am and <sup>134</sup>Cs bioaccumulation in the king scallop *Pecten maximus*: investigation via three exposure pathways. *Journal of Environmental Radioactivity* 102: 543-550.
- Mikac-Dević D. 1970. Methodology of Zinc Determinations and The Role of Zinc in Biochemical Processes. *Advances in Clinical Chemistry* 13: 271-333.
- Milcent MC, Goudard F, Durand JP, Germain P, Pieri J, George SG. 1996. Identification of <sup>137</sup>Cs-and <sup>241</sup>Am-binding sites in the oyster *Crassostrea gigas*. *Biochemistry and Molecular Biology International* 39: 137-148.
- Minier C, Lelong C, Djemel N, Rodet F, Tutundjian R, Favrel P, Mathieu M, Leboulenger F. 2002. Expression and activity of a multixenobiotic resistance system in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research* 54: 455-459.
- Minton KW. 1994. DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Molecular Microbiology* 13: 9-15.
- Miramand P, Germain P. 1986. Données expérimentales et *in situ* (Goury, Nord Cotentin, France) sur la concentration et la distribution de l'americium ([<sup>241</sup>Am]) dans les tissus de la coquille St-Jacques, *Pecten maximus* (L.). Paris, FRANCE: Société française de malacologie.
- Miramand P, Germain P, Boucaud-Camou E. 1991. Localisation histo-autoradiographique de l'americium dans les tissus des coquilles Saint-Jacques *Pecten maximus* : étude préliminaire sur les mécanismes de transfert à partir de l'eau de mer. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie* 313(9) 395-400.
- Moore JW, Ramamoorthy S. 1984. Organic chemicals in natural waters. 168-191.

- Mothersill C, Bucking C, Smith RW, Agnihotri N, O'Neill A, Kilemade M, Seymour CB. 2006. Communication of radiation-induced stress or bystander signals between fish *in vivo*. *Environmental Science and Technology* 40: 6859-64.
- Mothersill C, Smith RW, Agnihotri N, Seymour CB. 2007. Characterization of a radiation-induced stress response communicated *in vivo* between zebrafish. *Environmental Science and Technology* 41(9): 3382-7.
- Mottier A, Kientz-Bouchart V, Serpentine A, Lebel JM, Jha AN, Costil K. 2013. Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development and metamorphosis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology* 128-129: 67-78.
- Mottin E. 2010. Incidence de la dégradation des anodes sacrificielles en zinc chez deux mollusques, l'huître creuse *Crassostrea gigas* et l'ormeau *Haliotis tuberculata* approches *in vivo* et *in vitro*. Thèse de doctorat de l'Université de Caen Basse-Normandie.
- Moustacchi E. 2000. DNA damage and repair: consequences on dose-responses. *Mutation Research* 464(1): 35-40.
- Murphy C Jr. 1993. Tritium transport and cycling in the environment. *Health Physics* 65: 683-697.
- NCRP (1979). Tritium and other radionuclide labeled organic compounds incorporated in genetic material. Bethesda, MD, National Council on Radiation Protection and Measurements.
- Orieux N, Cambier S, Gonzalez P, Morin B, Adam C, Garnier-Laplace J, Bourdineaud JP. 2011. Genotoxic damages in zebrafish submitted to a polymetallic gradient displayed by the Lot River (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 974-983.
- Ostling O, Johanson KJ. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123: 291-298.
- Oubella R. 1996. Réponses immunitaires chez les mollusques bivalves - Effets de facteurs environnementaux sur le système de défense interne. Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale, Brest, 164p.
- Parolini M, Binelli A, Cogni D, Provini A. 2010. Multi-biomarker approach for the evaluation of the cytogenotoxicity of paracetamol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 79: 489-498.
- Pentreath R. 1998. Radiological Protection Criteria for the Natural Environment. *Radiation Protection Dosimetry* 75: 175-179.
- Pentreath RJ. 1984. The accumulation of long-lived radionuclides by marine organisms: problems past, present and future. 257-268.
- Pesticide Properties DataBase, (2009). <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/fr/index.htm>.
- Perry DM, Wels JS, Wels P. 1988. Cytogenetic effects of methylmercury in embryos of the killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 17: 569-574.

- Polikarpov G. 1998. Conceptual Model of Responses of Organisms, Populations and Ecosystems to all Possible Dose Rates of Ionising Radiation in the Environment. *Radiation Protection Dosimetry* 75: 181-185.
- Pomerantz S. 1963. Separation, purification, and properties of two tyrosinases from hamster melanoma. *The Journal of Biological Chemistry* 238: 2351-2357.
- Pruski AM, Dixon DR. 2002. Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. *Aquat Toxicol* 57: 127-137.
- 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.
- R Development Core Team. 2009. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Radioactive effluents from nuclear power stations and nuclear fuel reprocessing sites in the European Union, 1999-2003. RP 143. Luxembourg: European Commission; 2005. Available online at [http://ec.europa.eu/energy/nuclear/radiation\\_protection/publications\\_en.htm](http://ec.europa.eu/energy/nuclear/radiation_protection/publications_en.htm).
- Rai, D, Serne RJ. 1978. Solid phases and solution species of different elements in geologic environments. Department of Energy, Office of Energy Technology, Pacific Northwest Laboratory, 133 pages.
- Rasband WS. 1997-2011. Image J. U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.
- Rainbow PS, Luoma SN. 2011. Metal toxicity, uptake and bioaccumulation in aquatic invertebrates—Modelling zinc in crustaceans. *Aquatic Toxicology* 105: 455-465.
- Ren JS, Ross AH, Hadfield MG, Hayden BJ. 2010. An ecosystem model for estimating potential shellfish culture production in sheltered coastal waters. *Ecological Modelling* 221: 527-39.
- Ritz C, Streibig JC. 2005. Bioassay analysis using R. *J Statistic Software* 12: 1-22.
- Robert R, Gérard A. 1999. Bivalve hatchery technology: The current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquatic Living Resources* 12: 121-130.
- Roesijadi G, Hansen KM, Unger ME. 1997. Concentration-Response Relationships for Cd, Cu, and Zn and Metallothionein mRNA Induction in Larvae of *Crassostrea virginica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 118: 267-270.
- Rothkamm K, Löbrich M. 2003. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 100: 5057- 5062.
- Ryan TP. 2002. Transuranic biokinetic parameters for marine invertebrates—a review. *Environment International* 28: 83-96.
- Saintigny Y, Roche S, Meynard D, Lopez BS. 2008. Homologous recombination is involved in the repair response of mammalian cells to low doses of tritium. *Radiation Research* 170(2): 172-83.

- Scarlett A, Rowland SJ, Galloway TS, Lewis AC, Booth AM. 2008. Chronic sublethal effects associated with branched alkylbenzenes bioaccumulated by mussels. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27: 561-567.
- Shimada A, Shima A. 2004. Transgenerational genomic instability as revealed by a somatic mutation assay using the medaka fish. *Mutation Research* 552: 119-24.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175: 184-191.
- Singh NP. 2000. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutation Research* 455: 111-127.
- Siu SY, Lam PK, Martin M, Caldwell CW, Richardson BJ. 2008. The use of selected genotoxicity assays in green-lipped mussels (*Perna viridis*): a validation study in Hong Kong coastal waters. *Marine Pollution Bulletin* 57: 479-492.
- Söderhäll K, Cerenius L (1998) Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology* 10: 23-28.
- Stambuk A, Pavlica M, Malovic L, Klobucsar GI. 2008. Persistence of DNA damage in the freshwater mussel *Unio pictorum* upon exposure to ethyl methanesulphonate and hydrogen peroxide. *Environmental Molecular Mutagenesis* 49: 217-225.
- Strand JA, Fujihara MP, Burdett RD, Poston TM. 1977. Suppression of the Primary Immune Response in Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*, Sublethally Exposed to Tritiated Water During Embryogenesis. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 34: 1293-1304.
- Steinert SA, Streib-Montee R, Leather JM, Chadwick DB. 1998. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutation Research* 399: 65-85.
- Steinert SA, Streib-Montee R, Sastre MP. 1998. Influence of sunlight on DNA damage in mussels exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research* 46: 355-358.
- Taban IC, Bechmann RK, Torgrimsen S, Baussant T, Sanni S. 2004. Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to crude oil using comet assay. *Marine Environmental Research* 58: 701-705.
- Tan X, Grollman AP, Shibutani S. 1999. Comparison of the mutagenic properties of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyadenosine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine DNA lesions in mammalian cells. *Carcinogenesis* 20: 2287-2292.
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Bormanb, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology* 75: 291-295.
- Theodorakis C, Shugart L. 1998. Genetic Ecotoxicology III: the Relationship Between DNA Strand Breaks and Genotype in Mosquito Fish Exposed to Radiation. *Ecotoxicology* 7: 227-235.
- Theodorakis CW. 2003. Establishing Causality between Population Genetic Alterations and Environmental Contamination in Aquatic Organisms. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 9: 37-58.

- Thomas-Guyon H, Gagnaire B, Bado-Nilles A, Bouilly K, Lapègue S, Renault T. 2009. Detection of phenoloxidase activity in early stages of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Developmental and Comparative Immunology* 33: 653-659.
- Thomas D, Scot AD, Barbey R, Padula M, Boiteux S. 1997. Inactivation of OGG1 increases the incidence of G . C-->T . A transversions in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for endogenous oxidative damage to DNA in eukaryotic cells. *Molecular and General Genetics* 254: 171-178.
- Tubiana M, Aurengo A. 2006. Dose-effect relationship and estimation of the carcinogenic effects of low doses of ionising radiation: The Joint Report of the Académie des Sciences (Paris) and of the Académie Nationale de Médecine. *International Journal of Low Radiation* 2: 135-153.
- Trott KR, Rosemann M. 2000. Molecular mechanisms of radiation carcinogenesis and the linear, non-threshold dose response model of radiation risk estimation. *Radiation and Environmental Biophysics* 39: 79-87.
- UNSCEAR (2000). Source and effects of ionizing radiation. Vol. 1: sources. Rapport à l'assemblée générale.
- UNSCEAR. 1996. Effects of radiation on the environment, United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, United Nations, New York.
- UNSCEAR. 1993. Sources and effects of ionizing radiation. Sources and effects of ionizing radiation.
- Vasseur P, Cossu-Leguille C. 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environment International* 28: 711-717.
- Ward JF. 1988. DNA Damage Produced by Ionizing Radiation in Mammalian Cells: Identities, Mechanisms of Formation, and Reparability. Pages 95-125 in Waldo EC, Kivie M, eds. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, vol. 35 Academic Press.
- Warnau M, Teyssié JL, Fowler SW. 1996. Biokinetics of selected heavy metals and radionuclides in the common Mediterranean echinoid *Paracentrotus lividus*: Sea water and food exposures. *Marine Ecology Progress Series* 141: 83-94.
- Walker J, Ferrar P. 1998. Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 15: 457-498.
- Walker CH. 2006. *Principles of Ecotoxicology*, Third Edition. Taylor & Francis, 344 pages, ISBN: 084933635X, 9780849336355.
- Watling HR. 1982. Comparative study of the effects of zinc, cadmium and copper on the larval growth of three oyster species. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 28: 195-201.
- Watling HR. 1983. Comparative study of the effects of metals on the settlement of *Crassostrea gigas*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 31: 344-351.
- Wessel N, Rousseau S, Caisey X, Quiniou F, Akcha F. 2007. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17alpha-ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquatic Toxicology* 85: 133-142.

- Whicker F, Bedford J. 1995. Protection of the natural environment from the ionising radiation. Are specific criteria needed? International Symposium on Environmental Impact of Radioactive Releases 561-567.
- Widdows J. 1993. Marine and estuarine invertebrate toxicity tests. In "Handbook of Ecotoxicology" (P. Calow, ed.), 1, pp. 145-166. Blackwell, Oxford.
- Winsor CP. 1932. The Gompertz curve as a growth curve. Proceedings of the National Academy of Sciences 18: 1-8.
- Woelke, C.E., W.D.o.F. Management, and R. Division, *Development of a Receiving Water Quality Bioassay Criterion Based on the 48-hour Pacific Oyster (Crassostrea Gigas) Embryo*. 1972: State of Washington Department of Fisheries, Management and Research Division.
- Würgler FE, Kramers PG. 1992. Environmental effects of genotoxins (eco-genotoxicology). Mutagenesis 7: 321-327.
- Zeman FA, Gilbin R, Alonzo F, Lecomte-Pradines C, Garnier- Laplace J, Aliaume C. 2008. Effects of waterborne uranium on survival, growth, reproduction and physiological processes of the freshwater cladoceran *Daphnia magna*. Aquatic Toxicology 86: 370-8.
- Zuykov M, Pelletier E, Rouleau C, Popov L, Fowler SW, Orlova M. 2009. Autoradiographic study on the distribution of <sup>241</sup>Am in the shell of the freshwater zebra mussel *Dreissena polymorpha*. Microchimica Acta 167: 173-178.



# LISTE DES FIGURES

Figure 1 : historique des rejets annuels liquides d'AREVA La Hague. ....	14
Figure 2 : activités en tritium dans l'eau de mer de la Manche, la mer Celtique et la mer d'Irlande (d'après Bailly du Bois et Dumas 2005). ....	15
Figure 3 : doses annuelles et origines des expositions de la population française aux RI (Source IRSN 2005). ....	17
Figure 4 : effets des rayonnements ionisants au niveau subcellulaire (d'après Amiard 2011). ....	18
Figure 5 : effets direct ou indirect des RI sur l'ADN. ....	19
Figure 6 : schéma illustrant le principe de l'extrapolation à l'aide d'une relation dose-effet linéaire sans seuil. ....	23
Figure 7 : cycle de vie de <i>Crassostrea gigas</i> (d'après Lejart 2009 selon Fabioux 2004). ....	26
Figure 8 : approximations de doses létales pour différents groupes taxonomiques et indication comparative de leur radiosensibilité (UNSCEAR 1996). ....	27
Figure 9 : relation schématique des liens entre les réponses à différents niveaux organisationnels (d'après Walker <i>et al.</i> 2006). ....	30
Figure 10 : illustration de la démarche expérimentale entreprise lors de ces travaux de thèse. ....	32
Figure 11 : photos et dessins techniques des cages accueillant les naissains (A et B) et les larves (C). .	40
Figure 12 : mesures conservatives et automatisées de la croissance des naissains. ....	42
Figure 13 : mesures conservatives de la croissance des larves. ....	43
Figure 14 : histogramme de taille d'un lot de larves élevées dans les conditions <i>témoin</i> de laboratoire. ....	44
Figure 15 : diamètres de <i>Feret</i> moyen et pourcentages de survie de 7 lots de naissains exposés aux conditions <i>témoin</i> de laboratoire. ....	45
Figure 16 : Longueur moyenne et pourcentage de survie de 12 lots de larves exposées aux conditions <i>témoin</i> de laboratoire. ....	46
Figure 17 : schéma illustrant la propriété du SYBR Green à émettre de la fluorescence lorsqu'il est lié à l'ADN double brin (modifié d'après <a href="http://www.dkfz.de">www.dkfz.de</a> ). ....	49
Figure 18 : A - structure d'exposition chronique de naissains au zinc, B - schéma d'une UE de la plateforme d'élevage miniature utilisée au cours d'expositions chroniques de naissains au zinc. ....	56
Figure 19 : A - structure d'exposition chronique de larves au ZnCl <sub>2</sub> , B - UE de la plateforme d'élevage miniature utilisée au cours d'expositions chroniques de larves, C - schéma d'une UE. ....	58
Figure 20 : descriptif temporel des expositions de naissains et de larves au zinc. ....	58

Figure 21 : concentration en zinc mesurée dans les naissains entiers (parties molles et coquille, $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ de poids sec) exposés à différents niveaux de concentration en zinc dans l'eau de mer. ....	61
Figure 22 : pourcentage de survie moyen ( $\pm ET$ ; $n=6$ ) des naissains exposés à 6 niveaux de concentration en zinc dans l'eau de mer. ....	62
Figure 23 : croissance des naissains exposés à 6 concentrations en zinc dans l'eau de mer. ....	63
Figure 24 : courbe dose-réponse illustrant l'effet chronique de la concentration en zinc dans l'eau de mer sur la croissance des naissains. ....	64
Figure 25 : sensibilité de la CE50 chez les naissains exposés chroniquement au zinc (estimation $\pm ES$ , $n=6$ ). ....	65
Figure 26 : niveau d'expression transcriptionnelle des gènes codant pour les métallothionéines (MT1 et MT2) en réponse à une exposition chronique à différentes concentrations en zinc de l'eau de mer. ...	66
Figure 27 : Activité spécifique des phénoloxydases. ....	68
Figure 28 : Activité des enzymes antioxydantes. ....	68
Figure 29 : Activité spécifique de la GST. ....	69
Figure 30 : pourcentage de larves survivantes exposées à 4 niveaux de concentration en zinc ( $\text{ZnCl}_2$ ) dans l'eau de mer. ....	71
Figure 31 : croissance des larves exposées à 4 concentrations en zinc ( $\text{ZnCl}_2$ ) dans l'eau de mer. ....	73
Figure 32 : courbe dose-réponse illustrant l'effet chronique de la concentration en zinc dans l'eau de mer sur la croissance des larves. ....	74
Figure 33 : dispositif expérimental miniature utilisé lors des expositions chroniques de juvéniles au methiocarb. ....	84
Figure 34 : pourcentage de survie de larves exposées à quatre niveaux de concentration en methiocarb dans l'eau de mer. ....	85
Figure 35 : croissance des larves exposées à 4 concentrations en methiocarb dans l'eau de mer. ....	86
Figure 36 : niveau d'expression transcriptionnel du gène codant MXR en réponse à une exposition chronique de 14 jours à différentes concentrations en methiocarb. ....	87
Figure 37 : photographies des chambres d'irradiations chroniques aux rayonnements gamma. ....	96
Figure 38 : photographies et schémas détaillés illustrant les UEs et leurs agencements autour des sources de $^{137}\text{Cs}$ lors des expositions des naissains (a) et larves (b). ....	98
Figure 39 : photo de la structure d'exposition <i>témoin</i> . ....	99
Figure 40 : descriptif temporel des expositions de naissains et de larves à une source externe de rayonnements gamma. ....	100
Figure 41 : suivi temporel de la survie des juvéniles <i>témoin</i> et exposés à une source externe de rayonnements gamma. ....	102

Figure 42 : suivi temporel de la croissance de naissains <i>témoin</i> et exposés à une source externe de rayonnements gamma.....	103
Figure 43 : suivi temporel de la croissance de larves <i>témoin</i> et exposés à une source externe de rayonnements gamma.....	104
Figure 44 : niveau d'expression transcriptionnelle des gènes codant pour MT1&2 (a) et MXR (b) en réponse à une exposition de 14 jours à un débit de dose de rayonnements gamma externes de 27,3 mGy.h <sup>-1</sup> .....	105
Figure 45 : photos du dispositif d'exposition par baignation en milieu contrôlé (a), de la plate-forme de mesure de croissance (b) et d'une population de 40 naissains en début (c) et fin (d) d'exposition lors des expositions de juvéniles à l'américium 241.....	109
Figure 46 : photo du détecteur germanium coaxial de type N utilisé lors des expositions de juvéniles à l'américium 241.....	110
Figure 47 : descriptif temporel des expositions de naissains et larves à de fortes concentrations en <sup>241</sup> Am. ....	111
Figure 48 : suivi temporel de la survie des naissains <i>témoin</i> et exposés à l'euporium. ....	112
Figure 49 : suivi temporel de la croissance par tamis de naissains <i>témoin</i> et exposés l'euporium. ....	113
Figure 50 : suivi temporel de l'activité en <sup>241</sup> Am dans les naissains entiers. ....	114
Figure 51 : suivi temporel de la survie des naissains <i>témoin</i> et exposés à l' <sup>241</sup> Am. ....	115
Figure 52 : suivi temporel de la croissance par tamis de naissains <i>témoin</i> et exposés l' <sup>241</sup> Am.....	116
Figure 53 : photo de la structure d'exposition utilisée lors d'expositions de larves à différentes concentrations en Eu.....	118
Figure 54 : suivi temporel de la survie des larves <i>témoin</i> et exposés à 5 niveaux de contamination en Eu.....	119
Figure 55 : suivi temporel de la croissance des larves <i>témoin</i> et exposées à 5 niveaux de contamination en Eu (longueur moyenne ± ET). ....	120
Figure 56 : photo du dispositif d'exposition utilisé lors des contaminations en <sup>241</sup> Am. ....	121
Figure 57 : suivi temporel de la survie des larves <i>témoin</i> (○), <i>témoin-Eu</i> (◆) et exposées à 57 Bq.mL <sup>-1</sup> d' <sup>241</sup> Am (◆). ....	122
Figure 58 : suivi temporel de la croissance des larves <i>témoin</i> , <i>témoin-Eu</i> et exposées 57 Bq.mL <sup>-1</sup> d' <sup>241</sup> Am (longueur moyenne ± ET). ....	123
Figure 59 : ordres de grandeur des activités volumiques en tritium rencontrées dans l'environnement et exemples de niveaux d'exposition utilisés en laboratoire. ....	133
Figure 60 : photos d'un bac de 50 L d'eau de mer réfrigérée à 15 °C et contenant 40 huîtres.....	137
Figure 61 : structure d'exposition des jeunes huîtres au tritium. ....	138

Figure 62 : descriptif temporel (a) et plan d'échantillonnage (b) utilisé lors de l'exposition chronique de jeunes huîtres au tritium. ....	139
Figure 63 : différentes étapes de préparation des échantillons d'huîtres pour la mesure du tritium par scintillation liquide. ....	142
Figure 64 : dispositif utilisé lors des mesures individualisées de taux de filtration .....	144
Figure 65 : exemple d'observations de noyaux d'hémocytes <i>témoin</i> (a) et exposés à un agent génotoxique (b). ....	146
Figure 66 : prélèvement d'hémolymphe au niveau du sinus veineux du muscle adducteur. Le pouce gauche maintient la charnière légèrement ouverte. ....	146
Figure 67 : calcul du niveau de dommages à l'ADN, exprimé en pourcentage d'ADN présent dans la queue, lors du traitement du signal de fluorescence sur le logiciel Comet Assay IV. ....	149
Figure 68 : activité en tritium (HTO ; MBq.L <sup>-1</sup> ) mesurée dans l'eau de lyophilisation des huîtres .....	153
Figure 69 : activité volumique en tritium (OBT) dans les tissus exprimée en MBq.L <sup>-1</sup> d'eau de combustion.....	154
Figure 70 : taux de filtration moyen mesurés chez des huîtres <i>C. gigas</i> avant et après 14 jours d'exposition au tritium. ....	156
Figure 71 : niveaux d'expression transcriptionnelle des gènes codant pour les métallothionéines (MT1 et MT2) et MXR en réponse à une exposition chronique à trois niveaux de contamination en tritium (moy.±ET, n=9).....	158
Figure 72 : induction de cassures à l'ADN (exprimées en % d'ADN dans la queue de comète) dans les hémocytes de <i>C. gigas</i> après exposition à différentes concentrations en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	159
Figure 73 : induction de cassures à l'ADN (exprimées en % d'ADN dans la queue de comète) dans les hémocytes de <i>C. gigas</i> après exposition à différents niveaux de contaminations en tritium. ....	160
Figure 74 : signification et conséquences des cassures de brins d'ADN (d'après Jha 2008).....	174

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : séquence et numéro d'accèsion GenBank des amorces utilisées en RT-PCR (pour <i>C. gigas</i> ). .....	50
Tableau 2 : concentrations en Zinc (en $\mu\text{M}$ ) dans l'eau de mer des unités expérimentales lors des expositions de naissains (moyenne $\pm$ ET). .....	59
Tableau 3 : tableau récapitulatif illustrant les tendances de variations des différents paramètres biologiques étudiés lors des expositions de naissains au zinc. ....	70
Tableau 4: concentrations en Zinc (en $\mu\text{M}$ ) dans l'eau de mer des unités expérimentales lors des expositions des larves et naissains (moyenne $\pm$ ET). ....	70
Tableau 5 : principales caractéristiques du methiocarb.....	82
Tableau 6 : concentrations nominales en methiocarb dans l'eau de mer des unités expérimentales lors des expositions des larves et naissains. ....	83
Tableau 7 : modèle conceptuel de classification des débits de doses lors d'expositions chroniques aux rayonnements ionisants en milieu naturel. ....	94
Tableau 8 : débits de dose calculés au centre des cages lors des expositions des naissains et larves à une source externe de rayonnements gamma. ....	101
Tableau 9 : concentrations nominales en europium ( $\mu\text{M}$ ) dans l'eau de mer des unités expérimentales lors des expositions de larves. ....	117
Tableau 10 : paramètres physico-chimiques mesurées dans l'eau de mer des béciers exposés aux conditions contrôles durant 14 jours. ....	151
Tableau 11 : activités volumiques en tritium (HTO) dans les milieux d'exposition. ....	152
Tableau 12 : estimation du débit de dose reçu par les huîtres.....	155
Tableau 13 : niveaux de dommages à l'ADN, exprimés en "pourcentage d'ADN dans la queue de la comète", observés chez les hémocytes ou coelomocytes (à l'exception de <i>C. gigas</i> ) d'invertébrés aquatiques en conditions <i>témoin</i> . ....	163
Tableau 14 : Comparaison des dommages endogènes et des dommages radio-induits de l'ADN (modèle mammifère - cellule humaine) (d'après Ward 1988, Burkart <i>et al.</i> 1999). ....	173



## **ANNEXES**

Annexe A : Exposition chronique de larves de *Crassostrea gigas* à un géotextile.

Annexe B : Effect of Chronic Exposure to Zinc in Young Spats of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*).



# ANNEXE A : EXPOSITION CHRONIQUE DE LARVES DE *CRASSOSTREA GIGAS* A UN GEOTEXTILE

Cette étude a pour but de tester l'impact potentiel d'un géotextile sur la croissance des larves d'huître creuse.

Afin de réaliser cette expérience, plusieurs sous-populations de larves ont été prélevées au hasard parmi une population stock, puis elles ont été placées dans des cages suspendues appelées "tamis-nacelles". Chaque cage a été placée dans une Unité Expérimentale ("UE") contenant 230 mL de milieu de culture ([figure 1-a](#)).

Les milieux de culture ont été renouvelés les lundis, mercredis et vendredis. Ils se composaient d'eau de mer et d'un mélange de deux cultures algales. Au cours de leur première semaine de vie, les larves disposaient d'un mélange de *Pseudoisochrysis* et *Pavlova lutheri* puis la culture de *P. lutheri* a été remplacée par une culture de *Chaetoceros calcitrans* à partir de la seconde semaine de vie larvaire. Les cultures algales constituaient 2% du volume du milieu de culture les lundis et mercredis et 3% les vendredis ceci afin que les larves aient de quoi s'alimenter tout au long du week-end. La quantité de cellules algales a été mesurée au spectrophotomètre ( $\lambda = 700 \text{ nm}$ ) avant et après chaque changement de milieu. Les résultats montrent que toutes les larves disposaient de la même quantité de nourriture et qu'elles n'ont à aucun moment épuisé les ressources algales du milieu.

La température des milieux de culture a été régulée à une valeur de 26°C à l'aide d'un bain-marie. Chaque UE disposait d'un système de bullage dont l'air est préalablement chargé en humidité afin de limiter l'évaporation spontanée du milieu de culture. Une section de géotextile d'environ 70 cm<sup>2</sup> a été découpée puis placée au fond de l'UE exposée comme indiqué dans la [figure 1](#).

Quatre UE "témoins" et quatre UEs "exposées" ont ainsi été créées ce qui a permis des mesures conservatives de la croissance des larves au cours du temps ([figure 2](#)).

Au début de l'exposition au géotextile, les larves étaient âgées de 2 jours (pf).

Les résultats de croissance et de mortalité sont présentés sur les [figures 3, 4 et 5](#).

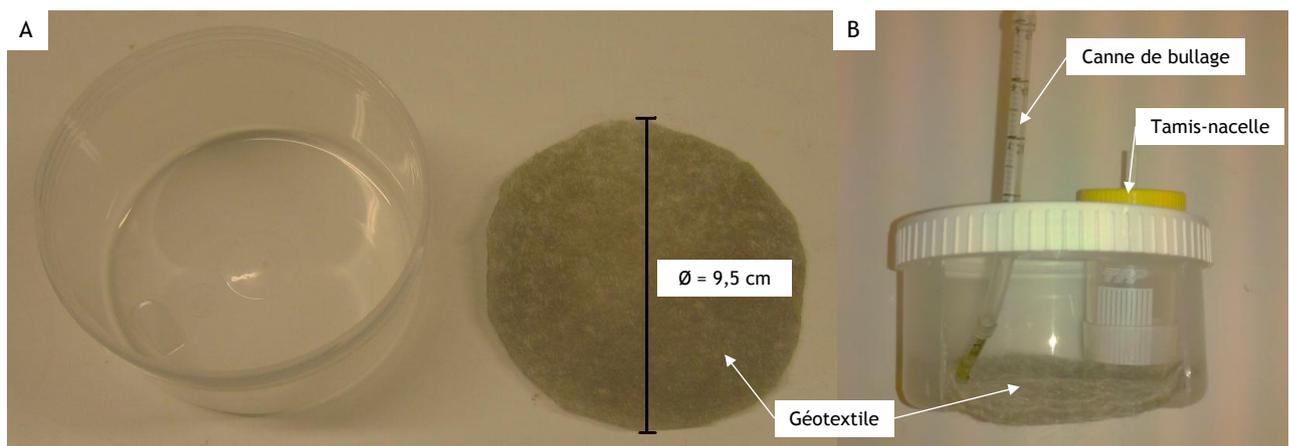


Figure 1 : Photographie de la partie inférieure d'une UE dont le fond sera tapissé d'un cercle de géotextile d'environ 70 cm<sup>2</sup> (A). Photographie d'une UE vu de profile (B).

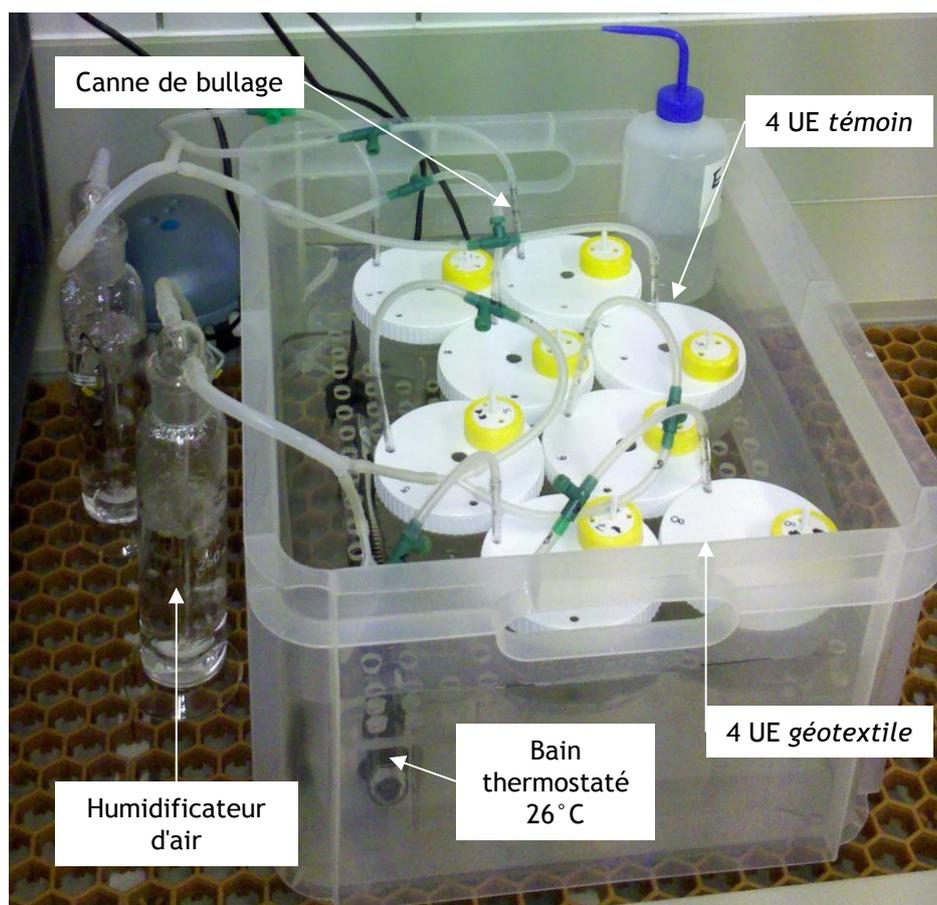


Figure 2 : Photographie du dispositif expérimental en fonctionnement.

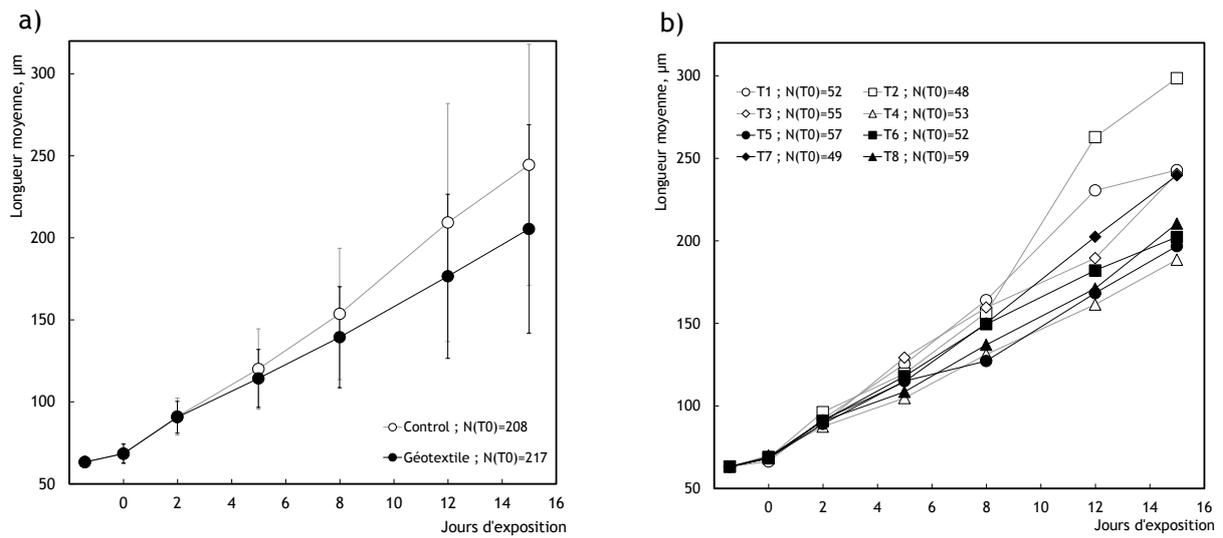


Figure 3 : a) Longueurs moyennes ( $\pm$  ET) des larves *témoin* et exposées en fonction du temps ; pool de 4 réplicats par condition. b) Longueurs moyennes ( $\pm$  ET) des larves *témoin* et exposées par réplicats en fonction du temps. Au temps 0 de l'exposition ( $t_0$ ), les larves sont âgées d'environ 48 heures (*pf*).

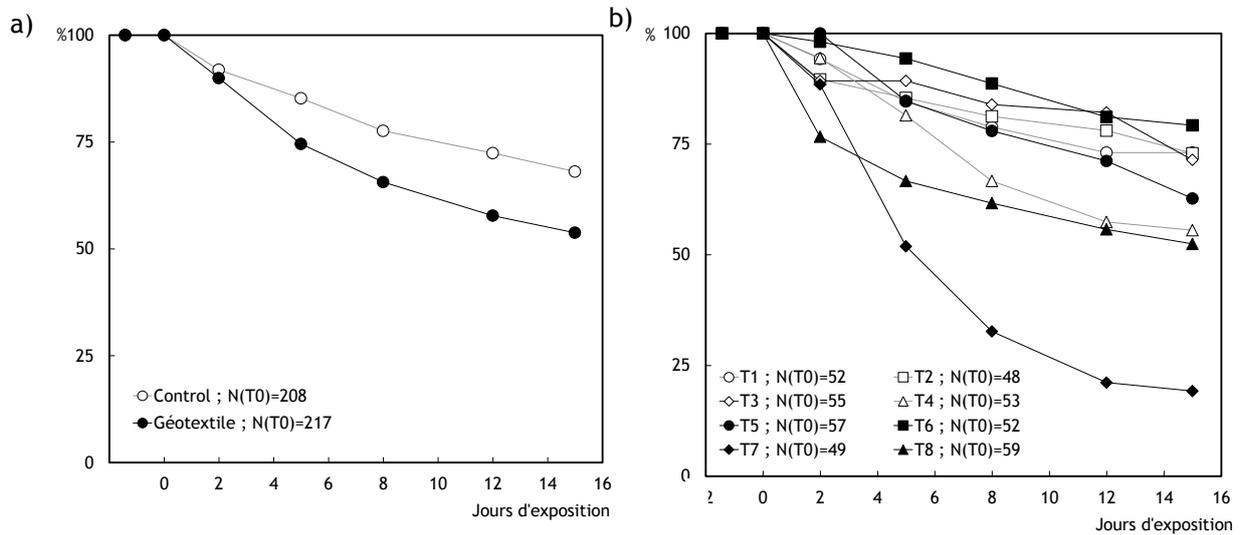


Figure 4 : a) Pourcentage de larves survivantes *témoin* et exposées en fonction du temps ; pool de 4 réplicats par condition (*témoin* :  $n(t_0)=208$  ; Exposées :  $n(t_0)=217$ ). b) Pourcentage de larves survivantes *témoin* et exposées par réplicats en fonction du temps. Au temps 0 de l'exposition, les larves sont âgées d'environ 48 heures.

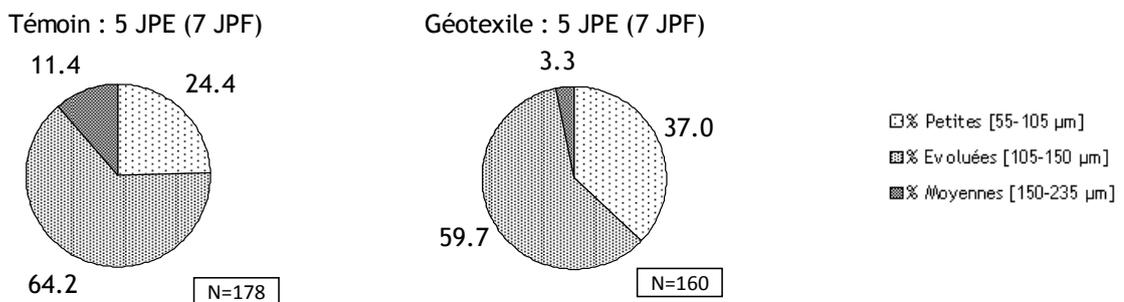


Figure 5 : Pourcentages des tailles prises par les larves témoins et exposées après 5 jours d'exposition (5 JPE) soit 7 jours après fécondation (7 JPF).

## Conclusion

D'après notre expérience d'élevage de larves en laboratoire, nous savons qu'une légère perturbation des conditions expérimentales au cours de la première semaine de développement larvaire se traduit par un taux de croissance beaucoup plus faible et par un taux de mortalité très supérieur à la normale.

Cette expérimentation consistait à tester l'impact potentiel d'un géotextile sur la croissance des larves d'huître creuse.

Au cours de cette expérimentation, les larves *témoin* et celles exposées au géotextile ont présenté des courbes de croissance et de survie similaires. En outre, aucune mortalité massive n'a été observée dans les deux conditions. Seules les larves du TAN 7 (exposées au géotextile) ont présenté un taux de mortalité élevé qui a atteint une valeur de 80% après 15 jours d'exposition ([figure 4-b](#)). Cette mortalité ne peut être expliquée par la présence du géotextile car les autres répliquats de larves exposées (TANs 5, 6 et 8) ont présenté des taux de mortalité similaires à ceux des larves témoins.

Le géotextile n'a donc pas perturbé la croissance des larves au cours des 15 jours qu'a duré l'exposition.

**ANNEXE B: EFFECT OF CHRONIC EXPOSURE TO ZINC  
IN YOUNG SPATS OF THE PACIFIC OYSTER  
(*CRASSOSTREA GIGAS*)**



EFFECT OF CHRONIC EXPOSURE TO ZINC IN YOUNG SPATS OF THE PACIFIC OYSTER (*CRASSOSTREA GIGAS*)ALEXANDRE DEVOS,<sup>†</sup> CLAIRE VOISEUX,<sup>†</sup> CHRISTELLE CAPLAT,<sup>‡</sup> and BRUNO FIEVET\*<sup>†</sup><sup>†</sup>Radioecology Laboratory of Cherbourg-Octeville, Institute of Radioprotection and Nuclear Safety/PRP-ENV/SERIS, Cherbourg-Octeville, France<sup>‡</sup>FRE3484 BioMEA-CNRS INEE, Biology of Marine Mollusks and Associated Ecosystems, IBFA-SFR ICORE, University of Caen Basse-Normandie, Technology Hall of Cherbourg, Cherbourg-Octeville, France

(Submitted 21 June 2012; Returned for Revision 20 July 2012; Accepted 13 August 2012)

**Abstract**—The marine coastal environment is exposed to a mixture of environmental pollutants of anthropogenic origin, resulting in chronic low concentrations of contaminants. As a consequence, most coastal marine species are exposed to low doses of such pollutants during their entire life. Many marine species live for years in their natural environment, whereas they do not under laboratory exposure conditions. Using early stages of development in laboratory work allows animals to be chronically exposed from an early age over a reasonable experiment period. In the present study, the authors investigated the effect of chronic exposure to zinc in spats of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), from metamorphosis up to 10 weeks. The authors investigated integrated biological endpoints that would account for the apparent general health of the animals as well as molecular markers showing more subtle effects that could potentially go unnoticed at a biologically integrated level. The authors measured in parallel both growth and the transcriptional level of target stress genes. Growth was monitored by image analysis of large samples to avoid high variability and ensure statistical robustness. A dose–response relationship was derived from growth data, yielding a median effective concentration (EC50) of 7.55  $\mu$ M. Stress genes selected on the basis of available RNA sequences in *C. gigas* included genes involved in chaperone proteins, oxidative stress, detoxification, and cell cycle regulation. Out of nine stress target genes, only metallothionein displayed overexpression in response to high levels of zinc. Environ. Toxicol. Chem. 2012;31:2841–2847. © 2012 SETAC

**Keywords**—Zinc    Chronic exposure    Metallothionein    Gene expression    Oyster spat

## INTRODUCTION

The marine coastal environment is exposed to a mixture of environmental pollutants of anthropogenic origin, resulting in chronic low concentrations of contaminants. A critical issue in laboratory experiments is to determine how long a study should last so as to be relevant in terms of chronicity of exposure. Many marine species live for years in their natural environment, which is not the case under laboratory exposure conditions. Using early stages of development allows animals to be chronically exposed from an early age over a reasonable experiment period. Young animals are often more sensitive to pollution than adults. Thus, we studied the effects of chronic exposure of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat to seawater zinc concentrations from metamorphosis through the 10 first weeks of life.

Zinc is an essential trace metal in living organisms [1], but it becomes toxic at high concentrations. In coastal marine systems, its concentration is influenced by many human activities [2], including the use of antifouling paints and sacrificial anodes [3]. The effects of chronic exposure to zinc on filtering bivalves have been previously investigated by several authors who focused on bioavailability, tissue accumulation, transfer kinetics, and relationships with metallothionein [4–9]. Numerous studies have addressed early life stages and toxicity [7,10–17], most of which involved larvae. A major issue regarding zinc is its chemical speciation in the natural marine environment and the consequences for its bioavailability, especially for filter-feeding animals. Laboratory exposure experi-

ments have mostly used field sediment elutriates or  $ZnCl_2$  as a primary source of zinc. On the basis of this rich literature, we selected zinc as a test pollutant for long-term exposure experiments on young oyster spats starting from metamorphosis. This developmental stage has probably been investigated less because of the very small size and the fact that the hard shell impairs soft tissue separation. However, the use of spats at the very beginning of their sessile life is relevant in terms of chronic exposure to pollutants. The present study used this biological model in an attempt to derive the ecotoxicological parameters (e.g., median effective concentration [EC50]) that are required in environmental risk assessments.

Examination of the effects of zinc on oyster spats ideally requires an investigation of the biological parameters accounting for the apparent general health of the animals (e.g., development, growth, physiology, and behavior), together with cellular/molecular parameters (e.g., biochemical and genotoxic markers, -omics) accounting for more subtle effects that could potentially go unnoticed at a biologically integrated level. We took advantage of the rapid growth rate of oyster spats to monitor their size by image analysis over time. This made it possible to process a large population sample to offset individual variability and ensure robust statistical analysis. Thus, at an integrated level, it was possible to derive the EC50 for growth from a dose–response curve analysis. Target gene analysis focusing on stress genes selected on the basis of available *C. gigas* DNA sequences was performed by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) as previously described [18]. Stress genes included heat shock proteins (hsp70, hsp72, hsp90), metallothionein (MT1/MT2), and genes involved in detoxification mechanisms (GST, P450, MDR) and the regulation of oxidative stress (SOD) and the cellular cycle (p53).

\* To whom correspondence may be addressed  
(bruno.fievet@irsn.fr).

Published online 20 September 2012 in Wiley Online Library  
(wileyonlinelibrary.com).

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Pacific oyster (*C. gigas*) spats were obtained from a local hatchery (Société Atlantique de Mariculture [SATMAR], Normandy, France). Larvae were initially obtained from 60 potentially different pairs. Spats were collected on the day of metamorphosis and acclimated overnight to laboratory conditions. Seawater came from the natural local environment and was filtered (0.22  $\mu\text{m}$ ) and kept at 23.5°C. All experiments were temperature-controlled at 23.5°C. The population was divided into six batches, including one control and five batches that were given different zinc concentrations. For each batch, 40 oysters were placed in each of six small polypropylene/nylon sieve replicates (diameter, 2.8 cm), and 3,500 were placed in a larger polyvinyl chloride/nylon sieve (diameter, 15 cm). Different nylon mesh sizes of 180, 300, and 500  $\mu\text{m}$  were used as the oysters grew. The animals from the six small sieves were used for mortality and growth analyses, and those from the larger sieve were used for destructive measurements. All seven sieves (six small and one large) were kept in plastic tanks containing 6 L of seawater that was recirculated with a small immersed pump and kept at 23.5°C. After time zero measurements at 17 d postfecundation and 1 d postmetamorphosis, chronic exposure to zinc started at 2 d postmetamorphosis and lasted for 10 weeks. The oysters were fed every other day or every 3 d with a 1:1 mixture of *Chaetoceros calcitrans* and *Pavlova lutheri* microalgae (provided by the SATMAR hatchery), the cell density of which was monitored in the tanks throughout the experiment. Cell densities of monospecific cultures were determined under the microscope using a Thoma cell counter. Oyster biomass (and shell) in each 6-L tank represented <1 g (at the start) to <15 g (at the end). Throughout the whole experiment, seawater from the tanks was renewed every Monday, Wednesday, and Friday.

One batch was kept as a control, and in the other five batches zinc chloride ( $\text{ZnCl}_2$ ; Sigma-Aldrich) was added to the seawater at increasing concentrations up to 2 mg L<sup>-1</sup> (33  $\mu\text{M}$ ).

### Zinc measurements in seawater

For all six batches, seawater samples were taken just before and after water renewal on days 0, 3, 5, 7, 11, 17, 24, and 38 of exposure. Samples of 50 ml were collected in disposable polypropylene centrifuge tubes, and a few drops of nitric acid were added (68%, Normapur grade). Zinc concentration in the seawater was measured by air-acetylene flame atomic absorption spectrometry (F-AAS) at a wavelength of 213.9 nm and with a slit of 1 nm. The apparatus was a Varian AA240F equipped with a deuterium lamp (coded hollow-cathode lamp from Photron Lamps) to correct for nonspecific absorption. All calibration standards were diluted from a stock standard (zinc calibration solution, 1.000  $\pm$  0.005 g L<sup>-1</sup>; Analytika) with MilliQ water. The standard addition method was used to check the quality of the measurements.

### Zinc measurements in oyster spats

The oyster spats were sampled from the large sieve at various time intervals and drained. The number of spats ranged between 15 and 2,500, depending on their size, to ensure at least 20 mg of dry material. Because of limitations in the available material, replicates were only collected for 25 samples, but this was sufficient to allow estimation of the repeatability of zinc measurements in oyster spats. The sampled animals were collected in 1.5-ml disposable centrifuge microtubes, freeze-

dried, and weighed. Then 20 mg of whole animals (including the shell) were transferred to a Teflon microwave bomb containing 5 ml of mineralizing solution freshly prepared with one volume of nitric acid (69%) and three volumes of hydrochloric acid ( $\geq 37\%$ ). The Teflon bombs were kept for 24 h at room temperature and then placed in a microwave oven (1,000 W) under controlled temperature (200°C) for 35 min. The accuracy of the analyses was checked by using the standard reference material NIST-1566b oyster tissue (National Institute of Standards and Technology) treated in the same way as the samples with respect to the preparatory procedures, including digestion and F-AAS analysis.

### Mortality

Mortality measurements were performed on the small sieves for each exposure concentration. Mortality was detected by direct observation under the binocular microscope by using several criteria such as absence of a color-contrasted digestive gland, absence of pseudopod movement out of the shell, and the presence of scavengers inside the valves. Mortality was further confirmed by absence of shell growth. Dead oysters were discarded after identification.

### Growth measurements

To deal with individual variability, the six replicates of 40 oyster spats from the small sieves for each exposure concentration were observed under the binocular microscope (Leica MZ6 with D420 camera), and a photomicrograph was taken. All images were scaled to allow size measurements by digital image analysis. Using Image J software ([19], <http://rsbweb.nih.gov/ij/>), the Feret diameter (maximal diameter) and the surface of each oyster shell was quantified. At various time intervals, for each zinc exposure concentration, six means with standard deviations were calculated from the six small sieve replicates of 40 spats, as well as an overall mean and standard deviation from all 240 individuals. Growth curves were plotted as changes in the overall mean ( $n = 240$  at the start) over time, and the Gompertz model was fitted [20]. In parallel, the six individual small sieve replicates ( $n = 40$  at the start) were processed separately for the Gompertz model fitting to derive six replicate values for the growth rate. The growth rate was taken as the maximal slope of the Gompertz model growth curve for the control batch. For the zinc exposure batches, the growth rate was taken as the slope of the Gompertz model curve at the same time as the control batch. The growth rate data were plotted as a function of zinc exposure concentration, and a dose-response curve was derived by log-logistic curve fitting.

### mRNA quantification

At each sampling time, approximately 50 mg of oyster spat were immediately drained and mixed with TRI REAGENT (Sigma Aldrich) and stored at -80°C. Total RNA was extracted, quantified (260- and 280-nm absorbance measured in a UV spectrophotometer), treated with RNase-free DNase I (Sigma-Aldrich) to discard genomic DNA, and retrotranscribed (Promega reagents) as described by Farcy et al. [21]. Real-time PCR was performed in a MyiQ Cycler (BioRad) with the same primers as used by Farcy et al. [18]. Amplification was carried out in 96-well plates, in a total volume of 15  $\mu\text{l}$  containing 7.5  $\mu\text{l}$  of 2X iQ SYBR Green Supermix (BioRad), each primer (500 nM final), and cDNA obtained from reverse transcription of 5 ng of total RNA. Amplification conditions were 40 cycles of 15 s at 95°C and 45 s at 60°C, followed by the protocol for the melting curve: 80 cycles of 10 s with an increase of 0.5°C

between each cycle from 55°C to 95°C. The specificity of the reaction was confirmed by observing a single peak at the expected  $T_m$  on the melting curve analysis. Sequences of amplicons obtained with the same primers and the same biological material were checked in previous studies [21]. All determinations were carried out in duplicate.

Gene-specific mRNA quantification was performed by normalizing data to the amount of mRNA encoding for actin, a cytoskeleton protein, and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), a key enzyme of glycolysis used as reference mRNA encoding for housekeeping genes. For each specific DNA analyzed, real-time PCR provides a cycle threshold (Ct) value whereby the fluorescence signal is detectable above background. This Ct value depends on the starting amount of cDNA. An actin Ct value in a range of 18.5 to 20.1 was used to confirm that the starting amount of cDNA was reproducible in all PCR quantifications. Quantification of specific stress gene mRNA (reverse-transcribed to cDNA) was performed using the Delta Ct method:  $gene\ of\ interest\ normalized\ mRNA\ level = 2^{[Ct_{ref} - Ct_{gene\ of\ interest}]}$ .

This formula calculates the amount of mRNA of interest as its ratio to the amount of reference mRNA (actin or GAPDH).

#### Data processing: Statistical analysis

All statistical analyses including sample comparisons and curve fittings were performed using R software ([22], <http://www.R-project.org>). The Shapiro–Wilk test was used to check the normal distribution of data before using analysis of variance (ANOVA) to compare several samples. When the normality hypothesis was rejected, the Kruskal–Wallis test was used instead of ANOVA. The Gompertz model fit to oyster spat size changes over time and the dose–response curve fit to the growth rate versus zinc level data were performed using the function  $drm()$  of R library  $drc$  [23]. The bootstrap method estimation of the 95% confidence interval on the EC50 value provided by the dose–response curve fit was computed using the function  $nlsboot()$  of R library  $nlstools$  ([24], <http://www.R-project.org>).

## RESULTS

#### Chronic exposure to zinc

**Zinc measurements in seawater.** Table 1 shows the zinc concentrations expressed in  $\mu\text{M}$ , measured in seawater in all six batches. No significant difference was observed between the means of zinc concentrations measured before and after water renewal for each batch (Shapiro–Wilk test,  $p > 0.05$ ; one-way ANOVA test,  $p > 0.05$ ). Consequently, zinc concentrations in the medium were considered as constant throughout the experiment.

**Zinc measurements in oysters.** Figure 1 displays the zinc concentration changes over time in spats exposed to the increasing levels of zinc given in Table 1. Data are expressed in  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  dry weight in the whole spat. Triplicate determinations were performed for 25 samples, and the relative standard deviations ranged from 0.01 to 36.80%, with a mean value of 7.51% ( $n = 25$ ). The last values for zinc levels Z4 and Z5 were associated with a high mortality (see below) and should be

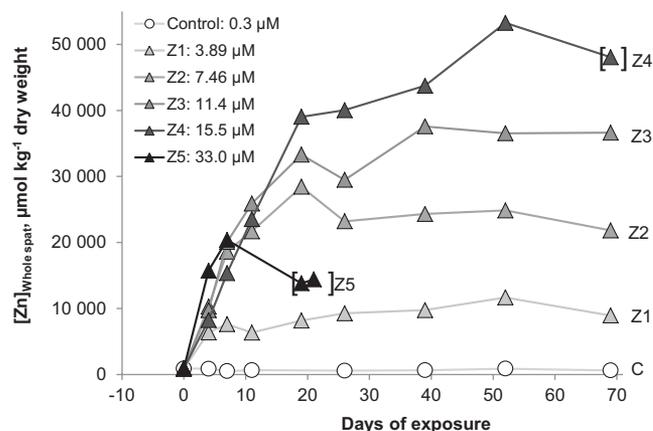


Fig. 1. Zinc concentrations measured in whole spats (soft parts and shell,  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  dry wt) exposed to increasing levels of seawater zinc concentrations. Data points in brackets correspond to samples with high mortality.

considered with caution. After 69 d of exposure, except for Z5, a ratio was calculated in triplicate between the zinc concentration in the spats and that in the seawater; the values were 2,022, 2,295, 2,924, 3,213, and 3,101  $\text{L kg}^{-1}$  dry weight for control, Z1, Z2, Z3, and Z4, respectively.

**Microalgae measurements in seawater.** The concentration of microalgae given to spats after each feeding was close to  $2.5 \times 10^6$  cells  $\text{ml}^{-1}$  in the spat culture tanks. Though cell concentration was not perfectly constant at each seawater renewal, all batches were fed exactly the same. Indeed, there was no significant difference between the average algal densities after feeding of the six zinc exposure batches (R software, one-way ANOVA test,  $p = 0.9995$ ; normality of residuals assumption was rejected using the Shapiro–Wilk test,  $p < 0.05$ ; Kruskal–Wallis test,  $p = 0.9978$ ). The minimal algal density occurring during all experiments before food refueling was  $0.445 \times 10^6$  cells  $\text{ml}^{-1}$ , which was above the minimal recommended density for oyster spat rearing,  $0.056 \times 10^6$  cells  $\text{ml}^{-1}$  [25,26].

#### Effects on survival and growth

Figure 2 shows the percentage of survival as a function of zinc concentration. To carry out the statistical analysis, mean and standard deviation values were calculated after splitting each different concentration batch data as the six small sieve replicate subsets. After confirmation of normal distribution of the data (Shapiro–Wilk test,  $p > 0.05$ ), one-way ANOVA ( $p$  values) was used to assess the statistical significance of the differences between zinc concentration batches. Compared with control ( $0.3 \mu\text{M}$ ), zinc concentrations of 3.89, 7.46, and  $11.44 \mu\text{M}$  induced no significant mortality until 53 d of exposure ( $p = 0.887$ ). Mortality occurred significantly after 6 d at  $33.0 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ), after 26 d at  $15.5 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ), and after 53 d at  $7.46 \mu\text{M}$  ( $p = 0.003$ ).

The day before the experiment began, the mean spat size was  $650 \mu\text{m}$  (Fig. 3). The highest growth rates were found in control

Table 1. Zinc concentrations (in  $\mu\text{M}$ ) in seawater in all six batches (mean  $\pm$  standard deviation;  $n = 14$ )

	Control	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5
Zinc concentration	$0.302 \pm 0.102$	$3.89 \pm 0.29$	$7.46 \pm 0.41$	$11.4 \pm 0.50$	$15.5 \pm 0.70$	$33.0 \pm 1.00$

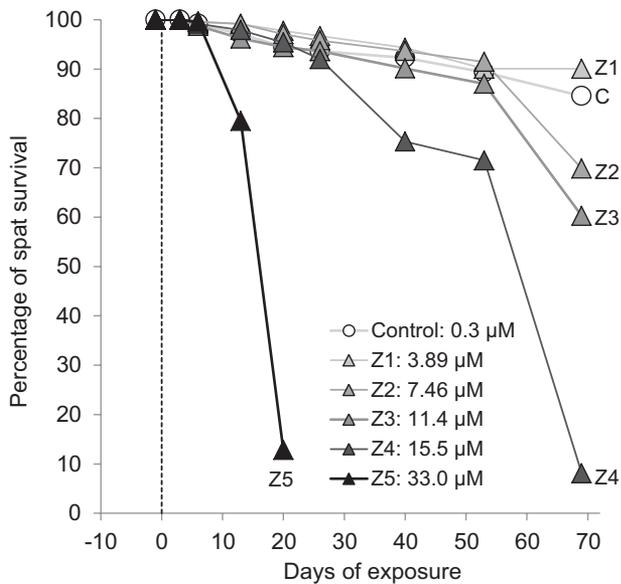


Fig. 2. Percentage of spat survival at six levels of seawater zinc concentration. At time zero of exposure (dashed line), spats were aged 2 d postmetamorphosis, and the population numbered 240 individuals.

cultures, with a final mean diameter of  $2,794 \pm 874 \mu\text{m}$  ( $n = 215$ ) 40 d after the experiment began. The lowest growth was in the batch with the highest zinc concentration (Z5; mean diameter  $722 \pm 49 \mu\text{m}$ ;  $n = 30$ ) after 20 d of exposure. In the Z5 spat cultures, mortality was 100% after day 20 of exposure. Intermediate batches were also affected—the higher the concentration of zinc, the slower the growth of the spats. The impact of zinc on the size of the spats was apparent as early as 3 d of exposure. The Gompertz growth curve model showed a sigmoid evolution of the size of spats in control and at Z1 and Z2 concentrations. For higher zinc concentrations, no clear inflexion was observed, and the data were roughly linear. The maximal growth rate observed for the control seawater batch was given by the slope of the Gompertz model fit 7 d after the experiment began. The value of this slope was

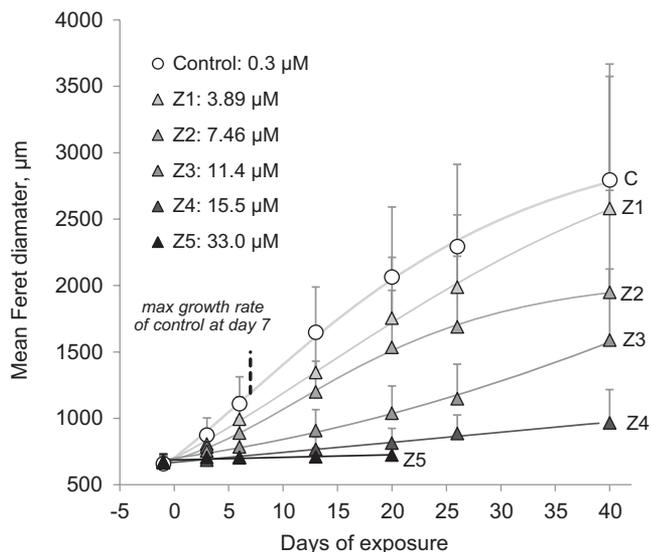


Fig. 3. Growth of spats at six seawater zinc concentrations. Values are mean Feret diameter and upper error bars account for the standard deviation. The solid lines correspond to the Gompertz model fit.

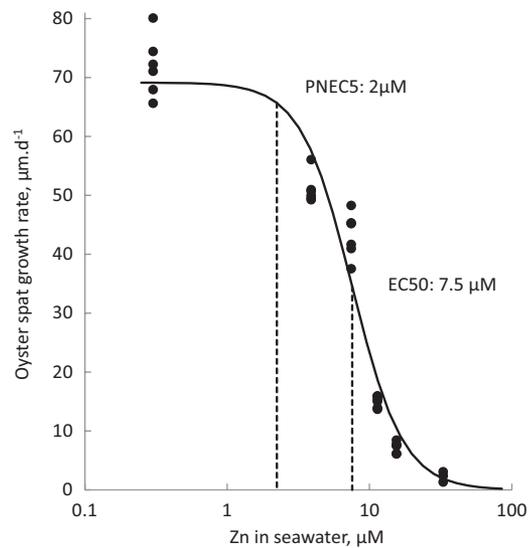


Fig. 4. Dose–response curve illustrating the chronic effect of seawater zinc concentrations on oyster spat growth. EC50 = median effective concentration; PNEC5 = fifth percentile of the predicted no effect concentration.

$71.9 \pm 5.1 \mu\text{m d}^{-1}$  (mean  $\pm$  standard deviation,  $n = 6$ ). This time of 7 d was also used to obtain the mean growth rate for other batches as the slope of the Gompertz model.

Figure 4 shows the growth rate data calculated for each batch at 7 d of exposure as a function of the concentration of zinc in the medium. The zinc concentration that reduced the growth rate to 50% (EC50) was derived from these data:  $7.55 \pm 0.42 \mu\text{M}$  (estimate  $\pm$  standard error,  $n = 6$  at each concentration). For the log–logistic model fit, the Shapiro–Wilk test and Normal QQ-Plot rejected the hypothesis of normality of the residuals, which challenged the statistical consistency of the standard error value. This was further investigated by using the bootstrap method implemented in R software, which yielded a 95% confidence interval for EC50 of 6.78 to 8.34.

#### Target gene transcriptional expression

Figure 5 shows the results for transcriptional expression of MT1 and MT2 in spats throughout the 69 d of exposure to increasing levels of zinc. Data were very similar when normalized to the two reference mRNAs used. Before the beginning of spat exposure to zinc, expression levels of the MT1 and MT2 genes were consistent with those of adult oysters in laboratory control conditions [18] as well as in the natural environment [21]. Metallothionein expression in control spats remained stable throughout the experiment (in the ranges of 0.1–1.9 and 0.3–8.0), when normalized to actin and GAPDH, respectively. In spats exposed to Z1, Z2, and Z3 concentrations, MT1 and MT2 levels were in the same range as those measured in control throughout the experiment period. From 0 to 39 d of exposure, the same mRNA level was measured in spats exposed to the Z4 concentration, but it increased after 52 d of exposure to reach a value 5 (actin) or 10 (GAPDH) times higher than control. The same observation was made for spats exposed to the highest concentration (Z5). After 11 d of exposure, the mRNA level began to increase and reached a level 50 times higher than control after 26 d of exposure.

The transcriptional expression levels of all other stress genes investigated (hsp70, hsp72, hsp90, SOD, GST, P450, MDR, p53) normalized to actin or GAPDH showed no clear response

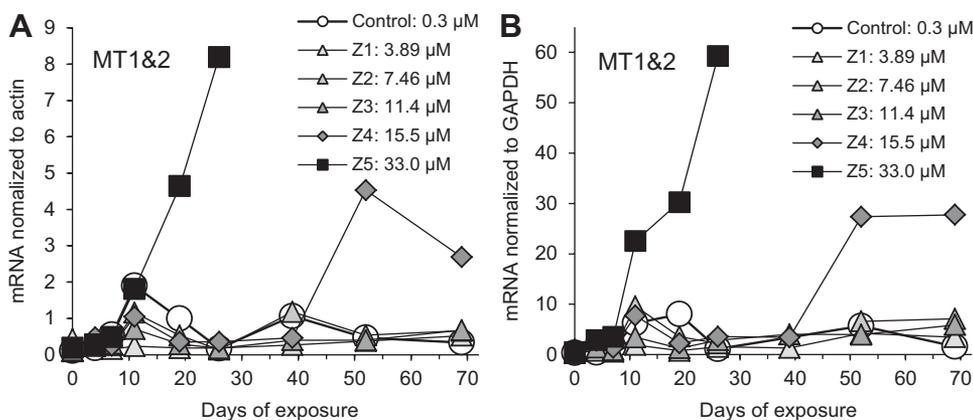


Fig. 5. Transcriptional expression levels of genes encoding for metallothionein (MT1 and MT2) in response to chronic exposure to increasing concentrations of seawater zinc. Data normalized to actin (A) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (B) as reference mRNAs.

related to oyster spat exposure to zinc in the present study. Compared with control, no pattern of difference was observed with respect to zinc levels or time of exposure (data not shown).

#### DISCUSSION

The concentration of zinc in open ocean surface water is usually below  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  [7,27]. Coastal seawater is influenced by many processes, including human activities, in particular the use of antifouling paints and sacrificial anodes, which can raise zinc concentrations substantially, especially in the vicinity of harbors [3]. In the North Cotentin (Normandy, France), values recently observed were in the range of 3 to  $12 \mu\text{g L}^{-1}$  [28], and in the present study we report a value of  $21 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $0.3 \mu\text{M}$ ). The control zinc concentration used in our experiment was higher than the usual open ocean level but was consistent with the levels encountered in coastal waters influenced by human activities. The fifth percentile of the predicted no-effect concentration derived from our dose-response curve ( $2 \mu\text{M}$ ) is much higher than in our control cultures.

The aim of the present laboratory study was to carry out our exposure experiment on a long-term basis. When added to seawater as  $\text{ZnCl}_2$ , zinc was expected to dissolve as the  $\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})^{2+}$  ion but also to form complexes with organic and inorganic ligands [29,30]. Monitoring of total zinc seawater concentration in all six batches up to day 38 provided evidence that it was constant and that the incorporation by oyster spats did not result in significant seawater depletion. Because the zinc content of spats was stable after day 38, there was no reason to suspect any further change in seawater zinc concentration. Because zinc chemical speciation in seawater and incorporation pathways in oysters are complex and numerous [31], it was important to check zinc content in the spats. In particular, seawater and feeding were two potential routes contributing to zinc uptake. However, the size of the young spats did not allow the soft parts to be isolated accurately from the shell for zinc measurements by F-AAS, and the values given are for the whole spat. The kinetics of whole spat incorporation of zinc provided the following information. Zinc rapidly increased with respect to the seawater zinc gradient and seemed to level off after three weeks. However, spats exposed to  $33.0 \mu\text{M}$  of zinc (the Z5 batch) rapidly deviated from this pattern as high mortality occurred. The most likely explanation is the increasing proportion of dead animals (Fig. 2), which resulted in an underestimation of zinc incorporation (Fig. 1, data points

surrounded by brackets) because of a reduction in the soft parts/shell ratio of whole spat material. However, this bias also provided an indication that the contribution of the soft parts was not masked by the contribution of the shell. The high mortality observed in spats exposed to  $15.5 \mu\text{M}$  (Z4 batch) after 10 weeks (Fig. 2) resulted in the same bias, with a decline in the zinc content. After discarding high-mortality cases (from Z4 and Z5 batches), it should be pointed out that the ratio of zinc data between spats and seawater at the end of exposure increased with respect to seawater from 2,022 to  $3,213 \text{ L kg}^{-1}$  dry weight. Although incorporation seemed to level off, this finding might indicate that a steady state had not yet been achieved. The partition between soft parts and shell interferes as well. Indeed, biological half-lives of zinc in adult oyster tissues are counted in years [6]. This assumption of a nonsteady state is also supported by the fact that bioaccumulation of zinc is usually in inverse relationship to medium concentration [32,33]. The zinc concentration ratio in mollusks from the literature (in  $\text{L kg}^{-1}$  wet wt) ranges up to  $10^5$  [34]. Moreover, organ distribution of zinc in mollusks is highly heterogeneous [8].

In addition to the need to renew the seawater frequently to prevent pollution by products of oyster metabolism, providing food was crucial for young spat growth. The diet, consisting of a mixture of *C. calcitrans* and *P. lutheri*, was provided by the hatchery to maintain a routine procedure in the laboratory. Cell density was monitored throughout the exposure experiment, and attention was paid to giving exactly the same microalgae concentration at each external medium renewal in all six zinc concentration batches. Moreover, cell density was kept above  $5.6 \times 10^4 \text{ cells ml}^{-1}$  [25,26] to ensure that the spats could feed ad libitum up to the next refueling.

Oyster spat growth showed high variability, as illustrated by the relative standard deviation values (normalized to the mean value) derived from large population samples (240 animals at the start), which increased as the animals grew, from approximately 8% at the age of 16 d (postfertilization) to approximately 30% at 58 d (postfertilization). The six small sieve replicates, hosting 40 spat subsamples each, provided statistical robustness despite this variability. The 240 individuals closely studied over the whole exposure time made it possible to derive consistent data on mortality and size distribution. Though a volume or mass parameter would have been ideal to account for growth, the digital image processing used to deal with the large number of samples provided the Feret diameter as well as the projected surface of the spat shells. The surface measurements

may have been relevant because of spat shell shape variations, but the results were similar to those derived from the Feret diameter and the latter was kept for presentation of the results. Growth was analyzed by fitting a Gompertz model to the Feret diameter versus time data from each small sieve replicate, and the growth rate values were derived as the slope of the Gompertz model. The maximal growth rate was given by the Gompertz model fit to the control batch dataset on day 7 of the experiment. This time of 7 d was used to derive the growth rate value as the slope of the Gompertz model fit for other exposure batches. Several arguments supported the rationale for this choice. First, the maximal growth rate was observed at day 7 for control spats maintained in natural local seawater, which was used as reference for this experiment. Second, after 7 d of exposure, no mortality occurred, even at the highest concentration. High mortality could have introduced a bias because survivors may have been selected by their particular resistance to zinc or a reduction in their capacity to incorporate zinc, which may be detrimental in a normal zinc level environment. In the latter case, the zinc concentration in the soft parts may not be correlated with the seawater level gradient, as in the other batches. The concentration in whole spats might not be representative of zinc incorporation in the soft parts, as discussed above. Third, at day 7 of exposure, whole spat zinc contents measured by F-AAS were roughly, though not perfectly, in relation to the seawater zinc level gradient; however, it should be noted that steady state had not yet been achieved, and the relative contributions of the shell and the soft compartments were likely to have different kinetics. Finally, because the growth rate values at this time of 7 d were used to compute the dose-response curve and the EC50 value, a sensitivity analysis was performed to estimate the influence of this time on the result. The data processing was repeated with different times for the growth rate values taken from day 2 to 22 of exposure, and the corresponding EC50 values varied from 6.0 to 9.7  $\mu\text{M}$ , respectively. This can be compared with the 95% confidence interval given above: 6.8 to 8.3  $\mu\text{M}$  for the EC50 obtained when we used day 7.

Though the dose-response curve illustrated zinc toxicity at high levels in terms of oyster spat growth, reducing zinc to zero would also inhibit growth and result in mortality. Because of this potential hormetic effect of zinc, we were careful not to back-extrapolate the curve below the lowest concentration we used in the present study.

In the present study, the EC50 for seawater zinc in terms of oyster growth was estimated at 7.6  $\mu\text{M}$  (497  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). For comparison, other studies have shown that zinc concentrations ranging from 0.76 to 3.06  $\mu\text{M}$  induced a gradual effect on the growth of the first stages of development of *C. gigas* larvae, as well as the number of developmental abnormalities and mortality; growth completely stopped at the highest concentration [2]. Watling [16] observed the growth of *C. gigas* larvae aged 6 d exposed to different zinc concentrations, and calculated an EC50 of 1.22  $\mu\text{M}$  (96 h) and a median lethal concentration of 1.53  $\mu\text{M}$  (96 h). These observations suggest that the premetamorphosis stages of development of the Japanese oyster are more sensitive to zinc than the young spats. Studies on adult oysters have usually addressed other biological parameters different from growth. For example, Mottin [28] exposed adult Japanese oysters for 10 weeks to a seawater zinc concentration of 8.11  $\mu\text{M}$  and observed no mortality, but a decrease in the number of hemocytes, an 85% increase in the production of reactive oxygen species, and an increase in the transcriptional expression level of genes encoding for metallothionein, multi-

xenobiotic resistance, and superoxide dismutase. Another study showed that adult oysters exposed to zinc concentrations ranging from 0.0153 to 1,529.1  $\mu\text{M}$  for 48 h exhibited a specific protein expression pattern at each concentration [35]. In the present study on oyster spats, target gene expression analysis gave no evidence for a dose-dependent effect between seawater zinc concentration and the transcriptional expression level of other stress genes studied except for metallothionein. Limitations in the amount of material did not allow replicates, but the RNA extracts corresponded to numerous pooled individuals. No standard error could be derived, and the results are only displayed graphically, with no statistical analysis. However, changes over time for control oyster spats in the present study, as well as previous published material obtained on adults of the same species and with the same PCR primers [18,21], provided a basis to estimate the variability of the signals. Genes encoding for metallothionein (MT1 and MT2) were expected to be stimulated in response to metal pollution [36,37]. However, an increase in MT1 and MT2 mRNA was only observed at the highest experimental seawater concentrations, 15.5 and 33.0  $\mu\text{M}$ , at 52 and 18 d of exposure, respectively. Other authors have reported that genes encoding for MT were overexpressed in gills of adults of *C. gigas* after exposure to zinc [38–41]. Protein increase in oysters after zinc exposure has also been demonstrated [4,5,11], including larvae [12]. Mottin [28] observed an increase in mRNA level encoding for MT after four weeks of exposure to 8.11  $\mu\text{M}$  of zinc; the maximal level reached a value 20 times higher than control after seven weeks of exposure. Marie et al. [39] reported a significant increase in MT protein concentration in *Corbicularia fluminea*, a freshwater bivalve, exposed for 24 d to 15.3  $\mu\text{M}$  zinc in water, whereas no significant MT variation was observed in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*, in terms of both protein and mRNA levels. In another study, Marie et al. [40] also reported no significant effect of a 15.3  $\mu\text{M}$  zinc concentration on young Japanese oysters aged one year. In the latter study, Zn (15.3  $\mu\text{M}$ ) appeared to have no effect on *CgMT1* and *CgMT2* gene expression levels after 14 d of exposure, whereas such levels increased sevenfold in the presence of cadmium (0.133  $\mu\text{M}$ ). The apparent delay and low sensitivity in the MT gene expression response in the present study is puzzling. The assumption that soft tissue uptake was lower than expected on the basis of whole spat (shell + soft parts) measurements is not enough to explain our results. In our laboratory-controlled conditions, seawater zinc was the only changing parameter among all batches, and zinc toxicity to oyster spat growth was clearly seawater concentration dependent. In addition, growth was already inhibited from the first increased zinc level, as soon as a few days after exposure began. It should be kept in mind that MT regulation in oysters exposed to metals occurs at the transcriptional and the translational levels [40].

## CONCLUSIONS

In the present study, we investigated the effect of chronic exposure to zinc in oyster spats. We measured in parallel the growth and the transcriptional level of stress genes. We expected the latter to be more sensitive as well as an earlier marker of effects than an integrated biological parameter such as growth. We cannot rule out the possibility that other stress genes or isoforms would have been more sensitive markers than those selected. However, MT1 and MT2 were relevant targets that had already proved to be overexpressed in oysters exposed to zinc. In the present study, MT expression increased only at

very high zinc levels, and this marker was not much more informative than mortality. Conversely, growth turned out to be affected as early as 3 d of exposure to the lowest increased zinc level (3.89  $\mu\text{M}$ ) compared with control. Image processing efficiently avoided the high variability in oyster spat growth and allowed robust statistical analysis of the results. Moreover, the technique was not destructive, which saved the biological material. To better understand the biological mechanisms involved in oysters' response to zinc exposure, molecular markers should be further investigated at biological levels intermediate between growth and gene expression (i.e., physiology, MT proteins, enzyme activities, genotoxicity, and others).

**Acknowledgement**—The present study was funded in part by the European Regional Development Fund, Interreg IVa (Grant 4059). We are much indebted to B. Diss from the Société Atlantique de Mariculture (SATMAR) hatchery and her colleagues, who kindly provided the young spats as well as the microalgae cultures to feed them. The professional consistency of SATMAR's constant high-quality biological material production was essential to carry out this long-term experiment.

## REFERENCES

- Duřanka M-D. 1970. Methodology of zinc determinations and the role of zinc in biochemical processes. In Oscar B, Stewart CP, eds, *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier, New York, NY, USA, pp 271–333.
- Brereton A, Lord H, Thornton I, Webb JS. 1973. Effect of zinc on growth and development of larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Biol* 19:96–101.
- Bird P, Comber SDW, Gardner MJ, Ravenscroft JE. 1996. Zinc inputs to coastal waters from sacrificial anodes. *Sci Total Environ* 181:257–264.
- Geffard A, Amiard-Triquet C, Amiard J-C, Mouneyrac C. 2001. Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of oysters (*Crassostrea gigas*) from a clean and a metal-rich site. *Biomarkers* 6:91–107.
- Geffard A, Amiard J-C, Amiard-Triquet C. 2002. Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker: Seasonal and intersite fluctuations. *Biomarkers* 7:123–137.
- Geffard A, Amiard J-C, Amiard-Triquet C. 2002. Kinetics of metal elimination in oysters from a contaminated estuary. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 131:281–293.
- Baudrimont M, Schäfer J, Marie V, Maury-Brachet R, Bossy C, Boudou A, Blanc G. 2005. Geochemical survey and metal bioaccumulation of three bivalve species (*Crassostrea gigas*, *Cerastoderma edule*, and *Ruditapes philippinarum*) in the Nord Médoc salt marshes (Gironde estuary, France). *Sci Total Environ* 337:265–280.
- Bustamante P, Miramand P. 2005. Subcellular and body distributions of 17 trace elements in the variegated scallop *Chlamys varia* from the French coast of the Bay of Biscay. *Sci Total Environ* 337:59–73.
- Caplat C, Mottin E, Lebel JM, Serpentine A, Barillier D, Mahaut ML. 2012. Impact of a sacrificial anode as assessed by zinc accumulation in different organs of the oyster *Crassostrea gigas*: Results from long- and short-term laboratory tests. *Arch Environ Contam Toxicol* 62:638–649.
- Burgeot T, His E, Galgani F. 1995. The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. *Mutat Res Genet Toxicol* 342:125–140.
- Geffard A, Geffard O, His E, Amiard J-C. 2002. Relationships between metal bioaccumulation and metallothionein levels in larvae of *Mytilus galloprovincialis* exposed to contaminated estuarine sediment elutriate. *Mar Ecol Prog Ser* 233:131–142.
- Geffard A, Geffard O, Amiard J-C, His E, Amiard-Triquet C. 2007. Bioaccumulation of metals in sediment elutriates and their effects on growth, condition index, and metallothionein contents in oyster larvae. *Arch Environ Contam Toxicol* 53:57–65.
- Johnson I, Harman M, Forrow D, Norris M. 2001. An assessment of the feasibility of using image analysis in the oyster embryo-larval development test. *Environ Toxicol* 16:68–77.
- Quiniou F, Damiens G, Gnassia-Barelli M, Geffard A, Mouneyrac C, Budzinski H, Romeo M. 2007. Marine water quality assessment using transplanted oyster larvae. *Environ Int* 33:27–33.
- Roesijadi G, Hansen KM, Unger ME. 1997. Concentration-response relationships for Cd, Cu, and Zn and metallothionein mRNA induction in larvae of *Crassostrea virginica*. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 118:267–270.
- Watling HR. 1982. Comparative study of the effects of zinc, cadmium and copper on the larval growth of three oyster species. *Bull Environ Contam Toxicol* 28:195–201.
- Watling HR. 1983. Comparative study of the effects of metals on the settlement of *Crassostrea gigas*. *Bull Environ Contam Toxicol* 31:344–351.
- Farcy E, Voiseux C, Robbes I, Lebel J-M, Fiévet B. 2011. Effect of ionizing radiation on the transcription levels of cell stress marker genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Radiat Res* 176:38–48.
- Rasband WS. 1997–2011. *Image J*. U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.
- Winsor CP. 1932. The Gompertz curve as a growth curve. *P Natl Acad Sci USA* 18:1–8.
- Farcy E, Voiseux C, Lebel J-M, Fievet B. 2007. Seasonal changes in mRNA encoding for cell stress markers in the oyster *Crassostrea gigas* exposed to radioactive discharges in their natural environment. *Sci Total Environ* 374:328–341.
- R Development Core Team. 2009. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ritz C, Streibig JC. 2005. Bioassay analysis using R. *J Stat Softw* 12:1–22.
- Baty F, Delignette-Muller ML. 2011. nlstools: tools for nonlinear regression diagnostics. The R Project for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Helm MM, Bourne N, Lovatelli A. 2006. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. FAO Fisheries Technical Paper 471. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy, p 184.
- Robert R, Gérard A. 1999. Bivalve hatchery technology: The current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquat Living Resources* 12:121–130.
- Brügmann L, Danielsson LG, Magnusson B, Westerlund S. 1983. Intercomparison of different methods for the determination of trace metals in seawater. *Mar Chem* 13:327–339.
- Mottin E. 2010. Incidence de la dégradation des anodes sacrificielles en zinc chez deux mollusques, l'huître creuse *Crassostrea gigas* et l'ormeau *Haliotis tuberculata*: Approches in vivo et in vitro. PhD thesis. University of Caen-Basse-Normandie, France (in French).
- Ellwood MJ, Van Den Berg CMG. 2000. Zinc speciation in the Northeastern Atlantic Ocean. *Mar Chem* 68:295–306.
- Moore JW, Ramamoorthy S. 1984. *Organic Chemicals in Natural Waters: Applied Monitoring and Impact Assessment*. Springer-Verlag, New York, NY, USA, pp 168–191.
- Rainbow PS, Luoma SN. 2011. Metal toxicity, uptake and bioaccumulation in aquatic invertebrates—Modeling zinc in crustaceans. *Aquat Toxicol* 105:455–465.
- McGeer JC, Brix KV, Skeaff JM, Deforest DK, Brigham SI, Adams WJ, Green A. 2003. Inverse relationship between bioconcentration factor and exposure concentration for metals: Implications for hazard assessment of metals in the aquatic environment. *Environ Toxicol Chem* 22:1017–1037.
- DeForest DK, Brix KV, Adams WJ. 2007. Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. *Aquat Toxicol* 84:236–246.
- Ancellin J, Guéguénat P, Germain P. 1979. *Radioécologie Marine*. Eyrolles, Paris, France.
- Meiller JC, Bradley BP. 2002. Zinc concentration effect at the organismal, cellular and subcellular levels in the eastern oyster. *Mar Environ Res* 54:401–404.
- Kägi JHR. 1991. Overview of metallothionein. *Methods Enzymol* 205:613–626.
- Vasseur P, Cossu-Leguille C. 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environ Int* 28:711–717.
- Bourdineaud J-P, Baudrimont M, Gonzalez P, Moreau J-L. 2006. Challenging the model for induction of metallothionein gene expression. *Biochimie* 88:1787–1792.
- Marie V, Gonzalez P, Baudrimont M, Bourdineaud J-P, Boudou A. 2006. Metallothionein response to cadmium and zinc exposures compared in two freshwater bivalves, *Dreissena polymorpha* and *Corbicula fluminea*. *BioMetals* 19:399–407.
- Marie V, Gonzalez P, Baudrimont M, Boutet I, Moraga D, Bourdineaud J-P, Boudou A. 2006b. Metallothionein gene expression and protein









## Résumé

---

Exposition chronique des stades précoces de développement de l'huître japonaise aux contaminants industriels en manche.  
Marqueurs de stress à des niveaux intégrés et moléculaires.

Ce travail de thèse porte sur les effets chroniques de contaminants industriels en mer de la Manche, dont les radionucléides, sur les stades précoces de développement de l'huître japonaise *Crassostrea gigas*. La conception de dispositifs expérimentaux originaux a permis d'étudier en laboratoire la croissance d'un grand nombre de larves et de naissains. L'accent a été mis sur l'utilisation conjointe des marqueurs de stress à des niveaux intégrés et moléculaires. Les premières expositions à des contaminants non radioactifs ont mis en évidence une réponse sensible et précoce de la croissance des juvéniles vis-à-vis d'un métal (zinc). Par la suite, les juvéniles ont été exposés plusieurs semaines à des débits de doses de rayonnements ionisants et des activités en radionucléide supérieures de plusieurs ordres de grandeur aux niveaux susceptibles d'être rencontrés dans l'environnement marin. Une approche éco-génotoxicologique a permis d'apporter des éléments de réponse quant aux effets des rayonnements ionisants sur l'ADN. Les résultats suggèrent fortement que des mécanismes biochimiques agissent efficacement contre les dommages radio-induits dès les premiers jours de vie de l'huître japonaise. Il reste encore des interrogations quant aux effets à long terme des dommages à l'ADN sur les niveaux d'organisation biologique supérieurs.

**Mots-clés :** rayonnements ionisants, marqueurs biologiques, *Crassostrea gigas*, écotoxicologie.

## Abstract

---

Chronic Exposure of Early Stages of Development of Japanese Oyster to Contaminants from the Industry in the English Channel.  
Stress Markers at Integrated and Molecular Level.

This thesis explores the effects of pollutants from the industry in the English Channel, in particular radionuclides, on the early stages of development of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. Original experimental devices were designed to study in laboratory controlled conditions the growth of a large number of larvae and spats. Emphasis was given to a joint use of stress markers at integrated and molecular levels. First exposures to non-radioactive pollutants revealed a highly sensitive response of the growth of juveniles exposed to a metal (zinc). Thereafter, juveniles were exposed for several weeks to dose rates of ionizing radiation and radionuclide activities several orders of magnitude higher than the levels likely to be encountered in the marine environment. An eco-genotoxicological approach contributed to the understanding of the effects of ionizing radiations on DNA. The results strongly suggest that biochemical mechanisms act efficiently against radio-induced damages as early as the first days of life of the Japanese oyster. It still remains a lack of information about the long-term effects of DNA damages to higher level of biological organization.

**Keywords:** ionizing radiation, biological markers, *Crassostrea gigas*, ecotoxicology.