



HAL
open science

Évaluation des effets biologiques des contaminants chimiques sur les juvéniles de poissons marins : approche multibiomarqueur en conditions expérimentales et in situ

Élodie Kerambrun

► **To cite this version:**

Élodie Kerambrun. Évaluation des effets biologiques des contaminants chimiques sur les juvéniles de poissons marins : approche multibiomarqueur en conditions expérimentales et in situ. Sciences agricoles. Université du Littoral Côte d'Opale, 2011. Français. NNT : 2011DUNK0317 . tel-00841588

HAL Id: tel-00841588

<https://theses.hal.science/tel-00841588v1>

Submitted on 5 Jul 2013

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

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

UNIVERSITE DU LITTORAL COTE D'OPALE

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DU LITTORAL COTE D'OPALE

Discipline : Géosciences, Ecologie, Paléontologie, Océanographie

**Evaluation des effets biologiques des
contaminants chimiques sur les juvéniles de
poisson marin : approche multibiomarqueur en
conditions expérimentale et *in situ***

Présentée et soutenue publiquement

par

Elodie KERAMBRUN

Le 21 novembre 2011

Devant le jury composé de :

M. Christophe Minier (Pr, Université du Havre) : rapporteur
Mme Helène Thomas Guyon (MC, HDR, Université de la Rochelle) : rapporteur
Mme Farida Akcha (Chargée de recherche, IFREMER, Nantes) : examinateur
M. Jean La Roche (Pr, Université de Bretagne Occidentale) : examinateur
M. Patrice Francour (Pr, Université de Nice) : examinateur
M. Rachid Amara (Pr, Université du Littoral) : directeur de thèse
Mme Françoise Henry (MC, Université du Littoral) : co-encadrant de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail. Je remercie notamment le Dr. Hélène Thomas-Guyon et le Pr. Christophe Minier qui se sont montrés disponibles pour rapporter cette étude. Merci également aux Dr Farida Akcha, Pr. Jean La Roche et Pr. Patrice Francour qui ont accepté d'examiner ce travail.

Mes plus sincères remerciements vont ensuite à mon directeur de thèse, Mr. Rachid Amara, qui m'a permis de réaliser ce travail et qui m'a soutenue pendant ces 3 années. Il a su me guider et me faire partager ses connaissances de la phase expérimentale à la phase rédactionnelle. Il a toujours été à l'écoute de mes nombreuses interrogations et je le remercie vraiment pour tout !

Je suis également infiniment reconnaissante envers ma co-encadrante de thèse, Mme Françoise Henry, qui m'a été d'un très grand soutien tout au long de mon travail de thèse. Toutes nos longues discussions sur les démarches analytiques et les tournures à prendre sur les publications et la rédaction du manuscrit m'ont vraiment été très bénéfiques. J'ai toujours pu compter sur elle et je la remercie énormément pour son investissement dans mon travail !

Je remercie ensuite Mr Wilfried Sanchez d'INERIS. Sa collaboration dans mon travail de thèse a été indispensable. Je lui suis reconnaissante de m'avoir appris ses techniques de dosage et d'avoir ensuite contribué à la rédaction de mes publications. Ses conseils m'ont été d'une aide précieuse.

Je suis également reconnaissante envers Mme Hélène Thomas-Guyon de l'Université de La Rochelle qui m'a fait participer au Projet DISCOBIOL. Je remercie ainsi le directeur de ce projet, Mr. François Xavier Merlin, pour m'avoir permis de m'intégrer dans leurs expériences. Mes sincères remerciements vont également à Mr. Stéphane Le Floch qui m'a encadré de façon si chaleureuse au CEDRE à Brest avec toute sa gentillesse, sa disponibilité et son attitude très positive au cours de mes différents passages. Je remercie également Rami Kanan pour m'avoir guidé tout au long de mes analyses au CEDRE ainsi que Thomas Milinkovitch. J'ai aussi eu l'aide précieuse de ma chère collègue bretonne, Morgane Danion.

Je remercie ensuite toute l'équipe du LEMA de l'Université du Havre avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer. Je remercie tout d'abord Mr. Christophe Minier pour m'avoir

accueilli aussi chaleureusement dans son laboratoire et pour son soutien lors des congrès scientifiques. Je remercie ensuite Melle Amandine Maréchal qui a apporté son point de vue « immunologique » dans ma thèse. Je remercie également Melle Frauke Seeman avec qui nous avons partagé de longues journées de dissections mais aussi ce fameux congrès à Long Beach.

Un très grand merci à Mme Lucie Courcot pour sa participation aux dosages chimiques et pour tout ce qu'elle m'a apportée par ses conseils scientifiques très judicieux et son soutien tellement amical. Je reconnais également les qualités d'adjoint technique indispensables (« incontournables et irremplaçables») de Mr. Vincent Cornille qui s'est toujours montré très disponible lors de mes expériences et de façon si plaisante. Je remercie également Mr. Michel Lareal pour sa disponibilité et son aide pratique notamment lors des constructions des cages de poissons.

Mes remerciements vont aussi à Isil Filipuci pour sa collaboration dans les expériences et analyses et les bons moments passés ensemble en début de thèse. Je remercie également Prescilla Perrichon qui a contribué à mon travail de thèse par son stage de master 2. Elle a été d'une motivation et d'une efficacité surprenante ! Merci à Oliver Bodéré et Khalef Rhabi pour leur participation à mes analyses. Merci de m'avoir soulagée de tous ses dosages pendant ma phase de rédaction! Merci également à Estelle Floc'h et Virginie Maes pour leur participation.

Je remercie très sincèrement toutes les personnes qui ont contribué à ce travail: Mr. Tarik Meziane du MNHN, Mr. Nicolas Spilmont, Mr. François Gevaert, Mr. Jonathan Selleslagh, Mr. Sandric Le Sourd, Mr. Lionel Denis du LOG, Mr. Grégory Germain d'IFREMER et Mr. Michael Theron de l'UBO.

Mes remerciements vont également au Centre Commun de Mesure de Dunkerque et en particulier Dorothee Dewaele qui m'ont permis de réaliser mes dosages de métaux dans les poissons. Je remercie également Mr. Bagdad Ouddane et Mr. Gabriel Billon du laboratoire FRE 3928 GEOSYSTEME à Lille pour nous avoir mis à disposition leur appareil pour les dosages chimiques.

Je suis également très reconnaissante envers Mr. Felipe Artigas, Mr. Jean Michel Brylinski, Melle Dorothee Vincent, Mr. Jean-David Gratteplanche et Melle Natacha Guisselin pour leurs aides et conseils précieux lors de mes activités d'enseignement.

Je remercie ensuite toute l'équipe de la MREN. Leurs bonnes humeurs ont fait de ces trois années un moment inoubliable ! Merci à mes compatriotes thésards et autre : Erwan, Nico, Zied, Thomas, Swann, Charles, Clémence, Christina, Alice pour votre soutien amical !! Merci également aux thésards mariniens (et ifremeriens): Juliette, Eric, Céline, Armonie, Mikael, Olivier, Sophie, Stella, Pierre, Sylvain, Benjamin, Gaspard, Moana, Antoine, Maud...

Je remercie évidemment mes précieux amis d'ailleurs. De nouveau ma chère amie Morgane avec qui je partage le chemin de la recherche depuis le début et que j'espère de tout cœur continuer (Danion et Kerambrun, 20xx ?!)... Merci à Mélissande, Micha, Fanny et Maxime ! Merci à Valérie, Charlotte, Mathilde, Jeanne-Marie et Nolwenn ! Vos présences malgré la distance m'ont continuellement ressourcée !

Je remercie finalement de tout mon cœur mes parents pour leur soutien démesuré et aveugle depuis que j'ai quitté le cocon familial pour les études il y a déjà 8 ans! Mes remerciements les plus chères vont également à ma grande sœur chérie et mon beau-frère qui m'ont toujours encouragée et qui sont venus si souvent me ressourcée dans le ch'Nord ! Merci infiniment pour tous ce que vous faites pour moi !!!

« Les hommes se plaisent à penser qu'ils peuvent se débrouiller seuls, mais l'homme, le vrai, sait que rien ne vaut le soutien et les encouragements d'une bonne équipe »

Tim Allen

Les travaux issus de cette étude ont été réalisés dans le cadre du programme européen INTERREG IV A (DIESE : Détermination d'Indicateurs Environnementaux pertinents : une Stratégie pour l'Europe) et du programme national 189 post-grenelle de l'INERIS (DEVIL : Development and validation of fish biomarkers for the implementation of environmental legislation).

Table des matières

<i>Liste des abréviations</i>	<i>1</i>
<i>Valorisation des travaux</i>	<i>4</i>
Chapitre I : Introduction générale	8
1. Dégradation des zones côtières et estuariennes	8
1.1 Importance écologique des milieux littoraux	8
1.2 Perturbations des milieux littoraux	9
2. Pollution de l'environnement littoral	10
2.1 Types de pollution chimique	11
2.2 Types de polluants chimiques	13
3. Surveillance des zones littorales	15
3.1 Biosurveillance	15
3.2 Modèles biologiques	17
3.3 Méthodes d'étude	19
3.4 Les biomarqueurs	22
4. Mesure des effets des polluants chez le poisson	26
4.1 De la molécule à la cellule	26
4.2 De l'individu aux populations	28
4.3 Sensibilité vs pertinence écologique	31
5. Utilisation simultanée de biomarqueurs chimiques, moléculaires et physiologiques	33
5.1 Bioconcentration des métaux et HAPs.....	33
5.2 Les biomarqueurs moléculaires.....	35
5.3 Paramètres physiologiques : croissance et indices de condition	39
6. Objectifs et organisation de la thèse	42

Chapitre II : Matériel et Méthodes 46

1. Expériences réalisées.....	46
1.1 Démarche expérimentale.....	46
1.2 Espèces cibles.....	47
1.3 Simulation d'un déversement pétrolier sur des juvéniles de bar : analyse en conditions contrôlées.....	50
1.4 Effets d'une pollution multiple de contaminants chimiques sur des juvéniles de bar et de turbot : analyses en conditions contrôlées et semi-contrôlées.....	52
1.5 Effets des contaminants chimiques sur l'état de santé de juvéniles de flet : analyse in situ.....	59
1.6 Synthèse des expériences et analyses effectuées.....	63
2. Analyses physico-chimiques	65
2.1 Paramètres hydrologiques et sédimentaires	65
2.2 Dosage des hydrocarbures dans la colonne d'eau.....	67
2.3 Analyse des contaminants chimiques dans les sédiments.....	69
3. Analyses des contaminants chimiques dans les poissons	74
3.1 Dosage des HAPs dans les chairs de poissons	74
3.2 Estimation des métabolites biliaires d'HAPs.....	75
3.3 Dosage des métaux dans les branchies et foies de poissons	76
4. Analyses des paramètres biologiques	80
4.1 Biomarqueurs moléculaires hépatiques.....	80
4.2 Indices de croissance.....	81
4.3 Indices de condition	85
4.4 Anomalies pathologiques et histologiques.....	89

Chapitre III : Simulation des effets d'un déversement pétrolier sur des juvéniles de bar : analyse en conditions contrôlées..... 94

1. Réponses de biomarqueurs moléculaires et d'indices de croissance et de condition mesurées sur des juvéniles de bar, <i>Dicentrarchus labrax</i>, exposés à du pétrole⁹⁴	
Résumé :.....	94
Responses of molecular biomarkers, growth and condition indices measured on juvenile sea bass, <i>Dicentrarchus labrax</i> , exposed to an acute crude oil.....	96

2.	Expérience complémentaire : utilisation d'un dispersant chimique	119
----	--	-----

Chapitre IV : Effets d'une pollution multiple de contaminants chimiques sur des juvéniles de bar et de turbot: analyses en conditions contrôlée et semi-contrôlée..... 124

Partie 1 : Expérience préliminaire : exposition de juvéniles de bar à des sédiments contaminés pendant 48 h	125
--	------------

Partie 2 : Exposition par « caging » de juvéniles de bar et de turbot dans un milieu portuaire.....	128
--	------------

2.1. Réponses biologiques de juvéniles de bar (<i>Dicentrarchus labrax</i>) et de turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>) dans un port pollué	129
---	------------

Résumé	129
--------------	-----

Biological responses of caged juvenile sea bass (<i>Dicentrarchus labrax</i>) and turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>) in a polluted harbour	133
--	-----

2.2. Les réponses des biomarqueurs moléculaires reflètent-elles la performance physiologique des juvéniles de bar et de turbot mis en cage dans un port pollué ?155	
--	--

Résumé	155
--------------	-----

Are biochemical biomarker responses related to physiological performance of juvenile sea bass (<i>Dicentrarchus labrax</i>) and turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>) caged in a harbour polluted area?	155
--	-----

Partie 3 : Exposition de juvéniles de turbot à des sédiments portuaires et estuariens en condition de laboratoire	155
--	------------

3.1. Croissance et indices de condition de juvéniles de turbot, <i>Scophthalmus maximus</i>, exposés à des sédiments contaminés : effets de composés métalliques et organiques	155
---	------------

Résumé	155
--------------	-----

Growth and condition indices of juvenile turbot, <i>Scophthalmus maximus</i> , exposed to contaminated sediments: effects of metallic and organic compounds.	155
---	-----

3.2. Une approche multibiomarqueur pour évaluer les effets délétères de sédiments contaminés sur des juvéniles de turbot, <i>Scophthalmus maximus</i>.....	155
---	------------

Résumé	155
--------------	-----

A multibiomarker approach in juvenile turbot, <i>Scophthalmus maximus</i> , exposed to contaminated sediments	155
---	-----

<i>Chapitre V : Effets des contaminants chimiques sur l'état de santé de juvéniles de flet : analyse in situ</i>	155
Résumé	155
Metal bioconcentrations and condition indices in juvenile European flounder, <i>Platichthys flesus</i> , from French and Belgium estuaries.	155
<i>Chapitre VI : Discussion générale</i>	155
1. Méthodes d'étude	155
1.1 Intérêt des juvéniles de poissons	155
1.2 Faisabilité du caging sur les juvéniles de poissons.	155
1.3 Expériences en laboratoire	155
1.4 Méthode in situ	155
2. Sensibilité et pertinence des paramètres utilisés	155
2.1 Analyses chimiques	155
2.2 Biomarqueurs moléculaires	155
2.3 Biomarqueurs physiologiques	155
<i>Conclusion générale</i>	155
<i>Perspectives</i>	155
<i>Références bibliographiques</i>	155
<i>Liste des Figures</i>	155
<i>Liste des Tableaux</i>	155
<i>Annexes</i>	342

Liste des abréviations

ABC : Abundance Biomass Comparison

AChE : AcétylCHoline Estérase

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ANOVA : Analyse de Variance

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomal

ARNt : ARN de transfert

BChE : ButyrylCHoline Estérase

BET : Bromure d'ETHidium

CAT : Catalase

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CEDRE : CEntre de Documentation, de Recherche et d'Expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux

CERT : CERTifié

CNRS : Centre National de Recherche Scientifique

COT : Carbone Organique Total (TOC)

CTRL : ConTRol

CYP450 : CYtochrome P450

DC : Dispersion Chimique

DCE : Directive Cadre sur l'Eau

DDT : DichloroDiphénylTrichloroéthane

DEVIL : DEvelopment and Validation of fish biomarkers for the Implementation of environmental Legislation

DIESE : Détermination d'Indicateurs Environnementaux pertinents : une Stratégie pour l'Europe

DISCOBIOL : DISpersant et techniques de lutte en milieu COTier : effets BIOLogiques et apport à la réglementation

DM : Dispersion Mécanique

DS : Dispersant Seul

EF : Facteur d'Enrichissement
EPA : Environmental Protection Agency
ERF : Ethoxyrésorufine
ERL : Effect Range Low
ERM : Effect Range Medium
EROD : Ethoxyresorufin-O-deethylase
FA : Fluctuation Asymmetry
FF : Fixed Wavelength
GESAMP : Joint Group of Experts on Scientific Aspects of Marine Pollution
GC-MS : Gaz Chromatography-Mass Spectrometry
GL : Growth in Length
GPX : Glutathion PeroXidase
GST : Glutathion-S-Transférase
GW : Growth in Weight
HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique (PAH)
HSP : Heat-Shock Proteins
IAEA : International Atomic Energy Agency
IBI : Index d'Intégrité Biologique
ICP-AES : Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy
ICP-MS : Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry
IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
INERIS : Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
K : Indice de condition de Fulton
L : Left
MEEDDM : Ministère de l'Ecologie de l'Energie et du Développement Durable et de la Mer
MES : MESuré
MMC : MelanoMacrophage Center
MOT : Matière Organique Totale (TOM)
MT : MétalloThionéines
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide PHosphate
NOT : Azote Organique Total (TON)
NRCC : Natioanl Research Council of Canada
OSPAR : OSlo and PARis conventions for the protection of the marine environment of the north-east atlantic

PCB : PolyChloroBiphényle
PDMS : PolyDiméthylSiloxane
PE : Perturbateurs Endocriniens
PMSF : PhénylMéthylSulfonideFluorure
POLMAR : POLLution MARitime
POP : Polluants Organiques Persistants
R : Right
REF : REFérence
RG : Recent Growth
RNO : Réseau National d'Observation
ROS : Reactive Oxygen Species
SBSE : Stir Bar Sorptive Extraction
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
SOD : Superoxyde Dismutase
SPE : Solid Phase Extraction
ST : STérol
TAG : TriAcylGlycérol
TGFb : Transforming Growth Factor-beta
TNPC : Traitement Numérique des Pièces Calcifiées
TOSC : Total Oxidant Scavenging Capacity
TPH : Total Petroleum Hydrocarbon
TRIS : TRIShydroxyméthylaminométhane

Valorisation des travaux

Publications scientifiques :

- Kerambrun, E., Sanchez, W., Henry, H., Amara, R., 2011.** Are biochemical biomarker responses related to physiological performance of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) caged in a polluted harbour. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology* 154, 187-195.
- Kerambrun, E., Henry F., Courcot, L., Gevaert, F. and Amara R., 2012.** Biological responses of caged juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) in a polluted harbour. *Ecological Indicators* (Sous presse).
- Kerambrun, E., F. Henry, P. Perrichon, L. Courcot, T. Meziane, N. Spilmont and R. Amara, 2012.** Growth and condition indices of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, exposed to contaminated sediments: effects of metallic and organic compounds. *Aquatic Toxicology* 108, 130-140.
- Kerambrun, E., P. Perrichon, F. Henry, L. Courcot et R. Amara, 2012.** Effets de sédiments contaminés sur les performances physiologiques de juvéniles de turbot, *Scophthalmus maximus*. F.G. Schmitt (ed.) *_Actes du 26e Forume des Jeunes Océanographes_*, Paris: UOF Editions, 2012.
- Kerambrun, E., S. Le Floch, H. Thomas-guyon, T. Meziane, F. Henry and R. Amara, 2012.** Responses of juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*, exposed to acute concentrations of crude oil, as assessed by molecular and physiological biomarkers. *Chemosphère* (Sous presse).
- Kerambrun, E, F. Henry, A. Maréchal A., W. Sanchez, C. Minier, I. Filipuci and R. Amara.** A multibiomarker approach in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, exposed to contaminated sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (Sous presse).
- Kerambrun, E., F. Henry, V. Cornille, L. Courcot and R. Amara.** Metal bioconcentrations and condition indices in European flounder, *Platichthys flesus*, from French and Belgium estuaries (En préparation).

Communications orales :

- Kerambrun, E., P. Perrichon, F. Henry, W. Sanchez, L. Courcot and R. Amara.** Growth, condition indices and biomarker responses of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*,

exposed to contaminated sediment. 16th International Symposium on Pollution Responses in Marine Organisms PRIMO16, 15-18 May 2011, Long Beach, California, USA.

Kerambrun, E., P. Perrichon, F. Henry, W. Sanchez, et R. Amara. Influence de sédiments contaminés sur les performances physiologiques et les réponses de biomarqueurs de juvéniles de turbot *Scophthalmus maximus*. 26^e Forum des jeunes océanographes, 30 septembre et 1^{er} octobre 2010, Wimereux, France (3^eme prix du jury).

Kerambrun, E., F. Henry, W. Sanchez, F. Gevaert, N. Spilmont and R. Amara. Physiological performance of caged juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) in a contaminated area. 47th Estuarine et Coastal Sciences ECSA 47, 14-19 September 2010, Figueira Da Foz, Portugal.

Kerambrun, E., S. Le Floch, H. Thomas-Guyon, W. Sanchez et R. Amara. Etude des relations entre les réponses de biomarqueurs et les performances physiologiques de juvéniles de bar commun, *Dicentrarchus labrax* exposés à une contamination au pétrole. 25^e Forum des jeunes océanographes, 28-29 octobre 2009, La Rochelle, France.

Communications par affiche :

Kerambrun, E., P. Perrichon, F. Henry, R. Amara. Influence de sédiments contaminés sur les performances physiologiques de juvéniles de turbot, *Psetta maxima*. Journée des Doctorants IRePSE 2011, 18 Janvier 2011, Villeneuve d'Ascq, France (3^eme prix du jury).

Perrichon, P., E. **Kerambrun**, F. Henry, W. Sanchez and R. Amara. Effects of contaminated sediments on physiological performance and biomarker responses in juvenile turbot *Scophthalmus maximus*. 47th Estuarine et Coastal Sciences ECSA 47, 14-19 September 2010, Figueira Da Foz, Portugal.

Kerambrun, E., I. Filipuci, W. Sanchez, F. Henry, V. Lahaye, J.M. Porcher, L. Courcot, and R. Amara. Study of the correlation between biomarkers responses and physiological performance of juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*, exposed to contaminated sediments. 15th International Symposium on Pollution Responses in Marine Organisms PRIMO15, 17-20 May 2009, Bordeaux, France.

Filipuci, I., **Kerambrun, E.**, W. Sanchez, V. Lahaye, F. Henry, L. Courcot, J.M. Porcher, and R. Amara. Link between biomarker responses and physiological performance of European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) exposed to acute heavy metals contamination. 15th International Symposium on Pollution Responses in Marine Organisms PRIMO15, 17-20 May 2009, Bordeaux, France.

Chapitre I : Introduction générale

Chapitre I : Introduction générale

1. Dégradation des zones côtières et estuariennes

1.1 Importance écologique des milieux littoraux

Situées à l'interface entre terre et mer, les zones côtières et estuariennes représentent des zones de transition qui sont considérées parmi les milieux les plus productifs de la planète (McHugh 1967; Whittaker 1975; Costanza *et al.*, 1997). L'hydrodynamisme particulier de ces zones entraîne la présence de nombreux gradients qui varient spatialement à différentes échelles de temps. Les systèmes côtiers et estuariens sont ainsi principalement caractérisés par des variations spatiales des gradients de salinité, de turbidité, en oxygène dissous, ainsi que des variations temporelles du gradient de température (McLusky et Elliott, 2004). Les apports de nutriments issus des eaux de ruissellement des bassins versants permettent un enrichissement naturel des eaux côtières. Ces nutriments sont intégrés dans les réseaux trophiques et soutiennent ainsi une forte productivité (Teal et Teal, 1962; Christensen et Pauly, 1998; Laffaille *et al.*, 2002). Ces écosystèmes participent plus globalement au fonctionnement général de la biosphère en participant à la dynamique des échanges gazeux et en recyclant les nutriments, en particulier l'azote et le carbone, grâce à l'activité intensive des détritivores et de la boucle microbienne. Dans les milieux tidaux tempérés, la production primaire est assurée par le phytoplancton et le microphytobenthos, telles que les diatomées ou les cyanobactéries, par les macrophytes aquatiques, comme les herbiers de zostères ou les ulves, et par les végétaux associés aux zones humides comme les marais intertidaux ou les roselières. Cette production est à l'origine de l'abondance de consommateurs primaires, en particulier des crustacés (amphipodes, mysidacés, gammaridés) qui eux-mêmes attirent de nombreux carnivores. Ces consommateurs secondaires sont représentés principalement par des invertébrés zooplanctivores ou invertivores et poissons. Les zones côtières et estuariennes font fonction de nurserie pour les juvéniles de nombreuses espèces de poisson. Ces habitats sont ainsi essentiels au recrutement des populations adultes qui sont largement exploitées par les pêches commerciales (Beck *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2002; Vasconcelos *et al.*, 2007). Les estuaires servent également de zones de reproduction pour certaines espèces de poissons et de voie de passage obligatoire pour les poissons migrateurs amphihalins. Enfin, les vasières

intertidales et les marais salés, alimentent de nombreux oiseaux, échassiers, canards, oies, rapaces, *etc.*, et servent de zone d'hivernage pour certains oiseaux migrateurs (Figure 1).

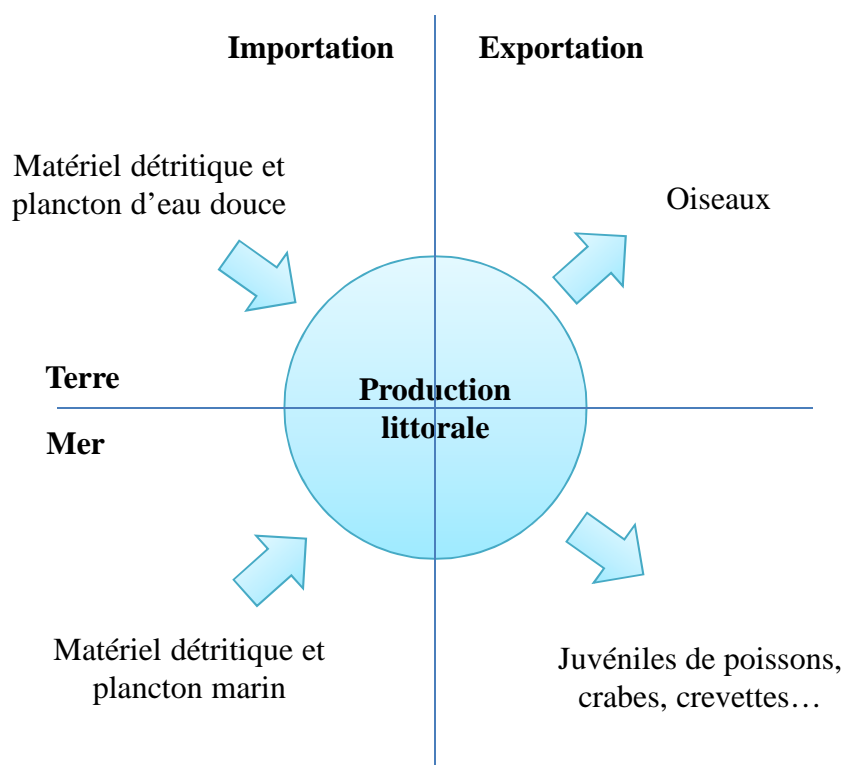


Figure 1 : Flux de matières dans les milieux tidaux situés entre la terre et la mer (modifié de Reise, 1985).

1.2 Perturbations des milieux littoraux

Toutes les aires littorales ne sont pas d'importance équivalente (Pihl *et al.*, 2005). En effet, ces aires sont typiquement sujettes à une forte variabilité environnementale naturelle qui peut imposer un stress considérable sur les organismes (Wedemeyer *et al.*, 1990). En milieu côtier ou estuarien, les organismes doivent faire face à des variations des facteurs environnementaux comme la salinité, la turbidité ou la disponibilité en oxygène. A ces facteurs d'origine naturelle, s'ajoutent des perturbations d'origine anthropique. En effet, les estuaires et zones côtières peuvent être considérés comme les environnements les plus dégradés subissant les effets de l'implantation humaine depuis des siècles (Edgar *et al.*, 2000). Plus de 60 % de la population mondiale vit à moins de 60 km des côtes (Post et Lundin, 1996). Les aménagements qui en découlent ont conduit notamment à l'endiguement des marais, ou poldérisation, qui entraîne une perte importante d'habitats essentiels et

principalement au niveau des zones intertidales (McLusky *et al.*, 1992). Par exemple, sur l'estuaire de la Seine, 100 km² de zones intertidales ont disparu depuis 1850 (Dauvin, 2008). Parmi les activités anthropiques, la pêche est à l'origine d'effets plus ou moins directs sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes estuariens. Elle entraîne des modifications dans l'abondance et la structure en taille et en âge des populations ciblées mais également des organismes non ciblés (Blaber *et al.*, 2000). De plus, la présence de grands ports industriels dans les aires littorales s'associe à un important trafic fluvial et à des activités de dragage pour la maintenance des chenaux de navigation. Différents aménagements sont créés au sein des zones portuaires afin de maintenir de bonnes conditions de navigation et de faciliter la manutention portuaire et le stockage des marchandises. Parmi les activités qui portent le plus préjudice à la qualité du milieu portuaire, on trouve le dragage et la remise en suspension des sédiments, l'exploitation des terminaux et l'activité de la réparation navale. Ces aménagements portuaires induisent de lourdes contraintes sur le fonctionnement écologique des estuaires et sont également responsables de la disparition de grandes surfaces de zones intertidales. En particulier, les dragages qui sont effectués au moment de la construction du port mais également de façon périodique pour enlever les sédiments qui se sont accumulés dans les chenaux et les darses, sont à l'origine de différents effets sur l'environnement. Ils induisent une hausse de la turbidité suite à une remise en suspension des sédiments sous-jacents anoxiques (Marchand, 1993) et favorisent ainsi l'apparition dans ces zones de déficit en oxygène dissous et la libération de contaminants potentiellement toxiques piégés préalablement dans le compartiment sédimentaire. En effet, les zones côtières et estuariennes représentent des zones de dépôt pour une large variété de substances d'origines naturelles ou anthropiques (Kennish, 1997). A l'interface des zones continentales et océaniques, les sédiments côtiers et estuariens jouent le rôle de filtres et de réservoirs pour les contaminants mais sont aussi d'importantes sources de contamination qui tendent à dégrader la qualité de ces habitats (Courrat *et al.*, 2009).

2. Pollution de l'environnement littoral

Le GESAMP (1983) définit la pollution marine comme l'introduction, directe ou indirecte, par l'homme, de substances ou d'énergie dans le milieu marin (y compris les estuaires) lorsqu'elle a des effets nuisibles tels que dommage aux ressources biologiques, risques pour la santé de l'homme, entrave aux activités maritimes, notamment la pêche, altération de la qualité de l'eau de mer du point de vue de son utilisation, et dégradation de

valeurs d'agrément. Cette perturbation anthropique des milieux marins comprend la pollution chimique mais également la pollution bactériologique qui correspond à l'introduction de germes qui prolifèrent dans le milieu et la pollution thermique représentant une modification des températures de l'eau. A ceci, s'ajoutent les effets liés aux apports de matières sédimentaires ou l'introduction d'espèces allochtones. La pollution chimique est une pollution engendrée par des substances chimiques normalement absentes, ou présentes dans l'environnement dans des concentrations naturelles plus faibles. Elle peut être divisée en deux types : la pollution accidentelle et la pollution chronique du milieu.

2.1 Types de pollution chimique

2.1.1 Pollution accidentelle

Les pollutions accidentelles résultent généralement de rejets industriels ponctuels, de pannes dans les stations d'épuration ou de naufrages de navires. La nature des polluants est variable : hydrocarbures, conteneurs de substances dangereuses, produits chimiques. Aujourd'hui, on estime à 37 millions le nombre de substances chimiques utilisées par l'homme et 2 000 sont régulièrement transportées par mer (CEDRE, 2010). Ce mode de transport est actuellement en pleine expansion avec des échanges ayant plus que triplés en 20 ans. Les accidents peuvent se produire dans des zones relativement confinées comme les zones portuaires, les baies et les estuaires ou en pleine mer dont l'effet de dilution minimise l'impact des substances chimiques sur l'environnement marin. Cependant, la dérive des produits chimiques vers les côtes peut représenter un risque conséquent pour les aires littorales sous l'effet des marées, des courants ou des vents. C'est notamment le cas de la dérive des nappes d'hydrocarbures issues des accidents pétroliers vers les côtes. L'impact écologique de ces marées noires varie en fonction de la quantité de pétrole déversé, de sa toxicité et des caractéristiques des sites impactés. Les principales catastrophes pétrolières marquantes sont celles de l'*Amoco Cadiz* en 1978 au large des côtes bretonnes avec un déversement de 227 000 t de pétrole, de l'*Exxon Valdez* en 1989 en Alaska avec 35 500 t de pétrole déversés, de l'*Erika* en 1999 dans le golfe de Gascogne au large de la Bretagne avec 19 800 t, du *Prestige* en 2002 au large du cap Finistère au nord-ouest de l'Espagne avec 63 000 t et en 2010 celle du *Deepwater Horizon* dans le golfe du Mexique avec environ 678 000 t de pétrole déversés dans le milieu.

Une pollution accidentelle des eaux requiert une réponse rapide et efficace pour confiner le polluant, faciliter sa dégradation, nettoyer les sites pollués, et prévenir l'impact sur

les espèces vivantes. Suite à la catastrophe de l'Amoco Cadiz en 1978, le gouvernement français a institué les plans POLMAR (POLution MARitime). Ces plans POLMAR (faisant actuellement partie des plans ORSEC, décret n° 2005-1157) constituent des plans d'intervention en cas de pollutions accidentelles des milieux marins. Dans le cas des marées noires, différentes techniques de lutte peuvent être utilisées dont les principales méthodes utilisées correspondent à une récupération mécanique du pétrole, à une combustion de la nappe de pétrole ou à l'utilisation de dispersant chimique. Des programmes de surveillance et d'évaluation du risque associés à ces accidents apparaissent également indispensables.

2.1.2 Pollution chronique

L'importance des activités anthropiques développées dans la zone littorale (présence de grands ports, urbanisation et industrialisation importantes) engendre des sources de contamination diffuses. Les apports de contaminants à la zone maritime se font par trois voies principales, à savoir les apports directs et les apports indirects d'origine fluviales et/ou atmosphériques. L'importance relative de chacun des apports dépend des milieux et des substances considérées. Alors que dans les milieux ouverts, les apports par voie atmosphérique prédominent, les rejets fluviales représentent une part importante de la contamination des zones littorales (Commission OSPAR, 2000). En effet, le ruissellement à partir des terres et des décharges vers les fleuves et leurs affluents va transporter les rejets des activités qui prennent place à l'intérieur du bassin, incluant le développement urbain et industriel ainsi que l'agriculture intensive (Kennish, 1997; Budzinski et Togola, 2006). A ces apports fluviaux, s'ajoutent des apports directs de contaminants qui sont la conséquence des déversements d'eaux résiduelles urbaines et industrielles dans les eaux côtières, ainsi que des activités offshore et des immersions.

Cette contamination chimique des milieux côtiers a conduit à une prise de conscience du problème de la qualité des eaux littorales à l'échelon européen qui a engendré un effort global visant à limiter les sources de pollution. Ainsi, les émissions de contaminants chimiques dans l'eau et dans l'atmosphère ont été réduites par l'établissement de réglementations environnementales et de l'interdiction dans l'usage de certaines substances (EPA, 2002; Van der Geest *et al.*, 2010). Cependant, de nombreux contaminants chimiques restent piégés dans les sédiments (Figure 2). En effet, les sédiments ont le potentiel de former des associations avec différentes classes de polluants et font ainsi fonction de réceptacle pour les contaminants chimiques (Viguri *et al.*, 2007; Otte *et al.*, 2008). De plus, ils représentent également des sources de contamination chimique par diffusion des polluants dans la colonne d'eau sous

l'action des phénomènes de resuspension des particules sédimentaires. Ce phénomène de remise en suspension résulte de facteurs naturels comme la bioturbation (Burgess *et al.*, 1993), les vagues et courants de marées mais également des activités anthropiques comme les opérations de dragage (Chapman *et al.*, 1998). Des préoccupations nouvelles, relatives à l'impact des dragages et immersions sur l'environnement, sont ainsi apparues à partir du moment où il a été établi que les sédiments pouvaient véhiculer des charges importantes de contaminants toxiques (Alzieu, 2003).

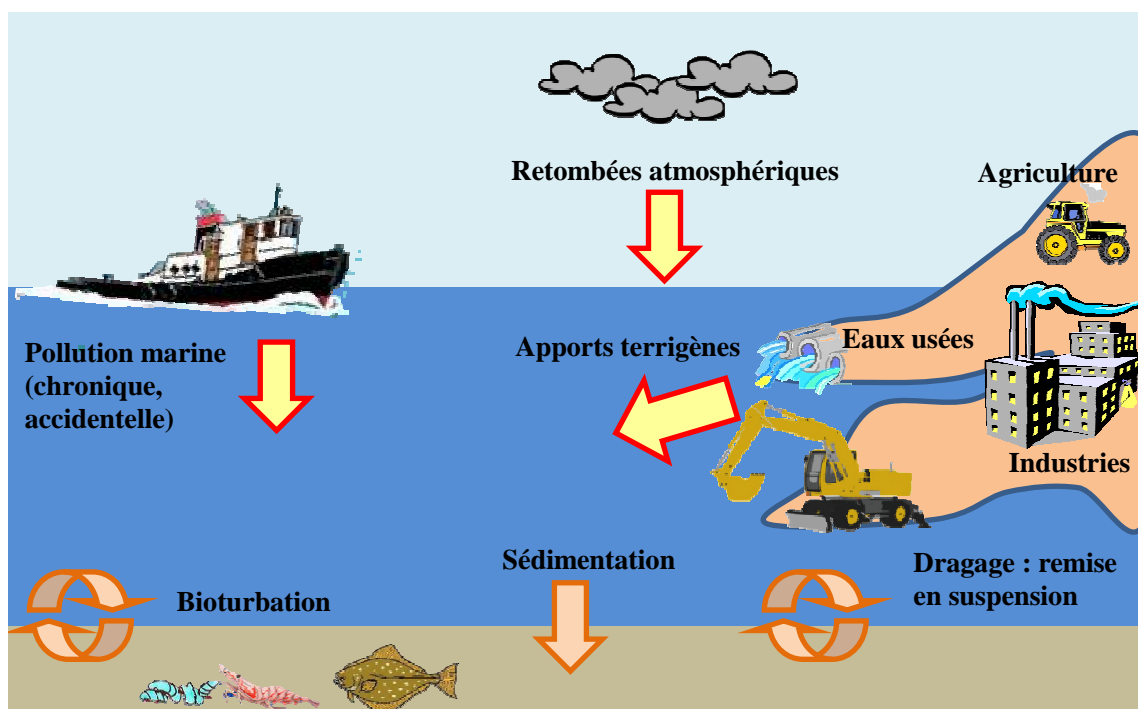


Figure 2 : Apports de contaminants dans le milieu littoral : apports directs et indirects d'origine fluviales et/ou atmosphériques.

2.2 Types de polluants chimiques

2.2.1 Métaux

Les métaux sont naturellement présents dans les roches et minerais de la croûte terrestre, généralement sous la forme d'oxydes, de carbonates, de silicates ou de sulfures. Une partie des métaux présents dans les sédiments côtiers provient donc de l'altération de ces roches et de l'érosion du bassin versant. D'autres phénomènes, tels que le volcanisme, les feux de biomasse et les sources thermales, contribuent au rejet de métaux dans

l'environnement (Rocher, 2003). A ces apports naturels se sont ajoutés les métaux émis à la suite des activités humaines: exploitation des gisements et utilisation des métaux dans de nombreux secteurs d'activité (métallurgie, fonderie, incinération des déchets, combustion des matériaux fossiles et des carburants, épandage de produits phytosanitaires et de fertilisants en agriculture). Les métaux sont présents dans la colonne d'eau et les eaux interstitielles sous forme d'ions libres, de complexes inorganiques et organiques dissous, ou sont liés aux particules en suspension. Les effets toxiques des métaux ainsi que leur comportement au sein du milieu aquatique (mobilité, biodisponibilité) vont dépendre en grande partie de leur spéciation, qui correspond à leur répartition en différentes espèces, formes ou phases (solubles et/ou insolubles) (Boust *et al.*, 1999). La fraction réactive du sédiment regroupe les particules susceptibles de relarguer les éléments métalliques qu'elles contiennent lors d'une remise en suspension du sédiment et/ou de la modification d'un ou de plusieurs paramètres biogéochimiques (modification de l'activité bactérienne, du potentiel d'oxydoréduction, du pH...) (Di Toro *et al.*, 1990; Cooper et Morse, 1998; Huerta Diaz *et al.*, 1998; Simpson *et al.*, 2000). Certains métaux sont essentiels pour les organismes vivants (Cu, Zn, Co, Fe, Mn, Ni, Cr, V, Se, As) et indispensables à certaines fonctions biologiques mais l'augmentation de leur concentration peut aboutir à des phénomènes de toxicité sur les organismes. Pour d'autres éléments tels que l'Ag, le Cd, le Hg et le Pb, ce caractère essentiel n'a pas été détecté (Mason et Jenkins, 1995). Ils entraînent des effets biologiques délétères à de très faibles concentrations et représentent donc des substances considérées comme prioritaires pour la surveillance du milieu marin (Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin, RNO)

2.2.2 HAPs

Les hydrocarbures sont des produits naturels composés uniquement d'atomes de carbone et d'hydrogène. Ils sont, dans des conditions normales de température et de pression, solides (paraffine), liquides (essences, pétrole, etc.) ou gazeux (méthane, butane, etc.). Au sein de cette famille, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) composés d'au moins deux cycles aromatiques fusionnés, occupent une place particulière en raison de leurs propriétés toxiques (IARC, 1983; Baumann, 1989; NTP, 1999). Seize HAP ont été définis comme polluants organiques prioritaires par l'Agence pour la Protection de l'Environnement des Etats-Unis (EPA US) (Keith et Teillard, 1979). Les propriétés physico-chimiques des HAPs dépendent de la structure et de la masse moléculaire des composés et conditionnent leur distribution dans l'environnement.

Les HAPs sont rejetés près des raffineries ou dans les ports (pollution tellurique), et également en haute mer par le déversement des eaux de ballast des pétroliers ou accidentellement après naufrage (pollution pélagique) (Marteil, 1974). Le trafic maritime mondial est le facteur le plus important de pollution par les HAPs. Environ deux millions de tonnes de ces composés aromatiques peuvent être rejetées par déballastage chaque année sans compter les nombreux accidents de navigation responsables de la perte en mer de près d'un million de tonnes de pétrole supplémentaires (Marteil, 1974).

2.2.3 Polluants organiques persistants

Les polluants organiques persistants (POP) sont des composés organiques qui, à des degrés divers, résistent à la dégradation photolytique, chimique ou biologique principalement par voie bactérienne. Les POP sont souvent halogénés et se caractérisent par une faible solubilité dans l'eau et une solubilité élevée dans les lipides. Ils persistent dans l'environnement, s'accumulent dans les tissus des organismes vivants à travers la chaîne alimentaire, et présentent le risque d'entraîner des effets indésirables sur les organismes vivants. De par ces propriétés de persistance et de bioaccumulation, ces molécules ont tendance à se déplacer sur de très longues distances et se déposer loin des lieux d'émission, typiquement des milieux chauds (à forte activité humaine) vers les milieux froids (en particulier l'Arctique). Les POPs au contraire des HAPs ou métaux n'existent pas naturellement et proviennent de produits chimiques industriels et de sous-produits de certaines combustions et procédés de l'industrie chimique. Ils comprennent les PolyChloroBiphényle (PCB) dont 7 congénères sont particulièrement persistants et présents dans l'environnement (*congénères* 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180), les pesticides les plus nocifs, dont le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), les dioxines et les furannes.

3. Surveillance des zones littorales

3.1 Biosurveillance

La directive-cadre européenne sur l'eau (2000/60/CE) (DCE), adoptée le 23 octobre 2000 établit un cadre pour une politique européenne dans le domaine de l'eau dont l'objectif est de parvenir à un bon état écologique et chimique des eaux d'ici à 2015. L'état écologique d'une masse d'eau de surface résulte de l'appréciation de la structure et du fonctionnement des écosystèmes aquatiques associés à cette masse d'eau. Il est déterminé à l'aide d'éléments de qualité : biologiques (espèces végétales et animales), hydromorphologiques et physico-

chimiques, appréciés par des indicateurs (par exemple les indices invertébrés ou poissons en cours d'eau). Les conditions de référence d'un type de masse d'eau sont les conditions représentatives d'une eau de surface de ce type, pas ou très peu influencée par l'activité humaine.

En adoptant la directive cadre européenne "Stratégie pour le milieu marin", la France et les pays de l'Union, se sont engagés à évaluer et à préserver la qualité de leur environnement marin. Avec un objectif ambitieux d'atteinte ou de maintien du bon état de l'environnement marin d'ici 2020, cette directive constitue le pilier environnemental de la stratégie maritime européenne. Le suivi de la qualité des eaux dont les eaux littorales est basé sur une sélection de paramètres chimiques et écologiques permettant de dresser un bilan complet de l'état des eaux en Europe. Cet objectif engendre des besoins de connaissances pour suivre, évaluer et agir sur les pollutions qui peuvent rendre impropre l'utilisation de l'eau et/ou perturber l'écosystème aquatique ou marin.

Jusqu'à la fin des années 1980, la surveillance de l'environnement reposait essentiellement sur un ensemble de techniques d'analyses physico-chimiques plus ou moins sensibles, menant à l'évaluation des concentrations de polluants dans l'eau, les sédiments et les organismes vivants. Cependant, bien que ces méthodes soient nécessaires pour évaluer la présence des contaminants dans le milieu, elles ne fournissent pas d'informations sur l'impact réel des molécules chimiques sur les organismes vivants. C'est pourquoi le concept de biosurveillance (ou biomonitoring) s'est développé ces dernières années afin d'étudier les effets biologiques des polluants sur les organismes. Le besoin d'une approche écotoxicologique spécifique aux problèmes environnementaux est donc apparu afin d'estimer les risques engendrés par la pollution sur la santé des organismes et de l'écosystème par l'utilisation de mesures chimiques couplées à des mesures biologiques. L'un des défis auxquels est actuellement confrontée l'écotoxicologie est d'élaborer des méthodes performantes permettant non seulement de porter un diagnostic sur la qualité du milieu, mais aussi de prédire les effets à long terme d'une contamination chimique sur les populations, les communautés et les écosystèmes. Dans ce contexte, il convient donc de développer des outils et des méthodes pour identifier les sources de pollution, les niveaux d'exposition des organismes et leurs effets tout en prenant en compte les différents facteurs environnementaux susceptibles de moduler ces réponses (Figure 3). La biosurveillance nécessite donc l'utilisation de modèles biologiques appropriés, de méthodes de suivi établissant des relations entre polluants et effets biologiques ainsi que de biomarqueurs sensibles et pertinents.

METHODES DE BIOSURVEILLANCE :

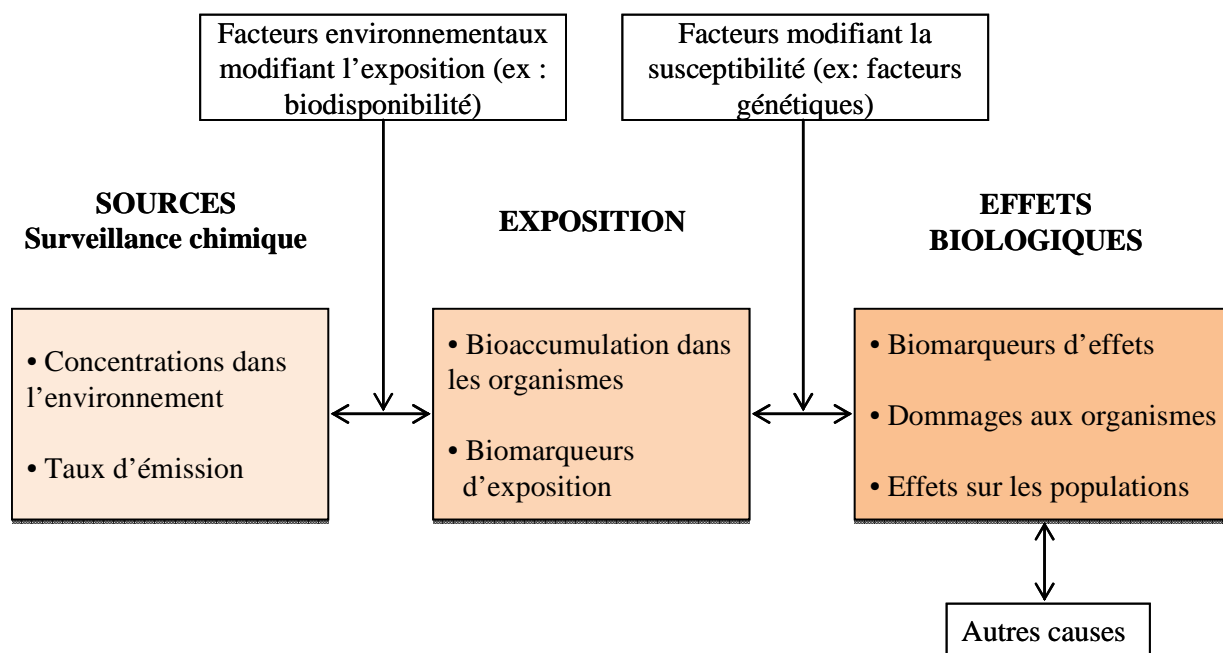


Figure 3 : Relations entre les différentes composantes de suivi des effets des contaminants chimiques sur les organismes (Modifié de Suter, 1993 et Van der Oost *et al.*, 2003).

3.2 Modèles biologiques

Tous les organismes ne répondent pas de manière similaire à la contamination chimique. Cela s'explique en partie par la nature et le niveau d'exposition aux substances. Cette exposition dépend du comportement biogéochimique des contaminants, du compartiment considéré, du mode d'alimentation des espèces et de leur place dans le réseau trophique. Les effets observés vont également dépendre des caractéristiques tissulaires et/ou physiologiques des espèces, de leur sensibilité ainsi que du mode d'action des toxiques. Différents organismes ont été utilisés afin d'étudier les effets de la contamination chimique sur les écosystèmes littoraux comme les mollusques (Cossa, 1995; Hiss *et al.*, 1999), les échinodermes (Fernandez et Beiras, 2001; Beiras *et al.*, 2003), les crustacés (Rainbow et White, 1989; Clason *et al.*, 2003), les poissons (Van der Oost *et al.*, 2003), les oiseaux (Jenssen, 1994; Bradbury et Kirby, 2006) et les mammifères marins (Aguilar *et al.*, 2002; Dolman *et al.*, 2009). Ces espèces ont été utilisées en considérant que les bioconcentrations en polluants et les effets biologiques mesurés sont représentatifs de la contamination de leur milieu environnant. Selon Phillips (1980) une espèce sentinelle de la qualité du milieu aquatique doit satisfaire différents critères :

- une abondance et une taille qui facilitent la réalisation des prélèvements et l'obtention d'échantillons représentatifs,
- une sédentarité et une large distribution géographique permettant des comparaisons des niveaux de présence entre plusieurs sites,
- une capacité à accumuler les contaminants,
- une capacité à intégrer dans le temps les fluctuations du milieu que des mesures dans la colonne d'eau ne permettraient pas de suivre,
- une tolérance aux stress environnementaux et aux contaminants,
- une faible capacité à biotransformer les substances chimiques suivies.

Les mollusques filtreurs comme les huîtres ou les moules, étant des espèces sessiles capables d'accumuler les polluants, satisfont ces critères et sont donc largement utilisés dans les programmes de surveillance environnementale des polluants du milieu marin. Pour l'environnement marin, le programme de surveillance ROCCh-RNO2 conduit par Ifremer pour le compte du MEEDDM (Ministère de l'Ecologie de l'Energie et du Développement Durable et de la Mer), font ainsi largement appel aux bivalves comme espèces indicatrices de la qualité du milieu marin littoral. L'utilisation des poissons dans de tels programmes de surveillance est moins fréquente notamment à cause de leur vie moins sédentaire et leur capacité à s'adapter aux perturbations du milieu (Arendt, 1997). Cependant, les poissons représentent des espèces d'intérêt de part leur forte diversité et leur valeur commerciale en tant qu'importante ressource halieutique. De nombreuses espèces de poissons sont dépendantes des aires littorales pendant une partie de leur cycle de vie et sont donc susceptibles d'être impactées par la contamination chimique de ces milieux (Cabral *et al.*, 2007). En général, le frai prend place au large, impliquant la migration des larves vers la côte continentale à travers les aires littorales et estuariennes (Koutiskopoulos et Lacroix, 1992). Les larves et juvéniles y restent durant plusieurs mois ou années, en fonction de l'espèce, jusqu'au recrutement des adultes pour le renouvellement des populations (Beck *et al.*, 2001; Vasconcelos, 2008). L'utilisation des zones estuariennes et côtières par les juvéniles de poissons présentent plusieurs avantages tels qu'une disponibilité en proie, un refuge vis-à-vis des prédateurs, de bonnes conditions pour une croissance rapide et une forte connectivité avec d'autres habitats (Beck *et al.*, 2001; Cabral *et al.*, 2007). Beck *et al.* (2001) considèrent quatre facteurs nécessaires à la contribution des zones de nourricerie pour le bon recrutement des adultes : densité, croissance, survie des juvéniles et mouvement vers les habitats adultes. En particulier, de nombreuses études ont montré que les juvéniles de poissons qui présentent une

croissance rapide et possèdent de hauts niveaux de réserves énergétiques sont moins vulnérables à la prédation et sont donc plus aptes à survivre en période hivernale (Biro *et al.*, 2004; Sogard, 1997; Vinagre *et al.*, 2008). En effet, pendant l'hiver, les poissons peuvent endurer des périodes de jeûne provoquées par la diminution de la disponibilité en nourriture (Foy et Paul, 1999), ce qui implique que les juvéniles doivent puiser sur leurs réserves énergétiques accumulées pendant les périodes estivales et automnales.

L'augmentation des apports en contaminants chimiques comme les métaux et polluants organiques dans les environnements littoraux tendent ainsi à perturber leur fonction essentielle de nourricerie pour les juvéniles de poissons (Gilliers *et al.*, 2006; Le pape *et al.*, 2007). En effet, les juvéniles restent habituellement inféodés à leur estuaire, ils ne migrent généralement pas entre estuaires (Amara *et al.*, 2007) même si ces habitats sont sujets à une diminution de leur qualité (Moles *et al.*, 1994). En France, une étude réalisée sur 13 estuaires de la façade Manche-Atlantique, suivie par la directive cadre sur l'eau, a révélé la perturbation de la fonction de nourricerie de ces estuaires en relation avec les perturbations d'origine anthropique (Courrat *et al.*, 2009). Une diminution de l'abondance et du nombre d'espèces de juvéniles utilisant ces estuaires comme zone de nourricerie a ainsi été reliée aux contaminants métalliques et organiques malgré la forte productivité des estuaires les plus anthropisés. L'étude des effets des contaminants chimiques sur les poissons apparaît donc indispensable pour suivre leur état de santé et prévenir d'une perturbation sur les populations à plus long terme. L'utilisation du poisson en tant qu'espèce biologique indicatrice de la contamination chimique a d'autant plus d'intérêt que les connaissances en physiologie, biochimie, écologie et éthologie sont assez nombreuses chez ces organismes par rapport aux invertébrés (Boudou et Ribeyre, 1989). De plus, les poissons présentent une grande diversité de types morphologiques, des régimes alimentaires, des cycles de vie, des distributions verticales et de comportements qui permettent de couvrir l'ensemble de la composante spatiale aquatique des estuaires susceptibles d'être impacté par les activités humaines (Whitfield et Elliott, 2002). Le rôle important des poissons dans la structuration et le fonctionnement des réseaux trophiques aquatiques conduit à les considérer comme des éléments représentatifs et intégrateurs de l'écosystème.

3.3 Méthodes d'étude

Différentes méthodes d'étude ont été utilisées afin d'analyser les effets des contaminants chimiques sur les organismes aquatiques en condition plus ou moins contrôlées,

chacune apportant différents degrés d'informations toxicologiques (Figure 4). La première méthode consiste à prélever des organismes dans des sites plus ou moins impactés. Cette méthode d'étude représente l'outil le plus intégrateur des conditions environnementales et permet ainsi d'aboutir à des résultats pertinents sur l'état de contamination chimique du milieu environnant. Ce type d'approche a été réalisé avec des prélèvements de poissons dans des milieux présentant des niveaux de contamination contrastés (Riba *et al.*, 2005; Henry *et al.*, 2004; Amara *et al.*, 2009) et est utilisé dans différents programmes de biosurveillance. C'est par exemple le cas du programme Seine-Aval dans lequel le flet, *Platichthys flesus*, et le bar, *Dicentrarchus labrax*, ont été choisis comme espèces pilotes pour évaluer les processus de contamination en métaux (Miramand *et al.*, 1998). Cependant, les migrations de la plupart des espèces de poissons pour l'alimentation ou la reproduction entraînent une incertitude sur la capacité de ces prélèvements d'organismes à refléter réellement la qualité du site de capture. De plus, la fluctuation des différents facteurs environnementaux rendent difficile d'accéder avec certitude aux effets seuls des contaminants chimiques présents dans l'environnement. Il peut être également difficile de disposer de sites de référence dans lesquels les mêmes organismes seraient présents et soumis à des conditions environnementales similaires que les sites pollués.

La mise en place d'expérimentations en conditions contrôlées permet de prendre en compte les interactions entre les facteurs biotiques et abiotiques dans l'étude des effets des contaminants et représente donc un moyen de pallier, en partie, aux difficultés rencontrées dans les études de terrain (Culp *et al.*, 2000). En effet, en contrôlant les facteurs confondants, les bioessais de toxicité apparaissent comme des instruments pertinents pour les scientifiques pour tester les mécanismes de toxicité ainsi que la biodisponibilité des contaminants chimiques pour les organismes. Des bio-essais respectant un protocole expérimental précis (durée, température, salinité, photopériode, stade de développement, etc.) et comprenant des mesures d'effets léthaux des polluants sur les organismes peuvent ainsi être normalisés et intervenir dans l'établissement de valeurs toxicologiques de références (NQE, CL50, NOEC, etc.). Les tests de toxicité qui impliquent des mesures subléthales des poissons fournissent également des informations sur la sensibilité, la pertinence et la variabilité des différents biomarqueurs utilisés en écotoxicologie vis-à-vis d'un polluant ou d'un mélange complexe de polluants (Jiménez-Tenerio *et al.*, 2007). Dans ce contexte, les bio-essais peuvent être utilisés pour comprendre les mécanismes des perturbations ou pour identifier les substances responsables des effets observés. Une multitude de bioessais ont ainsi été réalisées chez des poissons exposés à des contaminants chimiques par contamination par la colonne d'eau (Al-

Yakoob *et al.*, 1996; Richards et Playle, 1998; Gagnon et Holdway, 1999; Annune et Iyaniwura, 1993; Gbem *et al.*, 2001), par le sédiment (Moles et Norcross, 1998; Fragoso *et al.*, 2006; Otte *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2008; Kilemade *et al.*, 2009) ou par voie trophique (Scott *et al.*, 2003; Mielbrecht *et al.*, 2005; Saborido-Rey *et al.*, 2007). Cependant, même si des efforts se sont développés pour essayer de réaliser des expositions dans des conditions proches de celles du milieu naturel, les concentrations et le comportement des polluants s'avèrent souvent très différents entre laboratoire et environnement naturel. En effet, les durées d'exposition de ce genre d'expérimentation s'avèrent souvent relativement courtes et les concentrations utilisées peuvent se situer dans une gamme assez loin des concentrations environnementales.

Une immersion directe des poissons dans des sites sélectionnés (site pollué et site de référence) permet un meilleur contrôle des conditions d'exposition aux polluants présents dans l'environnement. L'utilisation de cage de poissons (méthode de « caging ») dans de telles études représente donc un avantage certain en connaissant avec précision la localisation et la durée d'exposition des espèces tout en conservant les caractéristiques environnementales du site étudié (Oikari *et al.*, 2006). Ce type d'approche permet de choisir l'espèce d'intérêt qui peut être soit issue d'aquaculture ou prélevé en milieu naturel, et également de sélectionner leur taille, leur stade de développement et parfois leur sexe suivant l'objectif de l'étude. Plusieurs récents travaux ont ainsi utilisé cette méthode en tant que méthode d'étude alternative des effets des contaminants chimiques en mesurant principalement la réponse de biomarqueurs moléculaires (Lindström-Seppa et Oikari, 1990; Soimasuo *et al.*, 1995; Goksoyr *et al.*, 1996; Stien *et al.*, 1998; Van der Oost *et al.*, 1998; Winter *et al.*, 2005). En général, ces études ont été réalisées sur des poissons de grande taille de salmonidés (Lindström-Seppa et Oikari, 1990), de poissons plats (Beyer *et al.*, 1996) ou d'anguilles (Teles *et al.*, 2004; Trembley *et al.*, 2004). Cependant, certains désavantages ont été identifiés comme les problèmes d'alimentation, la mise en place souvent laborieuse des cages et il est encore difficile d'évaluer le stress physiologique induit par ce procédé sur les organismes. La réalisation complémentaire d'étude en milieu naturel et d'expériences de laboratoire permettrait de mieux comprendre les mécanismes de toxicité et de mieux appréhender l'importance des facteurs environnementaux sur cette toxicité.

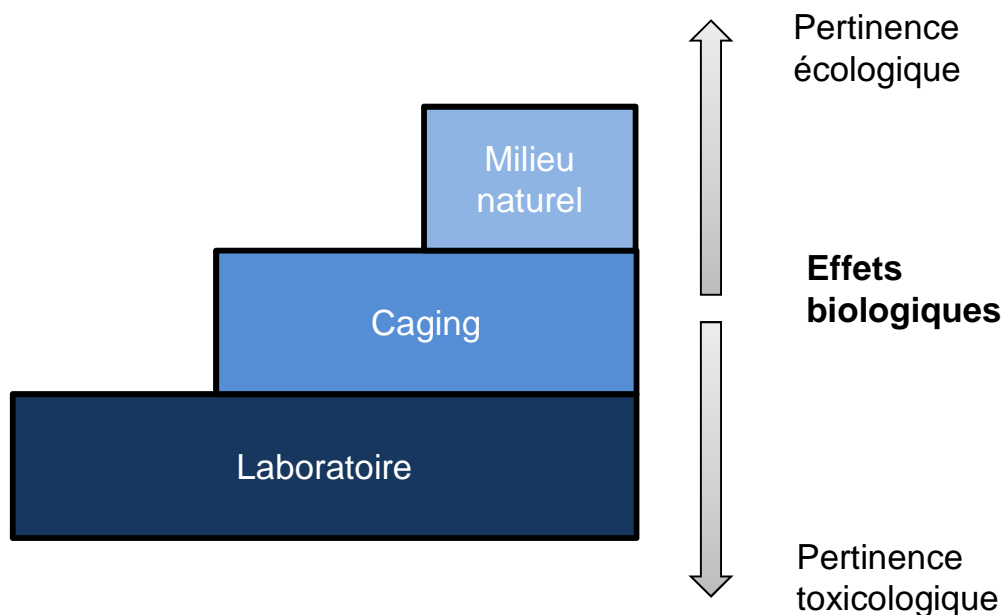


Figure 4 : Méthodes d'étude des effets biologiques des contaminations chimiques en relations avec leur pertinence écologique et toxicologique (modifié de Triebkorn *et al.*, 2001)

3.4 Les biomarqueurs

Bien que le développement des analyses chimiques ait permis de détecter et doser de nombreux contaminants chimiques présents dans l'environnement, l'association de ces polluants peut rendre difficile les interprétations sur leurs effets potentiellement toxiques sur les organismes. Conjointement aux mesures chimiques, la mesure de variables biologiques est susceptible d'apporter une information intégrée sur l'état de l'écosystème (Lévêque, 1997). Différents paramètres biologiques ont ainsi été développés représentant des paramètres à moindre coût pour évaluer les réponses biologiques aux pollutions environnementales au niveau moléculaire, cellulaire et de l'organisme (McCarthy *et al.*, 1990; Shugart *et al.*, 1992; Viarengo *et al.*, 1997). Un biomarqueur peut être défini comme une réponse biologique pouvant être reliée à une exposition ou à des effets toxiques de contaminants chimiques présents dans l'environnement (Peakall, 1994). Selon le NRC (National Research Council, 1987), les biomarqueurs peuvent être subdivisés en trois classes :

- Les biomarqueurs d'exposition sont des indicateurs de la contamination des systèmes biologiques par un (des) xénobiotique(s). Ils peuvent correspondre à des molécules exogènes ou leurs métabolites issus de la métabolisation du xénobiotique ou de produits issus de son

interaction avec certaines biomolécules ou cellules cibles. Les biomarqueurs d'exposition peuvent également prendre la forme d'activités ou de quantités anormales d'enzymes. En effet, certaines enzymes sont capables d'être induites ou activées par les polluants, cette induction pouvant revêtir un caractère plus ou moins spécifique d'un type de polluant donné.

- Les biomarqueurs d'effets sont des altérations biochimiques, physiologiques, comportementales ou autres au sein d'un organisme dont la réponse, en fonction de son intensité, peut être assimilée à un trouble ou une maladie. L'utilisation des biomarqueurs d'effet permet de montrer que le xénobiotique est entré dans l'organisme et, qu'après avoir été distribué entre les différents tissus, a exercé un effet toxique sur une cible critique. Ils sont utilisés pour évaluer les effets des xénobiotiques sur les individus, les populations ou les écosystèmes.

- Les biomarqueurs de susceptibilité sont des indicateurs d'une capacité inhérente ou acquise d'un organisme à répondre à un xénobiotique spécifique. Ils ont pour objet de rendre compte de différences interindividuelles dans la réponse à une exposition toxique. Cette catégorie de biomarqueurs peut donc notamment inclure des facteurs génétiques. En effet, cette sensibilité individuelle peut résulter de polymorphismes des gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques ou dans la réparation des lésions de l'ADN.

Certains biomarqueurs sont plutôt spécifiques d'une famille de substance chimique et d'autres ne font que traduire des réactions physiotoxicologiques générales, mais ne vont pas renseigner sur le type de substance responsable de cette réaction. Dans une optique de détection de l'exposition des organismes à des contaminants chimiques et d'évaluation précoce de risques écotoxicologiques, certains critères doivent être satisfaits afin de valider l'utilisation des biomarqueurs. Van der Oost *et al.* (2003) proposent six critères comprenant les informations les plus importantes que devrait respecter un « bon » biomarqueur:

- la mesure du biomarqueur doit être précise (avec des assurances qualité), à moindre coût et facile à effectuer,

- la réponse du biomarqueur doit être sensible à l'exposition à un polluant et/ou ses effets pour servir de paramètre précoce d'alerte,

- les valeurs basales du biomarqueur doivent être bien définies pour distinguer la variabilité naturelle (bruit) et le stress induit par le contaminant (signal),

- les effets des facteurs confondant sur la réponse de ces biomarqueurs doivent être bien établis,

- les mécanismes soulignant les relations entre réponse du biomarqueur et l'exposition au polluant (dose et temps) doivent être établis,
- la pertinence écologique de la réponse du biomarqueur, c'est-à-dire les relations entre sa réponse et l'impact (à long terme) sur l'organisme, doit être établie.

L'exposition et/ou l'assimilation de polluants par un organisme marin provoque des effets plus ou moins importants sur sa santé en fonction de la durée d'exposition ou de la dose ingérée. L'exposition à des doses croissantes de polluants entraîne des réponses physiologiques compensatoires mais lorsque la compensation physiologique est insuffisante pour maintenir les fonctions vitales, des conséquences pathologiques interviennent. Selon les biomarqueurs considérés (d'exposition ou d'effets), leurs réponses vont se traduire dans ces zones de compensation ou non (Figure 5).

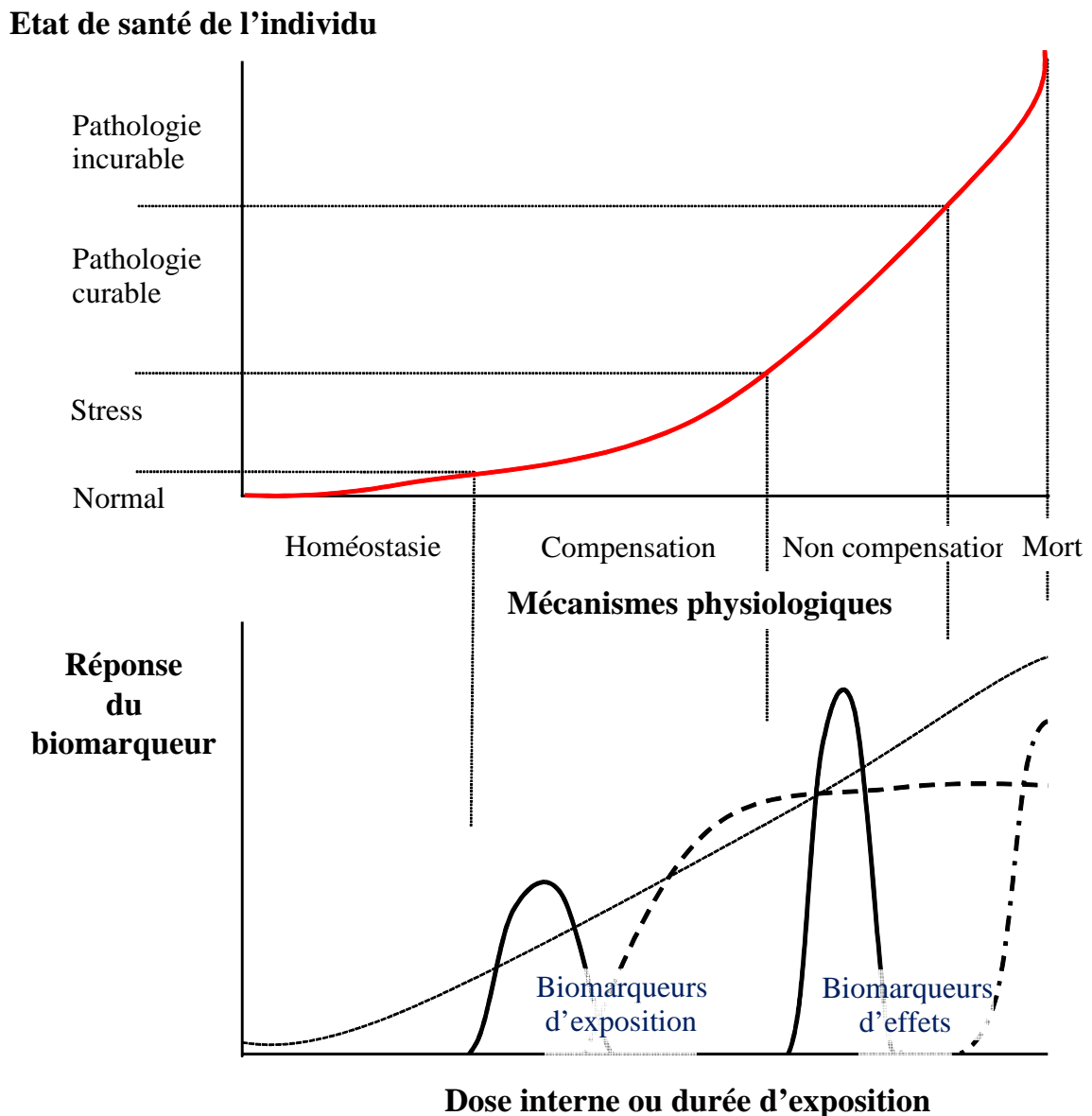


Figure 5 : Relations entre exposition aux contaminants et état de santé de l'organisme. Réponses des biomarqueurs d'exposition ou d'effets en fonction des mécanismes physiologiques impliqués (d'après Depledge, 1994).

Différentes études des effets des polluants chez les poissons ont ainsi été conduites afin de développer différents biomarqueurs et indicateurs biologiques à différents niveaux d'organisation. En effet, les impacts des contaminations chimiques vont intervenir à des niveaux d'organisation croissant en fonction de la durée d'exposition, de la nature et de la concentration des polluants. Dans la section suivante, nous proposons d'établir une brève synthèse des différents paramètres biologiques utilisés dans différentes études

écotoxicologiques chez le poisson afin de situer les variables biologiques retenues dans notre étude.

4. Mesure des effets des polluants chez le poisson

4.1 De la molécule à la cellule

4.1.1 Paramètres de biotransformation

De nombreux paramètres ont été utilisés au niveau sub-cellulaire chez les poissons pour leurs réponses sensibles aux substances toxiques et leur potentiel en tant que biomarqueurs d'exposition ou d'effet. L'impact des polluants au niveau subcellulaire peut conduire à l'inhibition et/ou l'induction de diverses protéines et enzymes impliquées dans le métabolisme et l'excrétion des xénobiotiques. Ces mécanismes de détoxification permettent aux organismes de maintenir leur intégrité face à l'exposition aux polluants. Le suivi de tels changements biochimiques permet de détecter une perturbation avant l'apparition de signes pathologiques irréversibles. Ces changements peuvent être, en ce sens, utilisés comme des systèmes d'alarme précoces d'une exposition toxique. Les modulations des enzymes de biotransformation ont ainsi fait l'objet d'un très grand nombre d'investigations ces 30 dernières années, notamment chez les poissons, attestant de leur utilité en tant que biomarqueur de la pollution aquatique (Andersson et Förlin, 1992; Goksoyr et Husoy, 1998; Whyte *et al.*, 2000). Ces activités de détoxification peuvent, en outre, être étudiées par les mesures des niveaux protéiques du cytochrome P450 (phases 1A et 3A) (Murphy et Goosh, 1997; Arinç *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2002), par la mesure de l'activité de l'éthoxyresorufin-O-dééthylase (EROD) (Goksoyr et Förlin, 1992; Whyte *et al.*, 2000; Teles *et al.*, 2004) ou celles des enzymes de la famille des Glutathion-S-transférase (Varanasi *et al.*, 1989; George, 1994; Kim *et al.*, 2010). Ces biomarqueurs moléculaires ne sont cependant pas spécifique des contaminants et leurs réponses sont potentiellement effectuées par des facteurs biotiques ou abiotiques.

4.1.2 Paramètres oxydatifs et « protéines de stress »

Plusieurs contaminants chimiques, ou leurs métabolites, exercent leur toxicité en générant la production de radicaux libres de l'oxygène. Le système antioxydant intervenant dans la protection cellulaire contre ce stress oxydatif induit lors de pollution, plusieurs enzymes antioxydantes ont été utilisées en tant que biomarqueur précoce comme la Catalase,

la Superoxyde dismutase (SOD) ou la Glutathion peroxidase (GPx) (Winston et Di Giulio, 1991; Stegeman *et al.*, 1992; Filho, 1996). De plus, plusieurs effets biochimiques ont été associés à l'augmentation de flux de radicaux libres qui ont mené au développement de biomarqueurs d'effet oxydatifs comme la peroxidation lipidique (Stegeman *et al.*, 1992; Hageman *et al.*, 1992), la capacité oxydante totale (TOSC) (Winston *et al.*, 1998; Regoli *et al.*, 2000) ou l'oxydation de l'ADN (Chipman *et al.*, 1998). Une variété de xénobiotiques peut également être à l'origine d'une induction de « protéines de stress », les Heat-Shock Proteins (HSP), qui sont indispensables à l'homéostasie cellulaire. Ces protéines ont ainsi été proposées en tant que biomarqueurs dans les programmes de biosurveillance (Schröder *et al.*, 2000; Köhler *et al.*, 2001; Triebkorn *et al.*, 2002). D'autres protéines non enzymatiques comme les métallothionéines (MT) ont également été utilisées en tant que biomarqueur d'exposition à des contaminations métalliques, ces protéines étant impliquées dans la régulation des métaux se propageant dans l'organisme (Roesijadi et Robinson, 1994; Viarengo *et al.*, 2000).

4.1.3 Paramètres endocriniens et neurologiques

Certains polluants, caractérisés de « perturbateurs endocriniens (PE) », agissent sur l'équilibre hormonal des organismes. Les perturbateurs endocriniens (PE) sont des substances exogènes provoquant des effets néfastes sur la santé d'un organisme ou sa descendance, secondairement à des changements de la fonction endocrine. Les mécanismes d'action des PE sont multiples puisqu'ils peuvent agir sur l'ensemble des étapes de la régulation endocrine, depuis la synthèse des hormones jusqu'à l'action au niveau des tissus cibles. Chez les organismes aquatiques, l'exposition aux PE a été associée à des effets néfastes sur la reproduction des individus et des populations. En conséquence, plusieurs études se sont focalisées dans la recherche de biomarqueurs endocriniens chez le poisson (Murphy *et al.*, 2005; Mills et Chichester, 2005). Afin de mieux considérer ces divers modes d'action, certains travaux se sont orientés plus récemment vers l'étude des effets des PE sur les enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse, processus par lequel les hormones stéroïdiennes sont synthétisées. En particulier, un intérêt croissant s'est porté sur la mesure de la vitellogénine en tant que biomarqueur d'exposition à des perturbateurs oestrogéniques (Sumpter et Jobling, 1995; Arukwe *et al.*, 2001) et la spiggin comme biomarqueur d'exposition aux perturbateurs androgéniques (Kawahara *et al.*, 2006; Andersson *et al.*, 2007). Certains polluants ont également été caractérisés comme neurotoxiques entraînant des effets sur les fonctions neurales des poissons. Les activités acétylcholine (AChE) et

butyrylcholine (BChE) estérasiques ont ainsi été utilisées du fait qu'elles constituent la cible privilégiée de ces contaminants dont l'inhibition constitue un bon marqueur d'exposition (Galgani *et al.*, 1992; Payne *et al.*, 1996; Fulton et Key, 2001).

4.1.4 Paramètres génétiques

Différents paramètres ont été développés au niveau génétique, divers agents chimiques ayant la capacité d'interagir avec la molécule d'ADN et d'en modifier l'intégrité (Hebert et Luiker, 1996; Cajaraville *et al.*, 2003). Les dommages à l'ADN sont généralement partagés en deux catégories: les lésions géniques (lésions fonctionnelles) induites par les agents mutagènes et les lésions chromosomiques (lésions structurales) induites par les agents clastogènes. Ces dommages à l'ADN ont été proposés comme étant un outil adapté à l'évaluation des propriétés génotoxiques des polluants environnementaux et à la détection de leur présence dans le milieu naturel (Shugart, 2000; Hebert et Luiker, 1996; Nunn *et al.*, 1996). De nombreux travaux réalisés en milieu naturel ont souligné l'intérêt d'analyser la formation d'adduits à l'ADN en tant que biomarqueur d'exposition à des composés génotoxiques mutagènes et cancérigènes présents dans l'écosystème aquatique (Stein *et al.*, 1994; Shugart et Theodorakis, 1998; Livingstone *et al.*, 2000). Les cassures simple et double brins de la molécule d'ADN ont été utilisées avec succès chez les poissons afin d'analyser la contamination d'un milieu (Shugart, 1990; Everaarts *et al.*, 1994). Le polymorphisme génétique de certains gènes a également été proposé en tant que biomarqueur permettant de différencier les populations de poissons en fonction du degré de contamination de leurs estuaires (Marchand *et al.*, 2010).

4.2 De l'individu aux populations

4.2.1 Paramètres hématologiques et immunologiques

Bien que les paramètres hématologiques ou immunologiques ne soient pas spécifiques dans leurs réponses aux stress chimiques, ils ont été considérés comme représentatifs de l'état physiologique des organismes (Beyer, 1996). Ainsi, différents paramètres hématologiques ont été proposés en tant que biomarqueurs d'effet comme l'activité sérique des transaminases (Moss *et al.*, 1986), l'hématocrite (Köprücü *et al.*, 2006), les concentrations en hémoglobines (Dangre *et al.*, 2010) et les taux protéiques ou glucosiques (Li *et al.*, 2010). De même, des études du système immunologique des poissons ont permis de discriminer certains nouveaux biomarqueurs en écotoxicologie comme la teneur en leucocytes (Rao *et al.*, 1990), le système

du complément (Bado-Niles *et al.*, 2009), les activités lysosomiales (Biagianti-Risbourg *et al.*, 1996), les centres mélanomacrophages (Payne et Fancey, 1989) ou les fonctions de phagocytose (Harford *et al.*, 2005). Des effets immunosuppresseurs des polluants ont ainsi été décrits suggérant une susceptibilité des poissons aux infections bactériennes ou virales (Vethaak, 1993). Cependant, des effets inverses ont été reportés dans le sens où certains polluants pouvaient entraîner une protection contre certains pathogènes (MacFarlane *et al.*, 1986).

4.2.2 Paramètres histologiques

Plusieurs avantages dans l'étude des caractéristiques histopathologiques d'organes spécifiques ont été décrits dans un article de synthèse de Hinton *et al.*, (1994). Ces paramètres histologiques ont été préconisés en tant qu'indicateurs fiables de l'état de santé des poissons en intégrant les effets d'une large gamme de polluants (Hinton *et al.*, 1992). Un certain nombre de liaisons et d'altérations histologiques ont ainsi été analysées dans les branchies, le foie ou le rein des poissons (Dezfuli *et al.*, 2006; Giari *et al.*, 2007). Bien que des indices histopathologiques aient été développés ces dernières années (Costa *et al.*, 2009), les résultats demeurent à un niveau qualitatif (présence ou absence de lésions), il reste donc difficile de disposer de données numériques et ainsi pouvoir établir des relations de causes à effets entre ces biomarqueurs et les contaminants.

4.2.3 Paramètres physiologiques

Parmi les différents niveaux de réponses étudiés, les réponses physiologiques à la contamination chimique ont souvent été ignorées en écotoxicologie. Elles sont considérées comme trop générales ou difficilement mesurables en routine (Depledge *et al.*, 1995). Cependant, une volonté de considérer ces aspects biologiques du poisson émerge depuis plusieurs années afin d'identifier des réponses intégrées représentant la somme des stress imposés par les polluants. En effet, les réponses des organismes à la contamination chimique présente dans l'environnement leur permettent, dans une certaine limite, de se maintenir ou de rétablir un certain équilibre. Le coût énergétique d'un stress environnemental se solde par une diminution de la quantité d'énergie disponible pour la maintenance, la reproduction et la croissance et en conséquence par une réduction de la fitness des individus (Lauwrence *et al.*, 2003). Plusieurs mesures physiologiques ont ainsi été développées chez les poissons comme l'osmorégulation (Lionetto *et al.*, 1998; Monserrat *et al.*, 2007), les capacités cardiaques

(Walker *et al.*, 1991; Claireaux et Davoodi, 2010), la respiration (Couture et Kumar, 2003; Chowdhury *et al.*, 2004), la croissance (Rowe *et al.*, 2003; Saborido-Rey *et al.*, 2007) et la reproduction (Kime, 1999; Arukwe, 2001). Des dommages au niveau de ces processus physiologiques entraînant un risque pour la survie de l'organisme, ces paramètres sont considérés comme refléter la capacité d'un individu à survivre. Ces modifications de l'état physiologique des organismes en réponse aux polluants sont particulièrement sensibles pour les stades précoces des poissons en affectant leur développement. Différentes anomalies dans le développement des larves et juvéniles ont ainsi été proposées en tant que biomarqueurs d'effets des polluants (Luckenbach *et al.*, 2003; Gonzalez-Doncel *et al.*, 2008). Plus récemment, ces études se sont focalisées sur des déformations squelettiques (Karen *et al.*, 2001; Boglione *et al.*, 2006). Différents indices morphologiques ont également été utilisés en tant qu'indicateur de l'état de santé des organismes (Kopecka-Pilarczyk et Correia, 2009)

4.2.4 Paramètres comportementaux

Le comportement des organismes vivants est susceptible d'être affecté par la pollution (Hansen *et al.*, 1999). Des perturbations de leurs activités locomotrices peuvent entraîner des déficiences dans leur capacité de fuite face aux prédateurs, une augmentation de leur temps de recherche des proies ainsi que des modifications des activités de migration affectant indirectement leur reproduction (Mesa *et al.*, 1994; Triebkorn *et al.*, 1997; Weis *et al.*, 2000; Weis *et al.*, 2003). Plusieurs études ont également rapporté que les polluants peuvent diminuer les activités alimentaires des poissons (Omeregic et Ufodike, 2000; Saborido-Rey *et al.*, 2007). Enfin, la présence de molécules indésirables peut entraîner des modifications de comportement liées à la reproduction (parades, choix du partenaire, soins parentaux) (Tierney *et al.*, 2010). Tous ces changements comportementaux résultent de modifications de processus biochimiques et physiologiques à l'échelle de l'individu et peuvent avoir des effets significatifs sur l'équilibre des populations et des communautés. Différentes techniques ont ainsi été développées pour suivre le comportement des individus en présence de polluants comme la télémétrie acoustique (Bégout-Anras et Lagardère, 2004) ou le suivi par caméra vidéo (Faucher *et al.*, 2008).

4.2.5 Paramètres populationnels

Les caractéristiques des communautés de poissons comme la diversité spécifique, la biomasse totale et les assemblages de poissons peuvent être considérés comme les niveaux les

plus caractéristiques de l'état de santé d'un écosystème puisqu'ils intègrent la qualité de l'habitat, la disponibilité en nourriture et la qualité de l'eau (Smith *et al.*, 1999; Kovacs *et al.*, 2002; MacDonald *et al.*, 2002). Parmi les indices calculés à partir des peuplements de poissons, on peut citer l'Index d'Intégrité Biologique (IBI) (Oberdorff et Hughes, 1992; Oberdorff *et al.*, 2001). Cet indice fournit un moyen de quantifier les changements écologiques résultant de la combinaison de stress physiques, chimiques et biologiques. Il a ainsi été utilisé pour les communautés de poissons dans plusieurs études de surveillance de l'effet de la pollution de l'eau (Hartwell, 1997; Dyer *et al.*, 2000; Porter et Janz, 2003). Une autre approche utilisée pour estimer la qualité des communautés de poissons est la comparaison abondance/biomasse (ABC méthode). Cet indice a été appliqué pour analyser les communautés de poissons de rivière (Coeck *et al.*, 1993; Penczak et Kruk, 1999) dans des milieux perturbés. L'index ABC est basé sur la théorie écologique qu'une communauté libre de stress se trouve proche de l'équilibre naturel. Malgré le développement dans l'établissement de ces indices pour rendre compte de la complexité des écosystèmes, celle-ci rend encore très difficile la possibilité de dresser des liens de causes à effets sans équivoque. En effet, les polluants peuvent agir directement (sensibilité différentielle des taxons) mais aussi indirectement (modification des interactions prédateur-proie) sur la structure et la dynamique des communautés.

4.3 Sensibilité vs pertinence écologique

L'étude de référence de Adams *et al.*, 1989 suggère une différence de sensibilité et de spécificité des réponses toxiques avec des niveaux d'organisation biologique croissant (Figure 6). Ces auteurs considèrent que des paramètres moléculaires ou biochimiques seraient plus spécifiques et plus sensibles à la contamination chimique que des paramètres mesurés au niveau physiologique, reproductif ou morphologique. A l'inverse, ces derniers apporteraient davantage d'informations sur l'état de santé de l'organisme et gagneraient donc en pertinence écologique. En effet, les paramètres offrant le plus d'informations écologiques sont les paramètres populationnels ou communautaires, mais dans la plupart des cas, ils sont limités dans la possibilité d'établir une relation claire de cause à effet avec les polluants. Cette question de la signification écotoxicologique des réponses biologiques reste un champ de recherche très ouvert. En effet, une perturbation de type biochimique n'entraîne pas nécessairement des effets irréversibles pour l'organisme, ni *a fortiori*, pour les populations. Ainsi, dans l'état actuel des connaissances, les biomarqueurs renseignent davantage sur

l'exposition des organismes à des contaminants (approche diagnostique) que sur l'évaluation d'un risque réel pour les populations (approche prédictive) (Lagadic *et al.*, 1998).

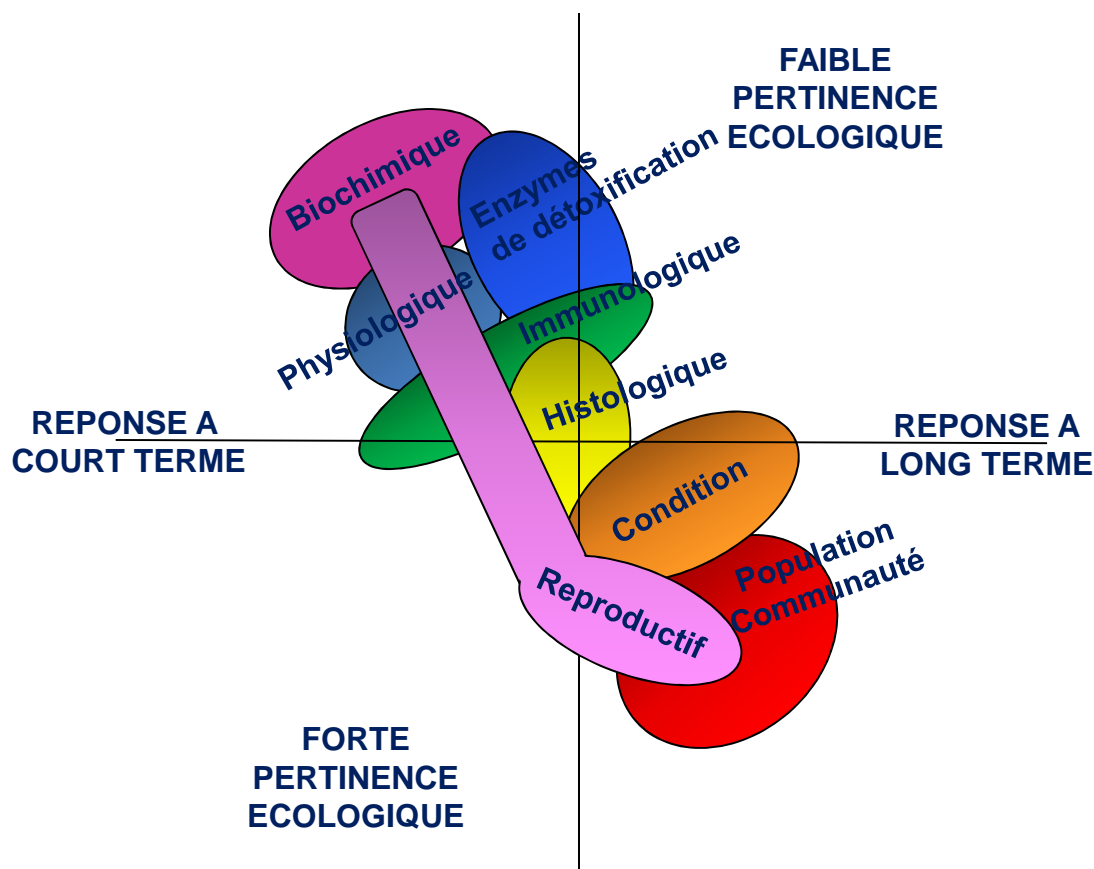


Figure 6 : Relations entre sensibilité et pertinence écologique des réponses biologiques à différents niveaux d'organisation (Modifié de Adams *et al.*, 1989).

Afin d'évaluer les risques environnementaux de substances chimiques, il serait idéal de disposer de biomarqueurs spécifiques indiquant de manière précise l'exposition d'un organisme à un ou plusieurs polluants et de biomarqueurs non-spécifiques permettant d'évaluer correctement les conditions de santé de l'organisme et de l'écosystème (Peakall et Walker, 1994). Cependant, bien que plusieurs biomarqueurs aient été développés pour accéder à l'exposition et aux effets des substances toxiques, d'autres investigations sont nécessaires pour se rapprocher de cet objectif. L'établissement d'approche intégrée est indispensable afin d'améliorer l'utilisation des biomarqueurs précoces dans une optique de prédiction des effets toxiques à des niveaux d'organisations plus élevés. Cependant, malgré l'utilité de chacun des biomarqueurs décrit précédemment, il est très difficile voire impossible d'en utiliser l'ensemble sur des mêmes organismes et populations. C'est pourquoi, dans notre étude, nous avons sélectionné différents biomarqueurs chimiques, biochimiques et

physiologiques afin d'accéder à une approche intégrant différents niveaux d'information. En effet, diverses études menées chez des populations vivant en milieux contaminés démontrent l'intérêt d'utiliser conjointement aux analyses chimiques, une batterie de biomarqueurs biochimiques et physiologiques complémentaires au plan informatif. Ainsi, leurs mesures tendent à améliorer la capacité de détection d'une exposition toxique, et à fournir une meilleure estimation non seulement de la biodisponibilité d'un groupe de xénobiotiques, mais aussi de leurs effets sur la santé des organismes (Eufemia *et al.*, 1997; Lyons *et al.*, 1999; Handy *et al.*, 2003; McClain *et al.*, 2003). Avant de présenter les différents objectifs et l'organisation de ce manuscrit, la section suivante décrit plus précisément les variables biologiques utilisés dans notre étude afin de présenter et justifier l'approche utilisée.

5. Utilisation simultanée de biomarqueurs chimiques, moléculaires et physiologiques

5.1 Bioconcentration des métaux et HAPs

5.1.1 Concentration en métaux dans les organismes

Les poissons étant situés au sommet du réseau trophique, ils sont capables d'accumuler les métaux présents dans la colonne d'eau, le sédiment et la nourriture. Différentes études effectuées en laboratoire ou sur le terrain montrent que l'accumulation en métaux dans les tissus dépend principalement des concentrations en métaux dans l'environnement mais aussi de la durée d'exposition ou d'autres facteurs environnementaux comme la salinité, le pH et la température (Yilmaz et Yilmaz, 2007). De plus, la toxicité des métaux vis-à-vis des organismes vivants dépend de leur nature, leur mode d'action, leur spéciation et donc de leur biodisponibilité (Alzieu, 1999). En conséquence, les concentrations en métaux ne sont donc pas nécessairement corrélées aux concentrations mesurées dans les organismes, puisque seulement une fraction de ces métaux sera disponible pour le biotope (Aarab, 2004). De plus, les concentrations en métaux dans les organismes dépendent de leur caractère essentiel ou non: alors que les métaux non-essentiels sont toxiques à l'état de trace, les métaux essentiels tendent à être régulés (Fernandes *et al.*, 2007).

La plupart des études se sont concentrées à doser l'accumulation des métaux dans les tissus musculaires, pour des raisons de santé publique ou de consommation (Storelli *et al.*, 2006; Keskin *et al.*, 2007). Cependant, les muscles ne sont pas toujours un bon indicateur du degré de contamination du poisson, il est donc important d'analyser d'autres tissus comme le

foie ou les branchies. En effet, la présence de certains ligands, comme la métallothionéine, qui joue le rôle de séquestration et de détoxification de certains métaux tels que Cu, Cd et Zn (Engel et Roesijadi, 1987) et de granules (Hare, 1992; Roesijadi et Robinson, 1994) fait du foie un meilleur témoin de l'accumulation en métaux que le muscle (Ploetz *et al.*, 2007; Uysal *et al.*, 2009). De même, l'utilisation des branchies pour le suivi de la contamination a été recommandée suite à certains travaux récents (Fernandes *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2009). En effet, les branchies représentent une large surface qui est continuellement en contact avec le milieu extérieur, aussi bien la colonne d'eau que le sédiment, qui peuvent représenter les principales voies de transfert de contaminants (Richards et Playle, 1998). Il est ainsi documenté que les branchies peuvent répondre plus précocement que le foie à l'accumulation de certains métaux comme le Pb (Ahmad *et al.*, 2004).

5.1.2 Concentration en HAPs ou métabolites d'HAPs dans les organismes

Les HAPs peuvent avoir un caractère toxique aigu ou chronique, mais également un effet mutagène. Leur caractère lipophile leur confère une grande facilité à franchir les membranes cellulaires à travers les branchies, les intestins, la peau et ainsi s'accumuler préférentiellement dans les tissus riches en lipides (Varanasi, 1989). La présence d'HAPs dans ces tissus représente donc une preuve d'exposition à ces composés aromatiques. Cependant, les HAPs sont rapidement métabolisés dans l'organisme à travers de nombreux systèmes enzymatiques (Budzinski *et al.*, 2004). En effet, une fois absorbés, les HAPs sont principalement acheminés jusqu'au foie où ils se fixent aux membranes des cellules en raison de leur hydrophobicité. Ces cellules hépatiques vont ensuite mettre en œuvre des processus de biotransformation afin de rendre les HAP plus hydrophiles et de pouvoir les excréter. La génotoxicité de ces composés est ainsi affectée par leur transformation au sein des organismes. Au cours des mécanismes de détoxification, des composés électrophiles peuvent être formés, et se fixer sur les sites nucléophiles de l'ADN et de l'ARN, provoquant des dysfonctionnements cellulaires à caractère mutagène et cancérigène. Une fois les HAPs métabolisés par les complexes enzymatiques, la principale voie d'excrétion de ces métabolites est la vésicule biliaire. C'est pourquoi le dosage des métabolites dans la bile a été appliqué comme un biomarqueur d'exposition aux HAPs (Aas *et al.*, 1998; Ariese, 1993; Hellou et Payne, 1987; Lin *et al.*, 1996). Les métabolites peuvent se trouver sous forme conjuguée ou libre dans l'organisme (Collier *et al.*, 1978; Leonard et Hellou, 2001).

La mesure des concentrations de ces différents contaminants chimiques dans les organismes peut renseigner sur le type et la biodisponibilité des contaminants présents dans l'environnement en permettant de qualifier et quantifier les substances. Ils représentent ainsi des preuves évidentes d'exposition. Cependant, ils ne représentent pas systématiquement de bon indicateur des niveaux d'exposition du fait des différents processus biologiques intervenant dans leur détoxification et excrétion. Leurs mesures, à elles seules, ne donnent pas accès aux informations sur les effets biologiques résultants.

5.2 Les biomarqueurs moléculaires

A la différence des mesures de bioconcentrations, les activités métaboliques enzymatiques peuvent fournir des informations sur l'exposition des contaminants avec une réelle significativité biologique (Gagnon et Holdway, 1999).

5.2.1 Enzymes de biotransformation : EROD et GST

Les systèmes enzymatiques de détoxification prennent en charge les xénobiotiques dans le but d'augmenter leur hydrosolubilité afin de faciliter leur excrétion dans les fluides biologiques (Figure 7). Deux types de réactions interagissent dans les mécanismes de la biotransformation. Les réactions dites de phase I, localisées essentiellement au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, consistent le plus souvent en l'oxydation du substrat par divers systèmes enzymatiques, en particulier les monooxygénases à cytochrome P450. Le métabolite produit, rendu plus hydrosoluble, peut alors être pris en charge par les réactions de phase II. Ces dernières greffent une molécule endogène très polaire sur le substrat oxydé, le rendant ainsi plus facilement excrétable (acide glucuronique, glutathion, sulfate, groupement méthyl,...).

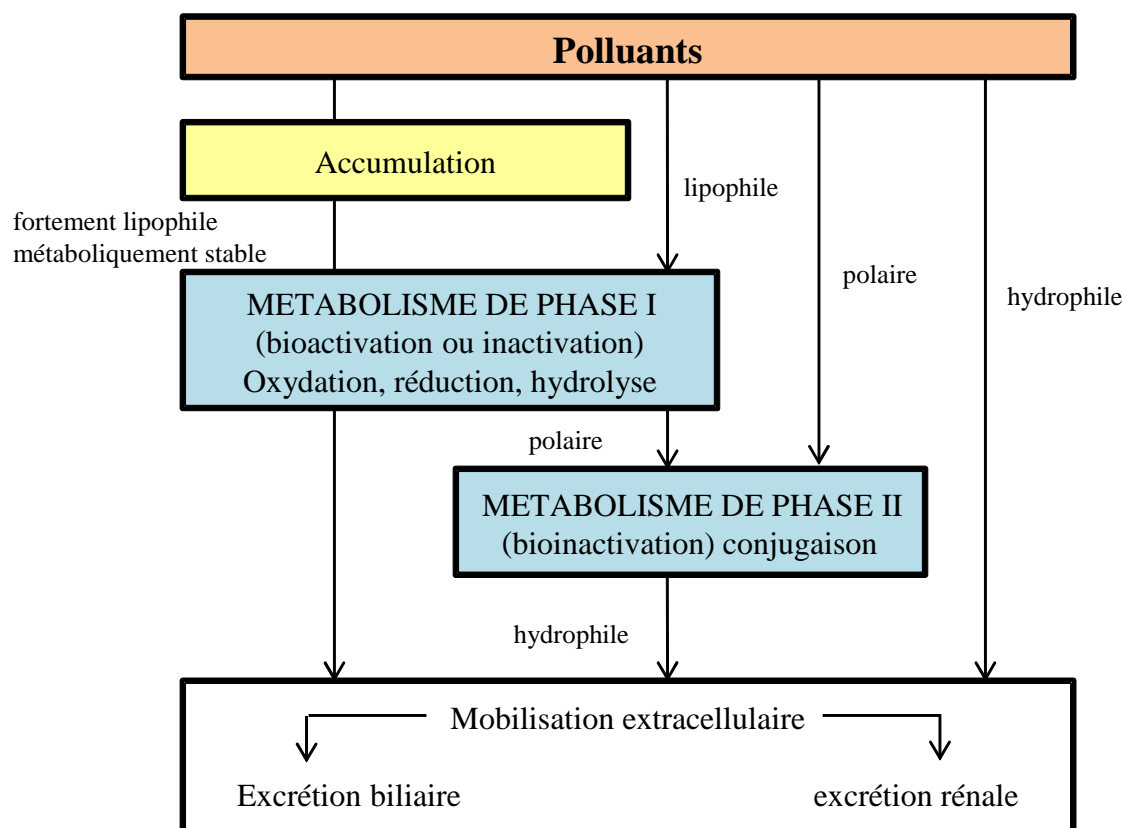


Figure 7 : Devenir des polluants dans les organismes : prises en charge des polluants dans la cellule afin d'augmenter leur hydrosolubilité et faciliter leur excrétion.

Des modifications dans les niveaux et les activités de ces enzymes de biotransformation sont souvent considérées comme les biomarqueurs les plus sensibles aux contaminants chimiques (Van der Oost *et al.*, 2003). Chez les poissons, l'activité de ces enzymes peut être induite ou inhibée après exposition aux xenobiotiques (Bucheli et Fent, 1995). Dans ce manuscrit, nous avons choisi d'étudier deux de ces paramètres de biotransformation qui sont fréquemment utilisés en étude écotoxicologique : l'activité Ethoxy-Résorufine-O-Dééthylase (EROD) qui caractérise la famille des enzymes monooxygénase à cytochrome P450 (CYP450) de phase I et la glutathion-S-transférase (GST), enzyme de phase II. En effet, de nombreuses synthèses bibliographiques témoignent des études réalisées sur les activités EROD et leur potentialité en tant que marqueurs de contamination par les HAPs et les PCBs (Payne *et al.*, 1987; Goksoyr *et al.*, 1992; Stegeman *et al.*, 1992; Burgeot *et al.*, 1994; Bucheli *et al.*, 1995; Flammarion 1997; Van der Oost, 1997). Après plusieurs années d'expérimentation, l'activité EROD est actuellement envisagée comme outil de surveillance au sein du Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin (RNO), par l'IFREMER. Bien que les connaissances sur la glutathion-S-transférase soient moindres que pour l'EROD, son intérêt en tant que biomarqueur de contamination par

les polluants organiques de type HAP, PCB et pesticides a été démontré (Boryslawskyj *et al.*, 1988; Narbonne, 1999). En effet, elle possède la particularité de pouvoir conjuguer un grand nombre de composés exogènes et endogènes qui ont les caractéristiques requises pour constituer un substrat approprié.

5.2.2 Enzyme antioxydante : la Catalase

La production d'espèces réactives oxygénées (ROS, Reactive Oxygen Species) est normale pour tous les organismes vivants en aérobie et ne constitue pas, en soi, une situation de stress oxydant. Cependant, un excès de production de ROS peut être généré par divers polluants organiques et métalliques via différents processus métaboliques (Lemaire *et al.*, 1994; Lopes *et al.*, 2001). La présence de ces radicaux libres peut engendrer des inactivations d'enzymes, une peroxydation des lipides, des dommages à l'ADN et peut aboutir à la mort cellulaire (Winston et Di Giulio, 1991) (Figure 8). Au sein des différents compartiments intracellulaires, les ROS peuvent y être piégées (oxyradical scavengers) et métabolisées par diverses protéines enzymatiques et non enzymatiques. Ainsi, l'augmentation de la production de ROS peut induire ou inhiber l'activité et la synthèse de ces composés antioxydants dont l'étude donne une indication sensible de la présence de contaminants générateurs d'un tel stress en milieu contrôlé et naturel (Di Giulio *et al.*, 1989; Lemaire *et al.*, 1994; McFarland *et al.*, 1999; Lopes *et al.*, 2001).

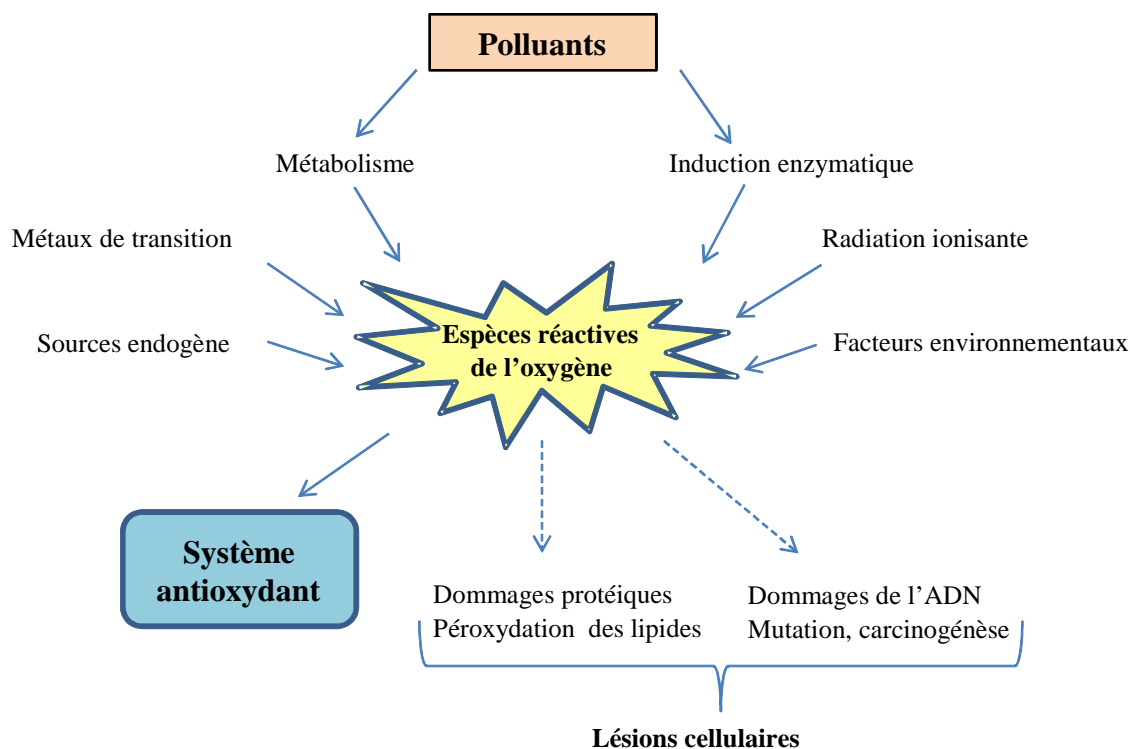


Figure 8 : Sources entraînant une augmentation des espèces réactives de l'oxygène dans la cellule, dommages cellulaires associés et intervention du système antioxydant.

Parmi les enzymes antioxydantes, la catalase fait partie de celles les plus étudiées (Hidalgo *et al.*, 2002; Gül *et al.*, 2004; Sanchez *et al.*, 2005). Elle catabolise les peroxydes d'hydrogène en molécule d'eau pour prévenir la formation de radicaux hydroxyles. L'intérêt de ces paramètres antioxydants en tant que biomarqueur réside dans le caractère aspécifique de leur réponse, ce qui peut être un avantage dans le contexte des contaminations multiples des écosystèmes (Cossu *et al.*, 1997; Vigano *et al.*, 1998; Larno, 2004)

Ces biomarqueurs moléculaires sont reconnus pour être des mesures précoces et sensibles à l'exposition de contaminants chimiques. Ils peuvent ainsi être très utiles pour détecter des effets avant que des effets irréversibles se soient manifestés. Cependant, en considérant leur utilisation dans l'évaluation des risques écologiques, il est primordial de savoir si des changements dans ces paramètres moléculaires se reflètent à de plus haut niveaux biologiques. En effet, les biomarqueurs moléculaires présentent des doutes sur leur réelle pertinence écologique en étant situé en bas du niveau d'organisation biologique (Castro *et al.*, 2004).

5.3 Paramètres physiologiques : croissance et indices de condition

L'utilisation de biomarqueurs physiologiques comme la croissance ou la condition du poisson est basée sur le fait qu'il représente des aspects biologiques des poissons directement reliés à la qualité de leur habitat (Amara *et al.*, 2007). L'étude de la croissance permet d'observer indirectement les effets d'un polluant sur la fitness des organismes et présente l'avantage d'intégrer l'histoire de vie des individus (Adams *et al.*, 1992; Laroche *et al.*, 2002; Marchand *et al.*, 2003). D'autres indicateurs de l'état de santé global des organismes tels que l'indice de condition, le rapport ARN/ADN et la teneur en lipides, renseignent sur les coûts métaboliques induits par un polluant et indirectement sur le statut énergétique et la croissance de l'individu exposé (Adams *et al.*, 1990; Lambert et Dutil, 1997). Ces indices de condition ont l'avantage d'être simples et relativement rapides à mesurer (Lambert et Dutil 1997; Leamon *et al.*, 2000; Webb et Gagnon, 2002). Malgré les précautions à prendre lors de leur interprétation, ces indices sont considérés comme des indicateurs d'effets très informatifs (Adams *et al.*, 1990).

5.3.1 Croissance

Plusieurs études ont montré que les contaminants chimiques inhibaient la croissance des poissons pour plusieurs espèces et particulièrement dans les stades les plus précoces, comme les larves et les juvéniles (Saborido-Rey, 2007; Abdel-Tawwab, 2007; Hopkins, 2004). Les variations de la croissance des poissons pourraient représenter un bilan des réponses sub-léthales face à des contaminations chimiques puisque la croissance intègre beaucoup de procédés (Morales-Nin, 2007). La croissance durant la première année est cruciale pour la survie du poisson. Les poissons manifestent leur croissance la plus rapide durant la phase juvénile (Smith *et al.*, 1995) et une réduction de cette croissance pourrait prolonger la durée de leur stade juvénile. Des poissons avec une croissance diminuée seraient plus susceptibles à la prédation et pourraient se montrer moins compétitifs pour la recherche de nourriture que de plus grands individus.

La croissance peut être obtenue expérimentalement par mesure directe de la croissance somatique du poisson mais également indirectement à partir de l'analyse des otolithes et plus particulièrement des stries journalières de croissance des otolithes. En effet, les accroissements journaliers permettent d'obtenir des informations sur les taux de croissance à court-terme des individus, ce qui est particulièrement utile lors d'étude en milieu naturel, lorsque la croissance somatique ne peut pas être calculée. Cet indice de croissance a ainsi été

utilisé dans diverses études écotoxicologiques (Burke *et al.*, 1993; Alquezar *et al.*, 2006; Davoodi et Claireaux, 2007; Morales-Nin *et al.*, 2007; Amara *et al.*, 2009).

5.3.2 Indices de condition de Fulton

L'indice de condition K de Fulton est un facteur morphométrique obtenu à partir des mesures de taille et poids de chaque poisson. L'indice de condition de Fulton K reflète l'embonpoint d'un poisson et suppose que pour une taille donnée, plus le poisson est gros, plus il est dans de meilleures conditions environnementales. Il est considéré comme représentatif de l'état nutritionnel et de l'état des réserves énergétiques d'un individu (Lambert et Dutil, 1997; Sutton *et al.*, 2000). Un poisson avec un indice faible sera considéré comme ayant souffert de conditions environnementales difficiles, de sous alimentation ou d'infections parasitaires (Lambert et Dutil, 1997; Yaragina et Marshall, 2000). Cet indice est donc considéré comme un bon indicateur de l'état de santé général du poisson et permet d'estimer la qualité des conditions environnementales (Ratz et Lloret, 2003). Il est souvent utilisé dans des études s'intéressant aux différentes sources de stress car ce type d'indice est facilement mesurable (Suthers, 1998).

5.3.3 Rapport ARN/ADN

Le rapport ARN/ADN est un indice communément utilisé, liant la croissance et les conditions nutritionnelles chez les juvéniles de poisson. La quantité d'ADN dans la plupart des cellules animales est considérée normalement stable, mais la quantité d'ARN varie avec le statut physiologique, la synthèse protéique et la croissance. Les ARNm, ARNt et ARNr étant essentiels pour la biosynthèse des protéines, la quantité d'ARN dans les cellules varie en réponse à des changements en demande de synthèse de protéines. Les quantités d'ARN sont élevées dans des organismes à croissance rapide; des facteurs diminuant la croissance sont donc reliés à une réduction des quantités d'ARN (Nye *et al.*, 2007). De nombreuses études ont montré que cet indice répond de manière rapide aux variations des conditions de nutrition et de croissance des larves et juvéniles de poisson (Buckley *et al.*, 1999; Clemmensen, 1988). Le rapport ARN/ADN a donc été utilisé comme biomarqueur biochimique de croissance qui reflète la réponse générale des organismes aux stress environnementaux (Wo *et al.*, 1999; Pottinger *et al.*, 2002; Humphrey *et al.*, 2007). L'application de cet indice en tant que biomarqueurs d'effets de pollution est ainsi considérée depuis quelques années chez les bivalves, crustacés et poissons (Amara *et al.*, 2009; Fonseca *et al.*, 2009; Tsangaris *et al.*, 2010; Gorokhova *et al.*, 2010)

5.3.4 Indice de stockage lipidique

L'indice de stockage lipidique est basé sur le rapport de la quantité de triacylglycerols (TAG, réserve lipidique) sur la quantité de stérols (ST; structure lipidique) dans le poisson. La teneur en TAG est dépendante de l'état nutritionnel du poisson vu que les TAGs sont la principale réserve énergétique chez les téléostéens et le premier composé mobilisé durant une période de stress, alors que les teneurs en stérols restent essentiellement inchangés (Galois *et al.*, 1990). Les TAG sont ainsi utilisés pour évaluer le statut énergétique d'un poisson et représentent une mesure directe du potentiel des individus à endurer des périodes de jeune. Cet index lipidique pourrait donc être considéré comme une mesure de la probabilité de survie à court et moyen terme. Chez des poissons exposés à des contaminants chimiques, une diminution de cet indice lipidique peut être reliée à la dépense énergétique nécessaire aux processus métaboliques de détoxification des polluants (Alquezar *et al.*, 2006) ainsi qu'à leurs effets indirects sur le comportement du poisson comme des modifications du comportement alimentaire (Saborido-Rey *et al.*, 2007) ou de nage (Stephens *et al.*, 2000).

Ces indices de croissance et de condition ont été utilisés avec succès dans des études reliant l'état de santé des larves et juvéniles de poissons avec les conditions environnementales du milieu (température, photopériode, disponibilité en nourriture...). Ces différents indices sont pertinents à différentes échelles temporelles (Figure 9). Les indices morphométriques (K de Fulton) et les indices de stockage lipidique (teneur en lipides, rapport TAG :ST) vont être sensibles à l'échelle de la semaine ou du mois alors que les indices de croissance (croissance récente, rapport ARN :ADN) peuvent réagir après quelques jours ou semaine. Cependant, leur sensibilité aux contaminants chimiques reste encore assez méconnue et davantage de recherche sont nécessaires pour considérer leur utilisation en tant que biomarqueur d'effets aux contaminants chimiques.

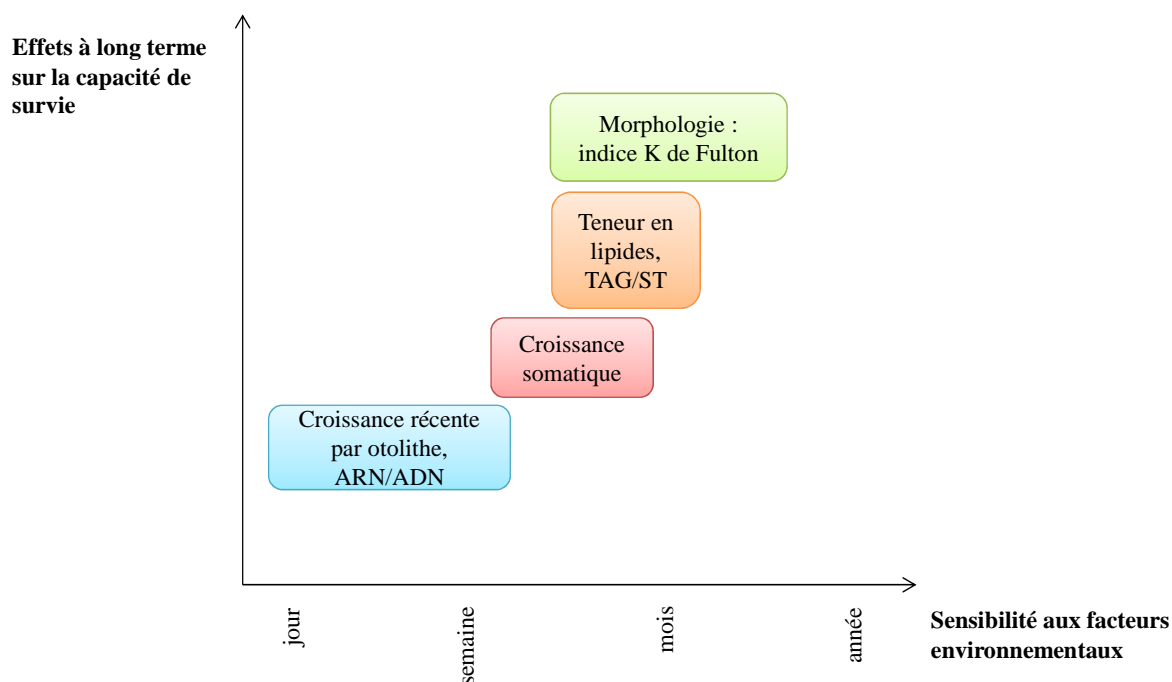


Figure 9 : Sensibilité et temps d'intégration des indices de croissances et de condition utilisés dans ce travail de thèse (modifié de Suthers, 2000).

6. Objectifs et organisation de la thèse

Notre étude a consisté à développer une approche multibiomarqueurs afin d'évaluer les effets biologiques de la pollution en milieu littoral en utilisant des paramètres chimiques, moléculaires et physiologiques chez le poisson. Cette approche a été réalisée par des expériences d'exposition de poissons à différents types de pollution rencontrés en milieu naturel, en conditions plus ou moins contrôlées. Des outils chimiques ont ainsi été utilisés afin de quantifier les niveaux de contamination présents dans l'eau, le sédiment et les organismes. Des biomarqueurs moléculaires, fréquemment utilisés en écotoxicologie (l'EROD, la GST et la CAT) ont été analysés en tant qu'indicateur précoce d'exposition et leurs réponses ont été comparées à celles de biomarqueurs physiologiques. En effet, bien que ces biomarqueurs moléculaires soient utilisés en tant que « système d'alarme » susceptibles de détecter une perturbation avant l'apparition de signes pathologiques irréversibles, peu d'études ont analysé leur pouvoir prédictif en les reliant à des paramètres présentant davantage de pertinence écologique. Les biomarqueurs physiologiques utilisés correspondent à des indices de croissance et de condition qui sont moins fréquemment utilisés en écotoxicologie mais qui

reflètent l'état de santé général du poisson. Ils ont été analysés en considérant que ces paramètres à haut niveau d'organisation biologique pourraient révéler les dommages induits par les polluants à l'échelle de l'individu et permettre d'évaluer la probabilité de l'individu à survivre.

Ce travail s'est focalisé sur les périodes juvéniles de poissons car ces stades précoces sont généralement plus sensibles à la contamination chimique et sont critiques pour le cycle de vie des poissons, le succès du recrutement et donc le renouvellement des populations adultes. Cette approche intégrée a été étudiée dans le cadre d'exposition de poissons à un seul type de contaminant chimique ou à un mélange complexe de polluants. Des études en conditions de laboratoire et en conditions environnementales ont été réalisées afin d'évaluer la sensibilité des biomarqueurs moléculaires et physiologiques aux contaminants chimiques mais également l'influence potentielle de facteurs environnementaux sur leurs réponses. Enfin, les réponses des biomarqueurs physiologiques ont été comparées chez des espèces présentant un mode de vie et un comportement différents : le bar commun, *Dicentrarchus labrax*, espèce démersale vivant dans la colonne d'eau et deux poissons plats, le turbot, *Scophthalmus maximus*, et le flet, *Platichthys flesus*, espèces benthiques vivant en contact avec le sédiment.

Le mémoire s'articule autour de six chapitres avec un premier chapitre présenté précédemment resituant le contexte de l'étude. Le chapitre II est un chapitre méthodologique, il présente les différentes approches expérimentales utilisées en décrivant les espèces et sites d'études ainsi que les protocoles et échantillonnages. Il décrit également les différentes techniques et mises au point qui ont été développées dans les analyses chimiques, moléculaires et physiologiques.

Le chapitre III présente une expérience de contamination en laboratoire de juvéniles de bars à du pétrole pendant 48 h et 96 h. Cette étude a pour objectif d'analyser les réponses des poissons à une exposition aiguë d'hydrocarbures à des concentrations reflétant celles observées au cours de différentes pollutions accidentelles de type pétrolière. Les biomarqueurs moléculaires ont été analysés en considérant que leurs réponses précoces pourraient refléter le niveau d'exposition des organismes aux produits pétroliers. Les réponses d'indices de croissance et de condition ont ensuite été analysées un mois après l'exposition au pétrole afin d'évaluer l'effet à moyen terme de ce type de contamination sur l'état de santé des juvéniles de bar. Les réponses de ces biomarqueurs moléculaires et physiologiques ont ensuite été comparées afin d'étudier la capacité des biomarqueurs moléculaires à refléter les effets des hydrocarbures sur l'état de santé des organismes.

Dans le chapitre IV, nous nous sommes intéressés aux réponses des biomarqueurs moléculaires et physiologiques dans le cadre d'une exposition chronique à un mélange de polluants. Ces réponses ont été analysées lors d'une première étude en condition semi-controlée par la réalisation d'une expérience de caging et lors d'une deuxième étude en condition contrôlée de laboratoire. Dans une première expérience, des juvéniles de bar et de turbot en été placés en cage dans le port de Boulogne sur Mer pendant 38 jours. Dans une deuxième étude des juvéniles de turbots ont été exposés en condition de laboratoire aux sédiments portuaires mais également à du sédiment estuarien provenant de la Seine pendant 21 jours. Lors de ces deux études, les réponses des biomarqueurs moléculaires et physiologiques ont été analysées et comparées à la fin de chaque exposition et après 7 jours d'exposition en laboratoire. Ces deux études ont été réalisées en considérant que l'analyse des biomarqueurs moléculaires permettrait de détecter l'exposition des organismes aux contaminants chimiques alors que la réponse des indices de croissance et de condition reflèterait les effets de la contamination sur leur état de santé. L'analyse et la comparaison d'études menées en condition environnementale et de laboratoire améliorera notre connaissance sur l'influence des facteurs environnementaux sur les réponses biologiques des organismes.

Le chapitre V concerne une étude réalisée sur des flets prélevés dans différents estuaires français et belges présentant des degrés d'anthropisation différents. La condition des poissons et leurs relations avec les concentrations en métaux observées dans les organismes ont été analysées dans cette étude de terrain pour mieux comprendre les effets des métaux sur les performances physiologiques des poissons et évaluer la qualité environnementale des estuaires. Cette étude a été réalisée suivant l'hypothèse que des niveaux croissants de concentrations en métaux dans les organismes entraîneraient une diminution de l'état de santé des organismes estuariens.

Enfin, le sixième et dernier chapitre (VI) constitue la discussion générale. Il synthétise l'ensemble des résultats obtenus lors de ces expériences en statuant sur la sensibilité des différents paramètres biologiques utilisés et sur la pertinence de l'approche proposée dans ces différentes techniques d'étude.

Chapitre II : Matériel et Méthodes

Chapitre II : Matériel et Méthodes

1. Expériences réalisées

1.1 Démarche expérimentale

L'approche multibiomarqueur présentée dans le chapitre précédent a été développée sur des juvéniles de poisson dans le cadre de deux types de pollution chimique rencontrés en milieu naturel : pollutions occasionnelle et chronique.

Notre choix d'étude en condition de pollution accidentelle s'est porté sur les effets d'une contamination aiguë à un seul type de contaminant : les hydrocarbures. Cette expérimentation s'est déroulée en avril-mai 2009 dans le cadre du projet ANR DISCOBIOL (Dispersant et techniques de lutte en milieu côtier : effets biologiques et apport à la réglementation) au Centre de Documentation, de Recherche et d'Expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux (CEDRE, Brest), centre disposant d'une serre expérimentale de 160 m². Des dispositifs expérimentaux y ont été développés afin d'étudier la réactivité du pétrole vis-à-vis du milieu aqueux et son impact sur des organismes marins. S'agissant d'une contamination par la colonne d'eau, les juvéniles de bar ont été choisis pour cette étude. Les organismes ont été exposés au pétrole en condition contrôlée pendant 48 h et 96 h, deux durées d'exposition courte appropriée au mode de contamination aiguë. Les poissons ont ensuite été transposés pendant 1 mois en eau claire afin de tester leur capacité à se rétablir.

Le deuxième volet des études d'exposition s'est porté sur les effets d'une exposition chronique à un mélange de polluants. Pour cela, des concentrations environnementales de contaminants chimiques ont été considérées afin de disposer de conditions réalistes par opposition aux études de toxicité aiguë. Dans un premier temps, notre approche expérimentale a été développée dans une zone portuaire, le port de Boulogne sur mer, plan d'eau relativement calme caractérisé par la présence de plusieurs familles de composés chimiques. Afin de disposer d'un mode d'exposition en condition environnementale, une approche par mise en cage des organismes (« caging ») a été testée sur des juvéniles de bar et de turbot en juin 2009. Les résultats de cette expérience ont ensuite été comparés à une seconde étude réalisée en janvier 2010, en condition contrôlée, en exposant des juvéniles de turbots pendant 21 jours à du sédiment issu des mêmes stations de caging. En complément, deux lots

d'individus ont été exposés à du sédiment prélevé dans l'estuaire de la Seine, site représentatif d'un estuaire productif impacté par les activités humaines.

Dans une dernière partie, en complément des expériences de laboratoire et de caging, une étude de terrain a été réalisée sur des juvéniles de flet prélevés dans des estuaires plus ou moins anthropisés. Le flet a été choisi pour ses qualités d'espèce sentinelle reconnues par plusieurs programmes de biosurveillance. Une campagne a ainsi été menée en Octobre 2010 afin de prélever des juvéniles de flet du groupe 0 dans un estuaire en mer du Nord (l'Escaut), dans deux estuaires en Manche orientale (la Canche et la Seine) et dans un estuaire de la façade atlantique française (la Loire).

1.2 Espèces cibles

1.2.1 Le bar et le turbot

Le bar commun, *Dicentrarchus labrax*, (Figure 10) est une espèce démersale vivant dans la colonne d'eau et se nourrissant sur le fond et la colonne d'eau. Son aire de distribution s'étend, dans l'Atlantique Nord-Est, des côtes du Maroc au sud de la Norvège. Il est présent en Mer d'Irlande, Mer du Nord et Mer Baltique, et il colonise toute la Mer Méditerranée ainsi que la Mer Noire. Il peut être trouvé jusqu'à une centaine de mètres de fond, et jusqu'à environ 80 km des côtes. A l'éclosion, les larves mesurent environ 4 mm (Barnabé, 1976; Kennedy et Fitzmaurice, 1968). Arrivées en zone côtière, elles y passent environ 30 jours, le temps nécessaire pour atteindre le stade de développement correspondant à une taille de 10 mm (Jennings et Pawson, 1992). Les juvéniles pénètrent alors dans les zones estuariennes pour s'y développer où ils se nourrissent essentiellement de mysidacés, d'amphipodes et de larves de décapodes. En Manche et autour des îles britanniques, les juvéniles restent inféodés à leurs estuaires pendant au moins les trois premières années de leur vie.



Figure 10 : Juvénile de bar commun, *Dicentrarchus labrax*, de 7 cm et âgé d'environ 4 mois

Le turbot, *Scophthalmus maximus*, (Figure 11) est un poisson plat vivant sur les fonds de pierre, de graviers ou de vase. Son aire de distribution s'étend dans l'Atlantique Nord Est,

de la Méditerranée, le long de la côte Européenne jusqu'au cercle arctique ainsi qu'en Mer Baltique. A l'éclosion, les larves mesurent de 3 à 5 mm. Elles ont d'abord un comportement pélagique, vivant en pleine eau, symétriques et dotées d'une vessie gazeuse. Lorsqu'elles atteignent 15 mm, leur corps subit une métamorphose par rotation à 90° vers la gauche et elles passent alors à un mode de vie benthique (Aarab, 2004). Les juvéniles rejoignent le littoral où ils poursuivent leur développement. Les jeunes turbots vivent en eau peu profonde près des côtes et se nourrissent d'invertébrés benthiques. Au fur et à mesure qu'ils grandissent, ils s'éloignent des eaux littorales pour rejoindre les fonds importants (au maximum à 80-100 m de profondeur).



Figure 11 : Juvénile de turbot, *Scophthalmus maximus*, de 7 cm et âgé d'environ 4 mois

Ces deux espèces, le bar et le turbot, ont fait l'objet d'études antérieures qui ont permis d'acquérir des connaissances sur leur biologie et leur physiologie. Ils présentent une croissance rapide, particulièrement pendant les premières périodes de leur vie, et sont capables d'adapter leur physiologie en fonction des conditions environnementales (espèce euryèce). Ces caractéristiques expliquent pourquoi ces 2 espèces font l'objet d'élevages intensifs dont la production s'est développée en Europe depuis ces dernières années. Le bar a été le premier poisson marin à être élevé en Europe en conditions intensives (Barnabé *et al.*, 1976). La production d'alevins de bar et de turbot en France permet de disposer de juvéniles dont l'histoire est connue, ce qui est un élément essentiel en étude écotoxicologique. De part leur intérêt écologique (habitat), économique (maîtrise de l'élevage) et leur biologie (cycle de vie), le bar et le turbot représentent donc des modèles biologiques appropriés à la réalisation d'études portant sur les effets des contaminants chimiques. De plus, de par leurs différences de mode de vie, de comportement et de nutrition, l'utilisation complémentaire de ces deux

espèces permettraient d'explorer différents aspects des effets liés à l'exposition à des contaminants chimiques.

1.2.2 Le flet européen

Le flet, *Platichthys flesus*, (Figure 12) est un poisson plat très largement réparti en Atlantique Nord-Est et en Méditerranée. Ce poisson benthique vit sur les fonds sableux, sablo-vaseux et vaseux des eaux marines. A l'éclosion, la larve pélagique atteint 2-3 mm et dérive vers les zones côtières et estuariennes. La métamorphose est observée quand la larve atteint 7-12 mm et acquiert un comportement benthique. Les poissons juvéniles resteront approximativement 2 ans en estuaire, en présentant une migration vers la partie aval de l'estuaire en période hivernale (induite par la température plus élevée et moins fluctuante en profondeur), et une migration d'origine trophique vers l'amont au printemps.

Le flet est un poisson qui possède des capacités d'adaptation qui lui permettent de survivre dans des sites contaminés et très diversifiés. Il possède ainsi les qualités premières d'une espèce sentinelle (large répartition, abondance, grande résistance). Dans l'estuaire de la Seine, le flet a été sélectionné comme modèle de par son comportement benthique associé à ses déplacements limités qui font que c'est un organisme, à ce stade, qui intègre très bien les modifications environnementales de son habitat et est particulièrement affecté en cas de pollution du milieu (Smith et Suthers, 1999; Able *et al.*, 1999). Plusieurs travaux ont ainsi été menés sur l'impact de la contamination chimique sur cette espèce, dans différents estuaires de la façade Atlantique française (Cossa *et al.*, 1992; Amara *et al.*, 2009; Evrard *et al.*, 2010; Marchand *et al.*, 2010).



Figure 12 : Juvénile de flet commun, *Platichthys flesus*, de 8 cm, âgé d'environ 5 mois.

1.3 Simulation d'un déversement pétrolier sur des juvéniles de bar : analyse en conditions contrôlées

1.3.1 La contamination : le pétrole

Lors de cette étude, des juvéniles de bar ont été exposés à 20 g de pétrole léger Arabian light étêté à 110°C (BAL 110). Ce pétrole a été sélectionné selon sa composition chimique proche de celle d'hydrocarbures qui ont été déversés dans le milieu marin suite à des catastrophes pétrolières comme celle de l'Amoco-Cadiz en 1978. Ses caractéristiques physico-chimiques sont les suivantes : 0,860 de densité à 20°C, 60 mP de viscosité à 15°C, 12% de composés polaires, 34% d'hydrocarbures aromatiques et 54% d'hydrocarbures saturés.

1.3.2 Les bars

Les expositions ont été effectuées sur des juvéniles de bar, *Dicentrarchus labrax* (4 mois; $4,87 \pm 0,83$ g; $73,8 \pm 4,1$ mm) obtenus d'une écloserie (Aquanord, Gravelines) et transportés au laboratoire. Les 200 poissons nécessaires pour l'exposition, ont été acclimatés pendant une semaine à $13 \pm 0,5^\circ\text{C}$ dans une cage de 150 L placée dans un bassin alimenté par un système ouvert de circulation d'eau de mer filtrée au charbon en photopériode naturelle. Les paramètres physico-chimiques (température, salinité, oxygène, pH) ont été relevés quotidiennement à l'aide d'une sonde multiparamétrique. Les poissons ont été nourris *ad libitum*, deux fois par jour avec des granulés commercialisés (Biomar S.A., Bio-Optimal Start N° 1.5). Avant exposition, la moitié des juvéniles de bar a été individuellement marqués avec des implants visuels (tags VI alpha, Northwest Marine Technology), pesés (à 0,01 g près) et mesurés (longueur totale à 0,1 mm près).

1.3.3 Conditions d'exposition au pétrole

Les expositions ont été réalisées dans des bacs de 300 L. Chaque bac est équipé d'une pompe à eau Johnson L450 pour permettre un mouvement d'eau facilitant la dispersion du pétrole. Le tuyau de sortie de la pompe est placé horizontalement dans la colonne d'eau à quelques centimètres du fond pour produire un mouvement de rotation lent de l'eau dans le bac. Un système d'entonnoir est connecté à l'entrée de la pompe et placé à la surface de l'eau pour récupérer le pétrole remonté à la surface. De plus, une barre métallique courbée est placée à la surface de l'eau pour entraîner le pétrole vers l'entonnoir (Figure 13). La dispersion mécanique du pétrole a été réalisée en ajoutant 20 g de pétrole dans l'entonnoir. Pour la condition contrôle (CTRL), le même dispositif expérimental a été utilisé. Chacune de

ces deux conditions (CTRL et PETROLE) a été réalisée en duplicat, un total de 4 bacs a donc été utilisé. Une fois le pétrole versé, le système est laissé en fonctionnement 24 h avant l'entrée des poissons afin de stabiliser au maximum la concentration du pétrole dans la colonne d'eau.

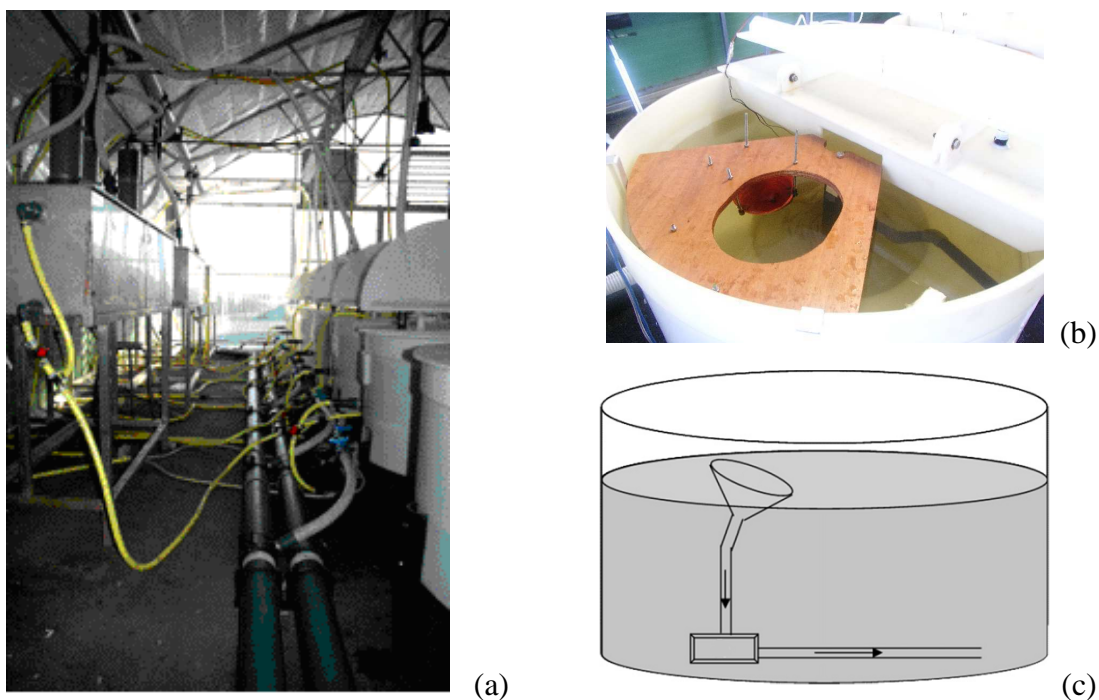


Figure 13 : (a) serre expérimentale du CEDRE, (b) bassin d'exposition de 300 L, le système expérimental est constitué d'un entonnoir lié à une pompe, (c) les flèches dans le schéma indique la direction du mouvement de l'eau de mer et/ou du pétrole (Milinkovitch *et al.*, 2011).

1.3.4 Exposition

Pour chaque bac, 20 poissons non marqués et 20 poissons marqués ont été distribués aléatoirement. Les conditions d'exposition (température, eau de mer, photopériode) utilisées étaient les mêmes qu'en acclimatation. Un nombre de 10 poissons, non marqués, par bac a été prélevé à deux temps de prélèvement : 48 h (t_{48}) et 96 h (t_{96}). A t_{48} et t_{96} , dix autres poissons marqués par bac ont été transférés dans de l'eau de mer claire pendant 26 et 28 jours respectivement dans les mêmes conditions qu'en acclimatation. Pour chacun des bacs, 5 prélèvements d'eau ont été effectués quotidiennement dans des flacons en verre de 100 mL pour le dosage des concentrations en hydrocarbures et conservés à l'obscurité.

1.4 Effets d'une pollution multiple de contaminants chimiques sur des juvéniles de bar et de turbot : analyses en conditions contrôlées et semi-contrôlées

1.4.1 Site d'étude : le port de Boulogne sur Mer

Le port de Boulogne-sur-Mer, situé sur le littoral occidental du Pas-de-Calais, est implanté au débouché de la rivière Liane sur la Manche Orientale. Le port s'étend sur une surface totale de 4,6 km², en incluant la rade délimitée au Nord par la digue Nord et à l'Ouest par la digue Carnot. C'est un site polyvalent où cohabitent entreprises agro-alimentaires (dont l'activité principale est la transformation des produits de la pêche), métallurgiques de ferromanganèse (cessation d'activité en 2005) et entrepôts de stockage (produits de la mer et du bois). L'activité maritime s'articule autour de trois secteurs :

- la pêche (Boulogne-sur-Mer est le premier et le plus grand port de pêche française) et la filière des produits de la mer,
- le trafic de passagers et de voitures de tourisme avec l'Angleterre,
- le commerce, tourné vers le trafic de ciment, de papier et de pâte à papier, de bois et de contre-plaqué.

Le port reçoit de nombreux contaminants acheminés par la Liane mais aussi les nombreux points de déversement des eaux usées.

Le port de Boulogne-sur-Mer est constitué (Figure 14) :

- d'une rade, occupant la partie Nord du chenal de navigation,
- du port extérieur comprenant un poste roulier, situé derrière la digue Carnot,
- du port intérieur, accessible par un chenal endigué essentiellement réservé à l'usage des pêcheurs fileyeurs, des plaisanciers ou des liaisons éventuelles ou existantes transmanche et formé d'un port de marée (pêche et plaisance) avec avant-port (terminal ferries) et de trois bassins à flot : Napoléon (réparation navale, pêche, plaisance), Loubet (pêche) et Frédéric Sauvage (plaisance).

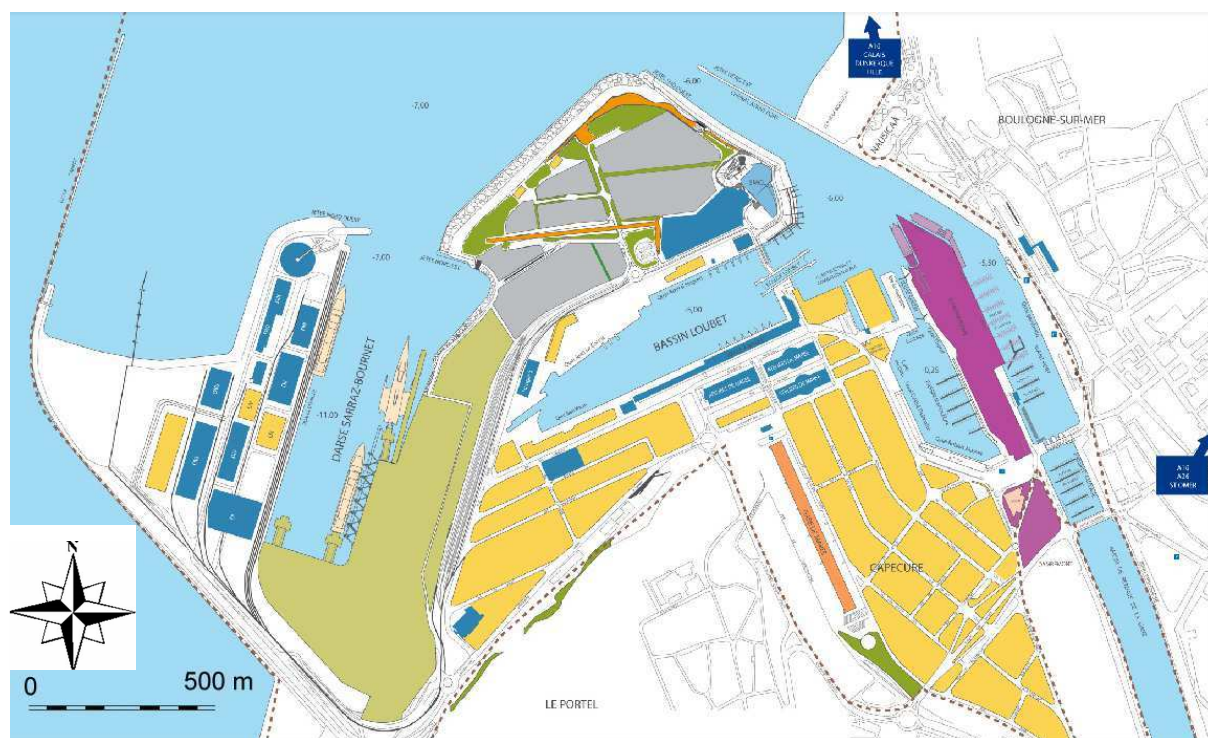


Figure 14 : Schéma du port de Boulogne sur Mer, Pas de Calais . Le port s'étend sur une surface totale de 4,6 km², en incluant la rade délimitée au Nord par la digue Nord et à l'Ouest par la digue Carnot.

Afin de permettre l'accès aux installations portuaires et d'assurer la sécurité des navires entrant et sortant, le Service Maritime des ports de Boulogne-sur-Mer et Calais (SMBC) effectue tout au long de l'année des dragages pour entretenir les profondeurs.

Les matériaux dragués sont évacués en mer sur un site de dépôt utilisé depuis de nombreuses années (pour un volume moyen de 350 000 m³ composés de sables, de vases sableuses et de vases) et pour lequel un permis d'immersion a été accordé le 13 décembre 2000 par la Préfecture du Pas-de-Calais autorisant le port de Boulogne-sur-Mer à rejeter en mer les déblais de dragages d'entretien, sous respect des analyses chimiques compatibles avec une immersion, de créneaux de clapage et de suivis (zones portuaires et d'immersion).

1.4.2 Exposition par caging de juvéniles de bar et de turbot dans un milieu portuaire

Les poissons

Les juvéniles de bar, *Dicentrarchus labrax* (3 mois; 2,84 ± 0,79 g; 64,2 ± 6,3 mm) ont été fournis par l'écloserie marine de Gravelines (Gravelines) et les juvéniles de turbot, *Scophthalmus maximus* (3 mois; 4,62 ± 0,72 g; 67,1 ± 3,4 mm), par France Turbot

(Noirmoutier, 85). Un nombre de 65 juvéniles de bar et 63 juvéniles de turbot ont été acclimatés dans un bassin de 2,7 m³ alimenté en eau de mer pendant 2 semaines avant l'expérience de caging. Les bars ont été mis en cage dans le bassin d'acclimatation afin de les séparer des turbots. Un système de bullage a été placé dans le bassin, la photopériode a été réglée à 10 h jour et 14 h nuit et le suivi des paramètres physico-chimiques a été effectué quotidiennement. Pendant l'acclimatation, la température de l'eau était de $13 \pm 1^\circ\text{C}$ et les poissons ont été progressivement nourris avec des artemias et des morceaux de crevettes et de moules pour les habituer à la consommation de proies naturelles. La veille de l'exposition, les poissons ont été individuellement marqués avec des implants visuels (tags V1alpha, Northwest Marine Technology), pesés (à 0,01 g près) et mesurés (longueur totale à 0,1 mm près). Pour chaque espèce, 15 poissons ont été prélevés avant la mise en place des cages afin d'établir une référence t_0 avant exposition.

Placement des cages

Les cages ont été mises en place en juin 2009 dans le port de Boulogne sur Mer. Trois emplacements ont été sélectionnés : station A près de la digue Carnot à l'avant du port ($50^\circ44'24.87''\text{N}$, $1^\circ34'07.02''\text{E}$), station B au niveau du quai de l'Europe ($50^\circ43'31.82''\text{N}$, $1^\circ34'25.73''\text{E}$) et la station C dans le bassin Loubet ($50^\circ43'28.20''\text{N}$, $1^\circ34'56.12''\text{E}$) (Figure 15). Initialement, une station supplémentaire située à l'extérieur du port avait été envisagée mais les conditions météorologiques et hydrodynamiques n'ont pas permis ce placement.

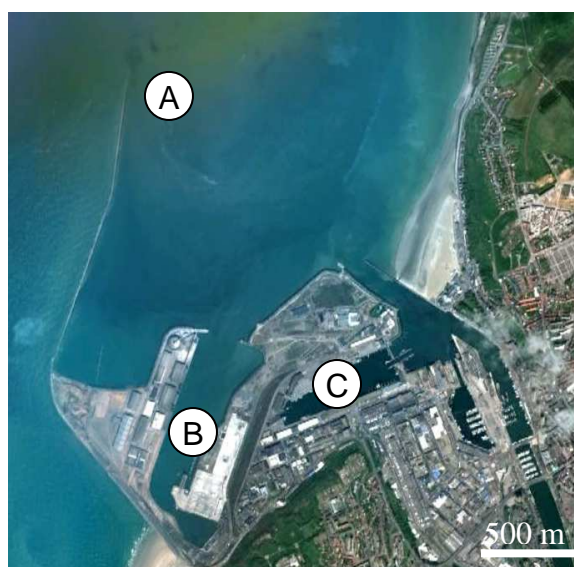


Figure 15 : Localisation des sites de caging dans le port de Boulogne sur Mer.

Les cages utilisées pour cette étude ont été construites afin de permettre un volume suffisant pour le bien être des poissons, un maillage suffisamment espacées pour limiter le colmatage et assurer une bonne circulation de l'eau, et donc une bonne oxygénation, et des apports de nourriture (proies) pour les poissons. La conception des cages a été pensée en fonction du comportement et du mode de vie des espèces étudiées (Figure 16). Des cages cylindriques (0,7 m de hauteur, 0,65 m de diamètre, 230 L de volume) en maille de 7 mm de côté ont été utilisées pour les bars. Des cages rectangulaires (0,9 m de longueur, 0,6 m de largeur et 0,3 m de hauteur, 160 L de volume) en maille de 10 mm de côté ont été choisies pour les turbots, espèce benthique, afin d'augmenter la surface de contact entre cage et sédiment.

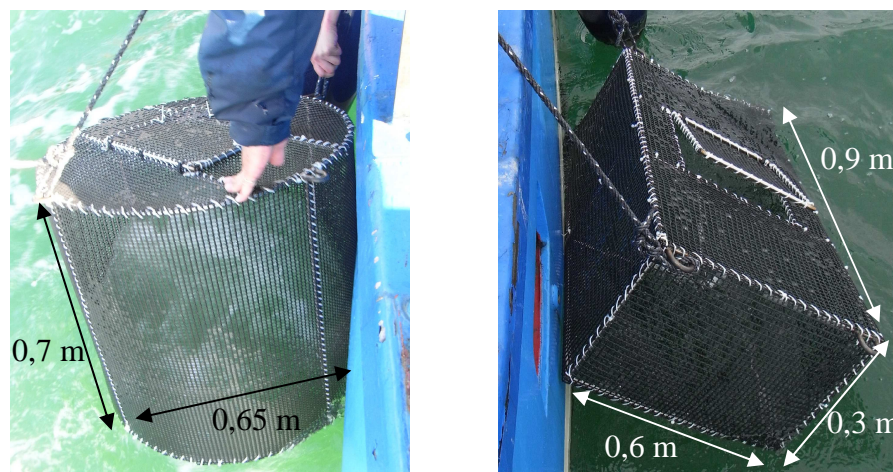


Figure 16 : Cage cylindrique des bars et cage rectangulaire des turbots utilisées pour l'expérience de caging.

A chaque station, les deux types de cages ont été immergées après y avoir placés aléatoirement les poissons marqués. Elles ont été fixées sur le sédiment par des ancrs à vis « Skrew anchor » à l'aide de plongeurs scientifiques et le fond des cages a été recouvert de sédiment. Initialement, le nombre de poissons par cage pour chaque espèce était fixé à 18 mais du fait de la fuite de certains poissons sous des conditions météorologiques difficiles, 15 bars et 17 turbots ont été placés à la station A, 18 bars et 16 turbots à la station B et 17 bars et 15 turbots à la station C (Figures 17 et 18). Les paramètres physico-chimiques (température, salinité, oxygène et pH) ont été mesurés et environ 1 L de sédiment a été prélevé pour l'analyse des contaminants chimiques. Les poissons n'ont pas été nourris pendant cette période d'exposition. L'analyse des contenus stomacaux a montré qu'ils ont pu se nourrir avec les proies naturellement disponibles dans la zone d'étude. Deux semaines après leur

placement, les cages ont été remontées en surface pour contrôler l'état des poissons et des cages. Dans la station la plus interne au port, C, tous les bars et turbots ont été retrouvés morts (arêtes retrouvées dans les cages). Pour les deux autres stations, les poissons étaient vivants. Les cages ont été rapidement nettoyées et replacées pour environ 3 semaines supplémentaires. Après les 38 jours d'exposition, les poissons ont été rapidement transférés au laboratoire (en 2 h).

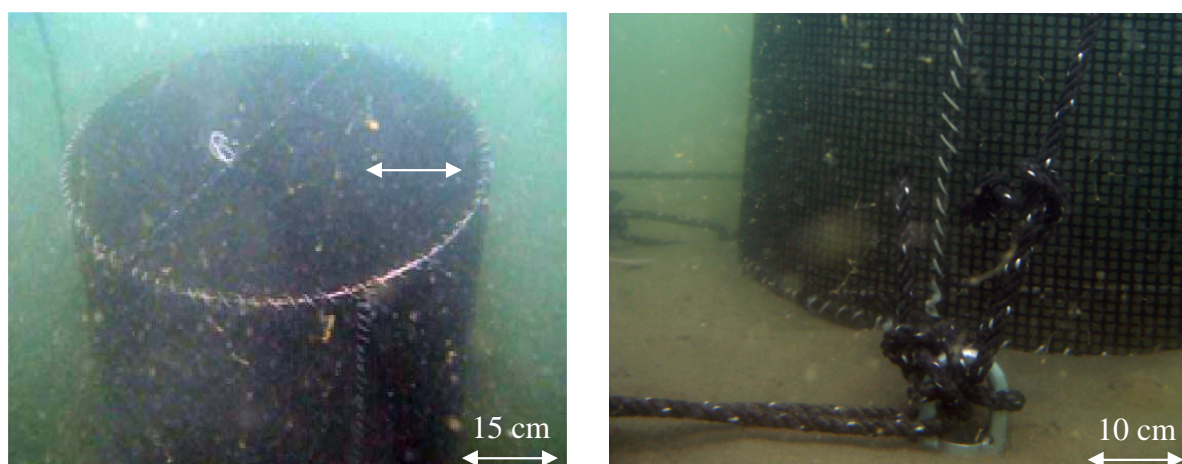


Figure 17 : Fixation des cages sur le sédiment par les plongeurs scientifiques à l'aide d'ancre à vis « Skrew anchor », station A.

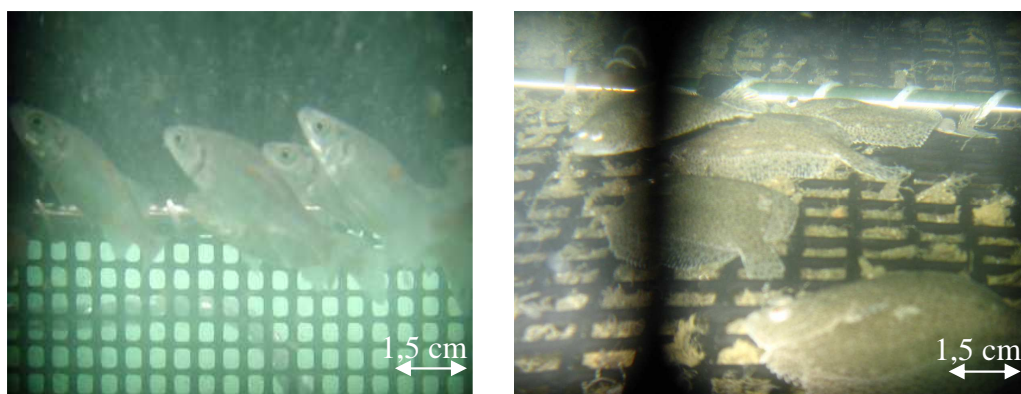


Figure 18 : Conditions d'exposition par caging des bars et turbots dans la station A.

1.4.3 Exposition de juvéniles de turbot à des sédiments portuaires et estuariens en condition de laboratoire

Prélèvements de sédiment

Les sédiments sélectionnés pour cette étude proviennent de cinq sites côtiers, estuariens ou portuaires. Les prélèvements ont été effectués en janvier 2010. Pour chacun des sites, un volume d'environ 15 L de sédiment a été échantillonné. Un premier prélèvement a été réalisé

en aval de l'estuaire de la Seine (la vasière nord, 49°26'44.64"N; 0°15'01.94" E), estuaire considéré comme fortement influencé par les activités anthropiques (Figure 19). Le sédiment (10 premiers cm) a été prélevé à pied à marée basse. Trois autres prélèvements ont été effectués dans le port de Boulogne sur Mer au niveau des mêmes stations que l'expérience précédente (caging). Un premier prélèvement a été effectué aux abords immédiats du port, près de la digue Carnot (H-A) (50°44'23.64" N; 1°34'15.96" E), un second au niveau du quai de l'Europe (H-B) (50°43'33.18" N; 1°34'28.98" E) et le dernier dans le bassin Loubet (H-C) (50°43'30.60" N; 1°35'03.90" E). Deux coups de benne de type Van Veen (surface d'échantillonnage 250 cm²) ont été réalisés pour chaque station. Ces boues portuaires ont été prélevées en prenant soin de ne pas prendre la fraction en contact avec la benne afin d'éviter toute contamination métallique. Le dernier prélèvement a été effectué à Wimereux (50°45'52.91"N; 1°36'15.56"E) dans une zone faiblement soumise à la contamination chimique afin de considérer ce prélèvement comme site témoin appelé ultérieurement site « control ».

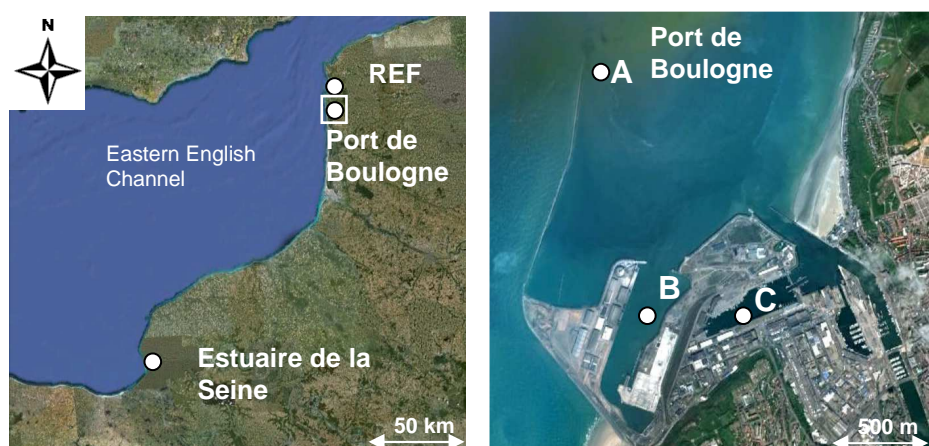


Figure 19 : Localisation des sites de prélèvements dans le port de Boulogne sur Mer (3 prélèvements), dans la vasière nord de l'estuaire de la Seine (1 prélèvement) et sur la plage de Wimereux (1 prélèvement).

Exposition des turbots

Les 213 juvéniles de turbot (4 mois; $6,8 \pm 0,72$ g; $75 \pm 3,3$ mm) proviennent d'une éclosérie commerciale (France Turbot, Groupe Adrien, Noirmoutier, France). L'exposition a été réalisée dans une chambre thermostatée réglée à 14°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) et une période d'acclimatation de 12 jours a été respectée avant l'exposition aux sédiments. Durant l'acclimatation et toute la durée de l'exposition, les poissons ont été nourris une fois par jour manuellement à 1% du poids de l'individu moyen sous forme de granulés. Avant le début de

l'exposition, les juvéniles ont été pesés, mesurés (longueur totale et hauteur du corps) et marqués avec des implants visuels (Tags VI alpha, Northwest Marine Technology).

Cinq litres de sédiments de chacun des sites de prélèvement ont été placés dans des aquariums en verre de 37 L (2 aquariums par condition) et 25 L d'eau de mer ont été ajoutés. Une décantation de 48 h a été réalisée avant l'ajout des poissons (Figure 20). Quinze turbots acclimatés ont ensuite été répartis aléatoirement dans chacun des 10 aquariums contenant les sédiments, au total donc 30 turbots par condition. L'exposition a été réalisée en circuit fermé durant 21 jours, avec une aération constante par système de bulleur. Un tiers du volume d'eau de mer total a été renouvelé quotidiennement pour chaque aquarium, en prenant soin de limiter la remise en suspension des particules sédimentaires et les facteurs de stress. Les paramètres physicochimiques de chaque bassin ont été mesurés chaque jour à la même heure, avant l'alimentation et avant le changement d'eau (température, salinité, conductivité, O₂ dissous, pH, turbidité) à l'aide d'une sonde multiparamétrique. La photopériode a été réglée à un cycle de 10:14 h (jour:nuit).

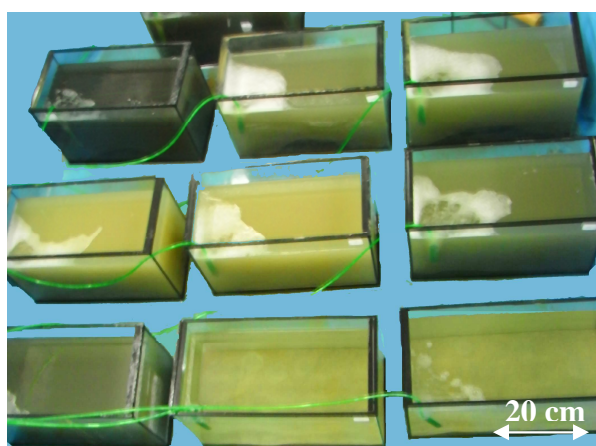


Figure 20 : Conditions d'exposition des juvéniles de turbots (75 mm) aux sédiments issus des trois sites d'étude : un sédiment de wimereux, un sédiment de la vasière nord de la Seine et trois sédiments prélevés dans le port de Boulogne sur mer.

Le jour du début de l'exposition, 15 turbots ont été prélevés aléatoirement et sacrifiés afin d'obtenir un état de référence, t_0 , des différents paramètres physiologiques analysés. Des prélèvements de 15 individus ont ensuite été effectués après 7 et 21 jours d'exposition pour chaque condition (t_7 et t_{21}). La capture des individus était aléatoire et équitablement répartie entre les aquariums répliqués afin d'y conserver des densités similaires.

Expérience supplémentaire : effet du jeune

L'ensemble des paramètres physiologiques étudiés étant sensible à l'état nutritionnel du poisson, il est nécessaire pour pouvoir interpréter les mesures obtenues de les comparer à celles correspondant à un état de stress sévère. Pour cela, une expérience supplémentaire a été réalisée en même temps que la précédente en privant les turbots de nourriture. Un nombre de 48 turbots a ainsi été distribué dans deux aquariums comprenant le même sédiment que celui du contrôle (sédiment de Wimereux). Les conditions expérimentales ont été rigoureusement identiques à celles décrites précédemment pour l'exposition des juvéniles au sédiment contaminé et aucune nourriture n'a été donnée pendant les 21 jours d'expérience. Des prélèvements de 12 turbots ont été réalisés après 2, 7, 10 et 21 jours d'expérience.

1.5 Effets des contaminants chimiques sur l'état de santé de juvéniles de flet : analyse in situ

1.5.1 Zones d'études

Des prélèvements de juvéniles de flet ont été effectués en octobre 2010 dans différents estuaires situés : au sud de la mer du Nord (Escaut), en Manche orientale (Canche, Seine) et sur la façade Atlantique (Loire) (Figure 21).



Figure 21 : Localisation des quatre estuaires (Escaut, Canche, Seine et Loire) dans lesquels les juvéniles de flets (5-10 cm) ont été prélevés.

L'estuaire de l'Escaut

L'Escaut (*de Schelde* en néerlandais) est un fleuve européen de 355 km de long, qui traverse 3 pays (France, Belgique et Pays-Bas) et 5 régions, avant de se jeter en mer du Nord. Son bassin versant s'étend sur plus de 20 000 km² (dont 15 328 km² en Belgique, soit plus de 50% de la surface de ce pays). L'estuaire est soumis à une très forte densité humaine et à une industrialisation ancienne. Les secteurs industriels les plus représentés (en nombre d'entreprises) sont ceux de l'industrie alimentaire et de l'industrie des métaux. L'estuaire de l'Escaut est également soumis à une agriculture intensive (priviliégiant les cultures dans le sud du district et dans la partie néerlandaise et l'élevage en Région Flamande). Il est également sous l'influence des activités portuaires de quelques ports importants, dont celui d'Anvers qui est le deuxième port d'Europe et également l'un des plus grands au niveau mondial. Plus de 130 millions de tonnes de marchandises y sont transbordées chaque année (District hydrographique international de l'Escaut).

L'estuaire de la Canche

L'estuaire de la Canche est situé dans le département du Pas de Calais, au sud de Boulogne et se jette dans la Manche orientale. Le fleuve Canche, long de 85 km, draine un bassin versant de 1274 km². Il s'agit d'un petit estuaire long de 10 km environ et large de 1,5 km en son embouchure. Bien que la longueur de son cours soit modeste, la Canche bénéficie de l'apport de nombreux affluents et d'un débit élevé (15 m³.s⁻¹). Avec près de 48% du littoral qui est urbanisé ou industrialisé, la région Nord-Pas de Calais figure parmi les plus urbanisées. Cette région est également la seconde zone côtière la plus peuplée de France avec près de 700 habitants/km². Malgré toutes les pressions anthropiques rencontrées dans la région, la partie au sud de Boulogne sur mer se voit un peu plus épargnée par ces aménagements. Par conséquent, cet estuaire demeure peu soumis aux fortes perturbations anthropiques. De récents travaux ont d'ailleurs décrit les habitats côtiers à proximité de l'estuaire de la Canche étant de bonne qualité et peu anthropisés (Amara *et al.*, 2007; Courrat *et al.*, 2009) en comparaison aux zones portuaires de Dunkerque, Calais et Boulogne. Cet estuaire a ainsi été considéré comme estuaire de référence lors de notre étude.

L'estuaire de la Seine

L'estuaire de la Seine, situé dans la partie nord ouest des côtes françaises, débouche dans la Manche par l'intermédiaire de la Baie de Seine. Long de 776 km, le fleuve draine avec ses affluents (Aube, Yonne, Marne, Oise et Eure) un bassin hydrographique couvrant une

superficie de 78 900 km² jusqu'à Tancarville, soit 15 % du territoire français, représentant à lui seul 40 % de l'activité économique française, 20 % de l'activité agricole et 30 % de la population nationale, soit 17 millions d'habitants. Quant au trafic fluvial du fleuve, il représente 50 % du trafic total français (Dange, 2002). Du fait de ces particularités, la Seine se trouve fortement soumise aux rejets d'origine anthropique, en particulier ceux provenant du bassin parisien. Les apports d'origine anthropique sont multiples. La Seine reçoit à Archères les rejets de la station d'épuration de l'agglomération parisienne. Deux autres grandes villes sont situées dans sa partie estuarienne : Rouen à 130 km en amont et Le Havre à l'entrée. A eux deux, les ports autonomes des agglomérations havraise et rouennaise constituent le plus grand complexe portuaire français avec un trafic total annuel de 75 millions de tonnes (Dange, 2002). Malgré les normes de rejet de plus en plus contraignantes, les industries qui y sont regroupées (usines chimiques, complexes pétrochimiques...) continuent à alimenter l'estuaire en polluants organiques et métalliques (rejets acides, hydrocarbures, métaux...). En raison d'un niveau de pollution important de l'estuaire, un suivi de sa contamination a été entrepris depuis plusieurs années dans le cadre du programme Seine Aval lancé en 1995.

L'estuaire de la Loire

Avec un cours long de 1000 km, la Loire constitue le plus grand fleuve français et la principale source d'apports de matériel d'origine continentale à la façade Atlantique européenne. Le bassin versant de la Loire est essentiellement agricole en amont de l'estuaire, seule la zone interne de l'estuaire est fortement urbanisée et industrialisée. L'essentiel des activités industrielles se situe au niveau de l'estuaire interne entre Nantes et Saint-Nazaire (zones portuaires, raffineries pétrolières, industries chimiques). A ce titre, des aménagements ont été réalisés pour faciliter le passage des grands navires à destination des ports de ces agglomérations et extraire, en amont, les sables et les graviers. Ces travaux ont changé fondamentalement la morphologie de l'amont de l'estuaire en provoquant notamment une progression vers l'amont des eaux marines et de la turbidité. Aux importantes sources de polluants que constituent ces activités industrielles s'ajoutent les rejets domestiques des deux agglomérations et les déversements urbains et industriels des autres grandes villes situées dans l'estuaire : Couéron, Cordemais et Donges (Dange, 2002). Les études des niveaux de contamination métallique menées en Loire depuis une vingtaine d'années ont montré l'existence au sein de l'estuaire d'une forte pollution en plomb d'origine industrielle (Boutier *et al.*, 1993). Les travaux relatifs au mercure ont fait apparaître une contamination non

négligeable de l'estuaire à ce métal, sans toutefois présenter un taux de pollution aussi élevé que dans l'estuaire de la Seine (Cossa *et al.*, 1992).

1.5.2 Échantillonnage

Pour les estuaires de la Canche, la Seine et l'Escaut, un petit chalut à perche a été utilisé pour pêcher les flets (Figure 22). Il possède une ouverture horizontale de 1,5 mètre, une ouverture verticale de 0,4 mètre et un maillage en trois parties. L'entrée de chalut est constituée d'une maille de 10 mm, la partie intermédiaire d'une maille de 8 mm et le cul d'un maillage de 5 mm. Le chalut est tracté par une embarcation de type zodiac, équipée d'un moteur de 40 chevaux, à vitesse constante de 2 noeuds et toujours face au courant. La durée de traîne a été fixée à 15-20 minutes, représentant une surface échantillonnée d'environ 1000 m². Les coordonnées de départ et de fin de chalutage sont enregistrées à l'aide d'un GPS, permettant de calculer la distance effectuée. Les paramètres physico-chimiques ont été relevés pour chaque traîne. En fonction du nombre de flets pêchés pour chaque traîne, elles ont été répétées jusqu'à obtenir un nombre suffisant de flets de taille comprise entre 7 et 9 cm pour les analyses biologiques et chimiques. Les flets ont été immédiatement stockés dans de la glace et congelés à -20°C au retour en laboratoire. Du sédiment a été prélevé à pied en s'échouant à marée basse sur les bancs.

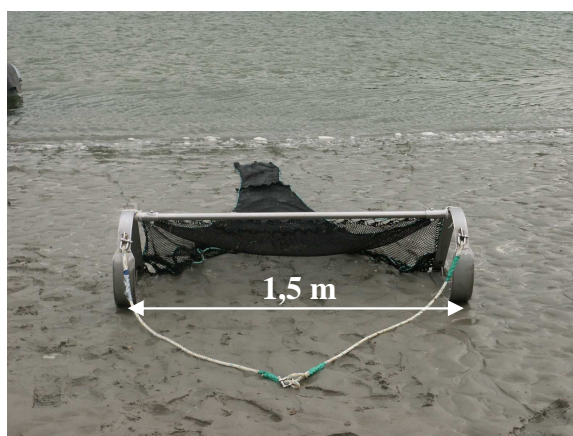


Figure 22 : Chalut à perche utilisé pour l'échantillonnage des juvéniles de flet (5-10 cm). Il possède une ouverture horizontale de 1,5 mètre, une ouverture verticale de 0,4 mètre et un maillage en trois parties d'un maillage de 5 à 10 mm.

Pour l'estuaire de la Loire, nous avons fait appel à un pêcheur professionnel. La pêche a été réalisée de nuit, avec un chalut de fond à panneaux. Il s'agit d'un chalut de fond remorqué par un bateau et dont l'ouverture horizontale est assurée par des panneaux divergents,

relativement lourds et munis d'une semelle d'acier prévue pour un contact accentué avec le fond.

1.6 Synthèse des expériences et analyses effectuées

Les conditions d'expérimentation des quatre expériences présentées précédemment sont décrites dans le Tableau 1. Les analyses réalisées au cours de ces expériences sont résumées dans le tableau 2.

Tableau 1 : Résumé des quatre études réalisées au cours de ce travail de thèse.

	1	2	3	4
Période	mars-avr-09	juin-juil-09	janv-fev-10	oct-10
Méthode	labo	caging	labo	<i>in situ</i>
Contamination / sites d'étude	pétrole	port de Boulogne sur mer	sédiments : port BL - Seine	Escaut, Canche, Seine, Loire
Eespèce	bar	bar turbot	turbot	flets
Taille (mm)	74	67 67	75	74
Poids (g)	4,8	2,8 4,6	6,8	4,5
Durée d'exposition	2 et 4 jrs	38 jrs	7 et 21 jrs	Age : 3-6 mois
Décontamination	28 et 26 jrs	-	-	-

Tableau 2 : Synthèse des différentes analyses réalisées au cours des quatre études : 1) exposition de juvéniles de bar, *Dicentrarchus labrax*, à du pétrole, 2) mise en cage de juvénile de bar et de turbot, *Scophthalmus maximus*, dans le port de Boulogne sur mer, 3) exposition de juvéniles de turbot à des sédiments contaminés et 4) prélèvement de flets, *Platichthys flesus*, dans trois estuaires français et un estuaire belge.

		paramètres mesurés	conservation	1	2	3	4
Analyse de l'eau	Hydrocarbures particulaires		4°C, noir	X			
	HAPs		4°C, noir	X			
Analyse sédimentaire	Granulométrie		T° ambiante		X	X	
	Matière organique		-20°C		X	X	
	HAPs, PCBs		-20°C		X	X	X
	métaux	fraction totale	-20°C		X	X	X
fraction réactive		-20°C		X	X	X	
Contaminants dans les organismes	HAPs	corps	-20°C	X			
	métabolites HAPs	bile	-80°C			X	
	métaux	branchies	-20°C		X	X	X
		foie	-20°C				X
Biomarqueurs moléculaires	EROD	foie	-80°C	X	X	X	
	GST	foie	-80°C	X	X	X	
	CAT	foie	-80°C	X	X	X	
Biomarqueurs physio	Croissance en poids		organisme vivant	X	X	X	
	Croissance en longueur		organisme vivant	X	X	X	
	Croissance récente	otolithe	ethanol (95%)	X	X	X	
	analyse de forme	otolithe	ethanol (95%)				X
	Indice de condition K		organisme vivant ou -20°C	X	X	X	X
	ARN:ADN	muscles	-20°C	X	X	X	
	TAG:ST	muscles	-20°C	X	X	X	X
Biomarqueurs immuno	volume	thymus	formol (4%)			X	
	MMC	rate	formol (4%)			X	
	TGF-b	plasma	-80°C			X	
Biomarqueurs histologiques	anomalies	branchies	formol (10%)	X			
Radiographie	anomalies	colonne vertébrale	-20°C		X		

2. Analyses physico-chimiques

2.1 Paramètres hydrologiques et sédimentaires

2.1.1 Sonde multiparamétrique et turbidimètre

Les analyses physico-chimiques de l'eau de mer lors des expériences d'exposition en laboratoire et des expériences de terrain ont été réalisées avec une sonde Multiparamétrique HANNA Instruments HI 9828. Cette sonde est équipée d'un capteur d'oxygène dissous galvanique, d'un capteur de conductivité 4 anneaux et d'un capteur de pH qui possède un verre sensible aux ions H^+ . Muni d'un microprocesseur, elle permet ainsi de mesurer différents paramètres hydrologiques comme l'oxygène dissous ($mg.L^{-1}$ et % de saturation), la salinité (PSU), le pH et la température ($^{\circ}C$).

La turbidité a été évaluée avec un turbidimètre de terrain EUTECH Instruments TN-100/T-100. Ce turbidimètre respecte la norme internationale ISO 7027 qui nécessite l'utilisation d'une source lumineuse monochromatique. Le système optique de base du turbidimètre est constitué d'une source lumineuse et d'un détecteur pour mesurer la lumière dispersée à 90° par rapport au faisceau incident. La mesure est effectuée en unité de turbidité néphélométrique (NTU), unité de mesure reconnue comme étant une mesure de la clarté optique d'un échantillon aqueux.

2.1.2 Granulométrie

La taille des particules des sédiments prélevés a été analysée sur trois aliquots humide de chaque sédiment étudié. Pour chaque échantillon, les teneurs en vase ($< 50 \mu m$), sable fin ($50-200 \mu m$), sable moyen ($50-200 \mu m$) et sable grossier ($> 500 \mu m$) ont été déterminées à partir d'un granulomètre laser de type Coulter Counter LS 230. La granulométrie laser permet de déterminer la taille des particules en suspension dans un liquide ou dans l'air en se basant sur le principe diffraction laser qui veut que lorsqu'un faisceau laser éclaire une particule, on peut observer des franges de diffraction. L'intensité du rayonnement diffracté et l'angle de diffraction sont fonction de la taille des particules. Plus la particule est petite, plus l'angle de diffraction est important (Figure 23).

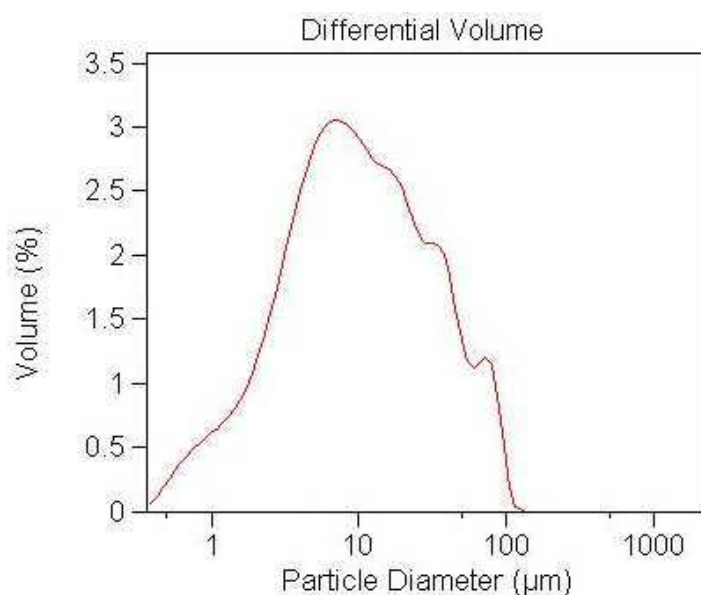


Figure 23 : Distribution des tailles de particules dans un échantillon de sédiment, déterminé avec un granulomètre Coulter Counter LS 230 : exemple du sédiment B dans le port de BL.

2.1.3 Matière organique

Le pourcentage de matière organique a été déterminé sur un échantillon de sédiment sec d'environ 2 g broyé à la main avec un mortier en agate. L'échantillon est séché à l'étuve à 40°C pendant 24 h jusqu'à poids constant et calciné à 450°C pendant 5 h. Le pourcentage de matière organique est calculé par différence des poids sec et calciné. La détermination du carbone et azote organique total (COT et NOT) a été réalisée par la méthode de Dumas avec un analyseur CHN. Cette méthode nécessite d'une part, le dosage du carbone et azote total après la combustion sèche et d'autre part la détermination du carbone et azote inorganique total après calcination. Le carbone et l'azote organique sont alors obtenus par le calcul de la différence entre le carbone et l'azote total et le carbone et l'azote minéral, respectivement. La norme NF ISO 10694 décrit cette méthode. La technique du CHN présente l'avantage de doser deux éléments, le carbone et l'azote, lors d'une même analyse. L'analyse avec cet appareil s'effectue sur de très faibles prises d'essai, 25 mg. L'échantillon est conditionné dans des capsules d'étain qui ont la propriété d'augmenter rapidement la température de 300°C. L'analyse élémentaire par combustion utilise deux tubes installés en série dans une enceinte calorifugée, chaque tube pouvant être chauffé indépendamment (Figure 24).

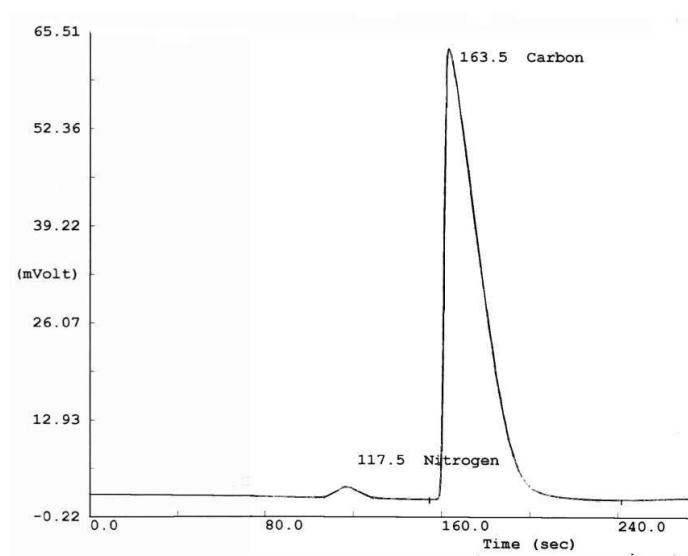


Figure 24 : Détection du carbone et de l'azote au CHN dans un échantillon de sédiment : exemple du sédiment C du port de BL.

2.2 Dosage des hydrocarbures dans la colonne d'eau

2.2.1 Hydrocarbures particuliers totaux

Les concentrations en hydrocarbures particuliers totaux représentent la somme des concentrations en hydrocarbures dissous ainsi que la quantité de gouttelettes de pétrole présentes dans la colonne d'eau. Cette analyse a été réalisée par extraction liquide-liquide. Le flacon contenant le prélèvement d'eau est déversé dans une ampoule à décanter. Les hydrocarbures sont extraits par 10 mL de dichlorométhane (99,8 %, Carlo Erba Reactifs, SDS) qui est ajouté dans l'ampoule. La phase inférieure contenant le dichlorométhane est ensuite récupérée dans une fiole jaugée de 25 mL à l'aide d'un entonnoir en verre contenant du coton et du sulfate de sodium anhydre afin de retenir l'eau potentielle. Une deuxième extraction est effectuée puis le volume complété à 25 mL avec du dichlorométhane. Une lecture de DO à 390 nm est ensuite effectuée par un spectrophotomètre. En effectuant une calibration au préalable, la quantité d'hydrocarbure particulière est ainsi déterminée (Milinkovitch *et al.*, 2011).

2.2.2 HAPs

Les HAPs dissous dans l'eau ont été dosés par la technique Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE). La SBSE est basée sur l'extraction par sorption de molécules apolaires (voire peu polaires) par un barreau recouvert de PDMS (PolyDiméthylSiloxane) et plongé directement dans le milieu à analyser. Le jour du prélèvement, le contenu d'un flacon a été

renversé dans une ampoule à décanter et 100 mL de la phase inférieure a été versé dans une fiole jaugée de 100 mL afin de récupérer la fraction soluble de l'échantillon. La solubilisation des HAPs dans l'eau de mer s'effectue par une solution de méthanol qui permet d'éviter l'adsorption des HAPs sur les parois en verre. Un volume de 10 mL de solution de méthanol contenant un étalon interne est ainsi ajouté dans le flacon. L'étalon interne est constitué d'une solution de 5 HAPs deutérés (Naphthalène d8, Biphényl d10, Phénanthrène d10, Chrysène d12, Benzo(a)pyrène d12) à la concentration de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour chaque composé. Le barreau aimanté est introduit dans le flacon puis placé sur un agitateur pendant 2 h à 200 tours/min dans l'obscurité afin d'éviter la photo oxydation des HAPs. Une fois la période d'agitation achevée, le barreau est récupéré et replacé dans un tube de désorption atomique jusqu'à l'analyse en GC-MS.

Les 16 HAPs préconisés dans la norme EPA610, ainsi que leurs composés ramifiés, et trois composés souffrés contenant des noyaux aromatiques (benzothiophene, biphenyl et dibenzothiophene) ont été analysés pour chacun des bacs d'exposition au pétrole. L'analyse a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à une détection par spectrométrie de masse (GC-MS). Le chromatographe en phase gazeuse est un HP 6890N équipé d'un système d'injection multifonctions Combipal MSPS (Gerstel, Suisse) dont est équipé le CEDRE. La température à l'interface est de 300°C . Le gaz vecteur est de l'hélium à débit constant. La colonne capillaire est une HP 5-ms (Agilent, Middelburg, Pays-Bas) : $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm ID} \times 0,25 \mu\text{m}$ (épaisseur de film). Le chromatographe est couplé à un détecteur par spectrométrie de masse (HP MSD 5973) (Impact électronique : 70 eV, tension : 2000V). La désorption thermique des composés concentrés sur le barreau aimanté par la phase PDMS permet d'introduire les analytes dans le couplage GC-MS. Cette étape est réalisée par un désorbeur thermique (Thermal Desorption Unit) monté en série avec un injecteur à programmation de température (Cooled Injection System – CIS). Les molécules ainsi libérées sont condensées dans le CIS, avant d'être injectées dans le couplage GC-MS par une montée de température rapide. Entraînés par l'hélium, les HAPs sont séparés sur la colonne du chromatographe en fonction de leur capacité d'interaction avec la phase stationnaire. Les composés sortent suivant leur temps de rétention qui dépend de leur température d'ébullition. Le spectromètre de masse va capturer, ioniser, accélérer, dévier et détecter les molécules ionisées séparément en fonction de leur rapport masse sur charge. La concentration des HAPs est déterminée par comparaison des surfaces chromatographiques obtenues à un temps de rétention donné entre l'échantillon et celles de chacun des standards de HAP, tout en tenant compte des surfaces obtenues pour les étalons volumétriques (standards internes) (Figure 25).

Le résultat obtenu est rapporté corrigé en fonction de la récupération de l'étalon interne associé aux différents groupes de HAPs.

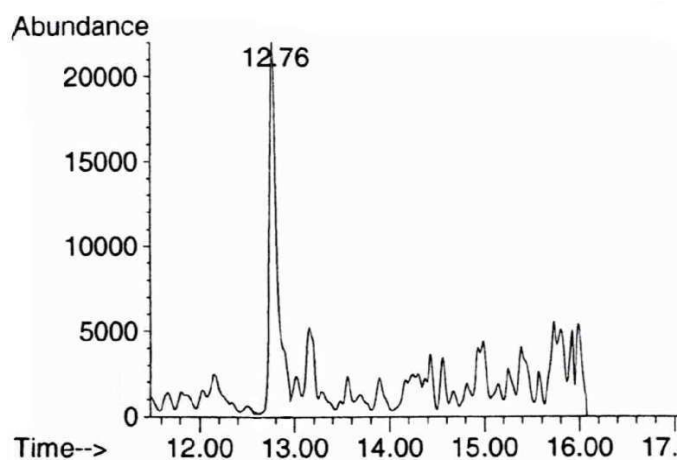


Figure 25 : Chromatogramme en extraction d'ion du naphthalène (ion 134) obtenu après analyse en GC-MS d'un échantillon d'eau prélevé dans un bac contaminé avec du pétrole

2.3 Analyse des contaminants chimiques dans les sédiments

2.3.1 HAPs et PCBs

Les 16 HAPs et les 7 congénères de PCBs préconisés par la norme EPA ont été mesurés dans les sédiments par Flandres Analyses (Dunkerque). S'agissant de mesures par prestation, le protocole ne sera pas décrit en détail. Les composés organiques ont été extraits à partir de 2 g de sédiment séché par microonde (120°C pendant 15 min, 1200 W) dans 40 mL d'un mélange d'acétone :hexane (1 :1, v :v). Le solvant a ensuite été évaporé sous flux d'azote dans un TurbVap et puis concentré à 1 mL d'hexane. La détermination simultanée des HAPs et PCBs a été réalisée en chromatographie de gaz couplé à un spectromètre de masse (GC-MS, VARIAN, CP 3800 – 1200 MS TQ). Pour la séparation des composés, une colonne ZB-MultiResidue (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m) a été utilisée (Phenomenex). L'identification des HAPs et des PCBs sélectionnés a été effectuée par comparaison de leurs temps de rétention et de leurs masses spectrales par rapport à des standards individuels. La limite de quantification de chaque HAP est de 0,05 mg.kg⁻¹ et de 0,01 mg.kg⁻¹ pour chaque PCB.

2.3.2 Métaux

La minéralisation totale et partielle des sédiments a été effectuée dans le but de déterminer les teneurs totales en métaux dans le sédiment ainsi que leur teneur dans la fraction qualifiée de réactive ou biodisponible.

Le matériel destiné aux différentes manipulations à l'exception des attaques acide à chaud est composé de flacons en PEHD (polyéthylène haute densité), pinces en nylon blanc, seringues en polyéthylène, béchers en PTFE. Afin de réduire les risques de contamination des échantillons, le matériel utilisé est au préalable lavé au détergent de laboratoire, trempé successivement au moins deux semaines dans deux bains acides (mélange molaire d'acides nitrique et chlorhydrique qualité PA « Pour Analyses », Merck) et rincé abondamment à l'eau déminéralisée ou à l'eau ultrapure Milli-Q (18,2 M Ω .cm, Millipore Corporation). Le matériel est ensuite séché sous hotte à flux laminaire (Norme « Federal Standard » n° 209a, classe 100) avant d'être stocké dans des sachets en polyéthylène avant utilisation. Toutes les manipulations ont été réalisées dans la mesure du possible sous hotte à flux laminaire. Pour chaque série d'échantillons, des blancs de réactifs et de manipulations ont été analysés. Comme, pour tous les éléments, le signal des blancs reste inférieur à 1% de celui des échantillons, aucune correction n'a été effectuée.

Avant la minéralisation, les sédiments ont été séchés dans une étuve à 40°C dédiée à cet effet pendant plusieurs jours, jusqu'à poids constant. Ils ont ensuite été broyés à l'aide d'un broyeur à bille en agate (20 min, 450 tr.min⁻¹; Retsch S100) afin d'homogénéiser chacun des échantillons.

Attaque totale

L'attaque totale du sédiment comprend plusieurs étapes successives de minéralisation par voie acide. Environ 200 mg de sédiment sont pesés et introduit dans un flacon (savillex, PFA, 15 mL). Une première étape consiste à ajouter 7 mL d'acide fluorhydrique (40 %, Suprapur) dans chaque flacon et les mettre à chauffer sur une plaque chauffante à 110°C pendant 48 h. Les silicates, les aluminosilicates et les carbonates sont ainsi principalement minéralisés. Après évaporation, la fraction résiduelle est ensuite attaquée par une seconde minéralisation par un mélange d'eau régale de qualité Suprapur (3 mL acide nitrique: 6mL acide chlorhydrique) à 120°C pendant 24 heures. L'attaque en eau régale, dans les mêmes conditions est réalisée une seconde fois. L'évaporation de cette dernière attaque est réalisée à la goutte et 10 mL d'eau Milli-Q sont introduits. Les flacons sont remis à chauffer pendant 3 h pour bien homogénéiser la solution avant filtration sur seringue équipée d'une membrane en

acétate de cellulose à 0,2 µm. Les échantillons sont récupérés dans des flacons de 20 mL en PEHD.

Le protocole de minéralisation a été validé en utilisant des matériaux de référence de sédiments marins : HISS-1, MESS-3 et PACS-2 commercialisés par le NRCC (National Research Council of Canada). Le matériau HISS-1 a été prélevé sur le banc d’Hibernia, dans les eaux côtières de Terre-Neuve, le matériau MESS-3 dans la mer de Beaufort et le matériau PACS-2 dans le port d’Esquimalt (Colombie-Britannique). Pour l’analyse du Hg, un autre standard certifié a été utilisé, l’IAEA-405 (International Atomic Energy Agency) qui est un sédiment estuarien prélevé dans la vasière intertidale de l’estuaire du Tage (Portugal). Les résultats présentés dans le tableau 3 montrent en général une bonne concordance des résultats.

Tableau 3 : Comparaison des valeurs certifiées (Cert) et mesurées (Mes) des sédiments de référence HISS-1, MESS-3 et PAC-2 ainsi que IAEA-405 pour l’analyse de mercure.

Elément (mg.kg ⁻¹)	λ(nm)	HISS-1 (n=3)		MESS-3 (n=9)		PAC-2 (n=3)		IAEA-405 (n=5)	
		Cert	Mes	Cert	Mes	Cert	Mes	Cert	Mes
Al	237,3	7,30 ± 0,5	7,06 ± 0,07	85,9 ± 2,3	79,3 ± 7,8	66,2 ± 3,2	61,9 ± 4,2		
Cd	214,4	0,02 ± 0,01	-	0,24 ± 0,01	-	2,11 ± 0,15	2,70 ± 0,02		
Cr	267,7	30,0 ± 6,8	-	105 ± 4	102 ± 9	90,7 ± 4,6	89,6 ± 4,1		
Cu	327,4	2,29 ± 0,37	2,07 ± 0,08	33,9 ± 1,6	30,8 ± 2,2	310 ± 12	326 ± 8		
Hg	263,7			0,091±0,01	0,079±0,01			0,81 ± 0,04	0,74 ± 1,11
Fe	234,4	2,46 ± 0,09	2,07 ± 0,08	43,4 ± 1,1	44,4 ± 1,8	40,9 ± 0,6	42,2 ± 1,1		
Mn	260,6	66,1 ± 4,2	71,3 ± 3,6	324 ± 12	304 ± 34	440 ± 19	427 ± 22		
Ni	231,6	2,16 ± 0,29	2,10 ± 0,04	46,9 ± 2,2	40,7 ± 7,5	39,5 ± 2,3	39,9 ± 5,1		
Pb	220,4	3,13 ± 0,40	3,02 ± 0,40	21,1 ± 0,7	14,9 ± 2,2	183 ± 8	166 ± 55		
V	292,4	6,80 ± 0,78	5,93 ± 1,32	243 ± 10	247 ± 17	133 ± 5	148 ± 2		
Zn	206,2	4,94 ± 0,79	3,72 ± 0,04	159 ± 8	152 ± 10	364 ± 23	394 ± 9		

Attaque partielle

L'analyse des métaux dans la fraction réactive du sédiment a également été réalisée. Cette fraction regroupe les particules susceptibles de relarguer les éléments métalliques qu'elles contiennent lors d'une remise en suspension du sédiment et/ou de la modification d'un ou de plusieurs paramètres biogéochimiques (modification de l'activité bactérienne, du potentiel d'oxydoréduction, du pH...) (Di Toro *et al.*, 1990; Cooper et Morse, 1998; Huerta Diaz *et al.*, 1998; Simpson *et al.*, 2000). D'un point de vue chimique, on peut supposer que cette fraction regroupe les entités détruites par une solution d'acide chlorhydrique de concentration molaire. Cette attaque plus ménagée a également été considérée comme une simulation des sucs gastriques contenus dans les systèmes digestifs de divers animaux vivant

à proximité des vasières et définit ainsi la quantité maximale de métaux extractibles ou disponibles pour ces animaux (Cooper et Mores, 1998; Herta-Diaz *et al.*, 1998; Billon, 2001). Le protocole d'extraction, assez simple à mettre en œuvre, est issu des travaux de Huerta-Diaz et Morse (1990). La fraction labile ou biodisponible est supposée comprendre les carbonates, une partie des oxydes-hydroxydes de fer et manganèse et la fraction volatile des sulfures. Environ 500 mg de sédiment sont introduits dans des flacons de scintillation en PEHD et 20 mL d'acide chlorhydrique suprapur (1 M) est versé. Les flacons sont placés sur une table d'agitation pendant 24 h à température ambiante. Les échantillons sont filtrés à 0,2 μm avant analyse.

Analyse en ICP-AES

Après minéralisation des sédiments suivant les deux attaques décrites précédemment, le dosage des métaux a été réalisé par spectrométrie d'émission atomique couplée à un plasma inductif (ICP-AES; Varian, Vista Pro, observation axiale) mise à disposition par le laboratoire FRE 3928 GEOSYSTEME à l'Université de Lille 1. L'ICP-AES est une méthode spectroscopique qui utilise comme source d'ionisation un plasma d'argon. L'échantillon introduit sous forme liquide est dispersé en très fines gouttelettes à l'aide d'un nébuliseur. Une partie est alors entraînée par de l'argon au centre de la torche à plasma elle-même alimentée par de l'argon. Les atomes portés à haute température émettent avant de retomber à leur état fondamental un rayonnement dont le spectre comporte des raies caractéristiques des éléments présents dans l'échantillon et utilisables en analyse quantitative. Les principaux avantages de cette technique sont outre l'analyse multiélémentaire, une minimisation des effets de matrice comparée aux autres méthodes spectroscopiques et une grande plage de linéarité (du $\mu\text{g.L}^{-1}$ à la centaine de mg.L^{-1}). Pour les éléments mineurs, la gamme d'étalonnage est effectuée entre 10 et 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Pour les éléments majeurs (Al et Fe), elle est comprise entre 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et 100 mg.L^{-1} . La limite de quantification est de 0.04 mg.kg^{-1} pour le Zn; 0,2 mg.kg^{-1} pour le Cd, Cr, Cu et Ni; 0,4 mg.kg^{-1} pour l'Al; 0,8 mg.kg^{-1} pour le Pb.

Mesure du mercure

La mesure du mercure dans les sédiments a été réalisée avec un analyseur de mercure AMA 254 (Altec Ltd., Prague, République Tchèque) mise à disposition par le laboratoire FRE 3928 GEOSYSTEME à Lille. L'analyseur est basé sur le principe de l'absorption atomique, réglée à la longueur d'onde de 263,65 nm pour la détermination spécifique du mercure à des

concentrations très faibles sur des liquides ou solides. 30 à 50 mg de sédiment sont déposés dans une nacelle en nickel préalablement tarée, laquelle est introduite dans le four de décomposition. Une montée en température jusqu'à 800°C dans un premier four, sous courant d'oxygène, assure le séchage de la matrice, sa décomposition puis sa calcination. Les produits issus de la décomposition ainsi que le mercure sont entraînés par l'oxygène, à travers un second four chauffé à 900°C en continu. Les vapeurs de mercure sont alors piégées quantitativement sur un amalgameur revêtu d'or. Le mercure est ensuite libéré par évaporation et introduit dans la cuve de mesure du système de détection par absorption atomique. La spectrométrie d'absorption atomique utilise la propriété que possèdent les atomes d'être excités par absorption d'énergie. L'absorbance est quantifiée, et proportionnelle à la concentration en mercure dans l'échantillon analysé. La limite de quantification pour le Hg est de 0.002 mg.kg⁻¹).

Le dosage du mercure dans les sédiments s'effectuant sans étape préalable de minéralisation, à l'inverse des autres métaux dosés en ICP-AES, les concentrations obtenues ont été corrigées en fonction des résultats des standards certifiés.

Facteurs d'enrichissement en métaux

Le degré de contamination du sédiment en métaux peut être évalué en utilisant le facteur d'enrichissement (EF) (Salomons et Forstner, 1984). La normalisation des métaux à un élément conservatif comme l'Aluminium permet d'évaluer l'influence anthropique des sédiments. L'EF est défini suivant l'équation suivante :

$$EF = (X/Al)_{\text{échantillon}} / (X/Al)_{\text{référence}}$$

où $(X/Al)_{\text{échantillon}}$ représente le rapport de la concentration du métal à celle de l'aluminium de l'échantillon de sédiment analysé, $(X/Al)_{\text{référence}}$ représente le rapport de la valeur naturelle de référence du métal à celle de l'aluminium. Les valeurs des EF sont calculées, comme suggéré par Birth (2003), par rapport à la moyenne de la croûte supérieure continentale des métaux étudiés (Taylor et McLennan, 1995). Cette approche a été largement utilisée pour étudier les sources de contamination en métaux dans des environnements fluviaux, estuariens et littoraux (Salomons et Forstner, 1984; Sinex et Wright, 1988; Windom *et al.*, 1989, 1991; Zhang et Liu, 2002; Feng *et al.*, 2004). EF<1 indique aucun enrichissement; <1-3 représente un enrichissement mineur; 3-5 modéré; 5-10 modérément sévère; 10-25 sévère; 25-50 très sévère; et >50 extrêmement sévère.

2.3.3 Critères de qualité des sédiments

Parmi les nombreux critères de qualité des sédiments « SQG » (*Sediment Quality Guidelines*) proposés depuis les années 1990, ceux définis par Long *et al.* (1995) sont fréquemment utilisés pour évaluer le potentiel toxique de sédiments marins. Deux valeurs guides ont ainsi été identifiées : les valeurs ERL (effect range low) et ERM (effect range medium) disponibles pour 9 métaux et 13 HAPs. Les concentrations au dessus des ERL, représentent des niveaux d' « effets possibles » pour lesquels des effets pourraient se produire occasionnellement. Les concentrations au dessus des ERM représentent des niveaux d' « effets probables » pour lesquels des effets pourraient se produire fréquemment. Ces critères résultent de la compilation et du traitement statistique de données d'effets biologiques observés *in situ*, en laboratoire, par la modélisation, sur des espèces benthiques marines ou estuariens, couplées aux données de caractérisation chimique des sédiments (différentes classes de contaminants) aux contacts desquels vivent ces espèces (Tableau 4).

Tableau 4 : Valeurs des seuils de toxicité ERL (Effect range low) et ERM (effect range medium), es métaux et HAPs sédimentaires (en mg.kg⁻¹) établis par Long et al., 1995.

	ERL	ERM		ERL	ERM
Arsenic	8,2	70	Acénaphène	0,016	0,5
Cadmium	1,2	9,6	Acénaphylène	0,044	0,64
Chromium	81	370	Anthracène	0,0853	1,1
Copper	34	270	Fluorène	0,019	0,54
Lead	46,7	218	2-Methylnaphtalène	0,070	0,67
mercury	0,15	0,71	Naphtalène	0,16	2,1
Nickel	20,9	51,6	Phénanthrène	0,24	1,5
Silver	1	3,7	Benz(a)anthracène	0,261	1,6
Zinc	150	410	Benzo(a)pyrène	0,43	1,6
			Chrysène	0,384	2,8
			Dibenzo(a,h)anthracène	0,0634	0,26
			Fluoranthène	0,6	5,1
			Pyrène	0,665	2,6
			Total 15 HAPs	4,022	44,792

3. Analyses des contaminants chimiques dans les poissons

3.1 Dosage des HAPs dans les chairs de poissons

Un nombre de 19 HAPs a été analysé dans les chairs des poissons exposés au pétrole (les 16 HAPs-EPA et les trois souffrés contenant des cycles aromatiques -benzothiophène,

biphenyl et dibenzothiophene). Le dosage des HAPs, hydrophobes mais solubles dans les graisses ou les phases lipidiques, a été réalisé par saponification à chaud en présence d'hydroxyde de potassium éthanolique (Baumard *et al.*, 1997). Cette méthode présente l'avantage d'éliminer totalement la matière grasse. Avant l'extraction, la tête, les viscères et la peau de chaque poisson ont été retirées et les poissons ont été regroupés par lots de trois pour obtenir des poids de tissus biologiques avoisinant les 3 g. L'échantillon est introduit dans un flacon en verre de 100 mL et 50 mL d'éthanol ainsi que 4 g d'hydroxyde de potassium (Fisher Chemicals) sont ajoutés. Un volume de 10 µL de standard interne deutéré (CUS-7249, Ultra Scientific, Analytical solutions) est également introduit. L'étalon interne est constitué d'une solution de 5 HAPs deutérés (Naphtalène d8, Biphényl d10, Phénanthrène d10, Chrysène d12, Benzo(a)pyrène d12). Cette digestion est réalisée pendant 4 h à 80°C. Un volume de 20 mL d'eau Milli-Q est ensuite ajouté et l'extraction des hydrocarbures est réalisée dans une ampoule à décanter avec 20 mL de pentane (Carlo Erba Reactifs, SDS) où la fraction inférieure contenant le pentane est récupérée. La procédure est renouvelée trois fois. L'extrait est ensuite évaporé avec un Turbo Vap 500 concentrateur (Zyman, Hopkinton, MA, USA à 880 mbar à 500C) pour obtenir un extrait concentré dans 1 mL. La purification de l'extrait est effectuée afin d'éliminer une partie des composés coextraits pouvant représenter une source potentielle de bruit de fond lors de l'analyse. La méthode utilisée est la purification sur cartouche de silice (5 g) dite d'extraction sur phase solide (SPE). Une fois l'échantillon injecté sur les cartouches, les colonnes sont rincées deux fois avec 5 mL d'un mélange de dichloropentane (80 :20, pentane : dichlorométhane). L'extrait est de nouveau évaporé au TurboVap et concentré à un volume de 200 µL recueilli dans un vial en verre de 2 mL comprenant un insert de 250 µL. Les composés aromatiques sont ensuite analysés en GC-MS-MS (Agilent Technologies 7890 A) dont est équipé le CEDRE et quantifiés par rapport aux standards internes deutérés introduits au début de la procédure. L'analyse en GC-MS-MS utilise deux spectromètres de masse quadripolaire montés en série afin d'améliorer la résolution et donc d'augmenter la sensibilité par rapport à une chromatographie gaz couplée à un seul spectromètre.

3.2 Estimation des métabolites biliaires d'HAPs

Les métabolites de HAPs ont été estimés dans la vésicule biliaire des turbots par la méthode de Aas *et al.* (1998) en spectrographie fluorescente synchrone (SFS) qui utilise des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de 343/383 nm et de 380/340 nm. Ces longueurs

d'onde permettent de détecter principalement des métabolites de types naphthalène, pyrène et benzo(a)pyrène. Les échantillons de bile sont dilués 1:3000 dans une cuve en quartz, la fluorescence émise est ensuite enregistrée aux longueurs d'ondes précédentes par un fluorimètre mis à disposition par l'Université de Bretagne Occidentale (UBO) à Brest. La somme des deux signaux enregistrés permet d'obtenir une estimation relative de la quantité de métabolites de HAPs détectés. Il s'agit d'une méthode semi-quantitative où les métabolites ne sont pas quantifiés individuellement mais par intégration du massif représentant les composés aromatiques fluorescents globaux. Les taux sont exprimés en unité arbitraire de fluorescence.

3.3 Dosage des métaux dans les branchies et foies de poissons

3.3.1 Etapes de minéralisation

Les tissus biologiques (foies et branchies) ont été prélevés en minimisant le contact avec les outils de dissection métalliques préalablement rincés avec de l'eau Milli-Q et une solution d'éthanol absolu PA. Les branchies, après prélèvement, ont été rincées délicatement avec de l'eau Milli-Q et soumises aux ultrasons par un sonicateur (Elmasonic One) pendant 5 min (fréquence: 35 kHz) afin de retirer les potentielles particules sédimentaires liées au mucus (confirmé par l'observation à la loupe binoculaire). Afin de disposer d'une quantité de matériel biologique suffisante, des mélanges d'environ 5 branchies et 5 foies ont été réalisés et lyophilisés pendant 24 h.

Afin d'obtenir des concentrations en éléments traces détectables en ICP-MS et respecter les conditions préconisées c'est-à-dire des solutions ne dépassant pas 2 g.L⁻¹ et acidifiée à 2% en HNO₃, une proportion d'attaque de 70 mg de matière par mL d'acide nitrique (65 %, suprapur) a été retenue. Les échantillons sont laissés 24 h à température ambiante puis chauffés à 100°C sur une plaque chauffante pendant 4 h. Par dilution avec de l'eau Milli-Q, ils sont ramenés dans un premier temps à 12 % d'HNO₃. Les flacons sont remis à chauffer pendant 2 h pour bien homogénéiser la solution avant d'être filtrés sur seringue équipée d'une membrane en acétate de cellulose à 0,2 µm. Les échantillons sont récupérés dans des flacons de 20 mL en PEHD. Chaque échantillon est de nouveau dilué pour être au maximum concentré à 2% d'HNO₃ avant analyse à l'ICP-MS. La limite de quantification est de 0,01 µg.g⁻¹ pour le Cd et le Pb; 0,05 µg.g⁻¹ pour le Co et le Cu; 0,1 µg.g⁻¹ pour le Cr, Mn, Ni, V et Zn et de 0,2 µg.g⁻¹ pour l'As.

Le protocole de minéralisation a été validé en utilisant des matériaux de référence de poissons: DORM-3 et DOLT-4 commercialisés par le NRCC (National Research Council of

Canada). Le DORM-3 a été préparé à partir d'un mélange homogénéisé de protéines de poissons et le DOLT-4 à partir de foie de chien-de-mer. Les résultats présentés dans le Tableau 5 montrent en général une bonne concordance des résultats.

Tableau 4 : Comparaison des valeurs certifiées (Cert) et mesurées (Mes) des matériaux de référence DORM-3 et DOLT-4. ¹ détection par absorption atomique à 263,65 nm; * à titre d'indication mais valeurs non certifiées

Elément (mg.kg ⁻¹)	masse	DORM-3 (n=6)		DOLT-4 (n=3)	
		Cert	Mes	Cert	Mes
As	75	6,88 ± 0,30	7,28 ± 1,64	9,66 ± 0,62	9,35 ± 2,08
Cd	111	0,29 ± 0,02	0,27 ± 0,04	24,3 ± 0,8	25,5 ± 2,2
Cr	53	1,89 ± 0,17	1,85 ± 0,24	1,40*	1,04 ± 0,2
Cu	65	15,5 ± 0,63	15,6 ± 2,5	31,20 ± 1,1	35,4 ± 1,6
Hg ¹		0,38 ± 0,06	0,40 ± 0,01	2,58 ± 0,22	2,58 ± 0,01
Mn	55	4,6*	3,27 ± 0,45	-	3,57 ± 0,61
Ni	60	1,28 ± 0,24	1,18 ± 0,20	0,97 ± 0,11	0,51 ± 0,19
Pb	207	0,39 ± 0,05	0,38 ± 0,05	0,16 ± 0,04	0,19 ± 0,05
Se	78	3,3*	4,50 ± 1,64	9,66 ± 1,3	9,75 ± 2,62
Zn	67	51,3 ± 3,1	51,5 ± 10,2	116 ± 6	128 ± 10

3.3.2 Dosage en ICPMS

Le spectromètre ICP-MS utilisé pour le dosage des métaux dans les organes de poisson est le modèle 820-MS VARIAN mise à disposition au CCM (Centre Commun de Mesure de L'Université du Littoral Côte d'Opale). La spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif est une technique reposant sur la séparation, l'identification et la quantification des éléments contenus dans un échantillon en fonction de leur masse. Elle est basée sur le même principe que l'ICP-AES pour la source d'ionisation comprenant le système de nébulisation et la torche à plasma. Par contre, celle-ci diffère des méthodes de détection optique car les ions sont séparés par spectromètre de masse quadripolaire en fonction de leur rapport masse/charge. Une partie du plasma généré au niveau de la torche est échantillonnée par un premier orifice de 1 mm de diamètre environ au sommet d'un cône en nickel ou platine (« le sampler ») suivi d'un second cône « le skimmer » de même composition. Ce système de vide différentiel accélère les ions du plasma vers un ensemble de lentilles électrostatiques qui extraient les ions chargés positivement et les transportent vers un filtre de masse quadripolaire. Ce filtre de masse transmet seulement les ions présentant un rapport masse sur charge particulier, déterminé en fonction de la fréquence appliquée au quadripôle. La partie détection s'effectue grâce à un multiplicateur d'électrons à dynodes discrètes. Le signal se

traduit en nombre d'impulsions (nombre de coups). Pour un isotope donné, le nombre d'ions mesurés permet de calculer directement la concentration de l'élément analysé. Les nombres de coups sont convertis en concentrations après calibration.

Malgré le développement de l'ICP-MS depuis le milieu des années 1980, certaines applications restent délicates pour la détermination en trace de certains éléments dans des matrices complexes de par l'existence d'interférences spectroscopiques ou non spectroscopiques. Sans rentrer dans le détail, les interférences liées à la matrice et du système d'introduction de l'échantillon et/ou issues de combinaisons d'ions générées par le plasma ne sont pas toujours bien corrigées ou éliminées. Le modèle de spectromètre 820-MS possède pour la gestion des interférences le mode CRI (Interface Collision/Réaction), technologie commercialisée au début des années 2000. La technique consiste à injecter dans l'interface CRI constituée des deux cônes les gaz de collision et/ou de réactions tels que l'hélium et hydrogène directement dans le plasma pendant qu'il traverse l'orifice des cônes. Ce système dans certaines applications bien ciblées peut permettre de minimiser les interférences polyatomiques. De même, pour s'affranchir le plus possible des effets de matrice des éléments facilement ionisables, il est possible de tenter de recréer la matrice avec des solutions synthétiques et l'utiliser pour l'étalonnage. Toutefois, le plus souvent la composition de l'échantillon est inconnue et les interférents peuvent varier d'un échantillon à l'autre. Une autre possibilité est d'utiliser la méthode des ajouts dosés. Cette méthode consiste à faire des répliqués de l'échantillon à analyser, en ajoutant à chacun d'eux des concentrations croissantes de l'élément à doser. Une gamme de calibration croissante, de même matrice et à volume final constant, est ainsi obtenue.

Après une phase d'essais et d'optimisation en considérant les différents modes de gaz, pour les échantillons de foies et de branchies, la méthode des ajouts dosés en mode sans gaz a été retenue car indispensable pour s'affranchir des problèmes de matrice. L'analyse des échantillons, un sans ajout et ceux avec les ajouts croissants, permet d'établir une droite d'étalonnage : I (intensité de l'élément dosé) = $f(C$: concentration de l'élément). L'intersection de cette droite avec l'axe des abscisses détermine l'origine de cet axe et par conséquent la concentration de l'élément dans l'échantillon (Figure 26). Une meilleure précision est obtenue avec l'ajout correspondant à la valeur attendue de la concentration de l'élément analysé ainsi qu'avec un ajout correspondant au double de cette valeur. Des ajouts dosés compris entre 0,5 et 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ont ainsi été réalisés selon les éléments.

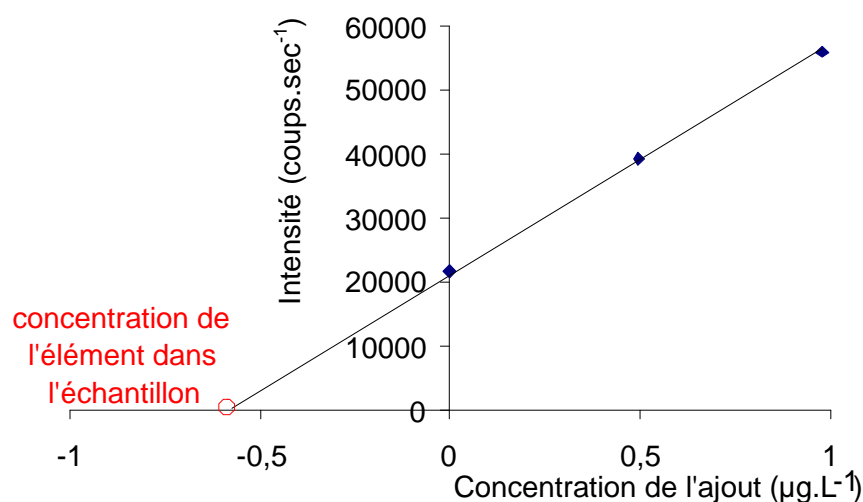


Figure 26 : Principe de la méthode des ajouts dosés : exemple du plomb dans un échantillon de foie. L'intersection de la droite « I (intensité de l'élément dosé) = $f(C$: concentration de l'élément) » avec l'axe des abscisses détermine la concentration de l'élément dans l'échantillon.

Cette méthode des ajouts dosés a été appliquée pour les éléments qui présentaient des concentrations trop faibles pour être analysées après dilution des échantillons. Cependant les éléments en concentrations plus importantes ont été dosés par calibration externe sur des échantillons dilués, comme le Mn (dilution par 100) et le Zn (dilution par 600) dans les branchies et le Cu et le Zn (dilution par 600) dans les foies. La similarité des résultats obtenus pour ces éléments en calibration externe et par la méthode des ajouts dosés permet de considérer que la dilution minimise les effets de matrice.

3.3.3 Analyse du mercure

Le mercure a été analysé sur les échantillons minéralisés (12% HNO_3) avec l'analyseur de mercure AMA 254 décrit précédemment mais les analyses ont été effectuées à la Maison de la Recherche (LOG, Wimereux). Si nécessaire, le mercure a été pré-concentré dans l'amalgame par trois injections successives de l'échantillon pour se situer dans une gamme comprise entre 0,2 et 1,0 ng.

4. Analyses des paramètres biologiques

4.1 Biomarqueurs moléculaires hépatiques

4.1.1 Préparation de la fraction S9 du foie

En vue de l'analyse des biomarqueurs moléculaires, le foie est broyé dans un broyeur à billes (Précelllys, Bertin Technologies, France) avec 200 μ L de solution tampon de phosphate (100 mM, pH 7,5) contenant 20 % de glycérol et du PMSF (PhénylMéthylSulfonideFluorure) à 0,2 mM puis centrifugé (10000 rpm, 15 min, 4°C). La fraction post mitochondriale (surnageant) est récupérée. Après préparation de la fraction S9 du foie, les dosages des activités enzymatiques ont été réalisés à l'aide d'un robot multiprobe II dont l'Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS, Verneuil en Halatte) est équipé (Figure 27). Ce robot 'pipetteur' permet de transférer des liquides d'un contenant vers un autre et permet ainsi une meilleure précision et un gain de temps précieux.



Figure 27 : Robot Multiprobe II utilisé pour les analyses des biomarqueurs moléculaires. Ce robot « pipetteur » permet de transférer des liquides d'un contenant vers un autre.

4.1.2 Teneur en protéines

La concentration protéique de la fraction post-mitochondriale est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) adaptée en microplaque. Pour cela, 10 μ L d'échantillon dilué au 1/150 dans du tampon Phosphate (pH 7,5) sont mélangés à 190 μ L de réactif de Bradford. La formation d'une coloration bleue issue de l'interaction entre les protéines et le bleu brillant de

Coomassie est suivie à 570 nm. Les résultats sont interprétés grâce à une gamme d'étalonnage d'albumine sérique de boeuf et exprimés en g.L^{-1} .

4.1.3 Activité de l'EROD

L'activité de l'EROD est mesurée par une méthode fluorimétrique (Flammarion *et al.*, 1998) en microplaque basée sur l'hydroxylation de la 7-éthoxyrésorufine (7-ERF). Pour cela, 10 μL d'échantillon dilué (concentration doit être comprise entre 0,5 et 10 $\mu\text{g/L}$) sont mélangés à 200 μL de mélange réactionnel, constitué de tampon Phosphate (pH 7,5) et d'une solution 7-ERF à 8 μM et à 10 μL de NADPH à 2 μM . L'apparition de résorufine est suivie par fluorimétrie pendant 30 minutes aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 530 et 590 nm respectivement. Les résultats sont interprétés grâce à une gamme d'étalonnage de résorufine et exprimés en $\text{pmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéines.

4.1.4 Activité de la GST

L'activité de la GST est mesurée par une méthode colorimétrique (Habig *et al.*, 1974) en microplaque basée sur la catalyse de la réaction entre le chloro dinitro benzene (CDNB) et le glutathion réduit (GSH). Pour cela, 10 μL d'échantillon normalisé à 0,6 g.L^{-1} sont mélangés à 133 μL de mélange réactionnel, constitué de tampon Phosphate (100 mM, pH 7,5), de CDNB à 1 mM et du GSH à 1 mM. L'apparition du tioether est suivie par colorimétrie pendant 6 minutes à la longueur d'onde de 340 nm. Les résultats sont interprétés grâce à une gamme d'étalonnage de GST et exprimés en $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéines.

4.1.5 Activité de la CAT

La catalase est dosée par méthode spectrophotométrique (Babo et Vasseur, 1992) en mesurant l'absorbance du peroxyde d'hydrogène dans l'UV à 240 nm. Un volume de 100 μL de l'échantillon est mélangé avec 100 μL du mélange réactionnel, constitué d'une solution tampon de phosphate (100 mM, pH 7,5) et de H_2O_2 à 28mM. L'absorbance est lue à 240 nm pendant 1 à 2 minutes. Les résultats sont exprimés en μmol de H_2O_2 consommés par minute (= 1 U de catalase). Les activités catalase sont recalculées grâce à une gamme d'étalonnage de Catalase (erythrocyte bovins) et exprimées en $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéines.

4.2 **Indices de croissance**

4.2.1 Taux de croissance individuels

Marquage individuel

Afin d'effectuer un suivi individuel de la croissance, les bars et les turbots ont été marqués, mesurés et pesés, au début de chaque expérience d'exposition en aquarium et avant l'expérience de caging à l'aide d'implant visuel (Visual Implant Alpha Tag, 1,2 mm x 2,7 mm, Northwest Marine Technology). Il s'agit d'un petit «tag» fluorescent avec un code alphanumérique qui est implanté sous la peau après anesthésie des juvéniles de poisson au 2-phenoxyethanol ($320 \mu\text{l.L}^{-1}$ pour le bar et $200 \mu\text{l.L}^{-1}$ pour le turbot). Il est introduit à l'aide d'une seringue injecteur qui permet d'introduire délicatement le «tag» sous la peau tout en préservant le muscle et en restant extérieurement visible (Figure 28). Avant l'utilisation de ce type de marquage, des essais ont été réalisés à la fois sur le bar et le turbot afin de s'assurer qu'il ne représente qu'une gêne minimale ou inexistante pour les organismes (aucune mortalité, nage non modifiée, pas de pertes du «tag»...)

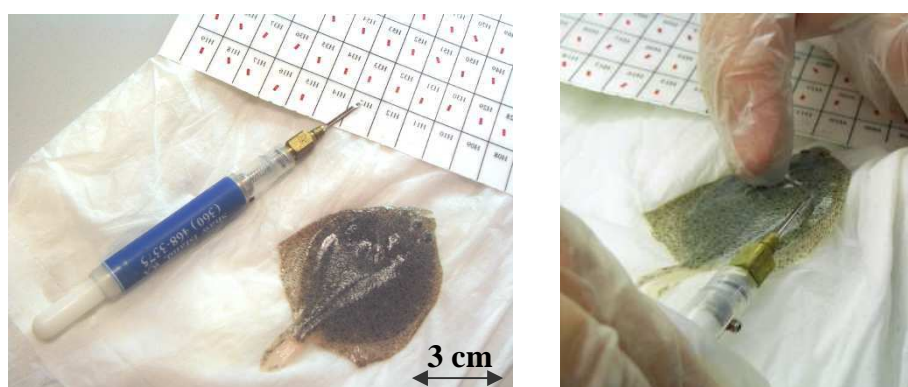


Figure 28 : Marquage d'un juvénile de turbot à l'aide d'un implant visuel (Visual Implant Alpha Tag, 1,2 mm x 2,7 mm, Northwest Marine Technology). Le tag fluorescent est introduit sous la peau à l'aide d'une seringue injecteur.

Taux de croissance spécifique

Le taux de croissance spécifique correspond à la mesure de l'augmentation journalière en poids (ou en taille), déterminé pour la période d'exposition considérée en conditions contrôlées ou semi-contrôlées. Il a été défini comme l'évolution du logarithme de la taille du poisson (souvent le poids) avec le temps (Elliott et Hurley, 1995) et ainsi calculé par l'équation suivante :

$$GW = 100(\ln W_2 - \ln W_1)/(t_2 - t_1),$$

où (W_1) et (W_2) représente le poids total du poisson (en mg) au temps (t_1) (début de l'expérience) et t_2 (temps de prélèvement).

Cette équation a été utilisée pour calculer le taux de croissance spécifique en poids (en % par jour) des bars et /ou turbots lors des expériences d'exposition en aquarium et également lors de l'expérience de caging. De la même façon, le taux de croissance spécifique en longueur (en % par jour) a été calculé suivant l'équation :

$$GL = 100(\ln L_2 - \ln L_1)/(t_2 - t_1),$$

où (L_1) et (L_2) représente la longueur totale du poisson (en mm) au temps (t_1) et (t_2).

4.2.2 Otolithes : croissance récente et indices de formes

Croissance récente

Les otolithes sont des concrétions calcaires localisées au niveau de l'oreille interne et participent aux fonctions d'équilibre et d'audition. Trois paires sont présentes dans ces capsules otiques : le lapillus, la sagitta et l'astériscus. La composition chimique des otolithes peut être influencée par des facteurs physiologiques (taux de croissance, stress, activité de reproduction) et des facteurs environnementaux (salinité, température). L'otolithe croît par apposition d'un nouveau matériel sur sa surface. Ce phénomène cyclique, fonction du métabolisme du calcium et de la synthèse des acides aminés, conduit à la formation de microzonations composée d'une zone d'accrétion large et calcifiée et d'une zone "de discontinuité" étroite et organique (Watabe *et al.*, 1982; Campana et Neilson, 1985). Cette zonation a mené à la découverte de stries journalières de croissance permettant d'estimer l'âge des poissons (Pannella, 1971). En s'intéressant à la distance inter-accroissement des dernières stries de croissances journalières, il est également possible d'estimer la croissance récente du poisson.

Une évaluation de la croissance des poissons basée sur la lecture de la microstructure des otolithes comporte trois étapes : extraction et montage de l'otolithe, préparation puis observation et interprétation. L'indice de croissance récente est déterminée à partir des sagitta, du fait de leur plus grande taille et donc de leurs stries journalières plus distinctes. L'extraction se fait sous loupe binoculaire, les deux sagittae sont nettoyées des tissus provenant des labyrinthes membraneux. Ils sont ensuite fixés dans une colle thermoplastique (Crystal Bond) et polis afin de réduire la profondeur du champ et d'améliorer la définition des accroissements. Le polissage se fait manuellement sur les deux faces de l'otolithe à l'aide de papiers abrasifs fins (de 3 μm à 0,1 μm) jusqu'à obtention d'un plan régulier contenant les accroissements journaliers périphériques. Chaque sagitta est ensuite gravée à l'EDTA (acide éthylènediamine tétraacétate 5%) durant quelques secondes puis rincée à l'eau distillée pour

faciliter la discrimination des stries. Toutes les mensurations sont réalisées au microscope (grossissement 10x) le long d'un même axe antéro-postérieur et au niveau du rostre à l'aide du logiciel TNPC 4.2 (Traitement Numérique des Pièces Calcifiées) (Ogor et Fablet, 2005). La largeur des accroissements est mesurée à partir de la périphérie de l'otolithe par groupe de 3x5 stries (Figures 29 et 30). La lecture de chaque otolithe est réalisée trois fois à différents moments de la journée.

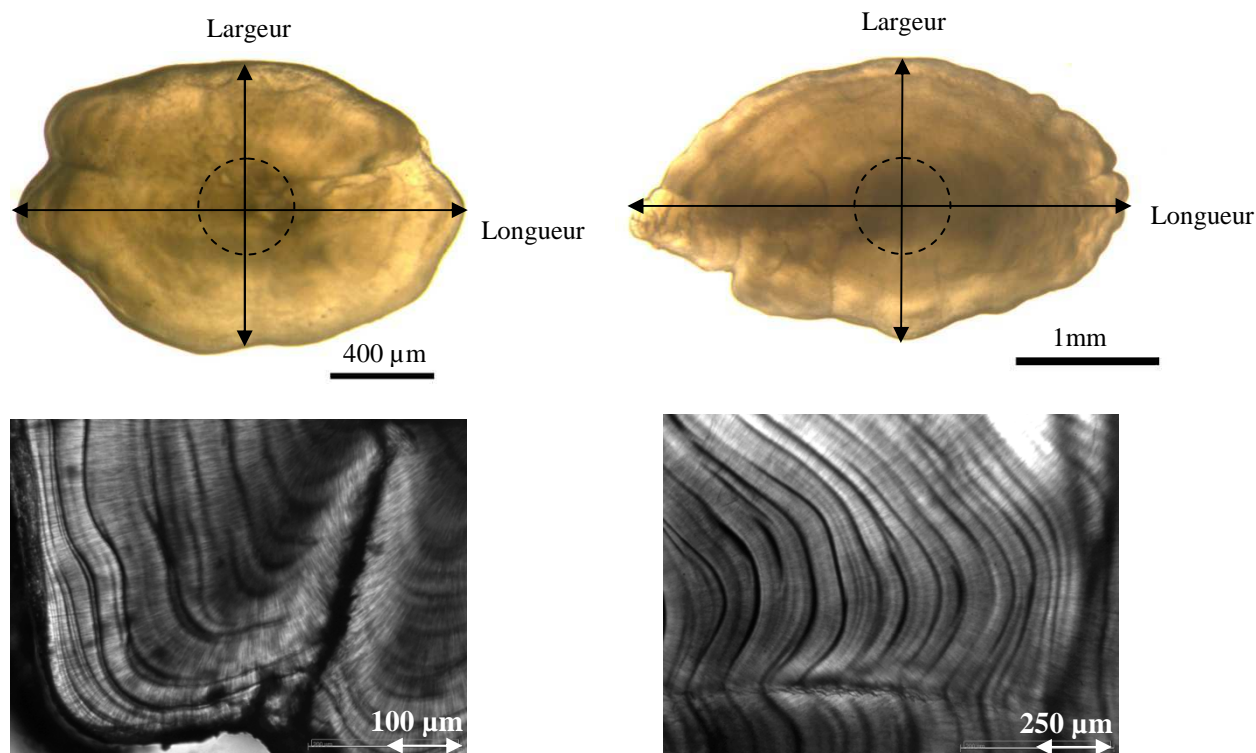


Figure 29 : Otolithe de turbot et ses stries de croissance observées après polissage manuel de l'otolithe.

Figure 30 : Otolithe de bar et ses stries de croissance observées après polissage manuel de l'otolithe.

Indices de forme

Des variations de taux de croissance des poissons peuvent être reliées à des variations dans la microstructure et la forme des otolithes du fait de relations proportionnelles entre la croissance de l'otolithe et la croissance somatique (Burke *et al.*, 2008). Au sein d'une même espèce, la forme de l'otolithe peut donc varier selon la taille du poisson, le site géographique, la profondeur et/ou d'autres facteurs environnementaux (Mérigot *et al.*, 2007). L'observation de variations dans l'asymétrie des otolithes a également été utilisée comme indicateur pour analyser des différences entre populations (Gronkjaer et Sand, 2003) ou pour tester l'influence de différents paramètres environnementaux comme la température (Lu et Bernatchez, 1999), le

parasitisme (Sasal et Pampoulie, 2000) ou la pollution (Hardersen, 2000). Pour chaque expérience, plusieurs paramètres et indices de formes (Mérigot *et al.*, 2007) ont pu être mesuré sur les otolithes à partir de photographies effectuées avant le montage des otolithes sur lame. Ces paramètres sont présentés dans le Tableau 5. Cet aspect a été plus particulièrement développé pour les flets prélevés dans le milieu naturel puisqu'ils sont amenés à intégrer davantage les caractéristiques du milieu et sur une plus longue période que ceux soumis à des expositions contrôlées.

Paramètres de forme	
Longueur	L
Largeur	l
Périmètre	P
Aire	A

Fluctuation d'asymétrie, otolithe droit (D) – gauche (G)	
FA1	$ A_D - A_L $
FA2	$ A_D - A_L / A_{DG}$

Tableau 5 : Paramètres de forme des otolithes mesurés au cours de ce travail de thèse et indices d'asymétrie calculés sur les juvéniles de flet, *Platichthys flesus*, prélevés dans les quatre estuaires (Mérigot *et al.*, 2007; Panfili *et al.*, 2005).

4.3 Indices de condition

4.3.1 Indice de condition K de Fulton

Cet indice est calculé à partir de la formule suivante :

$$K = W/L^3 \times 100$$

où W est le poids (en mg) et L la longueur totale (en mm) de l'individu. Le calcul du K assume une croissance isométrique du poisson puisque que la longueur est inféodée d'une puissance 3. Cette considération d'une croissance isométrique représente une approximation valide pour la plupart des espèces de poissons (Bister *et al.*, 2000).

4.3.2 Rapport ARN/ADN

La méthodologie utilisée suit le protocole de Clemmensen (1988) basé sur la méthode d'extraction et de quantification de Munro et Fleck (1966). Le dosage des acides nucléiques est effectué pour chaque individu sur un fragment de muscle frais (50 mg). Les muscles sont

pesés puis maintenus dans de la glace durant toute la durée des manipulations pour éviter la moindre dégradation des acides nucléiques. Les échantillons sont ensuite homogénéisés à l'aide d'un Ultra Turrax dans une solution tampon Tris (0,05 M Tris-HCL, 0,1 M NaCl et 0,01 M EDTA, pH=7.5) auquel a été ajouté de la protéinase K (0.2 mg.mL^{-1}). La protéinase K a pour but de digérer les matrices protéiques des cellules. Aux échantillons, est ajouté 30 μL de SDS 20% (sodium dodécyl sulfate) qui lyse les cellules.

L'extraction est effectuée dans un premier temps par ajout de 300 μL de phénol (SIGMA) qui a la propriété de désintégrer les protéines. Un volume de 300 μL de chloroforme isoamylalcool (SIGMA) est également ajouté afin de permettre la solubilisation des lipides et protéines et ainsi de les retirer de la phase nucléaire qui est récupérée après centrifugation (4°C , 6000 rpm, 10 min). Cette étape est renouvelée. La seconde étape consiste à ajouter uniquement 300 μL de chloroforme isoamylalcool (24:1), ce qui permet notamment d'éliminer les traces éventuelles de phénol. La phase nucléaire est récupérée par centrifugation (4°C , 6000 rpm, 5 min), la procédure est renouvelée et 200 μL de tampon Tris est ajouté.

La détermination des acides nucléiques est effectuée par méthode fluorimétrique. Un volume de 5 μL de bromure d'éthidium (BET, SIGMA), fluorophore spécifique des acides nucléiques (Karsten et Wollenberger, 1977), est ajouté à 45 μL d'échantillon dans des microplaques de 96 puits. L'intensité de fluorescence de ce marqueur varie linéairement avec la concentration d'acides nucléiques. La fluorescence des acides nucléiques totaux (ARN + ADN) est alors mesurée au spectrofluorimètre mis à disposition par le LEMA (Université du Havre), sous longueur d'onde d'excitation de 360 nm et longueur d'onde d'émission de 590 nm. Un aliquot de l'échantillon est ensuite incubé à 37°C durant une heure avec 0,3 μL de ribonucléase A ($0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$). Une seconde lecture au spectrofluorimètre détermine ainsi la fluorescence due aux ADN uniquement. La fluorescence en ARN est alors déduite en soustrayant la fluorescence totale (ARN + ADN) à celle de l'ADN. Ces fluorescences sont ensuite converties en $\text{ng.}\mu\text{L}^{-1}$ à l'aide de droites d'étalonnages préalablement établies à partir d'ADN standard de sperme de saumon (SIGMA) et d'ARN de levure type III (SIGMA) (Figure 31).

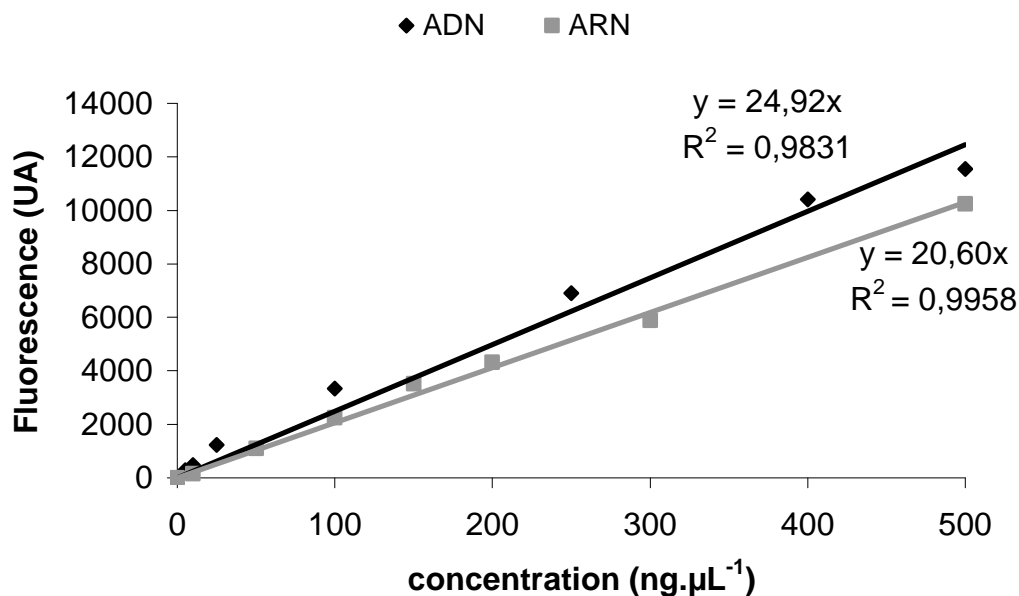


Figure 31 : Droites d'étalonnage des concentrations d'ADN et d'ARN en fonction de la fluorescence émise par le bromure d'ethidium (BET), fluorophore spécifique des acides nucléiques.

4.3.3 Indice lipidique : rapport TAG/ST

L'analyse des teneurs en lipides est effectuée à partir d'échantillons de muscle. Dans un premier temps, 300 à 400 mg de muscles (poids humide) sont prélevés, puis lyophilisés (24 h) afin de déterminer le poids sec. Les échantillons sont ensuite conservés dans de l'azote gazeux afin d'éviter l'oxydation des muscles. L'extraction des lipides est effectuée selon la méthode de Bligh et Dyer (1959), légèrement modifiée. Les cellules musculaires sont désintégrées par sonication ($T^{\circ}\text{C} < 40^{\circ}\text{C}$, 20 min) dans un mélange d'eau Milli-Q:méthanol:chloroforme (1:2:1, v:v:v) (Fisher Scientist). Le chloroforme (CHCl_3) extrait principalement les lipides « neutres » (les triglycérides), alors que le méthanol (CH_3OH) extrait les lipides membranaires (phospholipides, glycoprotéines). L'ajout d'eau Milli-Q:chloroforme (1:1, v:v) permet d'obtenir un complexe à deux phases, l'une organique, l'autre aqueuse. Les lipides sont transférés dans la couche inférieure correspondant au chloroforme après centrifugation (5 min à $3000 \text{ trs. min}^{-1}$). La phase organique est alors extraite et la phase aqueuse subit une seconde extraction au chloroforme (2, v). Les deux couches de chloroforme séparées sont combinées et évaporées à l'aide d'un évaporateur rotatif. Suite à cette évaporation, 3 x 1 mL de chloroforme sont ajoutés afin de collecter les lipides extraits. Après évaporation d'une partie du volume sous flux léger d'azote, l'extrait

lipidique est transféré dans un vial en verre de 2 mL (préalablement pesé à vide) et évaporé une seconde fois. Les lipides totaux ainsi obtenus sont pesés (mg.g^{-1} de poids sec) et redissous dans un mélange de chloroforme:méthanol (2:1).

Les classes lipidiques sont séparées par chromatographie sur couche mince (CCM). Les plaques de chromatographie (DC Gel de Silice 60) sont constituées d'une feuille de verre (10 cm x 10 cm) sur laquelle repose une fine couche de gel de silice (SIGMA). Dans la majorité des cas, deux injections de 5 μL (10 μL) sont utilisées pour chaque échantillon. L'éluant utilisé pour la migration est un mélange d'hexane:diéthylether:acide acétique (16:4:0,2, v:v:v) (Fisher Scientist). Après migration (11 min), le chromatogramme est immergé dans une solution fixatrice acide orthophosphorique (33%) :acide acétique :acide sulfurique (0,5%) :sulfate de cuivre (20:20:2:360) (Fisher Scientist) durant 2 min 30 s. Le chromatogramme est ensuite séché à l'air chaud et les classes lipides sont révélées sur plaque chauffante 45 min à 120°C. Le chromatogramme est finalement scanné et enregistré sous format JPEG. Un programme d'analyse d'image (NIH image, image J windows 1.41) est utilisé afin de déterminer la contribution relative de chaque classe lipidique en intégrant la surface du chromatogramme concerné. Avec cette méthode, il est possible de déterminer six classes lipidiques (phospholipides, acides gras, stérols, triglycérides, stérols esters, cirres) dont la quantité est exprimée en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec (Figures 32 et 33). Le rapport TAG/ST peut alors être calculé.

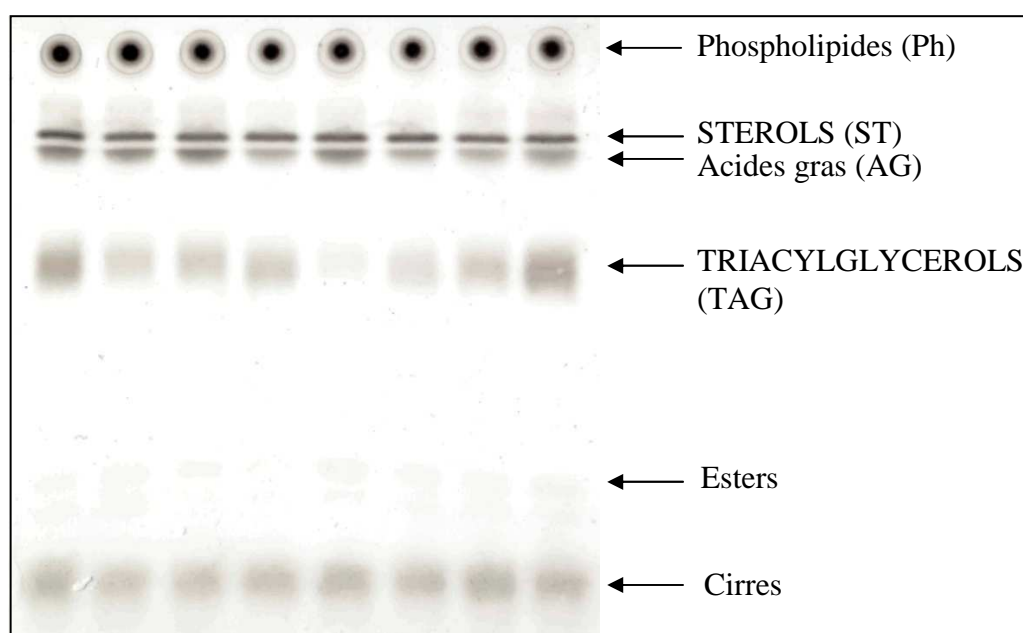


Figure 32 : Détermination des classes lipidiques par migration sur plaque TLC obtenues après injection d'un extrait lipidique de fragment de muscle de juvénile de turbot, *Scophthalmus maximus*.

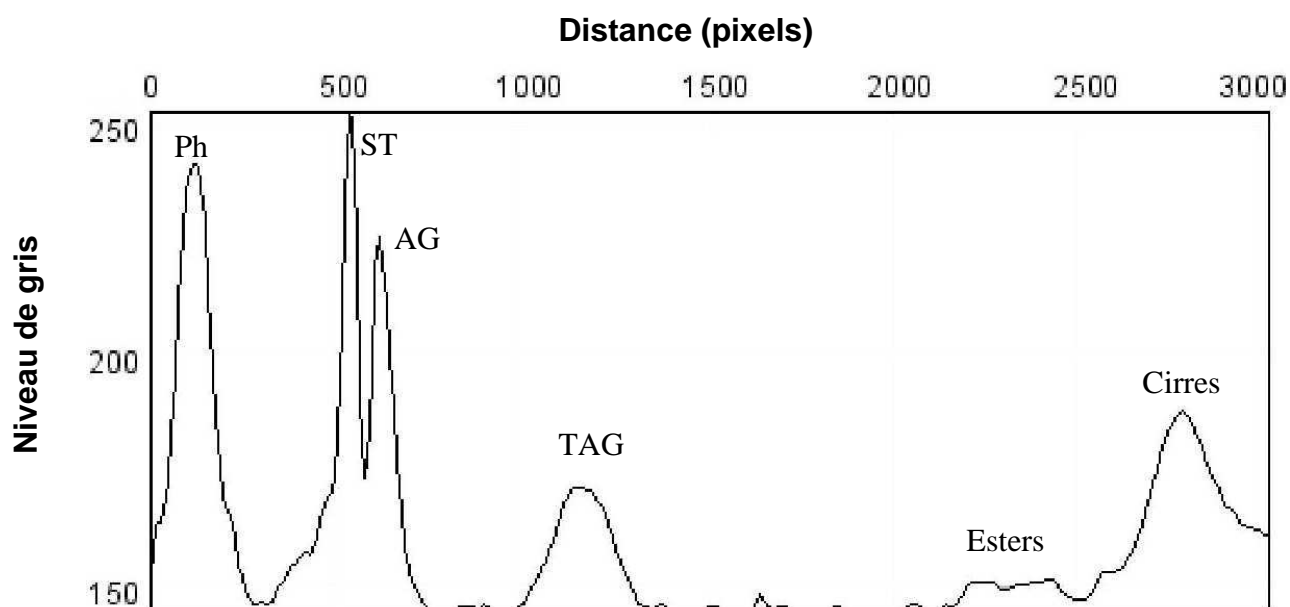


Figure 33 : Détermination des classes lipidiques par intégration des niveaux de gris après scannage d'une plaque TLC obtenues après injection d'un extrait lipidique de fragment de muscle de juvénile de turbot, *Scophthalmus maximus*.

4.4 Anomalies pathologiques et histologiques

4.4.1 Pathologies

Lors de chaque expérience, chaque individu a été analysé attentivement afin de surveiller la présence de pathologies externes mais également de pathologies internes visibles lors de la dissection. Une grille de description des potentielles pathologies a été établie (Tableau 6).

Tableau 6 : Grille de description des principales pathologies surveillées, utilisée lors de l'observation des juvéniles de poissons à la fin de chaque expérience.

Altérations anatomiques	Lésions oculaires
Maigreux	Gros yeux
Déformation, difformité	Hémorragies
Absence d'organes	Perte d'œil
Gros ventre	
Anus rouge saillant	
Altération de la couleur	Lésions branchiales
Coloration anormale	Paleur
Mélanose (pigment noir)	Congestion
Dépigmentation	Nécrose /kystes
Lésion de la peau et des nageoires	Parasitisme externe/interne
Absence d'écailles	Points blancs
Hypersécrétion de mucus	Points noirs
Excroissances, grosseurs, tumeurs, kystes	Mycoses ("mousse")
Hémorragies	Parasites visibles à l'œil nu
Lésions ouvertes (plaies, blessures)	ou à la loupe
Ulcère hémorragiques	
Nécrose	
Erosion (nageoire déformée)	

4.4.2 Altérations histologiques

La préparation des coupes histologiques des branchies des bars exposés au pétrole a été réalisée par prestation dans un laboratoire de toxicologie à la Rochelle (société HISTOTOX). L'interprétation des lames a été réalisée par l'école nationale vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation, Nantes-Atlantique (ONIRIS, Nantes). La seule anomalie observée était la présence de téléangectasie qui correspond à une dilation des vaisseaux au niveau des filaments branchiaux (Figure 34).

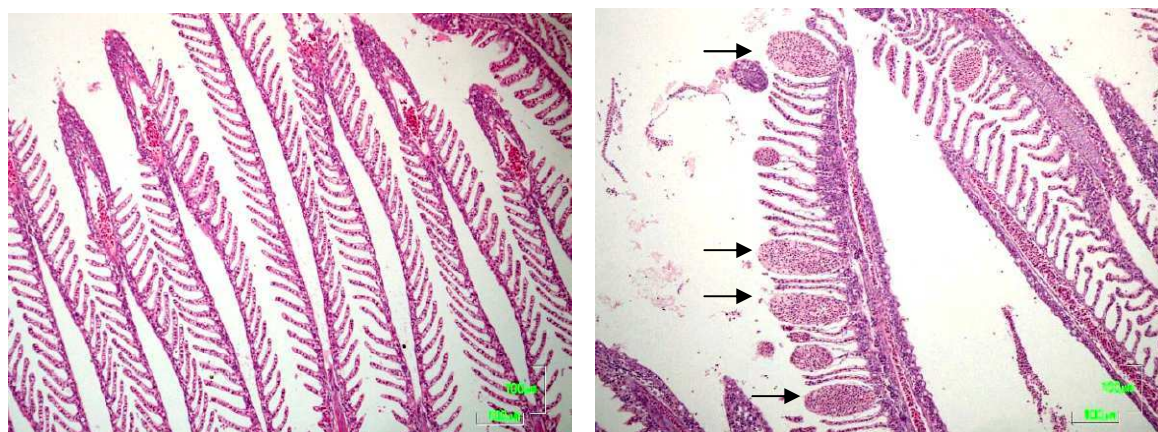


Figure 34 : Analyse histologique des branchies de bars : (A) filament branchial normal (B) Présence de sévère telangiectasie (= vascularisation des vaisseaux) au niveau d'un filament branchial.

4.4.3 Etude immunologique

Dans le cadre du projet DIESE, une collaboration a été entreprise avec le laboratoire d'écotoxicologie - milieux aquatiques (LEMA) de l'Université du Havre. Ainsi, différents marqueurs immunotoxicologiques ont été mesurés sur les turbots après exposition aux sédiments. L'expression des HSP70 branchiales, la fréquence de mélanomacrophages (MMC) sphériques, le volume et le rapport cortex/médulla thymiques ainsi que le taux de TGF- β 1 plasmatique ont été mesurés sur ces individus. Ces analyses ayant été effectuées par l'Université du Havre, elles ne seront donc pas développées dans ce chapitre.

4.4.4 Anomalies squelettiques

Des radiographies des poissons ont été effectuées après l'encagement des bars et turbots. Les radiographies ont été réalisées dans un cabinet de radiologie par mammographie à rayon X (Centre d'Imagerie Médicale Gravelinois). Chaque radio a été analysée attentivement pour détecter la présence d'anomalie squelettique au niveau de la colonne vertébrale et des vertèbres.

Chapitre III : Simulation des effets d'un déversement pétrolier sur des juvéniles de bar : analyse en conditions contrôlées

Chapitre III : Simulation des effets d'un déversement pétrolier sur des juvéniles de bar : analyse en conditions contrôlées

1. Réponses de biomarqueurs moléculaires et d'indices de croissance et de condition mesurées sur des juvéniles de bar, *Dicentrarchus labrax*, exposés à du pétrole

Résumé :

La multitude d'accidents pétroliers ayant touché l'environnement marin ces dernières décennies est à l'origine de nombreuses études d'exposition d'organismes à des produits pétroliers. Ces études sont réalisées afin de comprendre le comportement du pétrole dans le milieu marin. Elles visent notamment à la fois à déterminer ses effets sur les organismes mais aussi à développer des biomarqueurs pertinents permettant de suivre l'évolution de ces effets sur les communautés marines. Du fait de la sensibilité généralement établie des biomarqueurs moléculaires aux produits pétroliers, ils ont été utilisés chez le poisson dans un contexte de surveillance du milieu après plusieurs accidents pétroliers en comparaison avec les valeurs disponibles avant l'accident ou par comparaison avec des sites non impactés. Les auteurs considèrent ainsi que les niveaux métaboliques observés de ces biomarqueurs moléculaires témoignent du degré d'exposition des organismes aux produits pétroliers. Cependant, ils permettent difficilement de conclure en termes d'état de santé des organismes dans le milieu. En effet, suivant l'ampleur des accidents pétroliers, il peut en résulter une modification de l'état de santé des poissons et des populations. Dans cette étude, les effets d'une exposition à du pétrole ont été analysés sur des juvéniles de bar, *Dicentrarchus labrax*. Les réponses de plusieurs biomarqueurs moléculaires ont été comparées avec celles d'indices de croissance et de condition individuellement mesurés sur les poissons. Les bars ont été exposés à un pétrole brut léger mécaniquement dispersé pendant 48 et 96 heures. Les concentrations en HAPs ont été analysées dans l'eau et les poissons. Plusieurs biomarqueurs hépatiques (EROD, GST et CAT) ont été analysés en tant qu'indicateurs précoces de l'exposition au pétrole. Les performances physiologiques des juvéniles ont ensuite été mesurées après une période de décontamination de 28 et 26 jours.

Les concentrations en hydrocarbures particulières observées dans les bacs d'exposition reflétaient celles observées après certains accidents pétroliers comme le *North Cape* aux Etats-Unis en 1996 ou le *Prestige* au nord ouest de l'Espagne en 2002. La diminution de ces concentrations avec le temps d'exposition ainsi que celles des HAPs dissous dans l'eau étaient comparables au comportement des hydrocarbures en condition naturelle sous l'effet des facteurs environnementaux. L'exposition des organismes aux produits pétroliers a entraîné une bioconcentration des HAPs dans les poissons après les deux temps d'exposition évoquant le risque associé à leurs caractères toxiques. L'absence de différence entre les deux temps d'exposition suggère une métabolisation rapide des composés aromatiques dans les organismes. Une augmentation des activités EROD a été observée après les 48 h d'exposition au pétrole attestant de la sensibilité de ce biomarqueur moléculaire aux hydrocarbures. Cette activité a ensuite doublé après les 96 h d'exposition et une augmentation de la GST a été observée. Après une période en eau claire de 28 jours suivant l'exposition de 48 h, les organismes exposés au pétrole présentaient des taux de croissance et des rapports ARN/ADN diminués par rapport aux poissons de référence. Cette diminution des performances de croissance des organismes a également été observée 26 jours après les 96 h d'exposition au pétrole, avec en complément une diminution de la croissance en poids, de la croissance récente obtenue par otolithométrie et de l'indice de condition de Fulton. L'utilisation de ces indices de croissance et de condition a permis d'évaluer les effets délétères des composés pétroliers sur les performances physiologiques des organismes qui augmentent avec le temps d'exposition au pétrole. Le fait que les activités EROD soient reliées à ces effets sur l'état de santé des organismes témoigne de la pertinence de ce biomarqueur moléculaire dans un contexte de pollution de type pétrolière. Enfin, ce travail suggère que l'utilisation simultanée de ce type de biomarqueur moléculaire avec des indices de croissance et de condition tendrait à améliorer la détermination des impacts d'un accident pétrolier sur l'état de santé des juvéniles et *a posteriori* des populations de poisson.

Responses of molecular biomarkers, growth and condition indices measured on juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*, exposed to an acute crude oil

Kerambrun E.^{123*}, S. Le Floch⁴, W. Sanchez⁵, H. Thomas Guyon⁶, T. Meziane⁷, F. Henry¹²³ and R. Amara¹²³

¹ Univ Lille Nord de France

² ULCO, LOG, F-62930 Wimereux, France

³ CNRS, UMR 8187, F-62930 Wimereux, France

⁴ CEDRE, F-29218 Brest, France

⁵ Unité d'écotoxicologie *in vitro* et *in vivo*, Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), BP 2, F-60550 Verneuil en Halatte, France

⁶ Littoral Environnement Sociétés (LIENSs), Université de la Rochelle, F-17000 La Rochelle, France

⁷ UMR-CNRS 5178, Biologie des Organismes Marins et Ecosystèmes Département Milieux et Peuplements Aquatiques, MNHN, F-75231 Paris, France

1. Introduction

Oil spills caused by maritime transport of petroleum products such as tanker accidents and offshore production facilities represent an important source of marine and coastal pollution. Approximately 5 million tons of crude oil from a variety of sources enters the marine environment each year (Kennedy and Farrell, 2005). In particular, the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in crude oil is of concern, as they exhibit high toxicity in the marine environment (Van Veld *et al.* 1992; Achuba and Osakwe, 2003; Gonzalez-Doncel *et al.*, 2008). Greater acute toxicity is generally associated with the lower molecular weight PAHs whereas some high molecular weight PAHs form metabolites that can function as carcinogens (Gonzalez-Doncel *et al.*, 2008).

Assessment of the environmental impact of petroleum compounds on the marine environment is complicated because these products consist of complex mixtures or organic compounds. Moreover, after release into the marine environment, oils will gradually weather due to natural physical and chemical processes such as evaporation, dispersion, dissolution and chemical modification (Fingas and Hollebone, 2003). Risk assessments based solely on chemical analyses do not suffice to evaluate the complex toxic effects on the environment. Recently, other lines of evidence have been developed to complement chemical analysis and to assess the biological effects on fish. The use of biomarkers to assess the detrimental effects of petroleum compounds on marine biota has been recognised by many authors. Biomarkers have been defined as 'biological responses that can be related to an exposure to, or toxic

effect of, an environmental chemical or chemicals' (Peakall, 1994). Many parameters have been investigated to assess disturbances of various biochemical, biological and physiological functions linked to chemical exposure (Van der Oost *et al.*, 2003).

Biochemical markers of exposure have been extensively used to evaluate the biological effects on fish exposed to hydrocarbon compounds. PAHs are primarily metabolized, and thereby detoxified, by catalytic activities linked to the cytochrome P450 system (Sturve *et al.*, 2006). The 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity appears to be the most sensitive catalytic probe for determining the inductive responses of the cytochrome P450 1A (Martinez-Gomez *et al.*, 2006). Numerous field studies have demonstrated the suitability of EROD activity in episodes of hydrocarbon pollutions (e.g. Devaux *et al.*, 1998; Lee and Anderson, 2005). Moreover, Glutathione-S-transferases (GSTs) are the most important enzymes of the phase II biotransformation of xenobiotics that have been shown to respond to organic contaminants (Deviller *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2004). PAHs metabolism can also lead to the formation of reactive oxygen species (ROS) through the formation of redox labile metabolites. Antioxidant enzymes, such as catalase (CAT), belong to the cellular antioxidant system that counteracts the toxicity of ROS. Variations in CAT activity have been observed in fish exposed to organic compounds (Achuba and Osakwe, 2003; Damasio *et al.*, 2007).

Molecular biomarkers could be very useful because they allow the early detection of effects before higher biological organization levels become affected. However, considering their potential use in ecological risk assessment, it is important to know how the changes detected in such parameters are relevant. Indeed, in spite of their rapid responsiveness and sensitivity to contaminant exposure, molecular biomarkers have questionable ecological relevance, as a result of being endpoints at a low level of biological organization (Castro, 2004). On the contrary, change in physiology and fitness seems to be a common response in marine organism exposed to stressful pollutants (Alquezar *et al.*, 2006; Amara *et al.*, 2007; Faucher *et al.*, 2008). Juvenile fish condition and health may be determined by a variety of indices, which are relevant at different time scales: biochemical indices (RNA:DNA ratio, lipid index), histological status, morphometric indices (Fulton's K) or growth indices. Mortality rates for fish are high during the first several months of their lives, and only those few individuals surviving can reproduce and hence contribute to the recruitment success. Any difference in juvenile fish growth and condition in the first year of life can result in a large difference in the number of individuals entering the reproductive stage annually (Houde, 1987, Buckley *et al.*, 1999). In this context, knowledge of the effects of contaminant exposure

on the health of fish is essential in understanding the impact of pollution events, such as oil spills, on fish populations.

The main objective of this study was to assess and compare the response of several molecular biomarkers with growth and condition indices of juvenile sea bass exposed to a light crude oil for 48 and 96 h. Sea bass was chosen because it is a common and commercial species with a wide distribution range along the European coast. Molecular biomarker activities were analysed in relation to seawater hydrocarbon concentrations and PAH concentrations in fish. The effects of oil exposure on sea bass growth and condition indicators were then measured after a depuration period in clean seawater.

2. Materials and methods

This experiment was conducted in accordance with the European Commission recommendation 2007/526/EC on revised guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes. CEDRE (Centre de Documentation de Recherche et d'Expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux, France) is authorized to conduct experimentation on animals in its capacity as a certified establishment; according to the administrative order no. 2006-0429 dated 9 May 2006.

2.1. Chemicals

The Arabian Light crude oil, the Brut Arabian Light 110 (BAL 110), used for this study, was topped at 110°C to remove the most volatile components. This was done in order to simulate the natural behaviour of the oil after it is released at sea (by evaporation of the most volatile components) and before it reaches coastal zones. BAL 110, similar to oil spilled by the Amoco Cadiz in 1978, possesses the following physicochemical characteristics: 0.860 of density at 20°C, 60 mPa s of viscosity at 15°C, 12% polar compounds, 34% aromatic hydrocarbons and 54% saturated hydrocarbons.

2.2. Experimental procedure

One hundred and sixty juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*), (Weight 4.87 ± 0.83 g; Age: five months) were obtained from a hatchery (Aquanord in France). The fish were acclimatised in a clean tank supplied with an open seawater circuit for one week. The

photoperiod was set at a 10 h light and 14 h dark cycle. During the acclimation, the water temperature was 13 ± 0.5 °C and the fish were fed with a commercial fish food twice a day. The daily feeding amount was maintained at approximately 2% of the total fish weight. Before the beginning of the experiment each fish was anaesthetised in a $320 \mu\text{L.L}^{-1}$ 2-phenoxyethanol solution, individually marked (Visual Implant Tag, 1.2 mm x 2.7 mm, Northwest Marine Technology), weighed (near to 0.01 g) and measured for total length (near to 0.1 mm).

The experimental system was devised to maintain the mixture of oil as a homogeneous solution. The mixture was homogenized using a funnel (at the surface of a 300-L seawater tank), which was linked to a Johnson L450 water pump (at the bottom of the tank) in order to homogenize the mixture despite the hydrophobic nature of the oil (Milinkovitch *et al.*, 2011). The system was a static water system and exposure studies were conducted at 15 ± 0.5 °C. Physicochemical parameters (temperature, salinity, oxygen and pH) were measured daily. The mechanically dispersed oil exposure was made by pouring 20 g of petroleum into the funnel. For the control condition (Ctrl), the same experimental system was used without oil addition. Each condition (Ctrl and oil exposure) was done in duplicate, thus four tanks were used.

Forty juvenile sea bass were randomly distributed in each tank 24 h after the addition of petroleum into the system. Ten fish per tank were sampled at two sampling times: 48-h (t_{48}) and 96-h (t_{96}). They were anaesthetised (2-phenoxyethanol), their livers were sampled and frozen in liquid nitrogen, and their gills were preserved in a formaldehyde solution (10 %). The remainders of the fish were stored at -20°C. At t_{48} and t_{96} , ten other fish per tank were transferred to the clean seawater for 26 and 28 days respectively. Conditions were similar to those occurring in acclimation. After this growth period, the fish were identified (tag), weighed and measured for total length. Their livers and gills were sampled as previously. Their muscles were stored at -20°C and their otoliths (sagittae) were extracted and preserved in ethanol (95%).

2.3. Chemical analysis

2.3.1. TPH seawater concentrations

The TPH concentrations, which are the sum of dissolved hydrocarbon concentrations and the amount of oil droplets, were measured daily for both exposure conditions during the 96h-exposure, using the mean of two replicates for each time. The TPH's in the seawater samples were extracted with 10 mL of pestipur-quality dichloromethane (99.8 % pure solvent, Carlo

Erba Reactifs, SDS). After the separation of the organic and aqueous phases, the water was extracted two additional times with the same volume of dichloromethane (2×10 mL). The combined extracts were dried on anhydrous sulphate and then analyzed using a UV spectrophotometer (UV-vis spectrophotometer, Unicam) at 390 nm, as described by Fusey and Oudot (1976).

2.3.2. Seawater concentrations of PAHs

Seawater concentrations of 19 PAHs (alkylated and parents) were assessed daily during the 96h-exposure: the 16 US-EPA (1996) PAHs and 3 sulfur containing heterocyclic compounds (benzothiophene, biphenyl and dibenzothiophene). After sampling, perdeuterated internal standards (CUS-7249, Ultra Scientific, Analytical solutions) were added to the samples and a 24 h settling phase was undertaken to separate oil droplets and particulate matter from the seawater. Then, PAHs were extracted from the seawater using the stir bar sorptive extraction technique (SBSE—stir bar coated with PDMS, Gerstel), and analyzed using thermal desorption coupled to capillary gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). The GC was a HP7890 series II (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) coupled with a HP5979 mass selective detector (MSD, Electronic Impact: 70 eV, voltage: 2000 V). PAHs were quantified relative to the perdeuterated internal standards introduced at the beginning of the sample preparation procedure and according to published procedures (Roy *et al.*, 2005).

2.3.3. Fish concentrations of PAHs

The levels of the 19 PAHs (parents) were determined in the fish sampled after both exposure times with a GC-MS-MS Agilent Technologies 7890A, using the procedure of Baumard *et al.* (1997) with some modifications. Five pools of three fish were analyzed per treatment. Prior to extraction, the head, the viscera and the skin of each fish were removed. A volume of 10 μ l of perdeuterated internal standards (CUS-7249, Ultra Scientific, Analytical solutions) was added to about 3 g of fish pool samples, and the obtained mixtures were digested for 4 h under reflux in 50 ml of an ethanolic solution of potassium hydroxide (2 M, Fisher Chemicals). After cooling, settling and addition of 20 ml of deionised water, the digest was extracted in a 250 ml funnel twice with 20 ml of pentane (Carlo Erba Reactifs, SDS). The extract was evaporated with a Turbo Vap 500 concentrator (Zyman, Hopkinton, MA, USA, at 880 mbar and 50 °C) to obtain After concentration into 1 ml of concentrated extract and purification, . The purification of the extract was performed by its transfer to a silica column (5 g of silica). Hydrocarbons were eluted with 50 ml of pentane : dichloromethane (80 : 20,

v:v, SDS) and concentrated to 200 μ l by means of a TurboVap 500 concentrator (Zyman, 880 mbar, 50°C). Aaromatic compounds were analysed by GC–MS-MS and PAHs were quantified relative to the perdeuterated internal standards introduced at the beginning of the sample preparation procedure. The same protocol was used to measure the PAH concentrations in fish sampled following the 28 and 26 days period in clean seawater. However, only two pools of three fish were analysed per treatment.

2.4. Biological analysis

Biochemical hepatic biomarkers and histological analysis on the gills were performed on the fish sampled after the two exposure times (t_{48} and t_{96}) and on the fish transferred to the clean seawater after their contamination for 28 and 26 days, respectively. The specific growth rates, the otolith recent growth index, the RNA:DNA ratio, the TAG:ST ratio and the morphometric index, were only measured on the sea bass sampled after their period in the clean seawater.

2.4.1. Molecular biomarkers analysis

The livers were homogenized in an ice-cold phosphate buffer (0.1 M, pH = 7.8) with 20% glycerol and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride as a serine protease inhibitor. The homogenates were then centrifuged at 10,000 g at 4 °C, for 15 min and the post-mitochondrial fractions were used for biochemical assays. The total protein concentrations were determined using the method of Bradford (1976) with bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Chemicals, France) as a standard. Ethoxyresorufin-O-deethylase activity (EROD) was determined following the hydroxylation of 7-ethoxyresorufin by the method of Flammarrion *et al.* (1998). The reaction mixture consisted of a phosphate buffer (0.1 M, pH = 6.5), 7-ethoxyresorufin (8 μ M) and NADPH (0.5 mM). The change in fluorescence was recorded (excitation wavelength 530 nm, emission wavelength 585 nm) and the enzyme activity was calculated as $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein using Resorufin standard.

Glutathione S-transferase activity (GST) was determined following the conjugation of reduced glutathione with CDNB by the method of Habig *et al.* (1974). The reaction mixture consisted of a phosphate buffer (0.1 M, pH = 6.5), reduced glutathione (1 mM) and CDNB (1 mM). The change in absorbance was recorded at 340 nm and the enzyme activity was calculated as $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein using GST standard.

Catalase activity (CAT) activity was determined by the method of Babo and Vasseur (1992). Briefly, the assay mixture consisted of a phosphate buffer (100 mM pH 6.5) and H₂O₂ (28 mM). The change in absorbance was recorded at 240 nm. CAT activity was calculated in terms of $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein using bovine erythrocyte Catalase as standard.

2.4.2. Histological analysis

Organisms from the toxicity tests were analyzed to determine the histopathological damages in different gills. After dehydration in graded concentrations of ethanol, the samples were embedded in a paraffin wax. Histological sections were stained with Hemalun Eosine Safran. These sections were then reviewed by light microscopy and photographed.

2.4.3. Growth indices

Sea bass specific growth rates in weight (% per day) were estimated as:

$$GW = 100(\ln W_2 - \ln W_1)/(t_2 - t_1),$$

where (W_1) and (W_2) are fish total body weight at times (t_1) (beginning of the experiment) and t_2 (time of collection). Similarly, the specific growth rate in length was estimated as:

$$GL = 100(\ln L_2 - \ln L_1)/(t_2 - t_1),$$

where (L_1) and (L_2) are fish total length at times (t_1) and (t_2) respectively.

The recent growth index (RG) was determined by measuring the width of the peripheral daily increments of the otoliths. As there was a significant relationship between the otolith sagittal diameter and fish length (diameter = $1.08 + 0.028$ (TL), $R^2 = 0.67$, $p < 0.001$), we used the daily otolith width increments from the previous 5 days before the end of the experiment as an indicator of recent growth (mean distance between the margin of the otolith back to the 5th ring). The sagittae were cleaned and photographed to determinate the diameter, perimeter and area of each otolith. Then, they were mounted on a glass slide in thermoplastic cement (Crystal Bond). Sections of sagittae were obtained by polishing them on both sides with grinding paper of decreasing grit sizes (5 to 0.1 μm) until increments at the outer edge were visible. Otoliths were etched for 30 sec with 0.1 M EDTA and analysed under transmitted light, using a video system fitted to a compound microscope. All the measurements were done along the same axis (anteroposterior) using an Image Analysis System (TNPC, 5.0, NEOSIS). The increment measurement was repeated three times by the same reader at different intervals of time and the mean calculated.

2.4.4. Condition Indices

We estimated three condition indices: RNA:DNA ratio and TAG:ST ratio as indicators of nutritional status and Fulton's K condition index as an indicator of the fish general well being. This latter morphometric index assumes that heavier fish for a given length are in better condition. We calculated Fulton's K condition index with the formula: $K = 100(W/L^3)$, where (W) is the body mass (mg) and (L) is the total length (mm).

Nucleic acid quantification and subsequent RNA:DNA ratios have been used in numerous studies as indices for nutritional condition and growth assessment in larvae and juvenile fish (Buckley, 1984; Gwack and Tanaka, 2001). This biochemical index reflects variations in growth-related protein synthesis, since the quantity of ribonucleic acid (RNA) varies with the rate of protein synthesis, while the amount of deoxyribonucleic acid (DNA) per cell is species-constant in somatic tissue. The procedure used to determine RNA and DNA concentrations in each of the individual fish was based on the Clemmesen method (1988). Nucleic acids were measured on muscle fragments (0.05 g) by homogenizing the sample in an ice-cold Tris-EDTA buffer (0.05 M Tris, 0.1 M NaCl, 0.01 M EDTA, pH 8.0) using an Ultraturrax and subsequently transferring this to a mixture of a Tris-EDTA buffer, proteinase-K (pro-K) and sodium dodecyl sulfate (SDS). Nucleic acids were extracted by a purification step involving phenol-chloroformisoamylalcohol (Amara *et al.*, 2009). The quantity of RNA and DNA was determined by the fluorescence-photometric technique using a specific nucleic acid fluorescent dye-ethidium bromide (Sigma-Aldrich Chemicals, France). The fluorescence due to the total RNA was calculated as the difference between the total fluorescence (RNA and DNA) and the fluorescence after RNAase treatment, which is assumedly due to the presence of DNA only. Salmon sperm DNA (Sigma-Aldrich Chemicals, France) and yeast type III RNA (Sigma-Aldrich Chemicals, France) were used as standards. RNA and DNA contents were both expressed as milligrams per μL .

The third condition index was a lipid storage index based on the ratio of the quantity of triacylglycerols (TAG; reserve lipids) to the quantity of sterols (ST; structural lipids) in the fish. The TAG content is dependent on the nutritional state of the fish as they are a main reserve of energy in teleosts and the first components to be mobilised during periods of stress, while sterol contents remain essentially unchanged during starvation (Galois *et al.*, 1990). The amount of total lipids in each individual was measured on a sample of lyophilised muscle (0.07 g). Lipid extraction was conducted using the method of Bligh and Dyer (1959) slightly modified as described by Meziane and Tsuchiya (2002). Lipids were extracted according to a mixture of water:chloroform:methanol (1:1:1, v/v/v). TAGs and sterols were separated from other lipids by performing thin layer chromatography (TLC).

2.5. Statistical analysis

All statistics were performed with XLSTAT 2007. The differences in biological parameters between the control fish and the petroleum exposed fish at t_{48h} and t_{96h} were analysed with Student t tests. If any biological data did not comply with the parametric assumption of normality and homogeneity of variance after various transformation techniques were tested, the Mann–Whitney U test was used. This non–parametric test was also used to analyse differences in PAH concentrations in the fish.

3. Results

No prevalent mortality was observed during the exposure and the growth period; only five of the 160 (3 %) fish died. In fact, only one control fish died during the 96 h exposure, and one control fish and three oil-exposed fish died during the depuration period.

3.1. Hydrocarbon concentrations in seawater

Seawater total petroleum hydrocarbons (TPH) concentrations during the 96 h exposure of sea bass to petroleum are presented in Fig. 1. No TPH was detected in the control. During the first 48 h of exposure, TPH concentrations decreased from $18.6 \pm 3.6 \text{ mg.L}^{-1}$ to $9.60 \pm 2.86 \text{ mg.L}^{-1}$. After t_{48} , TPH concentrations increased to $19.8 \pm 0.1 \text{ mg.L}^{-1}$ and decreased again to $14.5 \pm 2.6 \text{ mg.L}^{-1}$ at t_{96} .

Seawater concentrations of the 19 PAHs (alkylated and parents) are presented in Table 1. At the beginning of the exposure, the total PAH concentration detected in the control was $0.43 \pm 0.23 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, whereas concentrations in oil condition was $48.7 \pm 15.7 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$. It appears that two- or three-ring PAH compounds were dominant when compared to heavier PAHs (\geq four rings). Similarly to TPH concentrations, a decrease in the total PAH concentration of 37 % was observed during the first 48 h. A reduction of 64 % in the total PAHs continued between 48 h and 96 h.

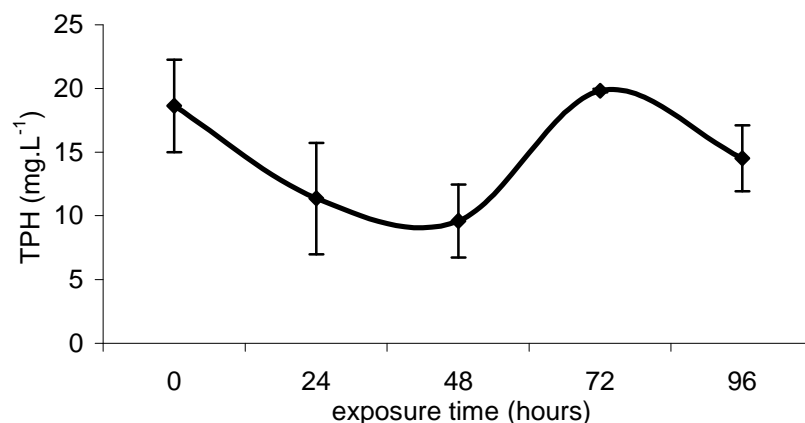


Fig 1. (Figure 35) : Total petroleum hydrocarbons (TPH) concentrations (mg.L⁻¹) in seawater during the 96 hours exposure of sea bass to petroleum. Values are expressed as mean of both experimental replicates (mean \pm SE).

Seawater concentrations of the 19 PAHs (alkylated and parents) are presented in Table 1. At the beginning of the exposure, the total PAH concentration detected in the control was $0.43 \pm 0.23 \mu\text{g.L}^{-1}$, whereas concentrations in oil condition was $48.7 \pm 15.7 \mu\text{g.L}^{-1}$. It appears that two- or three-ring PAH compounds were dominant when compared to heavier PAHs (\geq four rings). Similarly to TPH concentrations, a decrease in the total PAH concentration of 37 % was observed during the first 48 h. A reduction of 64 % in the total PAHs continued between 48 h and 96 h.

Table 1 (Tableau 7) : Concentrations of 19 PAHs (alkylated and parents): the 16 US-EPA PAHs and 3 sulfur containing heterocyclic compounds (ng.L⁻¹) in seawater at the beginning (T= 0 h), at T = 48 h and at T = 96 h in CTRL (control) and OIL (petroleum exposure). Values are expressed as mean of both experimental replicates (mean ± SE). n.d. : not detected

PAH concentrations (ng.L ⁻¹)	T = 0h		T = 48h		T = 96h	
	CTRL	OIL	CTRL	OIL	CTRL	OIL
2-ring						
Naphtalene	35.6 ± 8.41	911 ± 7.7	12.4 ± 3.78	591 ± 213	11.9 ± 1.74	323 ± 63.6
C1-Naphtalene	62.6 ± 3.20	5930 ± 1253	32.3 ± 9.35	1620 ± 737	31.6 ± 2.50	638 ± 179
C2-Naphtalene	43.5 ± 43.5	11106 ± 4037	47.9 ± 5.04	1706 ± 593	28.6 ± 3.99	668 ± 174
C3-Naphtalene	34.9 ± 24.8	7635 ± 2848	31.2 ± 1.79	969 ± 151	15.9 ± 6.14	770 ± 69.3
C4-Naphtalene	8.03 ± 5.68	1366 ± 443	9.51 ± 1.19	3891 ± 1578	4.74 ± 2.44	938 ± 9.69
Benzothiophene	5.17 ± 4.09	21.09 ± 3.58	n.d.	36.3 ± 20.3	0.58 ± 1.00	1.40 ± 1.40
C1-Benzothiophene	4.52 ± 1.95	381 ± 98	4.19 ± 0.28	572 ± 169	6.28 ± 0.87	180 ± 180
C2-Benzothiophene	40.4 ± 40.4	4915 ± 1528	61.8 ± 5.13	1879 ± 456	90.5 ± 5.43	574 ± 451
C3-Benzothiophene	20.0 ± 20	5925 ± 2219	20.8 ± 0.60	889 ± 252	24.5 ± 5.30	674 ± 98.7
C4-Benzothiophene	12.1 ± 10.7	2705 ± 1141	13.0 ± 0.66	3105 ± 1014	14.1 ± 1.54	989 ± 6.82
Biphenyl	7.26 ± 1.52	140 ± 34.1	105 ± 10.2	1072 ± 711	110 ± 18.5	297 ± 167
3-ring						
Acenaphthylene	1.50 ± 1.00	110 ± 38.0	1.09 ± 0.22	27.3 ± 13.4	0.53 ± 1.00	6.14 ± 3.64
Acenaphthene	2.91 ± 1.00	68.6 ± 14.7	2.84 ± 0.49	14.9 ± 3.67	1.90 ± 1.00	4.65 ± 2.02
Fluorene	8.21 ± 0.76	385 ± 97.1	4.25 ± 0.66	33.4 ± 15.5	2.91 ± 1.00	9.94 ± 5.88
C1-Fluorene	8.32 ± 1.55	473 ± 145	7.57 ± 1.75	126 ± 51.6	4.55 ± 1.56	38.8 ± 18.0
C2-Fluorene	5.50 ± 1.76	314 ± 82.8	7.20 ± 2.57	959 ± 323	3.49 ± 1.00	130 ± 20.5
C3-Fluorene	2.18 ± 2.18	162 ± 34.0	5.57 ± 2.08	1462 ± 788	3.72 ± 1.00	301 ± 100
Dibenzothiophene	35.1 ± 1.6	1565 ± 447	16.8 ± 0.40	159 ± 68.7	10.9 ± 1.42	69.4 ± 48.0
C1-Dibenzothiophene	15.6 ± 15.6	1872 ± 516	20.8 ± 0.75	507 ± 220	11.1 ± 0.57	84.6 ± 32.8
C2-Dibenzothiophene	7.18 ± 7.18	911 ± 201	13.0 ± 3.14	4747 ± 2083	10.3 ± 1.00	998 ± 126
C3-Dibenzothiophene	2.57 ± 2.57	242 ± 51.3	4.98 ± 1.15	3090 ± 1842	5.65 ± 1.00	1226 ± 364
Phenanthrene	18.7 ± 4.36	396 ± 112	6.53 ± 0.89	34.8 ± 22.80	3.16 ± 1.00	30.7 ± 25.6
Anthracene	13.8 ± 10.4	8.39 ± 0.79	0.76 ± 0.09	14.1 ± 4.06	n.d.	56.5 ± 52.3
C1-Phen/Anthr	8.91 ± 2.13	496 ± 135	8.11 ± 2.43	97.75 ± 48.3	4.58 ± 1.26	46.2 ± 16.3
C2-Phen/Anthr	4.39 ± 0.55	210 ± 49.4	6.17 ± 2.85	796 ± 346	6.34 ± 2.05	246 ± 49.6
C3-Phen/Anthr	0.82 ± 0.82	58.7 ± 11.6	2.17 ± 1.12	733 ± 429	2.40 ± 1.00	440 ± 140
4-ring						
Fluoranthene	1.49 ± 1.49	9.72 ± 2.91	1.20 ± 0.35	49.8 ± 28.0	1.44 ± 1.00	15.1 ± 8.71
Pyrene	3.59 ± 1.00	13.4 ± 3.11	2.26 ± 0.96	158 ± 107	3.51 ± 1.53	98.7 ± 45.9
C1-Fluor/Pyrene	0.68 ± 0.68	16.2 ± 2.43	1.63 ± 1.00	243 ± 157	3.80 ± 1.63	244 ± 96
C2-Fluor/Pyrene	0.59 ± 0.59	20.2 ± 2.54	n.d.	329 ± 221	2.27 ± 2.27	361 ± 109
C3-Fluor/Pyrene	n.d.	18.9 ± 2.17	n.d.	269 ± 168	10.3 ± 6.19	274 ± 78
Benzo[a]anthracene	1.03 ± 1.03	9.27 ± 2.32	n.d.	2.99 ± 0.05	n.d.	2.15 ± 0.69
Chrysene	1.22 ± 1.22	40.2 ± 12.1	1.09 ± 1.00	33.8 ± 7.22	1.63 ± 1.00	24.9 ± 10.4
C1-Chrysenes	n.d.	34.1 ± 8.17	1.23 ± 1.00	29.0 ± 8.67	1.88 ± 1.88	23.9 ± 10.9
C2-Chrysenes	3.42 ± 3.42	200 ± 25.8	16.8 ± 2.46	137 ± 24.8	33.0 ± 9.18	86.3 ± 46.8
C3-Chrysenes	1.86 ± 1.86	37.1 ± 5.45	7.50 ± 1.00	21.6 ± 7.68	10.9 ± 1.00	30.4 ± 11.9
5-ring						
Benzo[b+k]fluoranthene	1.03 ± 1.03	2.37 ± 1.00	1.49 ± 1.00	4.99 ± 1.00	1.19 ± 1.00	2.03 ± 1.00
Benzo[a]pyrene	1.24 ± 1.24	2.37 ± 1.00	1.09 ± 1.00	2.49 ± 1.00	1.66 ± 1.00	2.47 ± 0.62
Benzo[g,h,i]perylene	n.d.	2.37 ± 1.00	n.d.	1.50 ± 1.00	n.d.	0.46 ± 1.00
6-ring						
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	n.d.	24.5 ± 10.0	n.d.	18.5 ± 7.00	n.d.	5.67 ± 1.00
Dibenzo[a,h]anthracene	n.d.	30.8 ± 15.0	n.d.	22.4 ± 10.00	n.d.	6.89 ± 1.00
total PAHs (µg.L⁻¹)	0.43 ± 0.23	48.7 ± 15.7	0.48 ± 0.68	30.4 ± 12.9	0.48 ± 0.93	10.9 ± 2.8

3.2. PAH concentrations in fish

The PAH concentrations measured in the sea bass at the two time intervals of exposure are presented in Table 2. A significant increase in the total PAH concentrations in fish tissues was observed between the control ($t_{48} : 0.50 \pm 0.14 \mu\text{g.g}^{-1}$; $t_{96} : 0.63 \pm 0.12 \mu\text{g.g}^{-1}$) and the petroleum-exposed sea bass ($t_{48} : 5.72 \pm 1.41 \mu\text{g.g}^{-1}$; $t_{96} : 2.29 \pm 0.47 \mu\text{g.g}^{-1}$) after 48 h and 96 h of exposure. No significant difference in PAH concentrations in any of the fish was observed between the two times of exposure. Similar to the PAHs analysed in seawater, light PAHs were dominant in sea bass tissues. Indeed, significant differences between treatments were only observed for 2-3-ring PAHs. No 6-ring PAHs were detected in any of the fish. Following the 28 and 26 days in clean seawater, no difference in PAH concentrations between control ($t_{48} : 0.33 \pm 0.08 \mu\text{g.g}^{-1}$; $t_{96} : 0.70 \pm 0.15 \mu\text{g.g}^{-1}$) and oil exposed sea bass ($t_{48} : 0.96 \pm 0.89 \mu\text{g.g}^{-1}$; $t_{96} : 0.50 \pm 0.17 \mu\text{g.g}^{-1}$) was observed.

Table 2 (Tableau 8) : PAHs body burdens (ng.g^{-1} dry wt) in tissues of control sea bass gill (CTRL) and petroleum-exposed sea bass (OIL) following 48 h and 96 h of exposure. (*) represents significant difference ($p < 0.05$) compared to respective control; n.d. : not detected

	T = 48h		T = 96h	
	CTRL	OIL	CTRL	OIL
Naphtalène	127 ± 28.3	600 ± 196*	208 ± 39.7	346 ± 72.4
Benzothiophène	0.32 ± 0.37	49.2 ± 30.6*	0.85 ± 0.85	12.8 ± 2.80*
Biphényl	29.2 ± 12	273 ± 60.0*	38.5 ± 8.28	127 ± 9.19*
Acénaphtylène	n.d.	233 ± 61.8*	n.d.	82.5 ± 14.4*
Acénaphène	11.1 ± 7.82	330 ± 178*	23 ± 3.33	85.4 ± 10.9*
Fluorène	55.7 ± 25.1	609 ± 164*	67.8 ± 7.65	211 ± 47.5*
Dibenzothiophène	158 ± 28.8	3210 ± 628*	178 ± 25.5	1174 ± 224*
Phénanthrène	99.1 ± 23.3	360 ± 56.3*	87 ± 22.6	165 ± 31.2
Anthracène	n.d.	7.11 ± 7.11	n.d.	37.5 ± 25.2
Fluoranthène	4.01 ± 4.63	12.6 ± 7.99	5.49 ± 5.49	7.69 ± 7.15
Pyrène	4 ± 4.62	9.89 ± 9.89	4.92 ± 4.92	18.7 ± 17.2
Benzo[a]anthracène	4.95 ± 5.72	2.97 ± 2.97	1.03 ± 1.03	5.12 ± 3.36
Chrysène	8.45 ± 5.38	22.5 ± 4.67	8.72 ± 3.19	18.4 ± 1.71
Benzo[b+k]fluoranthène	n.d.	n.d.	0.07 ± 0.07	1.71 ± 1.71
Benzo[a]pyrène	1.49 ± 1.01	2.7 ± 0.99	2.76 ± 1.01	1.77 ± 0.72
Pérylène	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Indéno(1.2.3-cd)pyrène	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Dibenzo(a,h)anthracène	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
total PAHs	503 ± 147	5721 ± 1408	626 ± 124	2294 ± 469

3.3. Biochemical biomarker responses

Several hepatic biomarkers linked to the biotransformation of xenobiotics (EROD and GST) and the protection against oxidative stress (CAT) are analysed in Table 3.

Whereas a low EROD activity was detected in the control sea bass (ranging from 0.01-0.02 pmol.min⁻¹.mg⁻¹ protein), a significant induction of EROD was observed in the sea bass exposed to petroleum during the double exposure (t₄₈ : 2.74 ± 0.14 pmol.min⁻¹.mg⁻¹ protein; t₉₆ : 6.84 ± 0.26 pmol.min⁻¹.mg⁻¹ protein) (Table 3a). A significantly higher induction was observed after the 96 h of exposure to petroleum compared to the 48 h of exposure. No significant increase in GST activities was observed in the juvenile sea bass exposed to petroleum for 48 h compared to the control. On the contrary, a significant induction of GST was observed following the 96 h of exposure to petroleum (0.67 ± 0.02 μmol.min⁻¹.mg⁻¹ protein) compared to control (0.26 ± 0.02 μmol.min⁻¹.mg⁻¹ protein). No significant variation of CAT activities was observed in the sea bass after oil exposure, with activities of 1.31 ± 0.06 μmol.min⁻¹.mg⁻¹ protein measured in the control fish.

After the growth period in clean seawater (28 days for t₄₈ and 26 days for t₉₆), a significant induction of EROD activity was still observed in the sea bass exposed to petroleum for 48 h (Table 3b). A significant induction of EROD and GST activities was also still observed in the sea bass exposed to petroleum for 96 h. However, these inductions of EROD and GST activities were significantly lower compared to those observed just after the contamination.

Table 3 (Tableau 9) : Differences in Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD, pmol.min⁻¹.mg prot⁻¹), Glutathione S-transferase (GST, μmol.min⁻¹.mg prot⁻¹) and Catalase (CAT, μmol.min⁻¹.mg prot⁻¹) measured on control sea bass gill (CTRL) and petroleum-exposed sea bass (OIL) following 48 h and 96 h of exposure (a.), and following 26 and 28 days of decontamination respectively (b.). (*) represents significant difference (p < 0.05) compared to respective control

	T = 48h		T = 96h	
	CTRL	OIL	CTRL	OIL
EROD	0.01 ± 0.01	2.74 ± 0.14*	0.02 ± 0.01	6.84 ± 0.26*
GST	0.29 ± 0.03	0.31 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.67 ± 0.02*
CAT	1.31 ± 0.06	1.45 ± 0.10	1.51 ± 0.10	1.57 ± 0.10

a.

	28 d. after t ₄₈		26 d. after t ₉₆	
	CTRL	OIL	CTRL	OIL
EROD	0.01 ± 0.01	0.42 ± 0.08*	0.01 ± 0.01	1.15 ± 0.11*
GST	0.29 ± 0.02	0.24 ± 0.03	0.26 ± 0.02	0.40 ± 0.03*
CAT	1.50 ± 0.09	1.50 ± 0.11	1.57 ± 0.11	1.44 ± 0.08

b.

3.4. Gills histology

The only gill cell alteration observed in any of the samples was telangectasia (= branchial vessel aneurysm) (Fig. 2). However, no prevalent difference was observed between the control fish and the petroleum exposed fish. No anomaly was observed in the fish transferred to the clean seawater for 28 and 26 days.

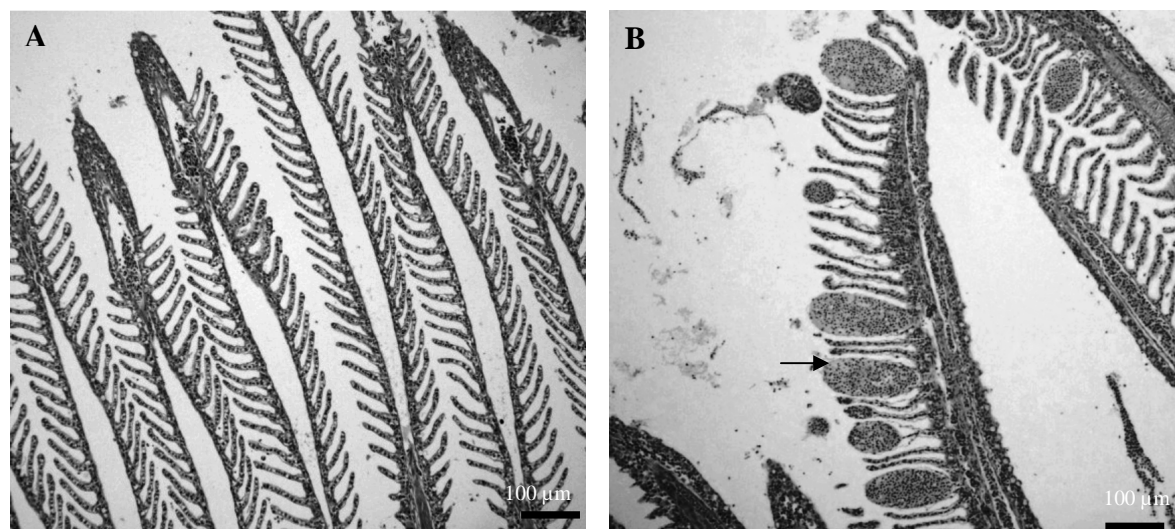


Fig. 2 (Figure 36) : Histopathological analysis of sea bass gills : (A) normal gill filaments (B) section of secondary lamellae of petroleum-exposed sea bass showing severe telangectasia (arrows).

3.5. Growth and condition indices

Specific growth rates and recent growth were individually measured on the tagged fish following the growth period in clean seawater (Fig. 3). When exposed for 48 h, the sea bass specific growth rate in weight and the recent growth showed no difference between the control fish and the petroleum exposed fish. On the contrary, the specific growth rate in length was significantly lower in the sea bass exposed to oil for 48 ($0.20 \pm 0.03 \text{ \%} \cdot \text{days}^{-1}$) compared to the control fish ($0.33 \pm 0.02 \text{ \%} \cdot \text{days}^{-1}$). After the 96 h exposure to petroleum, specific growth rates in weight ($0.22 \pm 0.10 \text{ \%} \cdot \text{days}^{-1}$), in length ($0.19 \pm 0.02 \text{ \%} \cdot \text{days}^{-1}$) and the recent growth ($8.71 \pm 0.43 \text{ } \mu\text{m}$) were significantly lower compared to the control sea bass (GW : $0.50 \pm 0.03 \text{ \%} \cdot \text{days}^{-1}$; GL : $0.27 \pm 0.02 \text{ \%} \cdot \text{days}^{-1}$; RG : $10.1 \pm 0.3 \text{ } \mu\text{m}$).

Several indices related to the condition, the growth and the nutritional status of the fish were estimated (Fig. 4). No difference in Fulton's K condition indices, RNA:DNA ratios and lipid indices was observed between both controls of the two exposure times. Whereas no significant difference was observed in the Fulton's K condition index of the sea bass exposed to oil for 48 h, a significant decrease of this index was observed after 96 h of petroleum

exposure ($1.06 \pm 0.03 \text{ mg}\cdot\text{mm}^{-3}$) compared to the control fish ($1.17 \pm 0.02 \text{ mg}\cdot\text{mm}^{-3}$). For both exposure times, a significant decrease of the RNA:DNA ratio was observed in the fish exposed to oil ($t_{48} : 2.95 \pm 0.16$; $t_{96} : 3.38 \pm 0.13$) compared to the control fish ($t_{48} : 4.03 \pm 0.28$; $t_{96} : 4.19 \pm 0.29$). A decrease of the lipid index, based on the quantity of TAG on ST, was observed in the sea bass exposed to oil for 48 h (1.25 ± 0.27) and 96 h (1.11 ± 0.22) compared to the control fish ($t_{48} : 1.57 \pm 0.33$; $t_{96} : 1.49 \pm 0.31$), however these decreases were not significantly different.

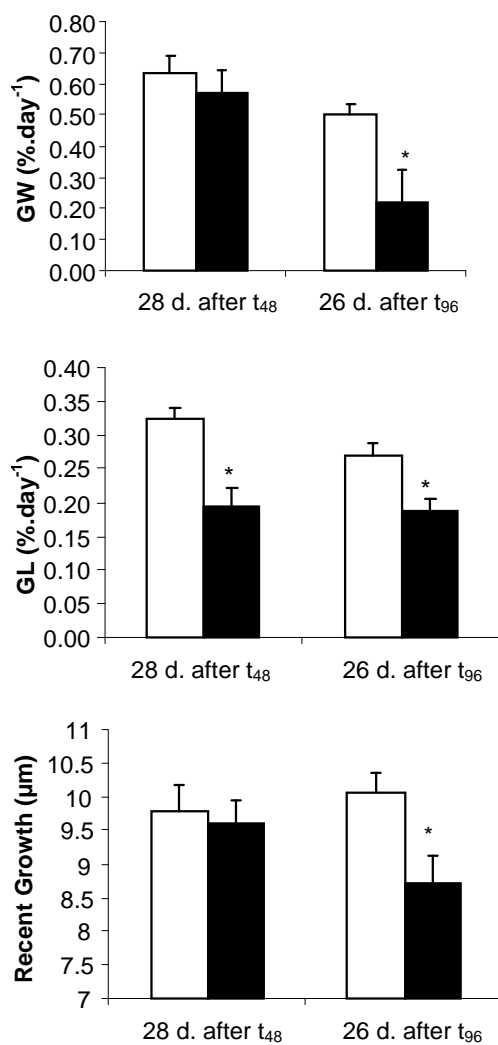


Fig. 3 (Figure 37) : Comparison of specific growth rate in length (GL), in weight (GW) and recent growth (RG) (mean ± SE), in control sea bass (CTRL) and petroleum-exposed sea bass (OIL) following 48 h and 96 h of exposure and following the 28 and 26 days period in clean sea water.

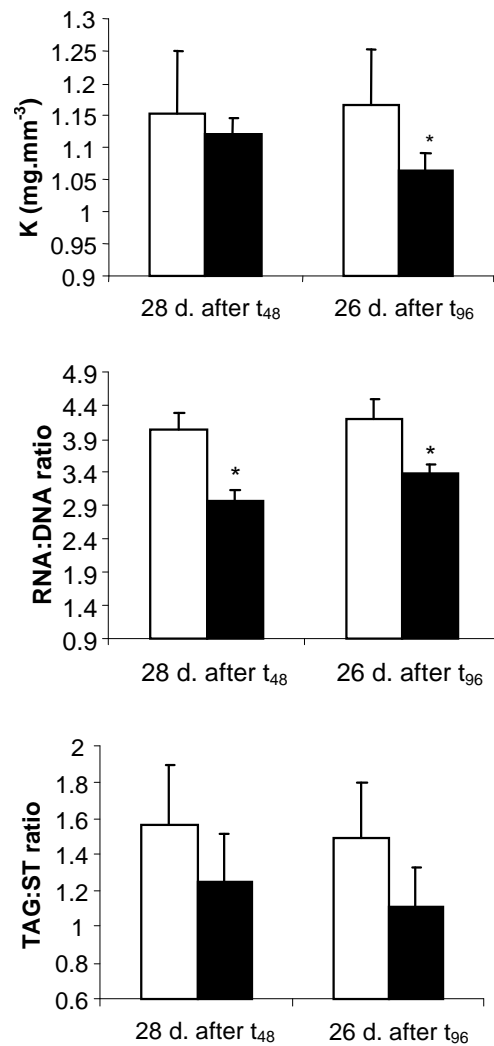


Fig. 4 (Figure 38) : Comparison of Fulton's K index, RNA:DNA ratio and TAG:ST ratio (mean ± SE), in control sea bass (CTRL) and petroleum-exposed sea bass (OIL) following 48 h and 96 h of exposure. (*) represents significant difference (p < 0.05) compared to respective control.

4. Discussion

4.1. Hydrocarbon concentrations

The juvenile sea bass were exposed to a TPH concentration corresponding to that encountered under some oil spill situations. For instance, Lunel (1995) monitored 1-100 mg.L⁻¹ of total petroleum hydrocarbons in coastal waters around Shetland during the Braer oil spill in 1993. Similarly, seawater PAH concentrations measured at the beginning of the exposure were of the same order of magnitude as those described in the literature after different oil spills. Seawater PAH concentrations ranged up to 28.8 µg.L⁻¹ after the Prestige oil spill in 2002 (Gonzalez *et al.*, 2006; Bado-Nilles *et al.*, 2009), up to 49.7 µg.L⁻¹ four days after the “North Cape” oil spill in 1996 (Reddy and Quinn, 2001) and from 50-100 µg.L⁻¹ after the oil spill in 1989 in Paraiso Bay, in Antarctica (Kennicutt *et al.*, 1991).

No oil slick was observed in either tank of oil exposure condition due to the energy of the experimental system simulating the oil natural dispersion (wave, current, swell...). However, during the exposure, some oil droplets adhered to the experimental system and caused the decrease in TPH concentration. An increase was observed after the 48 h of exposure, probably because of the first sampling of fish. Indeed, even though we tried to catch the fish without influencing the oil dispersion, we probably put in suspension some oil droplets, and so increased the TPH concentrations, which decreased again until 96 h of exposure. The decrease of hydrocarbon concentration could be extrapolated in a field situation. Indeed, the fate and behaviour of oil spills in the environment depends on a number of physicochemical and biological factors, including evaporation, dissolution and interaction between oil and sediments (Wang *et al.*, 1999). The combination of these processes, called ‘weathering’, reduces the concentrations of hydrocarbons in water. In particular, in the initial stages of an oil spill, one of the most important processes that produce changes in hydrocarbon concentrations is the evaporation of the more volatile components (Fingas, 1995; Nordvik, 1995). This phenomenon of evaporation could have been an obvious cause of the decrease in PAH concentrations during the time of exposure of our experimental approach since the crude oil used was mainly composed of light PAHs.

4.2. PAH bioconcentrations vs molecular biomarker activities

Organic pollutants, including polycyclic aromatic compounds, are absorbed easily via passive diffusion through the gills, intestine and skin, and accumulate in lipid-rich tissues (Varanasi, 1989). The main compounds of the crude oil used in this study were found in fish following the 48 and 96 h of exposure. An increase in PAH concentrations with the time of exposure was not observed. On the contrary, they tended to decrease after the 96 h exposure. PAHs are hydrophobic compounds that accumulate in fat and lipid structures such as cellular membranes. However, PAHs are also quickly metabolized through specific pathways (Budzinski *et al.* 2004). After the 96 h exposure, a part of the PAHs would have been already metabolized in those fish exposed to petroleum. No prevalent difference in PAH concentrations was observed between the sea bass petroleum exposed and the control fish after 28 and 26 days of depuration, probably because of the PAH excretions. The fact that PAHs were found in fish tissues after the contamination is evidence of fish exposure to petroleum, and suggests a potential risk to fish health due to the mutagenic and/or carcinogenic properties known of PAHs. However, due to this quick metabolization, the dosage of PAH concentrations in fish does not represent a suitable method to determine the level of fish exposure to petroleum (Collier *et al.*, 1996).

On the other hand, metabolic enzymatic activities provide a biologically significant consequence of exposure to contaminants (Gagnon and Holdway, 1999). In particular, EROD was successfully used to monitor oil exposure related to the Erika and Prestige oil spillages (ICES, 2001; Martinez-Gomez *et al.*, 2006). In the present study, an increase in EROD activity was observed in the juvenile sea bass after 48 h of exposure to petroleum. Among the different PAH compounds present in crude oil, several studies have shown that high molecular weight PAH, such as the four to six ring PAHs, are the more potent inducers of EROD activities (Lee *et al.*, 1972). However, the light crude oil used in our study was mainly composed by low molecular weight PAHs, suggesting their ability to increase EROD activities. Sea bass EROD activities doubled after exposure of 96 hours. Gagnon and Holdway (1999) reported similar results with an EROD induction detected in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to petroleum compounds with the highest induction between the fourth and eighth day. In our study, the highest EROD activities found after the 96 h exposure suggested a higher level of sea bass exposure as compared to the 48 h exposure.

GST is a well known biomarker involved in the conjugation of electrophilic compounds (or phase I metabolites) with glutathione, and is one of the main enzymes involved in xenobiotic phase II metabolism (Van der Oost *et al.*, 2003). In particular, Simonato *et al.*

(2008) observed an increase in GST activity in juveniles of a neotropical fish, (*Prochilodus lineatus*) exposed to the water-soluble fraction of diesel oil (WSD), and recommended GST activity as a sensitive biomarker for contamination by petroleum. In the present study, GST induction was observed in those sea bass exposed to crude oil, but an increase was only observed after four days of exposure. The 48 h exposure to petroleum appears not to have been sufficient to induce this enzyme. Similar differences in biomarker sensitivity between EROD (phase I) and GST (phase II) have been found previously for polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to the WSF of crude oil (Nahrgang *et al.*, 2010). In the same way, EROD activity has been found to be the most discriminating in a monitoring study of two demersal fish species, (*Lepidorhombus boscii*) and (*Callionymus lyra*), following the *Prestige* oil spill (Martinez-Gomez *et al.*, 2009).

The EROD and GST inductions observed after 96 h of exposure, and after 48 h for EROD, were still observed after the depuration period in clean seawater with lower values. In Gagnon and Holdway (1999), the EROD activity recovered to control levels in only 2 to 6 days after transferred to clean seawater. On the other hand, Nahrgang *et al.* (2010) also observed EROD and GST induction following two weeks of depuration of Polar cod dietary exposed to crude oil, and attributed this to stable proteins or a low protein degradation rate. Another previous experimentation established that a persistence of liver enzyme activity was dependent on both the duration and concentration of exposure (Collodi *et al.*, 1984).

The organ most commonly involved in the biotransformation of foreign compounds is the liver, because of its function, position and blood supply (Van der Oost *et al.*, 2003). In particular, the activities of the antioxidant enzymes, which defend the organisms against ROS, are critically important in the detoxification of radicals to non-reactive molecules. Dose-dependent increases in catalase activity in the liver and other organs were found after 196 h in African catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to crude oil (Achuba and Osakwe, 2003). On the contrary, barbel (*Barbus meridionalis*) collected in the river Fluvia` (NE Catalunya, Spain) 5 months after an oil spillage, showed decreased levels of CAT activity (Damasio *et al.*, 2007). In the present study, we found no difference in catalase activity between the petroleum exposed sea bass and the control group. Juveniles of curimba (*Prochilodus lineatus*), exposed to the water-soluble fraction of diesel oil (WSD) for 24 and 96 h showed no difference in CAT activity (Simonato *et al.*, 2008). Antioxidant enzymes are generally less responsive to pollutants than phase I and II biotransformation parameters, and the relationships between response and contaminant exposure are still less well established. However, this fact that

hepatic catalase activity was not induced does not exclude the possibility that there was ROS formation after exposure to oil, because other enzymes can metabolize hydroperoxides.

These results are part of a current project: DISCOBIOL project (DISpersant and response techniques for COastal areas; BIOLogical assessment and contributions to the Regulation). Primarily, this project intends to assess the toxicity of mechanically and chemically dispersed oil on several species living in nearshore areas. Consequently, this protocol of oil exposure was applied to *Crassostera gigas*, *Mytilus edulis*, *Scophthalmus maximus* and *Liza aurata*. A decrease of CAT activities was observed in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Luna-acosta *et al.*, 2011) and no difference in EROD, GST or CAT activities was observed in golden grey mullet, *Liza aurata*, following 48 h of exposure (Milinkovitch *et al.*, 2011). These differences between golden grey mullet and sea bass could be associated with species-specific responses, or attributed to the size of fish; since the mullet was 140 mm long. Earlier life stage sea bass (74 mm long) would have been more sensitive to oil exposure.

A variety of parameters in fish have been associated with the induction of EROD and GST activities, including reproductive effects (e.g. reduced serum steroid levels), increased liver somatic index and mortality (Whyte *et al.*, 2000). Moreover, in some cases, biotransformation generates active intermediates, which are able to interact with vital cellular macromolecules, such as DNA, thereby causing mutagenic and carcinogenic effects (Goldstein and Fallico, 1993). In the present study, as EROD induction was observed after 48 h of exposure and GST induction after 96 h, the effects on fish health could be supposed. However, as a direct link between biotransformation system induction and detrimental effects in fish has not been clearly established, their activity is best viewed as an indicator of contaminant exposure rather than an effect.

4.3. Gill histology

The exposure of fish to chemical contaminants induces a number of modifications in different organs particularly gills, kidney and liver, which histological examination represent a useful tool to assess the effects of xenobiotics (Giari *et al.*, 2007). The gills are the first to be affected by many xenobiotics because they provide a very large interface between the external and internal environments of fish (Costa *et al.*, 2009). Haensly *et al.* (1982) reported histopathological abnormalities in the gills of plaice (*Pleuronectes platessa*) that were exposed to the Amoco Cadiz oil spill in an isolated inlet off the coast of France. In our study, the only alteration evident in samples was telangectasia, but the anomaly was observed in

both the control and the oil exposed fish, maybe due to their manipulation. This absence of difference might be related to the period of exposure. For example, some lesions such as hepatocellular neoplasms might take two or more years to develop in fish species (Schiewe *et al.*, 1991).

4.4. Growth and condition indices

Even molecular biomarkers are considered as evidence of hydrocarbons exposure, if their activities are not related to longer term effects on fish health; it appears difficult to conclude in terms of fish development and survival. It is likely that changes in individual health, manifest themselves at higher levels of ecological organisation, leading to reduced fish recruitment success, abundance and production. For instance, Lancaster *et al.* (1998) analysed the growth and condition of sea bass following the Sea Empress oil spill, and suggested a detrimental effect on the local abundance of juvenile bass following the event. It appears essential to relate molecular biomarkers with indicators of fish health to try to understand the risk of oil spills.

Several studies have shown that crude oil and its components inhibit the growth of fish in a number of species. This is especially the case at earlier life stages, such as larvae and juveniles stages, when the fish are exposed to water soluble fractions of crude oil (Al-Yakoob *et al.*, 1996), oil-laden sediments (Moles and Norcross, 1998), or as a result of ingestion of oil-contaminated food (Saborido-Rey *et al.*, 2007). Since somatic growth requires the fish to be exposed a long time before significant differences can be detected (National Research Council, 2002), most growth studies have been done under chronic exposure to petroleum. However, little is known about the effects of short acute exposure to petroleum; that is why we chose to impose a growth period in clean seawater after an acute exposure. The sea bass exposed to the crude oil presented a significant decrease in somatic growth in length after 48 h of exposure, but a significant difference in specific growth rate in weight was only observed after 96 h of exposure. The use of tagged fish in laboratory condition leads to a precise estimation of fish growth over an exposure period. However, it has not been possible to measure this parameter precisely in a field situation, and that is why several growth biomarkers have been developed. Variations on the scale of a few days, over the month of depuration, can be detected by analysis of otolith growth and increment widths. Otolith growth reflects both fish growth and metabolism, and therefore is a sensitive indicator of the physiological state of an individual (Morales-Nin *et al.*, 2007). Key assumptions for these

uses are that the distance between increments is proportional to the somatic growth rate and that increments occur daily (Campana and Neilson, 1985), which have been verified in the present study. A difference in sea bass recent growth was only observed after 96 h of exposure compared to the control group. The most likely explanation for the growth reductions in this study is a combination of increases in metabolism due to detoxification and reductions in feeding (Moles and Norcross, 1998). Growth impairment during the juvenile stage is likely to be critical to survival and recruitment. Fish experience their most rapid growth during the juvenile phase (Smith *et al.*, 1995), and any reduction during juvenile growth would prolong the length of this stage. If oil inhibits sea bass growth, these fish would be more susceptible to predation and might compete less successfully for food than larger fish.

The combined use of biochemical and morphometric condition indices could be of great interest to analyse the energetic condition of fish following exposure at different time responses. Nucleic acids have provided useful tools for assessing the growth and nutritional condition of both larval and juvenile fish (Kuropat *et al.*, 2002). In the present study, this index was correlated with the specific growth rate in length and presented the same evolution with a significant decrease in the sea bass RNA:DNA ratio, 28 and 26 days after the 48 and 96 h-exposure to petroleum. Although this index is considered to be a short-term indicator (Gilliers *et al.*, 2006), its reduction observed 28 days following the 48 h of petroleum exposure suggested its sensitivity. On the other hand, the morphometric index based on length-weight data revealed a reduction in sea bass condition only following the 96 h exposure. The Fulton's K index is considered as a long-term indicator of individual's general well-being on the scale of weeks or months (Suthers, 2000). It was successfully used to show the negative effect of 24 h of fuel exposure on sole (*Solea solea*) transferred to clean seawater for 2 months (Claireaux *et al.*, 2004), and in sole caught in sites exposed to the Erika oil spill (Gilliers *et al.*, 2006) compared to appropriate reference. The decrease in the specific growth rate in length and the RNA:DNA ratios after 48 h exposure suggested the toxicity of this period to petroleum and its deleterious effect on fish performance. As the specific growth rate in weight, the recent growth and the Fulton's K condition indices were only lower after the 96 h exposure, this longer time of exposure could induce more long term effect on the fish.

The use of lipid storage indices such as triacylglycerol on sterol ratio (TAG:ST) has been considered as relevant to integrate the nutritional status of fish (Suthers *et al.*, 1992). TAGs are the major energy storage form in fish and have important ecophysiological relevance as indicators of growth potential and survival (Sogard et Olla 2000). Xenobiotic detoxification

involves energetic mechanisms (Alquezar *et al.*, 2006) and it has been shown that fish exposed to crude oil have lower feeding activities (Moles and Norcross, 1998). Consequently a decrease in the TAG:ST ratio could be observed in response to oil contamination. Indeed, in a mesocosm study, Claireaux *et al.* (2004) showed that the value of the TAG:ST ratio of juvenile sole exposed for 24 h to PAHs diminished by 75% after a 3 months period in clean seawater relative to control fish. In the present study, a decrease was observed 28 and 26 days after the 48 and 96 h exposure to petroleum, but the results were not significant. During the growth period, the fish were fed *ad libitum* with commercial pellets to favour growth performances, which have probably minimized any potential nutritional deficits.

4.5. Conclusions

In the present study, we have analysed the effects of 48 and 96 h of oil exposure on juvenile sea bass, at the sub-cellular level using some molecular biomarkers, and at the physiological level using some growth and condition indices. An EROD induction was observed after both exposure times, whereas a GST induction was only observed following the 96 h of exposure, and overall no difference in CAT activities was observed. Consequently, EROD appears to be the most sensitive molecular biomarker to hydrocarbon pollution. A significant decrease in some physiological biomarkers was observed 28 and 26 days following both exposure times. A decrease of specific growth rate in length and RNA:DNA ratio was observed after 48 h of exposure. It therefore appears as though these two parameters are more sensitive to oil exposure compared to the otolith recent growth, the Fulton's K condition index, which decreased only after 96 h of exposure, or lipid index, which showed no significant difference. Our study suggests that EROD induction could be related to the effects on fish health. Indeed, the EROD induction observed after 48 h of exposure was associated with effects on fish growth, and the highest EROD induction after the 96 h period, would correspond to a more important petroleum impact on fish health. It appears of great importance to consider appropriate molecular biomarkers complementary to fish health biomarkers, to improve the determination of oil spill impact in biomonitoring programs. This approach could be applied to survey habitat quality impacted by oil rejects. Indeed, the measurements of molecular biomarkers such as EROD, could give us information on fish hydrocarbon exposure, while physiological biomarkers, could inform us about fish health status and consequently habitat quality.

Acknowledgments

This work was part of a current project: DISCOBIOL project and was supported by post Grenelle programme 190, DEVIL of the French ministry for ecology and the Franco–British INTERREG IVA European project, DIESE. We would like to thank Ramy Kanan and Morgane Danion for their help during experimental and analytic procedures and Jérôme Abadie for the histological study. We also thank Peter Magee for his revision of the English grammar and syntax (www.anglais.webs.com).

2. Expérience complémentaire : utilisation d'un dispersant chimique

Le projet DISCOBIOL visant à étudier l'utilisation des dispersants dans les eaux côtières ou estuariennes, un mode d'exposition supplémentaire a été réalisé conjointement aux conditions d'expositions précédentes en utilisant du pétrole dispersé chimiquement. Un dispersant chimique est un tensioactif ou agent de surface. Ces molécules amphiphiles modifient la tension superficielle existante entre l'eau et l'hydrocarbure, facilitant ainsi la solubilisation des hydrocarbures dans la colonne d'eau afin d'éviter que la nappe de pétrole ne se dirige vers les côtes. En contre partie, en transférant la nappe de pétrole de la surface vers la colonne d'eau, la formation de gouttelettes d'hydrocarbures dans l'eau peut être à l'origine d'une augmentation de la toxicité du déversement pétrolier sur les organismes vivant dans la colonne d'eau. C'est pourquoi, dans cette étude nous avons également comparé les effets d'un pétrole dispersé chimiquement avec ceux d'un pétrole dispersé mécaniquement qui faisait l'objet de l'étude principale.

Deux bacs d'exposition, équipés du même système expérimental que précédemment, ont ainsi été utilisés en complément des quatre autres. Dans le premier bac additionnel, 1 g de dispersant chimique a été ajouté à l'eau de mer afin d'évaluer l'effet du dispersant seul. Dans le second, 1 g de dispersant chimique a été mélangé avec les 20 g de pétrole avant d'être versé dans l'entonnoir. L'exposition et les prélèvements ont été réalisés dans les mêmes conditions que précédemment mais elles n'ont pas été réalisées en duplicat. Les mêmes analyses chimiques et biologiques ont été effectuées à l'exception de l'analyse histologique qui n'a pas été réalisée sur ces poissons.

L'utilisation de dispersant chimique a entraîné une augmentation des hydrocarbures particuliers sous la forme de gouttelettes de pétrole dans l'eau par comparaison à la dispersion mécanique (Figure 39). De même, une augmentation des teneurs en HAPs dissous a été observée lorsque le pétrole a été dispersé chimiquement (Tableau).

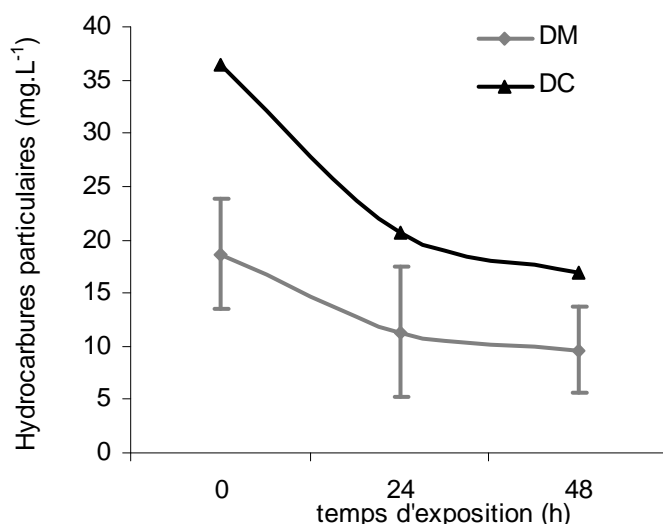


Figure 39 : Evolution des concentrations en hydrocarbures particulaires dans la colonne des bacs simulant une dispersion mécanique (DS) et chimique (DC) du pétrole.

Tableau 10 : Teneurs en HAPs dissous (ng.L⁻¹) analysés au moment de l'entrée des juvéniles de bar dans les bacs d'exposition : Control (CTRL), dispersant seul (DS), dispersion mécanique (DM) et chimique (DC).

	CTRL	DS	DM	DC
Naphthalène	35,6	37,3	911	1165
Benzothiophène	5,17	9,29	21,1	23,0
Biphényle	7,26	8,59	140	247
Acénaphthylène	1,50	2,77	110	175
Acénaphène	2,91	4,22	68,6	91,2
Fluorène	8,21	12,5	385	607
Dibenzothiophène	35,1	51,0	1565	2577
Phénanthrène	18,7	20,3	396	647
Anthracène	13,8	21,2	8,39	24,7
Fluoranthène	1,49	3,19	9,72	19,0
Pyrène	3,59	3,88	13,4	23,9
Benzo[a]anthracène	1,03	0,00	9,27	24,68
Chrysène	1,22	0,00	40,2	97,8
Benzo[b+k]fluoranthène	1,03	7,13	31	42,2

En augmentant les concentrations en hydrocarbures dans la colonne d'eau, l'utilisation de dispersant chimique a entraîné une plus forte bioconcentration des HAPs dans les organismes par rapport à la dispersion mécanique du pétrole (Figure 40).

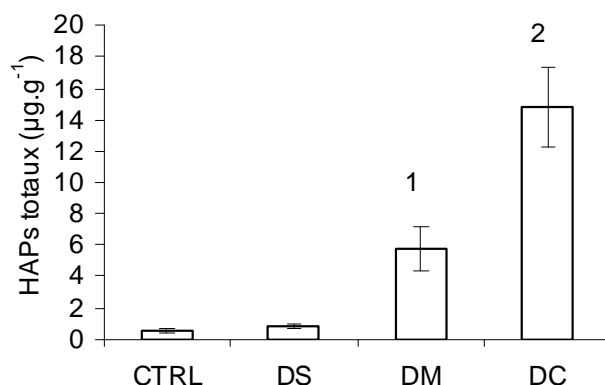


Figure 40 : Concentrations en HAPs mesurées dans les juvéniles de bar après l'exposition de 48 h à du pétrole dispersé mécaniquement (DM) et chimiquement (DC). CTRL = control; DS = Dispersant seul. ⁽¹⁾ et ⁽²⁾ : différence significative respective par rapport à CTRL et DS ($p < 0,05$).

Les valeurs des différents paramètres biologiques mesurés sur les poissons exposés au dispersant seul étant similaires au contrôle, aucun effet toxique du dispersant en lui-même ne paraît dans cette étude. Bien que la dispersion chimique du pétrole entraîne des concentrations plus importantes dans l'eau ainsi qu'une bioaccumulation plus élevée des HAPs dans les poissons, les résultats ne montrent pas d'effets plus marqués sur les biomarqueurs moléculaires et physiologiques qu'en absence de dispersant (Tableaux 11 et 12). En effet, les taux de croissance, les rapports ARN/ADN et l'indice de condition de Fulton étaient similaires entre les deux modes d'exposition au pétrole. Il est à noter, cependant, une diminution des activités EROD lorsque le pétrole est dispersé chimiquement. Des activités diminuées de cette enzyme pourrait entraîner une difficulté pour l'organisme à éliminer le polluant. De plus, ces activités inhibées de l'EROD discréditeraient l'utilisation de ce biomarqueur dans le cadre de biosurveillance des impacts d'une nappe de pétrole dispersée chimiquement. Ces résultats restant préliminaires, des études plus approfondies comme celles développées dans le projet DISCOBIOL paraissent indispensables avant de pouvoir proposer des recommandations sur l'utilisation de ces dispersants chimiques.

Tableau 11 : Comparaison des activités EROD, GST et CAT des juvéniles de bar après 48 h d'exposition à du pétrole dispersé mécaniquement et chimiquement. ⁽¹⁾ et ⁽²⁾ : différences significative respective par rapport à CTRL et DS ($p < 0,05$).

	EROD	GST	CAT
CTRL	0,01 ± 0,02	0,29 ± 0,14	1,31 ± 0,28
DS	0,01 ± 0,03	0,29 ± 0,12	1,54 ± 0,47
DM	2,74 ± 0,63 ^{1,3}	0,31 ± 0,11	1,45 ± 0,45

DC	$0,98 \pm 0.24^2$	$0,30 \pm 0.06$	$1,65 \pm 0.41$
----	-------------------	-----------------	-----------------

Tableau 12 : Comparaison de la croissance en poids (GW, % .jrs⁻¹) et en taille (GL, % .jrs⁻¹), de la croissance récente (RG), de l'indice de condition (K), du ratio ARN/ADN et de l'indice lipidique (TAG/ST) des juvéniles de bar exposés pendant 48 h à du pétrole dispersé mécaniquement et chimiquement puis mis en eau claire pendant 28 jours. ⁽¹⁾ et ⁽²⁾ : différence significative respective par rapport à CTRL et DS (p<0,05).

	CTRL	DS	DM	DC
GP	$0,64 \pm 0,25$	$0,75 \pm 0,10$	$0,57 \pm 0,31$	$0,66 \pm 0,20$
GL	$0,33 \pm 0,07$	$0,35 \pm 0,10$	$0,20 \pm 0,11^1$	$0,25 \pm 0,08^2$
RG	$9,80 \pm 1,43$	$9,61 \pm 1,14$	$9,77 \pm 0,52$	$9,02 \pm 1,27$
K	$1,16 \pm 0,09$	$1,13 \pm 0,04$	$1,07 \pm 0,13$	$1,07 \pm 0,04$
ARN/ADN	$4,03 \pm 1,02$	$3,50 \pm 0,7$	$3,22 \pm 0,92^1$	$3,34 \pm 1,04$
TAG/ST	$1,44 \pm 0,93$	$0,91 \pm 0,67$	$1,22 \pm 0,64$	$1,01 \pm 0,51$

Chapitre IV : Effets d'une pollution multiple de
contaminants chimiques sur des juvéniles de
bar et de turbot: analyses en conditions
contrôlée et semi-contrôlée

Chapitre IV : Effets d'une pollution multiple de contaminants chimiques sur des juvéniles de bar et de turbot: analyses en conditions contrôlée et semi-contrôlée

Lors des études d'évaluation du risque chimique dans le milieu marin, les essais de toxicité chronique sont le plus souvent réalisés avec des substances testées isolément. Cependant, cette démarche entraîne de nombreuses incertitudes quant à leur signification écologique car elles ne prennent pas en compte les effets cumulés, antagonistes ou synergiques rencontrés dans le cas de contaminations chroniques et diffuses. En effet, alors que dans le cadre de pollution pétrolière, les organismes sont exposés en majorité à un seul type de polluant, les hydrocarbures, les pollutions chroniques sont à l'origine d'un apport multiple de diverses origines de contaminants dans l'environnement naturel. En particulier, les zones portuaires représentent historiquement des sources et puits de contaminants. Le trafic maritime, les industries et les rejets d'eaux usées contribuent aux apports de déchets chimiques dans l'environnement du port. Par définition, les ports constituent des plans d'eau calme avec quelques mouvements périodiques pour ceux qui subissent l'action de la marée provoquant une remise en suspension du matériel sédimentaire fin ayant la propriété de fixer les polluants. L'activité même du port peut être à l'origine de l'apport de polluants du type métaux ou de pollution organique (aire de carénage, station à essence, peinture antisalissures...). De plus, de par de leur activité et leur situation géographique, les ports constituent un véritable réceptacle, notamment au niveau des sédiments, des divers rejets du littoral et/ou plus en amont après lessivage des bassins versants via le réseau hydrographique. Du fait de la présence d'une multitude de contaminants, les zones portuaires représentent donc des milieux d'étude intéressants pour développer et valider des procédures de biosurveillance de milieux complexes.

Partie 1 : Expérience préliminaire : exposition de juvéniles de bar à des sédiments contaminés pendant 48 h

Dans une étude préliminaire réalisée en novembre 2008, des juvéniles de bar ont été exposés à du sédiment prélevé dans 9 stations du port de Boulogne sur mer et dans la zone d'immersion des rejets de dragages (Figure 41).

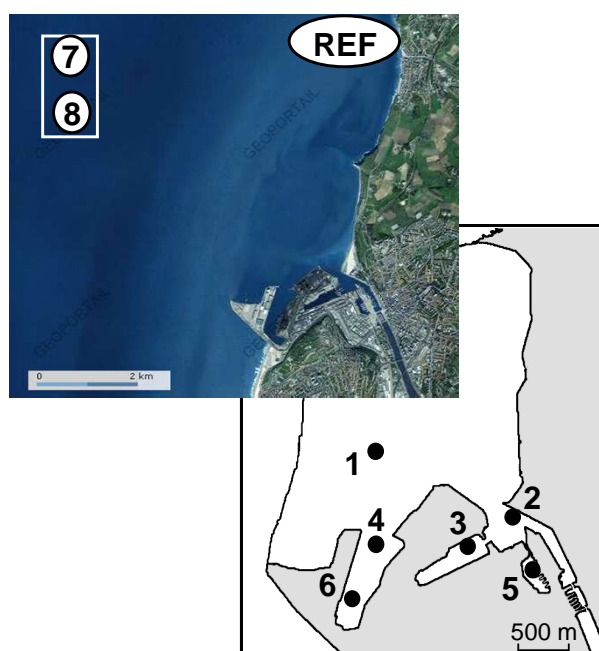


Figure 41 : Localisation des sites de prélèvements dans le port de Boulogne et dans la zone de rejets de dragage.

Différents niveaux de contamination en métaux et HAPs ont pu être observés entre les différents sédiments testés (Tableau 13). La durée d'exposition a été fixée à 48 heures pour pouvoir travailler en circuit fermé pendant l'exposition sans risque sur la qualité de l'eau. Les biomarqueurs moléculaires ont été mesurés après l'exposition et les performances physiologiques ont été mesurées trois semaines après.

Tableau 13 : Teneurs en métaux et en HAPs (mg.kg⁻¹) totaux dans les 9 sédiments utilisés pour l'exposition des juvéniles de bar.

	REF	1	2	3	4	5	6	7	8
Cd	<lim	0,3	0,69	1,13	0,44	1,09	6,49	0,02	0,03
Cr	6,23	26,3	37	43,9	36,7	42,6	35,2	3,77	5,55
Cu	1,01	7,95	30,1	29,1	13,7	38,1	48,8	1,78	1,2
Ni	1,75	8,35	12,9	15	12,2	14,9	16,8	1,95	2,11
Pb	3,95	14,9	41,7	43,8	25,5	34,6	188	5,9	5,88
V	5,82	32,7	46,6	59,2	50	49,6	48,5	9,46	9,68
Zn	7,27	61	108	145	82,2	142	1078	9,74	13,5
Hg	0,01	0,07	0,19	0,14	0,13	0,15	2,31	0,01	0,01
Mn	62,1	191	376	381	309	293	11025	484	218
PAH	<0,05	<0,05	0,72	0,73	0,35	0,29	1,78	<0,05	<0,05

Les activités GST et CAT des juvéniles de bar ne montrent pas de différence significative en présence de sédiments contaminés (Figure 42). Des différences dans les niveaux d'activités EROD ont été observées entre les différentes conditions d'exposition avec seulement une augmentation significative de ce biomarqueur pour les individus exposés au sédiment de la station 5 par rapport au site de référence.

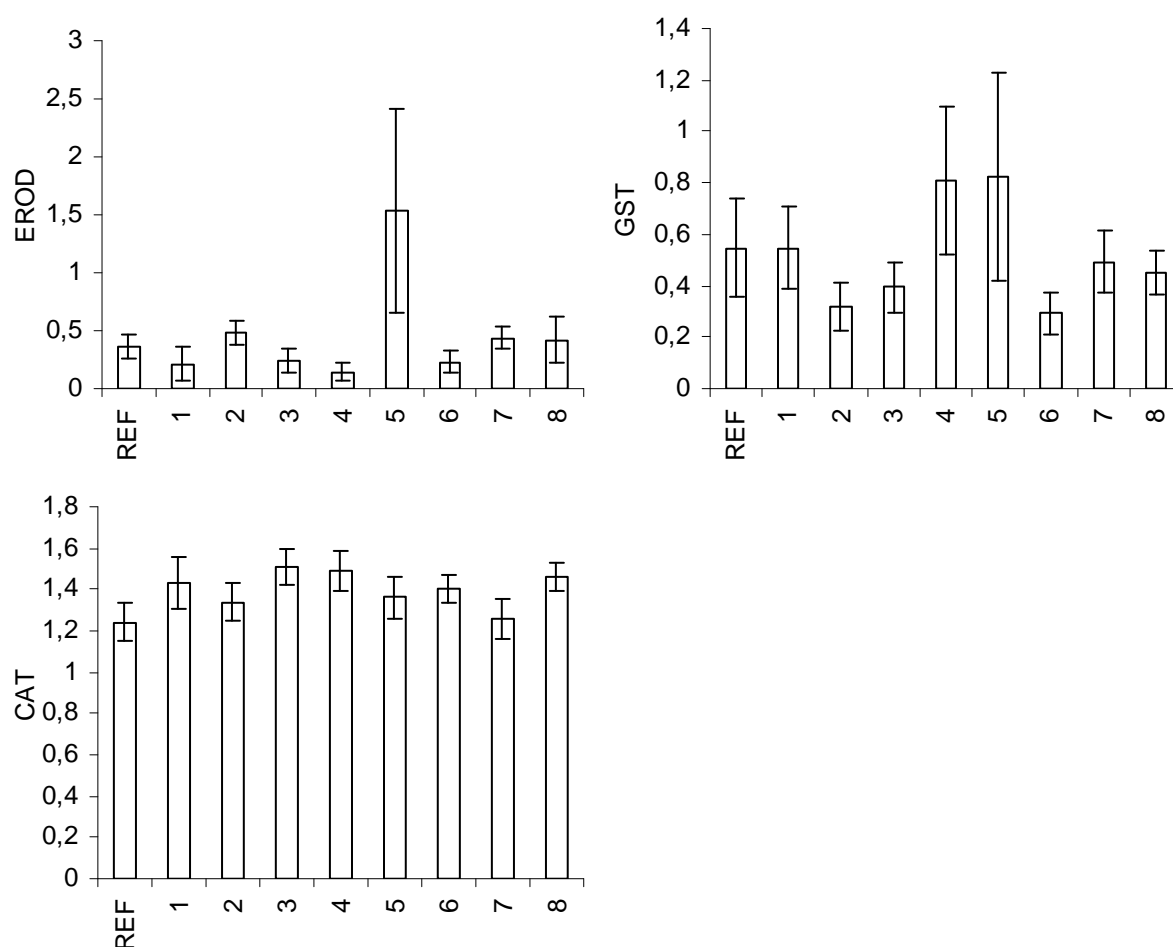


Figure 42 : Comparaison des activités EROD, GST et CAT des juvéniles de bar après leur exposition pendant 48 h à du sédiment contaminé.

Une diminution significative des taux de croissance en poids et en taille des juvéniles de bar n'a été relevée que sur les organismes exposés aux sédiments des sites 4 et 6. Les indices de condition de Fulton et les ratios ARN:ADN ne montraient aucune différence significative entre les conditions d'exposition (Tableau 14).

Tableau 14 : Comparaison des taux de croissance en poids (GW%.jrs⁻¹) et en longueur (GL, %.jrs⁻¹), de l'indice de condition de Fulton (K) et du ratio ARN/ADN des juvéniles de bar, 23 jours après leur exposition de 48 h à du sédiment contaminé.

	GW	GL	K	ARN:ADN
REF	1,89 ± 0,16	0,62 ± 0,05	0,99 ± 0,02	3,06 ± 0,36
1	2,07 ± 0,22	0,62 ± 0,04	0,99 ± 0,02	
2	2,18 ± 0,18	0,64 ± 0,05	0,94 ± 0,03	
3	1,67 ± 0,22	0,66 ± 0,04	0,95 ± 0,03	
4	1,19 ± 0,20*	0,45 ± 0,07	0,94 ± 0,02	2,75 ± 0,24
5	1,80 ± 0,16	0,65 ± 0,06	0,99 ± 0,02	3,24 ± 0,25
6	1,59 ± 0,17*	0,70 ± 0,08	0,96 ± 0,03	2,59 ± 0,17
7	1,81 ± 0,07	0,70 ± 0,07	0,97 ± 0,01	
8	1,73 ± 0,14	0,70 ± 0,05	0,96 ± 0,02	3,20 ± 0,22

Les résultats de cette étude préliminaire suggèrent qu'une exposition de 48 heures était probablement trop courte pour détecter des effets pertinents sur la croissance et la condition des juvéniles de bar soumis à des concentrations environnementales de contaminants. Cette expérience n'a donc pas été valorisée et par la suite des temps d'exposition plus longs ont été considérés. Dans une première étude, des juvéniles de bar et de turbot ont ainsi été placés en cage dans le port de Boulogne sur Mer pendant 38 jours en juin-juillet 2009. Dans une deuxième expérience, des juvéniles de turbot ont été exposés en janvier 2010 en condition de laboratoire aux sédiments portuaires mais également à du sédiment estuarien provenant de la Seine pendant 21 jours.

Partie 2 : Exposition par « caging » de juvéniles de bar et de turbot dans un milieu portuaire

En permettant de contrôler le lieu et la durée d'exposition des organismes tout en conservant les conditions environnementales du milieu, la méthode de caging nous a paru appropriée dans l'optique d'étudier les effets d'un mélange de polluants sur les paramètres moléculaires et physiologiques des poissons. Cette méthode, assez récente en écotoxicologie, a le plus souvent été utilisée pour étudier les processus de bioconcentration des polluants dans les organismes et/ou les réponses de différents biomarqueurs moléculaires et génétiques (Lindström et Oikari, 1990; Soimasuo *et al.*, 1995; Goksoyr *et al.*, 1996; Fenet *et al.*, 1998; Stien *et al.*, 1998; Van der Oost *et al.*, 1998; Winter *et al.*, 2004). A notre connaissance, elle n'a jamais été effectuée dans le but d'étudier les effets des polluants sur les performances physiologiques des stades précoces de poisson. En appliquant cette méthode dans le suivi des indices de croissance et de condition de juvéniles de poisson en milieu contaminé, l'objectif serait d'obtenir des réponses réalistes sur les capacités des individus à se développer et survivre dans de tels milieux. Cette étude a été réalisée sur des juvéniles de bar et de turbot, issus d'écloserie, dans le but de comparer leurs réponses en fonction de leurs différences de comportements alimentaires et locomoteurs vis-à-vis du sédiment et de la colonne d'eau.

La valorisation des différents résultats issus de cette expérience de caging est exposée sous la forme de deux papiers complémentaires, chacun présentant des objectifs différents. Le premier article présente les relations entre la contamination chimique et la condition des poissons mis en cages. Les indices de croissance et de condition ont été analysés en fonction de la contamination chimique dans le sédiment, la biodisponibilité des métaux et les concentrations en métaux dans les branchies des poissons. Le second article se focalise sur les réponses des trois biomarqueurs moléculaires (EROD, GST, CAT) sur la base de cette expérience de caging. Leurs réponses ont ensuite été comparées avec celles des indices de croissance et de condition précédemment mesurés sur les mêmes individus.

2.1. Réponses biologiques de juvéniles de bar (*Dicentrarchus labrax*) et de turbot (*Scophthalmus maximus*) dans un port pollué

Résumé

Dans cette étude, nous avons testé l'hypothèse qu'une exposition de juvéniles de poisson dans un environnement chimiquement contaminé pourrait affecter leurs performances physiologiques. Des indices de croissance et de condition ont été analysés sur les poissons en considérant que ces paramètres à haut niveau d'organisation biologique pourrait révéler les dommages des polluants à l'échelle de l'individu et pourrait ainsi refléter la capacité des individus à survivre. Des expériences de caging ont ainsi été réalisées sur des juvéniles de bar, *Dicentrarchus labrax*, et de turbot, *Scophthalmus maximus*, dans un milieu pollué. Les poissons ont été placés en cage dans un port du nord de la France, le port de Boulogne sur mer, à trois stations avec des degrés différents de contamination. Le sédiment de chaque station a été analysé pour déterminer les concentrations en métaux, HAPs et PCBs et la disponibilité en métaux. Dans la station la plus contaminée, tous les poissons ont été retrouvés mort après deux semaines d'exposition. Après 38 jours d'exposition, les poissons des deux autres stations ont été prélevés avec un taux de récupération des individus d'au moins 75 %. Les taux de croissance somatique, la croissance récente, l'indice K de Fulton et des rapports ARN/ADN et TAG/ST ont ensuite été mesurés individuellement sur les poissons marqués et la bioconcentration en métaux a été analysée dans les branchies.

Les poissons encagés dans les trois stations étaient affectés par des niveaux différents de contaminants chimiques alors que les autres facteurs abiotiques étaient similaires. Par comparaison avec des valeurs guides de toxicité pour des sédiments estuariens, le sédiment de la station A présentait de bons critères de qualité alors que les sédiments de la station B et C correspondaient à des sédiments contaminés dans lesquels certains métaux et HAPs excédaient des niveaux de toxicité. La station C étant la plus contaminée, particulièrement en HAPs, cette contamination chimique apparaît être une cause probable de la mortalité des poissons dans cette station. Des concentrations plus élevées en certains métaux comme le plomb et le zinc ont été mesurées dans les branchies des deux espèces de poissons encagés dans la station B. Ces augmentations en métaux dans les organismes suggèrent un risque pour l'état de santé des poissons associées au caractère potentiellement toxique de ces métaux. En effet, une diminution des taux de croissance en poids, de l'indice de condition de Fulton et du

ratio TAG :ST ont été observées pour les deux espèces mis en cage dans la station B par rapport à la station A avec cette tendance plus prononcée pour les juvéniles de bar que pour les turbots. Une réduction de la croissance récente et du rapport ARN/ADN a également été significative sur les juvéniles de bar encagés dans la station B par rapport à la station A. Ces résultats montrent une différence de réponses à ce mode d'exposition entre les deux espèces. Alors que les indices de condition mesurés sur les juvéniles de bar étaient similaires entre le début de l'expérience et la fin de l'exposition dans la station de référence (A), une diminution de ces indices a été observée pour le turbot. Ces résultats suggèrent ainsi un stress physiologique de la mise en cage chez le turbot qui peut être relié à une difficulté des individus à s'enfouir dans le sédiment et/ou de s'alimenter correctement. A l'inverse, les juvéniles de bar apparaissent en bonne condition dans la station de caging de référence. Le facteur de la nourriture semblerait ne pas être à l'origine de cette baisse de condition des turbots dans la station de référence comme le témoigne la multitude d'amphipodes retrouvés sur les deux cages de la station A (Figure 43). Par ailleurs, l'analyse des contenus stomacaux ont révélé une moyenne de 21 amphipodes par estomac pour chaque espèce encagée à la station A (Figure 44). Par contre, moins de proies ont été retrouvées dans les estomacs des individus mis en cage dans la station B et l'analyse du benthos effectuée dans le sédiment B n'a révélé aucun individu macrobenthique. En conséquence, en plus des effets directs des contaminants chimiques, la baisse de croissance et de condition des individus encagés dans la station B pourrait également être attribuée à une baisse d'activité alimentaire des organismes dans la station contaminée et/ou à une disponibilité plus limitée en nourriture.

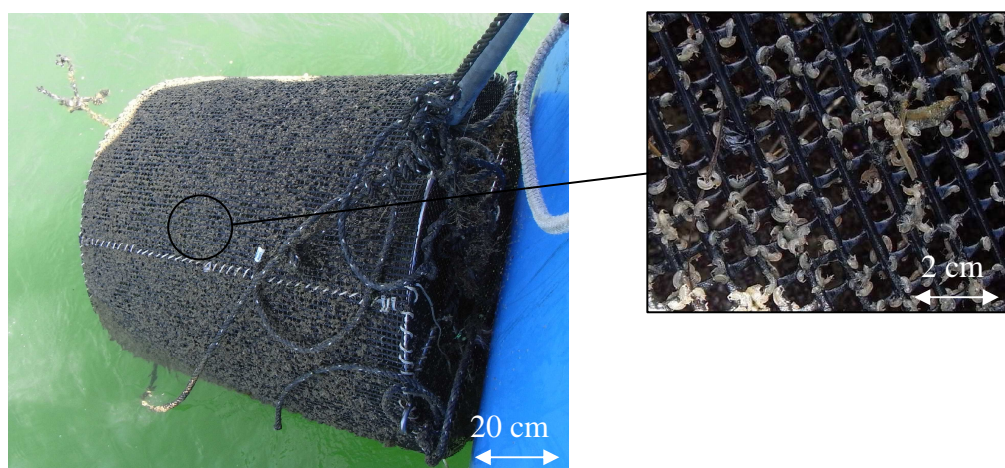


Figure 43 : Observation de nombreux amphipodes sur la cage de bars dans la station A.

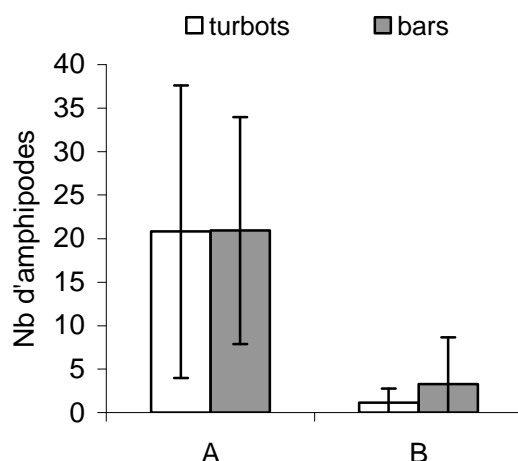


Figure 44 : Comparaison du nombre d'amphipodes observés dans les estomacs des juvéniles de bar et de turbot dans les stations de caging A et B.

Lors de cette étude, en complément des mesures de croissance et d'indices de condition, les potentielles anomalies squelettiques ont été examinées après la période d'exposition en cage des bars et turbots. Ces observations ont été utilisées récemment en tant qu'indicateurs de pollution chez les poissons (Boglione *et al.*, 2006). Des anomalies au niveau du squelette peut conduire à de faibles taux de croissance, une utilisation diminuée des réserves énergétiques et donc à un risque pour la survie du poisson (Pirhonen *et al.*, 2003). Néanmoins, dans cette étude, aucune différence apparente n'a été observée sur le développement de la colonne vertébrale entre les deux stations. Les seules déformations détectées au niveau de la colonne vertébrale étaient une compression des vertèbres de certains juvéniles de bar sans aucune différence observable entre les deux stations (Figures 45 et 46). Ces anomalies seraient plutôt une résultante des conditions d'élevage en aquaculture (Andrades *et al.*, 1996). Le temps d'exposition et le nombre de poissons étudiés représentent des facteurs limitant pour ce genre d'étude.

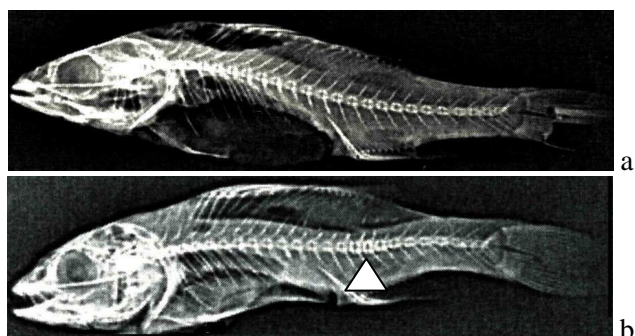


Figure 45 : Radiographie réalisée sur les juvéniles de bars mis en cage dans les stations A et B de Boulogne sur mer. La marque sur (b) signale une compression des vertèbres.

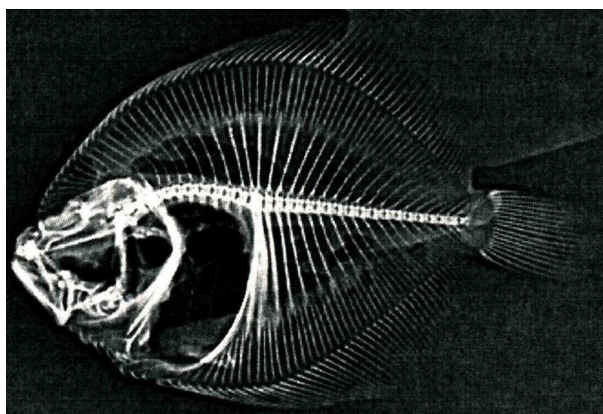


Figure 46 : Radiographie réalisée sur les juvéniles de turbots mis en cage dans les stations A et B de Boulogne sur mer.

Avec un fort taux de récupération des poissons, à l'exception de la station la plus contaminée, cette étude montre la potentialité de la méthode de caging pour des expositions environnementales aux contaminants chimiques en utilisant des juvéniles de poisson. En utilisant cette technique, nous avons pu intégrer des conditions réalistes de contamination chimique qui sont moins transposables en condition de laboratoire. De par son mode de vie spécifique, le bar, espèce démersale, apparaît comme un bon modèle d'étude pour la biosurveillance environnementale par caging. Ce travail démontre également qu'en permettant d'évaluer l'état physiologique des organismes en condition de contamination chronique et multiple, les indices de croissance et de condition pourraient représenter des paramètres pertinents dans la surveillance de milieux chimiquement complexes.

Biological responses of caged juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) in a polluted harbour

Kerambrun, E. (1,2,3,*), Henry, F. (1,2,3), Courcot, L. (1,2,3), Gevaert, F. (1,3,4), and Amara, R. (1,2,3).

¹ Univ Lille Nord de France

² ULCO, LOG, F-62930 Wimereux, France

³ CNRS, UMR 8187, F-62930 Wimereux, France

⁴ USTL, LOG, F-62930 Wimereux, France

*Corresponding author: Elodie Kerambrun

elodie.kerambrun@univ-littoral.fr

Phone: +(33) 321 99 64 27

Fax: +(33) 321 99 64 01

1. Introduction

Sometimes referred to in the literature as “essential fish habitat” (Beck et al., 2001), shallow coastal area habitats are thought to enable rapid growth and increase survivorship, thus providing ecological advantages for juvenile fish (Sogard, 1997). Although they provide suitable habitats for juvenile fish, these attractive ecosystems are in many cases strongly affected by numerous anthropogenic activities (e.g. urban and industrial pollution, agriculture, dredging, fishing, harbour activities). In particular, harbours have a long history as sinks and sources of pollutants for the marine environment. Ship traffic, industry and sewage effluents contribute to the release of waste into these harbours. Therefore, a multitude of xenobiotics contaminate the harbour environment, and although chemical analyses are able to measure many of these compounds qualitatively and quantitatively, complex mixtures of these chemical pollutants cannot be fully assessed.

Chemical contaminants are known to adversely affect fish physiology, growth, health and behaviour (Chapman et al., 2002; DelValls et al., 2004). All these disturbances to the biology of fish, could threaten their survival, since fish in poor condition are more vulnerable to predation and disease, and are less tolerant to adverse environments. Rapid growth may also reduce the time young fish spend in size classes more vulnerable to predators. In this context, the assessment and monitoring of the quality of nursery areas appears to be essential to sustain fish population. A major challenge in current ecotoxicological research is to identify suitable biomarkers and monitoring methods. Among the different levels of responses analysed, physiological responses to chemical contaminants have often been ignored by

ecotoxicologists because they are regarded as being too generalized and too difficult to measure routinely (Depledge et al., 1995). However, juvenile fish physiological measurements such as growth or lipid storage may provide the key to integrate various molecular and cellular responses in an organism with impaired fitness, because these processes must be functional for juvenile fish to survive, and so to contribute to the population's renewability (Depledge et al., 1995; Rose et al., 2006; Fonseca et al., 2009). Several measures of growth and condition of larvae and juvenile fish have therefore been used to assess individual and population status as well as habitat quality (Phelan et al., 2000; Meng et al. 2001; Gilliers et al., 2004; Amara et al., 2007). These measures comprise of growth indices (RNA:DNA ratios, specific growth rate, otolith increments), morphometric indices (Fulton's K) and storage indices (lipid content) that relate to the individual ability to respond and interact with the environment at different time scales (Suthers, 1998).

In addition to the necessity of using relevant biomarkers, it is essential to select relevant monitoring methods. Laboratory studies have often failed to recreate the mixed exposure situations occurring in nature. In comparison, a caging approach, in specific situations, may give us results that are more realistic in studies of bioavailability, bioaccumulation and the biological effects of contaminants in fish. The technique of caging offers advantages for the chemical exposure of organisms (Oikari, 2006). The precise location and duration of exposure can be controlled, while environmental field conditions are preserved. The migration of many fish species for feeding and breeding creates uncertainty about how an individual sampled in some habitat truly reflects the environmental quality around the site of capture. That is why many studies have used caging experiments in ecotoxicology (Stien et al., 1998; Van der Oost et al., 1998; Phelan et al., 2000). The development of caging field experiments could provide an indication of the impact of contamination on marine fish and information on the applicability of this experimental strategy for assessing habitat quality.

In this study, we tested the hypothesis that a short-term exposure (38 days) of juvenile fish to environmental chemical contamination affects their physiological performance. Indices of health (growth, RNA:DNA ratio, lipid index) were assessed, making the assumption that these high-level endpoints would reveal pollution-induced impairments at the level of the individual and must function appropriately if the individual is to survive. Therefore, two juvenile marine fish species: sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) were caged for a 38-day exposure period in a northern French harbour at three sites representing both polluted areas and a relatively unpolluted reference location. These two commercial species were chosen to analyse the differential pollutant-responses between a

demersal and a benthic species. The potentiality of chemical contaminant transfer in fish was accessed by the estimation of the metal bioavailability in sediment and the metal concentrations in the fish's gills.

2. Materials and methods

This experiment was conducted in accordance with the national and European requirements for animal experimentation. The University of Littoral Côte d'Opale is authorized to conduct experimentation on animals in its capacity as a certified establishment; according to the administrative order N° B62-160-2.

2.1. Experimental caging technique

Sixty five juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*), (Weight 2.84 ± 0.79 g; Age: 4 months) and sixty three juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*), (Weight: 4.62 ± 0.72 g; Age: 3 months) were obtained from hatcheries (Aquanord and France Turbot in France). The fish were acclimatised for 2-weeks in clean seawater with a flow-through system and progressively fed with artemia and pieces of shrimps and mussels to acclimate them to natural prey consumption. One day before the caging experiment, each fish was anaesthetised in a $200 \mu\text{l.L}^{-1}$ 2-phenoxyethanol solution, weighed (near to 0.01 g), measured for total length (near to 0.1 mm) and individually marked (Visual Implant Tag, 1.2 mm x 2.7 mm, Northwest Marine Technology). For each species, fifteen fish were sampled before the beginning of the experiment to establish t_0 , used as reference.

The shallow marine coastal zones of the eastern English Channel provide nursery areas, identified as essential fish habitat, for a wide variety of commercial fish species, particularly flatfish (Amara, 2003). However, this coastline is also characterised by substantial urban and industrial development, resulting in heavy inputs of chemical contaminants, as well as significant losses or alteration of marine habitats at some locations. Cage placement was carried out in June 2009 in an important northern French harbour (Boulogne sur Mer). This harbour is impacted by municipal and industrial discharges, fishing and shipping activities, and marinas. Three locations were chosen (Fig. 1) : station A in front of the harbour (depth 10 m) and station B and C in the inner part of the harbour (depths 4 and 8 m, respectively). Cylindrical cages (0.7 m height, 0.65 m diameter, 230 L volume), made from polypropylene

mesh (10 mm) were used for the sea bass. Rectangular cages (0.3 m height, 0.6 m width, 0.9 length, 160 L volume) were chosen for the turbot, benthic fish, in order to increase the surface in contact with the sediment. The fish were randomly placed in their respective cage, which were fixed to the bottom with a screw anchor by scuba-divers. Precisely, 15 sea bass and 17 turbot were placed in station A, 18 sea bass and 16 turbot in station B, and 17 sea bass and 15 turbot in station C. Physicochemical parameters (temperature, salinity, oxygen and pH) were measured and sediment sampled for contaminant analysis. The fish were not fed during the exposure period, relying only upon naturally available food items (affirmed by post-mortem observation of gut contents). Two weeks after their placement, the cages were raised to the surface to survey both fish and cage status. In the innermost station of the harbour (C), all the sea bass and turbot were found dead (skeleton in the cage). For the two other stations all the fish were alive and the cages were immersed for another three weeks. Following the 38-days exposure, the fish were rapidly transferred to the laboratory (within 2 h), anaesthetised (2-phenoxyethanol), identified (tag), weighed and measured for total length. Otoliths (sagittae) were extracted and preserved in ethanol (95%). Muscles and gills were sampled and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ with the rest of the fish.

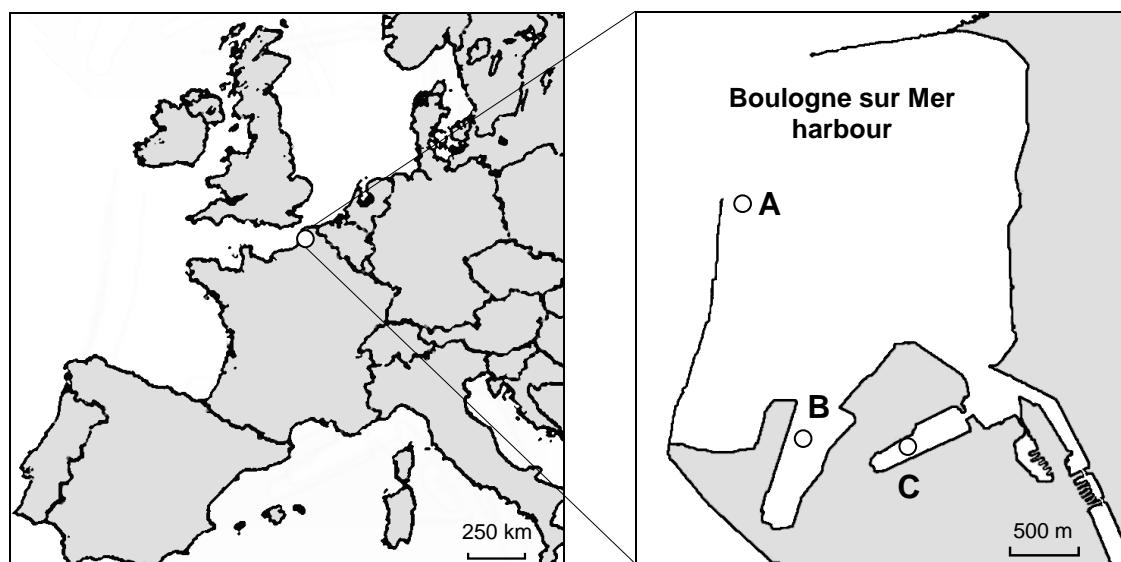


Fig. 1. (Figure 47) Locations of the two caging stations in the harbour of Boulogne sur Mer, France.

2.2. Sediment analysis

Sediment samples were collected near to each cage location using a Van Veen grab (250 cm² sampling area) in order to determine granulometry and organic matter. Sediments were also sampled for determination of metals, PAHs and PCBs.

The grain size distribution was analysed using a laser Beckman–Coulter LS 230. A classification was established using the proportion of clay (< 4 µm), fine silt (4 – 20 µm), coarse silt (20 – 50 µm), fine sand (50 – 200 µm), medium sand (200 – 500 µm) and coarse sand (500 – 2000 µm).

For the measurement of total organic matter (TOM, mg.g⁻¹) within the sediment, samples were dried at 60 °C for 24 h and subsequently baked at 450 °C for 5 h. The total organic carbon (TOC) and total organic nitrogen (TON) contents were determined using a CHNS analyser (NA-2100, CE instruments).

In order to determine selected metals (Al, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, V and Zn) in the total and bioavailable fractions, sediments were dried at 40 °C to constant weight and were ground to a powder. For the determination of total metals, about 0.250 g of ground sediments were digested with HF (Suprapur, Merck) at 110 °C for 48 h, followed by a mixture of concentrated acids HCl:HNO₃ (3:1, v:v, Suprapur Merck) at 120 °C for 24 h. This operation was repeated once. Metals associated with the reactive fractions of sediment, considered as bioavailable fractions, were estimated using the method of Huerta–Diaz and Morse (1990). The reactive fraction such as metals extracted by HCl 1 M shows values comparable to the sum of the first three reactive fractions in the Tessier extraction scheme (Tessier et al., 1979). The reactive fraction comprises of metal exchangeable and linked to carbonates, partially to oxy–hydroxides of Fe–Mn and to acid volatile sulfides (AVS). About 0.5 g of sediment was leached during 24 h with 20 mL of 1 M HCl (Suprapur, Merck). The total and extractable metals were measured by inductively coupled plasma–atomic emission spectrometry (ICP–AES, VARIAN Vista Pro, axial view). For quality assurance, reagents blanks, sample replicates and standard reference materials (HISS–1, MESS–3 and PACS–2, National Research Council Canada) were used to assess the accuracy and precision of the analyses. In all cases, the recovery efficiency was better than 85% for the total digestion of standard reference materials. Total Hg was measured in dry and ground sediment samples (without any pre–treatment) by means of atomic absorption spectroscopy (AAS) using an AMA 254 solid phase Hg–Analyzer (Altec Ltd., Prague, Czech Republic) (Ouddane et al., 2008). Mean recovery for total Hg was between 80 and 100% for certified estuarine sediment IAEA–405 (IAEA, Vienna, Austria).

The extent of sediment contamination was assessed using the enrichment factor (EF) (Salomons and Forstner, 1984). Commonly, normalization of the metals to a conservative element such as Al is employed as an index (EF) to evaluate anthropogenic influences to the sediments. The EF is defined as:

$$EF = (X/Al)_{sample} / (X/Al)_{background},$$

where $(X/Al)_{sample}$ is the metal to Al ratio in the sample of interest, $(X/Al)_{background}$ is the natural background value of metal to Al ratio. EF values were interpreted as suggested by Birth (2003) for the metals studied with respect to upper crust average (Taylor and McLennan, 1995). $EF < 1$ indicates no enrichment, $EF < 3$ is minor enrichment, $EF = 3-5$ is moderate enrichment, $EF = 5-10$ is moderately severe enrichment, $EF = 10-25$ is severe enrichment, $EF = 25-50$ is very severe enrichment, and $EF > 50$ is extremely severe enrichment.

The persistent organic pollutants, including PAHs (EPA's 16 priority PAHs) and PCBs (7 congeners) were analysed. Briefly, organic compounds were extracted from 2 g of dried sediment by a microwave oven (120 °C for 15 min, 1200 W) assisted extraction with 40 mL of a mixture of acetone and hexane (1:1, v:v). The solvent was evaporated under a stream of nitrogen in a TurboVap, and then concentrated to 1 mL of hexane. Simultaneous determination of PAHs and PCBs was performed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS, VARIAN, CP 3800 – 1200 MS TQ), with a ZB–MultiResidue column (30 m, 0.25 mm, 0.25 µm; Phenomenex). Identification of PAH compounds and PCB congeners was based on the comparison of their GC–retention times and their mass spectrum, with appropriate individual standards.

A way to assess sediment toxicity is the use of contamination sediment quality guidelines. Long et al., (1995) identified two guideline values: the effects range–low (ERL) and the effects range–median (ERM). Concentrations above the ERL, represent a possible–effects range within which effects would occasionally occur. The concentrations above the ERM values represent a probable–effects range within which effects would frequently occur. In the present study, chemical contaminant contents in sediments were analysed according to these guidelines.

2.3. Biological analysis

2.3.1. Growth index

Sea bass and turbot specific growth rates in weight (% per day) were estimated as:

$$GW = 100(\ln W_2 - \ln W_1)/(t_2 - t_1),$$

where (W_1) and (W_2) are fish total body weight at times (t_1) (beginning of the experiment) and t_2 (time of collection). Similarly, the specific growth rate in length was estimated as:

$$GL = 100(\ln L_2 - \ln L_1)/(t_2 - t_1),$$

where (L_1) and (L_2) are fish total length at times (t_1) and (t_2) respectively.

The recent growth index (RG) was determined by measuring the width of the peripheral daily increments of the otoliths. Because there was a significant relationship between the otolith sagittal diameter and fish length (Fig. 2), and between the otolith area and fish length (sea bass: $R^2 = 0.71$; turbot: $R^2 = 0.70$), we used the daily otolith width increments from the previous 5 days before the end of the experiment as an indicator of recent growth (mean distance between the margin of the otolith back to the 5th ring). Sagittae were cleaned and photographed and mounted on a glass slide in thermoplastic cement (Crystal Bond). Sections of sagittae were obtained by polishing them on both sides with grinding paper of decreasing grit sizes (5 to 0.1 μm) until increments at the outer edge were visible. All the measurements were done along the same axis (anteroposterior) using an Image Analysis System (TNPC, 5.0, NEOSIS). The increment measurement was repeated three times by the same reader at different interval of time and the mean calculated.

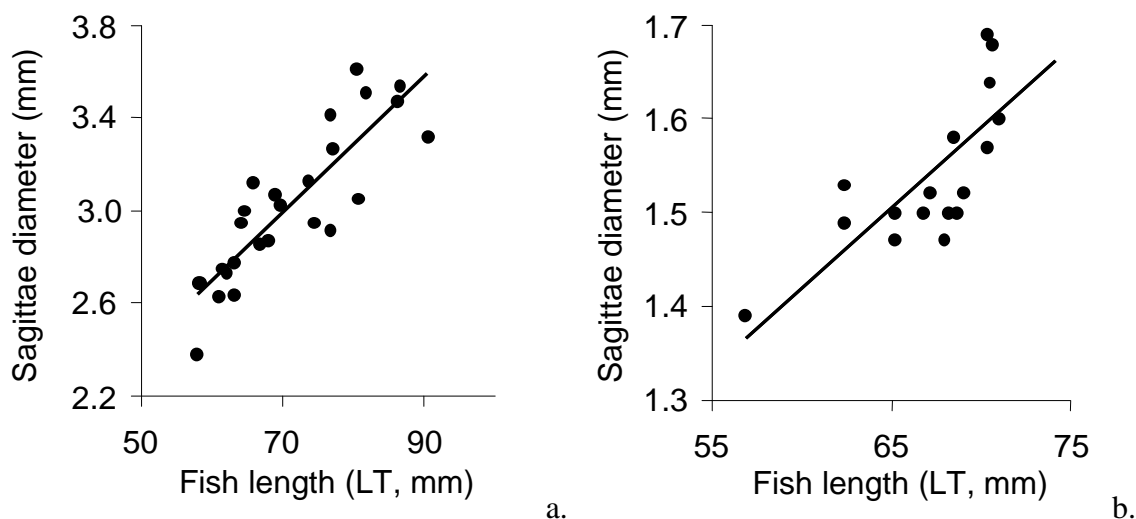


Fig. 2. (Figure 48) Relationship between fish TL (mm) and the sagittal otolith diameter (mm) in sea bass (A) and turbot (B). Regression model: Sea bass: diameter = 0.97 + 0.029 (TL), $R^2 = 0.75$, $p < 0.001$; Turbot: diameter = 0.39 + 0.017 (TL); $R^2 = 0.63$, $p < 0.001$.

2.3.2. Health indices

We estimated three health indices in the fish caged in the two stations and in the fish sacrificed at the beginning of the experiment (t_0): RNA:DNA ratio and TAG:ST ratio as indicators of nutritional status, and Fulton's K condition index as an indicator of the general well being of the fish. This latter morphometric index assumes that heavier fish, for a given length, are in better condition. We calculated Fulton's K condition index with the formula :

$$K = 100(W/L^3),$$

where (W) is the body mass (mg) and (L) is the total length (mm).

The procedure used to determine RNA and DNA concentrations in individual fish was based on the Clemmesen method (1988). Nucleic acids were measured on muscle fragments (0.05 g) by homogenizing the sample in ice-cold Tris-EDTA buffer (0.05 M Tris, 0.1 M NaCl, 0.01 M EDTA, pH 8.0) with proteinase-K (pro-K) and sodium dodecyl sulfate (SDS). Nucleic acids were extracted by purification step involving phenol:chloroform:isoamylalcohol (Amara et al., 2009). The quantity of RNA and DNA was determined by the fluorescence-photometric technique, using a specific nucleic acid fluorescent dye-ethidium bromide (Sigma-Aldrich Chemicals, France) (Amara et al., 2009).

The third health index was a lipid storage index based on the ratio of the quantity of triacylglycerols (TAG; reserve lipids) to the quantity of sterols (ST; structural lipids) in the

fish. The amount of total lipids in each individual was measured on a sample of lyophilised muscle (0.07 g). Lipid extraction was conducted using the method of Bligh and Dyer (1959) slightly modified as described by Amara et al. (2007). Lipids were extracted using a mixture of water:chloroform:methanol (1:1:1, v/v/v). TAGs and sterols were separated from other lipids by performing thin layer chromatography (TLC).

2.3.3. Metal analysis in gills

Because of the low quantity of juvenile fish gills for metal analysis, due to the small size of the juvenile, the gills of five fish were pooled and thus three samples of gills were analysed for each condition. The gills were rinsed with Milli-Q water, mixed and lyophilised for analysis of metal concentrations. Samples were digested with HNO₃ (65%, Suprapur Merck) at an ambient temperature for 24 h and then at 100 °C for 4 h. Concentrations of As, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, V and Zn were determined by inductively coupled plasma–mass spectrometry (ICP–MS; VARIAN 820) following the standard addition technique applied for resolution of matrix effects. International certified standard (DORM–3, NRC Canada) was used to control the accuracy of the analytical procedure.

2.4. Statistical analysis

Statistics were performed with XLSTAT 2007. Differences in biological parameters between fish caged in station A and B were analysed using parametric Student–t test. Comparisons between fish sacrificed at t₀ and fish cages in the two harbour stations were analysed with one–way ANOVA, followed by post–hoc Tukey tests. If biological data did not comply with the parametric assumption of normality and homogeneity of variance after various transformation techniques were tested, the non–parametric Kruskal–Wallis test and Mann–Whitney U test for post hoc pairwise comparisons were used. These non–parametric tests were also used to analyse differences in metal bioaccumulation in the gills. Using data from all the individuals collected, a Pearson product moment correlation matrix was computed to test the strength of the relationships between the variables measured. A principal component analysis (PCA) was performed with data means for each station and each species to evaluate the contributions of chemical and physiological biomarkers in the explanation of variations between caging stations.

3. Results

3.1. Environmental parameters

At the beginning of the experiment, bottom temperature and salinity were similar in the different caging stations, varying from 14.6 to 14.9 °C for temperature and from 33.2 to 34.1 PSU for salinity (Table 1). During the caging period, temperature increased in all three stations, up to 18 °C. Sediment TOM, TOC and TON were lower in station A compared to stations B and C. Sediment grain size distribution was also different in station A, where 99% of the sediment was composed of sand (fine, medium, coarse), whereas mud (clay, fine silt, coarse silt) was the main component of sediment from station B (82%) and station C (94%).

The results of metals, PAHs and PCBs concentrations in the total fraction expressed as mg. kg⁻¹ of dry sediment are reported for each station in Table 2. Sediment samples indicated different levels of contamination in metallic and organic compounds. Sediment from station A, located in front of the harbour, was the least contaminated, with the lowest levels of metal concentrations and no detectable PAHs. Stations B and C showed different levels of metal contamination. Sediment concentrations of cadmium (1.89 ± 0.20 mg.kg⁻¹) and mercury (0.70 ± 0.02 mg.kg⁻¹) were higher at station B than those measured at station C. Significantly highest levels of chromium (50.9 ± 0.8 mg.kg⁻¹), copper (135 ± 44 mg.kg⁻¹), nickel (21.1 ± 3.5 mg.kg⁻¹), lead (87.4 ± 1.6 mg.kg⁻¹) and zinc (501 ± 91 mg.kg⁻¹) were found at station C. The two stations located inside the harbour also had different concentrations of PAHs, with higher values being found at station C (4.12 ± 0.60 mg.kg⁻¹) than that found at station B (0.46 ± 0.07 mg.kg⁻¹). At the three caging stations, only the PCB congener 138 at station C was detected, but its concentration remained close to the limit of detection (0.01 mg.kg⁻¹).

Table 1 (Tableau 15) : Mean (\pm SD) values of abiotic and biotic parameters recorded at the three caging stations (A, B and C). TOM, TOC, TON: Total Organic Matter, Carbon or Nitrogen concentrations.

Environmental parameters	Station		
	A	B	C
Temperature ($^{\circ}$ C)	14.6	14.9	14.8
Salinity (PSU)	34.1	33.5	33.2
TOM ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	8.15 ± 0.15	128 ± 2.3	127 ± 2.3
TOC ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	1.04 ± 0.06	30.4 ± 1.8	48.5 ± 2.8
TON ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	0.19 ± 0.01	5.24 ± 0.12	3.95 ± 0.09
Mud (%)	0.24 ± 0.04	13.9 ± 0.9	19.9 ± 1.7
Fine silts (%)	0.32 ± 0.04	39.2 ± 1.3	48.9 ± 3.1
Coarse silt (%)	0.27 ± 0.02	29.1 ± 0.9	25.2 ± 1.2
Fine sand (%)	6.7 ± 0.3	17.9 ± 2.7	5.9 ± 3.9
Medium sand (%)	69.9 ± 0.4	0	0
Coarse sand (%)	22.6 ± 0.6	0	0

Table 2 presents also the levels of ERL and ERM guidelines. All chemical contaminants detected at station A were found to be lower than the toxic effect range ERL. Sediment from station B exhibited concentrations in Cd, Hg and Zn higher than ERL and lower than ERM. At station C, concentrations of five metals (Cd, Cu, Hg, Ni and Pb) and six PAHs exceeded ERL guidelines, and only Zn concentrations exceeded both ERL and ERM.

The percentage results of chemical extraction (HCl 1 M) for metals in sediments collected from the three caging stations are given in Fig. 3. The proportion of metals in the bioavailable fraction was found to be lower in the sediment from station A compared to other stations. Differences of bioavailability among elements were detected: Cd, Mn, Pb and Zn showed a strong affinity with the acid-soluble fraction, which represents more than 60%, while Cr, Ni and V remained lower than 30%.

Table 3 presents the enrichment levels of the metals at the three stations studied with respect to crust average. For all three stations the Cr, Ni and V did not exceed an enrichment level considered as moderate. All metals analysed in sediment from station A presented either no enrichment, or only a minor enrichment. At station B, the enrichment in Pb, Zn and Mn was considered as moderately severe, and extremely severe for Cd. At station C, the Mn presented a moderate enrichment level. The enrichment in Cu, Pb and Zn was estimated as severe, and very severe for Cd.

Table 2 (Tableau 16) : Mean (\pm SD) sediment metal, PAHs and PCBs concentrations ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ dry weight) at the three caging stations (A, B and C). ERL and ERM guidelines values defined by Long et al. (1995) are also presented. ⁽¹⁾, ⁽²⁾ Concentration that exceeds the ERL and ERM respectively

	Concentrations in sediments				
	A	B	C	ERL	ERM
Metals					
Cd	<0.01	1.89 ± 0.20^1	1.56 ± 0.16^1	1.20	9.60
Cr	3.96 ± 0.02	36.6 ± 0.9	50.9 ± 0.8	81	370
Cu	1.68 ± 1.06	17.7 ± 0.4	135 ± 44^1	34	270
Hg	0.01 ± 0.01	0.70 ± 0.02^1	0.35 ± 0.01^1	0.15	0.71
Mn	38.3 ± 5.3	1574 ± 13	1650 ± 120		
Ni	1.55 ± 0.47	12.8 ± 0.4	21.1 ± 3.5^1	20.9	51.6
Pb	3.69 ± 0.03	42.6 ± 1.2	87.4 ± 1.6^1	46.7	218
V	5.11 ± 0.57	49.8 ± 0.3	60.6 ± 3.5		
Zn	5.76 ± 0.67	168 ± 42^1	$501 \pm 91^{1,2}$	150	410
Al	6550 ± 26	23800 ± 6030	31210 ± 4580		
PAHs					
Naphtalene	<0.05	<0.05	0.06 ± 0.05	0.16	2.10
Acenaphtylene	<0.05	<0.05	<0.05	0.04	0.64
Acenaphtene	<0.05	<0.05	<0.05	0.02	0.50
Fluorene	<0.05	<0.05	0.08 ± 0.05^1	0.02	0.54
Phenanthrene	<0.05	0.09 ± 0.05	0.24 ± 0.05^1	0.24	1.50
Anthracene	<0.05	<0.05	0.21 ± 0.05^1	0.09	1.10
Fluoranthene	<0.05	0.10 ± 0.05	0.42 ± 0.05	0.60	5.10
Pyrene	<0.05	0.08 ± 0.05	0.79 ± 0.05^1	0.67	2.60
Benzo(a)anthracene	<0.05	<0.05	0.20 ± 0.05	0.26	1.60
Chrysene	<0.05	0.06 ± 0.05	0.42 ± 0.05^1	0.38	2.80
Benzo(a)pyrene	<0.05	0.05 ± 0.05	0.29 ± 0.05		
Benzo(b)fluoranthene	<0.05	0.08 ± 0.05	0.42 ± 0.05		
Benzo(k)fluoranthene	<0.05	<0.05	0.16 ± 0.08	0.43	1.60
Benzo(ghi)perylene	<0.05	<0.05	0.30 ± 0.05		
Indeno(123-cd)pyrene	<0.05	<0.05	0.34 ± 0.05^1	0.06	2.60
Dibenzo(a,h)anthracene	<0.05	<0.05	0.19 ± 0.07		
Total PAHs		0.46 ± 0.07	4.12 ± 0.60^1	4.02	44.8
PCBs					
Total PCBs (congeners					
28 – 52 – 101 – 118 –	<0.01	<0.01	0.01	0.5	1
138 – 153 – 180)					

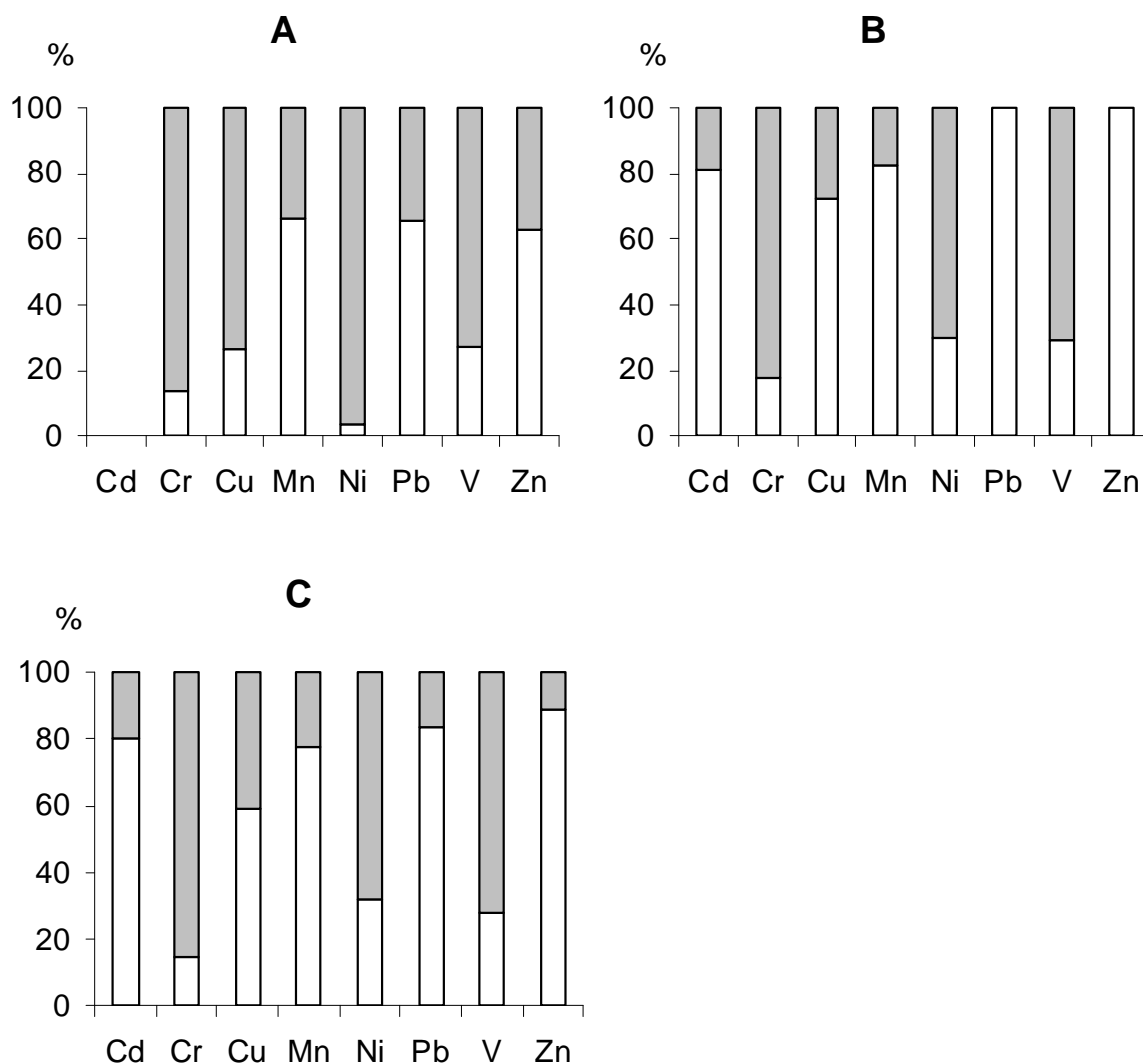


Fig. 3 (Figure 49): Distribution (%) of metals in the two sedimentary fractions (□ bioavailable; ■ not bioavailable) for the three caging stations (A, B and C).

Table 3 (Tableau 17) : Metals enrichment level for the three caging stations among the following classification: 0 = no one ($EF < 1$), 1 = minor ($1 < EF < 3$), 2 = moderate ($3 < EF < 5$), 3 = moderately severe ($5 < EF < 10$), 4 = severe ($10 < EF < 25$), 5 = very severe ($25 < EF < 50$), and 6 = extremely severe ($EF > 50$).

Station	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	V	Zn	Mn
A	0	1	0	0	1	1	0	0
B	6	2	1	1	3	1	3	3
C	5	2	4	1	4	1	4	3

3.2. Metal concentrations in gills

As no fish were found after two weeks in the cages from station C, the following results concern only those fish recovered from stations A and B. 75% of the fish from station A, were able to be sampled, and 94 % from station B. Some of the mortality observed was accidental and therefore, could not be properly assessed (fish loss during collection).

Table 4 reports the concentrations of trace metals measured in the fish's gills after 38 days of caging for the two fish species at reference levels t_0 , and from stations A and B. Before caging exposure, the gills from the control sea bass and turbot presented concentrations of metals in the same order of magnitude, except for Mn in the turbot, which showed concentrations approximately 10 times higher than the sea bass. Concentrations in As, Cr, Mn, Ni, Pb, V and Zn tended to increase in the sea bass caged at the inner harbour station (B) compared to station A. With the low number of samples of gills analysed (three replicates of a mixture of five gills per station), no significant difference could be detected between the two stations. However, Mn, Pb and Zn had significantly accumulated in the sea bass caged at station B compared to the reference t_0 (Kruskall Wallis, $p < 0.05$). Metal concentrations found in the turbot caged at station B showed higher Cr, Ni, Pb and V concentrations compared to station A, but these differences were not significant. Nevertheless, this tendency was confirmed for Cr, Ni, Pb and V between station B and t_0 (Kruskall Wallis, $p < 0.05$). These metals detected in the turbot gills showed an overall higher level of accumulation compared to the sea bass.

Table 4 (Tableau 18) : Mean (\pm SD) metal concentrations (mg.kg^{-1} dry weight) in gills of sea bass and turbot caged at stations A and B (t_0 : reference status). For each species, ⁽¹⁾ and ⁽²⁾ represent the significant difference ($p < 0.05$) compared to " t_0 " and "station A", respectively.

Metals	Concentrations in gills					
	Sea Bass			Turbot		
	t_0	A	B	t_0	A	B
As	2.44 ± 0.22	4.68 ± 0.08	4.27 ± 0.46	1.05 ± 0.19	2.03 ± 0.29	1.85 ± 0.11
Cd	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01
Cr	0.85 ± 0.15	1.09 ± 0.14	2.27 ± 1.38	0.94 ± 0.15	1.58 ± 0.30	6.92 ± 4.28^1
Cu	2.41 ± 0.41	2.29 ± 0.32	2.32 ± 0.19	2.94 ± 3.29	3.29 ± 0.19	2.96 ± 0.18
Mn	21.1 ± 0.4	17.8 ± 2.5	24.7 ± 2.1^2	196 ± 25	207 ± 6	187 ± 24
Ni	1.37 ± 0.08	1.37 ± 0.06	1.69 ± 0.14	1.46 ± 0.17	2.50 ± 0.15	3.17 ± 0.25^1
Pb	0.09 ± 0.04	0.32 ± 0.01	0.47 ± 0.01^1	0.12 ± 0.02	0.47 ± 0.10	2.82 ± 0.58^1
V	0.87 ± 0.09	0.94 ± 0.07	1.63 ± 0.26	0.74 ± 0.09	1.19 ± 0.25	2.22 ± 0.08^1
Zn	124 ± 2	127 ± 2	145 ± 4^1	111 ± 12	118 ± 5	107 ± 3

3.3. Physiological biomarkers

Differences in responses of some physiological biomarkers were observed between the two fish species analysed. Fish mean weight and length at the beginning of the experiment were not significantly different among the different cages. At the end of the experiment, however, mean weight varied significantly among the fish caged at station A and B (Student-t test, sea bass: $p < 0.001$; turbot: $p < 0.05$) and in length for sea bass (Student-t test, $p < 0.001$). Fish growth and health indices are presented in Table 5. For the sea bass, the specific growth rates in length (GL: $0.46 \pm 0.13\% \cdot d^{-1}$) and in weight (GW: $1.50 \pm 0.29\% \cdot d^{-1}$) of individuals caged in the least contaminated station (A) were significantly higher compared to individuals from station B (GL: $0.10 \pm 0.26\% \cdot d^{-1}$; GW: $-0.21 \pm 0.34\% \cdot d^{-1}$) (Student-t test, $p < 0.001$). The recent growth (RG) was also significantly higher for individuals caged at station A compared to those at station B (Student-t-test, $p < 0.001$). Whereas all growth parameters measured on the sea bass were lower at station B compared to station A, no difference in turbot GL and RG was observed between the caging stations. At both stations, the turbot had lost weight, but the loss was significantly higher at station B ($-0.39 \pm 0.23\% \cdot d^{-1}$) compared to station A ($-0.19 \pm 0.23\% \cdot d^{-1}$) (Student-t test, $p < 0.05$).

For both species, Fulton's K condition index was higher in the fish caged at station A (sea bass: $1.03 \pm 0.10 \text{ mg} \cdot \text{mm}^{-3}$; turbot: $1.41 \pm 0.15 \text{ mg} \cdot \text{mm}^{-3}$) compared to station B (sea bass: $0.85 \pm 0.11 \text{ mg} \cdot \text{mm}^{-3}$; turbot: $1.32 \pm 0.06 \text{ mg} \cdot \text{mm}^{-3}$) (Kruskall Wallis, sea bass: $p < 0.001$; turbot: $p < 0.05$). Significant variations in the biochemical index RNA:DNA ratio were only observed in the juvenile sea bass. Indeed, the ratio was significantly higher for the sea bass caged at station A (3.29 ± 1.11) compared to station B (1.71 ± 0.57) (Kruskall Wallis, $p < 0.001$). A difference in the lipid index was observed in both species since the TAG:ST ratios were significantly higher in the fish caged at station A (sea bass: 0.73 ± 0.60 ; turbot: 0.45 ± 0.35) compared to station B (sea bass: 0.22 ± 0.13 ; turbot: 0.19 ± 0.14) (Kruskall Wallis, sea bass: $p < 0.001$; turbot: $p < 0.05$).

In comparison with the fish sacrificed at the beginning of the experiment (t_0), no significant difference was observed with the sea bass caged at station A, although all the health indices (K, RNA:DNA and TAG:ST) had increased. On the contrary, all the condition indices had decreased in the sea bass caged at station B. In the turbot, all health indices were

significantly higher in t0 compared to those individuals caged at both stations A and B (Kruskall Wallis, $p < 0.01$).

Table 5 (Tableau 19) : Comparison of specific growth rate in length (GL) and in weight (GW), recent growth (RG), Fulton's K index, RNA:DNA ratio and TAG:ST ratio (mean \pm SD) for sea bass and turbot juvenile caged at stations A and B (t₀: reference). For each species, ⁽¹⁾ and ⁽²⁾ represent the significant difference ($p < 0.05$) compared to "t₀" and "station A" respectively.

Biological parameters	Sea bass			Turbot		
	t ₀	A	B	t ₀	A	B
GL		0.46 \pm 0.13	0.10 \pm 0.26 ²		0.04 \pm 0.07	0.03 \pm 0.09
GW		1.50 \pm 0.29	-0.21 \pm 0.34 ²		-0.19 \pm 0.23	-0.39 \pm 0.23 ²
RG		12.4 \pm 1.2	10.2 \pm 1.3 ²		7.26 \pm 0.24	7.36 \pm 0.49
K	1.02 \pm 0.05	1.03 \pm 0.10	0.85 \pm 0.11 ^{1,2}	1.57 \pm 0.22	1.41 \pm 0.15 ¹	1.32 \pm 0.06 ^{1,2}
RNA:DNA	2.70 \pm 0.85	3.29 \pm 1.11	1.71 \pm 0.57 ^{1,2}	5.00 \pm 1.47	3.39 \pm 1.29 ¹	3.26 \pm 1.60 ¹
TAG:ST	0.65 \pm 0.35	0.73 \pm 0.60	0.22 \pm 0.13 ^{1,2}	1.67 \pm 1.36	0.45 \pm 0.35 ¹	0.19 \pm 0.14 ^{1,2}

3.4. Correlation between physiological biomarkers

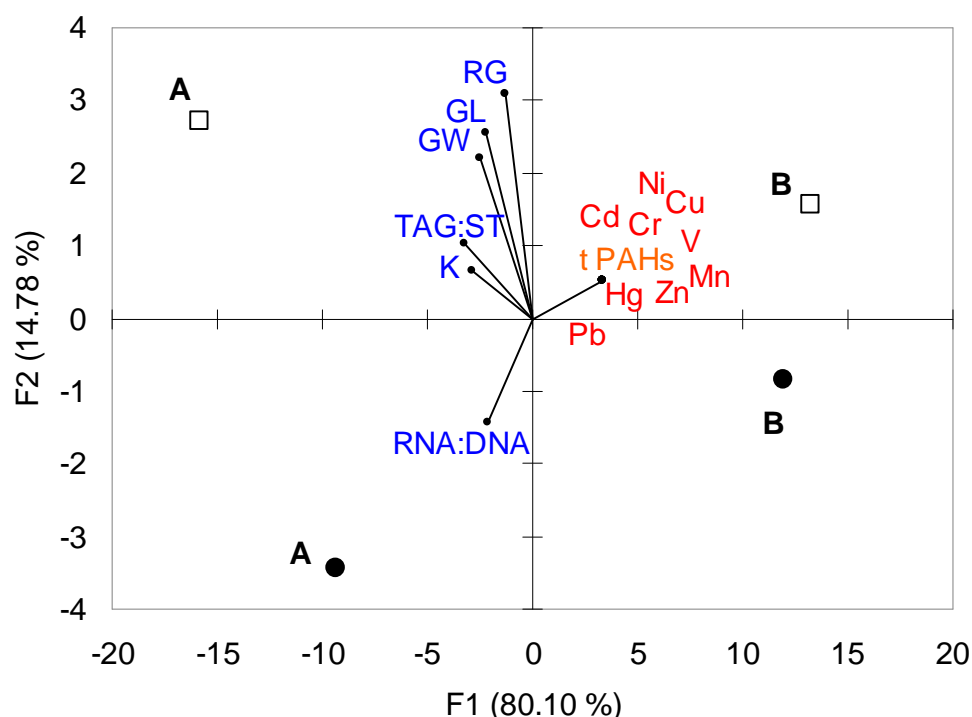


Fig. 4

(Figure 50) : PCA based on biological parameters (specific growth rate in length (GL) and weight (GW), recent growth (RG), Fulton's condition Index (K), RNA:DNA and TAG:ST ratios) of juvenile sea bass (□) and turbot (●) in relation with chemical contamination (metals and total PAHs) measured at caging stations A and B.

All the biological parameters measured in the present study were significantly correlated in sea bass (Table 6). For turbot, physiological biomarkers were moderately related to each other with only a significant correlation between GL, GW and K.

The relationship between physiological biomarkers and chemical contaminants in sediments were analysed with a PCA (Fig 4). The two first axis of the PCA allowed explanation of 94.9% of the total inertia in the data with mean explanations for the first axis (80.1%). For both species, the first axis differentiates stations A and B according to chemical contamination (metal and PAHs concentrations) with a total contribution of 75.5 % for all contaminants. The second axis differentiates sea bass and turbot according to physiological biomarkers, which show different values among the species. A contribution of 35.2 % in this second axis explanation was found for GL, 24.2 % for RG, 17.8 % for GW, 7.1 % for TAG:ST, 3.1 % for RNA:DNA and 1,5 % for K.

Table 6 (Tableau 20) : Pearson's correlation between growth indices (specific growth rate in length (GL) and weight (GW) and recent growth (RG)) and condition indices (Fulton's condition Index (K), RNA:DNA and TAG:ST ratios) measured in juvenile sea bass (a) and turbot (b) caged at stations A and B. Significant correlation for $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$ and $p^{***} < 0.001$.

	GW	GL	RG	K	RNA:DNA
GW	-				
GL	0.95***	-			
RG	0.55**	0.50*	-		
K	0.85***	0.74**	0.41*	-	
RNA:DNA	0.67***	0.65**	0.54**	0.58*	-
TAG:ST	0.65**	0.63**	0.32	0.46*	0.66**

a.

	GW	GL	RG	K	RNA:DNA
GW	-				
GL	0.60*	-			
RG	-0.25	0.21	-		
K	0.58**	-0.21	-0.52*	-	
RNA:DNA	-0.01	0.08	-0.13	0.03	-
TAG:ST	0.06	-0.09	0.01	0.28	0.15

b.

4. Discussion

4.1. Sediment contamination

The fish caged in all three stations were affected to varying degrees by anthropogenic activities, while abiotic factors other than chemical contamination, were quite similar. The sediments from the three caging locations revealed different levels of metallic and PAHs contaminants, whereas no PCB was detected below 0.01 mg.kg^{-1} . As expected, station A, located in front of the harbour and considered less influenced by anthropogenic activities, was found to be the least contaminated station. Station C meanwhile, seemed overall more contaminated compared to station B. Differences in metal contamination between the three caging stations could be related with sediment characteristics since metals are known to have a high affinity for sediment organic matter and fine fraction (Costa et al., 2009). Indeed, the less contaminated station (A) was characterised by sandy sediment and showed low organic matter content. The high content of metals in station B and C could be mainly explained by the industrial activities occurring in the harbour where contaminants are readily accumulated in sediments. Based on the enrichment factor values, stations B and C presented a severe enrichment in some metals, whereas station A appeared to have had a minor enrichment in all elements analysed. The high Cd, Cu, Pb and Zn contents, particularly in station C, could have resulted principally from the proximity of metallurgical activities. More precisely, siderurgical activities, or the use of anti-corrosion paints in boat maintenance, could have increased zinc concentrations in the harbour. High concentrations in mercury and manganese could have been the consequence of the activities of a former ferromanganese factory. The PAHs contamination could be explained by the intensity of the maritime traffic (REPOM, 2009). The chemical contamination could also have been the result of the discharged waters from the Liane river into the harbour. Since they are based on toxicity probabilities, the use of these sediment quality guidelines have been criticized by some authors (O'Connor, 2004), but they could be useful in comparison studies. Using this classification, and according to chemical contamination, station A seems to have had a good criteria of sediment quality, validating it as reference station. On the contrary, samples from stations B and C corresponded to polluted marine sediments, which exceeded some levels of toxicity.

The chemical concentrations measured in these harbour sediments were in the same order of magnitude as those reported in previous studies in the same area (Amara et al., 2007; Berthet et al., 2003), higher than some European harbours, such as Cork Ireland (Kilemade et al., 2009) or Rhodes, Greece (Angelidis and Aloupi, 1995), but lower than other harbours

such as East London (Fatoki and Mathabatha, 2001) or Barcelona, (Guevara–Riba et al., 2004).

The chemical concentrations measured in the sediment collected from the three caging stations could be put in relation with the percentage of fish recovery. After the two first weeks, the presence of all individual skeletons in the cages at station C suggested that the mortality was not due to cannibalism. This station being the most contaminated, especially with PAHs, the chemical contamination appeared to be an obvious cause of the fish's mortality. For the two other stations, the recovery of caged fish ranged from 75% from station A to 94% from station B, which was within the ranges found in other enclosure studies. For example, recovery rates were about 60.3% for the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) (Phelan et al., 2000) and varies from 54 to 100% for the European flounder (*Platichthys flesus*) (Tarpgaard et al., 2005). At stations A and B, no skeletal fish were found in the cages, and any loss was probably due to those escaping during the manipulation of the cages.

4.2. Accumulation of contaminants in fish

Ecotoxicological effects of chemical compounds are dependent on the exposure and bioavailability of elements, uptake, metabolism and intracellular concentrations (Fent et al., 2004). In the present study, the potentiality of chemical contaminant transfer in fish was assessed by the estimation of the metal bioavailability in the sediment and the metal concentrations in the fish's gills. Several recent works (Fernandes et al., 2008; Oliveira et al., 2009), have recommended the suitability of fish gills analysis for environmental biomonitoring. Gills are the main targets of direct contamination, as they have a large surface area continuously in contact with surrounding water (Pereira et al., 2009). Moreover, they play a significant role in metal uptake, storage and eventual transfer to the internal compartments via blood transport (Ahmad et al., 2004). Variations of bioaccumulation among species may be related to their differences in ecological needs, swimming behaviours and metabolic activities (Canli and Alti, 2003). Turbot is a benthic flatfish species that lives in contact with the sediment and so could be more exposed to sedimentary chemical contamination (Barhoumi et al., 2009). This behaviour could have accounted for the higher levels of metals accumulation in the turbot (i.e. Cr, Ni, Pb and V) compared to the sea bass. However, the sea bass were more sensitive than the turbot to Mn and Zn contamination, two elements found to be relatively concentrated in the gills. On the other hand, no difference in

copper, another essential element for fish metabolism, was observed, despite the high concentrations found in sediments and the high bioavailability of copper. These results indicated that high concentrations of an element in a sediment does not necessarily result in the accumulation of that metal in an organism, despite the high degree of its bioavailability. Similar results have been observed in yellow perch (*Perca flavescens*), transplanted to a contaminated lake, in which no accumulation of Zn and Cu was observed (Kraemer et al., 2005). Some metals like copper, zinc and manganese are essential for fish metabolism since they play an important role in biological systems, while non-essential metals such as mercury, cadmium and lead are toxic even in trace amounts. The essential metals can also produce toxic effects at high concentrations, but their concentrations in organisms tend to be highly regulated compared to non-essential metals (Fernandes et al., 2007). Moreover, the time of exposure may not have been long enough to detect higher concentrations of these elements in their gills, as several authors have observed an increase in metal concentrations in fish gills with the duration of exposure to contaminants (Annune and Iyaniwura, 1993; Gbem, 2001). This exposure time was chosen as a compromise between detecting potential effects on fish growth and health, and avoiding cage damage or losses. This choice was based on a review of caging techniques by Oikari, (2006) which mentioned that the duration of exposures in cages varied from 2 to 87 days, with 3–4 weeks being most common.

The two non-essential metals measured in the gills showed the opposite behaviour. Indeed, in spite of relatively high Cd concentrations in the sediment at station B, cadmium did not seem to accumulate in the gills since no difference was observed between the caged fish and reference levels. On the contrary, lead was found bioaccumulated in both species. Masoud et al. (2007) suggest a preferential accumulation of lead in gills, which could be attributed to a similarity of lead and calcium in their deposition and mobilisation from gills. This increase of lead concentrations in the gills from both species is of concern as lead can cause a deficit or decrease in fish growth rates, development, and metabolism, in addition to increased mucus formation (Burden et al., 1998; Burger et al., 2002).

Several studies have shown that some metals have displayed higher accumulation in the liver compared to the gills (Chen and Chen., 1999). However, in the present study, differences in metal concentrations between the two caging conditions were analysed only in fish's gills, as the livers were used for another study to analyse the reactions of several biochemical biomarkers responses. Mechanisms of toxicity were therefore assessed in this previous study, while the effects of the mixture of chemical contaminants in sediments on fish's physiological performance, were focused on in this present study. Indeed, fish exposure to toxicants as

metals or PAHs, are associated with increased metabolic costs, excretion and tissue repair (Janz et al., 2010), which could lead to physiological damages.

4.3. Physiological biomarkers

The highest concentrations, of metals and PAHs in the sediments, and of some metals in the gills, could have been related to the decrease of fish growth rates at station B. Growth values of sea bass caged in station A, were of the same order of magnitude as those measured on experimentally reared sea bass with the same initial weight in previous studies (Conides and Glamuzina, 2006). Sea bass growth could therefore be considered at an optimum at station A. The decrease of sea bass growth at station B may have represented a summation of various sub-lethal responses to chemical contamination exposition, because growth is an integration of many processes. Several studies have showed that chemical contaminant can reduce fish growth in many species, and particularly during early life stages (Morales-Nin et al., 2007; Saborido-Rey et al., 2007). Indeed, a decrease in growth has been observed in fish exposed to different sediment contamination levels (Forrester et al., 2003; Rowe, 2003; Hopkins et al., 2004).

The RNA:DNA ratio values of the sea bass and turbot from station A, were comparable with those measured in other studies (Alami-Durante et al., 2007; Rasmussen and Korsgaard, 1996, respectively). Although no difference was observed for the turbot, the juvenile sea bass caged at station A presented a higher RNA:DNA ratio compared to station B. This biochemical index has been shown to be a useful and reliable indicator of the nutritional status and growth of larval and juvenile fish, and has been widely applied to laboratory-reared, as well as wild fish (Clemmesen, 1988; Buckley et al., 1999). Decreases in RNA have been reported previously in fish exposed to toxic substances (Driedger et al., 2010). This low RNA:DNA ratio observed in the sea bass from the least contaminated station, confirmed the decrease of fish growth and suggested a decrease of their physiological status. As suggested by other authors (Soimasuo et al., 1995; Oikari, 2006), this decrease in fish physiology was likely to be the net result of additive chemical effects, or interactions of a complex chemical mixture of the studied harbour. These numerous potential toxic substances made it difficult to identify the components that caused these biological effects.

The second biochemical index used in this study was the lipid index (TAG:ST) which showed values in the same range as those measured on wild juvenile soles (*Solea solea*) from a French coastal area (Durieux et al., 2007). The decrease in the lipid index for both species

showed that the juvenile fish appeared to have had depleted energy reserves when caged in the contaminated station. Lipid depletion has been identified as a general metabolic response to stress (Claireaux et al., 2004). Xenobiotic detoxification and regulation involves both passive and active mechanisms, and therefore requires energy (Alquezar et al., 2006), whereas lipids are used for energetic mechanisms associated with growth and survival. Previous studies have reported similar depletion in lipid reserves of fish subjected to metal trace exposure (Rowe, 2003). Under chemical contamination, a lower part of the energy would be available for fish development. However, the difficulty to work with sites presenting different levels of contamination is that food in polluted areas is either more contaminated or nutritionally different or just limited (Oikari, 2006). The decrease in the lipid index could have represented a summation of the different nutritional factors linked to the chemical contamination.

4.4. Comparison between a demersal and a benthic species.

We found a significant relationship between the level of sediment contamination, growth and health indices of the juvenile sea bass. These physiological biomarkers seem useful proxies for comparison of two stations with different criteria of quality. This relationship was more moderate for the turbot, with a bioaccumulation of some toxic metals in the gills being a more sensitive biomarker of exposure. During the caging exposure, the turbot at both stations did not grow and lost weight, although, a growth rate of $1.25\% \cdot d^{-1}$ would have been expected under optimal condition in animals of same age (Labatut and Olivares, 2004). In addition, in comparison with t_0 , all health indices were found to be lower at both caging stations. It appeared that even at the least contaminated station, conditions were not favourable for the turbot's growth. This deference of physiological responses between the two species was confirmed by the second axis of the PCA.

Fish feeding behaviour proceeds from the interaction of sense organs receptive to visual, mechanical, chemical and electromagnetic stimuli (Hyatt, 1979). Both sea bass and turbot may feed on the water column and on the bottom, but sea bass as nocturnal feeders, probably rely heavily on the lateral system for maximising feeding performance (Rubio et al., 2003). On the other hand, in spite of the preference of turbot for high turbidity areas (Florin et al., 2009), turbot are visual daylight predators (Gibson, 2005), implying that increased turbidity can reduce feeding efficiency (Moore and Moore, 1976). As the harbour water turbidity was high, the weight loss of the juvenile turbot could be explained by a reduced food detection

efficiency in low light or in darkness. Moreover, the cages could have potentially affected food availability by filtering or concentrating prey. However, previous studies have shown no consistent relationship between prey densities and fish growth in cages (Sogard, 1992), and food limitation was not detected in a caging study using a flatfish (Kamermans et al., 1995). The cages retrieved from station A were found to contain numerous amphipods. The analysis of the stomach contents in the fish from station A showed no difference in feeding activities between the two species, with a mean of 21 amphipods per stomach for both species. The availability of food did not appear to have been a limited factor in this station, and did not explain the difference observed between the two species.

Energetic studies have shown that the metabolic rates of flatfish can increase significantly when the fish are forced to bury in sediments with suboptimal grain sizes, or do not have access to sediments at all (Howell and Canario, 1987). The non-optimal grain size of the sediment, or the fact that the cage infrastructure could have limited the turbot burying, may explain the decrease in the health of the turbot at station A, with only relatively low contaminated sediments. These differences in behaviour between a demersal fish like the sea bass and a benthic fish like the turbot, could explain the variations observed in our study in fish responses to chemical contamination. However, other biological differences between the two species as different activity rates or resistance to pollution could explain these variations. These results have shown the importance in the choice of the fish species suitable for caging studies in order to minimize physiological stress in caged fish.

4.6. Conclusions

With a high percentage of fish recovery, with the exception of the most contaminated station, this work has shown the potential of the caging method to study field exposures of fish to chemical contaminants. Using this technique, we were able to integrate true ambient conditions over chemical exposure, which would have been difficult to achieve in laboratory studies. The caging technique has already been used in many ecotoxicology studies, however, they have mainly focused on short-term responses, such as fish bile metabolites (Beyer et al., 1997) or biochemical biomarkers (Winter et al., 2005; Jung et al., 2008), and few studies have considered physiological performances. We found that the use of several physiological biomarkers such as growth and condition indices can improve fish health determination, and may provide a useful tool for monitoring complex exposures. Moreover, this study demonstrates the suitability of using juvenile fish in ecotoxicological caging studies,

particularly since physiological performance and metal accumulation have been shown to be higher in younger individuals (Canli and Atli, 2003), probably due in part to the differences in metabolic activity between younger and older fish. In this study, we chose two species with different behaviour and feeding habits, and observed species-specific responses to environmental conditions. Due to some original ecological features (*e.g.* large distribution, eurythermal and euryhaline species) sea bass, which is a demersal species, seems to be a good model organism for caging environmental monitoring.

Acknowledgements

This work was supported by post Grenelle programme 190, DEVIL of the French ministry for ecology and the Franco–British INTERREG IVA European project, DIESE. We would like to thank Michel LAREAL for making the cages, and Gregory GERMAIN for his help during the cages placement at sea. We thank Peter MAGEE for revision of the English grammar and syntax (www.anglais.webs.com).

2.2. Les réponses des biomarqueurs moléculaires reflètent-elles la performance physiologique des juvéniles de bar et de turbot mis en cage dans un port pollué ?

Résumé

Après avoir analysé les réponses physiologiques des juvéniles de bar et de turbot mis en cages en milieu contaminé, les réponses de biomarqueurs moléculaires ont été analysées sur les mêmes individus. Bien que la sensibilité de ce type de biomarqueurs à différents contaminants chimiques ait été démontrée dans plusieurs études, leur pertinence à de plus haut niveaux d'organisation biologique demeure encore mal connue. Certains auteurs préconisent ainsi leur utilisation conjointe avec des mesures de fitness. Cependant, peu d'études ont pu établir des relations entre les réponses de ces biomarqueurs moléculaires avec des performances physiologiques diminuées des organismes exposés aux contaminants chimiques. Ce type d'approche multibiomarqueurs apparaît essentiel car elle permettrait d'améliorer la capacité d'utilisation des biomarqueurs pour prédire les conséquences des polluants à l'échelle de l'individu et des populations. Dans cette étude, trois biomarqueurs moléculaires, l'EROD, la GST et la CAT ont ainsi été analysés sur la base de cette expérience de caging. Leurs réponses ont ensuite été reliées à celles des indices de croissance et de condition précédemment mesurés.

Les activités des deux paramètres de biotransformation, l'EROD et la GST, étaient plus élevées dans le foie des bars et des turbots mis en cage dans la station B que ceux encagés à la station A. De par leur sensibilité aux composés organiques, cette induction pourrait être reliée aux différentes concentrations d'HAPs observées dans le sédiment B alors qu'aucun de ces composés aromatiques n'a été détecté dans le sédiment A. A l'inverse, une diminution des activités CAT a été observée chez les deux espèces mis en cage dans la station B. Plusieurs auteurs ayant montré une inhibition des activités d'enzymes antioxydantes par les métaux, cette diminution d'activité pourrait s'expliquer par les plus fortes teneurs en métaux mesurées dans le sédiment de la station B comparé à celui de la station A. Néanmoins, à la fois des inductions et inhibitions des activités catalase ont été reportées chez des poissons exposés à des composés métalliques mais aussi organiques (Van der Oost *et al.*, 2003).

Dans l'étude précédente, nous avons observé des différences dans les réponses des indices de croissance et de condition entre les juvéniles de bar et de turbot mis en cage dans le milieu portuaire. Cette différence entre espèce se retrouve dans cette étude complémentaire

par rapport aux relations entre biomarqueurs moléculaires et physiologiques. En effet, alors que de nombreuses corrélations significatives ont pu être établies entre les réponses de l'EROD, la GST et la CAT avec les indices de croissance et de condition chez les juvéniles de bar, peu de corrélations ont été observées pour le turbot. Cette étude confirme la potentialité des juvéniles de bar comme modèle d'étude pour les expériences de caging. Elle préconise également l'utilisation simultanée des biomarqueurs moléculaires et physiologiques pour évaluer les effets des contaminants sur les juvéniles de poisson et ainsi accéder à la qualité des habitats. Toutefois, le manque de relations entre réponses moléculaires et physiologiques chez les turbots suggère l'effet d'autres facteurs biotiques et/ou abiotiques sur les réponses des organismes.

Are biochemical biomarker responses related to physiological performance of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) caged in a harbour polluted area?

Kerambrun, E. (1,2,3*), Sanchez, W. (4), Henry, F. (1,2,3) and Amara, R. (1,2,3).

¹ Univ Lille Nord de France

² ULCO, LOG, F-62930 Wimereux, France

³ CNRS, UMR 8187, F-62930 Wimereux, France

⁴ Unité d'écotoxicologie *in vitro* et *in vivo*, Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), BP 2, F-60550 Verneuil en Halatte, France

*Corresponding author : Elodie Kerambrun

elodie.kerambrun@univ-littoral.fr

Phone : +(33) 321 99 64 27

Fax : +(33) 321 99 64 01

1. Introduction

A multitude of xenobiotics contaminate the marine environment, and although chemical analyses are able to measure many of these compounds qualitatively and quantitatively, complex mixtures of these chemical pollutants cannot be fully assessed. Furthermore, chemical analyses alone do not reveal the impact of chemical pollution on the aquatic environment because of potential synergistic/antagonistic effects of complex mixtures of chemical pollutants. In this context, utilisation of biomarkers as an early warning of pollution or degradation in ecosystems has increased over the past 20 years (Adams, 2002).

Identifying a suitable biomarker of toxicity represents a major challenge in current ecotoxicological research (Cheung et al., 2007). Many parameters have been investigated to assess disturbances of various physiological functions linked to chemical exposure (Van der Oost et al., 2003). Peakall (1994) defined biomarkers as “biological responses than can be related to an exposure to, or toxic effect of, an environmental chemical or chemicals”. The subdivision of biomarkers in literature is rather diffuse since the impact of toxic xenobiotics on fish has been analysed with various types of exposure and effect biomarkers, ranging from molecular, through cellular and physiological responses, to behavioural changes. In order to avoid confusion, in this paper, biomarkers acting at the subcellular level as biotransformation process or oxidative stress protection will be referred to as “biochemical biomarkers” and biomarkers reflecting fish growth or physiological condition will be referred to as “physiological biomarkers”.

Because many toxic effects initially occur at the subcellular level, there has been an increasing use of biochemical biomarkers that help to determine causative agents responsible for altered cellular function (Schlenk et al., 1996). Among the biochemical biomarkers described in relating literature, phase I and phase II biotransformation parameters such as EROD (Ethoxyresorufin-O-deethylase) and GST (Glutathion-S-transferase) activities are currently used in environmental risk assessment (Sanchez et al., 2008). Biotransformation of chemicals is a requisite for detoxification and excretion (Gravato and Santos, 2003). The first step is usually catalysed by cytochrome P450-dependent monooxygenases (phase I) and their products, or several others organic pollutants, are subsequently coupled to endogenous metabolites (phase II) (Buhler and Williams, 1988; Landis and Yu, 1995). Antioxidant enzymes are also commonly used to understand the associated toxic-mechanisms of xenobiotics (Sanchez et al., 2005; Oliveira et al., 2008). Many pollutants exert their effects through redoxcycling, resulting in the production of reactive oxygen species (ROS). The role of antioxidant systems is to protect the cells from this oxidative stress. Thus, measurement of components of the antioxidant defence system may be helpful to determine organism exposure to pollutant (Bilbao et al., 2010).

Attempting to relate biomarker responses of individual organisms to increasing pollutant exposure and stress, both in the laboratory and *in situ*, offers considerable potential for improving the ecological relevance of ecotoxicological test procedures (Depledge et al., 1995). However, although the role of biochemical biomarkers as early warning tools is recognised, it is difficult to understand their significance at higher levels of biological organisation. Indeed, in spite of their rapid responsiveness and sensitivity to contaminant exposure, biochemical biomarkers have questionable ecological relevance, as a result of being endpoints at a low level of biological organisation (Castro, 2004). On the contrary, changes in physiology and fitness seem to be a common response in marine organism exposed to stressful pollutants (Alquezar et al., 2006; Faucher et al., 2008). Pollutants can induce various biological responses in fish, affecting the organisms from the biochemical to the population-community levels (Adams, 2002). For example, many investigations on biological responses of fish populations to contamination indicated a general decrease of the relative fecundity, the growth rate and condition factor in contaminated estuaries (Laroche et al., 2002; Marchand et al., 2003; Amara et al., 2007). It is likely that changes in individual health manifest themselves at higher levels of ecological organisation, leading to reduced fish recruitment, abundance and production.

It has long been suggested that biochemical biomarkers should be used in conjunction with measurements of fitness (Anderson et al., 1994; Depledge et al., 1995). However, few studies have demonstrated correlative relationships between biochemical biomarkers responses and reduced fitness of aquatic organisms exposed to toxicants (Depledge et al., 1995; Lesser et al., 2001; Fonseca et al., 2009). Biological impairment (e.g. embryonic malformations, growth and condition depletion, fecundity and pollution tolerance) may directly affect the survivorship of organisms. Therefore, this type of multifaceted approach is important because it will improve our ability to use molecular biomarker responses of organisms to predict higher-level consequences of toxicant exposure (Rose et al., 2006).

Although biochemical or physiological biomarkers are intended to be useful tools for environmental assessment in the field, most of them have been developed under laboratory controlled toxic conditions. These studies often fail to recreate the mixed exposure situations occurring in nature. However, in field situations, the migration of many fish species for feeding and breeding creates uncertainty about how individuals sampled in some habitat truly reflects the water quality around the site of capture. In comparison, a caging strategy may, in specific situations, give more realistic results in studies of bioavailability, bioaccumulation and biological effects of contaminants in fish. The technique of caging offers advantages over organism chemical exposure (Oikari, 2006) with a control of the precise location and duration of exposure while environmental field conditions are preserved. The use of cage-held animals from a common source (e.g. hatchery) also removes the potential for genotype adaptation, which is a distinct possibility in feral fish populations exposed to contaminants (Winter et al., 2005). The development of caging field experiments would provide an indication of the impact of contamination on marine fish and information on the applicability of this experimental strategy for assessing habitat quality.

The present study was designed to analyse the responses of two biotransformation parameters (EROD and GST activities) and an antioxidant enzyme (catalase) on the basis of a caging field experiment of two marine fish species in a polluted area (Boulogne sur Mer). In a second part, the responses of these enzymatic biomarkers were compared to different growth rates (in length and weight) and condition indices, measured on the same individual fish and analysed in a previous study (Kerambrun et al., submitted for publication). We used three condition indices: the Fulton's K condition factor; the RNA:DNA ratio which is used in numerous studies as indices for nutritional condition and growth assessment in larvae and juvenile fish (Buckley, 1984; Gwack and Tanaka, 2001; Amara et al., 2009); and a lipid

storage index based on the ratio of the quantity of triacylglycerols (TAG; reserve lipids) to the quantity of sterols (ST; structural lipids) in fish (Amara et al., 2007).

2. Material and Methods

This experiment was conducted in accordance with the Commission recommendation 2007/526/EC on revised guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes. The University of Littoral Côte d'Opale is authorised to conduct experimentation on animals in its capacity as a certified establishment; according to the administrative order N° B62-160-2.

2.1. Experimental caging technique

Cage placement was carried out in June 2009, in an important northern France harbour (Boulogne sur Mer) (Fig. 1). This harbour is impacted by municipal and industrial discharges, fishing and shipping activities, and marinas. Two locations were chosen: station A, in front of the harbour (depth 5 - 10 m according to tide) and station B, in the inner part of the harbour (depth 4 m). Previous data have shown that sediments from station A contain relatively low levels of metals and PAHs whereas those from station B are significantly more contaminated with metals and PAHs. The distance between the two stations was about 2.5 km.

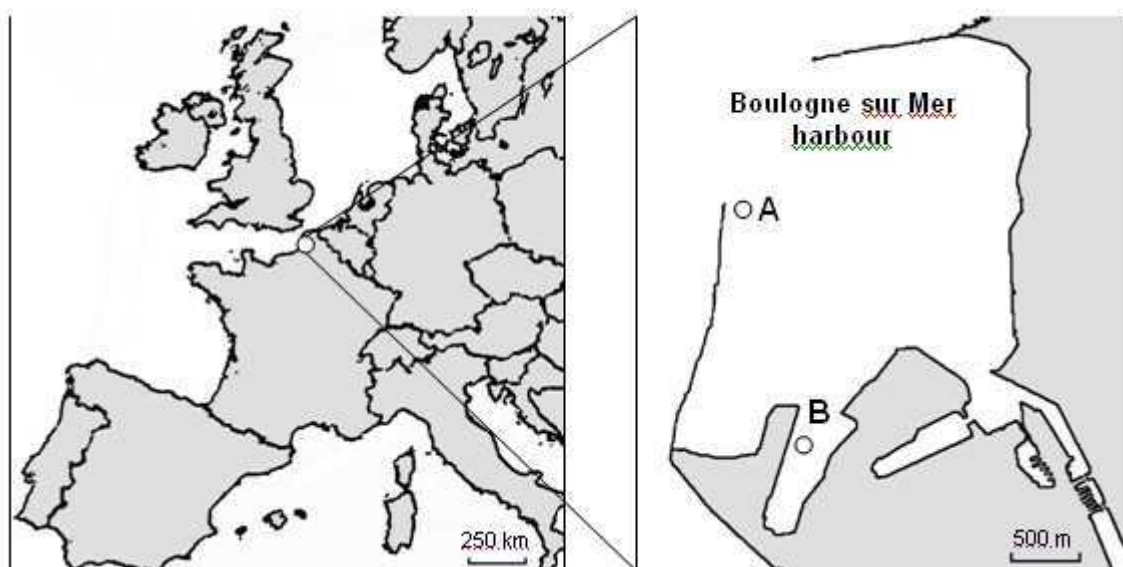


Fig. 1 (Figure 51) . Locations of the two caging stations at the harbour of Boulogne sur Mer, France.

48 juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*), (Weight: 2.84 ± 0.79 g; Age: 4 months) and 48 juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*), (Weight: 4.62 ± 0.72 g; Age: 3 months) were obtained from hatcheries (Aquanord and France Turbot, in France). Before the caging procedure, the fish were acclimatised for 2 weeks in a clean tank (2.7 m^3), supplied with an open seawater circuit. The water was aerated with air pumps, and the photoperiod was set at a 10 h light and 14 h dark cycle. During the acclimation, water temperature was about 13 ± 1 °C and the fish were progressively fed with artemia and pieces of shrimps and mussels to acclimate them to natural prey consumption. One day before the caging experiment, they were anaesthetised (2-phenoxyethanol), weighed (near to 0.01 g), measured for total length (near to 0.1 mm) and individually marked (Visual Implant Tag, 1.2 mm x 2.7 mm, Northwest Marine Technology). For each species, fifteen fish were sampled before the beginning of the experiment to establish t_0 values, used as reference. Cylindrical cages (0.7 m height, 0.65 m diameter, 230 L volume), made from polypropylene mesh (10 mm) were used for the sea bass. Rectangular cages (0.3 m height, 0.6 m width, 0.9 length, 160 L volume) were chosen for the turbot, benthic fish, in order to increase the surface area in contact with the sediment. At each station, the two types of cage were immersed with fish randomly placed and then fixed to the bottom with a screw anchor by scuba-divers. Precisely, 15 sea bass and 17 turbot were placed in station A, and 18 sea bass and 16 turbot, in station B (initially, 18 fish of each species were provided in each cage, but some fish escaped when they were put in the cages due to bad weather conditions). Sea water physicochemical parameters (temperature, salinity, oxygen and pH) were measured, and bottom sediment sampled for chemical contaminant analysis. Following the 38-days exposure, all the fish were rapidly transferred to the laboratory (within 2 h), anaesthetised (2-phenoxyethanol), identified (tag), weighed and measured for total length. Livers were sampled, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Muscles were sampled and preserved at -20 °C and otoliths (sagittae) extracted and preserved in ethanol (95%).

2.2. Sediment analysis

Sediment samples were collected near to each cage location using a Van Veen grab (250 cm^2 sampling area) in order to determine metals, PAHs and PCBs contents.

In order to determine selected metals (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, and Zn) in the total fractions, sediments were dried at 40 °C to constant weight and were ground into a powder. About

0.250 g ground sediments were digested with HF (Suprapur, Merck) at 110 °C for 48 h followed by a mixture of concentrated acids HCl:HNO₃ (3:1, v:v, Suprapur Merck) at 120 °C for 24 h, operation renewed once. Each heavy metal was measured by inductively coupled plasma–atomic emission spectrometry (ICP–AES, VARIAN Vista Pro, axial view).

Total Hg was measured in dry and ground sediment samples (without any pre–treatment) by means of atomic absorption spectroscopy (AAS) using an AMA 254 solid phase Hg–Analyser (Altec Ltd., Prague, Czech Republic) (Ouddane et al., 2008).

The persistent organic pollutants, including PAHs (EPA's 16 priority PAHs) and PCBs (7 congeners) were analysed. In brief, organic compounds were extracted from 2 g of dried sediment by microwave (120 °C for 15 min, 1200 W) assisted extraction with 40 mL of a mixture of acetone and hexane (1:1, v:v). Simultaneous determination of PAHs and PCBs was performed on a gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS, VARIAN, CP 3800 – 1200 MS TQ). A ZB–MultiResidue column (30 m, 0.25 mm, 0.25 µm) were used (Phenomenex). Identification of PAH compounds and PCB congeners was based on the comparison of their GC–retention times and their mass spectrum, with appropriate individual standards.

2.3. Biochemical biomarkers analysis

Livers were homogenised in an ice-cold phosphate buffer (0.1 M, pH 7.8) with 20% glycerol and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride as a serine protease inhibitor. The homogenates were centrifuged at 10,000 g at 4 °C, for 15 min and the post-mitochondrial fractions were used for biochemical assays. Total protein concentrations were determined using the method of Bradford (1976) with bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Chemicals, France) as a standard.

Ethoxyresorufin-O-deethylase activity (EROD) was determined following the hydroxylation of 7-ethoxyresorufin by the method of Flammarion et al. (1998). The reaction mixture consisted of a phosphate buffer (0.1 M, pH 6.5), 7-ethoxyresorufin (8 µM) and NADPH (0.5 mM). The change in fluorescence was recorded (excitation wavelength 530 nm, emission wavelength 585 nm) and enzyme activity calculated as pmol.min⁻¹.mg⁻¹ protein using a Resorufin standard.

Glutathione S-transferase activity (GST) was determined following the conjugation of reduced glutathione with CDNB by the method of Habig et al. (1974). The reaction mixture consisted of a phosphate buffer (0.1 M, pH 6.5), reduced glutathione (1 mM) and CDNB (1

mM). The change in absorbance was recorded at 340 nm and enzyme activity calculated as $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein using GST standard.

Catalase activity (CAT) activity was determined by the method of Babo and Vasseur (1992). In brief, the assay mixture consisted of a phosphate buffer (100 mM pH 6.5) and H_2O_2 (28 mM). Change in absorbance was recorded at 240 nm. CAT activity was calculated in terms of $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein, using bovine erythrocyte Catalase as standard.

2.4. Physiological parameters

2.4.1. Growth index

Sea bass and turbot specific growth rates in weight (% per day) were estimated as :

$$\text{GW} = 100(\ln W_2 - \ln W_1)/(t_2 - t_1),$$

where (W_1) and (W_2) are fish total body weight at times (t_1) (beginning of the experiment) and t_2 (time of collection). Similarly, the specific growth rate in length was estimated as :

$$\text{GL} = 100(\ln L_2 - \ln L_1)/(t_2 - t_1),$$

where (L_1) and (L_2) are fish total length at times (t_1) and (t_2) respectively.

The recent growth index (RG) was determined by measuring the width of the peripheral daily increments of the otoliths from the previous 5 days before the end of the experiment. Sagittae were removed, cleaned and mounted on a glass slide in thermoplastic cement (Crystal Bond). Sections of sagittae were obtained by polishing them in both side with grinding paper of decreasing grit sizes (5 to 0.1 μm) until increments at the outer edge were visible. Otoliths were etched for 30 sec with 0.1 M EDTA and analysed under transmitted light, using a video system fitted to a compound microscope (TNPC 5.0, NOESIS) (Amara et al., 2009).

2.4.2. Condition Indices

We estimated three condition indices for the fish caged in the two stations and in the fish sacrificed at the beginning of the experiment (t_0): RNA:DNA ratio and TAG:ST ratio as indicators of nutritional status and Fulton's K condition index as an indicator of the fishes general well being. We calculated Fulton's K condition index with the formula :

$$K = 100(W/L^3),$$

where (W) is the body mass (mg) and (L) is the total length (mm).

The procedure used to determine RNA and DNA concentrations in individual fish was based on the Clemmesen method (1988), slightly modified as described by Amara et al.

(2009). The quantity of RNA and DNA was determined by the fluorescence–photometric technique using a specific nucleic acid fluorescent dye–ethidium bromide.

The amount of total lipids in each individual was measured on a sample of lyophilised muscle (0.07 g). Lipid extraction was conducted using the method of Bligh and Dyer (1959), slightly modified as described by Amara et al. (2007). TAGs and sterols were separated from other lipids by performing thin layer chromatography (TLC).

2.5. Statistical analysis

Statistics were performed with Xlstat 2007. Mean comparisons of biomarker responses between t_0 and fish caged in station A and B were analysed using one-way ANOVA, followed by post-hoc Tukey tests. As biochemical and physiological biomarkers were analysed on the same fish, a Pearson product moment correlation matrix was computed using data from all the individuals collected from both stations, to examine the statistic links between parameters. A principal component analysis (PCA) was used to evaluate the relationships between the chemical sediment contaminants and fish biological responses.

3. Results

3.1. Environmental parameters

At the beginning of the experiment, bottom temperature (station A : 14.6°C ; station B : 14.9°C), salinity (station A : 34.1 PSU; station B : 33.5 PSU) and oxygen contents (station A : 7.86 mg.L⁻¹ ; station B : 7.04 mg.L⁻¹) were similar in the two caging stations. The studied area temperature had increased during June and July; the temperature was 18°C in both stations at the end of the caging exposure, which was also the highest temperature during the caging experiment.

The results of metal concentrations expressed as mg. kg⁻¹ of dry sediment are reported for each station in Fig. 2, PAHs and PCBs concentrations in Table 1. Sediment samples indicated different levels of contamination in metallic and organic compounds. As expected, all metal concentrations analysed in sediment collected from station A, located in front of the harbour, were lower than station B and no PAHs were detected. A way to assess sediment toxicity is the use of contamination sediment quality guidelines. Long et al. (1995) identified two guideline values: the effects range–low (ERL) and the effects range–median (ERM).

Concentrations above the ERL, represent a possible-effects range within effects that would occasionally occur. The concentrations above the ERM values represent a probable-effects range within which effects would frequently occur. In our study, all chemical contaminants detected in station A were found to be lower than the toxic effect range ERL. Sediment from station B exhibited concentrations in Cd, Hg and Zn higher than ERL and lower than ERM. The PAHs concentrations stayed below the guideline values and no PCBs was detected at any station ($< 0.01 \text{ mg.kg}^{-1}$).

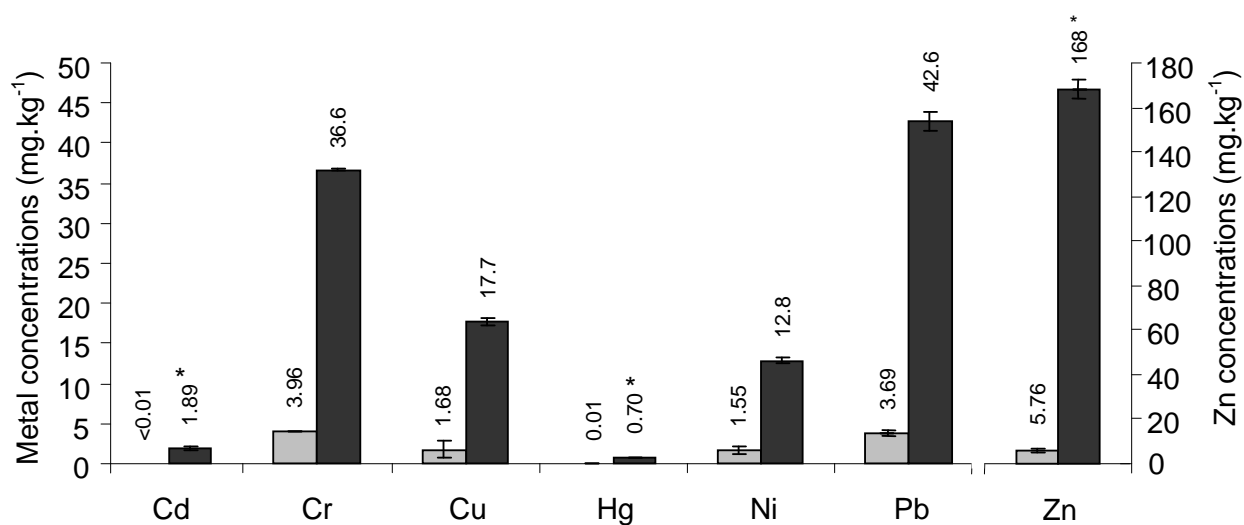


Fig. 2 (Figure 52) : Mean (\pm SD) sediment metal concentrations (mg.kg^{-1} dry weight) in the two caging stations (\square A and \blacksquare B). * Concentration that exceeds the ERL (effects range-low) defined by Long et al. (1995).

Table 1 (Tableau 21) : Mean (\pm SD) PAH and PCB concentrations (mg.kg^{-1} dry weight) in sediment from the two caging stations (A and B).

	A	B
PAHs		
Naphtalene	<0.05	<0.05
Acenaphtylene	<0.05	<0.05
Acenaphtene	<0.05	<0.05
Fluorene	<0.05	<0.05
Dibenzo(a,h)anthracene	<0.05	<0.05
Phenanthrene	<0.05	0.09 ± 0.05
Anthracene	<0.05	<0.05
Fluoranthene	<0.05	0.10 ± 0.05
Pyrene	<0.05	0.08 ± 0.05
Benzo(a)anthracene	<0.05	<0.05
Chrysene	<0.05	0.06 ± 0.05
Benzo(b)fluoranthene	<0.05	0.08 ± 0.05
Benzo(k)fluoranthene	<0.05	<0.05
Benzo(a)pyrene	<0.05	0.05 ± 0.05
Benzo(ghi)perylene	<0.05	<0.05
Indeno(123-cd)pyrene	<0.05	<0.05
Total PAHs		0.46 ± 0.07
PCBs		
Total PCBs (congeners 28 – 52 – 101 – 118 – 138 – 153 – 180)	<0.01	<0.01

3.2. Biochemical biomarkers

Because the cages were slightly damaged at station A, only 77% of the fish could be sampled (93% for sea bass and 59% for turbot). At station B, 94% of the fish were collected (100% for sea bass and 88% for turbot). No skeletal fish were found in any of the cages, or in the fish gut, from station A or B; we assumed that some fish had escaped when the cage was raised to the surface under difficult meteorological conditions. Therefore, the mortality rate was not assessed in the present study.

Several hepatic biomarkers were analysed, linked to biotransformation of xenobiotics (EROD and GST) and protection against oxidative stress (Catalase) (Fig. 3). Values of EROD activities were found lower in that of sea bass liver compared to turbot. Indeed, EROD activity measured in sea bass sacrificed at the beginning of the experiment (t_0) was below the detection limit, whereas some activities were detected in turbot ($0.95 \pm 0.22 \text{ pmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ of protein). For both species, a significant induction of EROD activities was observed in those

fish caged in the two stations compared to t_0 . This induction was significantly higher in fish from station B (sea bass : $0.90 \pm 0.53 \text{ pmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ protein; turbot : $2.88 \pm 0.62 \text{ pmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ protein) compared to station A (sea bass : $0.40 \pm 0.30 \text{ pmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ protein; turbot : $1.59 \pm 0.38 \text{ pmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ protein) (Anova, $p < 0.001$).

Values of Catalase activities were found to be about ten times higher in turbot liver compared to sea bass. For CAT activities measured in fish caged in station A, a significant induction was observed in both species (sea bass : $1.40 \pm 1.36 \text{ } \mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ protein; turbot : $28.6 \pm 7.2 \text{ } \mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ protein) compared to t_0 (sea bass : $1.03 \pm 0.22 \text{ } \mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ protein; turbot : $23.1 \pm 4.4 \text{ } \mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ protein) (Anova, $p < 0.001$). On the contrary, a significant decrease of CAT activities were measured in sea bass caged in station B ($0.54 \pm 0.18 \text{ } \mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ protein) compared to station A (Anova, $p < 0.001$). CAT activities were also lower in turbot from station B ($23.1 \pm 0.35 \text{ } \mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ protein) compared to station A, but the differences were not significant (Anova, $p = 0.149$).

For both species, no difference was observed in GST activities between those fish measured from t_0 and those caged in station A. However, GST activities were found significantly higher in fish caged in station B (sea bass : $0.62 \pm 0.20 \text{ } \mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ protein; turbot : $0.62 \pm 0.14 \text{ } \mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ protein) compared to reference station (A) (sea bass : $0.34 \pm 0.16 \text{ } \mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ protein; turbot: $0.44 \pm 0.11 \text{ } \mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ protein) (Anova, $p < 0.05$).

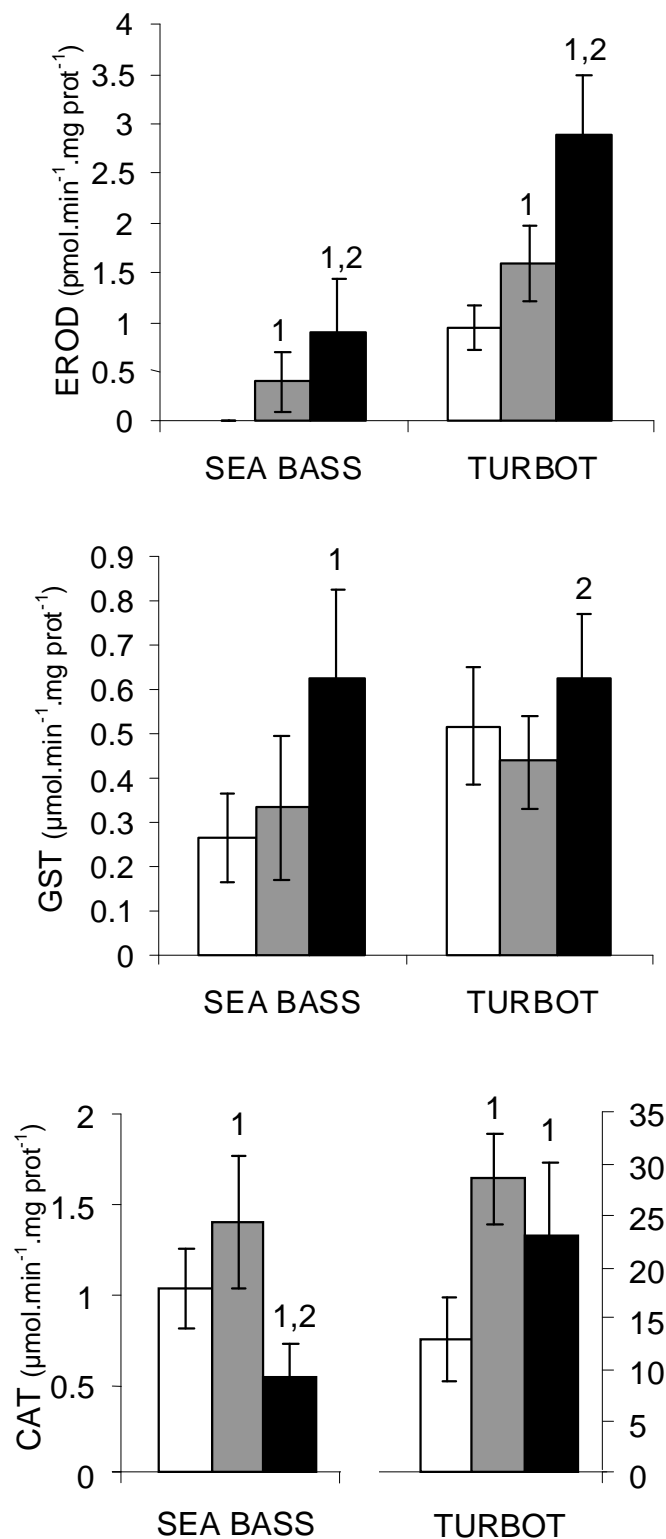


Fig. 3 (Figure 53) : Differences in Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), Glutathione S-transferase (GST) and Catalase (CAT) activities of juvenile sea bass and turbot caged in station \blacksquare A and \blacksquare B (\square t₀ : reference). Data represent mean (\pm SD) biochemical biomarkers activities and for each species, (1) represent significant difference (p<0.05) compared to “t₀” and (2) compared to “station A”. Sea bass : n = 15 (t₀), n = 14 (A), n = 18 (B); Turbot : n = 15 (t₀), n = 10 (A), n = 14 (B).

3.3. Relationships with physiological biomarkers

Sea bass caged in station B presented a significant decrease of both specific growth rates, recent growth, Fulton's K condition index, RNA:DNA and TAG:ST ratios, compared to the reference station. For turbot, among all physiological parameters analysed, only the specific growth rates in weight, the Fulton's K condition and the TAG:ST ratio were significantly lower in station B compared to the reference station (Kerambrun et al., submitted for publication). It should be noted that comparisons of growth and condition indices between the two stations were not the purpose of this study. Consequently, in this paper we have focused only on their relationships with biomarker activities.

The relationships between biomarker activities, biological parameters and sediment chemical contaminants were analysed with a PCA (Fig. 4).

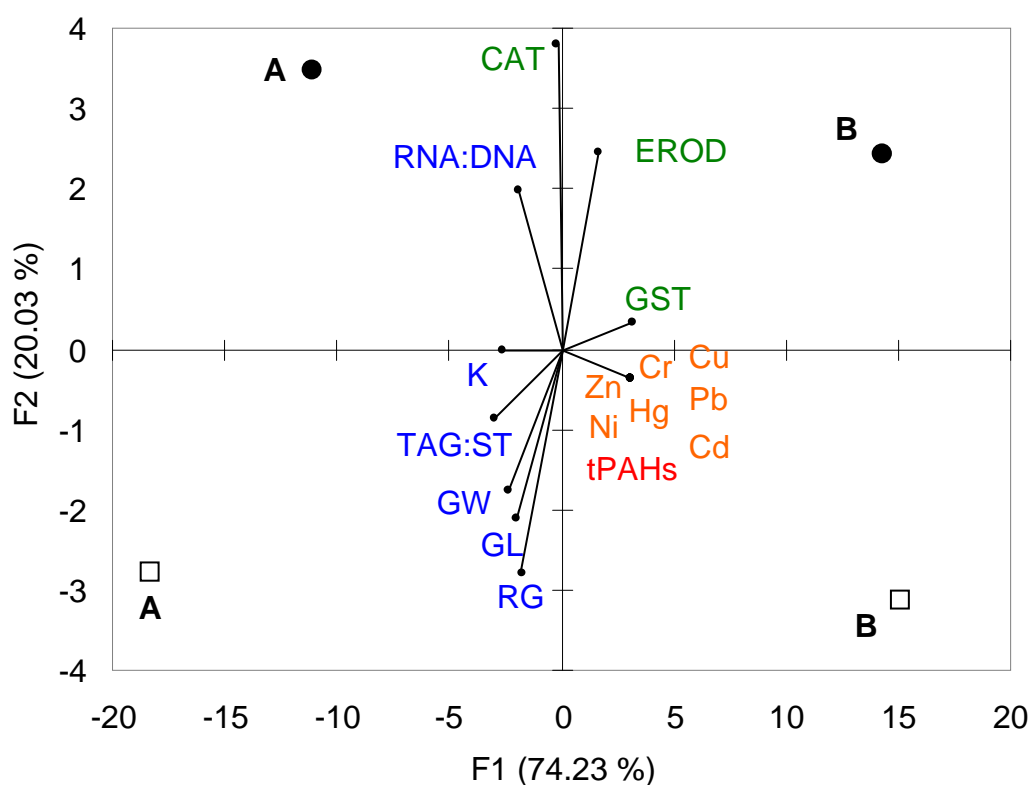


Fig. 4 (Figure 54): PCA based on biomarker responses (Ethoxyresorufin-O-deethylase -EROD-, Glutathione S-transferase -GST- and Catalase -CAT) of juvenile sea bass (□) and turbot (●) in relation with physiological biomarkers (specific growth rate in length -GL- and weight -GW-, recent growth -RG-, Fulton's condition index -K-, RNA:DNA and Triacylglycerol on sterol -TAG:ST- ratios) and chemical contamination (metals and total PAHs) measured in caging station A and B.

The two first axes of the PCA explained 94.26 % of the global inertia in the data with mean explanations for the first axis (74.23 %). The first axis ordines the stations along a pollution gradient, which appears to be positively correlated with GST activities. On the contrary, the PCA suggests a negative correlation between the contamination gradient and most of the physiological biomarkers. EROD and Catalase activities appear to be more associated with the second axis which seems to differentiate sea bass and turbot among the values of parameters. Among the different biological indicators, the RNA:DNA ratio appears to be the most related with biomarkers activities.

Correlations between biomarkers and physiological parameters (growth and condition indices) were more precisely analysed for each species (Table 2). For each species, by using the data from all individuals collected from the two stations, a Pearson correlation matrix was computed to test the existence of significant links between biochemical and physiological parameters, and to evaluate the strength of these relationships. For sea bass, biochemical biomarkers were well related to physiological biomarkers. CAT activities were significantly and positively correlated with all growth and condition indices. For EROD and GST activities, most correlations were found to be significant and negatively correlated with physiological biomarkers. Among the 12 correlations analysed on sea bass, only 3 were not significant: GST activities with a TAG:ST ratio and EROD with the recent growth (RG) and the Fulton's K index. For turbot, biochemical biomarker activities were slightly related to growth and condition indices, with only significant correlation between EROD activities, the Fulton's K index and the lipid index (TAG:ST), and CAT activities with the lipid index.

Table 2 (Tableau 22) : Pearson's correlations between biomarker responses (EROD, GST, CAT) and biological parameters (specific growth rate in length (GL) and weight (GW), recent growth (RG), Fulton's condition index (K), RNA:DNA and TAG:ST ratios) measured in juvenile sea bass (a) and turbot (b) caged in stations A and B. Significant correlation for $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$ and $p^{***} < 0.001$.

	GW	GL	RG	K	R:D	TAG:ST	EROD	GST
EROD	-0.41*	-0.49*	-0.25	-0.22	-0.43*	-0.45*	-	
GST	-0.57**	-0.56***	-0.42*	-0.53**	-0.48*	-0.37	0.40*	-
CAT	0.74***	0.70***	0.50**	0.60***	0.47*	0.63***	-0.30	-0.59***

a.

	GW	GL	RG	K	R/D	TAG:ST	EROD	GST
EROD	-0.45	-0.04	0.34	-0.46*	0.04	-0.47*	-	
GST	-0.06	0.15	0.15	-0.14	0.19	-0.24	0.27	-
CAT	0.01	-0.20	0.01	0.33	0.08	0.62**	-0.50*	-0.25

b

4. Discussion

4.1. Biochemical biomarkers responses

Fish, display close physiological relationships to their environment as ectothermic organisms, and as such, are sensitive to environmental disruptions and in particular to chemical stress. As a consequence many authors have begun measuring fish cellular detoxification or defence mechanisms that occur in response to exposure select environmental xenobiotics (Van der Oost, 2003). The first aim of this study was to analyse the response of three biochemical biomarkers in two marine fish species caged in a harbour polluted area. EROD activities measured in sea bass and turbot were in the same range of values than those measured on the same species by Teles et al. (2004) and Camus et al. (1997) respectively. Ahmad et al. (2009) also found comparable values of GST activities for sea bass, but no reference value of GST activities was found for turbot. These two biotransformation parameters (EROD phase I and GST phase II) activities were found to be higher in sea bass and turbot, caged in the inner part of the harbour, compared to the station located in front of it. Such induction of EROD and GST activity was also recorded in Stien et al. (1998) in sea bass caged in a Mediterranean France harbour and for carp (*Cyprinus carpio*) caged in a Netherlander polluted site (Van der Oost et al., 1998). EROD and GST are known to be induced by several organic contaminants such as PAHs and PCBs (Deville et al., 2005; Castro et al., 2004 ; Fragoso et al., 2006). As higher levels of PAHs were detected in station B compared to station A, the increase of these biotransformation enzymes could be explained by these organic compounds. However, other organic compounds not measured in this study such as dioxin could have enhanced these enzymes. Indeed, an EROD induction was observed in juvenile sea bream, *Sparus aurata*, exposed to a dioxin mixture (Abalos et al., 2008).

Complementary to these two biotransformation parameters, the catalase was measured to analyse the antioxidant status of juvenile fish. Catalase is an important enzyme in antioxidant defence system protecting animals from oxidative stress. Induction of biotransformation metabolism produces highly reactive oxygen species (ROS) as by-products leading to oxidative stress (Jifa et al., 2006). In this way, the antioxidant defence system may be induced in cells as response to ROS. In our study, a decrease of catalase activities was observed for both juvenile sea bass and turbot, even though the decrease was not significant for turbot. This inhibition was also observed in sea bass exposed to cadmium (Romeo et al., 2000) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) exposed to copper (Sampaio et al., 2008). Palace et al.

(1992) estimated that possible mechanisms by which metal produces lower catalase activity, may include direct metal-mediated structural alteration of the enzyme and depression of catalase synthesis. This phenomenon, could explain the decrease of catalase activities which occurred in our study, since sediment from station B showed concentrations of Cd, Hg and Zn higher than ERL guidelines.

In complex chemical mixtures, such as those found in the polluted sediments of the studied harbour, any biomarkers regulation was likely to be the net result of additive, synergistic or antagonistic chemical interactions. Indeed, while many studies have shown the induction of biotransformation enzymes by organics compounds, several studies have shown an inhibition of EROD activities by metals. EROD decrease was observed for sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Viarengo et al., 1997) and leaping mullet, *Liza saliens* (Bozcaarmutlu and Arinç, 2004) following metal exposure. This inhibition was explained by binding of metal ions to the sulfhydryl group of the enzymes or generation of reactive oxygen species (ROS) (Bozcaarmutlu & Arinç, 2004). On the other side, recent studies have shown in vivo GST induction in zebra fish, *Brachydanio rerio*, exposed to heavy metals (Paris-Palacios et al., 2000) and a positive correlation was found between copper and GST induction in grey gold mullet, *Liza aurata* (Pereira et al., 2009). In the same way, various responses of CAT activity have been observed in fish exposed to organic or metallic contaminants in both field and laboratory experiments. Indeed, CAT has been shown to be either induced or inhibited by metals depending on the dose, the species or the route of exposure (Romeo et al., 2000; Sanchez et al., 2005).

4.2. Comparison between biochemical and physiological biomarkers

In the last years, the use of biochemical biomarker in fish has been enhanced by increased information about influencing factors (Kammann et al., 2004). However, the relationships between molecular responses and effects at higher levels of biological organisation have not been examined in great detail. In the second part of this study, we have compared the biochemical biomarkers with several growth and condition indices measured from the same fish. Examination of individual fish growth and condition is one method that has been successfully used to compare habitat quality among different juvenile nursery areas (e.g. Sogard, 1992; Meng et al., 2000, Gilliers et al, 2006, Searcy et al., 2007; Amara et al., 2007). The use of growth and condition as indices of habitat quality is based on the assumption that larger, faster-growing fish are healthier and hence experience more favourable environmental

conditions than smaller, slower-growing fish. In a previous study, we analysed the relationships between chemical contamination and biological performance of juvenile marine fish using the caging method (Kerambrun et al., submitted for publication). We found a general decrease in growth and condition indices of juvenile fish caged in the contaminated station (B).

4.2.1. Sea bass

The results of comparison of parameter's means between the two stations, show that the inductions of EROD and GST, and the decrease of CAT activities found on sea bass caged in station B, are related to a significant decrease of both specific growth rates, recent growth, Fulton's K condition index, RNA:DNA and TAG:ST ratios. Using multiple correlations performed with the data from all the fish collected from both stations, no significant correlation was observed between EROD activities and the otolith's recent growth, or the Fulton's K index. This latter morphometric index is commonly used as indicators for an individual's general well-being, which represents a more longer-term indicator compared to some biochemical indices like RNA:DNA ratio (Vasconcelos et al., 2009). Indeed, Ferron (2000) suggested that morphological indicators have lower sensitivity, longer latency and slower dynamics than nucleic acids and lipids which respond on a shorter scale. The same results were obtained for juvenile sole exposed for 15-days to copper (Fonseca et al., 2009). Biochemical biomarkers response represents short-term responses to contaminant and so they would be less related to longer-term physiological biomarkers. However, GST activities were significantly correlated with recent growth and the Fulton's condition index suggesting the potential higher relevance of this biotransformation enzyme than EROD.

High levels of both EROD and GST activities were significantly correlated with reductions of the somatic growth rates, RNA:DNA ratios and lipid index of sea bass caged in the contaminated station. This relation suggests that there are metabolic costs associated with the synthesis of these proteins or with detoxification processes (Rose et al., 2006). Indeed, as growth is an integration of many processes (Morales-Nin et al., 2007), such changes in fish metabolism could result, at a higher level, to growth impairments. Previous studies have analysed biochemical biomarkers and growth measurement relationships. Cao et al. (2010) reported that after cadmium exposure, the decrease in the growth of juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), was related to inhibition of CAT and GST activities. The growth reduction of the greenback flounder (*Rombosolea tapirina*) exposed to contaminated sediment was also related to an induction of EROD activities (Mondon et al., 2001). On the

contrary, in Abalos et al. (2008), the increase of EROD and GST activities in juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*) was not related to growth which showed no difference between dioxin-exposed and non-exposed fish.

The decrease of catalase activities measured in sea bass was associated with a decrease of all physiological biomarkers. Indeed, catalase activities showed the strongest correlations with growth and condition indices compared to the two biotransformation parameters measured. Bagnyukova et al. (2005) showed that a catalase inhibition in goldfish (*Carassius auratus*) was associated with lipid oxidative damage products due to an oxidative stress from the absence of cell protection by this antioxidant enzyme. They also showed that the response to catalase depletion involves compensatory changes in the activities of other antioxidant enzymes. This change in cell metabolism in response to the decrease of catalase activities could have played a role in the decrease of sea bass physiological status observed in station B.

4.2.2. Turbot

Despite high levels of biotransformation parameters found in turbot caged in station B, no difference in growth in length and RNA:DNA ratios was observed. These low responses of turbot growth parameters have been explained in our previous results by the non optimal environmental parameters for juvenile turbot growth (sediment grain size, turbidity and feeding behaviour) as well as for reference station (A). Cages are a valuable tool for comparing the relative growth of small juvenile fish in different habitats but are also known to have certain limitations (Able et al., 1999; Phelan et al., 2000; Oikari, 2006). Cages confine fish to a small space, preventing movements to surrounding areas i.e. for food searching. The analysis of stomach of the two species indicated no food limitation as also observed in other caging studies (Sogard, 1992; Kamermans et al., 1995). Energetic studies have shown that the metabolic rates of flatfish can increase significantly when they are forced to bury in sediments with suboptimal grain sizes, or do not have access to sediments at all (Howell and Canario, 1987). The non optimal grain size of the sediment, or the fact that the cage infrastructure may have limited the turbot burying, could explain the decrease of turbot condition in station A even if the sediment was slightly contaminated. Consequently, among the different physiological parameters analysed in turbot, only the specific growth rate in weight, the Fulton's K condition index and the lipid index could be related with the significant EROD and GST induction. In particular, using multiple correlations performed with the data from all fish collected in both stations, the TAG:ST ratios were the ones significantly correlated with both EROD and CAT activities. Lipid depletion has been identified as a general metabolic

response to stress (Claireaux et al., 2004). TAGs are the principal reserve of energy in teleosts and the first components to be mobilised during periods of stress (Galois et al., 1990). Hakanson (1989) reported that TAGs were used preferentially for short-term energy need. Their decrease could be the direct consequence of the xenobiotic detoxification and regulation which involve both passive and active mechanisms and therefore require energy (Alquezar et al., 2006). Previous studies have reported similar depletion in lipid reserves of fish subjected to metal trace exposure (Rowe, 2003; Fonseca et al., 2009).

Since turbot growth appears to have been influenced by other environmental factors with additional chemical contaminant effects, the relationships between biochemical biomarkers and growth parameters could not be established for this species. These differences in behaviour between a demersal fish like the sea bass and a benthic fish like the turbot, could explain the variations observed in our study to fish responses to chemical contamination. These results show the importance in the choice of the fish species suitable for caging studies in order to minimise physiological stress in caged fish. Because of species specific differences in behaviour, feeding activities and physiological processes, fish biomarker responses and physiological parameters sensitivity, must be analysed carefully.

Conclusions

This multibiomarker approach allowed us to assess different levels of fish responses to chemical contamination. This study was a first approach of simultaneous comparison of both biochemical and physiological biomarkers in a caging study. For individual sea bass, biochemical biomarkers, growth and condition indices such as the Fulton's K condition index, the RNA:DNA ratio and the lipid storage index, showed numerous significant correlations. Conversely, there were only a few significant correlations for turbot, suggesting a species-specific response. However, even if biochemical biomarkers responses and fitness are a direct measure of an individual fish's stress and health, they are not specific to fish stress responses to pollutants, as several other biotic and abiotic stressors can affect them. Environmental conditions must be considered when one is integrating both biochemical and physiological biomarkers responses with pollution stress. This can explain the species-specific response we observed.

Although based on the comparison of only two stations, our data support the use of caged juvenile sea bass as sentinel species due to some original ecological features of this species (*e.g.* large distribution, eurythermal and euryhaline species). We found that the combined use

of several biochemical biomarkers and physiological responses such as growth and condition indices can improve fish health determination, and may provide a useful tool to monitor and assess habitat quality for juvenile fishes.

Acknowledgements

This work was supported by post Grenelle programme 189, DEVIL and the Franco-British INTERREG IVA European Programme, DIESE. We would like to thank Michel LAREAL for making the cages, and Gregory GERMAIN and François GEVAERT for their help during their placement at sea. We thank Peter MAGEE for revision of the English grammar and syntax (www.anglais.webs.com).

Partie 3 : Exposition de juvéniles de turbot à des sédiments portuaires et estuariens en condition de laboratoire

Une étude complémentaire à l'expérience précédente a été réalisée en condition contrôlée afin de comparer les réponses des deux techniques d'étude et ainsi pouvoir évaluer le rôle des facteurs environnementaux sur les réponses des paramètres étudiés. De par son mode de vie benthique, le turbot a été retenu comme modèle d'exposition à du sédiment. De plus, les résultats de l'expérience de caging sous-entendent que ce sont bien les turbots qui ont été les plus sensibles à l'influence des facteurs environnementaux. Les juvéniles de turbot ont ainsi été exposés pendant 21 jours à du sédiment prélevé dans les mêmes stations que pour l'expérience de caging. En complément, deux lots d'individus ont été exposés à du sédiment prélevé dans l'estuaire de la Seine afin de resituer les niveaux de contamination portuaires à ceux observés dans un estuaire productif impacté par les activités humaines. L'ensemble des paramètres physiologiques étudiés étant sensible à l'état nutritionnel du poisson, une expérience a été réalisée en parallèle en privant les turbots de nourriture afin de disposer de valeurs correspondant à un état de stress sévère.

Comme pour l'expérience de caging, nous avons choisi de présenter les résultats sous la forme de deux articles complémentaires. Le premier s'intéresse plus particulièrement aux relations entre indices de croissance et de condition avec la contamination chimique dans le sédiment, la biodisponibilité en métaux, les concentrations en métaux dans les branchies des poissons et les métabolites biliaires des HAPs. Le second article se focalise sur les réponses des trois biomarqueurs moléculaires (EROD, GST, CAT) mais également sur des paramètres immunologiques mesurés sur les poissons dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire d'Ecotoxicologie – Milieux Aquatiques (LEMA) de l'université du Havre. Les réponses des biomarqueurs moléculaires et immunitaires ont ensuite été comparées avec celles des indices de croissance et de condition précédemment mesurés sur les mêmes individus.

3.1. Croissance et indices de condition de juvéniles de turbot, *Scophthalmus maximus*, exposés à des sédiments contaminés : effets de composés métalliques et organiques

Résumé

Les bioessais de toxicité sédimentaire représentent des outils indispensables afin de tester la toxicité et la biodisponibilité des contaminants chimiques dans les sédiments. Les tests de toxicité qui impliquent des mesures subléthales peuvent fournir des informations pertinentes quant aux effets néfastes des composés associés au sédiment. Parmi les différents niveaux de réponses analysés, peu d'études se sont intéressées aux réponses physiologiques des poissons en raison de leur manque de spécificité vis-à-vis des polluants. Pour autant, l'utilisation d'indices de croissance et de condition peut être opportune dans la possibilité d'intégrer les différents stress imposés par les contaminants sur les organismes. En effet, les contaminants chimiques peuvent entraîner un changement d'allocation d'énergie qui serait davantage allouée dans la défense contre les polluants au détriment des processus de nutrition et de croissance. Le principal objectif de cette étude était d'utiliser certains biomarqueurs physiologiques afin d'analyser les effets des contaminants chimiques présents dans les sédiments sur l'état de santé des juvéniles de poisson. Des juvéniles de turbot ont ainsi été exposés pendant 21 jours en condition de laboratoire à du sédiment prélevé dans trois stations du port de Boulogne sur Mer (A, B et C), les mêmes que lors de l'expérience de caging, mais également à du sédiment estuarien de la Seine. Les réponses d'indices de croissance et de condition ont été évaluées en fonction du degré de contamination en métaux, HAPs et PCBs observés dans les sédiments, des métaux mesurés dans les branchies et l'estimation des métabolites d'HAPs dans leur bile.

La bonne condition des turbots dans le traitement de référence a pu être validée par la similitude obtenue des indices de condition entre ceux mesurés au début de l'expérience et ceux exposés au sédiment de référence non contaminé. D'autre part, la comparaison avec des turbots de même taille prélevés dans l'estuaire de la Canche, estuaire relativement propre et représentant une importante zone de nurserie, témoigne de la qualité de la condition de référence. Une augmentation des concentrations en As, Co, Pb et V a été observée dans les branchies des juvéniles exposés aux sédiments les plus contaminés avec de plus fortes différences pour les deux stations les plus internes du port. De même, une augmentation significative des teneurs en métabolites biliaires d'HAPs a été effective sur les turbots

exposés aux sédiments B et C et au sédiment de la Seine. Une concentration plus élevée en métabolites biliaires d'HAPs a été mesurée sur les poissons exposés au sédiment C, présentant les plus fortes teneurs en HAPs. Cette augmentation des teneurs en métaux et HAPs à la fois dans les sédiments et les organismes a pu être reliée à une diminution des performances physiologiques des individus exposés. Les diminutions des taux de croissance somatique, de l'indice de condition de Fulton et du rapport TAG/ST ont été significatives chez les turbots exposés aux quatre sédiments contaminés. De plus, une diminution significative de la croissance récente et du rapport ARN/ADN a été observée chez les individus exposés au sédiment C, témoignant de la toxicité plus élevée de ce sédiment. Cette diminution des performances physiologiques des poissons en relation avec les concentrations en métaux et HAPs peut être interprétée comme une réponse globale des changements métaboliques induit par ces contaminants chimiques. D'un autre côté, une légère tendance d'une diminution de consommation de la nourriture dans les bacs les plus contaminés peut être soupçonnée. En effet, certains auteurs ont pu démontrer une diminution des activités alimentaires en présence de contaminants (Stephens *et al.*, 2000; Saborido-Rey *et al.*, 2007). De ce fait, les réponses diminuées de croissance et de condition des turbots représentent probablement une combinaison des effets des contaminants sur le statut énergétique des organismes associés à leurs activités d'alimentation. La similarité des indices de croissance et de condition entre les turbots exposés au sédiment le plus interne du port (C) et ceux laissés à jeun pendant les 21 jours d'exposition au sédiment de référence témoigne de la sévérité du stress chimique induit par ce sédiment.

De telles réductions de croissance des juvéniles représentent un risque en situation naturelle, puisqu'une modification de croissance peut prolonger la durée de cette période juvénile. Des poissons avec des croissances diminuées seront plus susceptibles à la prédation et moins compétitifs pour se nourrir vis-à-vis de poissons plus grands. De plus, les effets observés au niveau nutritionnel entraînerait une faible capacité des organismes à endurer des conditions environnementales difficiles comme les maladies ou le jeune pendant l'hiver. Ces résultats suggèrent ainsi que la diminution observée de la performance physiologique des organismes dans des milieux contaminés pourrait dramatiquement diminuer leur capacité à survivre pendant la période hivernale. De plus, les valeurs plus faibles des indices de croissance et de condition chez les turbots engagés dans la station B par rapport à ceux exposés en laboratoire à ce même sédiment, suggèrent des effets additionnels de facteurs biotiques et/ou abiotiques à ceux des contaminants sur les réponses biologiques des organismes en situation environnementale.

Growth and condition indices of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, exposed to contaminated sediments: effects of metallic and organic compounds.

Kerambrun E.^{123*}, F. Henry¹²³, P. Perrichon⁴, L. Courcot¹²³, T. Meziane⁵, N. Spilmont¹³⁶⁷ and R. Amara¹²³

¹ Univ Lille Nord de France

² ULCO, LOG, F-62930 Wimereux, France

³ CNRS, UMR 8187, F-62930 Wimereux, France

⁴ IFREMER, F-17137 L'Houmeau, France

⁵ UMR-CNRS 5178, Biologie des Organismes Marins et Ecosystèmes Département Milieux et Peuplements Aquatiques, MNHN, 75231 Paris, France

⁶ USTL, LOG, F-62930 Wimereux, France.

⁷ Environmental Futures Centre, Griffith university, Gold Coast Campus, QLD 4222, Australia

* Corresponding author: Elodie Kerambrun
elodie.kerambrun@univ-littoral.fr

1. Introduction

Contamination of sediment in coastal areas, caused by multiple anthropogenic activities, is considered a major environmental concern for marine ecosystems. Although emissions into water and the atmosphere have been reduced, because of environmental regulations and the ban on the production and use of some substances (e.g., PCBs, DDT, some polybrominated diphenyl ethers), sediment now serves as a source of many contaminants (EPA, 2002; Van Geest et al., 2010). Indeed, sediments have the potential to form associations with several classes of anthropogenic pollutants, and may not only function as sinks for chemical contaminants, but also as sources of such pollutants through resuspension of particulate matter (Viguri et al., 2007; Otte et al., 2008). In particular, hydrophobic organic compounds and metals are two important groups of contaminants whose chemical constitution makes them prone to adsorption by particles. Although exposure to environmentally relevant concentrations of these contaminants may not be acutely lethal, they have the potential to induce sublethal effects in a variety of marine organisms (Van der Geest et al, 2010). In this context, toxicology methods have been developed to monitor the effects of sediment-associated pollutants on organisms, population and communities (Luoma and Ho, 1992). Sediment toxicity bioassays are instruments of increasing importance for scientists to test the toxicity and bioavailability of chemical compounds in sediments to organisms. Indeed, one

method for exposing aquatic organisms to contaminated sediment is to place the organisms with sediment layered on the bottom. It appears to be of great importance to select the appropriate type of test organisms, as well as the appropriate life stage, and the relevant sublethal measurements, based on the route of exposure to be assessed.

For several reasons, fish species have attracted considerable interest in studies assessing biological and biochemical responses to environmental contaminants (Amara et al., 2009). Benthic and epibenthic fish are the most heavily exposed to contaminants originating in sediments, and may integrate several routes of exposure by accumulating contaminants dissolved in water (through gills and skin) and through the ingestion of food and sediment. Moreover, fish often resuspend sediment, increasing the availability of contaminants. In particular, flatfish appear good model species to examine the effects of contaminated sediment. Following metamorphosis, flatfish display a predominantly benthic life style and maintain an intimate contact with sediments, where they seek shelter, waylay their prey (Aarnio et al., 1996), and therefore are likely to be exposed to sediment-associated contaminants. Among the different flatfish species, turbot could represent an appropriate study species, as it lives in shallow coastal areas likely to be impacted by nearshore activities. This species is reared in aquaculture and its biology and physiology are well known. It has also a rapid growth, particularly during its juvenile stage, and is able to change its physiology with easily detectable external stressors. Hatchery production of turbot has led to an increased availability of individuals with known exposure history, which is an essential element in any toxicological study (Boisson et al., 1998).

Toxicity tests that involve sublethal measurements have been shown to be sensitive and provide relevant information about the adverse effects associated with chemical contaminants (Jiménez-Tenerio et al., 2007). Among the different levels of responses analysed, physiological responses to chemical contaminants have often been ignored by ecotoxicologists, because they are regarded as being too generalized and too difficult to measure routinely (Depledge et al., 1995). However, evidence is now emerging that there may be some advantages in identifying integrated responses to the sum of the stresses imposed by pollutants and natural environmental factors. Moreover, few laboratory studies have examined the toxicity of contaminated sediment on early life stages, despite evidence that juveniles are more sensitive to contaminants than adults are. Juvenile fish physiological biomarkers, as growth or lipid storage, may provide the key to integrating various molecular and cellular responses in an organism with impaired fitness (Amara et al., 2007); these processes must be functional for juvenile fish to survive and so contribute to the population's renewability

(Depledge et al., 1995). Indeed, a commonly observed sublethal response of organisms exposed to chemical contaminants chronically is a change in their energy allocation (Rowe, 2001). In such a way, maintenance costs associated with combating chemical toxicants would be expected to ultimately reduce growth, and so a general decrease in juvenile fish condition.

The main objective of this study was to use some fish physiological biomarkers to analyse the potential adverse effects of contaminated sediments. Juvenile turbot was exposed in laboratory conditions to different contaminated sediments from a highly industrialised harbour (Boulogne-sur-Mer) and from an anthropogenic French estuary, the Seine. Several fish growth and condition indices were analysed according to the sediment chemical contamination, the metal concentrations in gills and the estimation of PAH metabolites in their bile. We used growth rates (somatic and estimated from otolith microstructure), RNA:DNA ratios, morphometric (Fulton's K condition index), and lipid (triacylglycerols:sterols ratio, TAG:ST) condition indices to estimate the health status of turbot related to the level of chemical contamination in sediments.

2. Material and Methods

This experiment was conducted in accordance with European Commission recommendation 2007/526/EC, on revised guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes. The University of Littoral Côte d'Opale is authorised to conduct experimentation on animals in its capacity as a certified establishment; according to the administrative order N° B62-160-2.

2.1. Sediment collection

Sediments were collected from different sites located along the French coast of the Eastern English Channel at the same time in February 2010. These sediments were sampled from three stations in a harbour in northern France (Boulogne-sur-Mer: BSM); from an anthropogenic French estuary (the Seine) and from a reference site (Fig. 1). The BSM harbour is an intensively developed and industrialised harbour impacted on by municipal and industrial discharges, fishing and shipping activities, and marinas. The sediment was collected using a Van Veen grab (250 cm² sampling area) in three different locations in the harbour: station A in the front, and stations B and C in the inner part. Estuarine inter-tidal sediment was collected at low tide from the north bank of the Seine estuary. The Seine basin currently

accounts for 25% of French agriculture, 25 to 30% of French industrial activity and 23% of the French population. The last sample was taken at low tide from Wimereux beach, used as the reference site. For each of these five locations, about 12 L of sediment were collected and put into polyethylene bags. Sediments were not sieved; however, large sediment particles and organic debris were removed. About 10 L were stored at 4°C until the experimental assay and 2 L were frozen at -20°C for sediment analyses. Sediment exposure was initiated approximately two weeks after sediment collection.

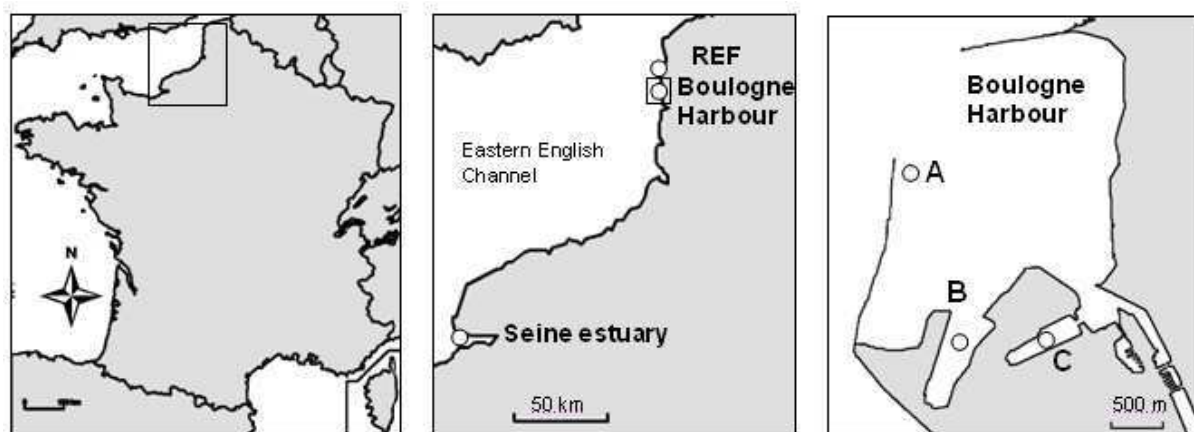


Fig. 1 (Figure 55) : Locations of the three sediment sampling sites (Reference, the Seine estuary and harbour of Boulogne sur Mer) and the three stations in the harbour (A, B and C).

2.2. Sediment exposure conditions

Four month old turbot, *Scophthalmus maximus*, (weight : 6.83 ± 0.72 g) were obtained from a hatchery (France Turbot) and acclimatised in two clean tanks (160 L) in semi-static conditions for two weeks. The water was aerated with air pumps and the photoperiod was set at a 10 h light and 14 h dark cycle. During acclimation, the water temperature was 14.3 ± 0.8 °C, and the fish were fed with a commercial fish food once a day. The daily feeding amount was maintained at approximately 1% of the total fish weight. Before the beginning of the experiment, each fish was anaesthetised in a $200 \mu\text{L.L}^{-1}$ 2-phenoxyethanol solution, weighed (0.01 g accuracy), measured for total length (1 mm accuracy) and individually marked (Visual Implant Tag, 1.2 mm x 2.7 mm, Northwest Marine Technology).

The experimental 21-day assay consisted of a static water system of 37 L capacity glass tanks, in which 5 L of sediment and 25 L of clean seawater were allocated. The assay was performed in duplicate for the five different sediments, thus ten tanks were used. Sediments were homogenised and allowed to settle 48 h before the beginning of the assay. The

conditions of treatment remained the same as those ones applied during the period of acclimation. Fifteen tagged fish were randomly distributed in each tank (30 per treatment) and fed with a commercial fish food once a day. In order to maintain an acceptable quality of overlying water, a daily water change (1/3 of total water volume) was performed, and water parameters (temperature, salinity, pH, oxygen and turbidity) were monitored every day before the water renewal.

Fifteen fish were sampled before exposure to the sediment to establish t_0 (the background level of the different biological parameters) and after 7 and 21 days of exposure. Another group of fifteen fish (7-8 per duplicate tank) was sampled per treatment group and anaesthetised with 2-phenoxyethanol. The turbot was identified (tagged), weighed and measured. Their bile was sampled, frozen in liquid nitrogen and preserved at -80°C . Their gills and muscles were sampled and stored at -20°C and their otoliths (sagittae) were extracted and preserved in ethanol (95%).

2.3. Additional starvation assay

Complementary to the contaminated sediment exposure, a starvation assay was undertaken to analyse the responses of physiological biomarkers under severe stress. Two 37 L glass tanks were used in which 5 L of the reference sediment were allocated. A number of 24 tagged turbot was distributed in each duplicate tank. Experimental conditions were strictly identical to the sediment exposure assay, but these fish were not fed during the experiment. Twelve fish (6 per duplicate tank) were sampled after 2, 7, 10 and 21 days. The fish were anaesthetised, weighed and measured. Muscles and otoliths were sampled as previously.

2.4. Sediment analysis

Sediment samples were analysed to determine granulometry, organic matter contents, metals, PAHs and PCBs contents.

The grain size distribution was analysed using a laser Beckman–Coulter LS 230. A classification was established using the proportion of clay ($< 4 \mu\text{m}$), fine silt ($4 - 20 \mu\text{m}$), coarse silt ($20 - 50 \mu\text{m}$), fine sand ($50 - 200 \mu\text{m}$), medium sand ($200 - 500 \mu\text{m}$) and coarse sand ($500 - 2000 \mu\text{m}$).

For the measurement of total organic matter (TOM, $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), the sediment samples were dried at 60 °C for 24 h and subsequently baked at 450 °C for 5 h (Luczak et al., 1997). The total organic carbon (TOC) and total organic nitrogen (TON) contents were determined using a CHNS analyser (NA-2100, CE instruments).

In order to determine selected metals (Al, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, V and Zn) in the total and bioavailable fractions, the sediments were dried in a oven at 40 °C to constant weight and then ground into powder. For the determination of total metals, about 0.250 g of ground sediment were digested with HF (Suprapur, Merck) at 110 °C for 48 h followed by a mixture of concentrated acids HCl:HNO₃ (3:1, v:v, Suprapur Merck) at 120 °C for 24 h. This operation was repeated once. Metals associated with the reactive fractions of sediment, considered as bioavailable fractions, were estimated using the method of Huerta-Díaz and Morse (1990). The reactive fraction shows values comparable to the sum of the first three reactive fractions in the Tessier extraction scheme (Tessier et al., 1979). The reactive fraction, such as metals extracted by HCl 1 M, comprises of metal exchangeable and linked to carbonates, partially to oxy-hydroxides of Fe-Mn, and to acid volatile sulfides (AVS). About 0.5 g of sediment was leached during 24 h with 20 mL of 1 M HCl (Suprapur, Merck). The total and extractable heavy metals were measured by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES, VARIAN Vista Pro, axial view). For quality assurance, reagents blanks, sample replicates and standard reference materials (MESS-3 and PACS-2, National Research Council Canada) were used to assess the accuracy and precision of the analyses. In all cases, the recovery efficiency was better than 85% for the total digestion of standard reference materials.

The extent of sediment contamination was assessed using the enrichment factor (EF) (Salomons and Forstner, 1984; Windom et al., 1989). Commonly, normalization of the metals to a conservative element such as Al is employed as an index (EF) to evaluate anthropogenic influences to the sediments. The EF is defined as $EF = (X/Al)_{\text{sample}} / (X/Al)_{\text{background}}$, where $(X/Al)_{\text{sample}}$ is the metal to Al ratio in the sample of interest and $(X/Al)_{\text{background}}$ is the same ratio in the upper crustal material (Taylor and Mc Lennan, 1995). According to previous studies (Birth, 2003; Han et al., 2006), $EF < 2$ indicates sediment uncontaminated by metals (crustal origin), $2 < EF < 10$, moderately contaminated, $EF > 10$ significantly contaminated (non-crustal source).

The persistent organic pollutants, including PAHs (EPA's 16 priority PAHs) and PCBs (7 congeners: 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) were analysed. Briefly, organic compounds were extracted from 2 g of dried sediment by a microwave oven (120 °C for 15 min, 1200 W),

assisted with a 40 mL mixture of acetone and hexane (1:1, v:v). The solvent was evaporated under a stream of nitrogen in a TurboVap, and then concentrated to 1 mL of hexane. Simultaneous determination of PAHs and PCBs was performed on a gas chromatography–mass spectrometer (GC–MS, VARIAN, CP 3800 – 1200 MS TQ). A ZB–MultiResidue column (30 m, 0.25 mm, 0.25 μ m) was used (Phenomenex). Identification of PAH compounds and PCB congeners was based on the comparison of their GC–retention times and their mass spectrum, with appropriate individual standards.

A way to assess sediment toxicity is the use of contamination sediment quality guidelines. Long et al., (1995) identified two guideline values: the effects range–low (ERL) and the effects range–median (ERM). Concentrations above the ERL, represent a possible–effects range within effects would occasionally occur. The concentrations above the ERM values represent a probable–effects range within which effects would frequently occur. In the present study, chemical contaminant contents in sediments were analysed according to these guidelines.

2.5. Biological analysis

2.5.1. PAH metabolites in bile

Bile samples were diluted 1:3000 times in 95% ethanol and, fixed wavelength fluorescence (FF) was measured at the excitation/emission wavelengths 343/383nm and 380/430. By FF_{343/383} and FF_{380/430} mainly pyrene and benzo(a)pyrene type metabolites are detected (Aas and Klungsoyr, 1997). The two fluorescence intensities were summed up and the relative PAH metabolite detection was expressed as an arbitrary unit of fluorescence.

2.5.2. Growth index

Turbot specific growth rates in weight (% per day) were estimated as :

$$GW = 100(\ln W_2 - \ln W_1)/(t_2 - t_1),$$

where (W_1) and (W_2) are fish total body weight at times (t_1) (beginning of the experiment) and t_2 (time of collection). Similarly, the specific growth rate in length was estimated as :

$$GL = 100(\ln L_2 - \ln L_1)/(t_2 - t_1),$$

where (L_1) and (L_2) are fish total length at times (t_1) and (t_2) respectively.

The recent growth index (RG) was determined by measuring the width of the peripheral daily increments of the otoliths. We used the width of the daily otolith increments from the previous 5 days before the end of the experiment as an indicator of recent growth (mean distance between the margin of the otolith back to the 5th ring). Sagittae were cleaned and photographed to determine the diameter, the perimeter and the area of each otolith. Then, they were mounted on a glass slide in thermoplastic cement (Crystal Bond). Sections of sagittae were obtained by polishing them on both sides with grinding paper of decreasing grit sizes (5 to 0.1 μm) until increments at the outer edge were visible. Otoliths were etched for 30 sec with 0.1 M EDTA and analysed under transmitted light, using a video system fitted to a compound microscope. All the measurements were done along the same axis (anteroposterior) using an Image Analysis System (TNPC, 5.0, NEOSIS). The increment measurement was repeated three times by the same reader at different interval of time and the mean was calculated.

2.5.3. Condition Indices

We estimated three health indices in turbot exposed to sediments at t_7 and t_{21} and in the fish sacrificed at the beginning of the experiment (t_0): RNA:DNA ratio and TAG:ST ratio as indicators of nutritional status, and Fulton's K condition index as an indicator of the general well being of the fish. This latter morphometric index assumes that heavier fish, for a given length, are in better condition. We calculated Fulton's K condition index with the formula : $K = 100(W/L^3)$, where (W) is the body mass (mg) and (L) is the total length (mm).

The procedure used to determine RNA and DNA concentrations in individual fish was based on the Clemmesen method (1988). Nucleic acids were measured on muscle fragments (0.05 g) by homogenizing the sample in ice-cold Tris-EDTA buffer (0.05 M Tris, 0.1 M NaCl, 0.01 M EDTA, pH 8.0) with proteinase-K (pro-K) and sodium dodecyl sulfate (SDS). Nucleic acids were extracted by purification step involving phenol:chloroform:isoamylalcohol (Amara et al., 2009). The quantity of RNA and DNA was determined by the fluorescence-photometric technique, using a specific nucleic acid fluorescent dye-ethidium bromide (Sigma-Aldrich Chemicals, France) (Amara et al., 2009).

The third health index was a lipid storage index based on the ratio of the quantity of triacylglycerols (TAG; reserve lipids) to the quantity of sterols (ST; structural lipids) in the fish. The amount of total lipids in each individual was measured on a sample of lyophilised muscle (0.07 g). Lipid extraction was conducted using the method of Bligh and Dyer (1959)

slightly modified as described by Amara et al. (2007). Lipids were extracted using a mixture of water:chloroform:methanol (1:1:1, v/v/v). TAGs and sterols were separated from other lipids by performing thin layer chromatography (TLC).

2.5.4. Metal analysis in gills

Because of the low quantity of juvenile fish gills for metal analysis, due to the small size of the juveniles, the gills of five fish were pooled and thus three samples of gills were analysed for each condition. The gills were rinsed with Milli-Q water, mixed and lyophilised for analysis of metal concentrations. Samples were digested with HNO₃ (65%, Suprapur Merck) at an ambient temperature for 24 h, and then at 100 °C for 4 h. Metal concentrations were determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS; VARIAN 820). Standard curves were used to determine both Mn and Zn, whereas a standard addition technique was applied for the resolution of matrix effects to calculate As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Se & V. International certified standard (DORM-3, NRC Canada) was used to control the accuracy of the analytical procedure.

2.6. Statistical analysis

Statistics were performed with XLSTAT 2007. Comparison of biological parameters between the five exposure conditions were analysed with one-way ANOVA, followed by post-hoc Tukey tests. If biological data did not comply with the parametric assumption of normality (Shapiro-Wilk tests) and homogeneity of variance (Levene tests) after various transformation techniques were tested, the non-parametric Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U test for post hoc pairwise comparisons were used. These non-parametric tests were also used to analyse differences in metal bioaccumulation in gills. Using data from all the individuals collected, a Pearson product moment correlation matrix was computed to test the strength of the relationships between the variables measured. A principal component analysis (PCA) was performed with data means for each condition to evaluate the contributions of chemical and physiological biomarkers in the explanation of variations between exposure conditions.

3. Results

3.1. Environmental parameters

No mortality was observed in any of the exposure tanks. Temperature, salinity, pH and oxygen levels were constant and similar in the different exposure tanks throughout the experimental assay. Sediment grain size distribution was different between the reference sediment, which was sandy, whereas, harbour and estuarine sediments were mainly composed of mud (Table 1). The turbidity was low in reference tanks (6.14 ± 3.74 NTU), varying from 214 ± 96 NTU in the A sediment tanks, to 398 ± 124 NTU in the Seine sediment tanks. This difference of turbidity could be related to the physical properties of the sediment. TOM, TOC and TON were also lower in the reference sediment, compared to the other sediments. These three organic compounds increased from A to C harbour sediments, and the Seine estuary sediment showed values similar to the A sediment.

No measurable PCB congeners were detected above 0.01 mg.kg^{-1} in any of the sediments tested. As expected, the reference sediment was the least concentrated in both metal and PAHs compounds (Table 1). Among the three harbour sediments, the A sediment located in front of the harbour, presented the lowest concentrations in metals, (which were however three times higher than in reference sediment), with no PAHs being detected. The B and C sediments showed different levels of contamination among metals. The B sediment showed the highest levels of Cd, Mn, and Pb, which were approximately 16, 33 and 12 times higher than reference sediment, respectively. In contrast, Cu and Zn were more abundant in the C sediment, with concentrations respectively 140 and 43 times higher than those measured in the reference site were. All metal concentrations were higher in the Seine sediment compared to the A sediment, but they remained lower than the two other harbour sediments, except for the chromium concentration, which was of the same order of magnitude. EF values confirm that a moderate contamination ($EF > 2$) is present in the inner harbour area for Cu, Mn, Pb and Zn and the difference of metal contamination between B and C sediments (Table 2). High ratios ($EF > 10$) were found for Cd for Seine and harbour sediments.

Concerning organic compounds, higher total PAH concentrations were found in the C sediment ($2.44 \pm 0.95 \text{ mg.kg}^{-1}$) compared to the B one ($1.27 \pm 0.50 \text{ mg.kg}^{-1}$). The total PAH concentration measured in the Seine sediment ($1.63 \pm 0.64 \text{ mg.kg}^{-1}$) was between those measured in the B and the C sediments. Among the different aromatic compounds detected in this sediment, PAHs with intermediate-high molecular weight were dominant.

Table 1 (Tableau 23) : Mean (\pm SD) abiotic parameters, sediment metal, PAHs and PCBs concentrations (mg.kg^{-1} dry weight) in the five sediments (Ref, Seine, A, B and C).

TOM, TOC, TON: Total Organic Matter, Carbon or Nitrogen concentrations. ERL and ERM guidelines values defined by Long et al. (1995) are also presented. (¹) Concentration that exceeds the ERL

	Concentrations in sediment					ERL	ERM
	REF	Seine	A	B	C		
Turbidity (NTU)	6.14 \pm 3.74	398 \pm 124	214 \pm 96	391 \pm 196	216 \pm 77		
TOM (mg.g^{-1})	2.41 \pm 0.04	57.7 \pm 1.0	41.8 \pm 0.7	116 \pm 2	155 \pm 3		
TOC (mg.g^{-1})	1.89 \pm 0.11	15.3 \pm 0.9	9.42 \pm 0.55	27.2 \pm 1.6	43.9 \pm 2.6		
TON (mg.g^{-1})	0	2.38 \pm 0.05	1.34 \pm 0.03	4.68 \pm 0.11	3.95 \pm 0.09		
Mud (%)	0	83.8 \pm 6.2	83.2 \pm 6.0	91 \pm 1.8	90.2 \pm 2.1		
Sand (%)	100 \pm 2.61	16.2 \pm 3.5	16.8 \pm 4.3	9.04 \pm 1.4	9.8 \pm 1.9		
Metals							
Cd	<0.1	0.62 \pm 0.11	0.26 \pm 0.03	1.61 \pm 0.10 ¹	0.97 \pm 0.02	1.20	9.60
Cr	4.98 \pm 0.23	40.3 \pm 1.4	15.5 \pm 0.7	37.3 \pm 0.3	41.1 \pm 1.0	81	370
Cu	0.67 \pm 0.02	15.5 \pm 0.1	3.73 \pm 0.09	16.9 \pm 0.1	94.1 \pm 1.8 ¹	34	270
Mn	52.1 \pm 1.15	396 \pm 7	124 \pm 1	1758 \pm 17	543 \pm 12		
Ni	1.36 \pm 0.06	10.3 \pm 0.3	4.55 \pm 0.13	12.5 \pm 0.2	14.6 \pm 0.3	20.9	51.6
Pb	3.56 \pm 0.04	23.4 \pm 0.5	7.51 \pm 0.02	42.6 \pm 0.4	32.8 \pm 0.9	46.7	218
V	4.72 \pm 0.1	36.0 \pm 0.7	17.8 \pm 0.2	52.7 \pm 3.8	66.4 \pm 1.6		
Zn	6.39 \pm 0.34	73.9 \pm 2.8	22.8 \pm 0.5	161 \pm 2 ¹	273 \pm 19 ¹	150	410
Al	9810 \pm 370	26700 \pm 200	14170 \pm 160	29240 \pm 600	32050 \pm 1200		
PAHs							
Naphtalene	<0.05	0.07 \pm 0.03	<0.05	<0.05	0.05 \pm 0.02	0.16	2.10
Acenaphtylene	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.04	0.64
Acenaphtene	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.02	0.50
Fluorene	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.02	0.54
Phenanthrene	<0.05	0.12 \pm 0.02	<0.05	0.10 \pm 0.01	0.13 \pm 0.02	0.24	1.50
Anthracene	<0.05	0.07 \pm 0.02	<0.05	<0.05	0.13 \pm 0.04 ¹	0.09	1.10
Fluoranthene	<0.05	0.20 \pm 0.04	<0.05	0.17 \pm 0.03	0.22 \pm 0.04	0.60	5.10
Pyrene	<0.05	0.17 \pm 0.03	<0.05	0.12 \pm 0.02	0.25 \pm 0.04	0.67	2.60
Benzo(a)anthracene	<0.05	0.14 \pm 0.01	<0.05	0.12 \pm 0.01	0.19 \pm 0.02	0.26	1.60
Chrysene	<0.05	0.16 \pm 0.03	<0.05	0.13 \pm 0.03	0.46 \pm 0.09 ¹	0.38	2.80
Benzo(b)fluoranthene	<0.05	0.22 \pm 0.10	<0.05	0.16 \pm 0.8	0.31 \pm 0.15		
Benzo(k)fluoranthene	<0.05	0.07 \pm 0.01	<0.05	0.06 \pm 0.01	0.11 \pm 0.02		
Benzo(a)pyrene	<0.05	0.09 \pm 0.06	<0.05	0.09 \pm 0.06	0.12 \pm 0.09	0.43	1.60
Indeno(123-cd)pyrene	<0.05	0.15 \pm 0.02	<0.05	0.11 \pm 0.02	0.21 \pm 0.03		
Dibenzo(a,h)anthracene	<0.05	0.07 \pm 0.05 ¹	<0.05	0.12 \pm 0.09 ¹	0.12 \pm 0.09 ¹	0.06	2.60
Benzo(ghi)perylene	<0.05	0.10 \pm 0.01	<0.05	0.09 \pm 0.01	0.14 \pm 0.01		
Total PAHs		1.63 \pm 0.64		1.27 \pm 0.50	2.44 \pm 0.95		

To evaluate sediment toxicity, Table 1 also gives the levels of two contamination sediment quality guidelines for some elements. Among the five sediments, the Seine, B and C sediments presented at least one compound concentration above the ERL values.

Dibenzo(a,h)anthracene concentrations exceeded the ERL value for the three sediments, Zn in both harbour sediments, and Cu, anthracene and chrysene only in the C sediment.

The percentage results of bioavailable metals in the sediments collected in the five locations are given in Table 2. The reactive fractions of Cd, Cu and Pb were not detected in the reference sediment due to their low contents in the sediment total fraction. Differences in bioavailability among elements appeared similar among the sediments sampling: Cd, Mn and Pb showed a strong affinity with the acid-soluble fraction, which represented more than 60 %, while Cr, Ni and V remained lower than 40 %.

Table 2 (Tableau 24) : Percentage (%) of metals potentially reactive towards biota and Enrichment Factor (EF) values for the five sediments (Ref, Seine, A, B and C).

	REF	Seine	A	B	C
EF					
Cd	6	15	19	45	25
Cr	1	3	3	3	3
Cu	0	1	2	2	9
Mn	1	1	2	8	2
Ni	1	1	2	2	2
Pb	1	2	4	6	4
V	1	2	2	2	3
Zn	1	2	3	6	10
Reactive fraction (%)					
Cd	-	63	83	82	85
Cr	18	25	20	20	18
Cu	-	71	66	76	93
Mn	56	62	65	70	63
Ni	22	38	40	37	40
Pb	-	89	73	95	96
V	31	22	35	30	33
Zn	80	73	72	66	46

3.2. Metal concentrations in gills

The fish exposed for 7 days to sediment collected in the three harbour stations, presented a significant increase in Pb and V concentrations in their gills compared to t_0 (Table 3). Cobalt concentrations were also significantly higher in the gills from fish exposed to both harbour sediments compared to t_0 . No major differences in metal concentrations in the gills at t_{21} were observed compared to t_7 . A significant increase of Pb, V and Co was observed in the harbour stations. The fish exposed to the Seine sediment for 21 days, presented significantly higher levels of Co concentrations. Arsenic concentrations were significantly higher in turbot

exposed to the A and B harbour sediments, as compared to t_0 . Cd, Cr, Cu, Mn and Zn concentrations were not higher in the gills from fish exposed to contaminated sediments at either exposure times, even if they presented different levels of concentrations in the five conditions.

Table 3 (Tableau 25) : Mean (\pm SD) metal concentrations (mg.kg^{-1} dry weight) in gills of turbot exposed to the five sediments (Ref, Seine, A, B and C) during 7 days (a.) and 21 days (b.) (t_0 : reference status). $n=3$. $(^0)$, $(^1)$, $(^2)$, $(^3)$, $(^4)$, $(^5)$ represent significant difference ($p < 0.05$) compared to " t_0 ", Seine, A, B and C respectively.

Metals	Concentrations in gills (t_7)					
	t_0	REF	Seine	A	B	C
As	1.18 ± 0.04	1.24 ± 0.17	1.24 ± 0.15	1.53 ± 0.19	1.39 ± 0.11	1.37 ± 0.12
Cd	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.02
Co	0.18 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.22 ± 0.01	$0.27 \pm 0.01^{0,1,3}$	0.27 ± 0.03^0
Cr	1.26 ± 0.02	1.41 ± 0.06	1.03 ± 0.03	1.04 ± 0.35	0.99 ± 0.01	0.98 ± 0.18
Cu	3.14 ± 0.03	3.73 ± 0.75	3.05 ± 0.17	3.08 ± 0.09	3.04 ± 0.11	3.63 ± 0.21
Mn	158 ± 17	188 ± 8.6	163 ± 15	172 ± 7	193 ± 22	188 ± 3
Ni	2.86 ± 1.17	1.91 ± 0.12	1.73 ± 0.28	1.77 ± 0.08	1.78 ± 0.10	1.87 ± 0.14
Pb	0.13 ± 0.09	0.19 ± 0.02	0.25 ± 0.03	$0.64 \pm 0.04^{0,1}$	$1.02 \pm 0.20^{0,1}$	$0.61 \pm 0.12^{0,1}$
Se	3.09 ± 0.12	2.83 ± 0.23	3.35 ± 0.28	3.49 ± 0.65	3.45 ± 0.33	3.11 ± 0.33
V	0.63 ± 0.04	0.69 ± 0.01	0.75 ± 0.07	$2.03 \pm 0.05^{0,1,4}$	1.80 ± 0.17^0	1.76 ± 0.17^0
Zn	97.8 ± 8.5	101 ± 3	93.4 ± 9.8	92.9 ± 3.49	94.1 ± 6.2	98.0 ± 7.9

Metals	Concentrations in gills (t_{21})					
	t_0	REF	Seine	A	B	C
As	1.18 ± 0.04	1.29 ± 0.04	1.37 ± 0.14	1.65 ± 0.19^0	1.75 ± 0.50^0	1.18 ± 0.06
Cd	0.11 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.07 ± 0.01
Co	0.18 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.26 ± 0.01^0	0.21 ± 0.02	$0.34 \pm 0.12^{0,1}$	$0.27 \pm 0.04^{0,1}$
Cr	1.26 ± 0.02	1.16 ± 0.44	1.65 ± 0.41	1.48 ± 0.46	2.26 ± 0.92	2.30 ± 0.97
Cu	3.14 ± 0.03	3.64 ± 0.76	3.63 ± 0.47	3.12 ± 0.83	4.05 ± 1.64	3.76 ± 0.54
Mn	158 ± 17	168 ± 2	170 ± 12	161 ± 14	224 ± 91	174 ± 9
Ni	2.86 ± 1.17	1.75 ± 0.23	2.18 ± 0.27	2.11 ± 0.61	2.69 ± 1.35	1.90 ± 0.24
Pb	0.13 ± 0.09	0.16 ± 0.05	0.42 ± 0.04	0.53 ± 0.16	$1.23 \pm 0.44^{0,1}$	$0.58 \pm 0.16^{0,1}$
Se	3.09 ± 0.12	3.17 ± 0.21	3.34 ± 0.22	3.23 ± 0.55	4.01 ± 1.20	3.00 ± 0.07
V	0.63 ± 0.04	0.68 ± 0.07	0.90 ± 0.05	$1.77 \pm 0.11^{0,1}$	$2.27 \pm 0.65^{0,1}$	1.67 ± 0.19^0
Zn	97.8 ± 8.45	101 ± 6	101 ± 7	101 ± 7	124 ± 47	102 ± 16

3.3. PAHs metabolites in bile

Whereas low fluorescence was detected in the bile from the fish exposed to the reference and the A sediments at both exposure times, a significant increase in fluorescence signals was

observed for those fish exposed to the Seine, B and C sediments (Fig. 2). The turbot exposed to the sediment from the innermost station of the harbour (C), displayed significantly higher bile fluorescence signals, compared to the four other sediments.

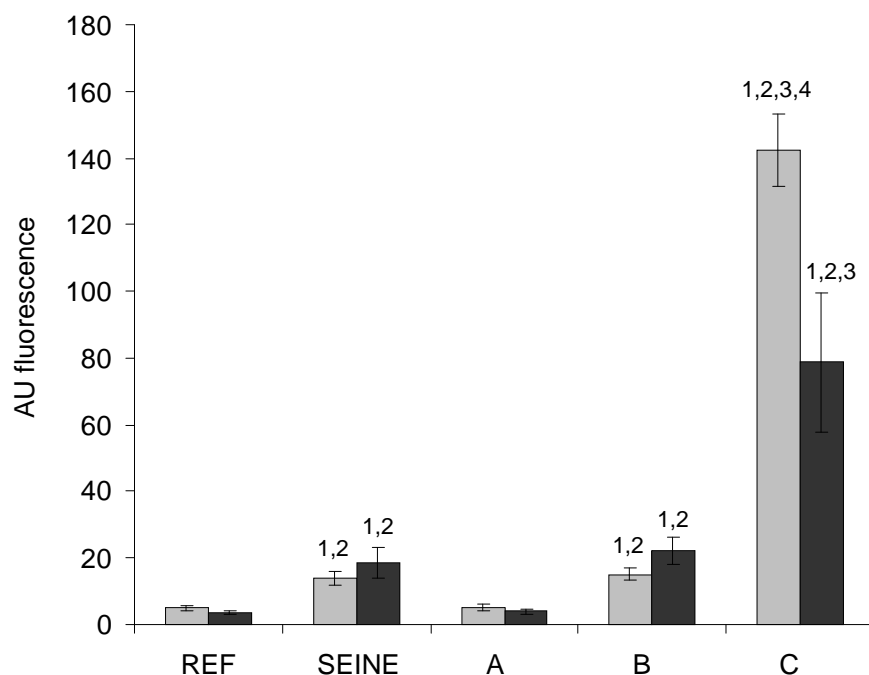


Fig. 2 (Figure 56) : Differences in relative PAH metabolites in bile from turbot exposed to the five sediments (Ref, Seine, A, B and C) during 7 (□) and 21 (■) days. Data represent mean (\pm SE) relative PAH metabolites fluorescence in bile. $n=10$. (⁰), (¹), (²), (³), (⁴), (⁵) represent significant difference ($p < 0.05$) compared to “ t_0 ”, Seine, A, B and C respectively.

3.4. Physiological biomarkers

The fish exposed to the reference sediment for 7-days showed a positive GW. Fish from the other treatments lost weight (Fig. 3). This loss of weight was significantly higher in the fish exposed to the C sediment, compared to other contaminated sediments. Similar results were observed following the 21-days exposure, but with global higher GW values compared to t_7 , and a weight gain observed in the fish exposed to the A sediment. The specific growth rate in length (GL) was significantly lower in the fish exposed to the four contaminated sediments compared to the reference sediment, following both exposure times. Those fish exposed to the C sediment had generally not grown in length and presented significantly lower GL compared to the Seine and the A sediments. No difference in turbot recent growth, estimated by the five last otolith daily increments, was observed between the fish exposed to the reference, Seine, A and B sediments. On the other hand, a decrease in recent growth was found in those fish exposed to the C sediment, which was significant compared to those exposed to the A sediment.

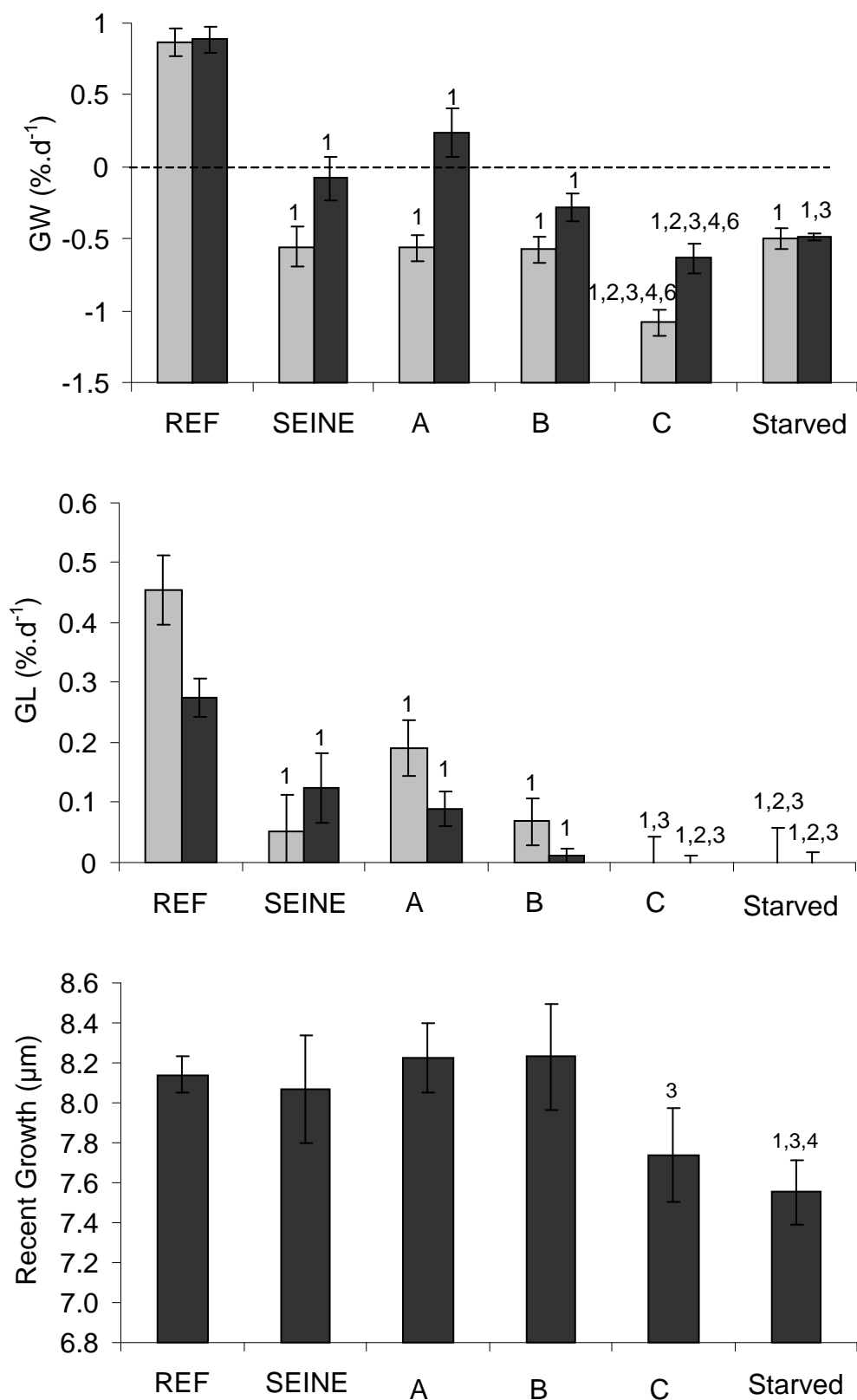


Fig. 3 (Figure 57) : Differences in the specific growth rate in weight (GW), length (GL) and the recent otolith growth (RG: obtained by the last five otolith increments) of juvenile turbot exposed to the five sediments (Ref, Seine, A, B and C) after 7 (□) and 21 (■) days (mean ± SE). n=15. (0), (1), (2), (3), (4), (5), (6) represent significant difference (p < 0.05) compared to “t₀”, Seine, A, B, C and starved fish, respectively.

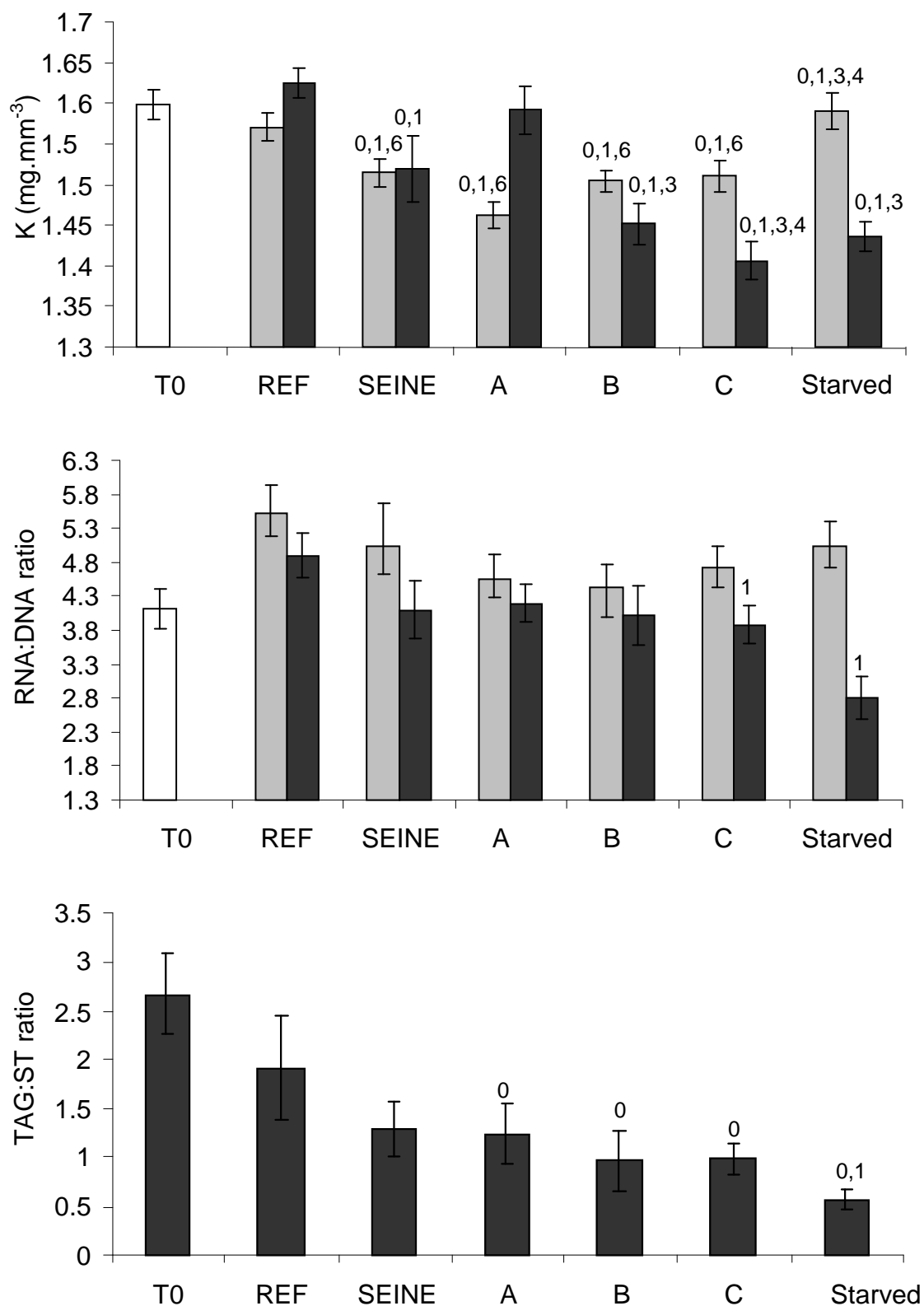


Fig. 4 (Figure 58) : Differences in the Fulton's K condition index, the RNA:DNA ratio and the lipid index (TAG:ST ratio) from turbot exposed to the five sediments (Ref, Seine, A, B and C) during 7 (□) and 21 (■) days (mean ± SE). n=15. (0), (1), (2), (3), (4), (5), (6) represent significant difference ($p < 0.05$) compared to "t₀", Seine, A, B, C and starved fish, respectively.

For both exposure times, the reference fish showed a similar K index to the t_0 fish (Fig. 4). Following 7 days exposure, the fish exposed to the Seine and the three harbour sediments had a significantly lower K index compared to the t_0 , reference. At t_{21} , the K index of fish exposed to A sediment was no longer different from the reference fish. A gradual significant decrease of the K index was observed in the t_{21} fish exposed to the Seine, B and C sediments, respectively compared to the reference fish. No significant difference in RNA:DNA ratio was observed in the fish exposed to the reference, Seine, A and B sediments. On the other hand, those fish exposed to the C sediment presented a significantly lower RNA:DNA ratio compared to the reference fish. A decrease of the TAG:ST ratio was observed in the fish exposed to the four contaminated sediments, and the decrease was significant for those fish exposed to the three harbour stations sediments, compared to t_0 fish.

3.5. Starvation effects on physiological performance

When starved, fish presented a weight loss within 2 days, and stopped growing in length after 7 days. A significant decrease in Fulton's K condition index was observed after 10 days of starvation compared to the t_0 fish (Table 4). RNA:DNA and TAG:ST ratios measured on the starved fish were significantly lower only following 21 days of starvation compared to the fed fishes.

Table 4 (Tableau 26) : Comparison of specific growth rate in length (GL) and in weight (GW), Fulton's K index, RNA:DNA ratio and TAG:ST ratio (mean \pm SE) for turbot starved at t_2 , t_7 , t_{10} and t_{21} . Reference turbot values are also presented at t_0 , t_7 and t_{21} . $n=12$. (⁰) and (¹) represent significant difference ($p < 0.05$) compared to " t_0 " and "reference" respectively.

Sample time	Condition	GL	GW	K	RNA:DNA	TAG:ST
t_0				1.60 ± 0.02	4.44 ± 0.28	2.49 ± 0.44
t_2	Fed	-	-	-	-	-
	Starved	0.19 ± 0.31	-0.33 ± 0.10	1.53 ± 0.02	3.74 ± 0.52	1.20 ± 0.42
t_7	Fed	0.46 ± 0.06	0.87 ± 0.10	1.57 ± 0.02	5.52 ± 0.43	
	Starved	0	-0.50 ± 0.07^1	1.59 ± 0.02	5.03 ± 0.36	2.22 ± 0.73
t_{10}	Fed	-	-	-	-	-
	Starved	0	-0.69 ± 0.07	1.49 ± 0.02^0	4.11 ± 0.29	2.36 ± 0.81
t_{21}	Fed	0.27 ± 0.03	0.89 ± 0.09	1.62 ± 0.02	4.90 ± 0.32	1.91 ± 0.53
	Starved	0	-0.49 ± 0.02^1	$1.44 \pm 0.02^{0,1}$	2.81 ± 0.31^1	$0.57 \pm 0.11^{0,1}$

Growth rates, recent growth and Fulton's K condition index of the fish exposed to the C sediment, presented values in the same order of magnitude as the starved fish. The significant decreases of RNA:DNA and TAG:ST observed in the fish exposed to the C sediment were slightly lower than those measured on the starved fish.

Table 5 (Tableau 27) : Pearson's correlation between growth indices (specific growth rate in length (GL) and weight (GW) and recent growth (RG)) and condition indices (Fulton's condition Index (K), RNA:DNA and TAG:ST ratios) measured in turbot exposed to the five sediments (Ref, Seine, A, B and C). n=75. Significant correlation for $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$ and $p^{***} < 0.001$.

	GW	GL	K
GL	0.68***	-	
K	0.43***	0.17	-
ARN:ADN	0.26*	0.04	0.02

A.

	GW	GL	RG	K	RNA:DNA
GL	0.71***	-			
RG	0.09	0.142	-		
K	0.84***	0.51	-0.04	-	
ARN:ADN	0.19	-0.01	-0.02	0.08	-
TAG:ST	0.25*	0.12	-0.10	0.26*	0.03

B

3.6. Relationships between physiological biomarkers

The two specific growth rates (GW and GL) were significantly correlated with each other and K indices were significantly correlated with GW (Table 5). These correlations were stronger at t_{21} compared to t_7 . On the contrary, RNA:DNA ratios were significantly correlated with GW only at t_7 . TAG:ST ratios were weakly but significantly correlated with GW and K indices.

The two first axes of the PCA allowed the explanation of 93.02% of the global inertia in the data with mean explanations for the first axis (77.69%) (Fig. 5). The first axis differentiates on its right-hand side, the five sediment exposure conditions according to the global chemical contamination, and on its left, the biological parameters. When exposure condition were projected on this axis, physiological biomarkers appeared to decrease gradually with the level of chemical contamination from the reference, A, Seine, B and C exposure conditions, respectively. No major difference in contributions was observed between variables (comprised between 3.29 % and 8.12 %). Metal and PAH contaminations were the

main factors on the second axis, which allowed us to distinguish the B and C sediments. This distinction could be explained by the highest contributions of Mn (23.1 %), Cu (13.4 %) and Cd (10.2 %).

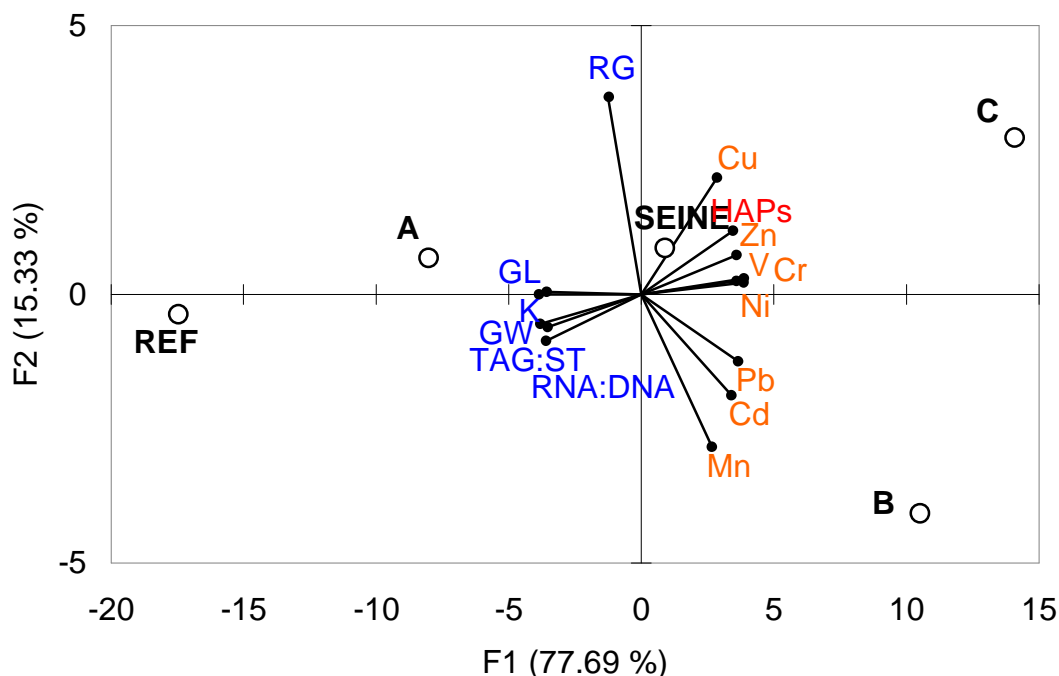


Fig. 5 (Figure 59) : PCA based on physiological biomarkers (specific growth rate in length (GL) and weight (GW), recent otolith growth (RG), Fulton's condition Index (K), RNA:DNA and TAG:ST ratios) of turbot exposed to the five sediments (Ref, Seine, A, B and C) after 21 days in relation to sediment chemical contamination (metals and total PAHs).

4. Discussion

In the present study, the effects of contaminated sediments from an important harbour in northern France, and from an estuary with human impact, the Seine, were analysed on juvenile turbot growth and condition. According to contamination sediment quality guidelines identified in Long et al. (2005), the reference sediment has good criteria of sediment quality, thus validating its reference status. On the contrary, sediments from harbour stations B, C, and the Seine estuary, corresponded to polluted marine sediments in which some metals and/or PAHs compounds exceeded the ERL (effects range-low) guidelines. The reference turbot showed a Fulton's K condition index similar to turbot of the same size (ou: of similar size) sampled in an estuary in northern France, the Canche, (data not shown); considered as a relatively clean estuary, used as a nursery ground by numerous fish (Selleslagh and Amara, 2008). This similitude of K index shows the relatively good health of fish exposed to the

reference sediment. On the contrary, the exposure of juvenile turbot to the harbour and the Seine sediments, led to a decrease of their biological performance. Indeed, turbot growth and condition indices decreased with the level of chemical contamination. As a decrease of growth and condition indices were observed in relation with the chemical contamination in sediments, a dose-dependent effect of chemical contamination on fish health appeared evident. Fish exposed to the most contaminated sediment showed growth and condition indices values similar to the starved fish. This similarity suggested the severity of the deleterious effect of such contaminated sediment on turbot health.

4.1 Sediment contaminants vs contaminants in fish

Chemical concentrations in sediment were similar to those measured in previous studies in the same harbour (Berthet et al., 2003; Amara et al., 2007) and in the Seine estuary (Cachot et al., 2006; Amara et al., 2009). The absence of detectable PCBs in all the sediment samples suggested that PCB contamination was unlikely to be a plausible factor influencing the response of turbot fish in our experiment. The high contents of metals in the harbour sediment could have been a result of the proximity of metallurgical activities. In particular, the high manganese contents could have been the consequence of the activities of a former ferromanganese factory. The metal contamination of the Seine sediment was intermediate between harbour sediments A and B. In the Seine estuary, the metallic contamination was related to the effluents from the upstream Paris urban area, and local inputs from the heavily industrialised Rouen and Le Havre regions. These comparisons of metal concentrations with the reference sediment could be influenced by the difference of granulometry and mineralogical composition since metal have a preferential affinity with muddy sediment (Förstner, 1989; Loring, 1991). However, the normalization with Al, confirms the metal contamination in those investigated areas. Bioaccumulation patterns of metals in fish tissues can be used as selective indicators of environmental metal contamination (Sultana and Rao, 1998). In particular, gills are the first organ to be in contact with water and resuspended sediment particles, so they can be relevant sites of interaction with metals (Fernandes et al., 2007). On the other hand, fish gills are able to accumulate chemicals that were taken up by other exposure routes, due to their position between the venous and arterial circulation, thus receiving nearly all of the cardiac output (Levine and Oris, 1999). It is documented that fish gills respond earlier than the kidney and liver under field contamination exposure (Ahmad et al., 2004; Santos et al., 2004). In the present study, higher concentrations of As, Co, Pb and V

were observed in turbot exposed to most contaminated sediments, with higher significant increases in turbot exposed to the two innermost sediments of the harbour. Gills have been considered as a more sensitive organ than liver response for arsenic in field tilapia (Liao, 2005), and a similarity of Pb and Co with calcium in their deposition and mobilisation from gills has been observed in previous studies in field fish (Masoud et al., 2007) and under water exposure (Richards and Playle, 1998). As and Pb, having no known role in biological systems, are toxic even in trace amounts. Conversely, vanadium is beneficial to normal cell growth (Colina et al., 2005) and cobalt acts as a co-factor for several enzymes (Richards and Playle, 1998). However, these metals could produce toxic effects at high concentrations. At higher concentrations, vanadium can become toxic to cells, inducing several injury effects on specific target organs, lipid peroxidation and changes in haematological and respiratory systems (Zychlinski et al., 1991; Byczkowski and Kulkarni, 1998). Little is known about cobalt toxicity, but water exposure of carp to Co has been shown to cause an edematous separation of the gill's secondary lamellar epithelium (Richards and Playle, 1998).

The Cu, Mn and Zn concentrations found in the turbot gills did not reflect the different levels of contamination found in the sediments, in spite of their relatively high availability. These results suggested that turbot were able to regulate tissue metal concentrations as previously reported in other species (Kraemer et al., 2005; Fernandes et al., 2007). Indeed, the concentrations of essential metals in organisms tend to be highly regulated compared to non-essential ones (Pereira et al., 2009). Consequently, essential metal concentrations in fish may not reflect environmental exposure to the same extent as those of non-essential metals (Schmitt et al., 1993). In the present study, there was no evident increase of metals in t_{21} compared to t_7 whereas several authors have observed an increase of metal concentrations in fish gills with the duration of water exposure to contaminants (Annune and Iyaniwura, 1993; Gbem, 2001). This phenomenon of time-dependence would most likely have been observed in our study if we had increased the duration of exposure.

Harbour activities and maritime traffic, have also led to the contamination of sediments in PAHs, which exhibit high toxicity in the marine environment. These carcinogenic and mutagenic compounds were found in the Seine sediment in concentrations between harbour stations B and C. Following metabolism by Phase I and Phase II detoxification enzymes, the major route of excretion of molecular weight metabolites is the bile (Van der Oost, 2003). That is why PAH metabolites detected in fish bile have been applied as a biomarker of PAH exposure (Aas et al., 1998; Ariese, 1993; Hellou and Payne, 1987; Lin et al., 1996). The results of total biliary fluorescence indicated a relation with PAH concentrations in the

sediments since the higher fluorescence was observed in turbot exposed to the C harbour sediment - the most contaminated in PAHs. Although, the biliary metabolite content did not represent an adverse biological effect by itself, these results showed the different levels of PAH exposure of turbot among the different conditions. This corroborated that biliary fluorescence was a good biomarker for PAH exposure and serves as a tool that is complementary to chemical analysis in biomonitoring programs.

4.2. Fish physiological performance

Several studies have shown that chemical contaminants inhibit growth of fish in a number of species, especially at early life stages, such as larvae and juveniles (Al-Yakoob et al., 1996). Indeed, a decrease in growth and condition has been observed in fish exposed to different contamination levels (Rowe, 2003; Alquezar et al., 2006). Differences in fish growth could represent a sum-up of the sublethal responses to chemical contaminants as growth integrates many processes (Morales-Nin *et al.*, 2007). In particular, exposure to chemical contaminants could lead to a change in energy allocation which would be used preferentially for resistance to chemical stress to the detriment of growth (Rowe, 2003).

A decrease of the RNA:DNA ratio was observed in the four contaminated conditions compared to the reference one, which confirmed the decrease of turbot growth and energetic status under chemical contamination. However, the decrease was significant only for turbot exposed to the highest contaminated sediment (C sediment). We observed the same results for the recent growth. In the present study, these two parameters were not correlated with specific growth rates in the length of juvenile turbot. Mesocosm and field studies have also revealed considerable variability in RNA:DNA and recent growth of individual fish, even when variability in size and/or age is removed (Buckley et al., 1999). The otolith daily increments are used in many studies showing short term variations in fish growth rates (Geffen et al., 1982 ; Morales-Nin and Aldebert, 1997). However, in the fish aged several months, the complex otolith structure and its irregular shape, lead to variability in its measurement, and could explain this lack of correlation. In the same way, high variability in RNA:DNA ratios was observed in the present study. The RNA:DNA ratio is an index commonly used, relating growth and nutritional condition of juvenile fish. Several studies have shown a fast response of this index to feeding and growth fluctuations in the early life stage of fish (Clemmesen, 1998; Buckley et al., 1999). However, individual nucleic acid determinations have revealed a large and unexplained inter-individual variability in the RNA content and in the RNA:DNA

ratios of fed fish reared under identical conditions (Clemmesen, 1988; Robinson and Ware, 1988; McGurk and Kusser, 1992; Ueberschar and Clemmesen, 1992; Mathers *et al.*, 1993). In the present study, a significant decrease of RNA:DNA ratios measured on the starved fish were only observed following the 21 days exposure whereas, several studies have shown a decrease in this after only few days of starvation (Buckley, 1980; Tanaka *et al.*, 2007, Bergeron *et al.*, 1994). However, many of these studies were carried out on larval fish. Fish age could have influenced the RNA:DNA variability, since this factor is known to influence this physiological biomarker. For example, a decrease of RNA concentrations has been observed with age in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Peragon *et al.*, 2001).

In the present study, a decrease of the lipid index was observed in the turbot exposed to the three harbour sediments. The TAG:ST ratio was correlated with the specific growth rates and Fulton's K condition index. This nutritional index, based on the ratio between quantities of lipid reserves (TAG) and structural lipids (ST), has been used to investigate the nutritional status of fish (Galois *et al.*, 1990; Amara *et al.*, 2000; Gilliers *et al.*, 2006). A lipid depletion has been identified as a general metabolic response to stress (Lemly and Esch, 1984; Lemly, 1997). The TAG decrease could be the direct consequence of the xenobiotic detoxification and regulation, which involves both passive and active mechanisms and therefore require energy (Alquezar *et al.*, 2006). In a mesocosm study, Claireaux *et al.* (2004) showed that the value of the TAG:ST ratio of juvenile sole, exposed for 24 h to PAHs, diminished by 75% after a 3 months period in clean sea water relative to the control fish. In the present study, the fish were fed up to 1% of their weight during exposure; a value recommended by Sprague (1969) for fish bioassay. When food was introduced, direct observations showed that the fish fed actively in all tanks. However, a slight tendency of a decrease of consumption rate with the contamination level was observed. Indeed, fish feeding could have been influenced by turbidity or chemical contamination, since exposure of organisms to pollutants could have induced alterations in their feeding behaviour or swimming activities. For instance, turbot exposed to oil have shown reduced feeding rates (Saborido-Rey *et al.*, 2007) and reduced swimming activities (Stephens *et al.*, 2000). Moreover, an increase of turbidity was observed in the four contaminated conditions compared to the reference one. In spite of the preference of turbot for high turbidity areas (Florin *et al.*, 2009), turbot are visual daylight predators (Gibson, 2005), implying that increased turbidity can reduce feeding efficiency (Moore and Moore, 1976). However, turbidity was similar in the four contaminated conditions, whereas decreases of many physiological biomarkers were found from those fish exposed to sediment A and to sediment C. Thus, the turbot growth and energetic reductions shown in this study

could also be the result of a decline in feeding activity combined with a major reduction in the ability to assimilate and/or convert food to energy.

The results of growth and condition indices of the fish exposed to the harbour sediments could be compared to a previous study in which juvenile turbot were caged in the harbour of Boulogne Sur Mer (Kerambrun et al., 2011). In particular, a cage was fixed to the sediment at station B where sediment was sampled in the present study. The growth in length and in weight measured in the turbot exposed to sediment B were similar to those found in the caged fish. However, condition indices (K index, RNA:DNA and TAG:ST ratios) were found lower in the caged fish. This comparative result suggests that environmental factors other than sediment associated contaminants, could have influenced the condition of the fish. In particular, in the present study, a daily water change was performed to avoid a decrease in seawater quality. However, this renewed seawater could have decreased the transfer of chemical contaminant by the water column. Moreover, the fish were fed uncontaminated food, but prey items in contaminated areas are likely to be an additional source of chemical contaminants.

Conclusion

Our study has shown the deleterious effects of exposure to contaminated sediments on the health of juvenile turbot, using growth and condition indices. Although all biological parameters used in this study showed variations in the most contaminated condition, growth rates and Fulton's K condition indices appeared to be more sensitive to the level of the chemical contamination. The decrease in biological performance of the turbot exposed to the Seine sediment, corroborates the results observed by Amara et al. (2009), which found a decrease in growth and condition of juvenile flounder (*Platichthys flesus*) sampled in the Seine estuary, compared to relatively clean estuaries. Growth during the initial year following settlement is likely to be critical to subsequent survival and recruitment. Fish experience their most rapid growth during the juvenile phase (Smith et al., 1995), and any reduction during juvenile growth would prolong the length of the juvenile stage. Juvenile fish with reduced growth would be more susceptible to predation and might compete less successfully for food than larger fish. Moreover, the observed changes in nutritional status and condition with the level of sediment chemical contamination may limit the ability of juvenile fish to tolerate difficult conditions such as diseases or starvation. In conclusion, such a reduction in growth and energetic status of juvenile fish could dramatically decrease their over-winter survival in

contaminated nursery grounds. However, to extrapolate these results in the field, other abiotic and biotic factors would have to be considered.

Acknowledgements

This work was supported by post Grenelle programme 190, DEVIL of the French ministry for ecology and the Franco–British INTERREG IVA European project, DIESE. We would like to thank Vincent CORNILLE and Michel LAREAL for their help during the experiment assay and Michael THERON for his contribution to the PAH metabolites analyses. We thank Peter MAGEE for revision of the English grammar and syntax (www.anglais.webs.com).

3.2. Une approche multibiomarqueur pour évaluer les effets délétères de sédiments contaminés sur des juvéniles de turbot, *Scophthalmus maximus*.

Résumé

Dans des milieux chimiquement complexes, il est difficile d'appréhender les interactions synergiques et/ou antagonistes entre les différents contaminants chimiques sur les réponses biologiques des organismes. Les réponses des biomarqueurs d'exposition peuvent être à la fois stimulées et inhibées suivant le mode d'action des contaminants. C'est pourquoi, l'évaluation des effets biologiques de ces contaminants impliquent l'utilisation de paramètres mesurés à la fois aux niveaux moléculaire, cellulaire et à l'échelle de l'individu. Lors de l'expérience précédente de caging, des réponses dans les activités des biomarqueurs moléculaires utilisés ont été observées dans la station contaminée. Pour préciser la sensibilité des activités EROD, GST et CAT avec les niveaux de contamination chimique dans un contexte de pollution multiple, une étude complémentaire en laboratoire a été menée sur le même type de sédiment. En comparant leurs réponses avec celles des indices de croissance et de condition mesurés sur les mêmes individus, cette étude pourrait permettre de statuer sur la capacité de ces biomarqueurs moléculaires à révéler les effets délétères des contaminants sur l'état de santé des organismes. En complément, nous avons considéré un autre niveau d'organisation en utilisant des biomarqueurs immunologiques. De par leur fonction biologique indispensable dans les mécanismes de défense des organismes, une relation plus étroite de leurs réponses avec celles des biomarqueurs physiologiques peut être supposée. Les modifications au niveau histologique ont été examinées par la mesure du nombre et de la taille des centres mélanomacrophagiques (MMCs). Les perturbations dans la fonction immunitaire ont été analysées par la mesure du facteur de croissance transformant bêta (TGF- β) et le développement du thymus.

Des différences dans les activités EROD, GST et CAT ont été observées chez les turbots exposés aux quatre sédiments contaminés par rapport au sédiment de référence. Ce résultat confirme la capacité de ces biomarqueurs moléculaires à détecter la présence de contaminants chimiques malgré que leurs réponses soient modérément reliées aux niveaux de contamination dans le sédiment. Les activités de la GST se sont avérées faiblement corrélées aux concentrations en polluants considérés et celles de l'EROD et la CAT ont montré quelques corrélations significatives avec certains métaux comme le Pb, le Cd et le Mn, trois

éléments concentrés dans le sédiment B. Seules les activités EROD après 21 jours d'exposition étaient significativement corrélées avec les concentrations en HAPs. Des différences dans les réponses de ces biomarqueurs moléculaires ont également été observées entre les deux temps d'exposition considérés (7 et 21 jours). Ce genre de variation en fonction du temps d'exposition est assez fréquent dans les réponses de ce type de biomarqueur : un temps de latence, une période d'induction et éventuellement d'adaptation correspondant au profil type des biomarqueurs moléculaires (Wu *et al.*, 2005). Le facteur temps peut être problématique en situation environnementale, une sous-estimation des niveaux de contaminants peut en résulter. D'autre part, les réponses des biomarqueurs moléculaires se sont avérées faiblement reliées avec les variations des indices de croissance et de condition, analysés précédemment sur les mêmes organismes. En particulier, aucune réponse de l'EROD et de faibles différences d'activités GST et CAT ont été observées sur les poissons exposés au sédiment le plus interne du port (C) qui présentaient les plus faibles taux de croissance et les indices de condition les plus fortement diminués. Ces résultats entraînent une limitation dans l'utilisation de ces biomarqueurs moléculaires en tant que « systèmes d'alarme » puisque dans cette situation d'exposition, leurs réponses n'ont pas permis de détecter les effets néfastes des contaminants chimiques sur les performances physiologiques des organismes.

Aucune différence n'est apparue sur le développement du thymus entre les différentes conditions d'exposition. Des différences dans le nombre de MMCs et dans les teneurs en TGF- β ont été observées entre les conditions d'exposition mais ces réponses présentent de faibles relations avec les concentrations en contaminants dans le sédiment. Néanmoins, quelques corrélations significatives ont pu être établies entre les TGF- β après 21 jours d'exposition et les métaux toxiques comme le Hg, le Cd et le Pb. De faibles relations entre ces biomarqueurs immunologiques et les réponses des indices de croissance et de condition ont également été décelées suggérant un manque de prédictibilité de ces biomarqueurs sur l'état de santé des organismes. Cette étude confirme la complexité dans l'établissement des relations cause à effet entre l'exposition à une multitude de polluants, le métabolisme et les dommages sur l'état de santé des organismes. La possibilité de sous-estimer les risques associés à l'exposition aux contaminants chimiques en utilisant seuls les biomarqueurs moléculaires et immunologiques est à considérer. Il apparaît ainsi nécessaire de coupler leur utilisation avec des paramètres à plus haut niveaux d'organisation comme les indices de croissance et de condition qui se sont avérées sensibles aux différents niveaux de contamination.

A multibiomarker approach in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, exposed to contaminated sediments

Kerambrun, E.^{1,2,3,*}, Henry, F.^{1,2,3}, Marechal, A.⁴, Sanchez, W.⁵, Minier, C.⁴, Filipuci, I.^{1,2,3}, Amara, R.^{1,2,3}

¹ University of Lille Nord de France, France

² ULCO, LOG, F-62930 Wimereux, France

³ CNRS, UMR 8187, F-62930 Wimereux, France

⁴ Laboratory of Ecotoxicology, Université du Havre, F- 76058, Le Havre, France

⁵ Unité d'écotoxicologie *in vitro* et *in vivo*, Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), BP 2, F-60550 Verneuil en Halatte, France

1. Introduction

In most contaminated environments, such as harbour areas, organisms are exposed to mixtures of pollutants, whose synergistic or antagonist effects are difficult to interpret and predicted exclusively from chemical analyses (Regoli et al., 2004). This explains why, in recent years, different biological tests have been developed representing low-cost tools to evaluate biological responses to environmental pollution at molecular, cellular and organismic levels (McCarthy et al., 1990; Shugart et al., 1992; Viarengo et al., 1997). However, it is still complex and difficult to predict the biological effects caused by different classes of chemicals during co-exposures when reciprocal interactions, cascade and indirect mechanisms can either enhance or suppress the expected responses (Benedetti et al., 2007).

In previous studies we analysed the responses of several molecular and physiological biomarkers in juvenile sea bass and turbot caged in a polluted harbour (Kerambrun et al., 2011; 2012a). The results of this study suggest the influence of biotic and/or abiotic factors on juvenile turbot responses to chemical contamination. Indeed, the release and bioavailability of contaminants are highly regulated by hydrodynamics, biogeochemical processes and environmental conditions of the system (Eggleton and Thomas, 2004) and make *in situ* studies difficult to interpret. Laboratory approaches in ecotoxicology could represent an alternative for establishing clearer cause and effect linkages between contaminants and toxicity, as well as the mechanistic basis for toxicity. Therefore, the use of a sediment toxicity bioassays would complement the previous caging studies and lead to a better understanding of the confounding factors in the assessment of the effects of chemical contaminants.

Since single biomarkers cannot reflect the impairment of organism health conditions, the use of different biomarkers that can both signal exposure to contaminants and quantify

their effects on the health of organisms, enables a more comprehensive and integrative assessment of environmental quality (Fonseca et al., 2011). In the present study, a multi-biomarker approach was used to analyze the effects of contaminants associated with sediments on juvenile turbot in laboratory conditions. The turbot species was chosen because it is a commercial fish that is widely distributed along the European coast. Moreover, this species maintains a close association with sediments for food and protection and is therefore more likely to be exposed to sediment-associated pollutants (Besselink et al., 1998; Kilemade et al., 2009). Sediment was sampled in a northern French harbour, Boulogne-sur-Mer, which is an intensively developed and industrialised harbour impacted by municipal and industrial discharges, fishing and shipping activities, and marinas. We also chose to sample sediment in an anthropogenic estuary, the Seine. This estuary remains a highly productive ecosystem, which provides a nursery for numerous marine fish in spite of heavy organic and metallic contamination and human activities (Dauvin and Desroy, 2005).

Among the numerous biological responses, those based on the molecular and cellular level can represent the earliest warning signals of environmental disturbance (Depledge, 1994). Several molecular biomarkers of exposure were therefore chosen since they are frequently used in ecotoxicological studies and they represent important mechanisms of defense against pollutants and their effects. Those are biotransformation enzymes [phase I ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and phase II glutathione S-transferase (GST) activities] that metabolize xenobiotics and an antioxidant enzyme activity [catalase (CAT)] which reduces cellular damage resulting from reactive oxygen species (ROS). The immune system is an important defense system which is yet less studied in environmental research. It nevertheless deserves attention since a number of pollutants have potential to disrupt this component (Wester et al., 1994) and these impairments can lead to dramatic effects including population decrease (Van Loveren et al, 2000). As thymus and spleen are important organs of the immune system, development and histological alterations were studied. Additionally, the cytokine transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) appears as a key component of the immune system showing pleiotropic effects in animal kingdom. The responses of these molecular and immunological biomarkers were correlated with turbot growth and condition measured in a previous study (Kerambrun et al, 2012b). Three condition indices were used: the Fulton's K condition factor; the RNA:DNA ratio which is used in numerous studies as an index of nutritional condition and growth assessment in larvae and juvenile fish (Buckley, 1984; Gwack and Tanaka, 2001; Amara et al., 2009); and a lipid storage index based on the ratio of

the quantity of triacylglycerols (TAG; reserve lipids) to the quantity of sterols (ST; structural lipids) in fish (Amara et al., 2007).

The main objective of present study was to assess and compare the responses of these biomarkers measured on turbot exposed to a mixture of chemical contaminants associated with harbour and estuarine sediments. This multibiomarker approach intended to explore a wide range of fish responses to pollution from the sub-cellular level to the general condition of fish. These laboratory data were compared with those obtained from our previous caging study to analyse the predictability of these biomarkers in a field situation.

2. Material and Methods

This experiment was conducted in accordance with European Commission recommendation 2007/526/EC, on revised guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes.

2.1. Sediment exposure conditions

Sediments were collected from different sites located along the French coast of the Eastern English Channel on the same date in February 2010. These sediments were sampled from three stations in a harbour in northern France (Boulogne-sur-Mer: BSM); from an anthropogenic French estuary (the Seine) and from a reference site (Fig. 1). The sediment was collected using a Van Veen grab (250 cm² sampling area) in three different locations in the harbour: station A at the front, and stations B and C in the inner part. Estuarine inter-tidal sediment was collected at low tide from the north bank of the Seine estuary. The last sample was taken at low tide from Wimereux beach, used as the reference site.

Four month old turbot, *Scophthalmus maximus*, (weight: 6.83 ± 0.72 g) were obtained from a hatchery (France Turbot) and acclimatised in two clean tanks (160 L) in semi-static conditions for two weeks. Before the beginning of the experiment, each fish was anaesthetised in a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 2-phenoxyethanol solution, weighed (0.01 g accuracy), measured for total length (0.1 mm accuracy) and individually marked (Visual Implant Tag, 1.2 mm x 2.7 mm, Northwest Marine Technology). The experimental 21-day assay consisted of a static water system of 37 L capacity glass tanks, in which 5 L of sediment and 25 L of clean seawater were allocated. The assay was performed in duplicate for the five different sediments, thus ten tanks were used. Fifteen fish per tank were distributed and the daily

feeding amount was maintained at approximately 1% of the total fish weight. No mortality was observed in any of the exposure tanks. Temperature (13.8 ± 0.1 °C), salinity (32.1 ± 0.2 PSU), pH (7.90 ± 0.03) and oxygen levels (8.01 ± 0.10 mg.L⁻¹) were constant and similar in the different exposure tanks throughout the experimental assay.

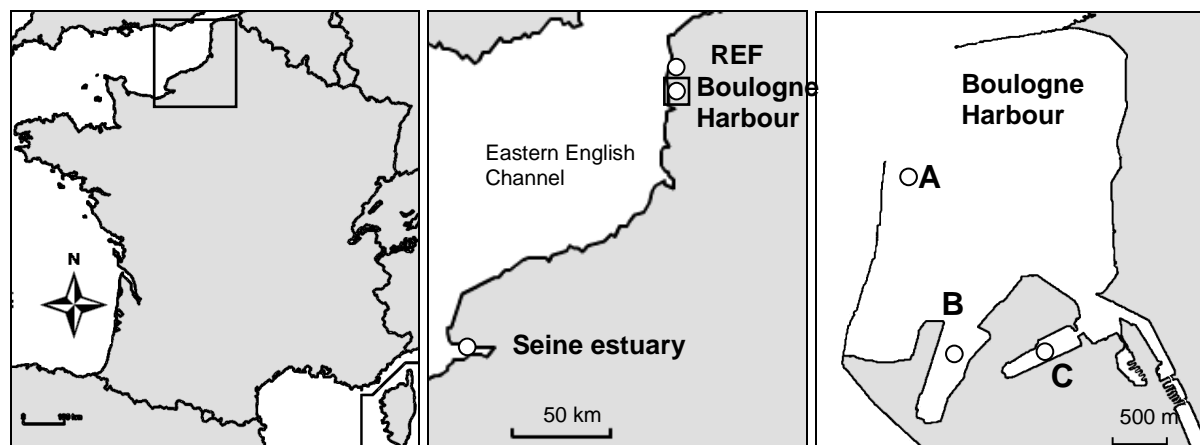


Fig. 1 (Figure 60) : Locations of the three sediment sampling sites (Reference, the Seine estuary and harbour of Boulogne sur Mer) and the three stations in the harbour (A, B and C).

Fifteen fish (7-8 per duplicate tank) per treatment group were sampled after 7 and 21 days of exposure and anaesthetised with 2-phenoxyethanol. The turbot were identified (tagged), weighed and measured in order to calculate somatic growth. For each fish, 1 mL of peripheral blood was withdrawn from the caudal vein with a lithium heparinised vacutainer and was centrifuged for 7 min at 700 g, 4°C. The supernatant was transferred into microtubes and conserved at 80°C until further analyses. The spleen and a large piece of the head including the thymus were collected and conserved in 4% buffered formaldehyde while the liver was frozen in liquid nitrogen and preserved at -80°C. Muscle fragments were stored at -20°C and otoliths (sagittae) were extracted and preserved in ethanol (95%).

2.2. Sediment analysis

In order to determine selected metals (Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, V and Zn) in the total fractions, the sediments were dried in an oven at 40 °C to constant weight and then ground into powder. For the determination of total metals, about 0.250 g of ground sediment were digested with HF (Suprapur, Merck) at 110 °C for 48 h followed by a mixture of concentrated acids HCl:HNO₃ (3:1, v:v, Suprapur Merck) at 120 °C for 24 h. This operation was repeated once. For quality assurance, reagent blanks, sample replicates and standard reference

materials (MESS-3 and PACS-2, National Research Council Canada) were used to assess the accuracy and precision of the analyses. In all cases, the recovery efficiency was better than 85% for the total digestion of standard reference materials.

The persistent organic pollutants, including polycyclic aromatic hydrocarbons (EPA's 16 priority PAHs) and polychlorinated biphenyls (7 PCB congeners) were analysed. Briefly, organic compounds were extracted from 2 g of dried sediment by a microwave oven (120 °C for 15 min, 1200 W), assisted with a 40 mL mixture of acetone and hexane (1:1, v:v). The solvent was evaporated under a stream of nitrogen in a TurboVap, and then concentrated to 1 mL of hexane. Simultaneous determination of PAHs and PCBs was performed on a gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS, VARIAN, CP 3800 – 1200 MS TQ). A ZB-MultiResidue column (30 m, 0.25 mm, 0.25 µm) was used (Phenomenex). Identification of PAH compounds and PCB congeners was based on the comparison of their GC-retention times and their mass spectrum, with appropriate individual standards. Total Hg was measured in dry and ground sediment samples (without any pre-treatment) by means of atomic absorption spectroscopy (AAS) using an AMA 254 solid phase Hg-Analyzer (Altec Ltd., Prague, Czech Republic) (Ouddane et al., 2008). Mean recovery for total Hg was between 80 and 100% for certified estuarine sediment IAEA-405 (IAEA, Vienna, Austria).

2.3. Biological analysis

2.3.1. Molecular biomarker analysis

Livers were homogenised in an ice-cold phosphate buffer (0.1 M, pH 7.8) with 20% glycerol and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride as a serine protease inhibitor. The homogenates were centrifuged at 10,000 g at 4 °C, for 15 min and the post-mitochondrial fractions were used for biochemical assays. Total protein concentrations were determined using the method of Bradford (1976) with bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Chemicals, France) as a standard.

Ethoxyresorufin-O-deethylase activity (EROD) was determined following the hydroxylation of 7-ethoxyresorufin according to the method described by Flammarion et al. (1998). The reaction mixture consisted of a phosphate buffer (0.1 M, pH 6.5), 7-ethoxyresorufin (8 µM) and NADPH (0.5 mM). The change in fluorescence was recorded (excitation wavelength 530 nm, emission wavelength 585 nm) and enzyme activity calculated as pmol.min⁻¹.mg⁻¹ protein using a Resorufin standard.

Glutathione S-transferase activity (GST) was determined following the conjugation of reduced glutathione with CDNB by the method of Habig et al. (1974). The reaction mixture consisted of a phosphate buffer (0.1 M, pH 6.5), reduced glutathione (1 mM) and CDNB (1 mM). The change in absorbance was recorded at 340 nm and enzyme activity calculated as $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein using GST standard.

Catalase activity (CAT) was determined using the method described by Babo and Vasseur (1992). In brief, the assay mixture consisted of a phosphate buffer (100 mM pH 6.5) and H_2O_2 (28 mM). Change in absorbance was recorded at 240 nm. CAT activity was calculated in terms of $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein, using bovine erythrocyte Catalase as a standard.

2.3.2. Immunological biomarkers

Thymus and spleen were processed for histological analysis. Prior to sectioning, fish heads were decalcified in 10% formic acid, 10% disodium citrate aqueous solution (Sigma aldrich) for 7 days. Samples were embedded in paraffin, and entirely cut into 5 μm sections. Slides were colored with hematoxylin eosin safran and observed under a light microscope. Images of the tissue sections were finally taken and analyzed by a computerized image analysis system (Qwin, Leica). The thymus volume was deduced from the addition of thymic areas multiplied by the total thickness of sections. The cortex-medulla ratio was calculated from the areas of these two thymic regions. Five sections from the median part of the spleen were randomly selected and analyzed. Relative abundance of melanomacrophage centers (MMC) and dark-brown aggregates were quantified by dividing the numbers of the corresponding foci by the area of the section.

Plasmatic levels of activated TGF- β 1 were determined immunologically (Invitrogen, KAC1688, Camarillo, Spain) according to manufacturer instructions.

2.3.3. Physiological biomarkers

The somatic growth in length and in weight, the otolith recent growth, the Fulton's K condition index, the RNA:DNA ratio and the lipid index, based on the TAG:ST ratio, were analysed in fish following the 21 day exposure period as described in Kerambrun et al., 2012b..

2.4. Statistical analysis

Mean comparisons of molecular biomarker responses between the five conditions of exposure were analysed using one-way ANOVA, followed by post-hoc Tukey tests. For the density of splenic MMCs and aggregates, and TGF- β 1 levels, statistical significance was analyzed by a Kruskal-Wallis rank sum test which was followed by a Kruskal multiple comparison test. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Using the data from all individuals collected and chemical contamination analysed in sediment, Pearson correlations between biomarkers and chemical contaminants were computed to examine the statistical links between parameters. Significance of the correlations was determined for each variable.

As molecular, immunological and physiological biomarkers were analysed at t_7 and t_{21} on the same fish, a Pearson product moment correlation matrix was computed using data from all the individuals exposed, to examine the statistical links between parameters.

Coefficients of variation (CV) for molecular, immunological and physiological biomarkers were calculated to analyse the heterogeneity of each variable using the formula:

$$CV_i = 100 \times SD_i / M_i.$$

Where SD_i and M_i represented the variable standard deviation and mean, respectively, for the condition i . The final CV of each biological parameter was obtained by the mean of the five CV_i (one per condition).

3. Results

3.1. Chemical contamination in sediment

No measurable PCB congeners were detected above 0.01 mg.kg^{-1} in any of the sediments tested. The metal concentrations measured in the total fraction of sediments are reported in Fig. 2. As expected, the reference sediment was the least enriched by metal compounds. Sediment A presented concentration in metals about 3 times higher than in reference sediment but showed lower metal concentrations compared to the two other harbour sediments. Sediments B and C showed different levels of contamination among metals. Sediment B showed the highest levels of Cd, Mn, and Pb, which were approximately 16, 33 and 12 times higher than in the reference sediment, respectively. In contrast, Cu and Zn were more abundant in sediment C, with concentrations respectively 140 and 43 times higher than those measured for the reference site. All metal concentrations were higher in the Seine sediment

compared to sediment A, but they remained lower than the two other harbour sediments, except for the chromium concentration, which was of the same order of magnitude.

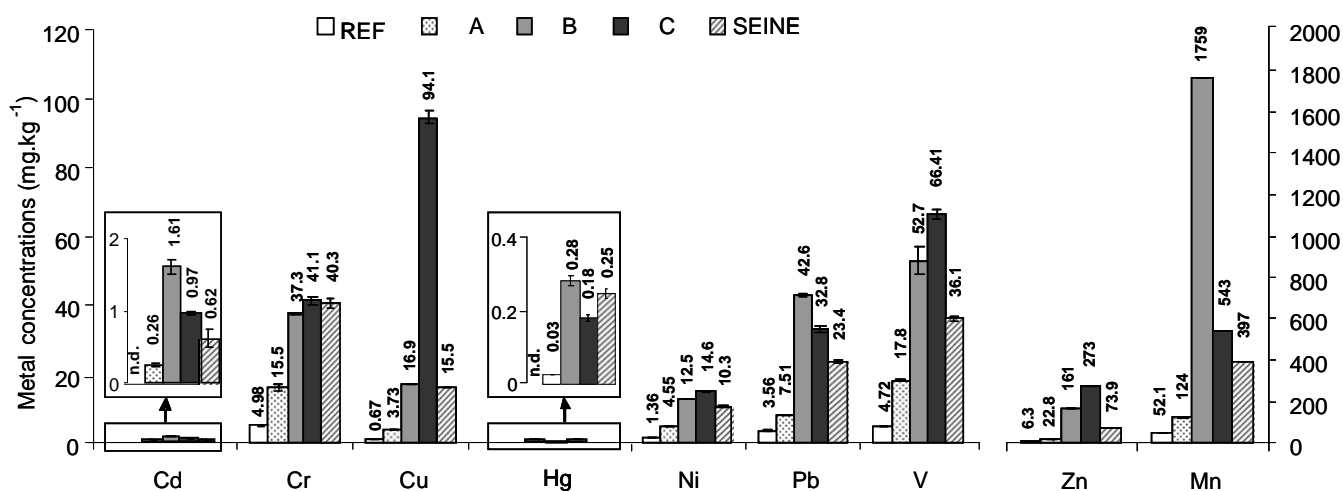


Fig. 2 (Figure 61) : Metal concentrations (mg.kg⁻¹ dry weight) in the five sediments (Ref, Seine, A, B and C)

No PAH was detected in the reference sediment or in sediment A. Higher total PAH concentrations were found in sediment C (2.44 ± 0.95 mg.kg⁻¹) compared to B (1.27 ± 0.50 mg.kg⁻¹). The total PAH concentration measured in the Seine sediment (1.63 ± 0.64 mg.kg⁻¹) was between those measured in sediments B and C. Among the different aromatic compounds detected in this sediment, PAHs with intermediate-high molecular weight were dominant.

3.2. Molecular biomarker responses

Molecular biomarker responses analysed following the 7 and 21 day exposure periods are presented in Fig. 3. A significant increase in EROD activities was observed at t_7 in fish exposed to A, B and Seine sediments compared to t_0 . These EROD activities measured at t_7 were also significantly higher in turbot exposed to sediment A compared to the reference sediment and exposed to sediment B compared to the four other conditions. Following the 21 day exposure period, EROD activities were only higher in fish exposed to sediment C compared to t_0 and in fish exposed to Seine sediment compared to t_0 and to the reference sediment. No significant difference was observed for GST activities at t_7 and a significant increase was found at t_{21} in turbot exposed to sediment B compared to other conditions. On the other hand, significantly lower GST activities were observed in fish exposed to sediment C compared to the reference sediment. A significant increase in CAT activities was observed in fish exposed to the four contaminated sediments for 7 days compared to t_0 and to the

reference sediment. Indeed, at t_7 , CAT activities increased significantly from sediment C and the Seine condition to sediment A and then to B. Following the 21 day exposure period, the only significant increase in CAT activities was observed in fish exposed to sediment B.

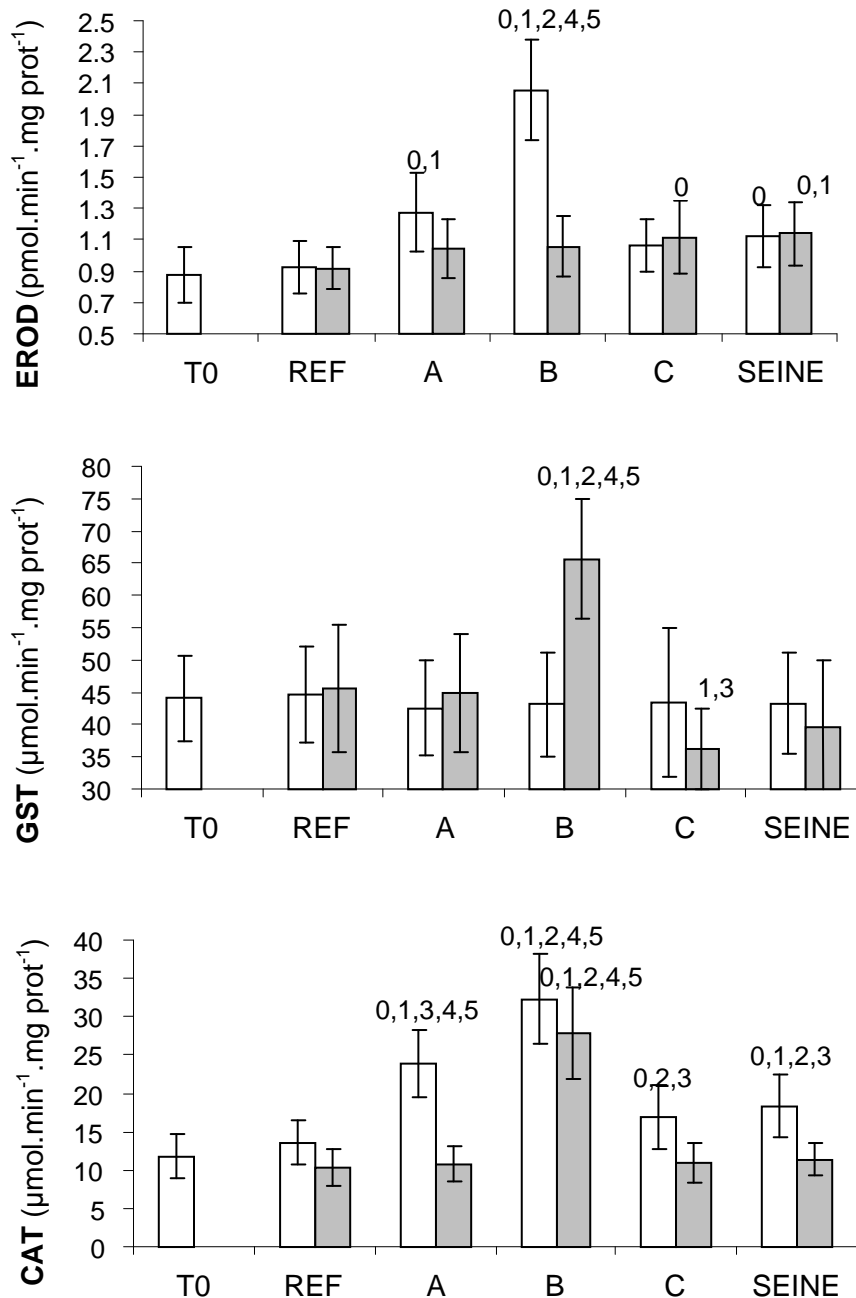


Fig. 3 (Figure 62) : Differences in Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), Glutathione S-transferase (GST) and Catalase (CAT) activities of turbot exposed to the five sediments (Ref, Seine, A, B and C) during 7 (□) and 21 (■) days. n = 15. ⁽⁰⁾, ⁽¹⁾, ⁽²⁾, ⁽³⁾, ⁽⁴⁾, ⁽⁵⁾, ⁽⁶⁾ represent significant difference (p < 0.05) compared to "t₀", Seine, A, B, C and starved fish, respectively.

3.3. Immunological biomarker responses

TGF- β 1 plasma concentration was constant in control fish throughout the 21-day experiment with values of 34-36 ng.mL⁻¹ (Fig. 4). Similar values were obtained in fish exposed to contaminated sediments for 7 days although a low but significant decrease could be measured for fish exposed to the Seine sediment and sediment A. However, after 21 days of exposure, all sediment-exposed fish showed a slight and non-significant increase in TGF- β 1 plasma concentration when compared to the value obtained after 7 days of exposure. This rise led to concentrations that were higher than 40 ng/mL in condition B, C and with the Seine estuary sediments.

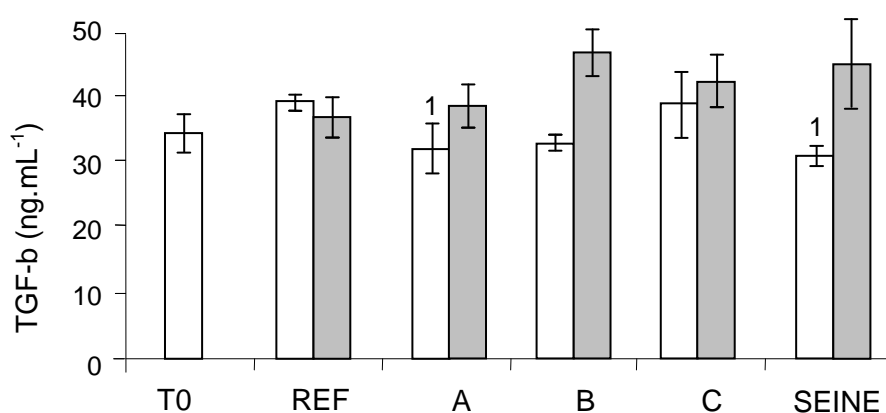


Fig. 4 (Figure 63): Differences in plasmatic levels of TGF- β 1 (ng.mL⁻¹) of turbot exposed to the five sediments (Ref, Seine, A, B and C) during 7 (□) and 21 (■) days. n= 3. (⁰), (¹), (²), (³), (⁴), (⁵), (⁶) represent significant difference (p < 0.05) compared to “t₀”, Seine, A, B, C and starved fish, respectively.

Relative abundance of spleen melanomacrophage centers (MMCs) was low in the control fish (2 MMCs.mm⁻², Fig. 5). Interestingly, starvation for 7 or 21 days did not result in any change in MMC numbers (not shown). However, with the exception of condition B, MMC density was 3 to 4 times higher in fish exposed for 21 days to harbour (condition A and C) and Seine Estuary sediments. A similar effect could be observed when measuring the relative abundance of brown aggregates within the spleen tissues. Although no statistically significant differences could be measured for the latter, aggregate density was 2-3 higher in tissues from fish exposed to contaminated sediments (Fig. 5).

The thymus volume of fish exposed to harbour sediment (condition C) was not significantly different from the control group after 21 days of exposure (622 μ m² \pm 366 versus 722 μ m² \pm 190). Similarly, no significant difference in thymic cortex medulla ratio could be

measured between these two conditions (1.40 ± 0.28 versus 1.39 ± 0.2). Thus, no variation in the T cell maturation process could be identified during the experiment.

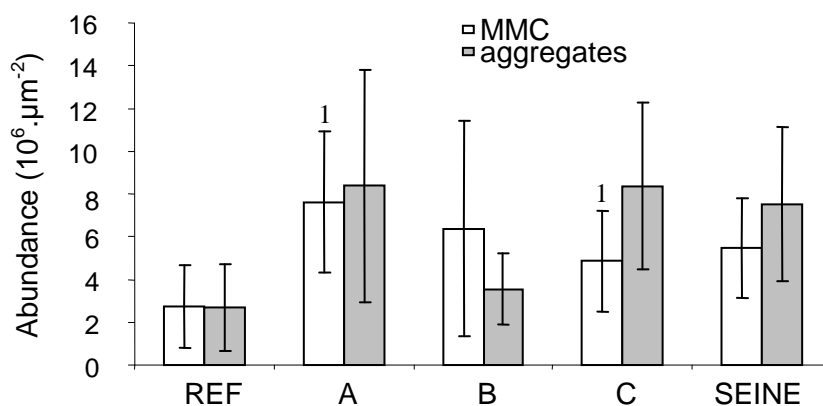


Fig. 5 (Figure 64): Differences in relative abundance of melanomacrophage centers (MMC) and dark-brown aggregates of turbot exposed to the five sediments (Ref, Seine, A, B and C) during 21 days. n=8. ⁽⁰⁾, ⁽¹⁾, ⁽²⁾, ⁽³⁾, ⁽⁴⁾, ⁽⁵⁾, ⁽⁶⁾ represent significant difference ($p < 0.05$) compared to “t₀”, Seine, A, B, C and starved fish, respectively.

3.4. Correlations of molecular, immunological and physiological biomarkers with chemical contaminants

In order to compare the responses of molecular, immunological and physiological biomarkers to the different levels of chemical contaminants found in sediments, correlations between biological parameters, the eight metal compounds analysed and the total PAH concentrations were performed. The coefficients of correlation are presented in Table 1. At t₇, EROD and CAT were significantly correlated with each other and with Cd, Hg, Cr, Mn, Ni, Pb and V whereas GST presented no significant correlation with chemical contaminants. Following 21 days of exposure, EROD presented significant correlations with Cr, Hg, Ni, Pb, V and total PAHs, GST with Cd, Cu and Mn, and CAT with Cd, Mn, Ni, Pb and V. With the exception of the correlation found between GST and Cu, all significant correlations found with these molecular biomarkers were positively related with chemical contaminants. No correlation could be found between the occurrence of spleen MMC and any measured contaminant while TGF-β1 plasma concentration appeared significantly related to some of the metals such as Cd, Cr, Hg, Mn, Ni and Pb.

Table 1 (Tableau 28) : Relationships (correlation coefficients) between molecular, immunological and physiological biomarkers and the levels of metal and PAH concentrations in sediment (n=75 for molecular and physiological biomarkers, n=15 for TGF-b1 and n=40 for MMC and aggregates -Agg). Significant correlation for $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$ and $p^{***} < 0.001$.

	-----t ₇ -----				-----t ₂₁ -----					
	EROD	GST	CAT	TGF-b1	EROD	GST	CAT	TGF-b1	MMC	Agg
Cd	0.65***	0.01	0.56***	-0.09	0.21	0.40***	0.74***	0.60*	-0.07	0.21
Cr	0.31***	-0.04	0.28*	-0.13	0.36***	-0.05	0.27*	0.55*	0.26	0.20
Cu	0.01	-0.06	-0.01	0.47	0.20	-0.33***	-0.10	0.10	0.27	-0.02
Hg	0.48***	0.01	0.37***	-0.19	0.26*	0.22	-0.55***	0.66**	-0.03	0.11
Mn	0.70***	0.05	0.61***	-0.10	0.11	0.58***	0.85***	0.54*	-0.21	0.16
Ni	0.36***	-0.02	0.32***	-0.01	0.32***	0.01	0.34***	0.52*	0.22	0.17
Pb	0.51***	0.00	0.43***	0.05	0.26*	0.20	0.54***	0.56*	0.06	0.14
V	0.40***	-0.03	0.35***	0.11	0.30**	0.03	0.36***	0.44	0.20	0.18
Zn	0.27*	-0.02	0.22	0.35	0.23	-0.07	0.23	0.32	0.17	0.04
PAHs	0.16	-0.02	0.09	0.15	0.31***	-0.18	0.13	0.45	0.22	0.03

3.5. Relationships between molecular, immunological and physiological biomarker responses

Correlations between molecular, immunological and physiological biomarkers were also performed to test the existence of significant links between these different parameters, and to evaluate the strength of these relationships. The results are presented in Table 2. At t_7 , only CAT activities presented significant correlations with EROD, GW, GL and K but R values were lower than 0.30. At t_{21} , EROD and CAT activities were found to be significantly and positively correlated. Negative significant correlations were observed between EROD activities and the RNA:DNA ratios. CAT activities were found significantly correlated with GW, GL and K. For the measured immunological parameters, only TGF-b1 plasma concentration showed a correlation with the K index.

3.6. Variability of measurements

Coefficients of variation (CV) for molecular and physiological biomarkers were calculated to analyse the heterogeneity of each variable. As growth rates ranged from negative to positive values, CV could not be estimated for these variables. The lowest coefficients of variation were observed for the K index ($CV_K=5.32\%$), the otolith recent growth ($CV_{RG} = 9.10\%$) and TGF-b1 ($CV_{TGF-b1} = 9.31\%$). The CV was quite similar between the three molecular biomarkers ($CV_{EROD} = 18.4\%$, $CV_{GST}=18.1\%$ and $CV_{CAT} = 21.7\%$) and highest

values were found for RNA:DNA ratios ($CV_{\text{RNA:DNA}} = 32.0\%$), MMCs ($CV_{\text{MMC}} = 56.6\%$), aggregates ($CV_{\text{agg}} = 56.7\%$) and for TAG:ST ratios ($CV_{\text{TAG:ST}} = 91.1\%$).

Table 2 (Tableau 29) : Relationships (correlation coefficients) between molecular, immunological and physiological biomarkers measured after 7 (a.) and 21 days (b.) of exposure (n=75 for physiological and molecular biomarkers, n=15 for TGF-b1 and n=40 for MMC). Significant correlation for $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$ and $p^{***} < 0.001$.

t_7	EROD	GST	CAT	TGF-b1		
GST	-0.1	-				
CAT	0.70***	-0.07	-			
TGF-b1	-0.05	-0.25	-0.21	-		
GW	-0.19	-0.02	-0.26*	0.09		
GL	-0.16	-0.06	-0.27*	0.04		
K	-0.18	-0.02	-0.25*	-0.17		
RNA:DNA	-0.18	0.15	-0.14	0.08		a.

t_{21}	EROD	GST	CAT	TGF-b1	MMC	Aggregates
GST	-0.11	-				
CAT	0.01	0.63***	-			
TGF-b1	0.05	0.38	0.45	-	-	-
MMC	0.13	-0.25	-0.19	-	-	-
Aggregates	-0.24	-0.01	0.21	-	-	-
GW	0.01	-0.16	-0.32*	-0.50	-0.18	-0.49*
GL	0.06	-0.17	-0.30*	-0.26	-0.04	-0.48*
RG	-0.14	0.19	0.14	0.09	-0.01	0.01
K	0.14	-0.25	-0.36**	-0.53*	-0.09	-0.31
RNA:DNA	-0.33*	0.05	-0.12	-0.24	-0.20	-0.18
TAG:ST	-0.10	-0.7	-0.08	-0.38	-0.23	-0.24

4. Discussion

4.1. Molecular biomarker responses

Differences in EROD, GST and CAT activities were observed in turbot exposed to the four contaminated sediments compared to the reference. Highest responses were observed in fish exposed to sediment B while sediment C presented the highest concentrations of most of the chemical contaminants. These molecular biomarkers are frequently used in ecotoxicological studies due to their sensitivity to different classes of pollutants (Van der Oost et al., 2003). For example, Kilemade et al. (2009) analysed the EROD responses in hatchery-reared 3 month old turbot exposed to sediments from two contaminated sites within Cork harbour which presented contaminants similar to ours. These authors found a significant

increase in EROD activities after 7, 14 and 21 days of exposure to these contaminated sediments compared to their reference. In the same way, higher GST activities were observed in flounder exposed to sediment from the harbour of Venice (Vigano et al., 2001) and an increase in GST and CAT was found in neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to sediment from an urban area (Almeida et al., 2005). However, as sediments are composed of a mixture of chemical contaminants, it is still difficult to know what pollutant is responsible for these molecular biomarker responses. In this study, we have analysed their correlations with the different chemical contaminants found in sediments. Although metals and PAHs are only some chemical compounds which are present in such contaminated sediment, they represent two important groups of contaminants whose chemical constitution makes them prone to adsorption by particles (Magnusson et al., 1996). Co-contamination with complex mixtures of metals and PAHs is a common environmental problem with multiple biological consequences, particularly to the enzyme systems and metabolism in the body (Korashy and El-Kadi, 2004).

Among the three molecular biomarkers analysed, GST presented the least significant correlations with contaminants, with only significant positive correlations with Cd and Mn at t_{21} and a negative correlation with Cu. More significant correlations were found for EROD and CAT activities. In particular, at t_7 , EROD and CAT activities showed relatively strong positive relationships with Cd, Mn and Pb. However, weak correlations were found in EROD and CAT activities with Cu and Zn in spite of their relatively high concentrations in sediment C. While many studies have observed an induction of detoxification parameters or antioxidant enzymes in fish under organic contamination by PAHs (Achuba and Osakwe, 2003; Simonato et al., 2008; Nahrgang et al. 2010), these three molecular biomarkers were weakly related to PAH concentrations found in sediments. The only significant correlation was observed for EROD at t_{21} . In particular, few responses were observed in fish exposed to sediment C, although it displayed the highest concentration of PAHs. The antagonist effects of pollutants could provide an explanation for these low responses of molecular biomarkers. In particular different studies have observed metal inhibitions of these enzyme activities (Pandey, 2008; Atli and Canli, 2010; Cao et al., 2010). For example, the induction of EROD and CAT activity in Antarctic fish *Trematomus bernacchii* exposed to benzo(a)pyrene was greatly suppressed by Cu (Benedetti et al., 2007). In the same way, liver microsomal EROD activity was significantly inhibited in sea bass after *in vitro* exposure to Cu and Zn (Oliveira et al., 2004). Metals can alter the activity of enzymes by binding to their functional groups but also by altering protein turnover (Viarengo, 1997; Oliveira et al., 2004). Moreover, metals do not

act in the same way in organisms since essential metals tend to be highly regulated compared to non essential metals (Fernandes et al., 2007). Under these circumstances the effect of mixtures is more difficult to predict. Moreover, our conclusions from this correlation study have to be moderated since other contaminants, not measured in this study, could have influenced the biomarker responses. The responses observed could be the result of the combination of this pollutant mixture. Other metal scavengers, i.e. metallothioneins, are also known to perform valid metal detoxification (Viarengo and Nott, 1993; Triebkorn et al., 2002). However, in this study we were limited by the liver size of such juvenile fish. Moreover, metallothionein responses to chemical contaminants were found to present quite a high variability especially due to the effects of biotic and abiotic factors on their synthesis (Amiard et al., 2006).

Differences in molecular biomarker responses were also observed between the two exposure times. Differences in GST activities were only observed at t_{21} whereas EROD and CAT responses were lower at t_{21} compared to t_7 . Differences in EROD activities according to exposure time have also been observed in turbot exposed to oil produced water (Stephens et al., 2000) and in the antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* exposed to different metals (Atli and Canli, 2010). In their study, Wu et al. (2005) examined the time-integrated response of various biomarkers. They propose a typical profile which includes a latent period, an induction period related to the concentration of contaminants and a decline of the response considered as an adaptation period if the exposure is prolonged. The time required for the occurrence of each process may be species-specific, contaminant-specific and dependent upon the level of biological response. The results of the present study suggest that GST would have a slow induction period while EROD and CAT would have a fast recovery period for this type of sediment contamination. In the present study, molecular biomarker responses were analysed at t_7 and t_{21} , however if other exposure times had been considered, different molecular responses could have been observed. These time-dependent responses could be problematic in a field situation resulting in an underestimation of the level of contaminants in the field (Wu et al., 2005).

4.2. Relationships between molecular and physiological biomarkers

The use of molecular responses in environmental assessments relies upon the fact that interactions between pollutants and molecular functions may indicate or lead to vital disturbances in for example reproduction success, growth or survival (Magnusson et al.,

1996). This is based on the assumption that there are metabolic costs associated with the synthesis of these proteins or with detoxification processes (Rose et al., 2006). In the present study, we used physiological biomarker results from a previous study (Kerambrun et al., 2012b) to determine whether variations in EROD, GST or CAT activities could be related with variations in turbot growth or condition.

While EROD and CAT showed the highest responses at t_7 , a low relationship was found between molecular biomarker responses at t_7 and the physiological performance of fish. At t_{21} , an EROD increase was found to be significantly and negatively related with RNA:DNA ratios and CAT with both specific growth rates and the Fulton's K index. However, this relationship remained relatively low with a correlation coefficient of about 30%. The main difference between molecular and physiological biomarkers was in the responses observed in turbot exposed to sediment C. Indeed, few differences in molecular biomarkers were observed in fish exposed to sediment C while a high difference was observed for condition B. On the other hand, the lowest responses of physiological biomarkers were observed for condition C. As stated previously, sediments B and C presented different levels of contamination among the metals. This fact supports the previously suggested hypothesis of potential antagonist effects of the different chemical contaminants present in sediments on molecular biomarker activities. The analysis of relationships between molecular and physiological biomarker responses suggests that, based only on biomarker responses, biological effects of exposure to sediment C would be underestimated.

The biomarker responses observed in this laboratory study could be compared with those obtained in a previous study in which similarly aged turbot were caged for 38 days in 2009 in the same harbour, at stations A, B and C (Kerambrun et al., 2011; 2012a). In these previous studies, significant decreases in growth, Fulton's index and TAG:ST ratio were found in turbot caged at station B compared to station A, corroborating the results from the present study. Some differences were observed for molecular biomarker responses. While a significant increase in EROD activities was observed in fish caged at station B, no significant difference was observed in turbot exposed to sediment B for 21 days, although metal and PAH concentrations were similar in both studies. CAT activities were lower in fish caged at station B whereas a significant increase was observed in fish laboratory exposed to sediment B compared to A. Low biomarker responses were observed for condition C in the present study while fish were found dead at caging station C. However, chemical concentrations observed in the caging study were about 2 times higher at station C than in the present study for Mn, Pb, Zn and total PAHs. Several additional factors could be suggested to explain the

differences between these two types of studies, such as the physiological stress of caging (Oikari et al., 2006), the additional seawater contamination in the water column or the time of exposure.

4.3. Immunological biomarker responses

No effect could be demonstrated in terms of thymic involution or of default in T cell maturation in juvenile turbot during the 21 day exposure period in this study. Similar results were reported for flounder exposed to 500 μg of TCDD $\cdot\text{kg}^{-1}$ bw (Grinwis et al., 2000). This could be attributed to the relatively short duration of the experiment or to a relative resistance of the fish. As cell maturation is a relatively slow process, alterations at the histological level may only be prevalent after a long exposure time. Furthermore, the decrease in thymus size appears to be a species-specific marker. Wester and collaborators showed that upon exposure to TBTO, only guppies (*Poecilia reticulata*) showed a thymic involution, whereas medaka (*Oryzias latipes*) did not (Wester and Canton, 1987; Wester et al., 1990).

In this study, the density of MMCs in the spleen of the fish did not show much variation. However, values were higher after 21 days of exposure to contaminated sediments. It is assumed that MMCs play an important role in the phagocytosis of cellular debris (Wolke, 1992; Leknes, 2007). They can also be indicative of stimulation of the innate immune system due to the fact that macrophages are important actors of the nonspecific defense notably during inflammation. Nevertheless, MMCs variation significance is unclear (Couillard et al., 1999) and MMC density was not significantly correlated to any physiological traits including growth and condition index of the fish used in the study. Its ability to be predictive of adverse effects thus deserves further investigation, especially during fish development. The increase in the number of brown aggregates paralleled the high MMC density in the spleen of fish exposed to sediments. These aggregates might be breakdown products which remained in tissues after the disappearance of macrophages and may be indicative of lipid peroxidation (Wolke, 1992). Both MMCs and brown aggregates might be closely related.

The effect on the immune system was further indicated by the low increase in plasma TGF- β 1 in all fish except control fish after 21 days of exposure to contaminated sediments. According to Harms et al. (2000), an increase in the TGF- β 1 level suggests an immunosuppressive effect due to its fundamental ability to turn off several components of immunity. No such conclusion could be derived from the present work. However, the

modulation of TGF- β 1 plasma concentration is similar to the changes in MMCs and, together, may indicate some changes that might be important for the developing fish.

Immunological measurements were not related to effects on growth or condition indices. It could be hypothesized that immunological effects are specific to a system and cells whereas the general condition reflects either the energy supply or its allocation to diverse systems. In this respect immunological development of the organisms could be a priority for the organisms during development thus not directly correlated to general condition. No obvious relationships were noted between the immunological parameters and the measured contaminants. Only the TGF- β 1 plasma concentration was correlated to some of the metals. Recent studies report that a wide range of pollutants can induce greater secretion of this cytokine (Sonne et al., 2007) and the observed correlation does not infer a direct relationship. On the contrary, some unmeasured contaminants may have contributed to the slight responses of the immunological system.

Although the measured effects were low, studies on the immune or neuro-endocrine system may be important. Not only do they represent an important system necessary for the proper functioning of the organisms, but alteration may also lead to profound and lasting effects resulting in increased susceptibility, diseases, or death in the long term.

4.4. Conclusion

These data confirm complex cause-effect relationships between exposure to pollutants, metabolisms and health damages. Molecular biomarkers were weakly related to fish physiological damage and their responses were not similar between this laboratory experiment and our previous caging study. The inconsistency of molecular responses measured in this work suggests that variations of molecular biomarkers can be difficult to predict in a field situation. Indeed, field organisms are exposed to pollutant mixtures including metals and PAHs, which could cause synergistic or antagonist effects on molecular biomarker responses, whereas immunological and physiological biomarkers appear to be more predictive of the adverse effects of chemical contaminants. However, immunological biomarkers appear to be weakly related to chemical contaminants found in sediments and fish physiological performance, with TGF- β 1 even showing some significant correlations. On the other hand, the inherent natural variability of physiological biomarkers and their sensitivity to several biotic or abiotic factors (sediment grain size, currents, food availability...) occurring in a field situation could lead to a misunderstanding of the biological effects of chemical

contaminants. This study suggests that molecular and immunological biomarkers should not be used alone in biomonitoring programs since interactions between chemical contaminants could alter their responses and lead to an underestimation of biological effects. Their complementary use with growth and condition indices could lead to a better understanding of the adverse effects of chemical contaminants on fish health.

Acknowledgements

This work was supported by post Grenelle programme 190, DEVIL of the French ministry for ecology and the Franco-British INTERREG IVA European project, DIESE. We would like to thank Prescilla PERRICHON, Lucie COURCOT, Vincent CORNILLE and Michel LAREAL for their help during the experiment assay.

Chapitre V : Effets des contaminants
chimiques sur l'état de santé de juvéniles de
flet : analyse in situ

Chapitre V : Effets des contaminants chimiques sur l'état de santé de juvéniles de flet : analyse in situ

Résumé

En complément des expériences de laboratoire et de caging exposées dans le chapitre précédent, une étude de terrain a été réalisée sur des juvéniles de flet prélevés dans des estuaires plus ou moins anthropisés. Le flet a été choisi pour ses qualités d'espèce sentinelle reconnues par plusieurs programmes de biosurveillance qui sont notamment une large aire de répartition géographique, un mode de vie benthique et une relative sédentarité. Une campagne a ainsi été menée en Octobre 2010 afin de prélever des juvéniles de flet du groupe 0 dans un estuaire en mer du Nord (l'Escaut), dans deux estuaires en Manche orientale (la Canche et la Seine) ainsi que dans un estuaire de la façade atlantique française (la Loire). La qualité environnementale de ces zones de nourriceries a été évaluée par des mesures complémentaires de contaminants chimiques et d'indices de condition analysés sur les individus prélevés. Les niveaux de contamination chimique présents dans les différents sites ont été analysés par la mesure des teneurs en métaux et HAPs dans le sédiment et celles des métaux dans le foie et les branchies des organismes. L'état de santé physiologique des juvéniles a été étudié par la mesure des indices de condition de Fulton et des rapports TAG/ST ainsi que par une analyse de forme des otolithes.

D'un point de vue chimique, l'estuaire de la Canche peut être considéré comme un estuaire de bonne qualité environnementale présentant de faibles concentrations en métaux et HAPs. Les flets prélevés dans cet estuaire présentaient également les concentrations en métaux les plus faibles dans les foies et branchies. Ces résultats confirment la prise en compte de cet estuaire comme site de référence. A l'inverse, les sédiments des trois estuaires anthropisés dépassent certains niveaux de toxicité. Les concentrations en mercure analysées dans le sédiment excèdent le niveau de toxicité ERL pour les trois estuaires ainsi que les concentrations en Cd, Pb et Zn pour l'Escaut et la Loire. Le sédiment de la Loire présente également des concentrations en Cr, Ni et Dibenzo(a,h)anthracène dépassant ce seuil de toxicité. Ces teneurs plus élevées en métaux dans le sédiment de ces trois estuaires par rapport à la Canche se retrouvent également dans les organes des juvéniles de flet avec des différences de concentration entre organes suivant le métal considéré. Les flets de la Seine présentent les concentrations les plus fortes en Hg, ceux de la Loire en As et Pb et ceux de

l'Escaut en Cd et Cu. Le foie apparaît plus sensible que les branchies à cette contamination métallique. Cette augmentation de contaminants chimiques à la fois dans le sédiment et les juvéniles issus des trois estuaires anthropisés est reliée à une diminution des indices de condition de Fulton et des indices lipidiques par rapport aux individus prélevés dans la Canche. Des taux de croissance plus faibles des juvéniles de flet prélevés dans la Seine, la Loire et l'Escaut ont également été suggérés par l'analyse de forme des otolithes bien que les variations de celles-ci restent faibles. Sur la base des relations taille-poids, cette diminution de l'état physiologique des juvéniles de flet issus de la Seine, l'Escaut et la Loire apparaît augmenter avec la taille des individus et donc avec le temps de séjour dans les estuaires depuis leur métamorphose.

Dans cette étude, les relations entre les concentrations en métaux dans les organes cibles des juvéniles de flet issus des quatre estuaires et les indices de conditions suggèrent des effets délétères de ces contaminants sur l'état physiologique des individus. Cette diminution de la condition des organismes reflète la baisse de la qualité environnementale des zones de nourriceries et ainsi le risque pour la survie des juvéniles et le recrutement des adultes. Néanmoins, l'étude de l'état de santé des organismes en condition *in situ* est sous l'influence d'autres facteurs environnementaux comme l'état nutritionnel des individus lors du prélèvement et/ou la présence de parasitisme qu'il faut considérer dans l'interprétation des résultats.

Metal bioconcentrations and condition indices in juvenile European flounder, *Platichthys flesus*, from French and Belgium estuaries.

Kerambrun^{1,2,3*} E., F. Henry^{1,2,3}, V. Cornille^{1,2,3}, L. Courcot^{1,2,3}, R. Amara^{1,2,3}.

¹ Univ Lille Nord de France

² ULCO, LOG, F-62930 Wimereux, France

³ CNRS, UMR 8187, F-62930 Wimereux, France

1. Introduction

In recent years, the scientific community has become increasingly aware of long-term impacts of chemical contaminants on marine environmental quality. Bioaccumulation patterns of metal in fish tissues can be used as effective indicators for both monitoring metal contamination of the environment and evaluating their bio-availability (Sultana and Rao, 1998). The organisms use for such bio-monitoring must meet certain conditions, amongst which not only feature their capacity to bio-concentrate the substance being studied, but also their abundance and their relative sedentarity, respectively allowing good coverage and geographic representation (Cossa, 1989; Nakhlé *et al.*, 2007). As the flounder fulfils most of these criteria, European flounder (*Platichthys flesus*), an abundant flatfish in European coasts, has been used in several biomonitoring programs since the 1970's (Misra *et al.*, 1989; Jensen and Cheng, 1987; Cossa *et al.*, 1992). It is an estuarine species that resides during its juvenile stage in estuaries, being also tightly linked to estuaries at the subadult and adult stages (Hylland *et al.* 1996, Kirby *et al.* 2000). Moreover, the flounder is a benthic fish living in contact with the sediment, the major compartment for contaminant storage in the aquatic environment, and is thus particularly exposed to chemical stress (Koehler, 2004, Minier *et al.* 2000). In general, studies were performed with large organisms, above 20 cm, since small fish do not provide such large amounts of tissue for analysis of metal concentrations. To our knowledge, until now, no investigation has been devoted to the metal determination in such juvenile fish, although these stages can be more sensitive than the adult stages. Juveniles are abundant along estuaries and coastal areas and represent a critical life stage for fish population renewal. Indeed, mortality is high during the first several months of fish life and only the few individuals surviving can contribute to the recruitment success (Beck *et al.*, 2001).

Distribution of metals is frequently specific tissue and depends largely on certain parameters, such as the exposure route, dose and time (Kalman *et al.*, 2010). Knowledge of the distribution of metal in tissues is useful in identifying particular organs that are sensitive and selective to metal accumulation (Szefer *et al.*, 1990). However, measuring pollutant concentrations in tissues do not provide the information needed to assess biological effects that contaminants may cause in organisms (Lehtonen and Schiedek, 2006). Results obtained from laboratory studies demonstrated that metal concentrations in fish tissues can result in direct energetic and physiological costs, expressed in decreased growth and low physiological condition as well as indirect costs due to the many defence mechanisms (Livingstone, 2001; Marchand *et al.*, 2004; van der Oost *et al.*, 2003; Fonseca *et al.*, 2009). Fish condition and its relationship with metal concentrations in the aquatic environment should also be monitored occasionally in the field to better understand the effects of metals on fish development and the current situation of population dynamics. Thus, in order to properly evaluate the effects of contaminants in organisms, complementary studies of bioaccumulation with effect biomarkers are strongly recommended (Fernandes *et al.*, 2008).

Fish health indicators, as condition and lipid storage indices, inform on metabolic cost induced by chemical contaminants and indirectly on the energetic status and growth of exposed individual (Adams *et al.*, 1990; Lambert et Dutil, 1997). These indices present the advantage to be relatively easy to measure and offer relevant information on fish health and thus are considered to reflect fish probability to survive. In addition to these common indices, recent studies have recommended otolith shape analysis as useful bioindicators of fish condition under environmental stress (Palmer *et al.*, 1994; Panfili *et al.*, 2005; Burke *et al.*, 2008). Numerous studies have demonstrated a significant relationship between otolith size and fish age, suggesting that otolith size can be used as a growth indicator (Boehlert, 1985; Choat *et al.*, 1996; Mug-Villanueva *et al.*, 1994; Newman *et al.*, 2000).

The aim of the present study was to evaluate, in field situation, the effects of chemical contaminants on 0-group flounders from three estuaries impacted by human activities by comparison with a reference site. Metal, PAH and PCB concentrations were determined in estuarine sediments and metal concentration in fish liver and gills, two target organs of contaminant accumulation. These levels of chemical compounds were then put in relation with juvenile flounder health using two indices frequently used to assess fish health : the Fulton's K index and a lipid index. In this work, we tested also the potentiality of otolith shape analysis for assess fish condition. This study was based on the assumption that this

combined used of metal contents in fish and measurements of fish condition could lead to a relevant assessment of habitat quality of anthropogenic estuaries.

2. Material and Methods

2.1. Flounder sampling

Juvenile flounders were collected in three French estuaries along the Atlantic coast (The Canche, Seine and Loire) and in a Belgium estuary (The Western Scheldt) (Fig. 1). The Canche is a small estuary with low domestic, agricultural and industrial effluents. A recent study on flounder from estuaries of the eastern part of the English Channel allowed to consider the Canche estuary as a reference site, displaying a low level of contaminants (PAHs and metals) and in which flounders appear in good condition (Amara *et al.*, 2009). The Scheldt, Seine and Loire estuaries are subjected to strong anthropogenic influences and are chronically polluted by mixture of chemicals. Indeed, the western arm of the Scheldt estuary is characterized by high metal pollution as it is a major drain for industrial and domestic wastes (Bayens, 1998). The Seine basin display high pollutant inputs as it concentrates 40% of the economic activity of France and 50% of the river traffic (Chiffolleau, 2001). The Loire estuary displays a strongly urbanized and industrialized basin, and thus shows a diffuse contamination, characterized by a mixture of metals, PAHs, PCBs and pesticides (RNO 2003).

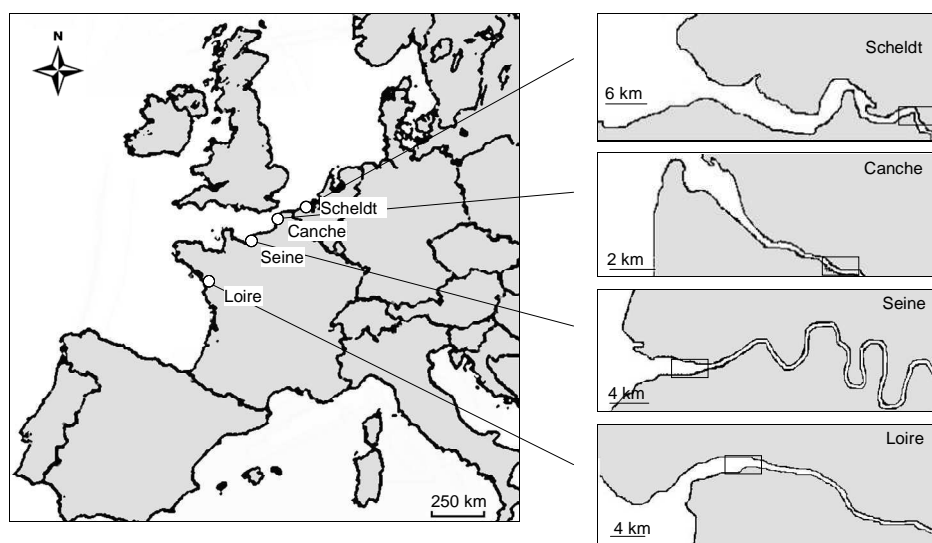


Fig. 1 (Figure 65) : Location of the four estuaries (Scheldt, Canche, Seine and Loire). The rectangular area represente the fish sampled area.

Flounder juveniles were collected in October 2010. Sampling was performed using a 1.5-m beam trawl, with one tickler chain and 5-mm mesh size in the cod end, towed by a zodiac against the current at two knots for 15 min. Immediately after sampling, 0-group flounders (879 individuals between 50.9 and 99.7 mm total length, TL) were sorted alive on board, kept in ice and transferred to -20°C in laboratory.

Each fish was measured for total length (near to 0.1 mm) and weight (near to 0.01 g) and was examined for external pathological abnormalities such as disease, fin erosion and were recorded as present or absent. Flounders used for chemical and biological analysis were chosen in order to avoid any difference in fish size between estuaries. Thirty flounders per estuary (TL : 79.8 ± 4.5 mm; W: 5.36 ± 0.96 g) were dissected for analysis of metal in livers and gills. Thirty other fish per estuary were used for biological analysis (TL : 70.1 ± 4.1 mm; W: 3.63 ± 0.65 g). Muscles were sampled and preserved at -20°C for lipid analysis. Their stomach was removed and their otoliths (sagittae) extracted and each was preserved in ethanol (95%).

2.2. Environmental parameters and sediment chemical contamination

At each station, physicochemical parameters (Temperature, salinity, oxygen, pH, turbidity) were recorded for each beam trawl hauls. Sediment was collected at low tide near each sample area, kept in ice box and preserved at -20°C in laboratory.

In order to determine selected metals (Al, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, V and Zn) in the total and bioavailable fractions, sediments were dried at 40 °C to constant weight and were ground to a powder. For the determination of total metals, about 0.250 g of ground sediments were digested with HF (Suprapur, Merck) at 110 °C for 48 h, followed by a mixture of concentrated acids HCl:HNO₃ (3:1, v:v, Suprapur Merck) at 120 °C for 24 h. This operation was repeated once. Metals associated with the reactive fractions of sediment, considered as bioavailable fractions, were estimated using the method of Huerta–Diaz and Morse (1990). The reactive fraction such as metals extracted by HCl 1 M shows values comparable to the sum of the first three reactive fractions in the Tessier extraction scheme (Tessier *et al.*, 1979). The reactive fraction comprises of metal exchangeable and linked to carbonates, partially to oxy–hydroxides of Fe–Mn and to acid volatile sulfides (AVS). About 0.5 g of sediment was leached during 24 h with 20 mL of 1 M HCl (Suprapur, Merck). The total and extractable metals were measured by inductively coupled plasma–atomic emission spectrometry

(ICP–AES, VARIAN Vista Pro, axial view). For quality assurance, reagents blanks, sample replicates and standard reference materials (MESS–3 and PACS–2, National Research Council Canada) were used to assess the accuracy and precision of the analyses. In all cases, the recovery efficiency was better than 85% for the total digestion of standard reference materials. Total Hg was measured in dry and ground sediment samples (without any pre–treatment) by means of atomic absorption spectroscopy (AAS) using an AMA 254 solid phase Hg–Analyzer (Altec Ltd., Prague, Czech Republic). Mean recovery for total Hg was 86 % for MESS-3.

The extent of sediment contamination was assessed using the enrichment factor (EF) (Salomons and Forstner, 1984). Commonly, normalization of the metals to a conservative element such as Al is employed as an index (EF) to evaluate anthropogenic influences to the sediments. The EF is defined as:

$$EF = (X/Al)_{sample} / (X/Al)_{background},$$

where $(X/Al)_{sample}$ is the metal to Al ratio in the sample of interest, $(X/Al)_{background}$ is the natural background value of metal to Al ratio. EF values were interpreted as suggested by Birth (2003) for the metals studied with respect to upper crust average (Taylor and McLennan, 1995). $EF < 1$ indicates no enrichment, $EF < 3$ is minor enrichment, $EF = 3–5$ is moderate enrichment, $EF = 5–10$ is moderately severe enrichment, $EF = 10–25$ is severe enrichment, $EF = 25–50$ is very severe enrichment, and $EF > 50$ is extremely severe enrichment.

The persistent organic pollutants, including PAHs (EPA's 16 priority PAHs) and PCBs (7 congeners) were analysed. Briefly, organic compounds were extracted from 2 g of dried sediment by a microwave oven (120 °C for 15 min, 1200 W) assisted extraction with 40 mL of a mixture of acetone and hexane (1:1, v:v). The solvent was evaporated under a stream of nitrogen in a TurboVap, and then concentrated to 1 mL of hexane. Simultaneous determination of PAHs and PCBs was performed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS, VARIAN, CP 3800 – 1200 MS TQ), with a ZB–MultiResidue column (30 m, 0.25 mm, 0.25 µm; Phenomenex). Identification of PAH compounds and PCB congeners was based on the comparison of their GC–retention times and their mass spectrum, with appropriate individual standards.

A way to assess sediment toxicity is the use of contamination sediment quality guidelines. Long *et al.*, (1995) identified two guideline values: the effects range–low (ERL) and the

effects range–median (ERM). Concentrations above the ERL, represent a possible–effects range within which effects would occasionally occur. The concentrations above the ERM values represent a probable–effects range within which effects would frequently occur. In the present study, chemical contaminant contents in sediments were discussed according to these guidelines.

2.3. Metal analysis in livers and gills.

Due to the small size of the juvenile, the livers and gills of six fish were pooled and thus five samples were analysed for each condition and each tissue. After sampling, gills were rinsed with Milli–Q water to eliminate potential sedimentary particles associated with mucus. Liver and gill pools were then lyophilised for analysis of metal concentrations. Samples were digested with HNO₃ (65%, Suprapur Merck) at an ambient temperature for 24 h and then at 100 °C for 4 h. Concentration of As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Se, V and Zn were determined by inductively coupled plasma–mass spectrometry (ICP–MS; VARIAN 820). Standard curves were used to determine Zn in both tissues, Cu in liver and Mn in gills, whereas a standard addition technique was applied for the resolution of matrix effects to calculate other metal contents. Concentrations of Hg were analysed by atomic absorption spectroscopy (AAS) using an AMA 254 solid phase Hg–Analyzer (Altec Ltd., Prague, Czech Republic). International certified standard (DORM–3, DOLT-4, NRC Canada) was used to control the accuracy of the analytical procedure.

2.4. Biological analysis

2.4.1. Weight-Length relationships

The estimation of W-L relationships was made by the adjustment of an exponential curve to the data from all fish sampled in each estuary (Quinn II and Deriso, 1999) : $W = aL^b$, where (*W*) is the body mass (mg) and (*L*) is the total length (mm).

The Fulton's K condition index which assumes that heavier fish for a given length are in better condition was calculated for all fish with the formula : $K = 100(W/L^3)$. The K was calculated for each estuary among 5 size groups (5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10 cm).

2.4.2. Feeding analysis

The stomach contents of thirty flounders per estuary were analysed under a microscope. The main prey categories were identified and counted. The vacuity index was calculated as the number of empty stomachs divided by the total number of stomachs examined x 100.

2.4.3. Lipid content and TAG:ST ratios.

Lipid content was measured in muscles of ten fish per estuary and a lipid storage index was estimated based on the ratio of the quantity of triacylglycerols (TAG; reserve lipids) to the quantity of sterols (ST; structural lipids) in the fish. The TAG content is dependent on the nutritional state of the fish as they are a main reserve of energy in teleosts and the first components to be mobilised during periods of stress, while sterol contents remain essentially unchanged during starvation (Galois *et al.*, 1990). The amount of total lipids in each individual was measured on a sample of lyophilised muscle (0.07 g). Lipid extraction was conducted using the method of Bligh and Dyer (1959) slightly modified as described by Amara *et al.* (2007). Lipids were extracted according to a mixture of water:chloroform:methanol (1:1:1, v/v/v). TAGs and sterols were separated from other lipids by performing thin layer chromatography (TLC).

2.4.4. Otolith measurements

Sagittae were cleaned and photographed to determinate the length (mm), the width (mm), the perimeter (mm) and the area (mm²) of each otolith (left and right) using an Image Analysis System (TNPC, 5.0, NEOSIS). Each otolith parameter was then normalized with the length (LT, cm) of respective fish.

For bilaterally symmetric organisms, developmental stability can be measured by a variable named fluctuating asymmetry (FA) that corresponds to deviations from a perfect bilateral symmetry in a morphological character (Parsons, 1992; Somarakis *et al.*, 1997; Panfili *et al.*, 2005). Therefore, fluctuating asymmetry (FA) in otolith was calculated in order to test difference between estuaries. FA was estimated using the differences for each variable between the right and left otoliths using the formula (example for the area) : $FA = |Area_{RO} - Area_{LO}| / Area_{[RO,LO]}$, where $Area_{RO}$ is the area of the right otolith, $Area_{LO}$ is the area of the left otolith and $Area_{[RO,LO]}$ is the mean area between right and left otoliths. FA was then the mean of FA_i for each sample. FA was calculated accordingly for each parameter.

2.5. Statistical analysis

Statistics were performed with XLSTAT 2007. Differences in biological parameters between fish from the four estuaries were analysed with one-way ANOVA, followed by post-hoc Tukey tests. If biological data did not comply with the parametric assumption of normality and homogeneity of variance after various transformation techniques were tested, the non-parametric Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U test for post hoc pairwise comparisons were used. These non-parametric tests were also used to analyse differences in metal bioaccumulation in livers and gills. Relationships between metal concentrations in the total and reactive fraction of sediment and metal contents measured in tissues were analysed by performing Pearson correlations. Comparison of fish weight-length relationships between estuaries was analysed by performing a multiple regression analysis of log-transformed variable with Statgraphics Centurion XVI.

3. Results

3.1. Sediment chemical contamination

The results of metal and PAH concentrations in the total fraction expressed as mg. kg⁻¹ of dry sediment are reported for each estuary in Table 1. No PCB was detected in any estuary above 0.01 mg.kg⁻¹. Among the four estuaries, the Canche sediment displays the least concentrations in all elements analysed. Metal concentrations found in Seine sediment were approximatively two times higher than in Canche but remains lower than those observed in the Scheldt and Loire estuaries except for Hg concentrations which were of the same order of magnitude. Different levels of metal concentrations were found in Scheldt and Loire estuaries among the metal. Indeed, Scheldt sediment displays higher concentrations in Cd (2.39 ± 0.11 mg.kg⁻¹), Hg (0.29 ± 0.01 mg.kg⁻¹) and Zn (212 ± 4 mg.kg⁻¹) whereas Loire sediment had higher concentrations in Cr (103 ± 1 mg.kg⁻¹), Cu (28.2 ± 0.5 mg.kg⁻¹), Ni (35.5 ± 1.6 mg.kg⁻¹), Pb (78.7 ± 1.6 mg.kg⁻¹) and V (100 ± 1 mg.kg⁻¹).

Only 2 PAHs was detected in Canche sediment whereas 8, 12 and 13 PAH compounds were quantified in Seine, Loire and Scheldt estuaries, respectively. The Scheldt estuary was therefore the most contaminated in organic compounds with Σ PAHs = 2.68 mg.kg⁻¹ compared to Loire (1.71 mg.kg⁻¹), Seine (0.6 mg.kg⁻¹) and Canche (0.12 mg.kg⁻¹).

Table 1 (Tableau 30) : Mean (\pm SD) abiotic parameters, sediment metal and PAHs concentrations (mg.kg^{-1} dry weight) in the four estuaries (Scheldt, Canche, Seine and Loire). ERL and ERM guidelines values defined by Long *et al.* (1995) are also presented. (¹) Concentration that exceeds the ERL

	Scheldt	Canche	Seine	Loire	ERL	ERM
T (°C)	17.3	13.1 \pm 3.6	14.4 \pm 2.0	16.04		
S (PSU)	10.75	19.7 \pm 11.3	24.5 \pm 1.8	18.42		
pH	8.12	8.24 \pm 0.40	8.51 \pm 0.40	8.11		
O ₂ (mg.L^{-1})	6.83	7.16 \pm 0.73	6.81 \pm 0.61	8.11		
Turbidity (NTU)	33.1	18.3 \pm 15.4	170 \pm 9	354		
Metals						
Cd	2.39 \pm 0.11 ¹	0.42 \pm 0.06	0.64 \pm 0.03	1.36 \pm 0.19 ¹	1.20	9.60
Cr	74.9 \pm 1.1	32.1 \pm 0.9	44.3 \pm 1.2	103 \pm 1 ¹	81	370
Cu	25.9 \pm 0.4	6.26 \pm 0.25	13.4 \pm 0.5	28.2 \pm 0.5	34	270
Hg	0.29 \pm 0.01 ¹	0.04 \pm 0.01	0.21 \pm 0.01 ¹	0.17 \pm 0.01 ¹	0.15	0.71
Ni	17.8 \pm 0.9	10.8 \pm 0.5	13.9 \pm 0.3	35.5 \pm 1.6 ¹	20.9	51.6
Mn	520 \pm 8	190 \pm 3	331 \pm 4	587 \pm 6		
Pb	49.0 \pm 1.4 ¹	11.7 \pm 0.5	23.7 \pm 0.9	78.7 \pm 1.6 ¹	46.7	218
V	63.0 \pm 0.7	33.5 \pm 0.1	38.1 \pm 0.4	100 \pm 1	150	410
Zn	212 \pm 4 ¹	46.1 \pm 0.9	78.4 \pm 1.2	164 \pm 3 ¹		
Al	33030 \pm 694	17320 \pm 364	24340 \pm 280	67400 \pm 959		
PAHs						
Naphtalene	0.07 \pm 0.03	<0.05	<0.05	0.05 \pm 0.02	0.16	2.10
Acenaphthylene	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.04	0.64
Acenaphthene	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.02	0.50
Fluorene	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.02	0.54
Phenanthrene	0.19 \pm 0.03	<0.05	0.07 \pm 0.01	0.12 \pm 0.02	0.24	1.50
Anthracene	0.07 \pm 0.02	<0.05	<0.05	<0.05	0.09	1.10
Fluoranthene	0.32 \pm 0.06	0.06 \pm 0.01	0.1 \pm 0.02	0.2 \pm 0.04	0.60	5.10
Pyrene	0.26 \pm 0.04	<0.05	0.08 \pm 0.01	0.15 \pm 0.03	0.67	2.60
Benzo(a)anthracene	0.3 \pm 0.02 ¹	<0.05	0.07 \pm 0.01	0.2 \pm 0.02	0.26	1.60
Chrysene	0.23 \pm 0.05	<0.05	0.05 \pm 0.01	0.13 \pm 0.03	0.38	2.80
Benzo(b)fluoranthene	0.22 \pm 0.16	<0.05	0.06 \pm 0.04	0.15 \pm 0.11		
Benzo(k)fluoranthene	0.41 \pm 0.19	0.06 \pm 0.03	0.11 \pm 0.05	0.26 \pm 0.12		
Benzo(a)pyrene	0.14 \pm 0.02	<0.05	<0.05	0.1 \pm 0.02	0.43	1.60
Indeno(123-cd)pyrene	0.15 \pm 0.01	<0.05	0.06 \pm 0.01	0.13 \pm 0.01		
Dibenzo(a,h)anthracene	0.11 \pm 0.02 ¹	<0.05	<0.05	0.07 \pm 0.01 ¹	0.06	2.60
Benzo(ghi)perylene	0.21 \pm 0.15	<0.05	<0.05	0.15 \pm 0.11		
Total PAHs	2.68	0.12	0.6	1.71		

To evaluate sediment toxicity, Table 1 also gives the levels of two contamination sediment quality guidelines for some trace metals and PAHs. The Canche sediment was the only one which presented no concentration that exceeded the guideline values. Our results reported that the Scheldt sediment displays concentrations in Cd, Cu, Pb and Zn exceeding the ERL values. The Scheldt sediment presented also the highest concentration in PAHs with two

compounds exceeding the ERL values. Among the four estuaries, the Loire sediment appears the most potentially toxic with concentrations in Cd, Cr, Hg, Ni, Pb and Zn which exceed ERL guidelines.

EF values and percentage results of metals measured in the reactive fraction of sediments collected in the four estuaries are given in Table 2. Following normalization with Al, EF values were quite similar between estuaries for Cr, Ni and V. High ratios (EF > 10) were found for Cd in all sediments with the highest for Scheldt sediment. A moderately severe enrichment was reported in Pb for Scheldt and Loire and in Zn for the Scheldt estuary. With regard the bioavailability of metals in the sediment, no major trend could be proposed except a slight decrease of Cd, Pb and Zn in the reactive fraction of the Loire sediment. In all estuarine sediments, Cu, Mn, Pb and Zn showed a strong affinity with the acid-soluble fraction, which represented more than 60 %, while Cr, Ni and V remained lower than 40 %.

Table 2 (Tableau 31) : Percentage (%) of metals potentially reactive towards biota and Enrichment Factor (EF) values for the four estuaries (Scheldt, Canche, Seine and Loire).

	Scheldt	Canche	Seine	Loire
EF				
Cd	59	20	22	17
Cr	5	4	4	4
Cu	3	1	2	1
Mn	2	1	2	1
Ni	2	3	2	2
Pb	6	3	4	5
V	3	3	2	2
Zn	7	3	4	3
Reactive fraction (%)				
Cd	78	63	55	41
Cr	20	17	24	24
Cu	76	91	76	72
Mn	81	69	82	70
Ni	38	20	37	31
Pb	79	100	100	74
V	21	25	20	21
Zn	78	73	73	60

3.2. Metal concentrations in fish tissues

Differences in levels of metal concentrations were found between fish liver and gills (Table 3). Concentrations of As, Cd, Co, Cu and Se were higher in liver whereas gills exhibited higher contents of Mn, Pb, V and Zn. For all metals analysed in both gills and

livers, flounder from the Canche estuary displayed the lowest concentrations except for Hg and Cu in gills. Flounders from Scheldt estuary presented the highest concentrations of Cu in liver and Cd in both tissues. The highest concentrations of Hg in liver, and Pb and Zn in gills, were observed in fish from Seine estuary.

Table 3 (Tableau 32) : Mean (\pm SD) metal concentrations ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ dry weight) in liver and gills of flounders sampled in the four estuaries (Scheldt, Canche, Seine and Loire). $n=5$. (¹), (²), (³), (⁴) represent significant difference ($p < 0.05$) compared to Scheldt, Canche, Seine and Loire respectively.

	Tissues	Scheldt	Canche	Seine	Loire
As	L	6.96 ± 0.86	2.77 ± 0.65	12.5 ± 0.6^2	$15.1 \pm 1.1^{1,2}$
	G	2.66 ± 0.11^2	1.41 ± 0.19	2.78 ± 0.41^2	4.31 ± 0.38^2
Cd	L	$3.02 \pm 0.52^{2,4}$	0.12 ± 0.06	0.58 ± 0.06^2	0.24 ± 0.02
	G	$0.12 \pm 0.01^{2,4}$	0.02 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Co	L	1.08 ± 0.13	0.51 ± 0.09	1.15 ± 0.17^2	$1.79 \pm 0.32^{1,2}$
	G	0.37 ± 0.08^2	0.25 ± 0.06	0.39 ± 0.02^2	0.54 ± 0.01^2
Cr	L	1.17 ± 0.24	0.77 ± 0.15	1.39 ± 0.20^2	1.24 ± 0.21^2
	G	1.45 ± 0.45^2	0.94 ± 0.14	$1.57 \pm 0.21^{1,2}$	1.14 ± 0.22
Cu	L	$73.8 \pm 6.7^{2,3,4}$	18.7 ± 7.3	46.6 ± 3.5	48.9 ± 11.0^2
	G	3.42 ± 0.38	2.88 ± 0.45	3.39 ± 0.27	3.14 ± 0.28
Hg	L	0.12 ± 0.01^2	0.10 ± 0.01	$0.31 \pm 0.06^{2,4}$	0.11 ± 0.01
	G	0.09 ± 0.01	0.12 ± 0.03^4	0.15 ± 0.03^4	0.06 ± 0.01
Mn	L	5.13 ± 2.05	4.90 ± 0.47	8.70 ± 2.80	$10.5 \pm 1.71^{1,2}$
	G	41.3 ± 5.8	45.4 ± 5.6	50.1 ± 8.2	107 ± 16.4^2
Ni	L	0.43 ± 0.06	0.20 ± 0.07	$1.14 \pm 0.13^{1,2}$	0.96 ± 0.28^2
	G	2.38 ± 0.24^2	1.66 ± 0.39	2.43 ± 0.20^2	2.19 ± 0.19
Pb	L	0.36 ± 0.09	0.11 ± 0.04	0.49 ± 0.06^2	0.60 ± 0.25^2
	G	1.20 ± 0.08^2	0.34 ± 0.25	$1.43 \pm 0.21^{2,4}$	0.97 ± 0.22
Se	L	12.2 ± 1.82^2	5.03 ± 0.55	9.58 ± 1.83	12.7 ± 1.24^2
	G	$7.47 \pm 0.72^{2,3}$	3.95 ± 0.47	5.60 ± 0.50	6.37 ± 0.18^2
V	L	1.69 ± 0.26^2	0.87 ± 0.16	1.32 ± 0.14	1.54 ± 0.24^2
	G	$3.85 \pm 0.52^{2,4}$	1.68 ± 0.39	3.18 ± 0.24^2	2.71 ± 0.26
Zn	L	201 ± 20^2	133 ± 7	179 ± 19	193 ± 11^2
	G	416 ± 22^2	307 ± 25	$445 \pm 24^{2,4}$	361 ± 16

Significant correlations of measurements of metal were analysed between sediment and liver for most of metals in a decreasing correlation order: Cd, Co, Zn, Cu, Pb, V, and Ni (Table 4). When applied with metal concentrations measured in fish gills, only significant correlations for Cd, Co and Mn were detected.

Table 4 (Tableau 33) : Pearson's correlation between metal concentrations analysed in the total and reactive fractions of sediments from the four estuaries (Scheldt, Canche, Seine and Loire) and the metal content in flounder liver and gills. n=20. Significant correlation for $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$ and $p^{***} < 0.001$.

		Liver	Gills
Cd	Total	0.78***	0.76***
	Reactive	0.96***	0.94***
Co	Total	0.77***	0.69***
	Reactive	0.76***	0.69***
Cr	Total	0.37	0.04
	Reactive	0.42	0.09
Cu	Total	0.74***	0.31
	Reactive	0.75***	0.33
Hg	Total	0.27	-0.22
	Reactive	-	-
Mn	Total	0.38	0.55*
	Reactive	0.34	0.44
Ni	Total	0.45*	0.21
	Reactive	0.51*	0.42
Pb	Total	0.65**	0.36
	Reactive	0.65**	0.33
V	Total	0.58**	0.27
	Reactive	0.51*	0.17
Zn	Total	0.77***	0.33
	Reactive	0.75***	0.39

3.3. Vacuity index

Differences in fish vacuity index were encountered among the four estuaries. Fish from Seine (30 %) and Scheldt (47 %) estuaries exhibited the lowest percentage of empty stomach whereas those from Canche (73 %) and Loire (93 %) presented the highest.

3.4. W-L relationships

Fish length-weight relationships were first analysed by the exponential curve of data from each estuary (Fig. 2). With the $W = aL^b$ model, it could be visualized that fish from Canche estuary presented higher weight for a given length compared to the three other estuaries, especially with increasing length. The linear model with $\ln(\text{length})$ as predictor variable for $\ln(\text{weight})$ resulted in high coefficient of determination R^2 between 0.97 and 0.98 for each estuary. Based on multiple regression analysis, regression slope of Seine fish were significantly lower compared to Canche.

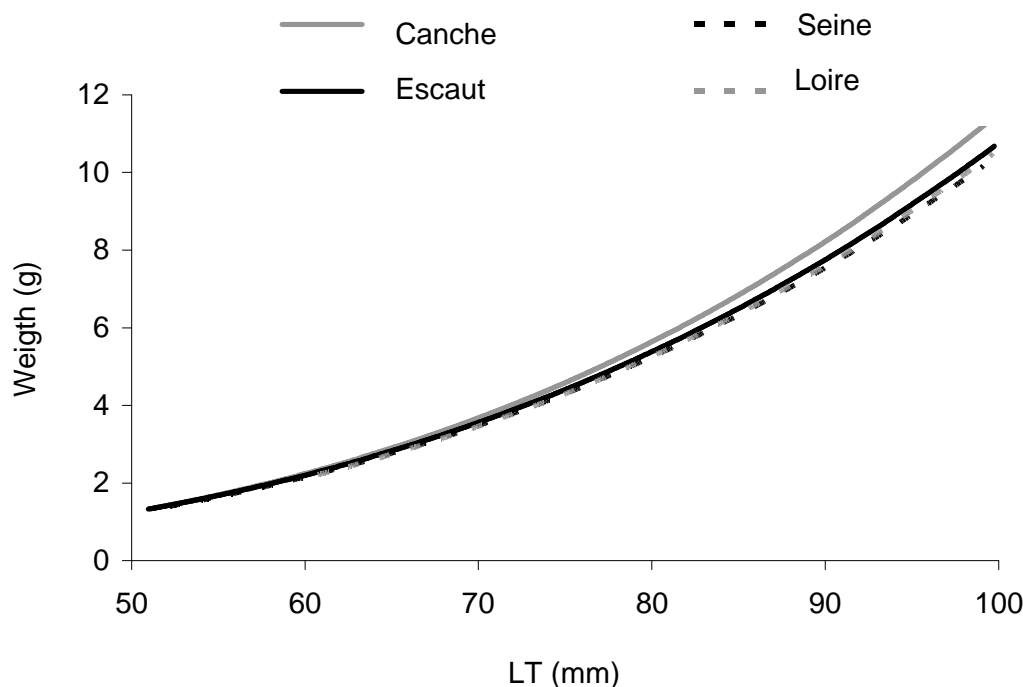
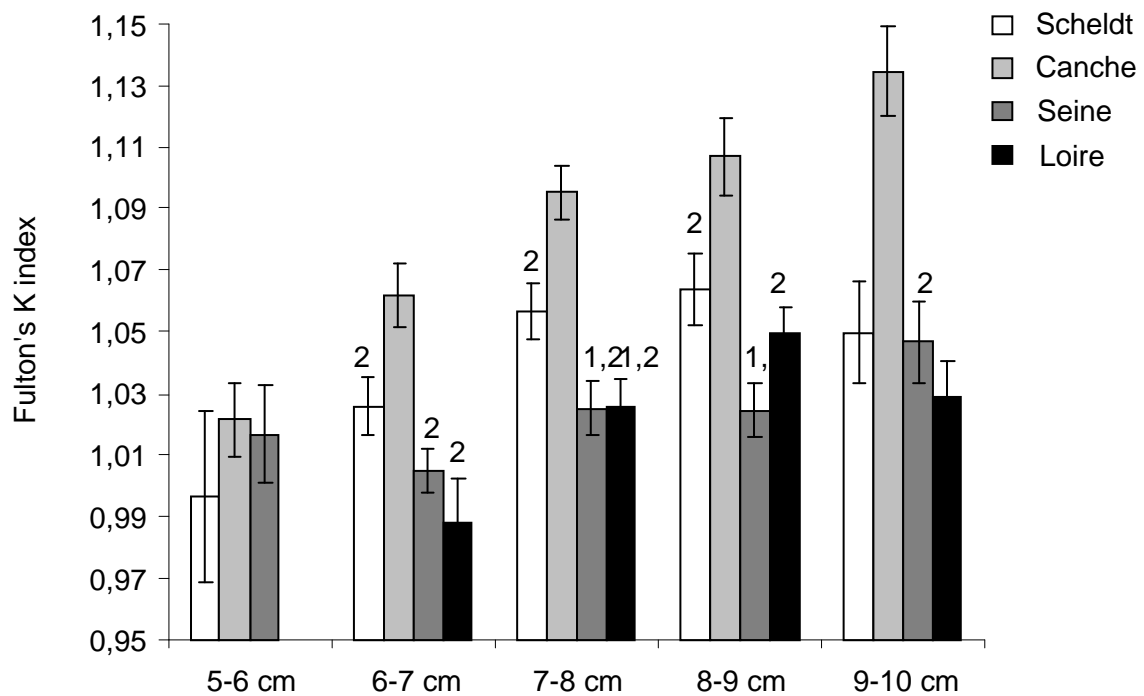


Fig. 2 (Figure66) : Weight-Length relationships of flounders sampled in the four estuaries (Scheldt, Canche, Seine and Loire). n=137 for Scheldt, n=277 for Canche, n=255 for Seine and n=210 for Loire.

Fulton's K indices were compared between estuaries for each fish size-group (Fig. 3). Except for the "5-6 cm" group, flounders from Scheldt, Seine and Loire presented significant

lower K index compared to Canche for the four size-groups ranged between 6 and 10 cm . This difference between Canche and other estuaries seems to increase with the fish length. K indices of fish from the Seine and Loire estuary were also significantly lower than Scheldt estuary for the “7-8 cm” group.

Fig. 3 (Figure 67) : Comparison of Fulton's K condition index for five size group of flounders sampled in the four estuaries. n=30. (1), (2), (3), (4) represent significant difference ($p < 0.05$) compared to Scheldt, Canche, Seine and Loire respectively.



3.5. Lipid analysis

Total lipid content in muscles was significantly higher in fish from the Canche estuary compared to the three others (Fig. 4). While TAG:ST ratios were found below 0.1 for all fish analysed, significant higher ratios were recorded in flounders from Canche (0.042 ± 0.014) compared to the Scheldt (0.004 ± 0.001) and Loire (0.001 ± 0.001) estuaries. Fish from Seine (0.011 ± 0.005) estuary presented also lower TAG: ST than Canche but difference was not significant.

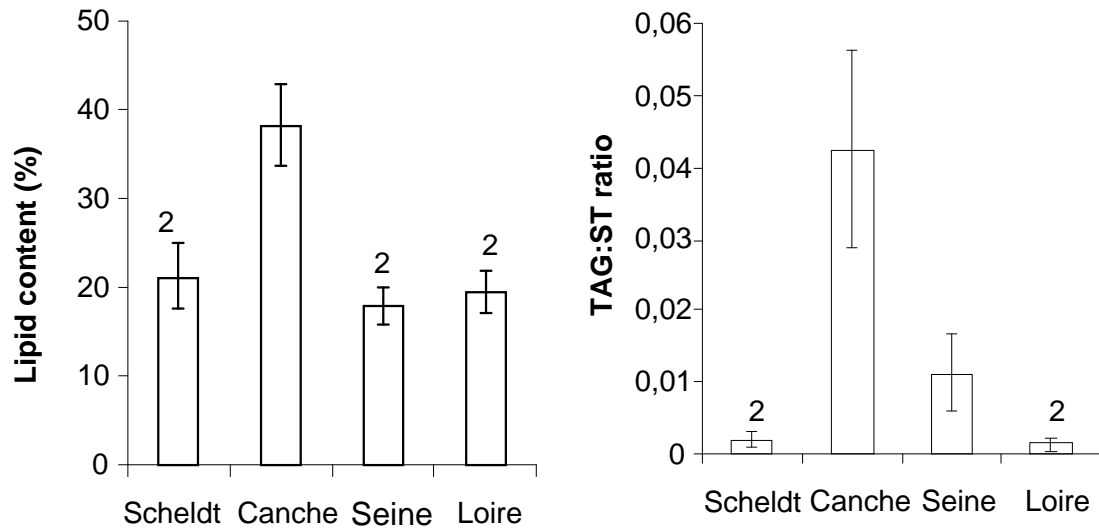


Fig. 4 (Figure 68) : Comparison of (a) lipid contents and (b) TAG:ST ratios of flounders sampled in the four estuaries. n=10. (1), (2), (3), (4) represent significant difference ($p < 0.05$) compared to Scheldt, Canche, Seine and Loire respectively.

3.6. Otolith measurements

Otolith area was significantly higher in fish from Seine (L : $0.293 \pm 0.023 \text{ mm}^2.\text{cm}^{-1}$; R : $0.289 \pm 0.023 \text{ mm}^2.\text{cm}^{-1}$) and Loire (L : $0.286 \pm 0.018 \text{ mm}^2.\text{cm}^{-1}$) estuaries compared to the Canche (L : $0.271 \pm 0.020 \text{ mm}^2.\text{cm}^{-1}$; R : $0.268 \pm 0.020 \text{ mm}^2.\text{cm}^{-1}$) (Table 5). Significant higher otolith width was observed in fish from the Scheldt (L : $0.202 \pm 0.008 \text{ mm}.\text{cm}^{-1}$; R : $0.201 \pm 0.008 \text{ mm}.\text{cm}^{-1}$) estuary compared to the Canche (L : $0.194 \pm 0.009 \text{ mm}.\text{cm}^{-1}$; R : $0.193 \pm 0.010 \text{ mm}.\text{cm}^{-1}$). Among the four parameters analysed in left and right otolith, no differences in fluctuation asymmetry were recorded.

Table 5 (Tableau 34) : Comparison of left (L) and right (R) otolith measurements normalized with fish length (weight, area, length, width and perimeter) and fluctuation of asymmetry for each parameter between the four estuaries. n=30. (²), represent significant difference ($p < 0.05$) compared to Canche.

		Scheldt	Canche	Seine	Loire
Area (mm ² .cm ⁻¹)	L	0.283 ± 0.021	0.271 ± 0.020	0.293 ± 0.023 ²	0.286 ± 0.018 ²
	R	0.281 ± 0.020	0.268 ± 0.020	0.289 ± 0.023 ²	0.281 ± 0.016
	FA	0.028 ± 0.016	0.022 ± 0.025	0.029 ± 0.020	0.025 ± 0.019
Length (mm.cm ⁻¹)	L	0.274 ± 0.012	0.274 ± 0.011	0.275 ± 0.015	0.281 ± 0.016
	R	0.272 ± 0.012	0.272 ± 0.011	0.272 ± 0.016	0.276 ± 0.014
	FA	0.030 ± 0.016	0.020 ± 0.029	0.029 ± 0.019	0.022 ± 0.017
Width (mm.cm ⁻¹)	L	0.202 ± 0.008 ²	0.194 ± 0.009	0.199 ± 0.008	0.199 ± 0.010
	R	0.201 ± 0.008 ²	0.193 ± 0.010	0.198 ± 0.008	0.198 ± 0.010
	FA	0.019 ± 0.018	0.022 ± 0.014	0.016 ± 0.015	0.016 ± 0.017
Perimeter (mm.cm ⁻¹)	L	0.756 ± 0.027	0.743 ± 0.027	0.753 ± 0.035	0.760 ± 0.032
	R	0.751 ± 0.027	0.738 ± 0.026	0.747 ± 0.030	0.752 ± 0.031
	FA	0.017 ± 0.019	0.014 ± 0.018	0.018 ± 0.011	0.015 ± 0.010

4. Discussion

4.1. Chemical contamination

Metal and PAH concentrations found in Canche sediment were on the same order of magnitude that those found in a previous study on the same area (Amara et al., 2009). Concentrations obtained in the sediment collected at the site named “Grande Vasière Nord” in Seine estuary were in the minimal values of the range reported previously (Dauvin, 2008, Clarisse et al., 2003). In the early 1980s, the Seine river basin was considered to be one of those most affected by trace metals, PAH and polychlorinated biphenyls (PCB) in Europe (Chiffolleau, 2001, Meybeck et al, 2004, Chevreuil, 1996). A general decrease of metal contents in the Seine river was then observed over the past 20 years following metal emission regulations (Meybeck et al., 2007). Therefore, in the present study, metals analysed in Seine sediment presented concentrations exceeding the ERL guideline values only for mercury but its concentration was found to be similar to the lowest values reported by Foucher (2002). In the same way, an historical overview based on trace metal contents of suspended matter in the Scheldt estuary reported a decrease of Cd, Cr, Ni and Zn between 1978 and 1993 (Nolting et al., 1999). In the same study area, measured contents of Cd, Cr, Cu Mn, Ni, Zn can be

compared with previous values reported by Laing et al (2009) on superficial intertidal sediment. Compatible values were found for Cr whereas our concentrations were generally twice lower. Likewise, in the same area, metal concentrations in Cd, Cu, Pb and Zn in the Scheldt sediment was found be higher than those reported earlier in Danis et al. (2004). . Sediment total fractions collected in the Loire estuary were more enriched in Cd, Cu, Mn, Pb and Zn compared to contents measured at the same location in the fine fraction (< 45 µm) by Piron et al., (1990). More recently, Negrel (1997) reported sediment concentrations in common investigated metals (Pb and Zn) in the same order of magnitude than those found in the present study.. Among the four estuaries, Loire sediment showed the highest concentrations in lead. Indeed, previous studies on metal contamination in Loire estuary have shown an important Pb contamination from industrial sources (Boutier et al., 1993). However, normalisation with respect to Al characteristic element of residual alumina-silicate fraction moderates this enrichment with EF in Loire sediment lower than Seine for Cd and Cu and than Scheldt for Cr, Pb and Zn. This tendency was confirmed by bioavailability data with the Loire sediment presented lower percentages of Cd, Pb and Zn concentrations in the reactive fraction of sediment than other estuaries.

As the flounder fulfils most criteria for selection as an indicator species, numerous studies have analysed metal concentrations in this European species (Cossa *et al.*, 1992; Beyer *et al.*, 1996; Goksøy *et al.*, 1996; Burgos and Rainbow, 2001; Vinagre *et al.*, 2004; Reynolds *et al.*, 2003; Henry *et al.*, 2004; Nakhlé *et al.*, 2007; Evrard *et al.*, 2010; Vasconcelos *et al.*, 2010). Most of these studies have particularly measured Cd, Cu, Pb and Zn in flounder liver and most of analysis were realised on flounder of size about 20-30 cm. Metal concentrations found in liver of flounders from Canche estuary were similar to those found in flounders sampled in other French areas weakly impacted by human activity like the Ster (Evrard *et al.*, 2010) or the Somme (Henry *et al.*, 2004). On contrary, flounders from Scheldt, Seine and Loire estuaries displayed metal concentrations in the same order of magnitude than those reported in flounder from anthropogenic coastal area like the Gironde estuary (Evrard *et al.*, 2010) and Calais coast (Henry *et al.*, 2004) in France or the Douro estuary in Portugal (Vinagre *et al.*, 2004). Flounder from Scheldt estuary displayed particularly high content of Cd compared to other studies. Metal concentrations in liver have already been studied in flounder form Seine (Henry *et al.*, 2004; Miramand *et al.*, 2001) and Loire (Evrard *et al.*, 2010) estuaries. We found globally higher concentrations than these previous studies and especially for the Seine estuary. It is well established that the metal concentration of aquatic organisms can vary with their size. Indeed, certain metals accumulate with age whereas the

growing of the tissue has the effect of lowering their metal concentration (Cossa *et al.*, 1992). For example, mercury concentration is found to be lower in fast-growing individuals than in slow-growing ones because the mercury accumulated in fish is diluted into a larger body mass (Huang *et al.*, 2010). Moreover seasonal differences of metal bioaccumulation in fish have been reported and could be attributed to the freshwater input variability observed in estuaries along the seasonal cycle, the metal speciation in estuarine waters linked to salinity and/or the increased metabolism due to high temperature (Waeles *et al.*, 2005; Masoud *et al.*, 2007; Evrard *et al.*, 2010).

In the present study, differences in metal concentrations were observed between liver and gills. These differences might be a result of their capacity to induce metal-binding proteins such as metallothioneins. Indeed, the liver is involved in the main metabolic activities, such as detoxification; thus, metals are transported from other tissue to this organ for its subsequent elimination through induction of those metal-binding proteins or binding to insoluble fractions (Klaverkamp *et al.*, 1984). High levels of metals accumulate also in the gill tissues by absorption. The gill is a tissue which was active and passive exchanges occur between the animal and aquatic environment (Heath, 1987; Dural *et al.*, 2006). Indeed, the gills are generally the primary uptake sites, although these tissues are not necessarily the final accumulators of the metals. In the present study, copper concentrations were found more than 10 times higher in liver than in gills which could be related to the fact that the liver not only accumulates Cu, but it also plays an important role in Cu homeostasis (Grossell *et al.*, 1998). On the opposite, Mn concentrations were found about 10 times higher in gills than in liver. Rouleau *et al.* (1995) suggested that uptake of manganese probably occurs mainly via the gills and is then transported by the blood to various organs and tissues.

Whereas strong significant correlation was found between Cd in fish and in sediment for both tissues, much more correlations with other metals were found for liver than gills. This fact suggest than liver would be more sensitive to metal bioconcentrations than gills. It has been reported that gill mucus layer likely acted as a transitory barrier preventing accumulation of metals by gills tissue (Kraemer *et al.*, 2005; Visnjic-Jeftic *et al.*, 2010). The absence of correlation with some metals could be also explained by the trend of essential metal regulation in tissue (Burgos and Rainbow, 2001). Links between metal concentrations in fish and in sediment are also mainly related to the bioavailability of these metals in the sediment. Indeed, the decrease of metal bioavaialability in Loire sediment might have lead to lower metal concentrations in fish tissues. It is also a question of the role of metal uptake via bio-transference from prey and the biomagnification of metal contamination through food webs

which represent a potential source of contamination. Indeed, juvenile flounders feed on a variety of polychaetes, crustaceans and amphipods (Aarnio *et al.*, 1996; Vinagre *et al.*, 2008) which could concentrate metals from the sediment or the water-column. Moreover, the migrations by flounder within the estuary can be seen as one possible explanation for the variability between metals concentrations analysed in sediment sampled the days of fish collection and those found in fish tissues. For instance, metal concentrations increase from the Seine bay to the upper Seine estuary (Cachot *et al.*, 2006).

4.2. Biological analysis

Based on weight-length relationships and the Fulton's K condition index, fish from Canche estuary were found in better condition than fish from Scheldt, Seine and Loire estuaries. This general decrease of fish condition factor in french contaminated estuaries was also reported in previous studies on the European flounder (Laroche *et al.*, 2002; Marchand *et al.*, 2004; Amara *et al.*, 2009). Moreover in the present study, the difference on fish condition between the Canche and the other sites appears to increase with the fish size and consequently with their age. Based on the assumption that the chemical contamination of anthropogenic estuaries are in part responsible of the decrease of fish condition, it appears that flounder would integrate these chemical effects with increasing time spent in such contaminated areas. Indeed, the Fulton's K condition index is considered as a long term parameter integrating the fish general well-being at the scale of week or months (Suther., 2000).

Flounder growth was access in the present study by analysis of the otolith shape since variation in growth rate produces corresponding variation in otolith shape. Consequently otolith shape analysis could be used as a proxy for otolith ring counts in ageing fish (Gauldie and Nelson, 1990). Indeed, the most accurate technique for estimating fish age involves analyzing otolith increments but the time and cost of such otolith preparation with the inherent subjectivity of this reading analysis make it difficult to realize it routinely (Steward *et al.*, 2009). In the present study, differences in otolith parameters were relatively low among estuaries but significant differences were found for at least one otolith parameter between fish from Canche and the three anthropogenic estuaries. Indeed, for a given length, flounders from Schedlt, Seine and Loire estuaries would present bigger otolith which would mean that fish would be older. This result suggests indirectly that fish from these estuaries would have slower growth than flounders from Canche.

Developmental instability of individuals and populations could be estimated by their level of fluctuating asymmetry (FA), which occurs when otherwise bilateral traits show small random variations in the size of the two sides of the character around a bilateral symmetry axis (Palmer and Strobeck, 1986). The degree of FA reflects the inability of individuals to maintain homeostasis during development when faced with stress; either genetic or environmental (Møller and Swaddle, 1997; Van Dongen, 2006). FA has been used as a bio-indicator to test different environmental affects including pollution (Hardersen, 2000). As otoliths are involved in the general balance of the individual in its space, the bilateral symmetry between right and left components is of prime importance for individual fitness (Anken *et al.*, 1998). However, in the present study no significant difference of FA was recorded between estuaries.

This decrease of fish condition in contaminated estuaries was confirmed by the analysis of lipid content in fish muscles. Indeed, total lipid content of a fish is an easy estimation of its physiological condition. Lipid depletion has been identified as a general metabolic response to stress (Lemly, 1997). Different laboratory-based experimental studies have underlined the impact of pollutants on reduction in lipid status (Claireaux *et al.*, 2004; Alquezar *et al.*, 2006; Kerambrun *et al.*, 2011). Indeed, decrease of lipid content with the sediment chemical contamination could be explained by the potential change in energy allocation which would be used preferentially for resistance to chemical stress to the detriment of growth (Rowe, 2003). A decline in feeding activity combined with a major reduction in the ability to assimilate and/or convert food to energy could also have contributed to this lipid depletion. Fractionation of lipid content into individual classes could provide a more sensitive measurement of metabolically available lipids and energy allocation (Norton *et al.*, 2001). Triacylglycerols (TAG) are the major energy storage form in fish and therefore displays an important ecophysiological relevance as indicators of growth potential and survival (Sogard and Olla, 2000). In the present study, the lipid depletion observed in fish from the three anthropogenic estuaries was confirmed by TAG:ST ratios which were higher in flounders from Canche estuary. However, in the present study, our data from all flounders showed extremely low TAG:ST ratios compared to previous data on juvenile sole, *Solea solea*, sampled in Canche estuary in September 2002 (Amara *et al.*, 2007). This fact suggests that TAG reserves had almost been exhausted in fish. Lipid storage is generally observed prior to winter and allows fish to survive periods of starvation, which are more frequent in winter. The low values of TAG would suggest a period of starvation in October which would be corroborate by the high vacuity index observed in flounders from Canche estuaries.

However, as suggested by Durieux *et al.*, (2007), lipid storage is not the only way for fish to store energy : a dramatic increase of glycogen content was observed during compensatory growth in young roach *Rutilus rutilus* (Mendez and Wieser, 1993).

Changes in fish growth and condition are a common response in marine organisms exposed to stressful pollutants which are directly related to fish well-being and health (Alquezar *et al.*, 2006). Their use is based on the fact that changes in individual health manifest themselves at higher levels of ecological organisation, leading to reduced fish recruitment, abundance and production. However, these physiological parameters are likely to be sensitive to other biotic or abiotic parameters. For instance, in this present study, differences in parasitism level were found among estuaries (data not shown). Indeed, whereas Canche flounders were affected by internal parasites, fish from Seine and Loire estuaries were external parasited by copepods. Parasitism involves an energetic cost due to both parasite nutrition and host reaction. Studies on cases of heavy infection have demonstrated negative effects of parasite on fish host growth and stored lipid supplies (Coleman and Travis, 1998; Johnson and Dick, 2001; Durieux *et al.*, 2007). Moreover, differences in feeding activities based on vacuity indices were observed among estuaries. In particular, our reference site appears to have reduced feeding activities whereas fish from Seine estuaries presented the lowest vacuity index. Indeed, all coastal areas are not equally important as food availability for fish. In spite of its metallic and organic contamination, the Seine estuary remains a highly productive ecosystem providing high abundance of macrobenthic and planktonic fauna (Dauvin and Desroy, 2005). However, this intrinsic richness of anthropogenic estuaries does not necessarily prevent the loss of their function as nursery ground (Courrat *et al.*, 2009).

Conclusion

This study demonstrated that the metallic concentrations found in estuarine sediments are reflected in juvenile flounder tissues. This metal accumulation is likely to be dependent of several factors as metal bioavailability in sediment and the route of exposure which leads to different concentrations among target tissues. This metal contamination was related to the decrease of condition and lipid supply of fish from anthropogenic estuaries and this condition depletion was shown to increase with the time spent in those estuaries. The combined use of chemical and physiological parameters offers relevant information on fish health determination under chemical contamination. The decrease of fish condition reflects the risk for juvenile survival and thus adult recruitment. However, fish health determination, in field

study, is also dependant of other biotic and abiotic factors. Indeed, the use of lipid index is limited by the seasonal variability of fish nutritional status. In the same way, fish condition is sensitive to uncontrolled factors such as parasitism or food bioavailability. Simultaneous analysis in field and laboratory conditions could lead to a better understanding of chemical effect on fish health. While laboratory experiment could establish direct linkage between chemical contaminant and fish conditions, field experiment could give information on the current situation of anthropogenic estuaries.

Acknowledgements

This work was supported by post Grenelle programme 190, DEVIL of the French ministry for ecology and the Franco–British INTERREG IVA European project, DIESE. We would like to thank Olivier BODERE and Khalef RHABI for their help during analysis.

Chapitre VI : Discussion générale

Chapitre VI : Discussion générale

1. Méthodes d'étude

1.1 Intérêt des juvéniles de poissons

Peu d'études ont réalisées une approche multibiomarqueurs sur des stades précoces de poissons marins, dû principalement à la quantité d'échantillon limitant les analyses. Cependant, les stades juvéniles de poissons sont abondants dans les zones côtières et estuariennes et cette période de vie représente un aspect critique pour le renouvellement des populations de poissons (recrutement). En se concentrant dans les zones côtières peu profondes soumises à de fortes pressions anthropiques, les juvéniles sont particulièrement sujets aux effets des contaminants chimiques. Dans nos études nous avons adapté nos méthodes de dosage (chimiques, moléculaires et physiologiques) pour de faibles quantités d'échantillon. Un certain nombre de paramètres ont pu être ainsi analysés chez les mêmes individus bien qu'étant de petite taille, ce qui facilite l'étude des relations entre les différents paramètres analysés. La taille réduite des individus permet également d'augmenter le nombre d'organismes étudiés, la taille des dispositifs expérimentaux (aquariums ou cages) devenant moins limitant. Outre l'aspect de la faisabilité des expériences, ces stades précoces apparaissent plus sensibles aux effets des contaminants chimiques que les adultes, ce qui a pu être vérifié dans le cadre du projet DISCOBIOL pour lequel différents organismes marins (dont le bar) plus âgés ont été soumis aux mêmes conditions expérimentales d'exposition au pétrole que notre étude (Milinkovitch *et al.*, 2011; Communication personnelle).

L'utilisation des stades précoces de poissons marins a d'autant plus d'intérêt qu'ils présentent des phases de croissance rapide. Dans nos études, des différences de croissance ont ainsi pu être détectées sur des temps d'exposition relativement court. En effet, en marquant les individus à l'aide de «tag» alphanumérique, un suivi précis et individuel de la croissance des poissons a pu être effectué en condition expérimentale mais également lors de l'expérience de caging. Entre les différentes conditions testées, nous avons ainsi pu obtenir des différences significatives avec des variations de taille de 2 à 10 mm (soit de 3 à 14 %) et de poids de 100 à 2000 mg (soit de 2 à 40 %) sur des individus mesurant en moyenne 70 mm et pesant 5 g. L'étude de la croissance des organismes nécessite l'utilisation de très jeunes individus en phase de croissance rapide. Ceci est particulièrement vrai si l'on s'intéresse à la

croissance récente par otolithométrie. En effet, la largeur des accroissements journaliers déclinant avec l'âge du poisson, les accroissements deviennent de plus en plus fins. De plus, les otolithes deviennent plus complexes et plus ornementés avec l'âge des individus, avec une augmentation des distorsions de la croissance due à un épaissement préférentiel de la face interne de l'otolithe (Baillon, 1992). Dans nos études, des différences dans ce paramètre de croissance n'ont été observées que dans les conditions les plus contaminées, c'est-à-dire sur les poissons présentant les taux de croissance somatique les plus faibles. Ce manque de sensibilité peut être attribué à la difficulté de lecture des stries due à leur forme irrégulière probablement liée à l'âge déjà avancé des poissons utilisés (3 - 4 mois) (Figure 70). En condition de laboratoire, il pourrait être intéressant d'effectuer un marquage fluorescent sur les otolithes au début de l'expérience (Lagardère *et al.*, 2000). Ce marquage permettrait de situer de manière plus précise les stries de croissances correspondant au temps d'exposition des organismes.

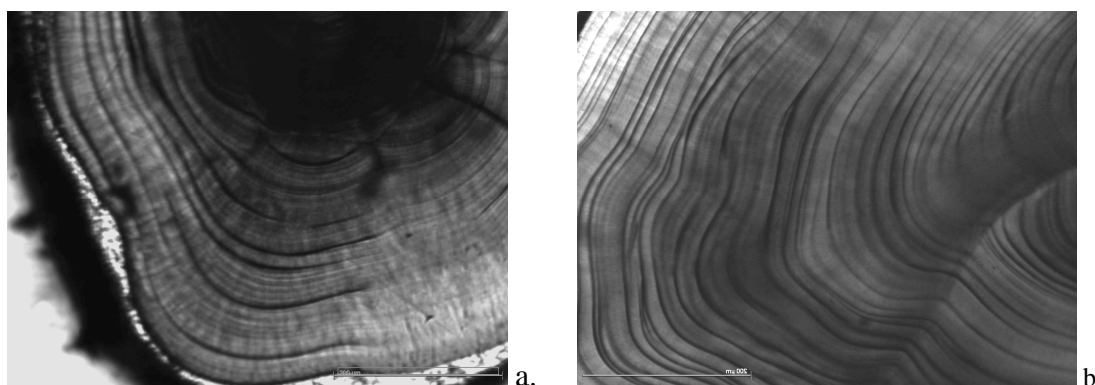


Figure 69 : Comparaison de la régularité des stries de croissance entre un otolithe de (a) un flet de 4 cm et celui de (b) un flet de 7 cm

1.2 Faisabilité du caging sur les juvéniles de poissons.

Un des objectifs des travaux de cette thèse consistait à tester la faisabilité et la pertinence des expériences de caging sur des juvéniles d'espèces marines. Avec de forts taux de récupération des poissons dans les deux sites analysés (75 et 90 %), cette expérimentation a montré la potentialité de cette méthode d'étude appliquée aux juvéniles de poisson. Cependant, comme préconisé par Oikari *et al.* (2006), plusieurs précautions doivent être prises pour mener à bien ce genre d'étude. Pour les raisons évoquées dans la section précédente, nous nous sommes focalisés sur les périodes juvéniles de poissons. Il a été choisi

de considérer deux espèces aux modes de vie différents afin d'analyser les différences de réponses vis-à-vis de cette technique d'exposition. Chacune des cages a ensuite été construite en fonction du mode de vie de ces espèces. Le choix de l'espèce est important dans ce genre d'exposition car certaines espèces n'apparaissent pas recommandables. Des caractéristiques comme un type de vie solitaire, le cannibalisme ou une tendance à perdre leurs écailles lors de la manipulation représentent des critères excluant leur utilisation. Nous avons choisi des espèces adaptées aux conditions environnementales et dont les populations naturelles vivent dans la zone d'étude. Nous avons choisi de considérer des animaux issus d'aquaculture afin de s'assurer que chaque individu ait le même « passé » mais également afin d'éviter des dommages potentiels liés à la pêche des poissons en milieu naturel. Cependant, certains auteurs utilisent des poissons issus de milieu naturel (Reynders *et al.*, 2008; Winter *et al.*, 2004; Phibbs *et al.*, 2011). En effet, leur utilisation peut représenter un avantage lors de l'encagement car ils présentent davantage de prédispositions à endurer des conditions naturelles comme se nourrir sur des proies vivantes. Pour pallier en partie ce problème, une période d'acclimatation de 15 jours a été respectée où les poissons ont été progressivement nourris avec des proies naturelles afin de les habituer à cette consommation. A notre connaissance, ce genre d'acclimatation n'a pas été effectué pour les précédentes études de caging réalisées. Nous préconisons cependant de respecter cette étape afin de s'assurer de la capacité des individus à se nourrir sur le site d'étude.

Le milieu portuaire a été retenu pour cette étude car il s'agit d'un milieu contaminé par divers composés chimiques. Il représente un plan d'eau relativement calme, ce qui facilite la mise en place des cages et évite leur exposition à des conditions hydrodynamiques contraignantes pour l'intégrité des cages mais aussi la survie des poissons. Les concentrations en métaux et HAPs analysés dans ces sédiments portuaires sont comparables à celles mesurées dans les sédiments issus d'estuaires anthropisés. En effet, les teneurs en métaux observées dans le sédiment de la Loire et de l'Escaut sont comprises entre celles mesurées dans les deux sites les plus internes du port (Port B et Port C). De plus, les teneurs en métaux analysées dans du sédiment prélevé en amont de la Seine sont comparables à celles observées à Port C (Cachot *et al.*, 2006). Lors du transport des poissons sur le lieu d'étude, pour limiter au maximum le stress potentiel, les organismes ont été manipulés avec précaution en se munissant de pompes à air portables et en évitant de stresser les poissons. La même procédure a été respectée à la fin de l'expérience puisque les poissons ont été transportés vivants jusqu'au laboratoire le plus rapidement possible (approximativement 2 h). Certains auteurs préfèrent dissequer les poissons sur place afin de s'affranchir du temps de trajet (Stein *et al.*,

1998; Jung *et al.*, 2008), mais il faut pouvoir disposer de conditions permettant la réalisation de la dissection. D'autres sacrifient les poissons lors du prélèvement avant de les acheminer au laboratoire (Doebel *et al.*, 2004; Almroth *et al.*, 2008; Soimasuo *et al.*, 1995) mais l'utilisation de biomarqueurs moléculaires imposent préférentiellement de disséquer le poisson vivant afin d'éviter la perturbation des activités enzymatiques. L'expérience de caging permettant de travailler dans un milieu ouvert, la réalisation de duplicat de cage ne paraissait pas nécessaire, chaque individu pouvant être considéré comme un réplicat. Les cages ont été fixées sur le sédiment en raison des espèces choisies et pour aussi accentuer le contact avec les polluants piégés dans le sédiment. Les cages ont également été remontées à la surface après 2 semaines afin de contrôler leur état et celui des poissons. L'opération n'a pas été renouvelée afin de limiter ce facteur de stress sur les poissons. Le temps d'exposition retenu est un compromis entre le temps nécessaire aux poissons pour intégrer la contamination chimique du milieu et un temps limitant l'endommagement des cages. Dans ce genre d'étude, il peut varier de 2 à 87 jours, le plus souvent une période de 3 à 4 semaines est respectée (review de Oikari *et al.*, 2006).

En respectant ces différentes conditions nous avons pu dans un premier temps apprécier le stress induit par cette mise en cage sur les poissons encagés dans la station considérée comme référence. La similarité des indices de condition (K, ARN:ADN, TAG :ST) entre les bars au début de l'expérience et ceux encagés dans la station de référence témoigne de la bonne condition des juvéniles de bars dans cette expérience et valide ainsi la comparaison des différents paramètres analysés sur cette espèce sur la station contaminée. Une baisse de la condition des juvéniles de turbots a été observée dans la station de référence, ce qui témoigne d'un stress physiologique imposé par la mise en cage sur cette espèce. D'autres auteurs se sont également intéressés à ce stress physiologique en mesurant les concentrations en cortisol, lactate et glucose dans le sang de corégones blancs encagés dans un lac recevant des rejets industriels témoignant de l'état physiologique des individus (Lappivaara et Oikari, 1999). Les résultats de notre étude suggèrent que, de par leur mode de vie, les juvéniles de bars apparaissent comme une espèce d'étude plus appropriée pour ce mode d'exposition que les turbots. La mise en place d'abris, permettant aux poissons de se réfugier et de s'affranchir de l'exposition constante aux courants pourrait être appliquée afin de diminuer le stress de cette mise en cage sur le turbot. L'utilisation d'abris sous forme de tube horizontal a déjà été envisagée pour des anguilles (Soivio and Oikari, 1976).

Il faut également souligner certaines difficultés rencontrées inhérentes à ce genre d'expérience effectuée en milieu naturel. Quatre sites d'études avaient initialement été

considérés. Dans un des sites, les cages ont été endommagées probablement par des pêcheurs comme l'ont montré les hameçons retrouvés dans le maillage des cages. Ce problème de « vandalisme » préconise l'utilisation de plusieurs sites d'études afin d'augmenter le nombre de poissons exploitables. Les conditions météorologiques ont également été contraignantes lors de la collecte des cages, ce qui a conduit à une perte de poissons lors des prélèvements. Des différences de disponibilité en nourriture entre les trois sites étudiés ont également été observées bien qu'ils soient situés dans un environnement proche (périmètre de 3 km). En effet, la difficulté de travailler dans des sites présentant des niveaux de contamination différents est que la nourriture dans les aires polluées est soit plus contaminée ou nutritionnellement différente ou juste limitante (Oikari *et al.*, 2006). Il pourrait être avantageux de nourrir les poissons pendant la durée d'exposition comme cela a été fait dans plusieurs études (Oikari et Kunnamo-Ojala, 1987; Lindström-Seppä et Oikari, 1990; Juell et Fosseidengen, 2004). Malheureusement, ce ne fut pas possible dans notre expérience, les cages étant placées à plusieurs mètres de profondeur. Nous ne voulions pas induire un stress supplémentaire sur les poissons en remontant régulièrement les cages à la surface. Cependant, l'intérêt de ce mode d'exposition réside dans le fait qu'il intègre les différentes conditions environnementales, biotiques et abiotiques, du site d'étude. En encageant des individus dans l'aire polluée, ces individus sont directement confrontés aux différents critères environnementaux du milieu et la nourriture en fait partie. L'évaluation de la capacité des individus à s'y développer permet ainsi d'estimer directement la qualité de cet habitat d'un point de vue chimique mais également nutritionnel.

1.3 Expériences en laboratoire

En contrôlant les facteurs confondants, les expériences en laboratoire représentent le meilleur moyen d'établir des relations causes à effets entre les réponses des biomarqueurs et les niveaux de contaminants chimiques. Elles représentent donc des moyens d'études indispensables pour tester la sensibilité aux polluants des différents paramètres analysés. Certaines études utilisent des concentrations aiguës dans leurs bioessais sur les poissons (Taylor *et al.*, 1985; Hrovat *et al.*, 2009) ou même réalisent des injections directes de polluants dans les organismes (Lemaire-Gony *et al.*, 1995; Benedetti *et al.*, 2007; Bilabo *et al.*, 2010). Dans nos différentes expériences en laboratoire, nous avons considéré des concentrations réalistes de contaminants chimiques qui peuvent être rencontrées après un accident pétrolier ou dans des zones à fortes activités anthropiques. En effet, notre approche

consistait à s'intéresser aux effets sublethaux des contaminants présents dans l'environnement.

Certaines considérations doivent être précisées et prises en compte dans l'interprétation des résultats vis-à-vis du comportement des contaminants chimiques dans les aquariums. Dans l'expérience d'exposition au pétrole, un système expérimental mis au point par le CEDRE à Brest a été utilisé. Il crée des phénomènes de turbulence afin de simuler la dispersion naturelle du pétrole dans l'environnement. Ce système a permis de recréer des concentrations et une évolution de ces concentrations en hydrocarbures proches de celles observées en milieu naturel suite à une catastrophe pétrolière. Cette volonté de recréer des conditions proches du milieu naturel s'avère nécessaire et en particulier dans le cas d'exposition à des produits pétroliers. En effet, les études qui ne font qu'ajouter le pétrole dans la colonne d'eau en absence de dispersion, peuvent être confontrées aux problèmes de la formation d'une nappe de pétrole à la surface de l'aquarium limitant ainsi la disponibilité en oxygène dans la colonne d'eau. Bien que ce système confiné soit loin de considérer tous les différents facteurs intervenant dans un milieu ouvert, ce système expérimental représente une alternative intéressante dans l'étude de l'effet des composés pétroliers. De plus, la période d'exposition a été couplée avec une période de décontamination en eau claire, ce qui a permis d'analyser les effets à moyens terme de cette pollution accidentelle et ainsi tester la capacité des individus à se rétablir. Cette période de décontamination pourrait être prolongée pour poursuivre l'étude à long terme des effets de l'exposition comme l'ont réalisé Claireaux *et al.* (2004) en laissant les organismes évoluer dans un mésocosme après l'exposition.

Le mode d'exposition des organismes aux sédiments contaminés s'est avéré quelque peu différent du précédent. Les modifications géochimiques et géophysiques induites lors de l'échantillonnage, la manipulation et le stockage des sédiments constituent des facteurs limitant, en modifiant la toxicité initiale du sédiment (Lamberson *et al.*, 1992; Luoma, 1995). Dans nos études, les sédiments ont été conservés suivant les recommandations de l'ASTM (1994) qui recommande une conservation au frais (4°C), à l'abri de la lumière et de l'air pendant une durée maximale de deux semaines. Lors de nos études en laboratoire, nous avons considéré des expositions à des concentrations reflétant une pollution chronique, ce qui nécessite un temps d'exposition plus long que lors d'exposition aiguë. Pour ces expositions chroniques, le maintien d'une qualité d'eau acceptable est extrêmement important. En effet, la présence de sédiment peut entraîner une diminution des concentrations en oxygène et/ou ammonium associées à une augmentation d'hydrogène sulfuré. Cette dégradation de la qualité de l'eau représente un risque pour la survie des organismes et peut entraîner un biais dans

l'évaluation du réel impact toxique des sédiments. La méthode la plus souhaitable est l'utilisation d'un flux d'eau en continue (Sved et Roberts, 1995; Hopkins *et al.*, 2004). Ce type de système s'avère couteux et logistiquement difficile à mettre en place. D'autres études réalisent les expériences en système statique (Kilemade *et al.*, 2009; Hartl *et al.*, 2007) mais il convient d'être très vigilant sur la qualité de l'eau. Dans notre étude, nous avons opté pour un renouvellement quotidien d'1/3 de l'eau comme d'autres auteurs (DelValls *et al.*, 1998; Jiménez-Tenorio *et al.*, 2007). Ce renouvellement d'eau peut minimiser l'impact des polluants sur les organismes via la colonne d'eau suite aux processus de diffusion/désorption des sédiments. Toutefois, une remise en suspension des particules sédimentaires induit à la fois par ce changement d'eau et par les organismes en contact avec le sédiment permet une remise en suspension physique du matériel sédimentaire et peut favoriser les échanges entre les phases solides et dissoutes pour certains éléments. Ce phénomène de remise en suspension pourrait être accentué en ajoutant un système brassant le sédiment comme l'ont effectué certains auteurs (Sved et Roberts, 1995). Dans ce genre d'expérience, la nourriture est aussi un paramètre critique. D'après l'étude bibliographique effectuée par Van der Geest *et al.* (2010), environ deux tiers des expériences sont menées sans ajout de nourriture lors des expositions. Cependant, la santé des poissons peut être fortement compromise en laissant les poissons à jeun lors de toute la durée d'exposition, leur métabolisme en étant fortement affecté. De plus, l'utilisation de biomarqueurs physiologiques implique une obligation de maintenir les individus dans de bonnes conditions d'exposition. Ainsi, dans notre expérience, les juvéniles de turbot ont été nourris quotidiennement à 1 % de leur poids.

Dans le cadre de notre étude sur l'effet d'une pollution multiple, ce mode d'expérimentation en laboratoire nous a permis de tester la réponse des différents biomarqueurs à différents niveaux de contamination présents dans les cinq sédiments considérés. Nous avons ainsi pu analyser si les réponses des biomarqueurs moléculaires et physiologiques étaient dose-dépendantes, ce qui représente un des critères souhaitable voire indispensable dans l'utilisation des biomarqueurs dans les programmes de surveillance. De plus, ce mode d'exposition nous a permis de nous affranchir des différences de disponibilités en nourriture soupçonnées en milieu naturel.

1.4 Méthode *in situ*

Le chapitre V présentait les résultats obtenus sur des juvéniles de flets directement prélevés dans différents sites estuariens. Une des principales difficultés d'étude sur des

poissons vivant en milieu naturel est la possibilité que les individus prélevés ne soient présents dans la zone d'étude que depuis peu de temps. Ces échantillons ne seraient donc pas représentatifs de la qualité du site d'étude. Les juvéniles de flet restant inféodés à leur estuaire pendant approximativement les deux premières années de leur vie, on peut supposer que les individus prélevés aient déjà passé un moment conséquent dans les estuaires étudiés. En analysant les concentrations en métaux dans les tissus, nous avons pu relier la contamination métallique avec la condition des poissons évoluant dans ces zones estuariennes. Cette analyse représente un moyen direct d'étudier la qualité des habitats pour les juvéniles de poissons malgré les difficultés d'interprétation liées à la présence de parasitisme ou des différences de leurs contenus stomacaux entre estuaires. Plusieurs études ont pu montrer les effets néfastes du parasitisme sur l'état de santé des organismes (Coleman and Travis, 1998; Johnson and Dick, 2001; Durieux *et al.*, 2007). L'évaluation du coût énergétique de ce parasitisme permettrait d'apprécier les effets distincts de ce parasitisme et des contaminants chimiques. De même, les aires littorales ne sont pas d'importance équivalente en ce qui concerne la disponibilité en nourriture pour les poissons. C'est par exemple le cas de l'estuaire de la Seine qui fournit une forte abondance en organismes benthiques et planctoniques malgré sa relative contamination en métaux et composés organiques (Dauvin et Desroy, 2005). Cependant, en couplant les résultats obtenus en milieu naturel avec ceux obtenus en condition de laboratoire et/ou de caging, cette relation entre état de santé des poissons et niveaux de contaminants chimiques peut être approfondie.

2. Sensibilité et pertinence des paramètres utilisés

2.1 Analyses chimiques

2.1.1 Dans la colonne d'eau et le sédiment

Dans nos études, dans un premier temps, les concentrations de polluants ont été mesurées dans la colonne d'eau ou le sédiment afin d'obtenir des informations indispensables sur la nature et les niveaux de contaminants chimiques considérés. Les concentrations en hydrocarbures particuliers et en HAPs dissous ont ainsi été analysées dans la colonne d'eau des bacs d'exposition des juvéniles de bar au pétrole. La mesure des concentrations en hydrocarbures dans l'eau suite à un accident pétrolier peut fournir des informations utiles sur l'ampleur de l'incident et sur l'évolution des teneurs dans les jours qui suivent la catastrophe. En comparant ces concentrations mesurées durant l'exposition des bars au pétrole avec celles

rencontrées après divers déversements pétroliers, les résultats de cette étude ont ainsi pu être extrapolés en condition environnementale. De plus, la diminution de ces teneurs avec le temps d'exposition reflétaient celle observée en milieu marin sous l'effet des différents facteurs environnementaux comme l'effet des courants sur la dispersion, l'évaporation, les phénomènes d'adsorption sur les particules sédimentaires ou algales et les processus microbiologiques.

Dans les modes d'exposition à une pollution chronique, c'est le compartiment sédimentaire qui a été considéré pour les sites d'études. En effet, les sédiments peuvent servir de compartiment de stockage à long terme des différents polluants et intègrent ainsi davantage l'historique des apports dans la zone d'étude que la colonne d'eau plus sensible aux effets saisonniers ou de la marée en milieu estuarien notamment. En comparant les concentrations en métaux et HAPs observées dans les sédiments analysées à des valeurs seuils établies dans des guides de toxicité, des substances en concentrations critiques dans le milieu ont pu être identifiées. Le risque chimique potentiel associé à ces contaminants a ainsi pu être estimé. Ce type d'analyse chimique a permis d'effectuer une comparaison pertinente des niveaux de contamination entre les sites étudiés. Cependant, plusieurs facteurs comme la composition granulométrique et l'enrichissement en matière organique doivent être pris en compte car ils agissent sur le comportement des composés piégés dans le sédiment et sur les échanges avec la colonne d'eau et le biota. Les analyses sédimentaires ont confirmé des différences de mobilité des métaux étudiés avec des formes plus ou moins accessibles par le biota (biodisponible). Des éléments comme le cuivre, plomb et zinc présentent une affinité préférentielle avec la phase échangeable du sédiment alors que d'autres comme le chrome, nickel et vanadium sont plutôt répartis dans la phase résiduelle alumino-silicatée des sédiments. L'estimation de cette biodisponibilité dans la phase sédimentaire réactive et la normalisation des teneurs métalliques avec un élément abondant et naturel comme l'aluminium (présent dans des composés très réfractaires comme les argiles) constituent des outils nécessaires pour traiter des différences de l'influence anthropique ou de la réactivité de la fraction sédimentaire. Pour exemple, bien que le sédiment de la Loire sur notre site d'étude présentait les concentrations les plus fortes en plusieurs métaux parmi les sédiments estuariens analysés, les calculs des facteurs d'enrichissement normalisés à l'Al et de la biodisponibilité nous a amené à pondérer la toxicité potentielle de ces contaminants sur les organismes. Par ailleurs, lors de nos études en milieu portuaire, des mesures complémentaires de dosage de quatre métaux (Cd, Cu, Pb et Zn) de la fraction dissoute dans la colonne d'eau ont été effectuées par méthode polarographique (Laboratoire GEOSYSTEME, Lille). Les

concentrations observées étaient comprises entre 5 et 20 ng.L⁻¹ pour les deux éléments toxiques Cd et Pb, entre 50 et 130 ng.L⁻¹ pour le Cu et entre 200 et 2000 ng.L⁻¹ pour le Zn. Ces concentrations sont du même ordre de grandeur que celles observées dans le milieu marin Manche orientale (OSPAR, 2006) mais restent plus faibles qu'en milieu estuarien comme la Seine, l'Escaut ou la Loire (Zwolsman *et al.*, 1997; Chiffoleau *et al.*, 2001; Waeles *et al.*, 2004).

2.1.2 Dans les organismes

Cette notion de biodisponibilité des polluants vis à vis des organismes va dépendre de facteurs biologiques propres aux modes de vie des espèces considérées (comportement, alimentation...) et de leurs processus biologiques (métabolisation, excretion, régulation..). L'intervention de ces facteurs biologiques ne permet pas généralement de conclure sur les réels niveaux de contamination auxquels sont soumis les organismes à partir des mesures environnementales seules. C'est pourquoi dans toutes nos études, les niveaux de contaminants présents dans les organismes ont été mesurés. L'analyse des teneurs en HAPs après l'exposition au produit pétrolier a permis de montrer que ces composés se retrouvent dans les organismes témoignant du risque associé à leur caractère mutagène et cancérigène. Cependant, ces concentrations se sont avérées indépendantes du temps d'exposition considéré ce qui suggère une métabolisation rapide des HAPs dans l'organisme en accord avec de nombreuses études (Aas *et al.*, 1998; Ariese, 1993; Hellou and Payne, 1987; Lin *et al.*, 1996, Budzinski *et al.* 2004). Nous nous sommes donc intéressés par la suite à la mesure des métabolites biliaires d'HAPs. En effet, les niveaux de métabolites dans l'organisme sont le résultat direct de l'interaction des composés chimiques avec la matrice biologique et reflètent ainsi l'induction des réactions enzymatiques. L'estimation des métabolites biliaires mesurés chez les turbots exposés au sédiment contaminé a ainsi permis de mettre en évidence les différents niveaux d'exposition aux HAPs auxquels ont été soumis les organismes. Ce résultat confirme la sensibilité de ce biomarqueur et préconise son utilisation pour la surveillance de sites impactés par les HAPs. En effet, l'analyse des métabolites biliaires permet de prouver la métabolisation des HAPs dans l'organisme mais également de fournir des informations sur les voies de biotransformation. Dans notre étude, les métabolites ont été mesurés par fluorescence ce qui représente un dosage très simple et informatif. Cependant, il permet difficilement de renseigner sur le type de composé aromatique présent dans le milieu. Des études sont actuellement en cours au CEDRE à Brest et au LPTC (Laboratoire de Physico- et Toxic-

Chimie de l'Environnement) à Bordeaux afin d'identifier et quantifier les composés par des techniques plus performantes comme la spectrométrie de masse couplée à une chromatographie en phase gazeuse (GC-MS).

Les concentrations en métaux présents dans les organismes exposés aux sédiments contaminés ont été mesurées malgré la taille des organismes considérés. De nombreuses études préconisent le dosage de ces composés dans le foie des organismes en raison de ses propriétés reconnues de bioaccumulation. Cependant, les propriétés de détoxification du foie suggèrent de mesurer également les enzymes de biotransformation dans cet organe. Il était donc souhaitable de considérer un autre organe permettant d'apporter des éléments sur le transfert de contaminant métallique dans les organismes. Notre choix s'est porté sur les branchies qui constituent une voie de transfert importante des polluants chez les poissons puisqu'elles sont en contact direct avec l'eau. De plus, elles jouent un rôle important dans l'assimilation des métaux, leur stockage et/ou leur transfert par le sang vers les différents tissus. La mesure des métaux dans les branchies des juvéniles de poissons ont permis de mettre en évidence des concentrations significativement plus élevées en certains métaux analysés dans les organismes exposés aux contaminants. Comme pour le dosage des composés aromatiques, des valeurs en métaux plus élevées dans les organismes constituent une preuve d'exposition aux composés métalliques et suggèrent ainsi un risque dû à leur caractère toxique. L'analyse des teneurs en métaux dans les tissus des flets a révélé des différences de niveaux de contamination métallique entre estuaires. Cependant, dans nos études une forte variabilité a été observée. En effet, les concentrations en métaux dans les organismes varient fortement en fonction des propriétés propres à chaque métal qui définissent les différentes interactions avec les tissus biologiques comme leur capacité d'excrétion ou les mécanismes de régulation des métaux essentiels notamment. De plus, l'étude *in situ* a permis de comparer les teneurs métalliques entre le foie et les branchies sur les mêmes individus. De fortes différences de concentrations entre ces deux organes ont été observées, certains métaux étant davantage présents dans l'un ou l'autre des tissus. Nos résultats ont montré que le foie serait un organe plus sensible pour détecter des différences de niveaux de contamination métallique entre les sites tandis que de récents travaux suggèrent que les branchies permettraient de détecter de façon plus précoce une exposition à des métaux que le foie (Fernandes *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2009).

Les mesures de polluant se sont focalisées sur deux familles de composés, les métaux et les HAPs dans le sédiment et/ou les organismes. Ils représentent deux groupes de polluants importants dont la toxicité est reconnue et qui se piègent préférentiellement dans le sédiment.

Les composés organochlorés (PCBs) ont aussi été dosés dans les sédiments prélevés dans les différentes zones d'étude. Malheureusement, la limite de détection de dosage de chaque congénère mesuré était de $0,01 \text{ mg.kg}^{-1}$, alors que le seuil d'une potentielle toxicité (ERL) est fixé à $0,0227 \text{ mg.kg}^{-1}$ pour la somme des sept congénères analysés (Long *et al.*, 1995). Les travaux respectifs de Cachot *et al.* (2006) sur les sédiments de la Seine et Danis *et al.* (2004) sur ceux de l'Escaut, à proximité de nos zones d'étude, ont indiqué des valeurs avoisinant celles de l'ERL pour la somme des PCBs ($0,021$ et $0,014 \text{ mg.kg}^{-1}$). Par la suite, il faudra s'attacher à améliorer la sensibilité de la méthode d'analyse des PCBs pour appréhender les compartiments naturels à pollution multiple. De plus, d'autres polluants organiques persistants mais également des composés pharmaceutiques peuvent être présents dans les zones d'études. Ces polluants ont pu entraîner des effets non négligeables sur les organismes étudiés.

2.2 Biomarqueurs moléculaires

Dans nos études, les réponses de deux enzymes de biotransformation, l'EROD et la GST, et une enzyme antioxydante, la Catalase ont été examinées en tant que biomarqueurs précoces d'exposition à des contaminants chimiques. Les relations entre les réponses précoces des biomarqueurs moléculaires et les effets observés sur les performances physiologiques des organismes exposés aux contaminants chimiques ont été reportées dans le Tableau 36.

Tableau 35 : Résumé des réponses des biomarqueurs utilisés dans les quatre études : 1) exposition de juvéniles de bar, *Dicentrarchus labrax*, à du pétrole, 2) mise en cage de juvénile de bar et de turbot, *Scophthalmus maximus*, dans le port de Boulogne sur mer, 3) exposition de juvéniles de turbot à des sédiments contaminés et 4) prélèvement de flets, *Platichthys flesus*, dans trois estuaires français et un estuaire belge. Une flèche haute représente une augmentation significative correspondant approximativement à plus de une fois (↑), deux fois (↑↑) et trois fois (↑↑↑) la valeur de référence. De même, une flèche basse (↓) représente une diminution significative par rapport à la référence.

Exp.	Espèce	Contaminants	Méthode	Lieu	Temps (jours)	EROD	GST	CAT	GW	GL	RG	K	ARN:ADN	TAG:ST	
1	Bar	Pétrole	labo		2	↑↑	-	-	-	↓	-	-	↓	-	
					4	↑↑↑	↑↑	-	↓↓	↓	↓	↓	↓	-	
2	Bar Turbot	Milieu naturel	caging	Port B	38	↑↑	↑↑	↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓	↓	↓↓	↓↓↓	
						↑↑	↑	-	↓↓	-	-	↓	-	↓↓	
3	Turbot	Sédiment	labo	Port A	7	↑	-	↑↑	↓↓	↓↓	-	↓	-	-	
					21	-	-	-	↓	↓↓	-	-	-	↓↓	
					Port B	7	↑↑	-	↑↑↑	↓↓	↓↓	-	↓	-	-
						21	-	↑	↑↑	↓	↓↓↓	-	↓	-	↓↓
					Port C	7	-	-	↑	↓↓↓	↓↓↓	-	↓	-	-
						21	↑	↓	-	↓↓	↓↓↓	↓	↓	↓	↓↓
Seine	7	↑	-	↑	↓↓	↓↓	-	↓	-	-					
	21	↑	-	-	↓	↓↓	-	↓	-	-					
4	Flet	Milieu naturel	<i>in situ</i>	Seine								↓	↓↓↓		
				Escaut								↓	↓↓↓		
				Loire								↓	↓↓↓		

2.2.1 Variabilités de réponses

Plusieurs études ont reporté l'influence de divers facteurs biotiques (genre, âge, genotype..) et abiotiques (température, turbidité, alimentation, saisons...) sur les réponses des biomarqueurs moléculaires (Sanchez et Porcher, 2009). De ce fait, l'estimation de la variabilité des biomarqueurs apparait indispensable en considérant leur utilisation dans les programmes de surveillance. Pour l'ensemble des expériences réalisées dans nos études, la variabilité des trois biomarqueurs moléculaires était similaire entre les trois paramètres avec une variabilité de 25 % pour la CAT, 29 % pour la GST et 32 % pour l'EROD (Figure 71). A l'exception de l'EROD lors de la mise en cage des bars, ces variations restaient relativement constantes le long des différentes expériences. Cette constance de variabilité représente un point positif dans l'utilisation de ces biomarqueurs moléculaires.

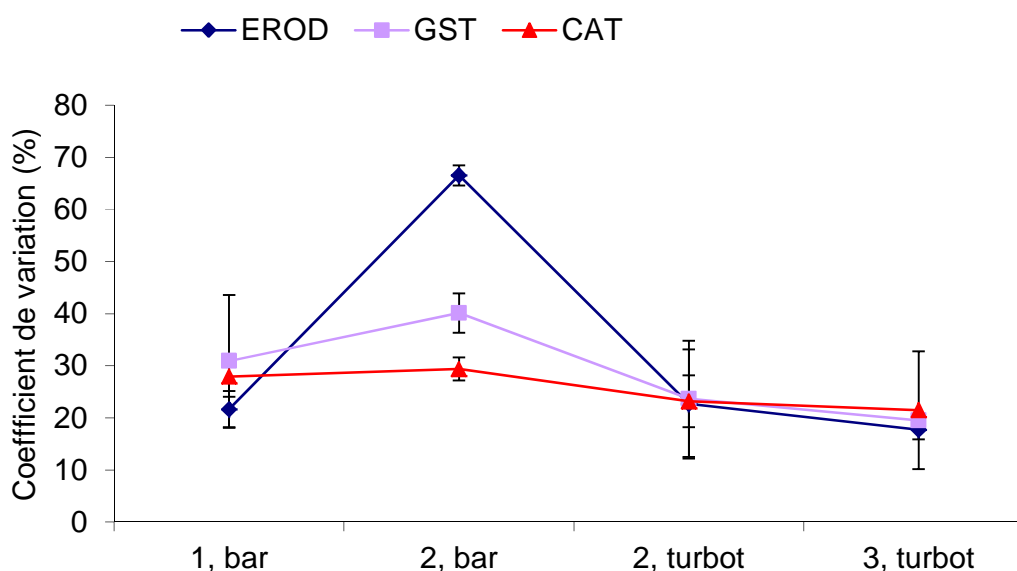


Figure 70: Evolution des coefficients de variation de l'EROD, la GST et la CAT au cours des trois expériences correspondantes : 1) exposition de juvéniles de bar, *Dicentrarchus labrax*, à du pétrole, 2) mise en cage de juvénile de bar et de turbot, *Scophthalmus maximus*, dans le port de Boulogne sur mer et 3) exposition de juvéniles de turbot à des sédiments contaminés.

2.2.2 Réponses à une contamination au pétrole

Dans un premier temps, les biomarqueurs moléculaires ont été analysés suite à une exposition aigue à du pétrole. La sensibilité de ces trois biomarqueurs vis-à-vis des hydrocarbures a été précédemment démontrée par plusieurs auteurs (Sturve *et al.*, 2006; Martinez-Gomez *et al.*, 2006; Devaux *et al.*, 1998; Lee and Anderson, 2005; Deviller *et al.*,

2005; Castro *et al.*, 2004; Achuba and Osakwe, 2003; Damasio *et al.*, 2007). Dans notre étude, seule une induction de l'EROD a été observée sur les juvéniles de bar après les deux temps d'exposition. Une induction de la GST a été observée mais uniquement après les 96 h d'exposition. Ces résultats suggèrent une sensibilité plus élevée de l'EROD aux hydrocarbures, un temps de réponse plus long de la GST et une faible sensibilité de la Catalase. Les enzymes antioxydantes sont, en effet, en général moins sensibles aux contaminants que les paramètres de biotransformation et les relations de leurs réponses avec les polluants ne sont pas encore clairement établies (Van der Oost *et al.*, 2003). Les activités EROD ayant plus que doublées après les 96 h d'exposition par rapport aux 48 h, les réponses de l'EROD aux hydrocarbures seraient dépendantes du temps d'exposition, ce qui représente un avantage dans la recherche de biomarqueurs.

L'augmentation des activités EROD dès 48 h d'exposition au pétrole et celle des activités GST après 96 h d'exposition étaient reliées aux effets des hydrocarbures sur les indices de croissance et de condition. Ces résultats suggèrent la capacité de l'EROD, et à un degré moindre de la GST, à détecter l'exposition des organismes au pétrole et à refléter ses effets délétères sur l'état de santé des organismes. L'utilisation simultanée de l'EROD et de la GST permettrait ainsi de renseigner sur l'ampleur des effets observés sur les poissons après une pollution pétrolière. Ces biomarqueurs moléculaires ont été utilisés dans un contexte de surveillance du milieu après plusieurs accidents pétroliers en comparaison avec les valeurs disponibles avant l'accident ou par comparaison avec des sites non impactés (Kirby *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2010; Martinez-Gomez *et al.*, 2006). Cependant, bien que les résultats de notre étude préconisent notamment l'utilisation de l'EROD, ces résultats n'étant issues que d'une seule étude, il serait souhaitable de poursuivre ces recherches sur la pertinence de ces biomarqueurs moléculaires dans le suivi des effets d'un accident pétrolier. D'autres auteurs se sont également intéressés à la mesure d'autres paramètres cellulaires et physiologiques comme l'activité métabolique (Davoodi et Claireaux, 2007) ou l'état pathologique (Al-yakoob *et al.*, 1996; Elston *et al.*, 1997).

2.2.3 Réponses à une pollution chronique et multiple

Plusieurs auteurs ayant démontrés des effets synergiques ou antagonistes des différents types de polluants sur les biomarqueurs moléculaires (Viarengo, 1996; Oliveira *et al.*, 2004; Benedetti *et al.*, 2007), nous nous sommes intéressées dans un second temps à leur réponse face à un mélange de polluants. Des différences d'activités EROD, GST et CAT ont été observées à la fois entre les deux stations de caging et entre les différentes conditions

d'exposition des turbots aux sédiments contaminés. Ces résultats confirment ainsi l'utilité des biomarqueurs moléculaires pour détecter la présence de contaminants chimiques. Néanmoins, les relations entre la réponse des biomarqueurs moléculaires avec les niveaux de contamination restent faibles. En effet, aucune différence n'a été observée pour l'EROD après exposition des turbots au sédiment le plus interne du port de Boulogne sur mer (port C). Des résultats contradictoires ont également été observées pour la GST avec une induction de ses activités après exposition au sédiment du port B et une inhibition après exposition au sédiment du port C. De même, alors que les activités catalase tendaient à diminuer après la mise en cage des turbots dans le port, une induction des activités a été plutôt observée en condition de laboratoire. Cette incohérence dans les réponses de ces biomarqueurs moléculaires vis-à-vis de ce mélange de contaminants présent dans le sédiment, suggère des effets antagonistes des différents types de polluants ou des effets de facteurs environnementaux. Dans ce contexte, l'utilisation de ces biomarqueurs moléculaires dans des milieux chimiquement complexes apparaît limitée.

Les réponses de ces biomarqueurs moléculaires apparaissent également dépendantes de l'espèce considérée. Lors d'une étude complémentaire réalisée dans le cadre d'une autre thèse, des juvéniles de bar ont été exposés en laboratoire à des sédiments issus de la Seine (Filipuci, 2011). Cette expérience a été réalisée dans les mêmes conditions que notre étude sur le turbot avec le même sédiment de référence et le même site de prélèvement en aval de la Seine. Les variations de réponses des biomarqueurs moléculaires entre la condition de référence et la condition contaminée sont présentées dans la Figure 72 pour le bar et le turbot. Il apparaît clairement que les activités EROD et GST observées après 7 jours d'exposition apparaissent plus sensibles aux contaminants présents dans le sédiment de la Seine pour le bar que pour le turbot. Ce genre de dépendance spécifique à l'espèce a déjà été reportée par d'autres auteurs entre le bar, *Dicentrarchus labrax*, la limande, *Limanda limanda* et la truite, *Oncorhynchus mykiss* (Lemaire *et al.*, 1996) et entre la truite, le flet, *Platyichthis flesus*, la limande et la limande sole, *Microstomus kitt*; Smeets *et al.*, 2002). Ces différences de réponses entre espèces pourraient être reliées à des niveaux métaboliques propres à chaque espèce. Néanmoins, des coefficients de variations similaires ont été observés entre les deux espèces.

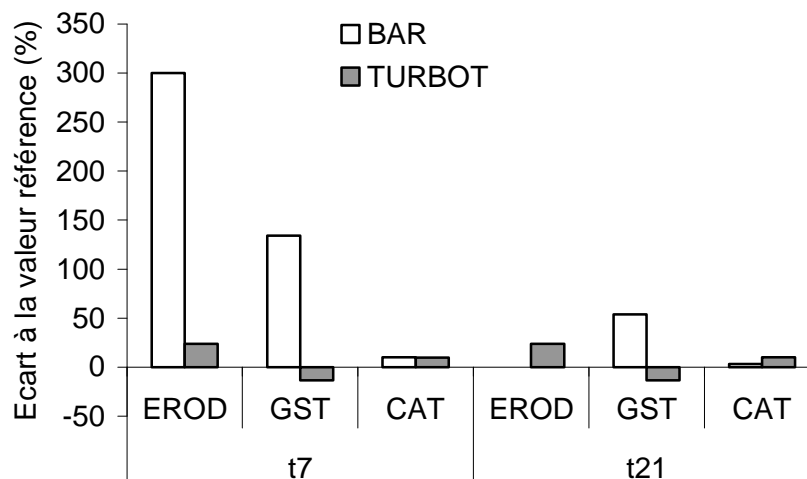


Figure 71 : Ecart de réponses (%) des biomarqueurs moléculaires mesurés chez des juvéniles de bar et de turbot exposés à du sédiment issu de la Seine par rapport à la condition de référence.

Des différences dans les réponses des trois biomarqueurs moléculaires ont été observées selon les deux temps d'exposition. En effet, la réponse mesurée de ce type de biomarqueurs s'accroît avec le niveau d'exposition mais lorsque la toxicité devient trop forte, la capacité des organismes à mettre en œuvre les mécanismes biochimiques de défense est surpassée, et la courbe atteint un plateau avant d'amorcer une baisse significative. Il est donc impossible de savoir si l'on se trouve dans la phase croissante ou dans la phase décroissante. Ces différences selon les temps d'exposition peuvent ainsi conduire à une sous-estimation du risque chimique.

Dans le cadre d'une pollution multiple, les relations entre biomarqueurs moléculaires et les réponses des indices de croissance et de condition ont été moins marquées. En effet, bien que des corrélations ont été observées entre ces deux niveaux de réponses chez les juvéniles de bar lors de l'expérience de caging, peu de corrélations ont été trouvées chez les turbots pour les deux modes d'exposition. En particulier, seules de faibles différences d'activités GST et CAT ont été observées sur les poissons exposés au sédiment le plus interne au port qui présentaient les plus faibles taux de croissance et les indices de condition les plus fortement diminués. En se basant uniquement sur les réponses des biomarqueurs moléculaires, ces bioessais de toxicité n'ont pas détecté de risques toxiques de ce sédiment contaminé alors que dans l'expérience de caging, les poissons ont été retrouvés mort à cette station après deux semaines d'exposition. Ces résultats entraînent une limitation dans l'utilisation de ces biomarqueurs moléculaires en tant que « systèmes d'alarme » puisque dans cette situation

d'exposition, leurs réponses n'étaient pas reliées aux effets néfastes des contaminants chimiques sur les performances physiologiques des organismes. Bien que certains auteurs aient pu établir une relation entre biomarqueurs moléculaires et des paramètres à plus haut niveaux d'organisation (Mondon *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 2010; Fonseca *et al.*, 2011), d'autres études n'ont également pas réussi à établir ce lien. Par exemple, une augmentation des activités EROD et GST chez des juvéniles de daurades (*Sparus aurata*) n'était pas reliée à la croissance d'individus exposés à des dioxines (Abalos *et al.*, 2008). Les mesures des ATPases et l'AcChE se sont révélées comme des biomarqueurs plus pertinents que l'EROD pour détecter une pollution de type organique chez l'anguille européenne (Buet *et al.*, 2006). Aucune corrélation n'a été observée entre des activités EROD élevées et des paramètres populationnels comme la composition spécifique et l'abondance relative de différentes espèces de poissons (Kloepper-Sams *et al.*, 1994; Munkittrick *et al.*, 1991). Alors que le nombre d'études utilisant ces biomarqueurs moléculaires augmentent depuis ces dernières années, il convient donc de les utiliser avec précautions quant à l'interprétation de leurs réponses voire de l'absence de réponse. En particulier, l'EROD a été préconisée comme biomarqueur d'intérêt dans le cadre du RNO suite à des études de faisabilité et de mise point menées depuis 1987 sur les côtes françaises. Bien que son utilisation ait été davantage ciblée sur des pollutions de type organiques (PCB, HAP), types de pollutions auxquelles l'EROD apparaît plus sensible, une sous-estimation des risques peut apparaître en présence d'autres contaminants comme notamment les métaux.

Même si l'utilisation simultanée de plusieurs biomarqueurs moléculaires est préconisée, dans nos études nous avons été limité par la faible quantité d'échantillon de foie disponible chez les stades juvéniles étudiés. L'étude des réponses des métallothionéines auraient notamment pu apporter des informations complémentaires sur les concentrations en métaux dans les sites d'études considérés. En effet, de nombreuses études ont montré le potentiel de l'induction des concentrations en métallothionéines comme biomarqueurs d'exposition aux contaminants métalliques par rapport à leur participation aux processus homéostatiques des métaux essentiels comme le Zn et le Cu et à la détoxification des métaux non-essentiels comme le Cd et le Hg (Schröder *et al.*, 2000; Köhler *et al.*, 2001; Triebkorn *et al.*, 2002). Cependant, les travaux récents de Amiard *et al.* (2006) souligne la grande variabilité d'induction et les différents facteurs abiotiques et biotiques influençant la synthèse des métallothionéines chez des invertébrés aquatiques.

2.3 *Biomarqueurs physiologiques*

2.3.1 Sensibilité vis-à-vis de la contamination

Au cours de cette thèse, les réponses des indices de croissance et de condition, ont été analysées en considérant que ces paramètres à haut niveau d'organisation biologique pourraient révéler des dommages induits par les polluants à l'échelle de l'individu et permettre d'évaluer la probabilité de l'individu à survivre. En effet, de nombreux auteurs ont démontré que des juvéniles présentant des taux de croissance diminués et des réserves énergétiques limitées ont moins de chance de survivre et donc de contribuer aux renouvellements des populations de poisson (Biro *et al.*, 2004, Sogard, 1997, Vinagre *et al.*, 2008). L'objectif de nos travaux n'était pas ici de confirmer ce phénomène déjà établi mais d'analyser les réponses des individus lors de différentes conditions d'exposition à des contaminants chimiques. Les indices de croissance et de condition se sont avérés sensibles aux différents niveaux analysés de polluants (Tableau 36). En effet, une diminution de la performance physiologique des poissons a pu être établie avec des niveaux croissants de contaminants chimiques. L'utilisation simultanée de ces différents indices de croissance et de condition sur des juvéniles de poissons a permis d'évaluer les effets d'une exposition de type pétrolière et les effets d'une exposition chronique à un mélange de polluant sur l'état de santé des organismes.

Des différences de sensibilité vis-à-vis des contaminants chimiques ont cependant pu être observées suivant le biomarqueur physiologique considéré. Les taux de croissance somatique et l'indice de condition de Fulton ont montré de fortes corrélations significatives avec les niveaux de contamination mesurés dans le sédiment. De plus, ces paramètres varient précocément en situation de stress, puisqu'une différence significative a été observée au bout de quelques jours chez les turbots et les bars sous l'effet du jeûne mais également dès 7 jours chez les turbots exposés au sédiment contaminé. Le coefficient de variation de l'indice K de Fulton s'est avéré faible et constant au cours des différentes expériences d'exposition (6%) (Figure 73). Ce coefficient de variation n'a pu être calculé pour les taux de croissance en raison des valeurs négatives mesurées en conditions contaminées. Cette sensibilité à la contamination et les faibles variations observées représentent des points positifs pour l'utilisation des variations de croissance et de l'indice de condition dans l'évaluation des effets des polluants sur les juvéniles de poisson. Par ailleurs, des variabilités plus importantes ont été observées pour les rapports ARN/ADN (31 %) et TAG /ST (79 %), ce qui a probablement limité l'observation de corrélation significative avec les niveaux de

contamination. Cette variabilité peut s'expliquer dans un premier temps par les techniques de dosage de ces indices biochimiques qui nécessitent des étapes d'extraction par solvant.

De même que la croissance récente obtenue par otolithométrie, le ratio ARN :ADN s'est avéré varié uniquement de manière significative pour les conditions les plus contaminées. Le rapport ARN/ADN est un indice communément utilisé, pour évaluer la croissance et la condition nutritionnelle des juvéniles de poisson. Dans notre étude sur l'effet du jeune sur le turbot, une diminution significative de cet indice n'a été observée qu'après 21 jours de jeune alors que plusieurs études ont montré que cet indice répondait rapidement de l'ordre de quelques jours, à des variations de croissance et d'alimentation sur des stades précoces de poisson (Clemmesen, 1998; Buckley *et al.*, 1999). Une corrélation significative de cet indice avec les taux de croissance somatique a cependant été reportée pour chacune des trois études utilisant cet indice attestant de la pertinence de ce paramètre pour refléter la croissance d'un poisson. Les réponses des rapports ARN/ADN sur les individus soumis aux conditions d'expositions les plus contaminées, suggèrent que ce rapport permet d'intégrer les effets des polluants même après une période de décontamination. Il reflète ainsi la condition affaiblie des poissons.

Une forte variabilité a également été observée dans les rapports TAG/ST (79 %). Cette variabilité dans les niveaux de TAGs a été reportée par certains auteurs entre individus présentant les mêmes activités d'alimentation (Fraser *et al.*, 1987; Ferron, 2000). De plus, les valeurs extrêmement faibles observées chez les flets prélevés dans les différents estuaires rendent difficile son utilisation en condition naturelle. En effet, cet indice apparaît très sensible aux disponibilités en nourriture du moment de l'année où sont effectués les prélèvements d'individus comme le montre l'étude de Durieux *et al.*, (2004) sur des soles. Néanmoins, ce paramètre à l'avantage de refléter de manière assez directe les réserves nutritionnelles des individus. Il a réagi de manière sensible aux variations de contaminations chimiques même si aucune corrélation significative n'a pu être observée avec les niveaux de contamination chimique. Une diminution significative a ainsi été observée après les 21 jours d'exposition des turbots aux trois sédiments contaminés, à la fin de l'exposition du caging pour les deux espèces et sur les flets prélevés dans les estuaires anthropisés.

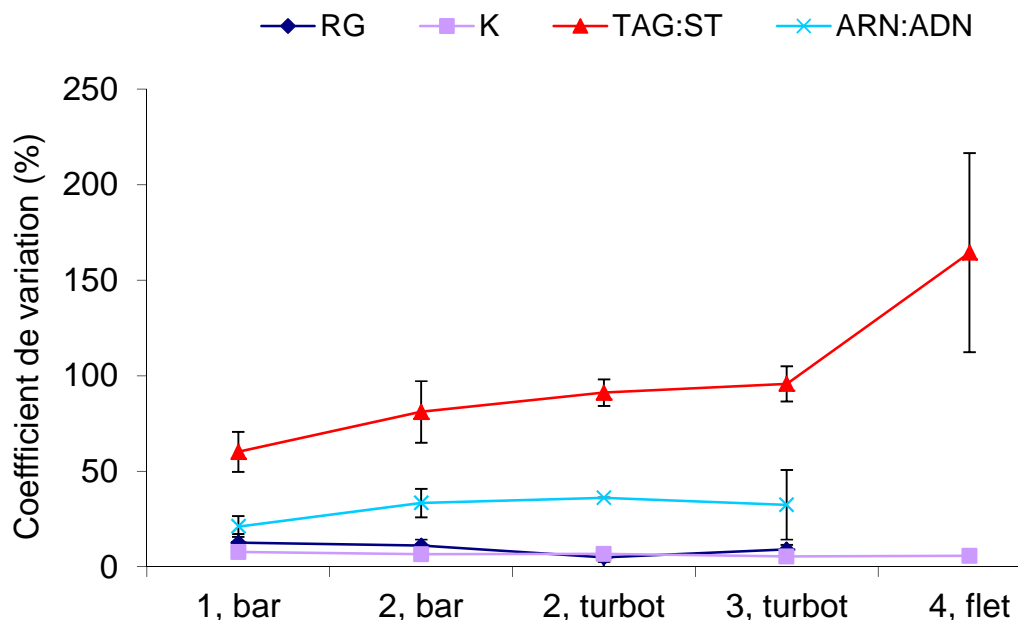


Figure 72 : Evolution des coefficients de variation de la croissance récente (RG), de l'indice de condition de Fulton (K) et des ratio ARN :ADN et TAG :ST au cours des quatre études : 1) exposition de juvéniles de bar, *Dicentrarchus labrax*, à du pétrole, 2) mise en cage de juvénile de bar et de turbot, *Scophthalmus maximus*, dans le port de Boulogne sur mer, 3) exposition de juvéniles de turbot à des sédiments contaminés et 4) prélèvement de flets, *Platichthys flesus*, dans trois estuaires français et un estuaire belge.

2.3.2 Limites d'utilisation

L'utilisation des indices de croissance et de condition apparaît dépendante de l'espèce d'étude suivant le mode d'exposition considérée. En effet, comme évoqué précédemment, le bar apparaît comme une espèce plus appropriée dans le cadre d'expériences de caging. Des améliorations dans les techniques d'exposition des turbots par caging sont nécessaires afin de diminuer le stress physiologique de la mise en cage sur cette espèce. A l'inverse, la comparaison des réponses des biomarqueurs physiologiques entre l'étude de Filipuci (2011) et la notre sur l'effet d'une exposition à du sédiment prélevé dans la Seine montrent des effets physiologiques plus marqués chez le turbot que chez le bar (Figure 74). Le turbot serait ainsi plus approprié dans les études, en laboratoire, des effets de sédiments contaminés sur l'état de santé des organismes. Cette différence de réponses vis-à-vis du sédiment contaminé pourrait être expliquée principalement par le mode de vie benthique du turbot. L'utilisation d'espèces benthiques pour les bioessais de sédiment est en effet préconisée (Van der Geest *et al.*, 2010). D'autres facteurs propres aux caractéristiques des espèces pourraient s'ajouter pour expliquer cette différence inter-spécifique en terme de métabolisme ou de comportement.

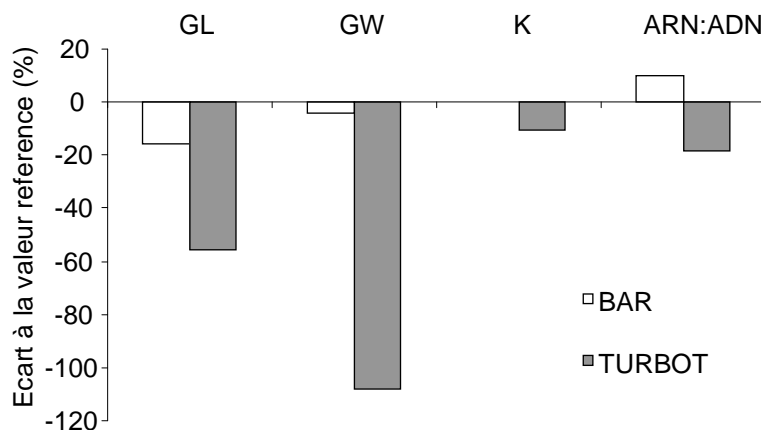


Figure 73 : Ecart de réponses (%) des biomarqueurs physiologiques mesurés chez des juvéniles de bar et de turbot exposé à du sédiment issu de la Seine par rapport à la condition de référence.

Par ailleurs, une incertitude demeure dans l'ensemble de nos expériences quant-aux mécanismes de toxicité de ces contaminants responsables des diminutions observées de l'état de santé des organismes. Bien qu'une diminution des performances physiologiques des individus ait été observée lors de leurs mises en cages dans un site contaminé, il est difficile de déterminer si cette diminution était directement liée à la toxicité des contaminants présents dans le milieu vis-à-vis des tissus biologiques. En effet, des effets indirects des contaminants ont pu affecter l'état physiologique des organismes comme la disponibilité en nourriture ou leur comportement alimentaire et natatoire. Une étude comportementale sur l'effet de cette contamination sur les activités d'alimentation des organismes pourrait être intéressante afin d'analyser les causes de la diminution de l'état de santé des organismes. En effet, une meilleure compréhension des effets toxicologiques des contaminants dans les systèmes naturels pourrait être apportée par l'utilisation simultanée de paramètres comportementaux et physiologiques comme le préconise certains auteurs (Scott and Sloman, 2004; Depledge, 2005). La récupération des granulés ou l'observation des comportements alimentaires permettrait d'apprécier les taux d'ingestion de nourriture des organismes contaminés en condition de laboratoire. L'analyse de cette activité alimentaire n'a pas pu être abordée dans la présente étude en raison de la turbidité limitant l'observation du comportement alimentaire et de l'impossibilité de récupérer les granulés non utilisés en présence de sédiments dans les aquariums. Les différents paramètres physiologiques analysés étant fortement sensible à cette diminution d'activité alimentaire, les effets observés des contaminants chimiques sur leur état de santé seraient davantage attribués à une combinaison des différents processus induit par ces

polluants. Bien qu'ils soient sensibles et pertinent, les indices de croissance et de condition manqueraient donc de spécificité vis-à-vis des polluants.

Dans notre approche, nous avons proposé l'utilisation d'indices de croissance et de condition en tant que biomarqueurs physiologiques à haut niveaux d'organisation biologique. Cependant, d'autres paramètres physiologiques reliés à des processus métaboliques plus précis pourrait également apporter des informations sur l'état physiologique des organismes comme les processus d'osmorégulation (Lionetto *et al.*, 1998; Monserrat *et al.*, 2007), les capacités cardiaques (Walker *et al.*, 1991; Claireaux et Davoodi, 2010), la respiration (Couture e Kumar, 2003; Chowdury *et al.*, 2004) ou le métabolisme énergétique (Cattani *et al.*, 1996; Tintos *et al.*, 2006; Davoodi et Claireaux, 2007). La comparaison des réponses de ces paramètres physiologiques avec celles des indices de croissance et de condition pourrait permettre l'approfondissement des relations causes à effets avec les polluants.

Conclusion générale

Le travail de cette étude s'inscrit dans une problématique d'évaluation des effets de la pollution en milieu littoral en utilisant des juvéniles de poisson comme modèle biologique. Une approche écotoxicologique a été développée en analysant conjointement des biomarqueurs chimiques, moléculaires et physiologiques afin de disposer d'informations permettant à la fois de signaler l'exposition d'un organisme à des contaminants chimiques et d'évaluer les effets de cette exposition sur l'état de santé des individus. Le développement de ce type d'approche intégrée est assez nouveau en écotoxicologie bien qu'un besoin de considérer différents niveaux d'organisation dans l'étude des effets des polluants émerge depuis plusieurs années. Cette approche a été développée par différentes méthodes d'exposition à des contaminants chimiques en conditions plus ou moins contrôlées. La sensibilité et la pertinence des différents biomarqueurs utilisés ont été analysées dans le cadre d'une part d'une exposition à du pétrole simulant une situation de pollution accidentelle et d'une pollution chronique à un mélange de polluants d'autre part.

Les relations observées entre les biomarqueurs moléculaires et les indices de croissance et de condition après exposition des juvéniles de bars aux hydrocarbures suggèrent la capacité de l'EROD, et à un moindre degré de la GST, à détecter l'exposition des organismes au pétrole et à refléter ses effets délétères sur l'état de santé des organismes. Cette relation a par contre été difficilement établie dans un contexte de pollution multiple. En effet, bien qu'une variation des réponses des biomarqueurs moléculaires soit apparue en présence des contaminants chimiques dans chacune de nos études, leurs réponses apparaissent modérément reliées aux teneurs en contaminants chimiques et aux effets sur les performances physiologiques des organismes. Cette absence de relation pourrait s'expliquer par des effets synergiques ou antagonistes des différents polluants présents dans le sédiment sur le métabolisme impliqué dans les activités de ces biomarqueurs enzymatiques. Ces résultats suggèrent une limitation dans la capacité de ces derniers à agir comme « système d'alarme » dans le cas de pollution chronique à un mélange de polluants.

Dans nos études, les réponses des indices de croissance et de condition, ont été analysées en considérant que ces paramètres à haut niveau d'organisation biologique pourraient révéler les dommages induits par les polluants à l'échelle de l'individu et permettre d'évaluer la probabilité de l'individu à survivre. Leurs utilisations à la fois en condition contrôlée et environnementale a permis d'approfondir les relations entre niveaux de

contaminants chimiques présent dans le milieu et état de santé des poissons. En effet, une diminution de la performance physiologique des poissons a pu être clairement établie avec des niveaux croissants de contaminants chimiques. Il apparaît cependant souhaitable de les analyser sur des juvéniles en phase de croissance rapide afin de pouvoir détecter des différences sur des temps d'exposition relativement court pour des concentrations environnementales. Dans cette étude, l'expérience de caging s'est révélée concluante pour les juvéniles de bar. A l'inverse, une baisse des indices de condition a été observée chez les juvéniles de turbot témoignant d'un stress physiologique de la mise en cage. L'évaluation de ce stress, peu établie dans la majorité des études de caging, apparaît fondamentale pour valider cette technique d'étude. En s'assurant de la bonne condition des individus dans la station de référence, par comparaison aux poissons témoins ou aux données acquises en condition de laboratoire, cette technique qui représente un mode environnemental de contamination, peut ainsi être utilisée pour suivre différents types de contamination.

La question de l'évaluation de l'impact des polluants dans l'environnement est soulevée dans le cadre des réglementations récentes comme le témoigne la Directive Cadre Eau de 2000, qui a pour objectif de parvenir au bon état chimique et écologique des milieux aquatiques. A ces fins, des outils d'analyse écotoxicologique applicables à la surveillance du milieu et à la prédiction des effets des contaminants chimiques ont été développés au cours des différentes approches expérimentales abordées dans ce travail. Nous pouvons ainsi formuler un certain nombre de recommandations quant à l'utilisation des biomarqueurs en vue d'améliorer l'évaluation des risques environnementaux. Les résultats de nos études suggèrent que les procédures de surveillance ne devraient pas être uniquement basées sur des biomarqueurs à faible niveau d'organisation biologique. L'utilisation de biomarqueurs avec davantage de pertinence écologique comme les indices de croissance et de condition apparaît essentielle pour évaluer les effets des contaminants chimiques. Ces biomarqueurs peuvent être d'une grande utilité en révélant des altérations de la santé des organismes avant qu'il y ait des effets massifs au niveau des populations. Ils offrent donc la possibilité d'établir un diagnostic de la qualité des habitats. Ils pourraient aussi établir une hiérarchisation des effets en fonction des niveaux de contamination présents dans l'environnement notamment lorsqu'il s'agit de pollutions multiples. Cependant, leurs réponses, représentant un bilan des différents effets induits par la présence de ces xénobiotiques, ne permettent pas d'établir un lien direct avec la nature de la contamination chimique en condition naturelle. Ce manque de spécificité envers le type de polluants peut-être problématique puisque des mesures visant à l'amélioration de la qualité du milieu ne peuvent être mises en place par les gestionnaires que si les informations

sur les types et niveaux de contaminants impliqués sont connus. A cet effet, le dosage chimique des contaminants à la fois dans l'environnement (eau, sédiment) et les organes cibles des poissons représente un moyen direct pour évaluer les niveaux de contaminants auxquels sont exposés les organismes et pour ainsi établir des relations entre type et niveau de contamination et état de santé des organismes. Le développement d'autres biomarqueurs précoces en supplément de ceux considérés dans notre étude dont les réponses seraient moins bruitées par des effets antagonistes doit être poursuivi (biomarqueurs génotoxiques, neurotoxiques, immunologiques...). Qu'il s'agisse de bioessais, visant à déterminer la toxicité potentielle du sédiment vers le biota, de caging ou de méthode *in situ* permettant d'évaluer la qualité du milieu, l'utilisation d'une approche multibiomarqueurs est ainsi fortement recommandée dans des méthodes de biosurveillance.

Perspectives

A partir des données acquises lors de cette étude et celles obtenues par les nombreux travaux réalisées à l'échelle moléculaire, cellulaire, physiologique et comportementale, différentes approches peuvent être proposées afin d'améliorer l'utilisation des biomarqueurs dans les démarches d'évaluation des risques associés aux contaminants chimiques. Ceci est particulièrement nécessaire pour les biomarqueurs à niveau écologique pour lesquels moins de travaux sont actuellement disponibles. En effet, l'approche écologique est nécessaire afin d'estimer la qualité environnementale des écosystèmes littoraux. Dans notre étude, nous avons proposé l'utilisation d'indices de croissance et de condition qui permettent d'évaluer des changements au niveau des individus, avant que la population ou la communauté ne soit affectée, d'où l'intérêt de leur suivi pour la préservation des ressources halieutiques. Cependant, l'évaluation de la biodiversité et de la structure des communautés permet de disposer d'indices plus directs sur l'impact de facteurs de stress, tout en intégrant les traits écologiques. A terme, il serait donc intéressant de réaliser le lien entre les approches effectuées à l'échelle individuelle avec celles à l'échelle de la population afin d'apprécier les vulnérabilités populationnelles face aux stress toxiques. Ce lien pourrait également être établi par la réalisation de modèles écotoxicologiques fondés sur des processus énergétiques. En effet, de telles études méritent d'être développées en permettant d'établir des relations entre les différents niveaux d'organisation mais également les différentes approches développées en laboratoire et sur le terrain. De plus, pour qu'un biomarqueur puisse être utilisé dans un cadre réglementaire, il est nécessaire qu'il soit standardisé et soumis à des processus d'intercalibration afin que les données acquises soient crédibles pour tous les acteurs concernés. Plus particulièrement, la variabilité de réponses des biomarqueurs représente un aspect important à appréhender afin de pouvoir proposer aux gestionnaires des indices fiables et reproductibles. En effet, l'utilisation d'un biomarqueur ne peut être considérée que s'il est possible de distinguer ses variabilités de réponse naturelle et de mesure à celle induit par le stress chimique.

Un facteur important à prendre en compte également dans les études écotoxicologiques est celui des antécédents environnementaux des individus analysés. L'exposition chronique à des contaminants peut conduire à l'acquisition d'une certaine

tolérance chez les individus. Ceci est particulièrement vrai pour les organismes estuariens. Les perturbations anthropiques qui s'ajoutent à la variabilité naturelle des zones estuariennes ont créé un ensemble de conditions fluctuantes dans lesquelles il est difficile de détecter des stress induits « uniquement » par les activités humaines (« Estuarine Quality Paradox », Elliott et Quintino 2007). La réalisation d'étude expérimentale avec des organismes issus d'écloserie ne prend pas en compte cette capacité naturelle d'adaptation. De plus, les animaux issus d'écloserie ont également été soumis à une sélection génétique de la part des éleveurs et des problèmes de consanguinité ont également été rapportés chez les poissons d'élevage. Bien que l'utilisation d'organismes d'aquaculture représente certains avantages (disponibilité en toute saison, individus calibrés, bonne condition...), il apparaît nécessaire de considérer également des animaux issus du milieu naturel. En comparant les réponses d'individus issus de milieu relativement propre et de milieux anthropisés à des contaminants chimiques, il serait possible d'analyser les tolérances des organismes contaminés aux polluants.

Au cours des différentes études réalisées, nous nous sommes principalement intéressés à la contamination par la colonne d'eau et/ou le sédiment. Cependant, la contamination par la nourriture représente également une voie de transfert des polluants importante dans l'environnement littoral. Par exemple, la contamination trophique est considérée comme la voie prépondérante de l'accumulation de certains métaux comme le mercure (Boudou et Ribeyre, 1997; Morel *et al.*, 1998). L'importance de la contamination par voie trophique est encore mal connue puisqu'elle est difficile à appréhender aussi bien en condition naturelle qu'en condition de laboratoire. En condition naturelle, il est difficile de déterminer avec précision les niveaux de contaminants présents dans la nourriture des individus étudiés. En condition de laboratoire, il est aussi compliqué de disposer ou de reconstituer de la nourriture contaminée d'un niveau nutritionnel équivalent à la nourriture de référence. De plus, une forte variabilité dans la consommation de la nourriture peut être effective entre individus. Cette question de la contamination par la nourriture est soulevée dans le cadre du projet MERLUMED qui s'intéresse au transfert et à la bioaccumulation des contaminants dans le merlu (*Merluccius merluccius*) du golfe du Lion en Méditerranée Nord Occidentale et dans les espèces principales de son réseau trophique. La recherche et le développement d'expériences de contamination par la nourriture couplées à des expositions directes permettraient d'apprécier l'importance des différentes voies de transfert des polluants et ainsi apporter des informations complémentaires et indispensables sur la sensibilité des biomarqueurs.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Aarab, N., 2004. Les biomarqueurs chez les poissons et les bivalves : de l'exposition à l'effet et du laboratoire au terrain. Université de Bordeaux 1. Thèse 276 pp.
- Aarnio, K., Bonsdorff, E., Rosenback, N., 1996. Food and feeding habits of juvenile flounder *Platichthys flesus* (L.), and turbot, *Scophthalmus maximus* L., in the land Archipelago, Northern Baltic sea. *Journal of Sea Research* 36 (3–4), 311–320.
- Aas, E., Beyer, J., Goksøyr, A., 1998. PAHs in bile detected by fixedwavelength fluorescence. *Marine Environmental Research* 46 (1–5), 225–228.
- Aas, E., Klungsøyr, J., 1998. PAH Metabolites in Bile and EROD Activity in North Sea Fish. *Marine Environmental Research* 46 (1–5), 229–232.
- Abalos, M., Abad, E., Estevez, A., Sole, M., Buet, A., Quiros, L., 2008. Effects on growth and biochemical responses in juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*) after long-term dietary exposure to low levels of dioxins. *Chemosphere* 73, 303–310.
- Abdel-Tawwab, M., Mousa, M.A.A, Ahmad, M.H., Sakr, S.F.M., 2007. The use of calcium pre-exposure as a protective agent against environmental copper toxicity for juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture* 264, 236–246.
- Able, K.W., Manderson, J.P., Studholme, A.L., 1999. Habitat quality for shallow water fishes in an urban estuary: The effects of man-made structures on growth. *Marine Ecology Progress Series* 187, 227–235.
- Achuba, F.I., Osakwe, S.A., 2003. Petroleum-induced free radical toxicity in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 29, 97–103.
- Adams, S.M., 2002. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. American Fisheries Society Bethesda, Maryland 621pp.
- Adams, S.M., Crumby, W.D., Greely, M.S., Jr., Ryon, M.G., Schilling, E.M. 1992. Relationships between physiological and fish population responses in a contaminated stream. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11, 1549–1557.
- Adams, S.M., Shepard, K.L., Greeley, M.S., Jr, Ryon, M.G., Jimenez, B.D., Shugart, L.R., McCarthy, J.F., Hinton, D.E., 1989. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress in fish. *Marine Environmental Research* 28, 459–464.
- Adams, S.M., Shugart, L.R., Southworth, G.R., Hinton, D.E., 1990. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (Eds.), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 333–353 (Chapter 19).

- Aguilar, A., Borrell, A., Reijnders, P.J.H., 2002. Geographical and temporal variation in levels of organochlorine contaminants in marine mammals, *Marine Environmental Research* 53, 425–452.
- Ahmad, I., Maria, V.L., Pacheco, M., Santos, M.A., 2009. Juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses following 17 β -estradiol exposure. *Ecotoxicology* 18, 974–982.
- Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A., 2004. Enzymatic and non-enzymatic antioxidants as an adaptation to phagocyte-induced damage in *Anguilla anguilla* L. following in situ harbor water exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57, 290–302.
- Alami-Durante, H., Olive, N., Rouel, M., 2007. Early thermal history significantly affects the seasonal hyperplastic process occurring in the myotomal white muscle of *Dicentrarchus labrax* juvenile. *Cell and Tissue Research* 327, 553–570.
- Almeida, J.S., Meletti, P.C., Martinez, C.B.R., 2005. Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 140, 356 – 363.
- Almroth, B.C., Albertsson, E., Sturve, J., Förlin, L., 2008. Oxidative stress, evident in antioxidant defences and damage products, in rainbow trout caged outside a sewage treatment plant. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70, 370–378.
- Alquezar, R., Markich, S.J., Booth, D.J., 2006. Effects of metals on condition and reproductive output of the smooth toadfish in Sydney estuaries, south-eastern Australia. *Environmental Pollution* 142, 116–122.
- Al-Yakoob, S.M., Gundersen, D., Curtis, L., 1996. Effects of the Water-Soluble Fraction of Partially Combusted Crude Oil from Kuwait's Oil Fires (from Desert Storm) on Survival and Growth of the Marine Fish *Menidia beryllina*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 35, 142–149.
- Alzieu, C., Abamou, A., Bassoullet, P., Boutier, B., 1999. Dragage et environnement marin : état des connaissances. Plouzane : Edition Ifremer, 223p.
- Amara, R., 2003. Seasonal ichthyodiversity and growth patterns of juvenile flatfish on a nursery ground in the Southern Bight of the North Sea (France). *Environmental Biology of Fishes* 67, 191–201.
- Amara, R., Meziane, T., Gilliers, C., Hermel, G., Laffargue, P., 2007. Growth and condition indices in juvenile sole *Solea solea* measured to assess the quality of essential fish habitat. *Marine Ecology Progress Series* 351, 201–208.
- Amara, R., Selleslagh, J., Billon, G., Minier, C., 2009. Growth and condition of 0-group European flounder, *Platichthys flesus* as indicator of estuarine habitat quality. *Hydrobiologia* 627, 87–98.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76, 160–202.

- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76, 160–202.
- Andersson, C., Katsiadaki, I., Lundstedt-Enkel, K., Örberg, J., 2007. Effects of 17 α -ethynylestradiol on EROD activity, spiggin and vitellogenin in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquatic Toxicology* 83, 33–42.
- Andersson, T., Förlin, L., 1992. Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish. *Aquatic Toxicology* 24, 1–20.
- Angelidis, M.O., Aloupi, M., 1995. Metals in sediments of Rhodes harbour, Greece. *Marine Pollution Bulletin* 31, 273–276.
- Anken, R.H., Werner, K., Ibsch, K., Rahmann, H., 1998. Fish inner ear otolith size and bilateral asymmetry during development. *Hearing Research* 121, 77–83.
- Annune, P.A., Iyaniwura, T.T., 1993. Accumulation of two trace metals in tissues of freshwater fishes, *Oreochromis niloticus* and *Clarias gariepinus*. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 2 (3), 5–18.
- Arendt, J.D., 1997. Adaptive intrinsic growth rates: an integration across taxa. *Quarterly Review of Biology* 72, 149–177.
- Ariese, L., 1993. Synchronous fluorescence spectrometry of fish bile: a rapid screening method for the biomonitoring of PAH exposure. *Aquatic Toxicology* 26, 273–286.
- Ariņ, E., Kocabikik, S., Su, E., 2001. Induced CYP1A mRNA, protein and catalytic activity in the liver of feral fish, leaping mullet, *Liza saliens*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 128, 281–290.
- Arukwe, A., 2001. Cellular and molecular responses to endocrine-modulators and the impact on fish reproduction. *Marine Pollution Bulletin* 42, 643–655.
- Arukwe, A., Thibaut, R., Ingebrigtsen, K., Celius, T., Goksøyr, A., Cravedi, J.P., 2000. In vivo and in vitro metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology* 49, 289–304.
- ASTM, 1994. Standard guide for collection, storage, characterization, and manipulation of sediments for toxicological testing. E-1391-94. American Society for Testing and Materials,
- Atli, G., Canli, M., 2010. Response of antioxidant system of fresh water fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1884–1889.

B

- Babo, S., Vasseur, P., 1992. In vitro effects of thiram on liver antioxidant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 22, 61–68.

- Bado-Nilles, A., Quentel, C., Thomas-Guyon, H., Le Floch S., 2009. Effects of two oils and 16 pure polycyclic aromatic hydrocarbons on plasmatic immune parameters in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linné). *Toxicology In Vitro* 23, 235–241.
- Bagnyukowa, T.V., Vasytkiv, O.Y., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2005. Catalase inhibition by amino triazole induces oxidative stress in goldfish brain. *Brain Research* 1052, 180–186.
- Baillon, N., 1992. Otolithometrie: revue et problemes. In *Tissus durs et âge individuel des verte´bre´s* (Baglinière, J. L., Castanet, J., Conand, F., Meunier, F. J., eds), pp. 21–52.
- Barhoumi, S., Messaoudi, I., Said, K., Kerkeni, A., 2009. Cadmium bioaccumulation in three benthic fish species, *Salaria basilisca*, *Zosterisessor ophiocephalus* and *Solea vulgaris* collected from the Gulf of Gabès in Tunisia. *Journal of Environmental Science* 21, 980–984.
- Barnabé, G., 1976. Contribution à la connaissance de la biologie du loup, *Dicentrarchus labrax* L. (Serranidae) de la région de Sète. Thèse Doct. D'État, Université du Languedoc, Montpellier, 426 pp.
- Baumann, P.C., 1989. PAH, metabolites, and neoplasia in feral fish populations. In *Metabolism of PAH in the aquatic environment* (Varanasi U, ed), 269-290. CRC, Boca Raton, FL, USA.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., 1997. Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues: application to mussels. *Fresenius Z. Analytical Chemistry* 359, 502–509.
- Bayens, W.F.J., 1998. Trace metals in the Westerschelde estuary: a case study of a polluted, partially anoxic estuary. *Hydrobiologia* 366, 167 pp..
- Beck, M.W., Heck, K., Able, K., Childers, D., Egglestone, D., Gillanders, B., Halpern, B., Hays, C., Hoshino, K., Minello, T., Orth, R., Sheridan, P., Weintin, M., 2001. The identification, conservation and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates. *Bioscience* 51, 633–641.
- Bégout-Anras, M.L., Lagardère, J.P., 2004. Domestication et comportement chez les poissons téléostéens. *INRA Productions Animales* 17, 211–215.
- Beiras, R., Bellas, J., Fernández, N., Lorenzo, J.I., Cobelo-García, A., 2003. Assessment of coastal marine pollution in Galicia (NW Iberian Peninsula); metal concentrations in seawater, sediments and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) versus embryolarval bioassays using *Paracentrotus lividus* and *Ciona intestinalis*. *Marine Environmental Research* 56, 531–553.
- Benedetti, M., Martuccio, G., Fattorini, D., Canapa, A., Barucca, M., Nigro, M., Regoli, F., 2007. Oxidative and modulatory effects of trace metals on metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. *Aquatic Toxicology* 85, 167–175.
- Bergeron, C., Beric-Maskarel, K., Muntasser, S., Weyer, L., Somerville, M.J., Percy, M.E., 1994. Neurofilament light and polyadenylated mRNA levels are decreased in amyotrophic lateral sclerosis motor neurons, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 53, 221–230.
- Berthet, B., Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Berthelot, Y., Le Hen, A., Mastain, O., Rainbow, P.S., Smith, B.D., 2003. Accumulation and Soluble Binding of Cadmium, Copper, and

- Zinc in the Polychaete *Hediste diversicolor* from Coastal Sites with Different Trace Metal Bioavailabilities. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45, 468–478.
- Bervoets, L., Blust, R., 2003. Metal concentrations in water, sediment and gudgeon (*Gobio gobio*) from a pollution gradient: relationship with fish condition factor. *Environmental Pollution* 126, 9–19.
- Besselink, H.T., Flipsen, E., Eggen, M.L., Vethaak, A.D., Koeman, J.H., Brouwer, A., 1998. Alterations in plasma and hepatic retinoid levels in flounder (*Platichthys flesus*) after chronic exposure to contaminated harbour sludge in a mesocosm study. *Aquatic Toxicology* 42, 271–285.
- Beyer, J., 1996. Fish biomarkers in marine pollution monitoring; evaluation and validation in laboratory and field studies. Academic thesis, University of Bergen, Norway.
- Beyer, J., Aas, E., Borgenvik, H.K., Ravn, P., 1997. Bioavailability of PAH in Effluent Water from an Aluminium Works Evaluated by Transplant Caging and Biliary Fluorescence Measurements of Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.). *Marine Environmental Research* 46, 233–236.
- Beyer, J.U., Sandvik, M., Hylland, K., Fjeld, E., Egaas, E., Aas, E., Skare, J.U., 1996. Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed by caging to polluted sediments in Sorfjorden, Norway. *Aquatic Toxicology* 36, 75–98.
- Biagianti-Risbourg, S., Pairault, C., Vernet, G., Boulkebach, H., 1996. Effect of lindane on the ultrastructure of the liver of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, sac-fry. *Chemosphere*, 33 (10), 2065–2079.
- Bilbao, E., Raingeard, D., Diaz de Cerio, O., Ortiz-Zarragoitia, M., Ruiz, P., Izagirre, U., Orbea, A., Marigomez, I., Cajaraville, M.P., Cancio, I., 2010. Effects of exposure to Prestige-like heavy fuel oil and to perfluorooctane sulfonate on conventional biomarkers and target gene transcription in the thicklip grey mullet *Chelon labrosus*. *Aquatic Toxicology* 98, 282–296.
- Billon, G., 2001. Géochimie des métaux et du soufre dans les sédiments des estuaires de la Seine et de l'Authie. Université des Sciences et Technologies de Lille. Thèse 230 pp.
- Biro, P.A., Morton, A.E., Post, J.R., 2004. Over-winter lipid depletion and mortality of age-0 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 61, 1513–1519.
- Birth, G., 2003. A scheme for assessing human impacts on coastal aquatic environments using sediments. Wollongong University Papers in Center for Maritime Policy 14, Australia.
- Bister, T.J., D.W. Willis, M.L. Brown, S.M. Jordan, R.M. Neumann, M.C. Quist, Guy, C.S., 2000. Proposed standard weight (Ws) equations and standard length categories for 18 warmwater nongame and riverine fish species. *North American Journal of Fisheries Management* 20, 570–574.

- Blaber, S.J.M., Cyrus, D.P., Albaret, J.J., Ching, C.V., Day, J.W., Elliott, M., Fonseca, M.S., Hoss, D.E., Orensanz, J., Potter, I.C., Silvert, W., 2000. Effects of fishing on the structure and functioning of estuarine and nearshore ecosystems. *ICES Journal of Marine Science* 57, 590–602.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 911–917.
- Boehlert, G.W., 1985. Using objective criteria and multiple regression models for age determination in fishes. *Fishery Bulletin* 83, 103–117.
- Boglione, C., Costa, C., Giganti, M., Cecchetti, M., Di Dato, P., Scardi, M., Cataudella, S., 2006. Biological monitoring of wild thicklip grey mullet (*Chelon labrosus*), golden grey mullet (*Liza aurata*), thinlip mullet (*Liza ramada*) and flathead mullet (*Mugil cephalus*) (*Pisces: Mugilidae*) from different Adriatic sites: meristic counts and skeletal anomalies. *Ecological Indicators* 6, 712–732.
- Boisson, F., Hartl, M.G.J., Fowler, S.W., Amiard-Triquet, C., 1998. Influence of chronic exposure to silver and mercury in the field on the bioaccumulation potential of the bivalve *Macoma balthica*. *Marine Environmental Research* 45, 325–340.
- Boryslawskyj, M., Garrod, A.C., Pearson, J.T., Woodhead, H., 1988. Elevation of glutathione S-transferase activity as a stress response to organochlorine compounds in the fresh water mussel *Sphaerium corneum*. *Marine Environmental Research* 24, 101–104.
- Bos, A.R., 1999. Aspects of the life history of the European flounder (*Pleuronectes flesus* L. 1758) in the tidal river Elbe. Ph.D. Thesis, University of Hamburg, Hamburg.
- Boudou A., Ribeyre, A., 1997. Mercury in the food web: accumulation and transfer mechanisms. In : Sigel A. and Sigel H. (Eds.), *Mercury and its effects on Environment and Biology*, 289–319, Marcel Dekker, New York.
- Boudou, A.D., Ribeyre, F.D., 1989. Fish as “biological model” for experimental studies in ecotoxicology. *Aquatic Ecotoxicology fundamental concepts and methodologies* (2), pp 127-157.
- Boust, D., Fischer, J.C., Ouddane, B., Petit, F., Wartel, M., Abarnou, A., Ficht, A., Gandon, R., Hebert, D., Hocdé, R., Poulin, M., Rozet, M., Voyer, J.J., 1999. Fer et manganèse : réactivités et recyclages. Programme scientifique Seine-Aval. Editions Ifremer (téléchargeable sur le site <http://seine-aval.crihan.fr/web/>)
- Boutier, B., Chiffolleau, J.F., Auger, D., Truquet, I, 1993. Influence of the Loire river on dissolved lead and cadmium concentrations in coastal waters of Brittany, *Estuarine Coastal and Shelf Science* 36, 133–145.
- Bozcaarmutlu, A., Arinç, E., 2004. Inhibitory effects of divalent metal ions on liver microsomal 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity of leaping mullet. *Marine Environmental Research* 58, 521–524.
- Bradbury, R. B., Kirby, W. B. 2006. Farmland birds and resource protection in the UK: crosscutting solutions for multi-functional farming. *Biological Conservation* 129, 530–542.

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Bucheli, T.D., Fent, K., 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 25, 201–268.
- Buckley, L., Caldarone E., Ong T.L., 1999. RNA–DNA ratio and other nucleic acid–based indicators for growth and condition of marine fishes. *Hydrobiologia* 401, 265–277.
- Buckley, L.J., 1980. Changes in RNA, DNA and protein content during ontogenesis of the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and the effect of starvation. *Fishery Bulletin* 77, 703–708.
- Buckley, L.J., 1984. RNA–DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea. *Marine Biology* 80, 291–298.
- Budzinski, H., Mazeas, O., Tronczynski, J., Desaunay, Y., Bocquene, Claireaux, G., 2004. Link between exposure of fish (*Solea solea*) to PAHs and metabolites: application to the ‘‘Erika’’ oil spill. *Aquatic Living Resources* 17, 329–334.
- Budzinski, H., Togola, A., 2006. Pharmaceutical substances : emergent contaminants of the marine systems. CIESM Workshop on Marine Science and Public Health. 27-30 septembre, Genève, Suisse.
- Buet, A., Banas, D., Vollaire, Y., Coulet, E., Roche, H., 2006. Biomarker responses in European eel (*Anguilla anguilla*) exposed to persistent organic pollutants. A field study in the Vaccare`s lagoon (Camargue, France). *Chemosphere* 65, 1846–1858.
- Buhler, D.R., Wang-Buhler, J.L., 1998. Rainbow trout cytochrome P450s: purification, molecular aspects, metabolic activity, induction and role in environmental monitoring *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 121(1-3), 107–137.
- Buhler, D.R., Williams, D.E., 1988. The role of biotransformation in the toxicity of chemicals. *Aquatic Toxicology* 11, 19–28.
- Burden, V.M., Sandheinrich, M.B., Caldwell, C.A., 1998. Effects of lead on the growth and 6-aminolevulinic acid dehydratase activity of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Environmental Pollution* 101, 285–289.
- Burgeot, T., Bocquené, G., Pingray, G., Godefroy, D., Legrand, J., Dimeet, J., Marco, F., Vincent, F., Henocque, Y., Jeanneret, H.O., Galgani, F., 1994. Monitoring biological effects of contamination in marine fish along French coasts by measurement of ethoxyresorufin-O-deethylase activity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 29, 131–147.
- Burger, J., Gaines, K. F., Boring, C. S., Stephens, W. L., Snodgrass, J., Dixon, C., 2002. Metal levels in fish from the Savannah River: Potential hazards to fish and other receptors. *Environmental Research A*, 89, 85–97.

- Burgess, R.M., Schweitzer, K.A., McKinney, R.A., Phelps, D.K., 1993. Contaminated marine sediment : water column and interstitial toxic effect. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12, 127–138.
- Burgos, M.G., Rainbow, P.S., 2001. Availability of cadmium and zinc from sewage sludge to the flounder, *Platichthys flesus*, via a marine food chain. *Marine Environmental Research* 51, 417–439.
- Burke, J., Peters, D., Hanson, P., 1993. Morphological indices and otolith microstructure of Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus*, as indicators of habitat quality along an estuarine pollution gradient. *Environmental Biology of Fishes* 36, 25–33.
- Burke, N., Brophy, D., King, P.A., 2008. Shape analysis of otolith annuli in Atlantic herring (*Clupea harengus*); a new method for tracking fish populations. *Fisheries Research* 91, 133–143.
- Byczkowski, J.Z., Kulkarni, A.P., 1998. Oxidative stress and pro-oxidant biological effects of vanadium. In: Nriagu, J.O. (Ed.), *Vanadium in the environment, Part 1: Chemistry and Biochemistry*. John Wiley et Sons, Inc., New York, 235–263.

C

- Cabral, N.H., Vasconcelos, R.P., Vinagre, C., Franc, a, S., Fonseca, V., Maia, A., Reis-Santos, P., Lopes, M., Ruano, M., Campos, J., Freitas, V., Santos, P., Costa, M.J., 2007. Relative importance of estuarine flatfish nurseries along the Portuguese coast. *Journal of Sea Research* 57, 209–217.
- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M.H., Pottier, D., Budzinski, H., 2006. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicology* 79, 257–267.
- Cajaraville, M.P., Hauser, L., Carvalho, G., Hylland, K., Olabarrieta, I., Lawrence, A. J., Lowe, D., Goksoyr, A., 2003. Genetic damage and the molecular/cellular response to pollution. In: *Effects of pollution on fish, molecular effects and population responses* (eds. Lawrence A. J., Hemingway K. L.), pp. 14–82. Blackwell Sciences.
- Campana, S.E., Neilson, J.D., 1985. Microstructure of fish otolith. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42, 1014–1032.
- Canli, M., Altı, G., 2003. The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Environmental Pollution* 121, 129–136.
- Cao, L., Huang, W., Liu, J., Yin, X.D.S., 2010. Accumulation and oxidative stress biomarkers in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic cadmium exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 151, 386–392.
- Castro, B.B., Sobral, O., Guilhermino, L., Ribeiro, R., 2004. An In Situ Bioassay Integrating Individual and Biochemical Responses Using Small Fish Species. *Ecotoxicology* 13, 667–681.

- Cattani, O., Serra, R., Isani, G., Raggi, G., Cortesi, P., Carpena, E., 1996. Correlation between metallothionein and energy metabolism in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, exposed to cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology* 113C, 193–199.
- CEDRE, 2010. Centre de documentation, de recherche et d'expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux. <http://www.cedre.fr/fr/accident/pollution-chimique.php>.
- Chapman, P.M., Ho, K.T., Munns, W.R., Solomon, K., Weistein, M.P., 2002. Issues in sediment toxicity and ecological risk assessment. *Marine Pollution Bulletin* 44, 271–8.
- Chapman, P.M., Wang, F., Janssen, C., Persoone, G., Allen, H.E., 1998. Ecotoxicology of metals in aquatic sediments: binding and release, bioavailability, risk assessment, and remediation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55 2212–2243.
- Chen, M.H., Chen, C.Y., 1999. Bioaccumulation of Sediment-Bound Heavy Metals in Grey Mullet, *Liza Macrolepis*. *Marine Pollution Bulletin* 39, 239–244.
- Cheung, C.H.Y., Chaillé, P.M., Randall, D.J., Gray, J.S., Au, D.W.T., 2007. The use of scale increment as a means of indicating fish growth and growth impairment. *Aquaculture* 266, 102–111.
- Chiffolleau, J. F., 2001. La contamination métallique. Programme Scientifique Seine Aval, fascicule 8, Editions IFREMER, 39 pp.
- Chipman, J.K., Davies, J.E., Parsons, J.L., Nair, J., O'Neill, G., Fawell, J.K., 1998. DNA oxidation by potassium bromate: a direct mechanism or linked to lipid peroxidation. *Toxicology* 126, 93–102.
- Choat, J.H., Axe, L.M., Lou, D.C., 1996. Growth and longevity in fishes of the family Scaridae. *Marine Ecology Progress Series* 145, 33–41.
- Chowdhury, M.J., Pane, E.F., Wood, C.M., 2004. Physiological effects of dietary cadmium acclimation and waterborne cadmium challenge in rainbow trout: respiratory, ionoregulatory, and stress parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 139, 163–173.
- Christensen, V., Pauly, D., 1998. "Changes in Models of Aquatic Ecosystems Approaching Carrying Capacity." *Ecological Applications* 8(1 Supplement: Ecosystem Management for Sustainable Marine Fisheries): S104–S109.
- Claireaux, G., Davoodi, F., 2010. Effect of exposure to petroleum hydrocarbons upon cardio-respiratory function in the common sole (*Solea solea*). *Aquatic Toxicology*, 98(2), 113–119.
- Claireaux, G., Désaunay, Y., Akca, F., Aupérin, B., Bocquené, G., Budzinski, H., Cravedi, J.P., Davoodi, F., Galois, R., Gilliers, C., Goanvec, C., Guérault, D., Imbert, N., Mazéas, O., Nonotte, G., Nonotte, L., Prunet, P., Sébert P., Vettier, A., 2004. Influence of oil exposure on the physiology and ecology of the common sole *Solea solea*: experimental and field approaches. *Aquatic Living Resources* 17, 335–351.
- Clason, B., Langston, W.J., Zauke, G.P., 2003. Bioaccumulation of trace metals in the amphipod *Chaetogammarus marinus* (Leach, 1815) from the Avon and Tamar estuaries (UK): comparison

- of two-compartment and hyperbolic toxicokinetic models. *Marine Environmental Research* 57, 171–195.
- Clemmesen, C.M., 1988. A RNA and DNA fluorescence technique to evaluate the nutritional condition of individual marine fish larvae. *Meeresforschung, Reports on Marine Research* 32, 134–143.
- Coeck, J., Vandelannoote, A., Yseboodt, R., Verheyen, R.F., 1993. Use of the abundance biomass method for comparison of fish communities in regulated and unregulated lowland rivers in Belgium. *Regulated Rivers-Research and Management* 8, 73–82.
- Coleman, F.C., Travis, J., 1998. Phenology of recruitment infection patterns of *Ascocotyle pachycyctis*, a digenean parasite in the sheephead minnow, *Cyprinodon variegatus*. *Environmental Biology of Fishes* 51, 87–96.
- Colina, M., Gardiner, P.H.E., Rivas, Z., Toncone, F., 2005. Determination of vanadium species in sediment, mussel and fish muscle tissue samples by liquid chromatography–inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 538, 107–115.
- Collier, T.K., Krone, C.A., Krahn, M.G., Stain, J.E., Chan, S.L., Varanasi, U., 1996. Petroleum exposure and associated biochemical effects in subtidal fish after the Exxon valdez oil spill. *American Fisheries Society Symposium* 18, 671–683.
- Collier, T.K., Thomas, L.C., Malins, D.C., 1978. Influence of environmental temperature on disposition of dietary naphthalene in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) : isolation and identification of individual metabolites. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 61, 23–28.
- Collodi, P., Stekoll, M.S., and Rice, S.D., 1984. Hepatic aryl hydrocarbon hydroxylase activities in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) exposed to petroleum hydrocarbons. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 79, 337–341.
- Conides, A.J., Glamuzina, B., 2006. Laboratory simulation of the effects of environmental salinity on acclimation, feeding and growth of wild-caught juvenile of European sea bass *Dicentrarchus labrax* and gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 256, 1–4.
- Contaminant Exposure in English Estuaries. *Marine Pollution Bulletin* 38, 676–686.
- Cooper, D.C., Morse, J.W., 1998. Extractability of metal sulfide minerals in acidic solutions : application to environmental studies of trace metal contamination within anoxic sediments. *Environmental Science and Technology* 32, 1076–1078.
- Cossa, D., 1995. A review of the use of *Mytilus spp.* as quantitative indicators of cadmium and mercury contamination in coastal waters. *Oceanologica Acta* 12, 417–432.
- Cossa, D., Auger, D., Averty, B., Lucon, M., Masselin, P., Noel, J., 1992. Flounder (*Platichthys flesus*) muscle as an indicator of metal and organochlorine contamination of French Atlantic coastal waters. *Ambio* 21, 176–182.

- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Vasseur, P., 1997. Biomarqueurs du stress oxydant chez les animaux aquatiques. In: Biomarqueurs en écotoxicologie - Aspects fondamentaux (eds. Lagadic L., Caquet T., Amiart J. C., Ramade F.), pp. 149-163, Paris.
- Costa, M.J., Cabral, H.N., Drake, P., Economou, A.N, Fernandez-Delgado, C., Gordo, L., Marchand, J., Thiel, R., 2002. Recruitment and Production of Commercial Species in Estuaries. In: Fishes in Estuaries. Eds: M. Elliot; K. Hemingway, Blackwell Science, United Kingdom. pp 54-123.
- Costa, P.M., Diniz, M.S., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A.M., Caetano, M., Vale, C., DelValls, T.A., Costa, M.H., 2009. Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: A weighted indices approach. *Aquatic Toxicology* 92, 202–212.
- Costanza, R., d'Arge, R., de Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naemm, S., O'Neill, R.V., Paruelo, J., Raskin, R.G., Sutton, P., van den Belt, M., 1997. The value of the world's ecosystem services and natural capita. *Nature* 387, 253–260.
- Couillard, C.M., Williams, P.J., Courtenay, S.C., and Rawn, G.P., 1999. Histopathological evaluation of Atlantic tomcod (*Microgadus tomcod*) collected at estuarine sites receiving pulp and paper mill effluent. *Aquatic Toxicology* 44, 263–278.
- Courrat, A., Lepage, M., Girardin, M., Laffargue, P., Nicolas, D., Lobry, J., Le Pape, O., 2009. Anthropogenic disturbance on nursery function of estuarine areas for marine species. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 81 (2), 179–190.
- Couture, P., Kumar, P.R. 2003. Impairment of metabolic capacities in copper and cadmium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquatic Toxicology* 64, 107–120.
- Culp, J.M., Podemski, C.L., Cash, K.J., Lowell, R.B., 2000. A research strategy for using artificial stream microcosms in ecotoxicology : integrating experiments at different levels of biological organization with field data. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* (7), 167–176.

D

- Damásio, J.B., Barata, C., Munné, A., Ginebreda, A., Guashsch, H., Caixach, J., Porte, C., 2007. Comparing the response of biochemical indicators (biomarker) and biological indices to diagnose the ecological impact of an oil spillage in a Mediterranean river (NE Catalunya, Spain). *Chemosphere* 66, 1206–1216.
- Dange, C., 2002. Etude du comportement des elements traces en milieu estuarien: approche expérimentale et modélisation : Application à l'étude de la spéciation de Cd, Co et Cs dans les estuaires majeurs français (Seine, Loire, Gironde, Rhône). Université de Reims Champagne-Ardenne. Thèse

- Dangre, A.J, Manning, S., Brouwer, M., 2010. Effects of cadmium on hypoxia-induced expression of hemoglobin and erythropoietin in larval sheepshead minnow, *Cyprinodon variegates*. *Aquatic Toxicology* 99(2), 168–175.
- Danis, B., Wantier, P., Dutrieux, S., Flammang, R., Dubois, Ph., Warnau, M., 2001. Contaminant levels in sediments and asteroids (*Asterias rubens* L., Echinodermata) from the Belgian coast and Scheldt estuary: polychlorinated biphenyls and heavy metals. *Science of the Total Environment* 333, 149– 165
- Dauvin, J.C., 2008. Effects of heavy metal contamination on the macrobenthic fauna in estuaries: The case of the Seine estuary. *Marine Pollution Bulletin* 57, 160-169.
- Dauvin, J.C., Desroy, N., 2005. The food web in the lower part of the Seine estuary: a synthesis of existing knowledge *Hydrobiologia* 540, 13–27.
- Davoodi, F., Claireaux, G., 2007. Effects of exposure to petroleum hydrocarbons upon the metabolism of the common sole *Solea solea*. *Marine Pollution Bulletin* 54, 928–934.
- DelValls, T.A., Andres, A., Belzunce, M.J., Buceta, J.L., Casadon Martinez, M.C., Castro, R., Riba, I., Viguri, J.R., Blasco, J., 2004. Chemical and ecotoxicological guidelines for managing disposal of dredged material. *Trends Analytical Chemistry* 23, 819–828.
- Depledge, M.H., 1994. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: Fossi, M.C., Leonzio, C. (Eds.), *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. Lewis, Boca Raton, FL, 261–285.
- Depledge, M.H., Aagaard, A., Gyorkos, P., 1995. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Marine Pollution Bulletin* 31 (1-3), 19–27.
- Devaux, A., Flammarion, P., Bernardon, V, Garric, J., Monod, G., 1998. Monitoring the chemical pollution of the river Rhone through measurment of DNA damage and cytochrome PA induction in chub (*Leuciscus cephalus*). *Marine Environmental Research* 46, 257–262.
- Devillier, G., Palluel, O., Aliaume, C., Asanthi, H., Sanchez, W., Franco Nava, M.A., Blancheton, J.P., Casellas, C., 2005. Impact assessment of various rearing systems on fish health using multibiomarker response and metal accumulation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61, 89–97.
- Dezfuli, B.S., Simoni, E., Giari, L., Manera, M., 2006. Effects of experimental terbuthylazine exposure on the cells of *Dicentrarchus labrax* (L.). *Chemosphere* 64, 1684–1694.
- Di Giulio, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R.J., Winston, G.W, Jewell, C.S., 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8, 1103-1123.
- Di Toro, D.M., Mahony, J.D., Hansen, D.J., Scott, K.J., Hicks, M.B., Mayrs, S.M., Redmond, M.S., 1990. Toxicity of Cd in sediments : the role of AVS. *Environmental Toxicity and Chemistry* 9, 1487-1502.

- Doebel, C., Baron, C.L., Evans, R.E., Wautier, K.G., Werner, J., Palace, V.P., 2004. Caged Pearl Dace (*Semotilus margarita*) as Sentinels for Gol Mining Wastes in Environmental Effect Monitoring. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 72, 409–414.
- Dolman, S.J., Weir, C.R., Jasny, M., 2009. Comparative review of marine mammal guidance implemented during naval exercises. *Marine Pollution Bulletin* 58, 465–477.
- Driedger, K., Weber, L.P., Rickwood, C.J., Dube, M.G., Janz D.M., 2010. Growth and energy storage in juvenile fathead minnows exposed to metal mine waste water in simulated winter and summer conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 727–734.
- Dural, M., Goksu, M.Z.L., Ozak, A.A., Dericci, B., 2006. Bioaccumulation of some heavy metals in different tissues of *Dicentrarchus labrax* L., 1758, *Sparus aurata* L., 1758 and *Mugil cephalus* L., 1758 from the C, Amlık lagoon of the eastern coast of Mediterranean (Turkey). *Environmental Monitoring and Assessment* 118, 65–74.
- Durieux, E., 2007. Ecologie du système hôte-parasite, juvéniles GO de sole (*Solea solea*) – métacercaires de Digènes : dynamique et effets de l’infestation. Thèse, Université de La Rochelle, 187 pp.
- Durieux, E.D.H., Galois, R., Bégout M.L., Sasal, P., Lagardère, F., 2007. Temporal changes in lipid condition and parasitic infection by digenean metacercariae of young-of-year common sole *Solea solea* (L.) in an Atlantic nursery ground (Bay of Biscay, France). *Journal of Sea Research* 57, 162–170.
- Dyer, S.D., White-Hull, C.E., Shephard, B.K., 2000b. Assessments of chemical mixtures via toxicity reference values overpredict hazard to Ohio fish communities. *Environmental Sciences and Technology* 34, 2518–2524.

E

- Edgar, G.J., Barrett, N.S., Graddon, D.J., Last, P.R., 2000. The conservation significance of estuaries: a classification of Tasmanian estuaries using ecological, physical and demographic attributes as a case study. *Biological Conservation* 92, 383–397.
- Eggleton, J., Thomas, K.V., 2004. A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events. *Environment International* 30, 973–980.
- Elliott, J.M. and Hurley, M.A. 1995. The functional relationship between body size and growth rate in fish. *Functional Ecology* 9, 625–627.
- Elliott, M., Quintino, V., 2007. The Estuarine Quality Paradox, Environmental Homeostasis and the difficulty of detecting anthropogenic stress in naturally stressed areas. *Marine Pollution Bulletin* 54(6), 640–645.

- El-Sayed, Y.S. Saad, T.T., El-Bahr, S.M. 2007. Acute intoxication of deltamethrin in monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* with special reference to the clinical, biochemical and haematological effects *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 24, 212–217
- Elston, R.A., Drum, A.S., Pearson, W.H., Parker, K., 1997. Health and condition of Pacific herring *Clupea pallasii* from Prince William Sound, Alaska, 1994. *Disease in Aquatic Organisms* 31, 109–126.
- Engel, D.W., Roesijadi, G., 1987. "Metallothionein: a monitoring tool". In W.B. Vernberg, A. Calabrese F., P. Thurberge t F.J. Vernberg (éd.). *Pollution physiology of estuarine organisms*. University of South Carolina Press, p.p. 421-438.
- Environmental Protection Agency (U.S.), 2000. *Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates*. EPA 600/R-99/064. Nd ed, Duluth, MN.
- Eufemia N. A., Collier T. K., Stein J. E., Watson D. E., Di Giulio R. T. (1997) Biochemical responses to sediment-associated contaminants in brown bullhead (*Ameriurus nebulosus*) from the Niagara River ecosystem. *Ecotoxicology* 6, 13-34.
- Everaarts J. M., Sleiderink H. M., den Besten P. J., Halbrook R. S., Shugart L. R. (1994) Molecular responses as indicators of marine pollution: DNA damage and enzyme induction in *Limanda limanda* and *Asterias rubens*. *Environmental Health Perspectives* 102 Suppl 12, 37-43.
- Evrard, E., Devaux, A., Bony, S., Burgeot, T., Riso, R., Budzinski, H., Le Du, M., Quiniou, L., Laroche, J., 2010. Responses of the European flounder *Platichthys flesus*, to the chemical stress in estuaries: load of contaminants, gene expression, cellular impact and growth rate. *Biomarkers* 15(2): 111-127.

F

- Fatoki, S.A., Mathabatha, S., 2001. An assessment of heavy metal pollution in the East London and Port Elizabeth harbours. *Water research commission* 27, 233–240.
- Faucher, K., Fichet, D., Miramand, P., Lagardère, J.P., 2008. Impact of chronic cadmium exposure at environmental dose on escape behaviour in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.; Teleostei, Moronidae). *Environmental Pollution* 151, 148–157.
- Feng, H., Han, X., Zhang, W., Yu, L., 2004. A preliminary study of heavy metal contamination in Yangtze River intertidal zone due to urbanization. *Marine Pollution Bulletin* 49, 910–915.
- Fent, K., 2004. Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology* 205, 223–290.
- Fernandes, C., Fontainhas–Fernandes, A., Ferreira, M., Salgado, M.A., 2008. Oxidative stress response in gill and liver of *Liza saliens*, from the Esmoriz–Paramos Coastal Lagoon, Portugal. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 55, 262–269.

- Fernandes, C., Fontainhas–Fernandes, A., Peixoto, F., Salgado, M.A., 2007. Bioaccumulation of heavy metals in *Liza saliens* from the Esmoriz–Paramos coastal lagoon, Portugal. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66, 426–431.
- Fernandez, N., Beiras, R., 2001. Combined toxicity of dissolved mercury with copper, lead and cadmium on embryogenesis and early larval growth of the *Paracentrotus lividus* sea-urchin. *Ecotoxicology* 10, 263–271.
- Ferron, A., 2000. An appraisal of condition measures for marine fish larvae with particular emphasis on maternal contribution, circadian periodicity, and the time response of nucleic acids and proteins. PhD thesis, McGill University. 309 pp.
- Filho, D.W., 1996. Fish antioxidant defenses: a comparative approach. *Braz. Journal of Medical and Biological Research* 29, 1735–1742.
- Filipuci, 2011. Effects of environmental stressors on coastal fish : *in situ* and experimental approaches. Université du Littoral Côte d’Opale. Thèse 257 pp.
- Fingas, M.F., 1995. A literature review of the physics and predictive modelling of oil spill evaporation. *Journal of Hazardous Materials* 42, 157–175.
- Fingas, M.F., Hollebone B.P., 2003. Review of behaviour of oil in freezing environments. *Marine Pollution Bulletin* 47, 333–340.
- Flammarion, P., Garric, J., 1997. Cyprinids EROD activities in low contaminated rivers: a relevant statistical approach to estimate reference levels for EROD biomarker. *Chemosphere* 35, 2375–2388.
- Florin, A.B., Sundblad, G., Bergström, U., 2009. Characterisation of juvenile flatfish habitats in the Baltic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 82, 294–300.
- Fonseca, V., Serafim, A., Compagny, R., Bebianno, M.J., Cabral, H., 2009. Effect of copper exposure on growth, condition indices and biomarker response in juvenile sole *Solea senegalensis*. *Scientia Marina* 73, 51–58.
- Fonseca, V.F., Franc, S., Seragim, A., Company, R., Lopes, B., Bebianno, M.J., Cabral, H.N., 2011. Multi-biomarker responses to estuarine habitat contamination in three fish species: *Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis* and *Pomatoschistus microps*. *Aquatic Toxicology* 102, 216–227.
- Forrester, G.E., Fredericks, B.I., Gredeman, D., Evans, B., Steele, M.A., Zayed, K., Schweitzer, L.E., Suffet, M.A., Vance, R.R., Ambrose, R.F., 2003. Growth of estuarine fish associated with the combined concentration of sediment contaminants and shows no adaptation or acclimation to past conditions. *Marine Environmental Research* 56, 423–442.
- Förstner, U., 1989. *Contaminated Sediments*. Springer-Verlag, Berlin, p. 157.
- Foy, R. J., and A. J. Paul. 1999. Winter feeding and changes in somatic energy content for age-0 Pacific herring (*Clupea pallasii*) in Prince William Sound, Alaska. *Trans. Am. Fish. Soc.* 128, 1193–2000.

- Fragoso, N.M., Hodson, P.V., Zambon, S., 2006. Evaluation of an exposure assay to measure uptake of sediment PAH by fish. *Environmental Monitoring and Assessment* 116, 481–511.
- Fraser, A.J., 1989. Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve and crustacean larvae. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 46, 1868–1873.
- Fulton, M.H., Key, P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 37–45.
- Fusey, P., Oudot, J., 1976. Comparaison de deux méthodes d'évaluation de la biodégradation des hydrocarbures in vitro. *Mater. U. Organ.* 4, 241–251.

G

- Gagnon, M.M., Holdway, D.A., 1999. Metabolic enzyme activities in fish gills as biomarkers of exposure to petroleum hydrocarbons. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44, 92–99.
- Galgani, F., Bocquene, G., Cadiou, Y., 1992. Evidence of variation in cholinesterase activity in fish along a pollution gradient in the North Sea. *Marine Ecology Progress Series* 13, 77–82.
- Galois, R., Lagardère, F., Richard P., 1990. Change in biochemical composition and otolith microstructure of larval common sole *Solea solea* L. under experimental starvation. *La Mer* 28, 273–285.
- Gauldie, R.W., Nelson, D.G.A., 1990. Otolith Growth in fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 97, 119–135.
- Gbem, T.T., Balogun, J.K., Lawal, F.A., Annune, P.A., 2001. Trace metal accumulation in *Clarias gariepinus* Teugels/ exposed to sublethal levels of tannery effluent. *Science of the Total Environment* 271, 1–9.
- Geffen, A.J., 1982. Otolith Ring Deposition in Relation to Growth Rate in Herring (*Clupea harengus*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*) Larvae. *Marine Biology* 71, 317–326.
- George, S.G., 1994. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: D.C. Malins and G.K. Ostrander (Editors), *Aquatic Toxicology Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives*. Lewis, Boca Raton, FL, pp. 37-85.
- GESAMP, 1983. Report of the Thirteenth Session, Geneva, Switzerland, 28. February-4 March 1983. IMO/FAO/UNESCO/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP Joint Group, of Experts on Scientific Aspects of Marine Pollution. Reports and Studies (18):50p. WMO, Geneva, Switzerland.
- Giari, L., Manera, M., Simoni, E., Dezfuli, B.S., 2007. Cellular alterations in different organs of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to cadmium. *Chemosphere* 67, 1171–1181.
- Gibson, R.N., 2005. Flatfishes. Biology and Exploitation. Blackwell Publishing, Oxford pp. 1–391.
- Gilliers, C., Le Pape, O., Désaunay, Y., Bergeron, J.P., Schreiber, N., Guerault, D., Amara, R., 2006a. Growth and condition of juvenile sole (*Solea solea* L.) as indicators of habitat quality in coastal

- and estuarine nurseries in the Bay of Biscay with a focus on sites exposed to the Erika oil spill. *Scientia marina* 70S1, 183–192.
- Gilliers, C., Le Pape, O., Désaunay, Y., Morin, J., Guérault, D., Amara, R., 2006b. Are growth and density quantitative indicators of essential fish habitat quality? An application to the common sole *Solea solea* nursery grounds. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 69, 96–106.
- Goksoyr, A., Beyer, J., Egaas, E., Grosvik, N.E., Hylland, K., Sandvuk, M., Skarre, J.U., 1996. Biomarker Responses in Flounder (*Platichthys flesus*) and their use in Pollution Monitoring. *Marine Pollution Bulletin* 33, 36–45.
- Goksøyr, A., Förlin, L., 1992. The cytochrome P450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology* 22, 287–312.
- Gøksøyr, A., Husoy, A.M., 1998. Immunochemical approaches to studies of CYP1A localization and induction by xenobiotics in fish. In: *Fish Ecotoxicology* (eds. Braunbeck T., Hinton D. E., Streit B.), pp. 165-202. Birkhäuser Verlag, Berlin.
- Gonzalez, J.J., Vinas, L., Franco, M.A., Fumega, J., Soriano, J.A., Grueiro, G., Muniategui, S., Lopez-Mahia, P., Prada, D., Bayona, J.M., 2006. Spatial and temporal distribution of dissolved/dispersed aromatic hydrocarbons in seawater in the area affected by the Prestige oil spill. *The Prestige Oil Spill: A Scientific Response in Marine Pollution Bulletin* 53(5-7), 250–259.
- Gonzalez-Doncel, M., Gonzalez, L., Fernandez-Torija, C., Navas, J., M., Tarazona, V., 2008. Toxic effects of an oil spill on fish early life stages may not be exclusively associated to PAHs: Studies with Prestige oil and medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* 87, 280–288.
- Gorokhova, E., Löf, M., Halldorsson, P., Tjärnlund, U., Lindström, M., Elfving, T., Sundelin, B., 2010. Single and combined effects of hypoxia and contaminated sediments on the amphipod *Monoporeia affinis* in laboratory toxicity bioassays based on multiple biomarkers. *Aquatic Toxicology* 99(2), 263-274.
- Gravato, C., Santos, M.A., 2003. *Dicentrarchus labrax* biotransformation and genotoxicity responses after exposure to a secondary treated industrial/urban effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55, 300–306.
- Grinwis, G.C.M., Besselink, H.T., van den Brandhof, E.J., Bulder, A.S., Engelsma, M.Y., Kuiper, R.V., Wester, P.W., 2000. Toxicity of TCDD in European flounder (*Platichthys flesus*) with emphasis on histopathology and cytochrome P450 1A induction in several organ systems. *Aquatic Toxicology* 50, 387–401.
- Grønkjær, P., Sand, M.K., 2003. Fluctuating asymmetry and nutritional condition of Baltic cod (*Gadus morhua*) larvae. *Marine Biology* 143, 191–197.
- Grossell, M.H., Hogstrand, C.M., Wood, C.M., 1998. Renal Cu and Na excretion and hepatic Cu metabolism in both Cu acclimated and non acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 40, 275–291.

- Guevara-Riba, A., Sahuquillo, A., Rubio, R., Rauret, G., 2004. Assessment of metal mobility in dredged harbour sediments from Barcelona, Spain. *Science of the Total Environment* 321, 241–255.
- Gül, Ş., Belge-Kurutaş, E., Yıldız, E., Şahan, A., Doran, F., 2004. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. *Environmental International*. 30, 605–609.
- Gwack, W.S., Tanaka, M., 2001. Developmental changes in RNA:DNA ratios of fed and starved laboratory-reared Japanese flounder larvae and juvenile, and its application to assessment of nutritional condition for wild fish. *Journal of Fish Biology* 59, 902–915.

H

- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biology and Chemistry* 249, 7130–7139.
- Haensly, W.E., Neff, J. M., Sharp, J.R., Morris, A.C., Bedgood, M.F., Boem, P.D., 1982. Histopathology of *Pleuronectes platessa* L. from Aber Wrac'h and Aber Benoit, Brittany, France: long-term effects of the Amoco Cadiz crude oil spill. *J. Fish Dis.* 5, 365–391.
- Hageman, J.J., Bast, A., Vermeulen, N.P.E., 1992. Monitoring of oxidative free radical damage in vivo: analytical aspects. *Chemico-Biological Interactions* 82, 243–293.
- Hakanson, J.L., 1989. Analysis of lipid components for determining the condition of anchovy larvae, *Engraulis mordax*. *Marine Biology* 102, 143–151.
- Han, Y.M., Du, P.X., Cao, J.J., Posmentier, E.S., 2006. Multivariate analysis of heavy metal contamination in urban dusts of Xi'an, Central China. *The Science of the Total Environment* 355, 176–186.
- Handy, R.D., Galloway, T.S., Depledge, M.H., 2003. A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. *Ecotoxicology* 12, 331–43.
- Hansen, L.A., Johnson, M.L., 1999. Conservation and toxicology: integrating the disciplines. *Conservation Biology* 13, 12–25.
- Hardersen, S., 2000. The role of behavioural ecology of damselflies in the use of damselflies in the use of fluctuating asymmetry as a bioindicators of water pollution. *Ecological Entomology* 25, 45–53.
- Hare, L., Saouter, E., Campbell, P.G.C., Tessier, A., Ribeyre, F., Boudou, A., 1990. "Dynamics of cadmium, Lead, and zinc exchange between nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia rigida* (Ephemeroptera) and the environment". *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48, 39–47.
- Harford, A.J., O'Halloran, K., Wright, P.F.A., 2005. The effects of in vitro pesticide exposures on the phagocytic function of four native Australian freshwater fish. *Aquatic Toxicol* 75(4) 330–42.

- Harms, C.A., Kennedy-Stoskopf, S., Horne, W.A., Fuller, F.J., Tompkins, W.A., 2000. Cloning and sequencing hybrid striped bass (*Morone saxatilis* × *M. chrysops*) transforming growth factor-beta (TGF-beta), and development of a reverse transcription quantitative competitive polymerase chain reaction (RT-qPCR) assay to measure TGF-beta mRNA of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology* 10, 61–85.
- Hartl, M.G.J., Kilemade, M., Sheehan, D., Mothersill, C., O'Halloran, J., O'Brien, N.M., van Pelt, F.N.A.M., 2007. Hepatic biomarkers of sediment-associated pollution in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Marine Environmental Research* 64, 191–208.
- Hartwell, S.I., 1997. Demonstration of a toxicological risk ranking method to correlate measures of ambient toxicity and fish community diversity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 361–371.
- Heath, A.G., 1987, *Water Pollution and Fish Physiology*, CRC Press, Inc. Boca Rotan, Florida, 245 pp.
- Hebert, P.D., Luiker, M.M., 1996. Genetic effects of contaminant exposure--towards an assessment of impacts on animal populations. *Science of the Total Environment* 191, 23–58.
- Hellou, J., Payne, J., 1987. Assessment of contamination of fish by water-soluble fractions of petroleum: a role for bile metabolites. *Environmental Toxicology and Chemistry* 6, 857–862.
- Henry, F., Amara, R., Courcot, L., Lacouture, D., Bertho, M.L., 2004. Heavy metals in four fish species from the French coast of the Eastern English Channel and Southern Bight of the North Sea. *Environment International*, 30(5), 675–683.
- Hidalgo, M.C., Exposito, A., Palma, J.M., Higuera, M., 2002. Oxidative stress generated by dietary Zn-deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 34, 183–193.
- Hinton, D.E., 1994. Cells, cellular responses, and their markers in chronic toxicity of fishes. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), *Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers CRC press, 207–240.
- Hinton, D.E., Baumann, P.C., Gardner, G.C., Hawkins, W.E., Hendricks, J.D., Murchelano, R.A., Okihiro, M.S., 1992. Histopathologic biomarkers. In: Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M., Jr, Bergman, H.L. (Eds.), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, 155–210.
- Hiss, E., Beiras, R., Seaman, M.N.L., 1999. The assessment of marine pollution-bioassays with bivalve embryos and larvae. In: Southward, A.I., Tyler, P.A., Young, C.M. (Eds.), *Advances in Marine Biology*. Academic Press, London, 1–178.
- Hopkins, W.A., Staub, B.P., Snodgrass, J.W., Taylor, B.E., DeBiase, A.E., Roe, J.H., Jackson, B.P., Congdon, J.D., 2004. Responses of benthic fish exposed to contaminants in outdoor microcosms—examining the ecological relevance of previous laboratory toxicity tests. *Aquatic Toxicology* 68, 1–12.

- Houde, E.D., 1987. Fish Early Life Dynamics and Recruitment Variability. American Fisheries Society Symposium 2, 17–29.
- Howell, B.R., Canario, A.V.M., 1987. The influence of sand on the estimation of resting metabolic rate of juvenile sole *Solea solea* (L). Journal of Fish Biology 31, 277–280.
- Huang, W., Cao, L., Ye, Z., Yin, X., Dou, S., 2010. Antioxidative responses and bioaccumulation in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic mercury exposure. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 152 (1), 99–106.
- Huerta Diaz, M.A., Tessier, A., Carignan, R., 1998. Geochemistry of trace metals associated with reduced sulfur in freshwater sediments. Applied Geochemistry 13, 213–233.
- Huerta–Diaz, M.A., Morse, J.W., 1990. A quantitative method for determination of trace metal concentrations in sedimentary pyrite. Marine Chemistry 29, 119–144.
- Humphrey, C.A., King, S.C., Klumpp, D.W., 2007. A multibiomarker approach in barramundi (*Lates calcarifer*) to measure exposure to contaminants in estuaries of tropical North Queensland. Marine Pollution Bulletin 54, 1569–1581.
- Hyatt, K.D., 1979. Feeding strategy. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Brett, J.R. (Eds.), Bioenergetics and Growth, Fish Physiology 8, 71–119.
- Hylland, K., Sandvik, M., Utne Skåre, J., Beyer, J., Egaas, E., Goksøyr, A., 1996. Biomarkers in flounder (*Platichthys flesus*): an evaluation of their use in pollution monitoring. Marine Environmental Research 42, 223–227.

I

- IARC (International Agency for Research on Cancer), 1983. Polynuclear aromatic hydrocarbons, Part 1, Chemical, environmental and experimental data. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, vol. 32, IARC, Lyon, France.
- ICES, 2001. Report of the working group on biological effects of contaminants (WGBEC). Marine Habitat Committee. ICES CM 2001.

J

- Janz, D.M., DeForest, D.K., Brooks, M.L., Chapman, P.M., Gilron, G., Hoff, D., Hopkins, W.A., McIntyre, D.O., Mebane, C.M., Palace, V.P., Skorupa, J.P., Wayland, M., 2010. Selenium toxicity to aquatic organisms. Ecological Assessment of Selenium in the Aquatic Environment. SETAC Press, Pensacola, FL pp. 141–241.
- Jennings, S., Pawson, M.G., 1992. The origin and recruitment of bass, *Dicentrarchus labrax*, larvae to nursery areas. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 72, 199–212.

- Jenssen, B.M., 1994, 'Review article: effects of oil pollution, chemically treated oil, and cleaning on the thermal balance of birds'. *Environmental Pollution* 86, 207–215.
- Jifa, W., Yu, Z., Xiuxian, S., You, W., 2008. Response of integrated biomarkers of fish (*Lateolabrax japonicus*) exposed to benzo[a]pyrene and sodium dodecylbenzene sulfonate. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65, 230–6.
- Jimenez, B.D., Stegeman, J.J., 1990. Detoxification enzymes as indicators of environmental stress on fish. In: Adams, S.M. (Ed.), *Biological Indicators of Stress In Fish*. Bethesda, American Fisheries Society 8, 67–79.
- Jiménez-Tenorio, N., Morales-Caselles, C., Kalman, J., Salamanca, M.J., Ganzalez de Canales, M.L., Sarasquete, C., DelValls, T.A., 2007. Determining sediment quality for regulatory proposes using fish chronic bioassays. *Environment International* 33, 474–480.
- Johnson, M., Dick, T., 2001. Parasite effects on the survival, growth, and reproductive potential of yellow perch (*Perca flavescens* Mitchill) in canadian Shield lakes. *Canadian Journal of Zoology* 79, 1980–1992.
- Johnson, M., Dick, T., 2001. Parasite effects on the survival, growth, and reproductive potential of yellow perch (*Perca flavescens* Mitchill) in canadian Shield lakes. *Can. J. Zool.* 79, 1980–1992.
- Juell, J.E., Fosseidengen, J.E., 2004. Use of artificial light to control swimming depth and fish density of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in production cages. *Aquaculture* 233, 269–282
- Jung, J.H., Kim, S.J., Lee, T.K., Shim, W.J., Woo, S., Kim, D.J., Han, 2008. Biomarker responses in caged rockfish (*Sebastes schlegeli*) from Masam Bay and Haegeumgang, South Korea. *Marine Pollution Bulletin* 57, 599–606.

K

- Kalman, J., Riba, I., DelValls, A.T.A. Blasco, J., 2010. Comparative toxicity of cadmium in the commercial fish species *Sparus aurata* and *Solea senegalensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 306–311
- Kamermans, P., Guindon, K.Y., Miller, J.M., 1995. Importance of food availability for growth of juvenile southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) in the Pamlico River estuary, North Carolina, USA. *Neth. Journal of Sea Research* 34, 101–109.
- Kammann, U., Biselli, S., Hühnerfuss, H., Reineke, N., Theobald, N., Vobach, M., Wosniok, W., 2004. Genotoxic and teratogenic potential of marine sediment extracts investigated with comet assay and zebrafish test *Environmental Pollution* 132, 279–287.
- Karen, D.J., Klaine, S.J., Ross, P.E., 2001. Further considerations of the skeletal system as a biomarker of episodic chlorpyrifos exposure. *Aquatic Toxicology* 52 (3-4), 285–296

- Karsten, U., Wollenberger, A., 1977. Improvements in the ethidium bromide method for direct fluorimetric estimation of DNA and RNA in cell and tissue homogenates. *Analytical Biochemistry* 77, 464–470.
- Kawahara, R., Nishida, M., 2006. Multiple occurrences of spiggin genes in sticklebacks. *Gene* 373, 58–66.
- Keith, L.H., Telliard, W.A., 1979. Priority pollutants. I. A perspective view. *Environmental Science and Technology* 13, 416–423.
- Kennedy, C.J., Farrell, A.P., 2005. Ion homeostasis and interregional stress responses in juvenile Pacific herring, *Clupea pallasii*, exposed to the water-soluble fraction of crude oil. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 323, 43–56.
- Kennedy, M., Fitzmaurice, P., 1968. Occurrence of eggs of bass *Dicentrarchus labrax* on the southern coasts of Ireland. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 48, 585–592.
- Kennicutt, M.C., Sweet, S.T., Fraser, W.R., Stockton, W.L., Culver, M., 1991. Grounding of the Bahia Paraiso at Arthur Harbor, Antarctica. 1. Distribution and fate of oil spill related hydrocarbons. *Environmental Science and Technology* 25, 509–518.
- Kennish, M.J., 1997. *Estuarine and Marine Pollution, Practical Handbook*. CRC Press Marine Science Series, Boca Raton.
- Kerambrun, E., Henry, F., Courcot, L., Gevaert, F., Amara, R., 2011. Biological responses of caged juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) in a harbour polluted area. *Ecological Indicators*.
- Kerambrun, E., Henry, F., Perrichon, P., Courcot, L., Meziane, T., Spilmont, N., 2011. Growth and condition indices of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to contaminated sediments: Effects of metallic and organic compounds. *Aquatic Toxicology*.
- Kerambrun, E., Sanchez, W., Henry, H., Amara, R., 2011. Are biochemical biomarker responses related to physiological performance of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) caged in a polluted harbour. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 154, 187–195.
- Keskin, Y., Baskaya, R., Ozyaral, O., Yurdun, T., Luleci, N.E., Hayran, O., 2007. Cadmium, lead, mercury and copper in fish from the Marmara Sea, Turkey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 78, 258–261.
- Kilemade, M., Hartl M.G.J., O'Halloran, J., O'Brien, N.M., Sheehan, D., Mothersill, C., VanPelt, F.N.A.M., 2009. Effects of contaminated sediment from Cork Harbour, Ireland on the cytochrome P450 system of turbot. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 747–755.
- Kim, K.H., Dahms, H.U.D., Rhee, J.S., Lee, Y.M., Lee, J., Han, K.N., Lee, J.S., 2010. Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes in cadmium-exposed river pufferfish (*Takifugu obscurus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 151, 99–106

- Kime, D.E., 1999. A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction. *Science of the Total Environment* 225, 3–11.
- Kirby, M.F., Matthiessen, P., Neall, P., Tylor, T., Allchin, C.R., Kelly, C.A., Maxwell, D.L., Thain, J.E., 1999. Hepatic EROD Activity in Flounder (*Platichthys Flesus*) as an Indicator of
- Kirby, M.F., Morris, S., Hurst, M., Kirby, S.J., Neall, P., Tylor, T., Fagg, A., 2000. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin* 40, 780–91.
- Klaverkamp, J. E., Mc Donald, W. A., Duncan, D. A. and Wagenann, R. 1984. Contaminant effect on fisheries Metallothionein and acclimation to heavy metals in fish, a review. In: Cairns, V. W., Hodson, P. V. and Niragu, J.O. (Eds.). Wiley, New York, 99–113.
- Klopper-Sams, P.J., Swanson, S.M., Marchant, T., Schryer, R., and Owens, J.W. 1994. Exposure of fish to biologically treated bleached-kraft effluent. 1. Biochemical, physiological and pathological assessment of rocky mountain whitefish (*Prosopium williamsoni*) and longnose sucker (*Catostomus catostomus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 1469–1482.
- Koehler, A., 2004. The gender-specific risk to liver toxicity and cancer of flounder (*Platichthys flesus* (L.)) at the German Wadden Seacoast. *Aquatic Toxicology* 70, 257–76.
- Köhler, H.R., Bartussek, C., Eckwert, H., Farian, K., Granzer, S., Knigge, T., Kunz, N., 2001. The hepatic stress protein (hsp70) response to interacting abiotic parameters in fish exposed to various levels of pollution. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 8, 261–279.
- Kolok, A.S., 1999. Interindividual variation in the prolonged locomotor performance of ectothermic vertebrates: A comparison of fish and herpetofaunal methodologies, and a brief review of the recent fish literature. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56, 700-710.
- Kopecka-Pilarczyk, J., Correia, A.D., 2009. Biochemical response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to in vivo exposure to a mix of selected PAHs. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1296–1302.
- Köprücü, S, Köprücü K, Ural M.S., Ispir, U., 2006. Acute toxicity of organophosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some hematological parameters of fingerling European catfish (*Silurus glanis* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86, 99–105.
- Korashy, H.M., El-Kadi, A.O.S., 2004. Differential effects of mercury, lead and copper on the constitutive and inducible expression of aryl hydrocarbon receptor (AHR)-regulated genes in cultured hepatoma Hepa 1c1c7 cells. *Toxicology* 201, 153–172.
- Koutsikopoulos, C., Lacroix, N., 1992. Distribution and abundance of sole (*Solea solea* (L.)) eggs and larvae in the Bay of Biscay between 1986 and 1989. *Neth. Journal of Sea Research* 29, 81–91.
- Kovacs, T.G., Martel, P.H., Voss, R.H., 2002. Assessing the biological status of fish in a river receiving pulp and paper mill effluents. *Environmental Pollution* 118, 123–140.

- Kraemer, L.D., Campbell, P.G.C., Landis, H., 2005. Dynamics of Cd, Cu and Zn accumulation in organs and sub-cellular fractions in field transplanted juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). *Environmental Pollution* 138, 324–337.
- Kuropat, C., Mercaldo-Allen, R., Caldarone, E., Goldberg, R., Phelan, B., Thurberg, F., 2002. Evaluation of RNA concentration as an indicator of growth in young-of-the-year winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* and tautog *Tautoga onitis*. *Marine Ecology Progress Series* 230, 265–274.

L

- Labatut, R.A., Olivares, J.F., 2004. Culture of turbot (*Scophthalmus maximus*) juvenile using shallow raceways tanks and recirculation. *Aquacultural Engineering* 32, 113–127.
- Laffaille, P., Feunteun, E., Lefebvre, C., Radureau, A., Sagan, G., Lefeuvre, J.C., 2002. Can thin-lipped mullet directly exploit the primary and detritic production of European macrotidal saltmarshes? *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 54, 729–736.
- Lagardère, F., Thibaudeau, K., Begout-Anras, M.L., 2000. Feasibility of otolith markings in large juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, using immersion in alizarin-red Solutions. *Journal of Marine Science* 57, 1175–1181.
- Laing, G., Meer, E., Dewispelaere, M., Vandecastel, B., Rinklebe, J., Tacka, F.M.G., Verloo, M.G., 2009. Heavy metal mobility in intertidal sediments of the Scheldt estuary: Field monitoring. *Science of the Total Environment* 407, 2919–2930
- Lamberson, J.O., DeWitt, T.H., Swartz, R.C., 1992. Assessment to Sediment Toxicity to Marine Benthos. In Burton, GAJ (Eds). *Sediment Toxicity Assessment*, Lewis, Chelsea, MI, USA. 183–210.
- Lambert, Y., Dutil, J.D., 1997. Can simple condition indices be used to monitor and quantify seasonal changes in the energy reserves of atlantic cod (*Gadus morhua*)? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 54, 104–112.
- Lancaster, J.E., Pawson, M.G., Pickett, G.D., Jennings, S., 1998. The Impact of the 'Sea Empress' Oil Spill on Seabass Recruitment. *Marine Pollution Bulletin* 30(9) 677–688.
- Landis, G., Yu, M.H., 1995. Introduction to Environmental Toxicology: Impacts of Chemicals upon Ecological Systems. Lewis, Boca Raton, FL.
- Lappivaara, J., Oikari, A., 1999. Altered challenge response in whitefish subchronically exposed in areas polluted by bleached kraft mill effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 43, 212–222.
- Larno, V., 2004. Réponses génétiques et physiologiques de populations de chevaine (*Leuciscus cephalus*) à la contamination chimique dans le Bassin du Rhône. Université Claude Bernard, Lyon 1. Thèse 263 pp.

- Laroche, J., Quiniou, L., Juhel, G., Auffret, M., Moraga, D., 2002. Genetic and physiologic responses of flounder (*Platichthys flesus*) populations to chemical contamination in estuaries. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 2705–2712.
- Lawrence, A.J., Arukwe, A., Moore, M., Sayer, M., Thain, J., 2003. Molecular/cellular processes and the physiological response to pollution. In: *Effects of pollution on fish, molecular effects and population responses* (eds. Lawrence A. J., Hemingway K. L.), 83–133. Blackwell Sciences.
- Le Pape, O., Gilliers, C., Riou, P., Morin, J., Amara, R., 2007. Convergent signs of degradation of both the capacity and the quality of an essential fish habitat: synthesis on the Seine estuary (France), a highly anthropised estuary of which flatfish nursery function is altered. *Hydrobiologia* 588, 225–229.
- Leamon, J.H., Schultz, E.T., Crivello, J.F., 2000. Variation among four health indices in natural populations of the estuarine fish, *Fundulus heteroclitus* (Pisces, Cyprinodontidae), from five geographically proximate estuaries. *Environmental Biology of Fishes* 451–458.
- Lee, R.F., Anderson, J.W., 2005. Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. *Marine Pollution Bulletin* 50, 705–723.
- Lee, R.F., Sauerheber, R., Dobbs, G.H., 1972. Uptake, metabolism, and discharge of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine fish. *Marine Biology* 17, 201–208.
- Lehtonen, K.K., Schiedek, D., 2006. Monitoring biological effects of pollution in the Baltic Sea: neglected – but still wanted? *Marine Pollution Bulletin* 53, 377–386.
- Leknes, I.L., 2007. Blood cleansing in heart atrium of *Trichogaster leerii* (Bleeker, 1852), Anabantidae: Teleostei. *Zoomorphology* 126, 299–302.
- Lemaire, P., Förlin, L., Livingstone, D.R., 1996. Responses of hepatic biotransformation and antioxidant enzymes to CYP1 A-inducers (3-methylcholanthrene, ~-naphthoflavone) in sea bass (*Dicentrarchus labrax*), dab (*Limanda limanda*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 36, 141–160.
- Lemaire, P., Matthews, A., Forlin, L., Livingstone, D.R., 1994. Stimulation of oxyradical production of hepatic microsomes of flounder (*Platichthys flesus*) and perch (*Perca fluviatilis*) by model and pollutant xenobiotics. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 26(2), 191–200.
- Lemly, A.D., 1997. Role of season in aquatic hazard assessment. *Environmental Monitoring and Assessment* 45, 89–98.
- Lemly, A.D., Esch, G., 1984. Effects of the trematode *Uvuliferambloplilis* on juvenile bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*: ecological implications. *Journal of Parasitology* 70, 475–492.
- Leonard, J.D., Hellou, J., 2001. Separation and characterization of gall bladder bile metabolites from speckled trout, *Salvelinus fontinalis*, exposed to individual polycyclic aromatic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(3), 618–623.

- Lesser, M.P., Farrell, J.H., Walker, C.W., 2001. Oxidative stress DNA damage and p53 expression in the larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to ultraviolet (290–400 nm) radiation. *Journal of Experimental Biology* 204, 157–164.
- Leveque, C., 1997. Etat de santé des écosystèmes aquatiques : l'intérêt des variables biologiques. In séminaire national « Les variables biologiques : des indicateurs de l'état de santé des écosystèmes aquatiques » Ministère de l'Environnement, 2-3 Novembre 1994, CEMAGREF (Eds.), 13–26.
- Levine, S.L., Oris, J.T., 1999. CYP1A1 expression in liver and gill of rainbow trout following waterborne exposure: Implications for biomarker determination. *Aquatic Toxicology* 46, 279–87.
- Li, Y., Zhang, B., Chen, X., Chen, Y., Cao, Y., 2010. Improvement of *Aspergillus sulphureus* endo- β -1,4-xylanase expression in *Pichia pastoris* by codon optimization and analysis of the enzymic characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160(5), 1321–1331.
- Liao, C.M., Liang, H.M., Chen, B.C., Singh, S., Tsai, J.W., Chou, Y.H., Lin, W.T., 2005. Dynamical coupling of PBPK/PD and AUC-based toxicity models for arsenicin tilapia *Oreochromis mossambicus* from blackfoot disease area in Taiwan. *Environmental Pollution* 135, 221–233.
- Lin, E., Cormier, S., Torsella, J., 1996. Fish biliary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites estimated by fixed-wavelength fluorescence: comparison with HPLC-fluorescent detection. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 35 (1), 16–23.
- Lindström-Seppä, P., Oikari, A., 1990. Biotransformation and other toxicological and physiological responses in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) caged in a lake receiving effluents of pulp and paper industry. *Aquatic Toxicology* 16, 187–204.
- Lionetto, M.G., Maffia, M., Cappello, M.S., Gioradano, M.E., Storelli, C., Schettino, T., 1998. Effect of cadmium on carbonic anhydrase and Na⁺–K⁺ ATPase in eel, *Anguilla anguilla*, intestine and gills. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 120, 89–91.
- Livingstone, D.R., Chipman, J.K., Lowe, D.M., Minier, C., Mitchelmore, C.L., Moore, M.N., Peters, L.D., Pipe, R.K., 2000. Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.) and other mytilids. *International Journal of Environment and Pollution* 13, 56–91.
- Lloret, J., S. Planes, 2003. Condition, feeding and reproductive potential of white seabream *Diplodus sargus* as indicators of habitat quality and the effect of reserve protection in the Northwestern Mediterranean. *Marine Ecology Progress Series* 248, 197–208.
- Long, E.R., MacDonald, D.D., Smith S.L., Calder F.D., 1995. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environmental Management* 19, 81–87.
- Lopes, M.H., Zanata, S.M., Mercadante, A.F., Graner, E., Huang, L., Bulingame, A., Martins, V.R., Brentani, R.R., 2001. Biochemical interaction between cellular prion protein and extendin. *Journal of Neurochemistry* 78, 133.

- Lu, G.Q., Bernatchez, L., 1999. A study of fluctuating asymmetry in hybrids of dwarf and normal lake whitefish ecotypes (*Coregonus clupeaformis*) from different glacial races. *Heredity* 83, 742–747.
- Luckenbach, J.A., Godwin, J., Daniels, H.V., Borski, R.J., 2003. Gonadal differentiation and effects of temperature on sex determination in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture* 216, 315–327.
- Luczak, C., Janquin, M.A., Kupka, A., 1997. Simple standard procedure for the routine determination of organic matter in marine sediment. *Hydrobiologia* 345, 87–94.
- Luna-Acosta, A., Kanan, R., Le Floch, S., Huet, V., Pineau, P., Bustamante, P., Thomas-Guyon, H., 2011. Enhanced immunological and detoxification responses in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, exposed to chemically dispersed oil, *Water Research*, in press.
- Lunel, T., 1995. The Braer Oil Spill: Oil Fate Governed by Dispersion International Oil Spill Conference, Long Beach, CA, USA.
- Luoma, S.N., Ho, K.T., 1992. The appropriate uses of marine and estuarine sediment bioassays. In : P. Calow (ed.), *The Handbook of Ecotoxicology*. Blackwell Scientific Publications, London 193–226.
- Luoma, S.N., Ho, K.T., 1993. Appropriate uses of marine and estuarine sediment bioassays. In *Handbook of Ecotoxicology* 1, 193–226, P Calows (ed.), Blackwell, Oxford.
- Lyons, B.P., Stewart, C., Kirby, M.F., 1999. The detection of biomarkers of genotoxin exposure in the European flounder (*Platichthys flesus*) collected from the river Tyne. *Estuary Mutation Research* 446, 111–119.

M

- MacDonald, D.D., Ingersoll, C.G., Smorong, D.E., Lindskoog, R.A., Sparks, D.W., Smith, J.R., Simon, T.P., Hanacek, M.A., 2002. Assessment of injury to fish and wildlife resources in the Grand Calumet River and Indiana Harbor area of concern, USA. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 43, 130–140.
- MacFarlane, R.D., Bullock, G.L., McLaughlin, J.J.A., 1986. Effects of five metals on susceptibility of striped bass to *Flexibacter columnaris*. *Transactions of the American Fisheries Society* 115, 227–231.
- Magnusson, K., Ekelund, R., Dave, G., Granmo, A., Forlin, L., Wennberg, L., Samuelsson, M.O., Berggren, M., Broström-Lunden, E., 1996. Contamination and correlation with toxicity of sediment samples from the Skagerrak and Kattegat. *Journal of Sea Research* 35, 223–234.
- Marchand, J., 1993. The influence of seasonal salinity and turbidity maximum variations on the nursery function of the Loire estuary (France). *Netherlands Journal of Aquatic Ecology* 27(2-4) 427–436.

- Marchand, J., Evrard, E., Guinand, B., Cachot, J., Quiniou, L., Laroche, J., 2010. Genetic polymorphism and its potential relation to environmental stress in five populations of the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic coast. *Marine Environmental Research* 70, 201–209.
- Marchand, J., Quiniou, L., Riso, R., Thebault, M.T., Laroche, J., 2004. Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aquatic Toxicology* 70, 327–343.
- Marchand, J., Tanguy, A., Laroche, J., Quiniou, L., Moraga, D., 2003. Responses of European flounder *Platichthys flesus* populations to contamination in different estuaries along the Atlantic coast of France. *Marine Ecology Progress Series* 260, 273–284.
- Marteil, L. 1974. La conchyliculture française. Première partie : Le milieu naturel et ses variations. *Revue de Travail de l'Institut des Pêches Maritimes* 38, 217–337.
- Martínez-Gómez, C., Campillo, J.A., Benedicto, J., Fernández, B., Valdés, J., García, I., Sánchez, F., 2006. Monitoring biomarkers in fish (*Lepidorhombus boscii* and *Callionymus lyra*) from the northern Iberian shelf after the Prestige oil spill. *Marine Pollution Bulletin* 53, 305–314.
- Martinez-Gomez, C., Fernandez, B., Valdes, J., Campillo, J.A., Benedicto, J., Sanchez, F., Vethaak, A.D., 2009. Evaluation of three-year monitoring with biomarkers in fish following the Prestige oil spill (N Spain). *Chemosphere* 74, 613–620.
- Mason, A.Z., Jenkins, K.D., 1995. Metal detoxication in aquatic organisms. In *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. Eds Tessier A, Turner DR, Vol 3. Wiley et Sons, Chichester, 469–608.
- Masoud, M.S., El-Samra, M., El-Sadawy, M.M., 2007. Heavy-metal distribution and risk assessment of sediment and fish from El-Mex Bay, Alexandria, Egypt. *Chemistry in Ecology* 23, 201–216.
- Mathers, E.M., Houlihan, D.F., McCarthy, I.D., Burren, L.J., 1993. Rates of growth and protein synthesis correlated with nucleic acid content in fry of rainbowtrout, *Oncorhynchus mykiss*: effects of age and temperature. *Journal of Fish Biology* 43, 245–263.
- McCarthy, F.J., Jimenez, B.D., Shugart, L.R., Sloop, F.V., 1990. Biological markers in animal sentinels: laboratory studies improve interpretation of field data. In Sandhu, S. S., Lower, W. R., de Serres, F. J., Suk, W. A. & Tice, R. R. (eds). *In Situ Evaluations of Biological Hazards of Environmental Pollutants*. Plenum Press, New York, USA.
- McClain, J.S., Oris, J.T., Burton, G.A., Lattier, D., 2003. Laboratory and field validation of multiple molecular biomarkers of contaminant exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 361–370.
- McFarland, V.A., Inouye, L.S., Lutz, C.H., Jarvis, A.S., Clarke, J.U., McCant, D.D., 1999. Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field-collected brown bullhead *Ameiurus nebulosus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37, 236–241.

- McGurk, M.D., Warburton, H.D., Galbraith, M. and Kusser, W.C., 1992. RNA:DNA ratio of herring and sand lance larvae from Port Moller, Alaska: Comparison with prey concentration and temperature. *Fisheries Oceanography* 1(3), 193–207.
- McHugh, J.L., 1967. Estuarine nekton. American Association for the Advancement of Science Publications 83, 581–620.
- McLusky, D.S., Bryant, D.M., Elliott, M., 1992. The impact of land-claim on macrobenthos, fish and shorebirds on the Forth Estuary, eastern Scotland. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 2, 211–222.
- McLusky, D.S., Elliott, M. 2004. *The Estuarine Ecosystem: ecology, threats and management*, Third edition. Oxford University Press, Oxford.
- Mendez, G., Wieser, W., 1993. Metabolic responses to food deprivation and refeeding in juveniles of *Rutilus rutilus* (Teleostei: Cyprinidae). *Environmental Biology of Fishes* 36, 73–81.
- Meng, L., Powell, J.C., Taplin, B., 2001. Using winter flounder growth rate to assess habitat quality across anthropogenic gradient in Narragansett Bay, Rhode Island. *Estuaries* 24, 576–584.
- Mérigot, B., Le tourneur, Y., Lecomte-Finiger, R., 2007. Characterization of local populations of the common sole *Solea solea* (Pisces, Soleidae) in the NW Mediterranean through otolith morphometrics and shape analysis. *Marine Biology*, 151, 997–1008.
- Mesa, M.G., Poe, T.P., Gadomski, D.M., Petersen, J.H., 1994. Are all prey created equal? A review and synthesis of differential predation on prey in substandard condition. *Journal of Fish Biology* (Supplement A) 45, 81–96.
- Meybeck, M., Lestel, L., Bonte, P., Moilleron, R., Colin, J-L., Rousselot, D., de Ponteves, C., Grosbois, C., Thevenot, D.R., 2007. Historical perspective of heavy metals contamination (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn) in the Seine River basin (France) following a DPSIR approach (1050–2005). *Science of the Total Environment* 375, 204–231.
- Meziane, T., Tsuchiya, M., 2002. Organic matter in a subtropical mangrove- estuary subjected to wastewater discharge: origin and utilization by two macrozoobenthic species. *Journal of Sea Research* 47(1), 1–11.
- Mielbrecht, E.E., Wolfe, M.F., Tjeerdemac, R.S., Sowby, M.L. Influence of a dispersant on the bioaccumulation of phenanthrene by topsmelt (*Atherinops affinis*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61, 44–52.
- Milinkovitch, T., Ndiaye, A., Sanchez, W., Le Floch, S., Thomas-Guyon, H., 2011. Liver antioxidant and plasma immune responses in juvenile golden grey mullet (*Liza aurata*) exposed to dispersed crude oil. *Aquatic Toxicology* 101, 155–164.
- Mills, L.J., Chichester, C. 2005. Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Science of the Total Environment* 343(1-3), 1–34.

- Minier, C., Levy, F., Rabel, D., Bocquené, G., Godefroy, D., Burgeot, T., Leboulenger, F., 2000. Flounder health status in the Seine Bay. A multibiomarker study. *Marine Environmental Research* 50, 373–377.
- Miramand, P., Guyot, T., Rybarczyk, H., Bessineton, C., 1998. Cd, Cu, Pb, Zn dans les tissus et dans le réseau trophique benthique du bar et du flet de l'estuaire de la Seine. Programme Scientifique Seine Aval, Thème Edifices Biologiques, Rapport 1997/Fin-4, Rouen 1998, 171–181.
- Miramand, P., Guyot, T., Rybarczyk, H., Elkaim, B., Mouny, P., Dauvin, J.C., Bessineton, C., 2001. Contamination of the biological compartment in the Seine estuary by Cd, Cu, Pb and Zn. *Estuaries* 24 (6B), 1056–1065.
- Moles, A., Norcross, B.L., 1997. Effects of oil-laden sediments on growth and health of juvenile flatfishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55, 605–610.
- Moles, A., Rice, S., Norcross, B.L., 1994. Non-avoidance of hydrocarbon laden sediments by juvenile flatfishes. *Netherlands Journal of Sea Research* 32, 361–367.
- Molinero, A., Flos, R., 1991. Influence of sex and age and the feeding habits of the Common Sole *Solea solea*. *Marine Biology* 111, 493–501.
- Møller, A.P., Swaddle, J.P., 1997. *Asymmetry, Developmental Stability, and Evolution*. Oxford: Oxford University Press.
- Mondon, J.A., Duda, S., Nowak, B.F., 2001. Histological, growth and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity responses of greenback flounder *Rhombosolea tapirina* to contaminated marine sediment and diet. *Aquatic Toxicology* 54, 231–247.
- Monserrat, J., Martinez, P.E., Geracitano, L.A., Amado, L.L., Martins, C.M.Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Bianchini, A., 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146, 221–234.
- Moore, J.W., Moore, I.A., 1976. The basis of food selection in flounders, *Platichthys flesus* (L.), in the severn estuary. *Journal of Fish Biology* 9, 139–156.
- Morales-Nin, B., Aldebert, Y., 1997. Growth of juvenile *Merluccius merluccius* in the Gulf of Lions (NW Mediterranean) based on otolith microstructure and length-frequency analysis. *Fisheries Research* 30, 77–85.
- Morales-Nin, B., Geffen, A.J., Cardona, F., Kruber, C., Saborido-Rey, F., 2007. The effect of Prestige oil ingestion on the growth and chemical composition of turbot otoliths. *Marine Pollution Bulletin* 54, 1732–1741.
- Morel, F.M.M., Kraepiel, A.M.L., Amyot, M., 1998. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 29, 543–566.
- Moss, D.W., Henderson, A.R., Kachmar, J.F., 1986. Enzymes. In: Tietz, N.W. (Ed.), *Textbook of Clinical Chemistry*, 9th ed. WB Saunders, Philadelphia, 619–774.

- Munkittrick, K.R., Van Der Kraak, G.J., Smith, I.R., and Rokosh, D.A. 1991. Response of hepatic MFO activity and plasma sex steroids to secondary treatment of bleached kraft pulp mill effluent and mill shutdown. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11, 1427–1439.
- Munro, H.N., Fleck, A., 1966. The determination of nucleic acids. *Methods of Biochemical Analysis* 14, 113.
- Murphy, C., McGurk, M., Pettigrew, J., Santinelli, A., Mazzucchelli, R., Johnston, P.G., Montironi, R., Waugh, D.J., 2005. Nonapical and cytoplasmic expression of interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 correlates with cell proliferation and microvessel density in prostate cancer. *Clinical Cancer Research* 11, 4117–4127.
- Murphy, D.L., Gooch, J.W., 1997. EROD and CYP1A protein in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) from an urban estuary relative to that in benzo[a]pyrene-exposed hatchery specimens. *Environmental Pollution* 95(2), 235–239.

N

- Nahrgang, J., Camus, L., Gonzalez, P., Jönsson, M., Christiansen, J.S., Hop, H., 2010. Biomarker responses in polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to dietary crude oil. *Aquatic Toxicology* 96, 77–83.
- Nakhlé, K., Cossa, D., Claisse, D., Beliaeff, B., Simon, S., 2007. Cadmium and mercury in Seine Estuary flounders and mussels: the results of two decades of monitoring. *ICES Journal of Marine Science* 64(5), 929-938.
- Narbonne, J.F., Daubeze, J.F., Clerendeau, C., Garrigues, P., 1999. Scale classification based on biochemical markers in mussels : application to pollution monitoring in European coasts. *Biomarkers* 4(6), 415–424.
- National Research Council, 2002. *Oil in the sea III: inputs, fates, and effects*. National Academy Press, Washington.
- Negrel, Ph., 1997. Multi-element Chemistry of Loire Estuary Sediments: Anthropogenic vs. Natural Sources. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 44, 395–410.
- Newman, S.J., Cappo, M., Williams, D.M., 2000. Age, growth, mortality rates and corresponding yield estimates using otolith of the tropical red snappers, *Lutjanus erythropterus*, *L. malabaricus* and *L. sebae* from the central Great Barrier Reef. *Fisheries Research* 48, 263-275.
- Nordvik, A.B., 1995. The Technology Windows-of-Opportunity for Marine Oil Spill Response as Related to Oil Weathering and Operations *Spill Science et Technology Bulletin*, 2 (1), 7–46.
- Norton, E.C., MacFarlane, R.B., Mohr, M.S., 2001. Lipid class dynamics during development in early life stages of shortbelly rockfish and their application to condition assessment. *Journal of Fish Biology* 58, 1010–1024

- Nolting, R.F., Helder, W., Baar, H.J.W., Gerringa, L.J.A., 1999. Contrasting behaviour of trace metals in the Scheldt estuary in 1978 compared to recent years. *Journal of Sea Research* 42, 275–290.
- NRC (National Research Council), 1987. Committee on biological markers. *Environmental Health Perspectives* 74, 3–9.
- NTP (National Toxicology Program), 1999. The 9th report on carcinogens. US Department of Health and Human Services, Public Health Service National Toxicology Program, Washington, DC.
- Nunn, J.W., Livingstone, D.R., Chipman, J.K., 1996. Effect of genetic toxicants in aquatic organisms. In: *Toxicology of aquatic pollution. Physiological, molecular and cellular approaches*, (Ed. Taylor E.W), 225–251.
- Nye, J.A., D.D., Davis, Miller, T.J., 2007. The effect of maternal exposure to contaminated sediment on the growth and condition of larval *Fundulus heteroclitus*. *Aquatic Toxicology* 82, 242–250.

O

- O'Connor, T.P., 2004. The sediment quality guideline, ERL, is not a chemical concentration at the threshold of sediment toxicity. *Marine Pollution Bulletin* 49, 383–385.
- Oberdorff, T., Hughes, R.M., 1992. Modification of an index of biotic integrity based on fish assemblages to characterize rivers of the Seine Basin, France. *Hydrobiologia* 228, 117–130.
- Oberdorff, T., Hugueny, B., Vigneron, T., 2001. Is assemblage variability related to environment variability? An answer for riverine fish. *Oikos* 93, 419–428.
- Ogor, A, Fablet, R., 2005. Formation TNPC du 27 au 29 septembre 2005, 38 pp.
- Oikari, A., 2006. Caging techniques for field exposures of fish to chemical contaminants. *Aquatic Toxicology* 78, 370–381.
- Oikari, A., Kunnamo-Ojala, T., 1987. Tracing of xenobiotic contamination in water with the aid of fish bile metabolites: a field study with caged rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquatic Toxicology* 9, 327–341.
- Oliveira, M., Maria, V.L., Ahmad, I., Serafim, A., Bebianno, M.J., Pacheco, M., Santos, M.A., 2009. Contamination assessment of a coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal) using defence and damage biochemical indicators in gill of *Liza aurata* an integrated biomarker approach. *Environmental Pollution* 157, 959–967.
- Oliveira, M., Santos, M.A., Pacheco, M., 2004. Glutathione protects heavy metal-induced inhibition of hepatic microsomal ethoxyresorufin Odeethylase activity in *Dicentrarchus labrax* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 58, 379–385.
- Oliveira, M., Pacheco, M., Santos, M.A., 2008. Organ specific antioxidant responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following a short-term exposure to phenanthrene. *Science of the Total Environment* 396, 70–78.

- Omoregie, E., Ufodike, B.C., 2000. Effects of water soluble fractions of crude oil on growth of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 64, 601–605.
- OSPAR. 2000. Quality Status Report 2000. OSPAR Commission, London. 108pp.
- OSPAR. Agreement on background concentrations for contaminants in seawater, biota and sediment. Convention for the protection of the marine environment of the north-east Atlantic; 2006.
- Otte, J.C., Andersson, C., Abrahamson, A., Olsman, H., Keiter, S., Engwall, M., Hollert, H., Brunström, B., 2008. A bioassay approach to determine the dioxin-like activity in sediment extracts from the Danube River: Ethoxyresorufin-O-deethylase induction in gill filaments and liver of three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.). Environment International 34(8), 1176–1184.
- Ouddane, B., Mikac, N., Cundy, A.B., Quillet, L., Fischer, J.C., 2008. A comparative study of mercury distribution and methylation in mudflats from two macrotidal estuaries: The Seine (France) and the Medway (United Kingdom). Applied Geochemistry 23, 618–631.

P

- Palace, V.P., Mjewski, H.S., Klaverkamp, J.F., 1992. Interactions among antioxidant defences in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to cadmium. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 50, 156–162.
- Palmer, A.R., Strobeck, C., 1986. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. Annual Review of Ecology and Systematics 17, 391–421.
- Pandey, S., Parvez, S., Ansari, R., A., Ali, M., Kaur, M., Hayat, F., Ahmad, F., Raisuddin, S., 2008. Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. Chemistry and Biology Interactions 174, 183–192.
- Panfili, J., Durand, J.D., Diop, K., Gourène, B., Simier, M., 2005. Fluctuating asymmetry in fish otoliths and heterozygosity in stressful estuarine environments (West Africa). Marine and Freshwater Research 56, 505–516.
- Pannella, G., 1971. Fish otoliths: daily growth layers and periodical patterns. Science 173, 1124–1127.
- Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S., Vernet, G., 2000. Biochemical and (ultra) structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. Aquatic Toxicology 50, 109–124.
- Parsons, P.A., 1992. Fluctuating asymmetry: a biological monitor of environmental and genomic stress. Heredity 68, 361–364.

- Payne, J.F., Fancey, L.L., Rahimtula, A.D., Porter, E.L., 1987. Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 86, 233–245.
- Payne, J.F., Fancey, L.F., 1989. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on immune responses in fish: Change in meal macrophage centres in flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) exposed to hydrocarbon-contaminated sediments. *Marine Environmental Research* 28, 431–435.
- Payne, J.F., Mathieu, A., Melvin, W., Fancey, L.L., 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin* 32, 225–231.
- Peakall, D.W., Walker, C.H., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (3). *Ecotoxicology* 3, 173–179.
- Penczak, T., Kruk, A., 1999. Applicability of the abundance/biomass comparison method for detecting human impacts on fish populations in the Pilica River, Poland. *Fisheries Research* 39, 229–240.
- Perago, J., Barroso, J.B., Garcia-Salguero, L., Higuera, M., Lupianez J.A., 2001. Growth, protein-turnover rates and nucleic-acid concentrations in the white muscle of rainbow trout during development. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 33, 1227–1238.
- Pereira, P., de Pablo, H., Vale, C., Pacheco, M., 2009. Combined use of environmental data and biomarkers in fish (*Liza aurata*) inhabiting a eutrophic and metal-contaminated coastal system – Gills reflect environmental contamination. *Marine Environmental Research* 69, 53–62.
- Phelan, B.A., Goldberg, R., Bedja, A.J., Pereira, J., Hagan, S., Clark, P., Studholme, A.L., Cablabrese, A., Able, K.W., 2000. Estuarine and habitat-related differences in growth rates of young-of-the-year winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and tautog (*Tautoga onitis*) in the 3 north-eastern US estuaries. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 247, 1–28.
- Phibs, J., Wiramanaden C.I.E., Hauck, D., Pickering, I.J., Liber, K., Janz, D.M., 2011. Selenium uptake and speciation in wild and caged fish downstream of a metal mining and milling discharge. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1139–1150.
- Phillips, D.J.H., 1980. Quantitative aquatic biological indicators. Applied Science Publication, 488.
- Pihl, J., Modin, J., Wennhage, H., 2005. Relating plaice (*Pleuronectes platessa*) recruitment to deteriorating habitat quality: effects of macroalgal blooms in coastal nursery grounds. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62, 1184–1193.
- Piron, M., Pineau, A., Mabele, R.M., 1990. Sediment, parameters and distribution of metals in fine sediments of the Loire estuary. *Water, Air, and Soil Pollution* 50, 267–277.
- Ploetz, D.M., Fitts, B.E., Rice, T.M., 2007. Differential accumulation of heavy metals in muscles and liver of a marine fish (King Mackerel, *Scomberomorus cavalla*, Cuvier) from the Northern Gulf of Mexico, USA. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 78, 134–137.

- Porter, C.M., Janz, D.M., 2003. Treated municipal sewage discharge affects multiple levels of biological organization in fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 199–206.
- Post, J.C., Lundin, C.G., 1996. Guidelines for integrated coastal zone management. In: *Environmentally Sustainable Development Studies and Monographs Series No. 9*. World Bank, Washington, DC, 16 pp.
- Pottinger, T.G., Carrick, T.R., Yeomans, W.E., 2002. The three-spined stickleback as an environmental sentinel: effects of stressors on whole-body physiological indices. *Journal of Fish biology* 61, 207–29.

Q

- Quinn II, T.J., Deriso, R.B., 1999. *Quantitative fish dynamics*. Oxford University Press. New York.

R

- Rainbow, P.S., White, S.L., 1989. Comparative strategies of heavy metal accumulation by crustaceans: zinc, copper and cadmium in a decapod, an amphipod and a barnacle. *Hydrobiologia* 174, 245–262.
- Rao, V.V., Gupta, E.V., Thomas I.M., 1990. Chromosome damage in untreated tuberculosis patients, *Tubercle* 71, 169–172.
- Rasmussen, R.S., Korsgaard, B., 1996. The effect of external ammonia on growth and food utilization of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 205, 35–48.
- Rätz, H.J., Lloret, J., 2003. Variation in fish condition between Atlantic cod (*Gadus morhua*) stocks, the effect on their productivity and management implications. *Fisheries Research* 60, 369–380.
- Reddy, C.M., Quinn, J.G., 2001. The North Cape oil spill. Hydrocarbons in Rhode Island coastal waters and Point Judith Pond. *Marine Environmental Research* 52, 445–461.
- Regoli, F., Frenzilli, G., Bocchetti, R., Annarumma, F., Scarcelli, V., Fattorini, D., Nigro, M., 2004. Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Aquatic Toxicology* 68(2), 167–178.
- Regoli, F., Nigro, M., Bompadre, S., Winston, G.W., 2000. Total oxidant scavenging capacity (TOSC) of microsomal and cytosolic fractions from Antarctic, Arctic and Mediterranean scallops: differentiation between three potent oxidants. *Aquatic Toxicology* 49, 13–25.
- Reise, K. 1985. *Tidal Flat Ecology: An experimental approach to species interactions*. Berlin–Heidelberg, Springer-Verlag. pp. 191.
- REPOM, 2009. Réseau national de surveillance de la qualité de l'eau et des sédiments des ports maritimes. Bilan dans la région Nord – Pas–de–Calais de 1997 à 2008. Adrien Lebrun ULCO.

- Reynders, H., Bervoets, L., Gelders, M., De Coen, W.M., Bulst, R., 2008. Accumulation and effects of metals in caged carp and resident roach along a metal pollution gradient. *Sciences of Total Environment* 391, 82–95.
- Reynolds, W.J., Feist, S.W., Jones, G.J., Lyons, B.P., Sheahan, D.A., Stentiford G.D., 2003. Comparison of biomarker and pathological responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) induced by ingested polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) contamination. *Chemosphere* 52(7), 1135–1145.
- Riba, I., Blasco, J., Jimenez-Tenorio, N., Angel DelValls, T.A., 2005. Heavy metal bioavailability and effects : I. Bioaccumulation caused by mining activities in the Gulf of Cadiz (SW, Spain). *Chemosphere* 58, 659–669.
- Richards, J.G., Playle, R.C., 1998. Cobalt Binding to Gills of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): An Equilibrium Model. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 119 (2), 185–197.
- RNO (Réseau National d'Observation). (2003). Surveillance du milieu marin. Travaux du Réseau National d'Observation de la qualité du milieu (eds. Ifremer).
- Robinson, S.M., Ware, D., 1988. Ontogenetic development of growth rates in larval Pacific herring, *Clupeaharengus pallasii*, measured with RNA/DNA ratios in the Strait of Georgia, British Columbia. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45, 1422–1429.
- Rocher, V., 2003. Introduction et stockage des hydrocarbures et des éléments métalliques dans le réseau d'assainissement unitaire parisien. Thèse de Doctorat, Université Paris XII - Val de Marne, France.
- Roesijadi, G., Robinson, W.E., 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), *Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers, CRC press, 387–420.
- Romeo, M., Bennani, N., Gnassia-Barelli, M., Lafaurie, M., Girard, J.P., 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology* 48, 185–194.
- Rose, W.L., Nisbet, R.M., Green, P.G., Norris, S., Fan, T., Smith, E.H., Cherr, G.N., Anderson S.L., 2006. Assessment of seasonal variability of biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from a low contaminated stream: Implication for environmental biomonitoring. *Aquatic Toxicology* 80, 298–308.
- Rouleau, C., Tjälve, H., Gottofrey, J., Pelletier, É., 1995. Uptake, distribution and elimination of Mn(II) in the brown trout (*Salmo trutta*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 483–490.
- Rowe, C.L. 2003. Growth responses of an estuarine fish exposed to mixed trace elements in sediments over a full life cycle. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 229–239.
- Rowe, C.L., Hopkins, W.A., Congdon, J.D., 2001. Metabolic costs incurred by crayfish (*Procambarus acutus*) in a trace element polluted habitat: further evidence of a common response among diverse taxonomic groups. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 129, 275–283.

Roy, G., Vuillemin, R., Guyomarch, J., 2005. On-site determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in seawater by stir bar sorptive extraction (SBSE) and thermal desorption GC–MS. *Talanta* 66, 540–546.

Rubio, V.C., Sanchez-Vasquez, F.J., Madrid, J.A., 2003. Nocturnal feeding reduces sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) pellet-catching ability. *Aquaculture* 220, 697–705.

S

Saborido-Rey, F., Dominguez-Petit, R., Tomas Morales-Nin, B., Alonso-Fernandez, A., 2007. Growth of juvenile turbot in response to food pellets contaminated by fuel oil from the tanker ‘Prestige’. *Marine Ecology Progress Series* 245, 271–279.

Salomons, W., Forstner, U., 1984. *Metals in the Hydrocycle*. Springer, Berlin, pp. 349.

Sampaio, F.G., Bojink, C.L., Oba, E.T., Santos, L.R.B., Kalinin, A.L., Rantin, F.T., 2008. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 147, 43–51.

Sanchez, W., Palluel, O., Meunier, L., Coquery, M., Porcher, J.M., Aït-Aïssa, S., 2005. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19, 177–83.

Sanchez, W., Piccini, B., Ditche, J.M., Porcher, J.M., 2008. Assessment of seasonal variability of biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from a low contaminated stream: Implication for environmental biomonitoring. *Environment International* 34, 791–798.

Sanchez, W., Porcher, J.M., 2009. Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive of the European Union. *Trends in Analytic Chemistry* 28.

Santos, M.A., Pacheco, M., Ahmad, I., 2004. *Anguilla anguilla* L. Antioxidants responses to in situ bleached kraft pulp mill effluent outlet exposure. *Environment International* 30, 301–318.

Santos, M.M., Solé, M., Lima, D., Hambach, B., Ferreira, A.M., Rais-Henriques, M.A., 2010. Validating a multi-biomarker approach with the shanny *Lipophrys pholis* to monitor oil spills in European marine ecosystems. *Chemosphere* 81, 686–691.

Sasal, P., Pampoulie, C., 2000. Asymmetry, reproductive success and parasitism of *Pomatoschistus microps* in a French lagoon, *Journal of Fish Biology* 57, 382–390.

Schiewe, M.H., Weber, D.D., Myers, M.S., Jacques, F.J., Reichert, W.L., Krone, C.A., Malins, D.C., McCain, B.B., Chan, S.L., Varanasi, U., 1991. Induction of foci of cellular alteration and other hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*) exposed to an extract of an urban marine sediment. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48, 1750–1760.

- Schlenk, D., Perkins, E.J., Hamilton, G., Zhang, Y.S., Layher, W., 1996. Correlation of hepatic biomarkers with whole animal and population/community metrics. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56, 2299–2308.
- Schmitt, C.J., Wildhaber, M.L., Hunn, J.B., Nash, T., Tieger, M.N., Steadman, B.L., 1993. Biomonitoring of lead-contaminated Missouri streams with an assay for erythrocyte aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in fish blood. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 25, 464–475.
- Schröder, H.C., Batel, R., Hassanein, H.M.A., Lauenroth, S., Jenke, H.S., Simat, T., Steinhart, H., Müller, W.E.G., 2000. Correlation between the level of the potential biomarker, heat-shock protein, and the occurrence of DNA damage in the dab, *Limanda limanda*: a field study in the North Sea and the English Channel. *Marine Environmental Research* 49, 201–215.
- Scott, G., Sloman, K.A., Rouleau, C., Wood, C.M., 2003. Cadmium disrupts behavioural and physiological responses to alarm substance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Bio.* 206, 1779–1790.
- Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology* 68, 369–392.
- Searcy, S.P., Eggleston, D.B., Hare, J.A., 2007. Is growth a reliable indicator of habitat quality and essential habitat for a juvenile estuarine fish? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 64, 681–691.
- Seine-Aval, Fascicule n°1, 29 p. Editions Ifremer, Plouzané (France). ISBN 2 84433 026-6.
- Selleslagh, J.R., Amara, R., Laffargue, P., Lesourd, S., Lepage, M., Girardin, M., 2009. Composition and functioning of three fish estuarine assemblages of the eastern English Channel: a comparison with French estuaries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 81, 149–159.
- Shugart, L.R., 1990. Biological monitoring: testing for genotoxicity. *Biomarkers of Environmental Contamination* 205–216. Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton.
- Shugart, L.R., 2000. DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology* 9, 329–340.
- Shugart, L.R., McCarthy, J.F., Halbrook, S.H., 1992. Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview. *Risk Analysis* 12, 353–360.
- Shugart, L.R., Theodorakis, C., 1994. Environmental genotoxicity: probing the underlying mechanisms. *Environmental Health Perspectives* 102, 13–7.
- Simonato, J.D., Guedes, C.L.B., Martinez, C.B.R., 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69, 112–120.
- Simpson, S.L., Apte, S.C., Batley, G.E., 2000. Effect of short-term resuspension events on the oxidation of cadmium, lead and zinc sulfide phases in anoxic estuarine sediments. *Environmental Sciences and Technology* 34, 4533–4537.

- Sinex, S.A., Wright, D.A., 1988. Distribution of trace metals in the sediments and biota of Chesapeake Bay. *Marine Pollution Bulletin* 19, 425–431.
- Smeets, J.M.W., Wamsteker, J., Roth, B., Everaarts, J., Van den Berg, M., 2002. Cytochrome P4501A induction and testosterone hydroxylation in cultured hepatocytes of four fish species. *Chemosphere* 46, 163–172.
- Smith, G.M., Khan, A.T., Weis, J.S., Weis, P., 1995. Behavior and brain chemistry correlates in mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) from polluted and unpolluted environments. *Marine Environmental Research* 39, 329–333.
- Smith, A.K., Ajani, P.A., Roberts, D.E., 1999. Spatial and temporal variation in fish assemblages exposed to sewage and implications for management. *Marine Environmental Research* 47, 241–260.
- Smith, A.K., Suthers, I.M., 1999. Effects of sewage effluent discharge on the abundance, condition and mortality of hulafish, *Trachinops taeniatus* (Plesiopidae). *Environmental Pollution* 106, 97–106.
- Sogard, S.M., 1992. Variability in growth rates of juvenile fishes in different estuarine habitats. *Marine Ecology Progress Series* 85, 35–53.
- Sogard, S.M., 1997. Size-selective mortality in the juvenile stage of teleost fishes: A review. *Bulletin of Marine Science* 60, 1129–1157.
- Sogard, S.M., Olla, B.L., 2000. Endurance of simulated winter conditions by age-0 walleye pollock: effects of body size, water temperature and energy stores. *Journal of Fish Biology* 56, 1–21.
- Soimasuo, R., Jokinen, I., Kukkonen, J., Petnen, T., Ristola, T., Oikari, A., 1995. Biomarker responses along a pollution gradient: Effects of pulp and paper mill effluents on caged whitefish. *Aquatic Toxicology* 31, 329–345.
- Soivio, A., Oikari, A., 1976. Haematological effects of stress on a teleost, *Esox lucius* L. *Journal of Fish Biology* 8, 397–411.
- Somarakis, S., Kostikas, I., and Tsimenides, N., 1997. Fluctuating asymmetry in the otoliths of larval fish as an indicator of condition: conceptual and methodological aspects. *Journal of Fish Biology Supplement A* 51, 30–38.
- Sonne, C., Fonfara, S., Dietz, R., Kirkegaard, M., Letcher, R.J., Shahmiri, S., Andersen, S., Møller, P., 2007. Multiple cytokine and acute-phase protein gene transcription in West Greenland sledge dogs (*Canis familiaris*) dietary exposed to organic environmental pollutants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53, 110–118.
- Sprague, J.B., 1969. Measurement of pollutant toxicity of fish. I. Bioassay methods for acute toxicity. *Water Research* 3, 793–821.
- Stegeman, J.J., Brouwer, M., Richard, T.D.G., Förflin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., van Veld, P.A., 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. *Environmental Health Perspectives* 102, 19–23.

- Stein, J.E., Reichert, W.L., Varanasi U., 1994. Molecular epizootiology: assessment of exposure to genotoxic compounds in teleost. *Environmental Health Perspectives* 102, 19–23.
- Stephens, S.M., Frankling, S.C., Stagg, R.M., Brown, J.A., 2000. Sub-lethal effects of exposure of juvenile turbot to oil produced water. *Marine Pollution Bulletin* 40, 928–937.
- Steward, C.A., DeMaria, K.D., Shenker, J.M., 2009. Using otolith morphometrics to quickly and inexpensively predict age in the gray angelfish (*Pomacanthus arcuatus*). *Fisheries Research* 99, 123–129
- Stien, X., Percic, P., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M. and Lafaurie, M., 1998. Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean Sea. *Environmental Pollution* 99, 339–345.
- Storelli, M.M., Barone, G., Storelli, A., Marcotrigiano, G.O., 2006. Trace metals in tissues of Mugilids (*Mugil auratus*, *Mugil capito*, and *Mugil labrosus*) from the Mediterranean Sea. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 77, 43–50.
- Sturve, J., Hasselberg, L., Fäth, H., Celander, M., Förlin, L., 2006. Effects of North Sea oil and alkylphenols on biomarker responses in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquatic Toxicology* 78, 73–78.
- Sultana, R., Rado, D.R., 1998. Bioaccumulation patterns of zinc, copper, lead and cadmium in Grey Mullet, *Mugil cephalus* (L.), from harbour waters of Visakhapatnam, India. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 60, 949–955.
- Sumpter, J.P., Jobling, S., 1995. Vitellogenin as a biomarker of exposure to oestrogens. *Environmental Health Perspectives*. In Press.
- Suter, G.W., II, 1993. *Ecological Risk Assessment*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, p. 538.
- Suthers, I.M., 1998. Bigger?fatter? or is faster growth better? Considerations on condition in larval and juvenile coral–reef fish. *Australian Journal of Ecology* 23, 265–273.
- Suthers, I.M., Fraser, A., Frank., K.T., 1992. Comparison of lipid, otolith and morphometric condition indices of pelagic juvenile cod (*Gadus morhua*) from the Canadian Atlantic. *Marine Ecology Progress Series*, 84, 31–40.
- Suthers, I.M., 2000. Significance of larval condition: comment on laboratory experiments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57, 1534–1536.
- Sutton, S.G., Bult, T.P., Haedrich, R.L., 2000. Relationships among fat weight, body weight, water weight, and condition factors in wild Atlantic salmon parr. *Transactions of the American Fisheries Society* 129, 527–538.
- Sved, D., Roberts, M.H., 1995. A novel use for the continuous-flow serial diluter: aquatic toxicity testing of contaminated sediments in suspension. *Journal of Water Research*. 29, 1169–1177.
- Szefer, P., Szefer, K., Skwarzec, B., 1990. Distribution of trace metals in some representative fauna of the southern Baltic. *Marine Pollution Bulletin* 21, 60–62.

T

- Tanaka, Y., W.S. Gwak, Tanaka M., Sawada, Y., Okada, T., Miyashita, S., Kumai., H., 2007. Ontogenetic changes in RNA, DNA and protein contents of laboratory-reared Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Fisheries Science* 73, 378–384.
- Tarpgaard, E., Mogensen, M., Gronkjaer, P., Carl, J., 2005. Using short-term growth of enclosed 0–group European flounder, *Platichthys flesus*, to assess habitat quality in a Danish bay. *Journal of Applied Ichthyology* 21, 52–63.
- Taylor, S.R., McLennan, S.M., 1995. The geochemical evolution of the continental crust. *Reviews of Geophysics*. 33, 241–265.
- Teal, J., Teal, M., 1962. "Energy flow in the salt marsh ecosystem of Georgia." *Ecology* 43, 614–624.
- Teles, M., Gravato, C., Pacheco, M., Santos, M.A., 2004. Juvenile sea bass biotransformation, genotoxic and endocrine responses to β -naphthoflavone, 4-nonylphenol and 17 β -estradiol individual and combined exposures. *Chemosphere* 57, 147–58.
- Tessier, A., Campbell, P.G.C., Bisson, M., 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry* 51, 844–851.
- Tierney, K.D., Baldwin, D.H., Hara, T.J., Ross, P.S., Scholtz, N.L., 2010. Olfactory toxicity in fishes. *Aquatic Toxicology* 96, 2–26.
- Tintos, A., Miguez, J.M., Mancera, J.M., Soengas, J.L., 2006. Development of a microtitre plate indirect ELISA for measuring cortisol in teleost fish, and evaluation of stress responses in rainbow trout and gilthead sea bream. *Journal of Fish Biology* 68, 251–263.
- Trembley, L.A., 2004. Biomarkers in eel to evaluate effects of diquat in a Christchurch river. *Australas. J. Ecotoxicol.* 10, 53–56.
- Triebkorn, R., Adam, S., Casper, H., Honnen, W., Pawert, M., Schramm, M., Schwaiger, J., Kohler, H.R., 2002. Biomarkers as diagnostic tools for evaluating effects of unknown past water quality conditions on stream organisms. *Ecotoxicology* 11, 451–65.
- Tsangaris, C., Kormas, K., Stroglyoudi, E., Hatzianestis, I., Neofitou, C., Andral., F., Galgani, F., 2010. Multiple biomarkers of pollution effects in caged mussels on the Greek coastline. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 151(3), 369–378.

U

- Ueberschar, B., Clemmesen, C., 1992. A comparison of the nutritional condition of herring larvae as determined by two biochemical methods—tryptic enzyme activity and RNA:DNA ratio measurements. *ICES Journal of Marine Science* 49, 245–249.
- US-EPA, 1996. Test Methods for Evaluating Solid Waste. Vol IB: Laboratory Manual. Physical and Chemical Methods. National Technology Information Service.

Uysal, K., Köse, E., Bülbül, M., Dönmez, M., Erdögan, Y., Koyun, M., Omeröglu, C., Ozmal, F., 2009. The comparison of heavy metal accumulation ratios of some fish species in Enne Dame Lake (Kütahya/Turkey). *Environmental Monitoring and Assessment* 157, 355–362.

V

Van der Geest, J.L., Poirier, D.G., Sibley, P.K., Solomon, K.R., 2010. Measuring bioaccumulation of contaminants from field-collected sediment in freshwater after organisms: a critical review of laboratory methods. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29 (11), 2391–2401.

Van der Oost, R., Vindimian, E., van den Brink, P., Satumalay, K., Heida, H., Vermeulen, N.P.E., 1997. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*): III. Statistical analyses of relationships between contaminant exposure and biomarkers. *Aquatic Toxicology* 39, 45–75.

Van der Oost, R., Lopes, S., Komen, H., Satumalay, K., Van den Bos, R., Heida, H., Vermeulen, N., 1998. Assessment of environmental quality and inland water pollution using biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*); use of a bioactivation:detoxication ratio as biotransformation index (BTI). *Marine Environmental Pollution* 46, 315–319

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57–149.

Van Dongen, S., 2006. Fluctuating asymmetry and development instability in evolutionary biology: past, present and future. *Journal of Evolutionary Biology*, 19, 1727–1743.

Van Veld, P.A., Vogelbein, W.K., Smolowitz, R., Woodin, B.R., Stegeman, J.J., 1992. Cytochrome P450IA1 in hepatic lesions of a teleost fish (*Fundulus heteroclitus*) collected from a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated site. *Carcinogenesis* 13, 505–507.

Varanasi, U., 1989. *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Varanasi, U., Nishimoto, M., Reichert, W.L., Le Eberhart, B.T., 1986. Comparative metabolism of benzo[a]pyrene and covalent binding capacity to hepatic DNA in English sole, *starry flounder*, and rat. *Cancer Research* 46, 3817–3824.

Vasconcelos, R.P., Reis-Santos, P., Fonseca, V., Ruano, M., Tanner, S., Costa, M.J., Cabral, H.N., 2009. Juvenile fish condition in estuarine nurseries along the Portuguese coast. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 82, 128–138.

Vasconcelos, R.P., Reis-Santos, P., Tanner, S., Maia, A., Latkoczy, C., Gunther, D., Costa, M.J., Cabral, H., 2008. Evidence of estuarine nursery origin of five coastal fish species along the Portuguese coast through otolith elemental fingerprints. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 79, 317–327.

- Vasconcelos, R.P., Reis-Santos, P., Maia, A., Ruano, M., Costa, M.J., Cabral, H.N., 2011. Trace metals (Cu, Zn, Cd and Pb) in juvenile fish from estuarine nurseries along the Portuguese coast. *Scientia Marina* 75(1) 115–162.
- Vethaak, A.D., 1993. Fish disease and marine pollution; a case study of the flounder (*Platichthys flesus*) in Dutch coastal and estuarine waters. Academic thesis, University of Amsterdam, The Netherlands.
- Viarengo, A., Bettella, E., Fabbri, R., Burlando, B., Lafaurie, M., 1997. Heavy Metal Inhibition of EROD Activity in Liver Microsomes from the Bass *Dicentrarchus labrax* Exposed to Organic Xenobiotics: Role of GSH in the Reduction of Heavy Metal Effects. *Marine Environmental Research* 44, 1–11.
- Vigano L., Arillo A., Melodia F., Arlati O., Monti C., 1998. Biomarker responses in cyprinids of the middle stretch of the River Po, Italy. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 404–411.
- Viguri, J.R., Irabien, M.J., Yusta, I., Soto, J., Gómezc, J., Rodriguez, P., 2007. Physico-chemical and toxicological characterization of the historic estuarine sediments: a multidisciplinary approach. *Environment International*. 33, 436–44.
- Vinagre, C., Amara, R., Maia, A., Cabral, H.N., 2008. Latitudinal comparison of spawning season and growth of 0–group sole, *Solea solea* (L.). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 78, 521–528.
- Vinagre, C.S. França, I., Caçador, Cabral, H.N., 2004. Accumulation of heavy metals by flounder, *Platichthys flesus* (Linnaeus 1758), in a heterogeneously contaminated nursery area. *Marine Pollution Bulletin* 49(11-12), 1109–1126.
- Visnjic-Jeftic, Z., Jaric, I., Jovanovic, L., Skoric, S., Smederevac-Lalic, M., Nikcevic, M., Lenhardt, M., 2010. Heavy metal and trace element accumulation in muscle, liver and gills of the Pontic shad (*Alosa immaculata* Bennet 1835) from the Danube River (Serbia). *Microchemical Journal* 95, 341–344

W

- Waeles, M., Riso, R.D., Le Corre, P., 2005. Seasonal variations of cadmium speciation in the Penzé estuary, NW France. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 65, 143–152.
- Waeles, M., Riso, R.D., Maguer, J.F., Le Corre, P., 2004. Distribution and chemical speciation of dissolved cadmium and copper in the Loire estuary and North Biscay continental shelf, France. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 59, 49–57.
- Walker, P., Grouzmann, E., Burnier, M., Waeber, B., 1991. The role of neuropeptide Y in cardiovascular regulation. *Trends in Pharmacological Sciences* 12, 111–115.
- Wang, Z., Fingas, M., Page, D.S., 1999. Oil spill identification. *Journal of Chromatography A*, 843, 369–411.

- Watabe, N., Tanaka, K., Yamada, J., Dean, J.M., 1982. Scanning electron microscope observations of the organic matrix in otolith of the Teleost fish *Fundulus heteroclitus* (Linnaeus) and *Tilapia nilotica* (Linnaeus). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 58 : 127-134.
- Webb, D., Gagnon, M., M., 2002. Biomarkers of exposure in fish inhabiting the Swan-Canning Estuary, Western Austria - a preliminary study. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 9, 259-269.
- Weber, L.P., Diamond, S.L., Bandiera, S.M., Janz, D.M., 2002. Expression of HSP70 and CYP1A protein in ovary and liver of juvenile rainbow trout exposed to b-naphthoflavone. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 131, 387-394.
- Wedemeyer, G., Barton, B., McLeay, D., 1990. Stress and acclimation. In: Schreck, C.B., Moyle, P.B. (Eds.), *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda, MD, 451-489.
- Weis, J.S., Samson, J., Zhou, T., Skurnick, J., Weis, P., 2003. Evaluating prey capture by larval mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) as a potential biomarker for contaminants. *Marine Environmental Research* 55, 27-39.
- Weis, J.S., Smith, G., Santiago-Bass, C., 2000. Predator/prey interactions: a link between the individual level and both higher and lower level effects of toxicants in aquatic ecosystems. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 7, 145-153.
- Wester, R.C., Melendres, J., Maibach, H.I., Serranzana, S., Wade, M., 1994. Time-response necessary in validation for extraction of herbicides and pesticides from cloth patches used in field exposure studies. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 27, 276-280.
- Whitfield, A.K., Elliot, M., 2002. Fishes as indicators of environmental ecological changes within estuaries : a review of progress and some suggestions for the future. *Journal of Fish Biology* 61, 229-250.
- Whittaker, R.H., 1975. *Communities and ecosystems*. Macmillan, New York. 385 pp.
- Whyte, J.J., Jung, R.E., Schmitt, C.J., Tillitt, D.E., 2000. Ethoxyresorufin- O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical Review in Toxicology* 30, 347-570.
- Windom, H., Byrd, J., Smith Jr., R., Hungspreugs, M., Dharmvanij, S., Thumtrakul, W., Yeats, P., 1991. Trace metal-nutrient relationships in estuaries. *Marine Chemistry* 32, 177-194.
- Windom, H.L., Schropp, S.J., Calder, F.D., Ryan, J.D., Smith Jr., R.G., Burney, L.C., Lewis, F.G., Rawlinson, C.H., 1989. Natural trace metal concentrations in estuarine and coastal marine sediments of the southeastern United States. *Environmental Sciences and Technology* 23, 314-320.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 19, 137-161.
- Winston, G.W., Regoli, F., Dugas, A.J., Jr, Fong, J.H., Blanchard, K.A., 1998. A rapid gas-chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biology and Medicine* 24, 480-493.

- Winter, M.J., Verweij, F., Garofalo, E., Ceradini, S., McKenzie, D.J., Williams, M.A., Taylor, E.W., Butler, P.J., Van Der Oost, R., Chipman, J.K., 2005. Tissue levels and biomarkers of organic contaminants in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) from rivers in the West Midlands, UK. *Aquatic Toxicology* 73, 394–405.
- Wo, K.T., Lam, P.K.S., Wu, R.S.S., 1999. A comparison of growth biomarkers for assessing sublethal effects of cadmium on a marine gastropod, *Nassarius festivus*. *Marine Pollution Bulletin* 39, 165–173.
- Wolke, R.E., 1992. Piscine macrophage aggregates: A review. *Annu. Rev. Fish Dis.* 2, 91–108.
- Wu, R.S.S., Siu, W.H.L., Shin, P.K.S., 2005. Induction, adaptation and recovery of biological responses: Implications for environmental monitoring. *Marine Pollution Bulletin* 51, 623–634.

Y

- Yaragina, N.A., and Marshall, C.T., 2000. Trophic influences on interannual and seasonal variation in the liver condition index of Northeast Arctic cod. *ICES Journal of Marine Science* 57, 42–55.
- Yilmaz, A.B., Yilmaz, L., 2007. Influences of sex and seasons on levels of heavy metals in tissues of green tiger shrimp (*Penaeus semisulcatus* de Hann, 1844). *Food Chemistry* 101, 1664–1669.

Z

- Zhang, J., Liu, C.L., 2002. Riverine composition and estuarine geochemistry of particulate metals in China-weathering features, anthropogenic impact and chemical fluxes. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 54, 1051–1070.
- Zwolsman, J.J.G., Van Eck, B.T.M., Van der Weijden, C.H., 1997. Geochemistry of dissolved trace metals (cadmium, copper, zinc) in the Scheldt estuary, southwestern Netherlands: impact of seasonal variability. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 61, 1635–1652.
- Zychlinski, L., Byczkowski, J.Z., Kulkarni, A.P., 1991. Toxic effects of long term intratracheal administration of vanadium pentoxide in rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 20, 295–298.

Tables des illustrations

Liste des Figures

Figure 1 : Flux de matières dans les milieux tidaux situés entre la terre et la mer (modifié de Reise, 1985).....	9
Figure 2 : Apports de contaminants dans le milieu littoral : apports directs et indirects d'origine fluviatiles et/ou atmosphériques.....	13
Figure 3 : Relations entre les différentes composantes de suivi des effets des contaminants chimiques sur les organismes (Modifié de Suter, 1993 et Van der Oost <i>et al.</i> , 2003).....	17
Figure 4 : Méthodes d'étude des effets biologiques des contaminations chimiques en relations avec leur pertinence écologique et toxicologique (modifié de Triebkorn <i>et al.</i> , 2001).....	22
Figure 5 : Relations entre exposition aux contaminants et état de santé de l'organisme. Réponses des biomarqueurs d'exposition ou d'effets en fonction des mécanismes physiologiques impliqués (d'après Depledge, 1994).	25
Figure 6 : Relations entre sensibilité et pertinence écologique des réponses biologiques à différents niveaux d'organisation (Modifié de Adams <i>et al.</i> , 1989).....	32
Figure 7 : Devenir des polluants dans les organismes : prises en charge des polluants dans la cellule afin d'augmenter leur hydrosolubilité et faciliter leur excrétion.	36
Figure 8 : Sources entraînant une augmentation des espèces réactives de l'oxygène dans la cellule, dommages cellulaires associés et intervention du système antioxydant.	38
Figure 9 : Sensibilité et temps d'intégration des indices de croissances et de condition utilisés dans ce travail de thèse (modifié de Suthers, 2000).	42
Figure 10 : Juvénile de bar commun, <i>Dicentrarchus labrax</i> , de 7 cm et âgé d'environ 4 mois.....	47
Figure 11 : Juvénile de turbot, <i>Scophthalmus maximus</i> , de 7 cm et âgé d'environ 4 mois	48
Figure 12 : Juvénile de flet commun, <i>Platichthys flesus</i> , de 8 cm, âgé d'environ 5 mois.....	49
Figure 13 : (a) serre expérimentale du CEDRE, (b) bassin d'exposition de 300 L, le système expérimental est constitué d'un entonnoir lié à une pompe, (c) les flèches dans le schéma indique la direction du mouvement de l'eau de mer et/ou du pétrole (Milinkovitch <i>et al.</i> , 2011).....	51
Figure 14 : Schéma du port de Boulogne sur Mer, Pas de Calais . Le port s'étend sur une surface totale de 4,6 km ² , en incluant la rade délimitée au Nord par la digue Nord et à l'Ouest par la digue Carnot. 53	
Figure 15 : Localisation des sites de caging dans le port de Boulogne sur Mer.....	54
Figure 16 : Cage cylindrique des bars et cage rectangulaire des turbots utilisées pour l'expérience de caging.	55
Figure 17 : Fixation des cages sur le sédiment par les plongeurs scientifiques à l'aide d'ancre à vis « Skrew anchor », station A.	56
Figure 18 : Conditions d'exposition par caging des bars et turbots dans la station A.....	56

Figure 19 : Localisation des sites de prélèvements dans le port de Boulogne sur Mer (3 prélèvements), dans la vasière nord de l'estuaire de la Seine (1 prélèvement) et sur la plage de Wimereux (1 prélèvement).....	57
Figure 20 : Conditions d'exposition des juvéniles de turbots (75 mm) aux sédiments issus des trois sites d'étude : un sédiment de wimereux, un sédiment de la vasière nord de la Seine et trois sédiments prélevés dans le port de Boulogne sur mer.....	58
Figure 21 : Localisation des quatre estuaires (Escaut, Canche, Seine et Loire) dans lesquels les juvéniles de flets (5-10 cm) ont été prélevés.....	59
Figure 22 : Chalut à perche utilisé pour l'échantillonnage des juvéniles de flet (5-10 cm). Il possède une ouverture horizontale de 1,5 mètre, une ouverture verticale de 0,4 mètre et un maillage en trois parties d'un maillage de 5 à 10 mm.....	62
Figure 23 : Distribution des tailles de particules dans un échantillon de sédiment, déterminé avec un granulomètre Coulter Counter LS 230 : exemple du sédiment B dans le port de BL.....	66
Figure 24 : Détection du carbone et de l'azote au CHN dans un échantillon de sédiment : exemple du sédiment C du port de BL.....	67
Figure 25 : Chromatogramme en extraction d'ion du naphthalène (ion 134) obtenu après analyse en GC-MS d'un échantillon d'eau prélevé dans un bac contaminé avec du pétrole.....	69
Figure 26 : Principe de la méthode des ajouts dosés : exemple du plomb dans un échantillon de foie. L'intersection de la droite « I (intensité de l'élément dosé) = f(C : concentration de l'élément) » avec l'axe des abscisses détermine la concentration de l'élément dans l'échantillon.....	79
Figure 27 : Robot Multiprobe II utilisé pour les analyses des biomarqueurs moléculaires. Ce robot « pipetteur » permet de transférer des liquides d'un contenant vers un autre.....	80
Figure 28 : Marquage d'un juvénile de turbot à l'aide d'un implant visuel (Visual Implant Alpha Tag, 1,2 mm x 2,7 mm, Northwest Marine Technology). Le tag fluorescent est introduit sous la peau à l'aide d'une seringue injecteur.....	82
Figure 29 : Otolithe de turbot et ses stries de croissance observées après polissage manuel de l'otolithe.....	84
Figure 30 : Otolithe de bar et ses stries de croissance observées après polissage manuel de l'otolithe.....	84
Figure 31 : Droites d'étalonnage des concentrations d'ADN et d'ARN en fonction de la fluorescence émise par le bromure d'ethidium (BET), fluorophore spécifique des acides nucléiques.....	87
Figure 32 : Détermination des classes lipidiques par migration sur plaque TLC obtenues après injection d'un extrait lipidique de fragment de muscle de juvénile de turbot, <i>Scophthalmus maximus</i>	88
Figure 33 : Détermination des classes lipidiques par intégration des niveaux de gris après scannage d'une plaque TLC obtenues après injection d'un extrait lipidique de fragment de muscle de juvénile de turbot, <i>Scophthalmus maximus</i>	89
Figure 34 : Analyse histologique des branchies de bars : (A) filament branchial normal (B) Présence de sévère telangectasie (= vascularisation des vaisseaux) au niveau d'un filament branchial.....	91
Figure 35 : Total petroleum hydrocarbons (TPH) concentrations (mg.L ⁻¹) in seawater during the 96 hour exposure of sea bass to petroleum. Values are expressed as mean of both experimental replicates (mean ± SE).....	105

Figure 36 : Histopathological analysis of sea bass gills: (A) normal gill filaments (B) section of secondary lamellae of petroleum-exposed sea bass showing severe telangectasia (arrows)..... 109

Figure 37 : Comparison of specific growth rate in length (GL), in weight (GW) and recent growth (RG) (mean \pm SE), in control sea bass (CTRL) and petroleum-exposed sea bass (OIL) following 48 h and 96 h of exposure and following the 28 and 26 day period in clean seawater, respectively. (*) represents the significant difference ($p < 0.05$) compared to respective control..... 110

Figure 38 : Comparison of Fulton's K index, RNA:DNA ratio and TAG:ST ratio (mean \pm SE), in control sea bass (CTRL) and petroleum-exposed sea bass (OIL) following 48 h and 96 h of exposure. (*) represents the significant difference ($p < 0.05$) compared to respective control. 111

Figure 39 : Evolution des concentrations en hydrocarbures particuliers dans la colonne des bacs simulant une dispersion mécanique (DS) et chimique (DC) du pétrole. 120

Figure 40 : Concentrations en HAPs mesurées dans les juvéniles de bar après l'exposition de 48 h à du pétrole dispersé mécaniquement (DM) et chimiquement (DC). CTRL = control; DS = Dispersant seul. (¹) et (²) : différence significative respective par rapport à CTRL et DS ($p < 0,05$)..... 121

Figure 41 : Localisation des sites de prélèvements dans le port de Boulogne et dans la zone de rejets de dragage. 125

Figure 42 : Comparaison des activités EROD, GST et CAT des juvéniles de bar après leur exposition pendant 48 h à du sédiment contaminé..... 126

Figure 43 : Observation de nombreux amphipodes sur la cage de bars dans la station A..... 130

Figure 44 : Comparaison du nombre d'amphipodes observés dans les estomacs des juvéniles de bar et de turbot dans les stations de caging A et B..... 131

Figure 45 : Radiographie réalisée sur les juvéniles de bars mis en cage dans les stations A et B de Boulogne sur mer. La marque sur (b) signale une compression des vertèbres..... 131

Figure 46 : Radiographie réalisée sur les juvéniles de turbots mis en cage dans les stations A et B de Boulogne sur mer. 132

Figure 47 : Locations of the two caging stations in the harbour of Boulogne sur Mer, France. 136

Figure 48 : Relationship between fish TL (mm) and the sagittal otolith diameter (mm) in sea bass (A) and turbot (B). Regression model: Sea bass: diameter = $0.97 + 0.029$ (TL), $R^2 = 0.75$, $p < 0.001$; Turbot: diameter = $0.39 + 0.017$ (TL); $R^2 = 0.63$, $p < 0.001$ 140

Figure 49 : Distribution (%) of metals in the two sedimentary fractions (\square bioavailable; \blacksquare not bioavailable) for the three caging stations (A, B and C). 145

Figure 50 : PCA based on biological parameters (specific growth rate in length (GL) and weight (GW), recent growth (RG), Fulton's condition Index (K), RNA:DNA and TAG:ST ratios) of juvenile sea bass (\square) and turbot (\bullet) in relation with chemical contamination (metals and total PAHs) measured at caging stations A and B..... 148

Figure 51 : Locations of the two caging stations at the harbour of Boulogne sur Mer, France. 162

Figure 52 : Mean (\pm SD) sediment metal concentrations (mg.kg^{-1} dry weight) in the two caging stations (\square A and \blacksquare B). * Concentration that exceeds the ERL (effects range-low) defined by Long et al. (1995). 167

Figure 53 : Differences in Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), Glutathione S-transferase (GST) and Catalase (CAT) activities of juvenile sea bass and turbot caged in station A and B (□ t₀ : reference). Data represent mean (± SD) biochemical biomarkers activities and for each species, (1) represent significant difference (p<0.05) compared to “t₀” and (2) compared to “station A”. Sea bass : n = 15 (t₀), n = 14 (A), n = 18 (B); Turbot : n = 15 (t₀), n = 10 (A), n = 14 (B)..... 170

Figure 54 : PCA based on biomarker responses (Ethoxyresorufin-O-deethylase -EROD-, Glutathione S-transferase -GST- and Catalase -CAT-) of juvenile sea bass (□) and turbot (●) in relation with physiological biomarkers (specific growth rate in length -GL- and weight -GW-, recent growth -RG-, Fulton’s condition index -K-, RNA:DNA and Triacylglycerol on sterol -TAG:ST- ratios) and chemical contamination (metals and total PAHs) measured in caging station A and B..... 171

Figure 55 : Locations of the three sediment sampling sites (Reference, the Seine estuary and harbour of Boulogne sur Mer) and the three stations in the harbour (A, B and C). 185

Figure 56 : Differences in relative PAH metabolites in bile from turbot exposed to the five sediments (Ref, Seine, A, B and C) during 7 () and 21 () days. Data represent mean (± SE) relative PAH metabolites fluorescence in bile. n=10. (0), (1), (2), (3), (4), (5) represent significant difference (p < 0.05) compared to “t₀”, Seine, A, B and C respectively. 195

Figure 57 : Differences in the specific growth rate in weight (GW), length (GL) and the recent otolith growth (RG: obtained by the last five otolith increments) of juvenile turbot exposed to the five sediments (Ref, Seine, A, B and C) after 7 () and 21 () days (mean ± SE). n=15. (0), (1), (2), (3), (4), (5), (6) represent significant difference (p < 0.05) compared to “t₀”, Seine, A, B, C and starved fish, respectively..... 196

Figure 58 : Differences in the Fulton’s K condition index, the RNA:DNA ratio and the lipid index (TAG:ST ratio) from turbot exposed to the five sediments (Ref, Seine, A, B and C) during 7 () and 21 () days (mean ± SE). n=15. (0), (1), (2), (3), (4), (5), (6) represent significant difference (p < 0.05) compared to “t₀”, Seine, A, B, C and starved fish, respectively..... 197

Figure 59 : PCA based on physiological biomarkers (specific growth rate in length (GL) and weight (GW), recent otolith growth (RG), Fulton’s condition Index (K), RNA:DNA and TAG:ST ratios) of turbot exposed to the five sediments (Ref, Seine, A, B and C) after 21 days in relation to sediment chemical contamination (metals and total PAHs). 200

Figure 60 : Locations of the three sediment sampling sites (Reference, the Seine estuary and harbour of Boulogne sur Mer) and the three stations in the harbour (A, B and C). 155

Figure 61 : Metal concentrations (mg.kg-1 dry weight) in the five sediments (Ref, Seine, A, B and C) 155

Figure 62 : Differences in Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), Glutathione S-transferase (GST) and Catalase (CAT) activities of turbot exposed to the five sediments (Ref, Seine, A, B and C) during 7 () and 21 () days. n = 15. (0), (1), (2), (3), (4), (5), (6) represent significant difference (p < 0.05) compared to “t₀”, Seine, A, B, C and starved fish, respectively..... 155

Figure 63 : Differences in plasmatic levels of TGF-b1 (ng.ml⁻¹) of turbot exposed to the five sediments (Ref, Seine, A, B and C) during 7 () and 21 () days. n= 3. (0), (1), (2), (3), (4), (5), (6) represent significant difference (p < 0.05) compared to “t₀”, Seine, A, B, C and starved fish, respectively..... 155

Figure 64 : Differences in relative abundance of melanomacrophage centers (MMC) and dark-brown aggregates of turbot exposed to the five sediments (Ref, Seine, A, B and C) during 21 days. n=8. (0), (1), (2), (3), (4), (5), (6) represent significant difference (p < 0.05) compared to “t₀”, Seine, A, B, C and starved fish, respectively. 155

Figure 65 : Location of the four estuaries (Scheldt, Canche, Seine and Loire). The rectangular area represente the fish sampled area.....	155
Figure 66 : Weight-Length relationships of flounders sampled in the four estuaries (Scheldt, Canche, Seine and Loire). n=137 for Scheldt, n=277 for Canche, n=255 for Seine and n=210 for Loire.....	155
Figure 67 : Comparison of Fulton's K condition index for five size group of flounders sampled in the four estuaries. n=30. (1), (2), (3), (4) represent significant difference (p < 0.05) compared to Scheldt, Canche, Seine and Loire respectively.	155
Figure 68 : Comparison of (a) lipid contents and (b) TAG:ST ratios of flounders sampled in the four estuaries. n=10. (1), (2), (3), (4) represent significant difference (p < 0.05) compared to Scheldt, Canche, Seine and Loire respectively.	155
Figure 69 : Comparaison de la régularité des stries de croissance entre un otolithe de (a) un flet de 4 cm et celui de (b) un flet de 7 cm.....	155
Figure 70: Evolution des coefficients de variation de l'EROD, la GST et la CAT au cours des trois expériences correspondantes : 1) exposition de juvéniles de bar, <i>Dicentrarchus labrax</i> , à du pétrole, 2) mise en cage de juvénile de bar et de turbot, <i>Scophthalmus maximus</i> , dans le port de Boulogne sur mer et 3) exposition de juvéniles de turbot à des sédiments contaminés.....	155
Figure 71 : Ecart de réponses (%) des biomarqueurs moléculaires mesurés chez des juvéniles de bar et de turbot exposés à du sédiment issu de la Seine par rapport à la condition de référence.	155
Figure 72 : Evolution des coefficients de variation de la croissance récente (RG), de l'indice de condition de Fulton (K) et des ratio ARN :ADN et TAG :ST au cours des quatre études : 1) exposition de juvéniles de bar, <i>Dicentrarchus labrax</i> , à du pétrole, 2) mise en cage de juvénile de bar et de turbot, <i>Scophthalmus maximus</i> , dans le port de Boulogne sur mer, 3) exposition de juvéniles de turbot à des sédiments contaminés et 4) prélèvement de flets, <i>Platichthys flesus</i> , dans trois estuaires français et un estuaire belge.....	155
Figure 73 : Ecart de réponses (%) des biomarqueurs physiologiques mesurés chez des juvéniles de bar et de turbot exposé à du sédiment issu de la Seine par rapport à la condition de référence.	155

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Résumé des quatre études réalisées au cours de ce travail de thèse.....	63
Tableau 2 : Synthèse des différentes analyses réalisées au cours des quatre études : 1) exposition de juvéniles de bar, <i>Dicentrarchus labrax</i> , à du pétrole, 2) mise en cage de juvénile de bar et de turbot, <i>Scophthalmus maximus</i> , dans le port de Boulogne sur mer, 3) exposition de juvéniles de turbot à des sédiments contaminés et 4) prélèvement de flets, <i>Platichthys flesus</i> , dans trois estuaires français et un estuaire belge.....	64
Tableau 3 : Comparaison des valeurs certifiées (Cert) et mesurées (Mes) des sédiments de référence HISS-1, MESS-3 et PAC-2 ainsi que IAEA-405 pour l'analyse de mercure.....	71
Tableau 4 : Comparaison des valeurs certifiées (Cert) et mesurées (Mes) des matériaux de référence DORM-3 et DOLT-4. ¹ détection par absorption atomique à 263,65 nm; * à titre d'indication mais valeurs non certifiées.....	77
Tableau 5 : Paramètres de forme des otolithes mesurés au cours de ce travail de thèse et indices d'asymétrie calculés sur les juvéniles de flet, <i>Platichthys flesus</i> , prélevés dans les quatre estuaires (Mérigot <i>et al.</i> , 2007; Panfili <i>et al.</i> , 2005).....	85
Tableau 6 : Grille de description des principales pathologies surveillées, utilisée lors de l'observation des juvéniles de poissons à la fin de chaque expérience.	90
Tableau 7 : Concentrations of 19 PAHs (alkylated and parents): the 16 US-EPA PAHs and 3 sulfur containing heterocyclic compounds (ng.L ⁻¹) in seawater at the beginning (T= 0 h), at T = 48 h and at T = 96 h in CTRL (control) and OIL (petroleum exposure). Values are expressed as the mean of both experimental replicates (mean ± SE). n.d.: not detected	106
Tableau 8 : PAHs body burdens (ng.g ⁻¹ dry wt) in muscles of control sea bass (CTRL) and petroleum-exposed sea bass (OIL) following 48 h and 96 h of exposure. (*) represents the significant difference (p < 0.05) compared to the respective control. n.d. : not detected	107
Tableau 9 : Differences in Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD, pmol.min ⁻¹ .mg prot ⁻¹), Glutathione S-transferase (GST, μmol.min ⁻¹ .mg prot ⁻¹) and Catalase (CAT, μmol.min ⁻¹ .mg prot ⁻¹) measured on control sea bass gill (CTRL) and petroleum-exposed sea bass (OIL) following 48 h and 96 h of exposure (a.), and following 26 and 28 days of decontamination respectively (b.). (*) represents the significant difference (p < 0.05) compared to the respective control.....	108
Tableau 10 : Teneurs en HAPs dissous (ng.L ⁻¹) analysés au moment de l'entrée des juvéniles de bar dans les bacs d'exposition : Control (CTRL), dispersant seul (DS), dispersion mécanique (DM) et chimique (DC).....	120
Tableau 11 : Comparaison des activités EROD, GST et CAT des juvéniles de bar après 48 h d'exposition à du pétrole dispersé mécaniquement et chimiquement. ⁽¹⁾ et ⁽²⁾ : différences significative respective par rapport à CTRL et DS (p<0,05).	121
Tableau 12 : Comparaison de la croissance en poids (GW, %.jrs ⁻¹) et en taille (GL, %.jrs ⁻¹), de la croissance récente (RG), de l'indice de condition (K), du ratio ARN/ADN et de l'indice lipidique (TAG/ST) des juvéniles de bar exposés pendant 48 h à du pétrole dispersé mécaniquement et chimiquement puis mis en eau claire pendant 28 jours. ⁽¹⁾ et ⁽²⁾ : différence significative respective par rapport à CTRL et DS (p<0,05).....	122
Tableau 13 : Teneurs en métaux et en HAPs (mg.kg ⁻¹) totaux dans les 9 sédiments utilisés pour l'exposition des juvéniles de bar.	126

Tableau 14 : Comparaison des taux de croissance en poids ($GW\%.jrs^{-1}$) et en longueur (GL, $\%.jrs^{-1}$), de l'indice de condition de Fulton (K) et du ratio ARN/ADN des juvéniles de bar, 23 jours après leur exposition de 48 h à du sédiment contaminé..... 127

Tableau 15 : Mean (\pm SD) values of abiotic and biotic parameters recorded at the three caging stations (A, B and C). TOM, TOC, TON: Total Organic Matter, Carbon or Nitrogen concentrations..... 125

Tableau 16 : Mean (\pm SD) sediment metal, PAHs and PCBs concentrations ($mg.kg^{-1}$ dry weight) at the three caging stations (A, B and C). ERL and ERM guidelines values defined by Long et al. (1995) are also presented. ⁽¹⁾, ⁽²⁾ Concentration that exceeds the ERL and ERM respectively 125

Tableau 17 : Metals enrichment level for the three caging stations among the following classification: 0 = no one ($EF < 1$), 1 = minor ($1 < EF < 3$), 2 = moderate ($3 < EF < 5$), 3 = moderately severe ($5 < EF < 10$), 4 = severe ($10 < EF < 25$), 5 = very severe ($25 < EF < 50$), and 6 = extremely severe ($EF > 50$)..... 126

Tableau 18 : Mean (\pm SD) metal concentrations ($mg.kg^{-1}$ dry weight) in gills of sea bass and turbot caged at stations A and B (t_0 : reference status). For each species, ⁽¹⁾ and ⁽²⁾ represent the significant difference ($p < 0.05$) compared to “ t_0 ” and “station A”, respectively 127

Tableau 19 : Comparison of specific growth rate in length (GL) and in weight (GW), recent growth (RG), Fulton's K index, RNA:DNA ratio and TAG:ST ratio (mean \pm SD) for sea bass and turbot juvenile caged at stations A and B (t_0 : reference). For each species, ⁽¹⁾ and ⁽²⁾ represent the significant difference ($p < 0.05$) compared to “ t_0 ” and “station A” respectively..... 127

Tableau 20 : Pearson's correlation between growth indices (specific growth rate in length (GL) and weight (GW) and recent growth (RG)) and condition indices (Fulton's condition Index (K), RNA:DNA and TAG:ST ratios) measured in juvenile sea bass (a) and turbot (b) caged at stations A and B. Significant correlation for $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$ and $p^{***} < 0.001$ 128

Tableau 21: Mean (\pm SD) PAH and PCB concentrations ($mg.kg^{-1}$ dry weight) in sediment from the two caging stations (A and B). 137

Tableau 22 : Pearson's correlations between biochemical biomarker responses (Ethoxyresorufin-O-deethylase -EROD-, Glutathione S-transferase -GST- and Catalase -CAT) of juvenile sea bass (\square) and turbot (\bullet) in relation with physiological biomarkers (specific growth rate in length -GL- and weight -GW-, recent growth -RG-, Fulton's condition index -K-, RNA:DNA and Triacylglycerol on sterol -TAG:ST- ratios) measured in juvenile sea bass (a) and turbot (b) caged in stations A and B. Significant correlation for $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$ and $p^{***} < 0.001$. Sea bass : $n = 32$; Turbot : $n = 24$ 139

Tableau 23 :Mean (\pm SD) abiotic parameters, sediment metal, PAHs and PCBs concentrations ($mg.kg^{-1}$ dry weight) in the five sediments (Ref, Seine, A, B and C). TOM, TOC, TON: Total Organic Matter, Carbon or Nitrogen concentrations. ERL and ERM guidelines values defined by Long et al. (1995) are also presented. ⁽¹⁾ Concentration that exceeds the ERL..... 150

Tableau 24 : Percentage (%) of metals potentially reactive towards biota and Enrichment Factor (EF) values for the five sediments (Ref, Seine, A, B and C)..... 150

Tableau 25 : Mean (\pm SD) metal concentrations ($mg.kg^{-1}$ dry weight) in gills of turbot exposed to the five sediments (Ref, Seine, A, B and C) during 7 days (a.) and 21 days (b.) (t_0 : reference status). $n=3$. ⁽⁰⁾, ⁽¹⁾, ⁽²⁾, ⁽³⁾, ⁽⁴⁾, ⁽⁵⁾ represent significant difference ($p < 0.05$) compared to “ t_0 ”, Seine, A, B and C respectively..... 151

Tableau 26 :Comparison of specific growth rate in length (GL) and in weight (GW), Fulton's K index, RNA:DNA ratio and TAG:ST ratio (mean \pm SE) for turbot starved at t_2 , t_7 , t_{10} and t_{21} . Reference turbot

values are also presented at t_0 , t_7 and t_{21} . $n=12$. (⁰) and (¹) represent significant difference ($p < 0.05$) compared to “ t_0 ” and “reference” respectively..... 152

Tableau 27 : Pearson’s correlation between growth indices (specific growth rate in length (GL) and weight (GW) and recent growth (RG)) and condition indices (Fulton’s condition Index (K), RNA:DNA and TAG:ST ratios) measured in turbot exposed to the five sediments (Ref, Seine, A, B and C). $n=75$. Significant correlation for $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$ and $p^{***} < 0.001$ 153

Tableau 28 : Relationships (correlation coefficients) between molecular, immunological and physiological biomarkers and the levels of metal and PAH concentrations in sediment ($n=75$ for molecular and physiological biomarkers, $n=15$ for TGF-b1 and $n=40$ for MMC and aggregates -Agg). Significant correlation for $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$ and $p^{***} < 0.001$ 155

Tableau 29 : Relationships (correlation coefficients) between molecular, immunological and physiological biomarkers measured after 7 (a.) and 21 days (b.) of exposure ($n=75$ for physiological and molecular biomarkers, $n=15$ for TGF-b1 and $n=40$ for MMC). Significant correlation for $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$ and $p^{***} < 0.001$ 155

Tableau 30 : Mean (\pm SD) abiotic parameters, sediment metal and PAHs concentrations (mg.kg^{-1} dry weight) in the four estuaries (Scheldt, Canche, Seine and Loire). ERL and ERM guidelines values defined by Long *et al.* (1995) are also presented. (¹) Concentration that exceeds the ERL..... 155

Tableau 31 : Percentage (%) of metals potentially reactive towards biota and Enrichment Factor (EF) values for the four estuaries (Scheldt, Canche, Seine and Loire). 155

Tableau 32 : Mean (\pm SD) metal concentrations (mg.kg^{-1} dry weight) in liver and gills of flounders sampled in the four estuaries (Scheldt, Canche, Seine and Loire). $n=5$. (¹), (²), (³), (⁴) represent significant difference ($p < 0.05$) compared to Scheldt, Canche, Seine and Loire respectively. 155

Tableau 33 : Pearson’s correlation between metal concentrations analysed in the total and reactive fractions of sediments from the four estuaries (Scheldt, Canche, Seine and Loire) and the metal content in flounder liver and gills. $n=20$. Significant correlation for $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$ and $p^{***} < 0.001$ 155

Tableau 34 : Comparison of left (L) and right (R) otolith measurements normalized with fish length (weight, area, length, width and perimeter) and fluctuation of asymmetry for each parameter between the four estuaries. $n=30$. (²), represent significant difference ($p < 0.05$) compared to Canche. 155

Tableau 35 : Résumé des réponses des biomarqueurs utilisés dans les quatre études : 1) exposition de juvéniles de bar, *Dicentrarchus labrax*, à du pétrole, 2) mise en cage de juvénile de bar et de turbot, *Scophthalmus maximus*, dans le port de Boulogne sur mer, 3) exposition de juvéniles de turbot à des sédiments contaminés et 4) prélèvement de filets, *Platichthys flesus*, dans trois estuaires français et un estuaire belge. Une flèche haute représente une augmentation significative correspondant approximativement à plus de une fois (\uparrow), deux fois ($\uparrow\uparrow$) et trois fois ($\uparrow\uparrow\uparrow$) la valeur de référence. De même, une flèche basse (\downarrow) représente une diminution significative par rapport à la référence. 155

Annexes

Annexe 1 : Poster 1



15th International Symposium on Pollution Responses in Marine Organisms PRIMO15, 17-20 May 2009, Bordeaux, France



INERIS

Study of the correlation between biomarkers responses and physiological performance of juveniles sea bass, *Dicentrarchus labrax*, exposed to contaminated sediments

Kerambrun E.¹, I. Filipuci¹, W. Sanchez², F. Henry¹, V. Lahaye¹, J.M. Porcher², L. Courcot¹ and R. Amara¹

¹Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences LOG UMR 8187 Université du Littoral Côte d'Opale, avenue Foch, 62930 Wimereux, France

²Unité d'écotoxicologie in vitro et in vivo, INERIS, BP 2, F-60550 Verneuil en Halatte, France



Introduction: The multiple anthropogenic activities that take place in harbors contribute to the release of chemical contaminants in this coastal zone. Dredging activities, which involve removing and relocating of contaminated sediments, could lead to an environmental impact that can damage the organism's health (Jiménez-Tenorio *et al.*, 2007). Particularly, this pollution could be a threat to fish recruitment population by its effect on early life stages which are more sensitive to chemical contamination (Amara *et al.*, 2007). In order to determine biological effects induced by the potential toxicity of dredged material, bioassays could be a good tool of monitoring. However, it is of great importance that sublethal measurements consider a multifaceted approach to predict high-level consequences of toxicant exposure. The main objective of this study is to assess and compare the response of a multi-biomarker approach with physiological indices measured on juveniles sea bass, *Dicentrarchus labrax*, exposed to contaminated sediments.

Materials and Methods :

Sediments

Sediments were collected in six sites in the harbor of Boulogne-sur-Mer and two in its dredged material disposal site. Sediment was also sampled in an area considered to be out of the influence of the harbor's activities (ctrl sed).

Fig 1 : location of the sample sites

Exposure

- Juveniles sea bass, *Dicentrarchus labrax*, (2.16-g ± 0.61 and 59.7-mm ± 4.6) marked (VI Alpha tags)
- Exposure during 2-days laboratory assay.
- Growth in clean sea water during 23-days

N = 12 ; in duplicate
Control without sediment

Short term responses

BIOMARKERS

- EROD - GST - Catalase

Long term responses

PHYSIOLOGICAL INDICES

- Growth - Condition indice - Biochemical indices

Results and Discussion

Biomarkers

Fig. 2 : Comparison of hepatic EROD (I), GST (II) and Catalase activities (III).
a, i (1...4) : significant difference with control (ctrl) and site i.

Correlation

Fig. 4 : Correlation between biomarkers and relative growth.

Morphometric indices

Fig. 3 : Comparison of relative growth in length (I), in weight (II) and relative evolution of Fulton's K-Factor indices (III).
a, b, i (1..7) : significant difference with control (ctrl), control sediment (ctrl sed) and site i.

- GST and Catalase activities don't seem to be different in presence of contaminated sediments (Fig 2).

- EROD activities were different between levels of contamination with no detection for the control. In particular, site 5 showed high activities compared to the lowest contaminated sites (Fig 2.I). Surprisingly, EROD activities in control sediment was quite high.

- There was no correlation between biomarkers.

- Growth of juveniles sea bass do not seem to be altered by contaminated sediments with the exception of sites 4 and 6 (Fig 3.I,II).

- Condition indices tend to increase for the lowest contaminated sediments but decrease after exposure with the highest (Fig 3. III). This trend is significant for site 6 and 8.

- Low responses of parameters lead to an incertitude about the links between short and long term responses, however there was a significant correlation between GST activities and relative growth in length (Fig 4).

- Others measurements of physiological performance, i.e. ratio ARN:ADN and lipid condition indices, are in progress.

⇒ Low responses of studied parameters suggest that a 2-days exposure would not be sufficient. A longer time of exposure will be appropriated.

Amara *et al.*, 2007. Growth and condition indices in juvenile sole *Solea solea* measured to assess the quality of essential fish habitat. Mar Ecol Prog Ser. 35, 201-208.

Jiménez-Tenorio *et al.*, 2007. Determining sediment quality for regulatory proposes using fish chronic bioassays. Envir Internat. 33, 474-481.

Annexe 2 : Poster 2



47th Estuarine & Coastal Sciences ECSA 47, 14-19 September 2009, Figueira Da Foz, Portugal

Effects of contaminated sediments on physiological performance in juvenile turbot *Psetta maxima*.

Perrichon P.^{1,2,3}, Kerambrun E.^{1,2,3}, Henry F.^{1,2,3}, Sanchez W.⁴ and Amara R.^{1,2,3}

¹ Univ Lille Nord de France ; ² ULCO, LOG, F-62930 Wimereux, France ; ³ CNRS, UMR 8187, F-62930 Wimereux, France ; ⁴ Unité d'écotoxicologie in vitro et in vivo, INERIS, BP 2, F-60550 Verneuil en Halatte, France



Introduction :

Marine and coastal areas are constantly subjected to the introduction of natural and anthropogenic pollutants, which are mostly adsorbed by suspended particles and subsequently accumulated in the sediments. The presence of organic and inorganic pollutants could represent a threat to these areas which represent some essential function for the good realisation of the fish life cycle (Pihl *et al.*, 2005). Particularly, during the juvenile period, fish use for temporary time the shallows coastal areas, which play the role of nursery for several month and let the optimisation of juveniles physiological performances. However, due to pollution, poor growth and nutritional status of juveniles may weaken overall conditions, potentially making these individuals more vulnerable to predation, physiological stress and disease (Amara, 2009). The main objective of this study is to determine the sublethal responses of juvenile turbot (*Psetta maxima*) exposed to contaminated sediments using bio-indicators.

Materials and Methods :

Sediments

Sediments were collected in five sites :

- 3 in a northern France Harbor
 - Station A** Heavy metals and PAHs contaminants
 - Station B**
 - Station C**
- 1 in the heavily polluted Seine estuary
- 1 in a reference site

=> Metals analysis (ICP-AES)

Exposure

Juveniles turbot, *Psetta maxima*, (75.16 mm ± 3.25 ; 6.83 g ± 0.72) were individually marked and exposed during a 7 and 21-days laboratory assay in duplicate using 37-L glass tank with 5-L of collected sediments and 20-L of sea water.. n=15

7 and 21 days exposure

Analysis

- Growth rate in length and in weight
- Fullton's K condition index
- Otolith microstructure analysis : Recent growth measurement
- RNA:DNA ratio
- Lipid index : TAG:ST ratio

A Kruskal Wallis test to non normal data was applied to analyse the differences between samples, p<0.05.

Results and Discussion :

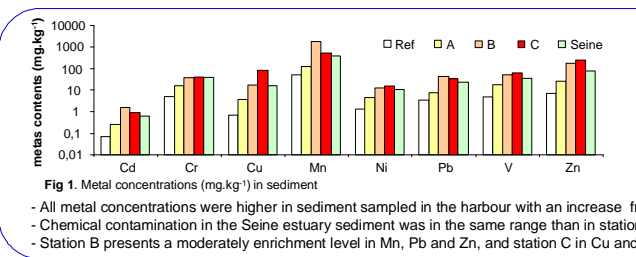
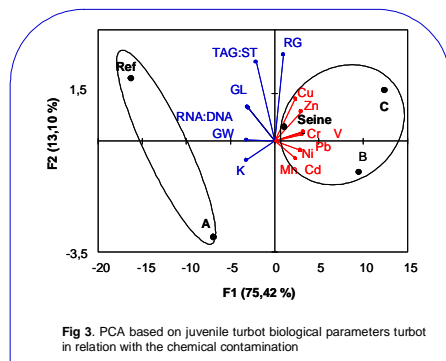
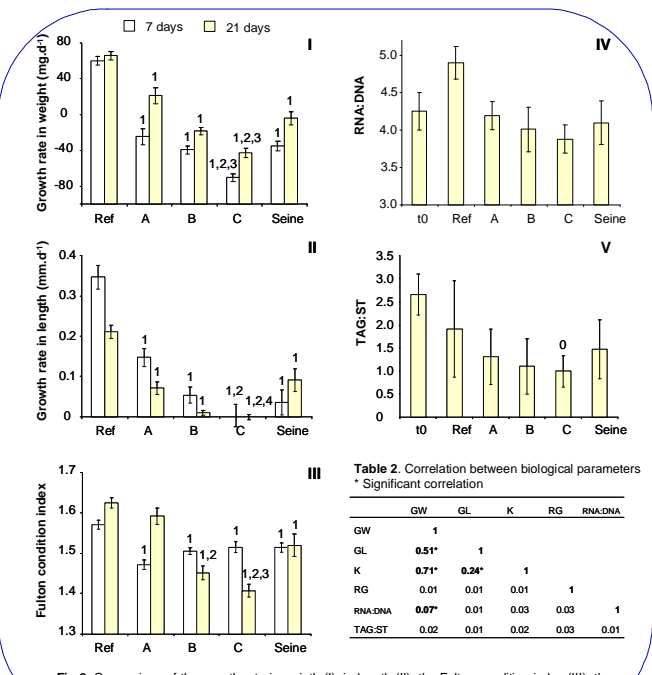


Table 1. Metal enrichment levels for the three caging sites among the following classification: 0 = no one (EF<1), 1 = minor (1<EF<3), 2 = moderate (3<EF<5), 3 = moderately severe (5<EF<10), 4 = severe (10<EF<25), 5 = very severe (25<EF<50), and 6 = extremely severe (EF>50).

	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	V	Zn	Fe
Ref	0	1	0	0	0	1	0	0	0
A	4	1	0	1	1	1	1	1	1
B	5	1	1	3	1	3	1	3	1
C	4	1	3	1	2	1	3	1	1
Seine	4	2	1	1	1	2	1	2	1



Conclusion

These results suggest a decrease of physiological performance of juvenile turbot with the increase of metal contamination in sediment (Fig 3). The physiological indices measured in this study may provide a useful tool to assess fish health and habitat quality. The low growth and lipid-storage limitation could dramatically decrease winter survival of the juveniles living in contaminated sites.

Acknowledgments.

We would like to thank Michel Lareal and Vincent Cornille for their help during experimental work. This study was financed by post grenelle programme 189 DEVIL and the Franco-British INTERREG IVA European Programme, DIESE.

Pihl, J., Modin, J., Wennhage, H., 2005. Relating plaice (*Pleuronectes platessa*) recruitment to deteriorating habitat quality: effects of macroalgal blooms in coastal nursery grounds. *Can J Fish Aquat Sci* 62, 1184-1193.
 Amara, R., Sellslagh, J., Bilton, G., Miner, C., 2009. Growth and condition of 0-group European flounder, *Platichthys flesus* as indicator of estuarine habitat quality. *Hydrobiologia* 627, 87-98.

Contact : elodie.kerambrun@univ-littoral.fr

Abstract

Evaluation of pollutant effects in environment is one of the major issues of the European Water Framework Directive 2000. Regulations have particularly the objective to reach to a good chemical and ecological status of water bodies. In this context, the aim of our study was to develop a multibiomarker approach on juvenile marine fish in order to evaluate the biological effects of chemical pollution in coastal areas. Molecular detoxification parameters (EROD, GST) and an antioxidant enzyme (CAT) were used as early warning tools of toxicity allowing the prevention of irreversible damages. In parallel, different physiological biomarkers (somatic and recent growth, RNA:DNA ratio, morphometric and lipidic indices) were analysed as reflecting damages on juveniles health. Sensitivity and relevance of molecular and physiological biomarkers were tested experimentally on juvenile : i) sea bass exposed to acute petroleum pollution, ii) sea bass and turbot submitted to a mix of contaminants in environmental concentrations during controlled and semi-controlled (caging) conditions.

Our results show the ability of EROD, and in lower degree the GST, to detect short exposure (2 and 4 days) of organisms to petroleum and to reflect their deleterious effects on fish health. This relationship between molecular and physiological biomarkers was more difficultly established under multiple pollutions. Growth and condition indices were found to be more sensitive to the different levels of chemical contamination analysed (metal, PAHs). Their analyses allowed us to evaluate the weakened condition of organisms caged in the harbour area during 38 days. This caging experiment was relevant especially for juvenile sea bass in which no physiological stress was detected in the reference station. Deleterious effects of chemical contaminant on turbot juvenile health were also observed in controlled condition after 21 days exposure to the same harbour sediments and to an estuarine sediment.

In complement to these experiments, a field study was realized on juvenile flounders sampled in some estuaries along the French and Belgium coast. A decrease of morphometric and lipidic indices were found in juvenile flounders from the three anthropogenic estuaries showing the highest metal bioconcentrations compared to the reference estuary. Results from these different studies showed the potentiality of growth and condition indices to reflect biological effects of chemical contaminants on juvenile marine fish. However, their use could be limited by their lower specificity to pollutant than parameters involved in detoxification. These works show therefore the need to use biomarkers at different level of biological organization in biomonitoring programs.

Keywords : ecotoxicology, juvenile fish, metal, PAHs, caging, EROD, GST, growth, condition, lipidic index

Résumé

L'évaluation de l'impact des polluants dans l'environnement est une des préoccupations majeures qui s'inscrit dans la Directive Européenne Cadre Eau 2000. Les réglementations préconisées ont notamment pour objectif de parvenir au bon état chimique et écologique des masses d'eau. Dans ce contexte, notre étude a consisté à développer une approche multibiomarqueur sur des juvéniles de poisson afin d'évaluer les effets biologiques de la pollution chimique en milieu littoral. Des paramètres moléculaires de détoxification (EROD, GST) et une enzyme antioxydante (CAT) ont été utilisés en tant que « système d'alarme » susceptibles de détecter une perturbation avant l'apparition de signes pathologiques irréversibles. En parallèle, différents biomarqueurs physiologiques (croissance somatique et récente, rapport ARN/ADN, indices morphométrique et lipidique) ont été analysés en considérant que ceux-ci pourraient révéler les dommages induit par les polluants sur l'état de santé des juvéniles. La sensibilité et la pertinence des biomarqueurs moléculaires et physiologiques ont été testés expérimentalement sur des juvéniles : i) de bar exposés à une pollution aigüe de pétrole, ii) de bar et de turbot soumis à des mélanges de contaminants en concentrations environnementales en conditions contrôlée et semi contrôlée (« caging »).

Nos résultats montrent la capacité de l'EROD, et à un degré moindre de la GST, à détecter une exposition courte (2 et 4 jours) des organismes au pétrole et à refléter ses effets délétères sur leur état de santé. Cette relation entre biomarqueurs moléculaires et physiologiques a par contre été plus difficilement établie dans un contexte de pollution multiple. Les indices de croissance et de condition utilisés se sont avérés plus sensibles aux différents niveaux de contamination analysés (métaux et HAPs). Leur utilisation a permis d'évaluer la condition affaiblie des organismes mis en cage en milieu portuaire pendant 38 jours. Cette expérience de « caging » s'est révélée concluante, notamment pour les juvéniles de bar, sur lesquels aucun stress physiologique de la mise en cage n'a été détecté dans la station de référence. Les effets délétères des contaminants chimiques sur l'état de santé des juvéniles de turbot ont également été observés en condition contrôlée après exposition de 21 jours aux mêmes sédiments portuaires et à un sédiment estuarien.

En complément de ces expériences, une étude de terrain a été réalisée sur des juvéniles de flet prélevés dans des estuaires le long de la côte française et belge. Une diminution des indices morphométrique et lipidique des juvéniles de flet, issu des trois estuaires anthropisés, a été observée en relation avec des bioconcentrations en métaux plus élevées que l'estuaire de référence. Les résultats issus de ces différentes études montrent la potentialité des indices de croissance et de condition à révéler les effets biologiques des contaminants chimiques sur les juvéniles de poissons marins. Cependant, leur spécificité vis à vis des polluants étant plus faible que les paramètres de détoxification, leur utilisation peut être limitée. Ces travaux montrent ainsi le besoin d'utiliser des biomarqueurs à différents niveaux d'organisation biologique dans les programmes de biosurveillance.

Mots clés : écotoxicologie, juvéniles de poisson, métaux, HAPs, caging, EROD, GST, croissance, condition, indice lipidique