

# Le sédiment en Seine : une matrice particulièrement adaptée pour caractériser le potentiel toxique de la contamination du milieu par la méthode EDA (Effect Directed-Analysis)

Christelle Clérandeau<sup>1</sup>, Laure Landi<sup>1</sup>, Maya Bimbot<sup>2</sup>, Yves Lévi<sup>2</sup>, Lucie Ozio<sup>2</sup>, Jérôme Cachot<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Bordeaux, UMR EPOC 5805, avenue des Facultés 33405 Talence Cedex

<sup>2</sup> Université Paris-Sud 11, UMR 8079 - Ecologie Systématique Evolution – AgroParistech, Faculté de Pharmacie, 5 rue J.B. Clément 92296 Châtenay-Malabry cedex, France

\* [j.cachot@epoc.u-bordeaux1.fr](mailto:j.cachot@epoc.u-bordeaux1.fr)

## 1 Contexte et objectifs

Au cours des études menées en 2011 et 2012, nous avons mis en évidence une forte embryotoxicité associée à un potentiel perturbateur endocrinien élevé du compartiment sédimentaire en aval de l'agglomération parisienne et plus particulièrement au niveau du site de Triel. L'origine de ces effets n'est pas connue à ce jour.

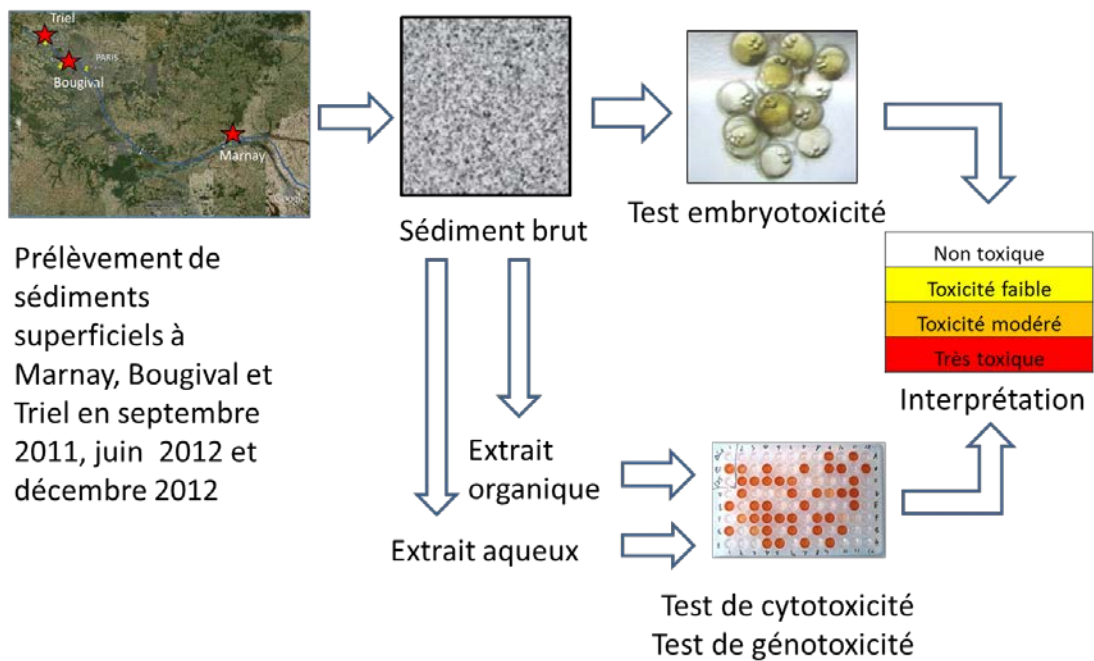
Il a été proposé en 2013 de caractériser plus complètement la toxicité du compartiment sédimentaire en prenant en compte au-delà des seuls effets embryotoxiques mesurés précédemment les effets génotoxiques et les effets comportementaux sur un poisson modèle, le médaka japonais *Oryzias latipes*. Ces analyses ont pour objectif d'établir un tableau de bord plus complet de la toxicité du compartiment sédimentaire en Seine.

Nous avons également proposé de tester la toxicité de ces mêmes sédiments à l'aide de deux tests *in vitro* de toxicité, le test Microtox® qui permet de mesurer le potentiel cytotoxique et le SOS Chromotest qui permet de mesurer le potentiel génotoxique d'un échantillon. Ces deux tests doivent être appliqués sur extraits aqueux (élutriat) et extraits organiques (hexane/acétone) de ces mêmes sédiments afin de mesurer la toxicité de la fraction bio-disponible (extrait aqueux) et de la fraction organique totale (extrait organique). L'objectif à terme est de pouvoir disposer d'outils et protocoles fiables pour identifier les substances toxiques présentes dans le compartiment sédimentaire par une approche EDA (*Effect-directed Analysis*) ou TIE (*Toxicity Identification Evaluation*). Il s'agit d'une analyse dirigée par les bioessais qui consiste à réduire la complexité d'extraits organiques par fractionnement analytique afin d'identifier par fractionnement progressif des composés clés dans les fractions biologiquement actives.

## 2 Matériel et Méthodes

### 2.1 Stratégie expérimentale

Les sédiments analysés au cours de la présente étude ont été collectés à Marnay, Bougival et Triel au cours de trois campagnes en Seine en septembre 2011, juillet et décembre 2012. La toxicité de ces sédiments a été évaluée au moyen de deux tests bactériens de génotoxicité (SOS Chromotest) et de cytotoxicité (Microtox®) à partir d'extraits organiques et aqueux. Les effets comportementaux et génotoxiques ont été caractérisés sur embryons de médaka, *Oryzias latipes* exposés aux sédiments bruts fraîchement décongelés (Figure 1). Une grille de cotation à 4 niveaux (de non toxique à très toxique) permet de hiérarchiser les dangers selon les sites et la saison de prélèvement.



*Figure 1 : Stratégie expérimentale mise en œuvre pour l'analyse de la toxicité des sédiments de Seine*

## 2.2 Extraits aqueux

Ces extraits n'ont pas encore été préparés ni analysés. Ces extractions et analyses sont prévues au cours du premier semestre 2014.

## 2.3 Extraits organiques

Les extraits organiques ont été préparés au LSPE (UMR 8079, UP11) selon le protocole décrit dans la figure 2. Les mêmes extraits ont ensuite été testés avec le SOS Chromotest et le test Microtox®.

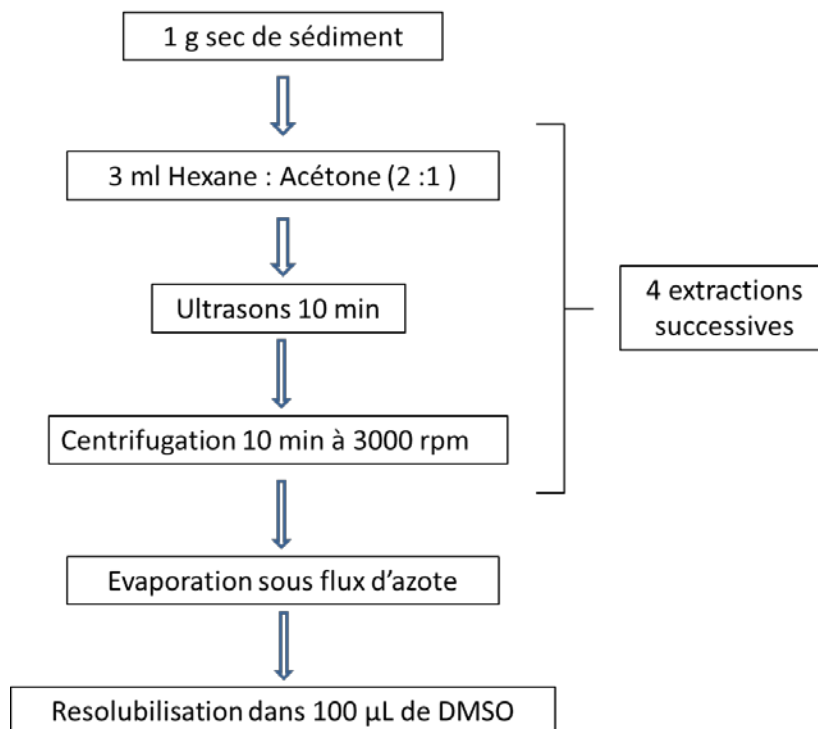


Figure 2 : Protocole de préparation des extraits organiques de sédiment

## 2.4 Test Microtox®

Le test Microtox® est un test de toxicité aiguë qui consiste à mesurer la bioluminescence émise par une bactérie marine *Vibrio fischeri* en présence de la substance ou de l'échantillon à analyser (Bulich, 1979). L'exposition de cette souche bactérienne à une substance cytotoxique va conduire à une baisse de la viabilité cellulaire qui se traduit en retour par une diminution de la bioluminescence émise par la culture bactérienne. Celle-ci est comparée à celle émise par une culture témoin non exposée. Ce test est sensible, rapide, reproductible (Ribo et al., 2001) et normalisé (EN ISO 11348-3). Il a été largement appliqué à tous les domaines nécessitant une expertise toxicologique et notamment à l'évaluation de la toxicité de matrices environnementales tels que eaux, effluents, sols, sédiments, etc. (Pedersen et al., 1998, Kwok et al., 2005).

Ce test a été utilisé pour déterminer le potentiel cytotoxique de chaque extrait organique de sédiment. Une courbe dose-réponse a été construite à partir de 5 points de dilution (raison 1/2) afin de déterminer la concentration efficace inhibitrice 50% (CEi50).

## 2.5 Test SOS Chromotest

Le SOS Chromotest est un test de génotoxicité sur une souche bactérienne de *E. coli* modifiée génétiquement (Quillardet et Hofnung, 1985). Ce test consiste à déterminer la capacité d'une substance chimique à induire l'expression d'un des composants du système de réparation d'urgence SOS, le gène *sfiA*. Plus il y a de dommages induits dans le génome de souche par le composé testé, plus la souche exprimera fortement le gène *sfiA*. La mesure de cette activation s'opère grâce à un gène rapporteur *LacZ* qui code pour la synthèse de la  $\beta$ -galactosidase dont l'activité est dosée par spectrophotométrie à 420 nm en présence d'ortho-nitrophényl  $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG). Ce test présente une haute sensibilité et spécificité vis à vis d'un large panel de composés génotoxiques (Quillardet & Hofnung, 1993) et a été utilisé pour l'évaluation du potentiel génotoxique de différentes matrices environnementales : particules atmosphériques (Škarek et al., 2007), sédiments (Chen et White, 2004, Cachot et al., 2006), eaux de surface (Zani et al., 2005), matrices biologiques (White et al., 1997) etc.

Ce test a été réalisé sur extraits de sédiment à trois concentrations (1/10, 1/33 et 1/100) en présence ou non d'une fraction microsomale S9 qui permet la bioactivation des pro-génotoxiques.

## 2.6 Analyse des effets sur le comportement et l'intégrité génétique des larves de médaka

Le test embryo-larvaire médaka en sédiment contact (MELAc) a été développé par le laboratoire EPOC. Il permet de mesurer la toxicité de polluants organiques (Vicquelin et al., 2011, Le Bihanic et al., 2014a) ou métalliques (Barjhoux et al., 2012) accumulés dans les sédiments sans recourir à une extraction de ces polluants. Le protocole de ce test est présenté dans la figure 3. Les analyses réalisées en 2013 concernent uniquement les sédiments collectés en 2012 et la mesure des effets génotoxiques et comportementaux sur larves de médaka. L'analyse des dommages à l'ADN par le test des comètes a été réalisé selon le protocole décrit par Morin et al. (2011). Le protocole pour l'analyse comportementale a été décrit par Le Bihanic et al. (2014b).

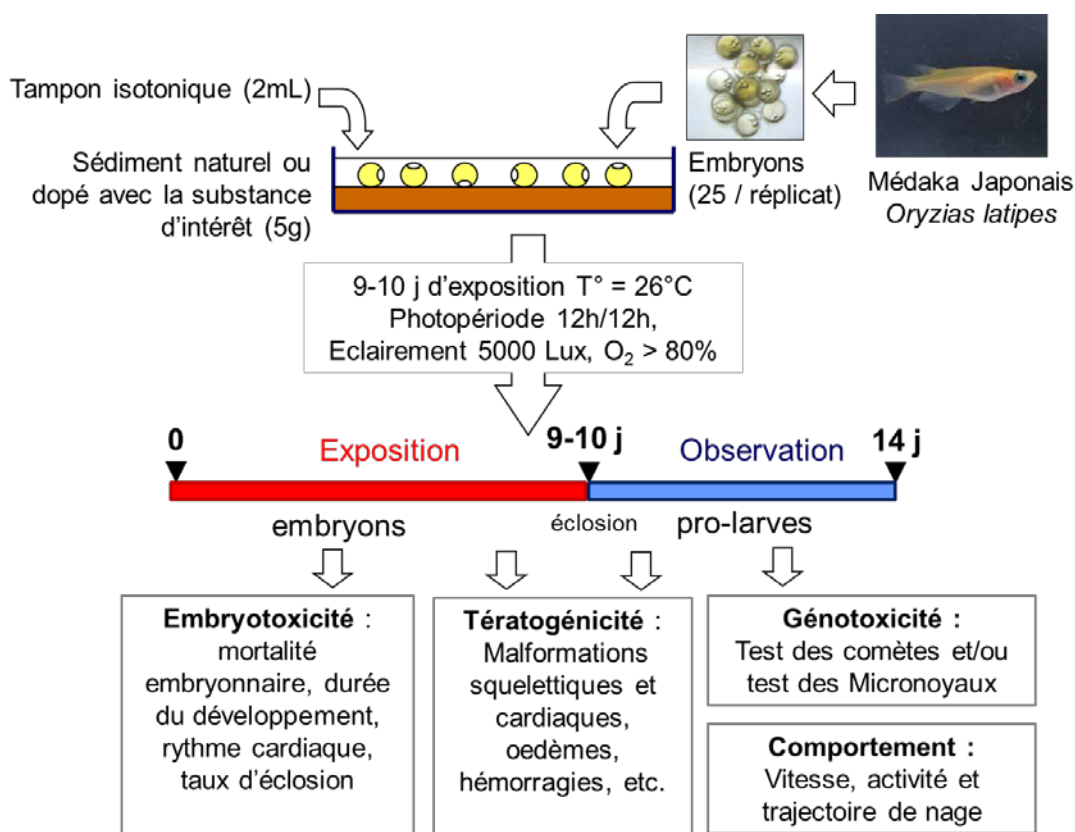
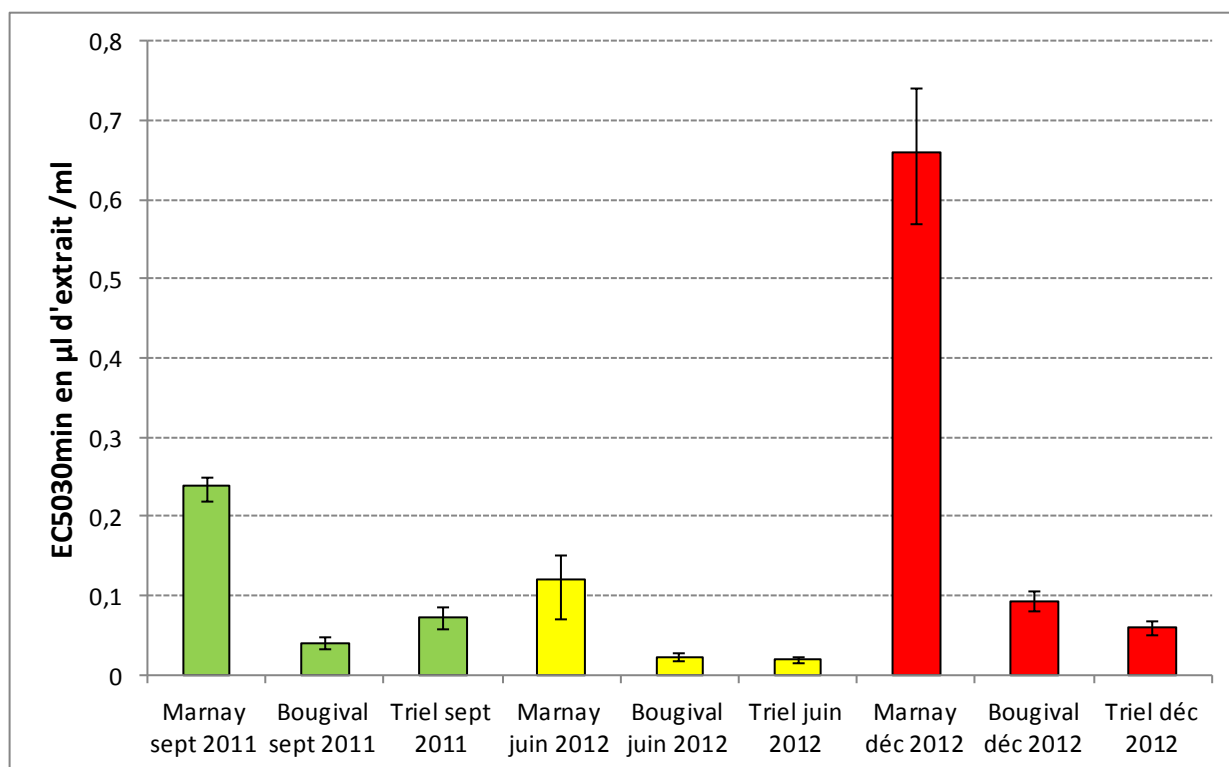


Figure 3 : Test embryo-larvaire medaka en sédiment-contact (MELAc).

### 3 Résultats

#### 3.1 Potentiel cytotoxique des extraits de sédiment

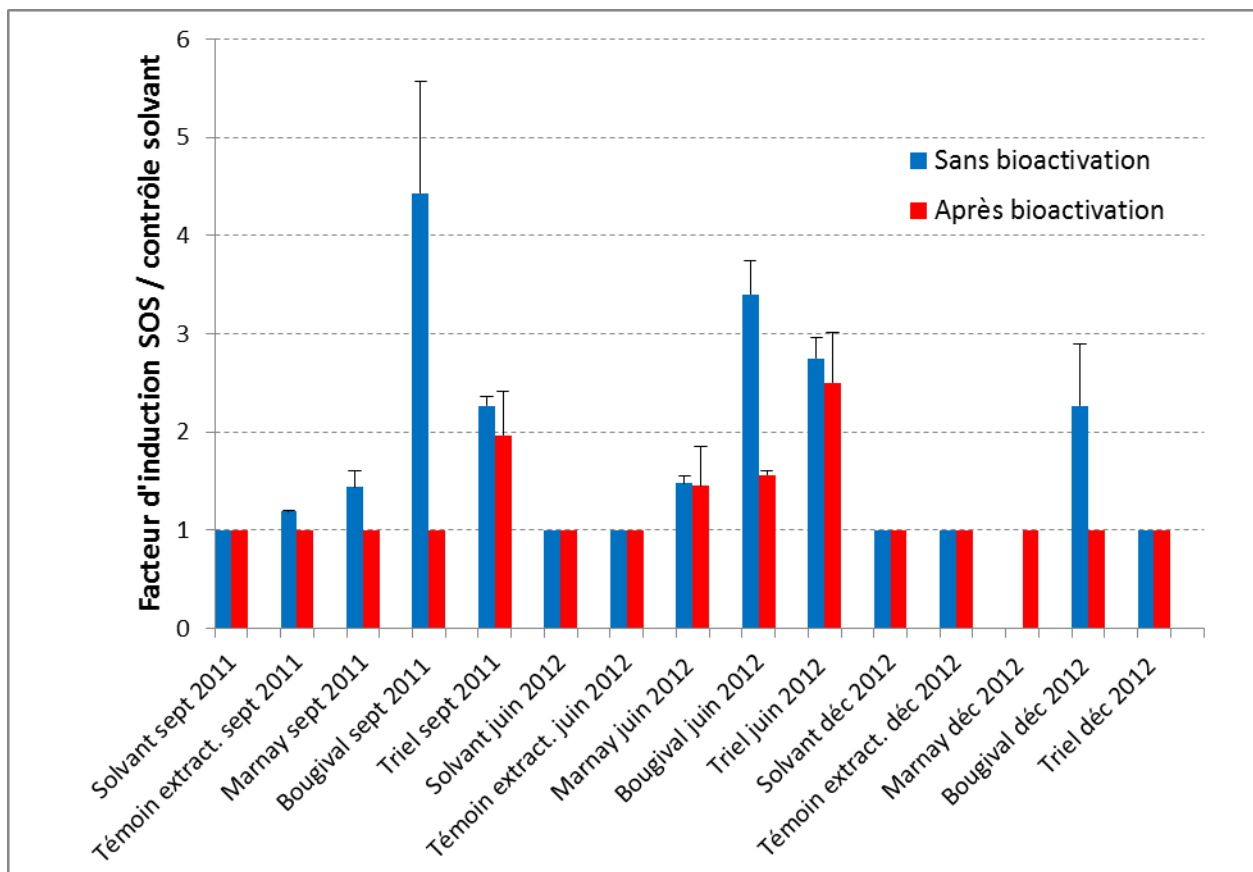
Les données présentées en figure 4 font clairement apparaître des différences de toxicité inter-sites avec une toxicité beaucoup plus marquée sur les sites à l'aval de Paris (Bougival et Triel) et plus fluctuante sur le site de Marnay. Au niveau du site de Marnay on peut également noter une fluctuation temporelle de la toxicité avec des niveaux de toxicité plus élevés en juin 2012 par rapport à septembre 2011 et décembre 2012.



**Figure 4 : Cytotoxicité des extraits organiques de sédiment de Seine. Les résultats sont exprimés en concentration efficace inhibitrice 50% après 30 min d'exposition. La toxicité est inversement proportionnelle à l'EC50.**

#### 3.2 Potentiel génotoxique des extraits de sédiment

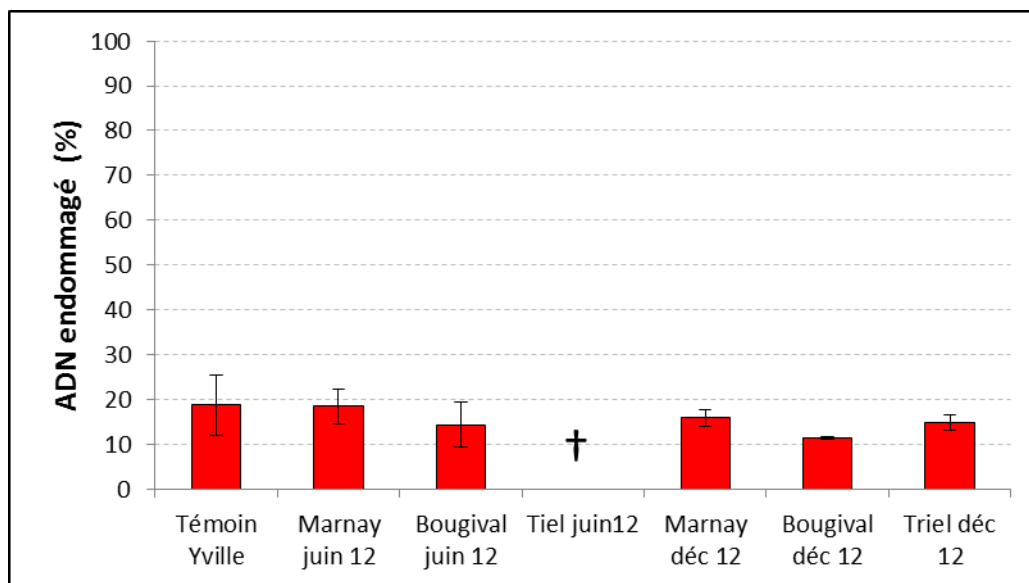
Les données de génotoxicité avec et sans bioactivation des pro-génotoxiques sont présentées dans la figure 5. Une variabilité inter-sites apparaît clairement avec une génotoxicité globalement plus marquée sur le site de Bougival et de façon moindre à Triel. Les extraits de sédiment de Marnay apparaissent faiblement génotoxiques. La génotoxicité fluctue au cours du temps, elle est globalement moindre en décembre 2012 par rapport à septembre 2011 et juin 2012. Ces analyses ont permis de mettre en évidence dans les sédiments de Seine en aval de Paris la présence de composés génotoxiques directs et de pro-génotoxiques.



**Figure 5 : Génotoxicité des extraits organiques de sédiment de Seine (dilution 1/100<sup>ème</sup>). Les résultats sont exprimés en facteur d'induction (FI) par rapport au contrôle solvant. Un FI inférieur à 1.5 traduit l'absence de génotoxicité, entre 1.5 et 2 il traduit une génotoxicité modérée et au-delà de 2 une génotoxicité forte.**

### 3.3 Effets génotoxiques des sédiments sur larves de poisson médaka

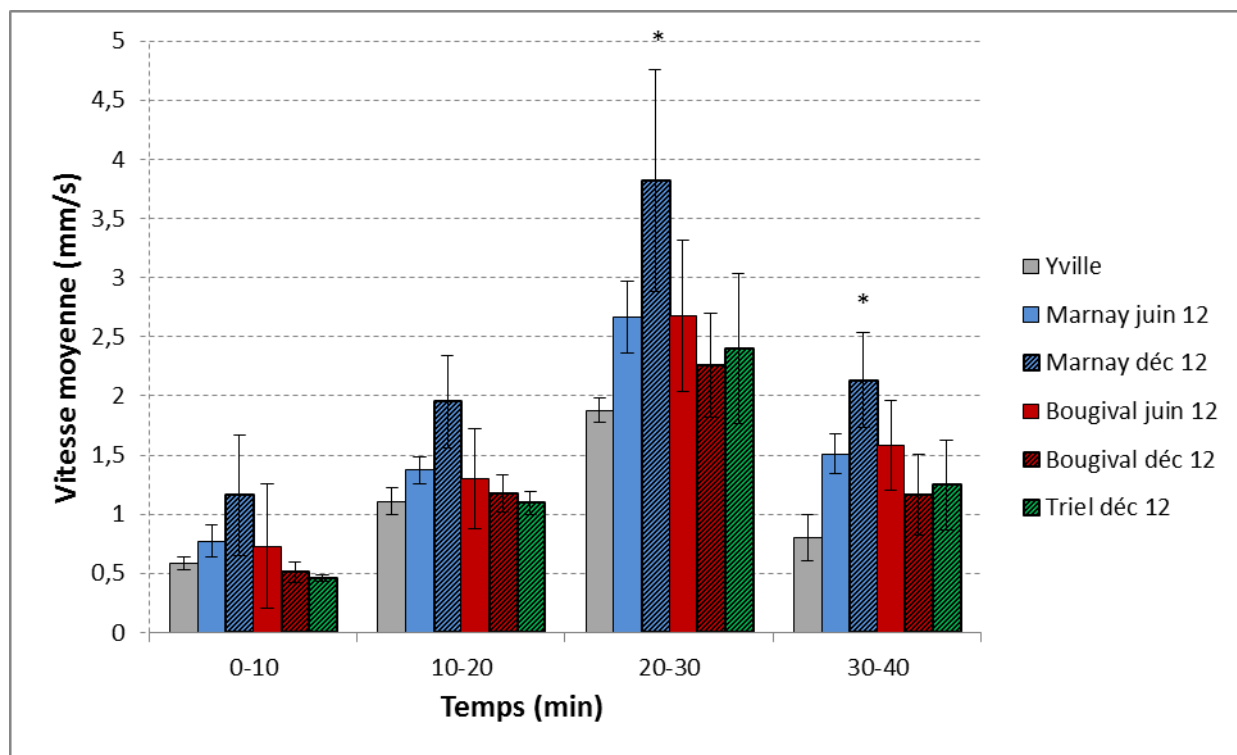
Le test des comètes a été réalisé sur larves de médaka exposées aux sédiments de Seine pendant toute la phase embryonnaire. Les résultats sont présentés dans la figure 6. Ces analyses ont révélé des taux d'endommagement relativement faibles qui fluctuent entre 11,4 et 18,8% mais aucune différence statistique n'a été mise en évidence entre sites et selon les périodes de prélèvement.



**Figure 6 : Dommages à l'ADN mesurés par le test des Comètes sur larves de poisson médaka exposées pendant leur développement embryonnaire à des sédiments de Seine. Tous les embryons exposés au sédiment de Triel de juin 2012 sont morts ou n'ont pas éclos.**

### 3.4 Effets des sédiments sur le comportement natatoire des larves de poisson médaka

L'analyse du comportement a été réalisée sur des larves exposées au stade embryonnaire aux différents sédiments collectés en Seine. Les résultats sont présentés dans la figure 7. On n'observe pas de différence significative de vitesse moyenne de nage selon les sites à l'exception des larves exposées au sédiment de Marnay de décembre 2012. Ces larves ont une vitesse de nage significativement plus élevée par rapport à tous les autres sites que ce soit en condition de lumière ou à l'obscurité.



**Figure 7 : Vitesse moyenne de nage des larves de médaka exposées au stade embryonnaire à différents sédiments de Seine. Les larves ont été soumises à différents conditionnement d'éclairage : 0-10min obscurité, 10-20 min lumière blanche, 20-30 min obscurité, 30-40 min lumière blanche.**

## 4 Conclusions

L'ensemble des données de cytotoxicité et de génotoxicité est rassemblé dans le tableau 1. Il apparaît que ces deux tests sont capables de discriminer des différences de toxicité entre sites. Les extraits de sédiment des sites en aval de Paris apparaissent fortement cytotoxiques et génotoxiques. Cette toxicité est beaucoup moins marquée pour les extraits de sédiments de Marnay. **Compte tenu de la sensibilité des tests Microtox et SOS Chromotest et des niveaux de toxicité très élevés relevés à Bougival et Triel notamment en décembre 2012, l'approche EDA (TIE) est techniquement possible pour identifier les composés toxiques présents dans ces sédiments.**

Ces différences de toxicité des sédiments entre l'amont et l'aval de l'axe Seine sont **cohérentes avec le potentiel perturbateur endocrinien** mesuré sur ces mêmes sédiments à l'aide de bioessais cellulaires de mesure de perturbations de l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires aux hormones endocrines. Il est en effet plus élevé à Bougival et Triel qu'à Marnay, que ce soit pour les effets oestrogéniques sur cellules MELN, thyroïdiens sur cellules PC-DR-LUC ou agonistes ou anti-androgéniques sur cellules MDA-kb2 (Labadie et al., rapport PIREN Seine 2013). Les extraits organiques étaient alors deux fois moins concentrés que ceux préparés pour la présente étude. Néanmoins, ils ont engendré des niveaux d'activité suffisamment élevés pour espérer observer une activité biologique toujours significative même après fractionnement analytique des extraits au cours d'une approche EDA. En effet, les activités induites étaient plus élevées que celles des témoins contrôles, jusqu'à 40x pour les effets oestrogéniques, 3x pour les effets thyroïdiens, et 2,5x pour les effets agonistes sur cellules MDA-kb2, avec presque 50% d'inhibition pour les effets anti-androgéniques observés sur ces mêmes cellules en présence de la dihydrotestostérone, DHT (campagne de juin 2012). A ce jour, les extraits préparés pour la présente étude n'ont pu être testés que pour leur potentiel perturbateur endocrinien sur cellules MDA-kb2, engendrant un facteur d'induction de 3x pour son activité agoniste, et une inhibition de l'activité de la DHT voisine de 75%. Même si ces observations restent à



confirmer sur les deux autres bioessais cellulaires, cette préparation d'extraits de sédiments, plus concentrée en contaminants que celle utilisée jusqu'à présent, semble sensiblement augmenter les niveaux d'activité PE.

Les analyses réalisées sur embryons et larves de poisson médaka ont révélé une **forte embryotoxicité des sédiments en aval de Paris mais peu ou pas d'effets sur le comportement ou l'intégrité de l'ADN** de ces organismes (Tableau 2). On peut donc penser que certains des contaminants détectés par l'approche *in vitro*, notamment le SOS Chromotest sur extrait organique de sédiment, ne sont pas ou peu biodisponibles ou peu ou pas toxiques pour des organismes pluricellulaires tels que des embryons de poisson.

De nouvelles analyses de toxicité doivent être conduites prochainement sur des extraits aqueux de cette même série de sédiments. Ces travaux vont permettre d'évaluer la toxicité de la fraction accessible et éventuellement biodisponible des polluants emprisonnés dans les sédiments de Seine.

**Tableau 1 : Potentiel génotoxique (SOS Chromotest) et cytotoxique (Test Microtox) d'extraits organiques de sédiment de Seine. Les données sont exprimées en taux d'induction par rapport au contrôle solvant.**

	Génotoxicité		Cytotoxicité
	Avec bioactivation	Sans bioactivation	
Marnay sept 2011	x1,4	x1	x2,8
Bougival sept 2011	x4,4	x1	x16,5
Triel sept 2011	x2,3	x2	x9,2
Marnay juin 2012	x1,5	x1,4	x5,5
Bougival juin 2012	x3,4	x1,6	x28,7
Triel juin 2012	x2,8	x2,5	x34,7
Marnay déc 2012	ND	x1	x1
Bougival déc 2012	x2,3	x1	x7,1
Triel déc 2012	x1	x1	x11

ND : non déterminé

**Tableau 2 : Effets embryotoxiques, génotoxiques et comportementaux des sédiments de Seine sur embryons et larves de poisson médaka**

	Embryotoxicité*		Intégrité de l'ADN	Activité natatoire
	Effets subaigus	Effets aigus		
Marnay sep 2011	+	-	ND	ND
Bougival sep 2011	++	-	ND	ND
Triel sept 2011	+	++	ND	ND
Marnay juin 2012	+	-	-	-
Bougival juin 2012	++	-	-	-
Triel juin 2012	+	+	-	-
			-	
Marnay déc 2012	++	-	-	+
Bougival déc 2012	+	-	-	-
Triel déc 2012	++	-	-	-

(-) pas de réponse significativement différente des contrôles (+ et ++) différences significatives

ND : non déterminé

\* analyses réalisées en 2011 et 2012

## Références bibliographiques

- Barjhoux I., Baudrimont M., Morin B., Landi L., Gonzalez P., Cachot J., 2012. Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 79 : 272-282.
- Bulich A.A., 1979. Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments. In *Aquatic Toxicology*, 2nd conference, L.L. Marling and R.A. Kimerle (Eds.) ASM STP 667. American Society for testing and Materials, Philadelphia, PA : 98-110.
- 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.
- Chen G., White P.A., 2004. The mutagenic hazards of aquatic sediments : a review. *Mutat. Res., reviews in Mutation Research*, 567 : 151-225.
- Kwok Y.C., Hsieh D.P.H., Wong P.K., 2005. The toxicity identification evaluation (TIE) of pore water from contaminated marine sediment collected from Hong Kong waters. *Mar. Poll. Bull.* 51 : 1085-1091.
- Le Bihanic F., Perrichon P., Landi L., Clérandeau C., Le Menach K., Budzinski H., Cousin X., Cachot J., 2014a. Development of a reference artificial sediment for chemical testing adapted to the MELA sediment contact assay. *Environmental Science and Pollution Research*, sous presse.
- Le Bihanic F., Clérandeau C., Le Menach K., Morin B., Budzinski H., Cousin X., Cachot J., 2014b. Developmental toxicity of PAH mixture in fish early life stages. Part II: adverse effects in Japanese Medaka. *Environmental Science and Pollution Research*, sous presse.
- Morin B., Filatreau J., Vicquelin L., Barjhoux I., Guinet S., Leray-Forget J., Cachot J., 2011. Detection of DNA damage in larvae of the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, by the comet assay. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 399 : 2235-2242.
- Norme ISO: International Organization for Standardization (2007). Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) -- Part 3: Method using freeze-dried bacteria. EN ISO 11348-3.
- Pedersen F., Bjornestad E., Vang Andersen H., Kjolholt J., Poll C., 1998. Characterisation of sediments from Copenhagen harbour by use of biotests. *Water Sci. Technol.*, 37 : 233-240.
- Quillardet P. & Hofnung M., 1985. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins : procedures. *Mutation Research*, 147 : 65-78.
- Quillardet P. & Hofnung M., 1993. The SOS Chromotest, a review. *Mutat. Res.*, 297 : 235-279.
- Ribo J.M. Ribo, Canela M., E. Grifol E., 2001. Repeatability and reproducibility of the luminescent bacteria bioassay. *Environ. Toxicol.* 16 : 127–135
- Škarek M., Janošek J., Čupr P., Kohoutek J., Novotná-Rychetská A., Holoubek I., 2007. Evaluation of genotoxic and non-genotoxic effects of organic air pollution using in vitro bioassays. *Environ. Int.*, 33 : 859-866.
- Vicquelin L., Leray-Forget J., Peluhet L., LeMenach K., Deflandre B., Anschutz P., Etcheber H., Morin B., Budzinski H., Cachot J., 2011. A new spiked sediment assay using embryos of the Japanese medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. *Aquatic Toxicology*, 105 : 235-245.
- White P.A., Blaise C. & Rasmussen J.B., 1997. Detection of genotoxic substances in bivalve molluscs from the Saguenay Fjord (Canada) using the SOS chromotest. *Mutation Research*, 392 : 277-300.

Zani C., Feretti D., Buschini A., Poli P., Rossi C., Guzzella L., Di Caterino F., Monarca S., 2005. Toxicity and genotoxicity of surface water before and after various potabilization steps. *Mutat. Res. Genetic Toxicology and environmental Mutagenesis*, 587 : 26-37.