

N° d'ordre : 2945

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE BORDEAUX I

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DU VIVANT, GEOSCIENCES, SCIENCES DE
L'ENVIRONNEMENT

Par **Olivier MAZEAS**

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

SPECIALITE : BIOGEOCHIMIE DE L'ENVIRONNEMENT

**EVALUATION DE L'EXPOSITION DES ORGANISMES AUX
HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAP) DANS LE
MILIEU MARIN PAR LE DOSAGE DES METABOLITES DE HAP**

Soutenue le 17 décembre 2004

Après avis de :

Mme	M.F. GRENIER-LOUSTALOT	Directeur de recherche CNRS, Lyon	Rapporteur
M	M. MARCHAND	Directeur de recherche, IFREMER, Nantes	Rapporteur

Devant la commission d'examen composée de :

M	J.M. SCHMITTER	Professeur, IECB	Président et rapporteur de soutenance
Mme	M.F. GRENIER-LOUSTALOT	Directeur de recherche CNRS, Lyon	Rapporteur
M	M. MARCHAND	Directeur de recherche, IFREMER, Nantes	Rapporteur
M	L-A. ROMAÑA	Directeur de recherche, IFREMER, Toulon	Examinateur
M	J. TRONCZYNSKI	Chercheur, IFREMER, Nantes	Examinateur
Mme	H. BUDZINSKI	Directeur de recherche CNRS, Bordeaux	Examinateur
M Y.	DESAUNAY	Directeur de recherche IFREMER, Nantes	Invité

REMERCIEMENTS

Ce manuscrit est le résultat de mon travail de thèse, réalisé au laboratoire de Physico- et Toxicochimie (LPTC) des systèmes naturels de l'université Bordeaux I. Bien que mon nom soit inscrit sur la couverture de ce manuscrit, je me dois de préciser que son contenu est la somme du travail d'une multitude de personnes, sans qui tout ceci n'aurait pas été possible. Je vais tâcher de les remercier dans cet avant-propos.

Je voudrais tout d'abord remercier Hélène Budzinski, directrice du laboratoire LPTC (responsable du groupe Contaminants organiques du LPTC lors de mon doctorat) et Jacek Tronczynski du laboratoire des Polluants Chimiques de la Direction de l'Environnement Littoral (DEL-PC) d'Ifremer, d'avoir dirigé ma thèse.

Je remercie également madame Grenier-Loustalot, directrice du laboratoire central d'analyse du CNRS, et monsieur Marchand, directeur du DEL-PC de l'Ifremer, de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs de thèse et d'avoir apporté leurs observations avisées à ce manuscrit.

Je souhaite également exprimer ma gratitude à monsieur Schmitter, enseignant-chercheur à l'Institut Européen de Chimie de Bordeaux (IECB) et à Monsieur Romaña, directeur de recherche à l'Ifremer Toulon, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens également à remercier Yves Desaunay pour avoir accepté de participer à ce jury.

Je voudrais d'autre part réaffirmer toute ma gratitude à Hélène Budzinski pour m'avoir proposé de réaliser ce doctorat dans son groupe et d'avoir mis en œuvre tous les moyens nécessaires à la réalisation de ces travaux. C'est bien entendu grandement grâce à elle que j'ai pu me former concrètement à de nombreuses techniques de chimie analytique et que j'ai pu participer à des programmes tels que le programme de suivi Erika, le programme Seine-Aval, le projet européen BEEP et le programme Liteau-Erika.

A travers Hélène, je souhaiterais bien sûr remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées au LPTC pendant ce doctorat. Je pense bien évidemment dans un premier lieu à Jacqueline Bellocq, Karyn Le Menach, Sylvie Augagneur et Laurent Peluhet, les encadrants du groupe, mais également à Olivier Geffard, Anne Togola, Pierre Labadie, Nathalie Tapie, Marie-Hélène Devier, Jean-bastien Lapeyre, Michèle Daubèze, Christelle Clérandeau et Pascal Mora qui ont, dans le cadre de manipulations ou de missions de terrain, participé à ma thèse (et à son ambiance).

Et puis, je voudrais également avoir une pensée pour tous les autres membres du laboratoire.

Je voudrais de plus exprimer toute mon amitié à Yves Desaunay. Je ne suis pas près d'oublier sa gentillesse et sa grande humanité. Par la même occasion, je voudrais remercier différentes personnes de l'Ifremer qui ont collaboré de près ou de loin à ma thèse : Gilles Bocquené, Thierry Burgeot, Hélène Oger-Jeanneret, Olivier Le Pape, Jocelyne Morin, Farida Akcha et Camille Gilliers. Et puis, j'ai une pensée toute particulière pour Daniel Guérault d'Ifremer Nantes qui nous a quitté durant mon doctorat.

Un grand merci également à Guy Claireaux du Créma L'houmeau pour notre collaboration dans le cadre du programme de suivi Erika, pour son accueil chaleureux au Créma et les moyens qu'il a mis à disposition pour nos expérimentations en bassin. A travers lui, je souhaiterais également remercier Jean-Pierre Cravedi du Laboratoire des Xénobiotiques de l'INRA Toulouse, mais

également Christelle Goanvec, Aurélie Vettier, Philippe Pineau et Fariba Davoodi avec qui j'ai eu l'occasion de travailler au Créma.

Et puis, merci à mes amis, à Typhaine, à mon frère, à mon père et à ma mère... pour tout...

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1. LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES	11
1.1. LES COMPOSES ETUDIÉS :	11
1.2. ORIGINE DES HAP :	12
1.3. CARACTÉRISATION DES SOURCES DE HAP :	12
1.3.1. Généralités :	12
1.3.2. Altération de l’empreinte :	13
1.4. COMPORTEMENT ET DEVENIR DES HAP DANS L’ENVIRONNEMENT :	14
1.4.1. Propriétés physico-chimiques :	14
1.4.2. Cycles biogéochimiques :	14
a) Généralités :	14
b) Comportement dans le milieu marin :	16
1.5. CAS DES MAREES NOIRES :	17
1.5.1. Origines :	17
1.5.2. Historique :	18
1.5.3. Les produits pétroliers :	21
a) Composition :	21
b) Classification des pétroles bruts :	22
c) Classification des produits de raffinage :	23
1.5.4. Comportement dans le milieu marin :	23
1.6. LES RESEAUX DE SURVEILLANCE :	24
1.7. LA MAREE NOIRE ERIKA DANS LE CONTEXTE DE LA CONTAMINATION CHRONIQUE DU MILIEU MARIN FRANÇAIS ET MONDIAL :	26
1.7.1. L’eau :	26
1.7.2. Les sédiments :	28
1.7.3. Les organismes :	28
2. BIOTRANSFORMATION ET TOXICITÉ DES HAP DANS LE MILIEU MARIN	30
2.1. MÉCANISMES DE BIOTRANSFORMATION :	30
2.1.1. Phase de fonctionnalisation :	31
2.1.2. Phase de conjugaison :	33
2.2. TOXICITÉ :	34
2.2.1. Mécanismes de toxicité :	34
a) Génotoxicité et cancérogénicité :	34
b) Effets sur la reproduction et le développement :	36

c) Autres effets :	37
2.2.2. Données toxicologiques :	37
a) Toxicité aiguë :	38
b) Toxicité chronique :	38
c) Classement des HAP en fonction de leur toxicité et valeurs guides :	38
2.2.3. Biomarqueurs :	43
3. LES METABOLITES DE HAP	44
3.1. TECHNIQUES ANALYTIQUES :	45
3.1.1. Déconjugaison :	45
3.1.2. Extraction :	45
a) Extraction liquide-liquide :	45
b) Extraction sur phase solide (SPE) :	47
c) Micro-extraction sur phase solide (SPME) :	48
3.1.3. Purification :	48
3.1.4. Séparation et détection des métabolites :	49
a) Techniques de spectrofluorimétrie :	50
Chromatographie en phase liquide haute performance couplée à la spectrofluorimétrie (CLHP-F)	50
Spectrométrie de fluorescence synchrone (SFS)	52
Fluorescence fixe (FF)	52
b) Techniques de spectrométrie de masse :	52
Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)	53
Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-SM)	53
Autres techniques	53
3.2. ETUDE DU METABOLISME ET IDENTIFICATION DES METABOLITES :	54
3.2.1. Localisation des métabolites chez les organismes aquatiques :	54
3.2.2. Identification des métabolites :	55
a) Généralités :	55
b) Naphtalène :	56
c) Phénanthrène :	56
d) Benzo(a)pyrène :	58
e) Pyrène :	61
f) Autres HAP :	62
g) Produits pétroliers :	63
3.3. ETUDE DU METABOLISME DES HAP :	65
3.3.1. Facteurs influençant le devenir des HAP :	65
a) Période de reproduction :	65
b) Age :	66
c) Température :	66
d) Nourriture :	67
e) Présence d'autres contaminants :	67
3.3.2. Différences entre espèces de poisson :	67
a) Différences quantitatives :	67
b) Différences qualitatives :	68
3.3.3. Etude cinétique du métabolisme des HAP :	68
a) Exposition ponctuelle et unique :	68
b) Exposition prolongée :	69

3.4. APPLICATION A LA SURVEILLANCE ENVIRONNEMENTALE :	70
3.4.1. Pollutions ponctuelles :	72
a) La marée noire de l'Exxon Valdez :	72
b) Autres pollutions pétrolières :	73
c) Autres pollutions ponctuelles d'origine anthropique :	75
d) Pollutions ponctuelles d'origine naturelle :	76
3.4.2. Pollutions chroniques :	76
3.4.3. Pollutions diffuses :	78
BUT DES TRAVAUX	83
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES	85
1. SITES D'ETUDE ET EXPERIMENTATIONS	89
1.1. LA MAREE NOIRE ERIKA :	89
1.1.1. Campagnes d'échantillonnage :	90
1.1.2. Expérimentations en bassin :	93
a) Exposition à du fuel lourd n°2 :	93
b) Exposition à des HAP individuels :	95
1.1.3. Etude du traict du Croisic :	97
1.2. EXPERIMENTATION EN BASSIN :	99
1.3. ESTUAIRE DE LA SEINE :	102
2. DOSAGE DES COMPOSES ETUDIÉS	104
2.1. DOSAGE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES :	104
2.1.1. Préparation des échantillons :	104
2.1.2. Introduction des étalons internes :	105
2.1.3. Extraction :	106
a) Extraction des HAP dissous dans l'eau :	106
b) Extraction micro-ondes des matrices solides :	107
c) Extraction liquide-liquide :	107
2.1.4. Concentration :	107
2.1.5. Purification :	107
a) Chromatographie en phase liquide sur colonnes d'alumine et de silice :	107
b) Chromatographie liquide haute-performance (CLHP) :	108
c) Saponification :	108
2.1.6. Analyse par couplage CPG/SM :	108
a) Description de l'analyse :	108
b) Méthode de quantification :	109
c) Validation des analyses :	109
2.2. DOSAGE DES METABOLITES DE HAP (PUBLICATION 2) :	110
2.2.1. Préparation de l'échantillon :	110
2.2.2. Etalonnage interne :	111
2.2.3. Déconjugaison enzymatique :	111
2.2.4. Extraction :	111
2.2.5. Purification :	111
2.2.6. Détection des métabolites de HAP (Publication 1) :	112
a) Détection par CPG/SM :	112
b) Détection par CLHP/SM :	113

2.2.7. Dosage de l'activité enzymatique EROD :	115
2.2.8. Dosage des protéines :	115
CHAPITRE III : SYNTHÈSE	117
1. MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DOSAGE DES METABOLITES DE HAP DANS LES MATRICES LIQUIDES	121
1.1. SEPARATION ET DETECTION (Publication 1)	121
1.2. PREPARATION DES ECHANTILLONS (Publication 2)	121
2. EXPERIMENTATIONS EN BASSIN	123
2.1. EXPOSITION A DES COMPOSES INDIVIDUELS (Publication 3)	123
2.2. EXPOSITION A DES PRODUITS PETROLIERS	128
2.2.1. Exposition à un fioul lourd n°2 (Publication 4)	128
a) Fiouls lourd n°2	128
b) Phase dissoute	129
c) Bioaccumulation dans les tissus	131
d) Biotransformation	134
2.2.2. Exposition à un pétrole brut (Publication 5)	139
3. ETUDES DE TERRAIN	141
3.1. LA MAREE NOIRE ERIKA :	141
3.1.1. Etude des nourriceries de sole du golfe de Gascogne (Publications 6, 7 et 8) :	141
3.1.2. Etude du traict du Croisic - Transplantation de moules (Publication 9) :	143
a) Les sédiments :	143
b) Les moules :	146
3.2. L'EMBOUCHURE DE LA SEINE (Publication 10) :	148
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	151
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	157
ANNEXES	197
PUBLICATIONS	263
PUBLICATION 1 : Comparison of analytical methods for the individual detection and quantification of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites. Soumis à Journal of Chromatography A.	265
PUBLICATION 2 : Solid phase extraction and purification for the quantification of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in biological fluids. Soumis à Analytical and Bioanalytical Chemistry.	285

PUBLICATION 3 : Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by flat fish in waterborne laboratory exposures to individual polycyclic aromatic hydrocarbons. Soumis à <i>Aquatic Toxicology</i> .	299
PUBLICATION 4 : Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons from heavy fuel oil in the marine environment : study of biotransformation by fish in laboratory experiments. Soumis à <i>Environmental Toxicology and Chemistry</i> .	319
PUBLICATION 5 : Exposure of two fish species to dispersed crude oil : determination of individual biliary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons and evaluation of the additive effect of alkylphenols. Soumis à <i>Marine Environmental Research</i> .	349
PUBLICATION 6 : Evaluation of the exposure of bottom fish to the Erika oil spill : biotransformation and bioaccumulation monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons. Soumis à <i>Environmental Science and Technology</i> .	369
PUBLICATION 7 : Link between exposure of fish (<i>Solea solea</i>) to PAHs and metabolites: Application to the “ Erika” oil spill. <i>Aquatic Living Resources</i> , 17 : 329–334 (2004).	397
PUBLICATION 8 : Influence of oil exposure on the physiology and ecology of the common sole <i>Solea solea</i> : Experimental and field approaches. <i>Aquatic Living Resources</i> , 17 : 335–351 (2004).	403
PUBLICATION 9 : Evaluation of the impact of the Erika oil spill on the traict du Croisic site by the way of mussel caging experiments. Soumis à <i>Chemosphere</i> .	421
PUBLICATION 10 : Evaluation of the exposure of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons in the Seine River mouth through bile metabolites monitoring; comparison with other French Atlantic sites. Soumis à <i>Marine Pollution Bulletin</i> .	439

Abréviations

ADEME : Agence pour le Développement et la Maîtrise de l'Energie

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AFNOR : Agence Française de Normalisation

AFSSA : Agence Française Sanitaire et de Santé Alimentaire

AHH : Aryl Hydrocarbon Hydroxylase

AhR : Aryl hydrocarbon Receptor

APCI : Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique

BCF : Bioconcentration Factor

BPDE : benzo(a)pyrène 7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde

BPH : Benzo(a)pyrène Hydroxylase

BSTFA : Bis(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide

[¹⁴C] : Isotope 14 du carbone

C₁₈ : Octadécyl

CAT : Catalases

CEDRE : Centre de Documentation, de Recherche et d'expérimentations sur les pollutions
accidentelles des eaux

CL₅₀ : Concentration Létale 50

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CLHP-F : Chromatographie en phase Liquide Haute Performance couplée à la spectrofluorimétrie

CLHP-SM : Chromatographie en phase Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de
Masse

CPG/SM : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

CREMA : Centre de Recherche sur les Ecosystèmes Marins et Aquacoles

CSHPF : Conseil de Sécurité et d'Hygiène Publique Française

CYP1A1 : Enzymes dépendantes du cytochrome P-450 1A1

DD : Dihydrodiol Déshydrogénases

DDD : Dichlorodiphényltrichloroéthane

DDE : Dichlorodiphényléthylène

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

DMSO : Diméthylsulfoxyde

diOH : Dihydrodiol

DPMA : Direction des Pêches Maritimes et de l'Aquaculture

ECTOPHY : Suivi Ecologique, Toxicologique et Physiologique des poissons exposés à la marée
noire de l'Erika

EDF : Electricité De France

EH : Epoxydes Hydrolases

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EROD : Ethoxyrésorufin-*O*-Dééthylase

ESI : Ionisation Electrospray

FET : Facteur d'Equivalent Toxique

FF : Fluorescence Fixe

GESAMP : Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection

GSH : Glutathion

GST : Glutathion S-Transférases

[³H] : Isotope 3 de l'hydrogène

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

H₂O₂ : Hydroperoxyde d'hydrogène

Hsp 90 : Heat shock protein 90

IARC : International Agency for Research on Cancer

IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

INERIS : Institut National de l'Environnement industriel et des Risques

IPCS : Programme International de Sécurité Chimique

ITOPF : International Tanker Owners Pollution Federation

JOCE : Journal Officiel des Communautés Européennes

K_d ou K_p: coefficient de partage sédiment/eau

kDa : Kilodaltons

K_{ea} : Coefficient de partage eau/air

K_{oc} : coefficient de partage carbone organique/eau

K_{ow} : coefficient de partage n-octanol/eau

K_{sa} : Coefficient de partage sol/air

LOEC : Lowest Observed Effect Concentration

LPTC : Laboratoire de Physico- et Toxic-Chimie des systèmes naturels

MATE : Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement

MFO : Mixed-Function Oxygenases

MTBE : Méthyl t-butyl éther : (CH₃)₃C(OCH₃)

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogéné
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogéné
NaOH : Hydroxyde de sodium, soude
NOAA : National Oceanic and Atmospheric Administration (USA)
NOEC : No Observed Effect Concentration
NRC : National Research Council
NRCC : National Research Council of Canada
NTP : National Toxicologic Program
 $O_2^{\cdot-}$: Anion superoxyde
OH : Hydroxy
 $\cdot OH$: Radical hydroxyle
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OSPAR : Oslo – Paris
OSPARCOM : Commission Oslo - Paris
PCB : Polychlorobiphényles
ppm : Partie par million
PSWQAT : Puget Sound Water Quality Action Team
Q : Quinone
REBENT : Réseau Benthique
REMI : Réseau de contrôle Microbiologique
REMORA : Réseau Mollusques des Rendements Aquacoles
REPAMO : réseau de pathologie des mollusques
REPHY : Réseau de surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines
RNO : Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin
SFS : Spectrométrie de Fluorescence Sychrone
SOD : Superoxydes Dismutases
SPE : Extraction sur Phase Solide
SPME : Micro-Extraction sur Phase Solide
SRM : Standard Reference Matrix
TBT : Tributylétain
UDPGT : Uridine-Diphosphate-Glucuronyltransférases
US-EPA : Agence américaine de Protection de l'Environnement

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques

Composé	abréviation
Naphtalène	N
Méthylnaphtalènes	C ₁ N
Ethylnaphtalènes	EtN
Diméthylnaphtalènes	C ₂ N
Triméthylnaphtalènes	C ₃ N
Tétraméthylnaphtalènes	C ₄ N
Biphényle	Bi
Acénaphtylène	Ay
Acénaphène	Ae
Fluorène	Fe
Dibenzothiophène	DBT
Méthyl dibenzothiophènes	C ₁ DBT
Diméthyl dibenzothiophènes	C ₂ DBT
Phénanthrène	Phe
Méthylphénanthrènes	C ₁ Phe
Diméthylphénanthrènes	C ₂ Phe
Triméthylphénanthrènes	C ₃ Phe
Anthracène	A
2-méthylanthracène	2-C ₁ A
Fluoranthène	F
Pyrène	P
Chrysène + Triphénylène	C+T
Méthylchrysènes	C ₁ C
Benz(a)anthracène	BaA
1,2-benzonaphtothiophène	1,2-BNT
2,3-benzonaphtothiophène	2,3-BNT
Benzofluoranthènes	BbF+BkF+BjF=BFs
Benzo(e)pyrène	BeP
Benzo(a)pyrène	BaP
Pérylène	Per
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	IP
Dibenz(a,h)anthracène + Dibenz(a,h)anthracène	DBaA+DBaC
Benzo(g,h,i)pérylène	BPer

Les composés hydroxylés

Composé	Abréviation
1-hydroxynaphtalène	1-OHN
2-hydroxynaphtalène	2-OHN
2-hydroxybiphényle	2-OHBi
9-hydroxyfluorène	9-OHFe
Hydroxyphénanthrènes	OHPhe
1-hydroxypyrene	1-OHP
1-hydroxychrysène	1-OHC
3-hydroxybenzo(a)pyrène	3-OHBaP

Liste des figures**Chapitre I**

Figure I.1 : Formule semi-développée des principaux HAP parents étudiés	11
Figure I.2 : Schéma récapitulatif des cycles biogéochimiques des HAP dans l'environnement (d'après McElroy et al., 1989)	16
Figure I.3 : Pourcentage du nombre des accidents pétroliers en fonction de la quantité déversée de 1974 à 2002 (http://www.itopf.com , 15 septembre 2003)	18
Figure I.4 : Evolution du nombre des accidents pétroliers supérieurs à 7000 tonnes depuis 1970 (http://www.itopf.com , 15 septembre 2003)	18
Figure I.5 : Evolution de la quantité de pétrole déversée en mer depuis 1970 (http://www.itopf.com , 15 septembre 2003)	19
Figure I.6 : Localisation des principaux accidents pétroliers depuis 1967	19
Figure I.7 : Ensemble des hydrocarbures présents dans les pétroles bruts (d'après Bertrand et Mille, 1989)	22
Figure I.8 : Devenir du pétrole déversé trois ans après le naufrage de l'Exxon Valdez (Wolfe et al., 1994)	24
Figure I.9 : Exemple de modification du niveau et du profil de concentration en HAP dissous dans l'eau avant (A) et après la marée noire (B) (Tronczynski et al, 2003)	27
Figure I.10 : Somme des HAP de l'US-EPA mesurés par le RNO dans les huîtres et les moules (poids sec) de 1994 à 1999 sur les zones du littoral atlantique français touchées par la marée noire Erika (adapté de Jeanneret et al., 2002)	29
Figure I.11 : Schéma général de biotransformation des HAP	30
Figure I.12 : Schéma récapitulatif de l'action oxygénasique du système cytochrome P-450 sur les HAP (d'après Estabrook et al., 1978)	32
Figure I.13 : Formule des principaux conjugués formés chez les poissons	33
Figure I.14 : Exemple de voies métaboliques et de formation d'adduits possibles	35
Figure I.15 : Localisation des régions K et baie du benzo(a)pyrène	35
Figure I.16 : Bilan de la gestion des zones conchylicoles et de pêche à pied de loisir suite au naufrage du pétrolier Erika (RNO, 2002)	42
Figure I.17 : Formule semi-développée du phénanthrène	57
Figure I.18 : Formule semi-développée du benzo(a)pyrène	58

Figure I.19 : Evolution de la concentration de certaines classes de métabolites dans la bile de <i>Notothenia gibberifrons</i> après une injection intra-musculaire de fioul (Yu et al., 1995)	69
--	----

Chapitre II

Figure II.1 : Localisation du naufrage du pétrolier ERIKA et des principales côtes touchées par les nappes (Estimation Cedre)	89
Figure II.2 : La sole <i>Solea solea</i>	91
Figure II.3 : Concentrations en oeufs dans les frayères de soles du golfe de Gascogne en février et localisation des principales nourriceries (adapté de Arbault et al.,1986 et Le Pape et al.,2003)	91
Figure II.4 : Localisation des zones échantillonnées lors des campagnes Black et Nurse	92
Figure II.5 : Localisation des traits de chalut contenant du fuel lors de la campagne Black 1	92
Figure II.6 : Exposition de soles en bassin à différentes concentrations de fuel lourd	94
Figure II.7 : Localisation des bassins utilisés lors de la troisième expérimentation dans les marais de l'Houmeau	95
Figure II.8 : Photographie des bassins extérieurs utilisés pour les expositions aux HAP individuels	96
Figure II.9 : <i>Mytilus Edulis</i>	97
Figure II.10 : Schéma de l'expérimentation de caging entre le Moulleau et le traict du Croisic	98
Figure II.11 : Localisation des sites de caging dans le traict du Croisic	99
Figure II.12 : La morue <i>Gadus morhua</i>	100
Figure II.13 : Répartition de la morue dans l'océan mondial (FAO, 2000-2003)	100
Figure II.14 : Evolution de la biomasse féconde de morues (milliers de tonnes) en mer du Nord (EEA, 2002)	100
Figure II.15 : Le turbot <i>Scophthalmus maximus</i>	101
Figure II.16 : Schéma du dispositif de contamination des morues et des turbots	101
Figure II.17 : Le flet <i>Platichthys flesus</i>	102
Figure II.18 : Localisation des sites de prélèvement de flets	103
Figure II.19 : Protocoles analytiques permettant le dosage des HAP dans les différentes matrices étudiées	105

Figure II.20 : Schéma de l'extracteur micro-ondes Maxidigest MX 4350	107
Figure II.21 : Formule des métabolites de HAP étudiés (un seul hydroxyphénanthrène est représenté)	110
Figure II.22 : Protocole de dosage des métabolites de HAP dans les matrices liquides	110
Figure II.23 : Chromatogramme obtenu en CPG/SM par injection d'un mélange contenant les métabolites étudiés (un seul isomère d'hydroxyphénanthrène) après dérivation	112
Figure II.24 : Séparation des différents isomères (1, 2, 3, 4 et 9) d'hydroxyphénanthrène obtenue en CPG/SM après dérivation	113
Figure II.25 : Chromatogramme obtenu en CLHP-ESI-SM par injection d'un mélange contenant les métabolites étudiés (un seul isomère d'hydroxyphénanthrène)	114
Figure II.26 : Séparation des différents isomères (1, 2, 3, 4 et 9) d'hydroxyphénanthrène obtenue en CLHP-ESI-SM	114

Chapitre III

Figure III.1 : Exemple de chromatogramme obtenu par CPG/SM en mode de sélection d'ions pour les échantillons de bile de flet après application du protocole analytique	122
Figure III.2 : Concentration moyenne en HAP dans la phase dissoute pour les quatre expositions exprimées en ng/l (analyses réalisées en duplicat)	124
Figure III.3 : Evolution de la concentration en 1-hydroxypyrene dans la bile de soles exposées à du pyrene (1-OHP) et dans la bile de soles du bassin contrôle (1-OHP')	125
Figure III.4 : Evolution des concentrations en hydroxyfluoranthènes dans la bile de soles exposées à du fluoranthène (x-OHF) et dans la bile de soles du bassin contrôle (x-OHF')	126
Figure III.5 : Evolution des concentrations en hydroxyphénanthrènes dans la bile de soles exposées à du phénanthrène (x-OHPhe) et dans la bile de soles du bassin contrôle (x-OHPhe')	127
Figure III.6 : Composition en HAP de faible poids moléculaire (moyenne de triplicats) du fioul de l'Erika, des fiouls lourds A et B et du pétrole brut de la mer du Nord (PB) exprimée en µg/g	129
Figure III.7 : Composition en HAP de haut poids moléculaire (moyenne de triplicats) du fioul de l'Erika, des fiouls lourds A et B et du pétrole brut de la mer du Nord (PB) exprimée en µg/g	129
Figure III.8 : Concentrations en HAP dissous (ng/l) à la fin des expositions I, II et III	130
Figure III.9 : Concentrations en HAP dans les foies (ng/g de matière sèche) à la fin des expositions I (5°C) et II (15°C) (fioul A)	132

Figure III.10 : Concentrations en HAP dans les muscles (ng/g de matière sèche) à la fin des expositions I et II (fioul A)	133
Figure III.11 : Concentrations en HAP dans les muscles (ng/g de matière sèche) à la fin de l'exposition III réalisée à 15°C	133
Figure III.12 : Concentrations en métabolites dans la bile (ng/g de bile) à la fin de l'exposition I	137
Figure III.13 : Concentrations en métabolites dans la bile (ng/g de bile) à la fin de l'exposition II	137
Figure III.14 : Concentrations en métabolites dans la bile (ng/g de bile) par groupe d'âge (g1 et g2) à la fin de l'exposition III	137
Figure III.15 : Concentrations en métabolites dans la bile (ng/g de bile) à la fin de l'exposition I en fonction du sexe	138
Figure III.16 : Concentrations en métabolites dans la bile de turbot exprimée en ng/g de bile pour les poissons non exposés (ctrl), les poissons exposés au pétrole brut (oil) et au pétrole brut en présence d'alkylphénols (oil+AP)	140
Figure III.17 : Concentrations en métabolites dans la bile de morue exprimée en ng/g de bile pour les poissons non exposés (ctrl), les poissons exposés au pétrole brut (oil) et au pétrole brut en présence d'alkylphénols (oil+AP)	140
Figure III.18 : Concentration en 1-hydroxypyrrène dans la bile (ng/g de bile) de soles capturées dans certains sites du golfe de Gascogne	142
Figure III.19 : Concentrations en HAP dans les sédiments des différents sites d'expérimentation	145
Figure III.20 : Rapports de concentrations en HAP dans les sédiments des différents sites d'échantillonnage et dans le fioul Erika	145
Figure III.21 : Concentrations en HAP par classe d'aromaticité dans les moules du bassin d'Arcachon et des différents sites d'expérimentation	146
Figure III.22 : Rapports de concentrations en HAP dans les sédiments des différents sites d'échantillonnage	147
Figure III.23 : Coupe transversale de glande digestive de moule au microscope pour les individus du Moulleau (A) et de Pen Bron (B) prélevés à la fin du mois d'août	148
Figure III.24 : Somme des concentrations en métabolites dans la bile (ng/g)	149
Figure III.25 : Somme de 15 HAP (12 des 16 HAP de l'US-EPA à partir du phénanthrène + 3 coéluants) dans les foies de flet	150

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau I.1 : Propriétés physico-chimiques des HAP	15
Tableau I.2 : Principaux accidents pétroliers depuis 1967 (http://www.itopf.com , 15 septembre 2003)	20
Tableau I.3 : Principaux accidents pétroliers ayant touché la France depuis 1967 (Gilbert, 1998; http://www.le-cedre.fr , 18 mars 2004; http://www.marenoire.com , 18 mars 2004; http://www.itopf.com , 18 mars 2004; http://www.polmar.com , 18 mars 2004)	21
Tableau I.4 : Classification des différents types de produits de raffinage, caractéristiques et comportement dans le milieu marin (Adapté de la classification de l'US-EPA (http://www.epa.gov/oilspill/refined.htm , 8 mai 2004) et de Marchand et Kantin, 1995)	23
Tableau I.5 : Contaminants suivis dans les organismes dans le cadre du RNO	25
Tableau I.6 : Dosages de HAP dissous réalisés dans le nord du golfe de Gascogne dans le cadre du RNO et du « suivi Erika » (Tronczynski et al., 2003)	27
Tableau I.7 : Classement des HAP en fonction de leur génotoxicité et de leur cancérogénicité	39
Tableau I.8 : Classification des mélanges de HAP, des milieux de travail et de sources mobiles par l'IARC (d'après Boffetta et al., 1997)	40
Tableau I.9 : Récapitulatif des facteurs d'équivalent toxique au benzo(a)pyrène	40
Tableau I.10 : Seuils de sécurité de concentrations en HAP dans l'eau (ng/l) concernant les organismes aquatiques dans différents pays et organisations (BKH, 1995; OSPARCOM, 1994; Rondeau, 2002)	41
Tableau I.11 : Valeurs guides de concentration (ng/g de poids sec) en HAP dans les organismes marins destinés à la consommation dans le cadre de la marée noire Erika (AFSSA, 2003)	42
Tableau I.12 : Principales études mettant en œuvre des biomarqueurs afin d'évaluer l'exposition aux HAP chez les organismes marins et ses effets	44
Tableau I.13 : Travaux mettant en oeuvre une extraction liquide-liquide des métabolites de HAP	46
Tableau I.14 : Principaux protocoles mettant en oeuvre une extraction sur phase solide C ₁₈ des métabolites de HAP	47
Tableau I.15 : Principaux travaux mettant en œuvre une purification CLHP d'échantillons de poissons	49

Tableau I.16 : Récapitulatif des études réalisées par analyse directe d'échantillons en CLHP-F sans étape de déconjugaison enzymatique	51
Tableau I.17 : Principales études concernant la mise au point du dosage des métabolites de HAP chez des organismes marins par SFS (Spectrométrie de Fluorescence Synchrone) et FF (Fluorescence Fixe)	52
Tableau I.18 : récapitulatif des études utilisant la GC/MS pour détecter les métabolites de HAP dans les organismes marins	53
Tableau I.19 : Travaux étudiant la distribution des métabolites dans différents organes de poisson dont la vésicule biliaire	55
Tableau I.20 : Principaux travaux étudiant le métabolisme du phénanthrène chez des organismes marins	58
Tableau I.21 : Proportion des principales classes de métabolites conjugués dans la bile de poissons exposés à du benzo(a)pyrène radioactif	59
Tableau I.22 : Pourcentage des différents métabolites identifiés après déconjugaison des conjugués glucuronidés et sulfatés dans la bile de poissons exposés à du benzo(a)pyrène	60
Tableau I.23 : Travaux étudiant la biotransformation du pyrène chez différents organismes	62
Tableau I.24 : Principaux métabolites de différents HAP chez des organismes aquatiques	63
Tableau I.25 : Métabolites identifiés après déconjugaison enzymatique dans la bile de poissons exposés à des produits pétroliers	64
Tableau I.26 : Concentration en métabolites de HAP légers identifiés dans la bile de 2 espèces de poissons exposées à du pétrole brut altéré par injection intra-musculaire (Krahn et al., 1992)	65
Tableau I.27 : Etudes de terrain réalisant des dosages quantitatifs de métabolites individuels dans la bile de poisson	71
Tableau I.28 : Travaux consistant à évaluer la biodisponibilité des HAP en milieu naturel lors de pollutions ponctuelles par un dosage semi-quantitatif global	72
Tableau I.29 : Concentration (ng/g) des métabolites biliaires détectés par CPG/SM chez 2 espèces de poissons après la marée noire de l'Exxon Valdez (d'après Krahn et al., 1992)	74
Tableau I.30 : Concentrations minimales et maximales en métabolites détectées dans la bile de bossus dorés (<i>Lethrinus kallopterus</i>) collectés un an après la marée noire consécutive de la guerre du golfe (Krahn et al., 1993a)	75
Tableau I.31 : Travaux consistant à évaluer la biodisponibilité des HAP en milieu naturel lors de pollutions chroniques par un dosage semi-quantitatif global	77
Tableau I.32 : Travaux consistant à évaluer la biodisponibilité des HAP en milieu naturel lors de pollutions diffuses par un dosage semi-quantitatif global	79

Tableau I.33 : Concentrations extrêmes de métabolites dosés individuellement dans la bile de poissons collectés dans différents environnements	80
Tableau I.34 : Concentrations (ng/ml) extrêmes de métabolites dosés dans la bile d'anguilles <i>Anguilla anguilla</i> collectées dans différents estuaires anglais (d'après Ruddock et al., 2003)	81
Tableau I.35 : Récapitulatif des métabolites détectés dans la bile de poissons collectés dans différents environnements et concentrations (ng/g)	82

Chapitre II

Tableau II.1 : Récapitulatif des échantillonnages de soles réalisés le long de la côte Atlantique lors des 5 campagnes réalisées	93
Tableau II.2 : Récapitulatif des expérimentations réalisées avec du fuel lourd n°2	94
Tableau II.3 : Récapitulatif des expositions aux HAP individuels et des échantillonnages réalisés	96
Tableau II.4 : Récapitulatif des quatre missions de caging de moules réalisées au cours de l'année 2001 dans le Traict du Croisic	99
Tableau II.5 : Récapitulatif des échantillonnages de flets	103
Tableau II.6 : Liste résumée des composés dosés ainsi que des étalons internes utilisés pour les quantifier et de ceux servant à contrôler les rendements du protocole	106
Tableau II.7 : Principaux ions (m/z) caractéristiques des spectres de masse obtenus par CPG/SM avec et sans dérivation	113
Tableau II.8 : Principaux ions (m/z) caractéristiques des spectres de masse obtenus par CLHP/SM	115

Chapitre III

Tableau III.1 : Rendements d'extraction obtenus pour les différents composés étudiés par rapport à l'étalon interne pour les différentes étapes du protocole de dosage ainsi que pour le protocole entier (n=3)	122
Tableau III.2 : Concentration en ng/g des différents métabolites détectés dans la bile de flet (n=3)	123
Tableau III.3 : Facteurs de bioconcentration (BCF) dans les foies pour les différents groupes de HAP définis au début de cette étude	132
Tableau III.4 : Facteurs de bioconcentration (BCF) dans les muscles pour les différents groupes de HAP définis au début de cette étude	133
Tableau III.5 : Facteurs de biotransformation dans la bile	135

Tableau III.6 : Récapitulatif des teneurs globales en HAP dans l'eau et en métabolites dans la bile pour les expérimentations I et II

INTRODUCTION GENERALE

Depuis l'accélération de l'industrialisation des pays européens et nord américains au cours du XIX^{ème} siècle, l'environnement est soumis à une forte pression anthropique (surexploitation des ressources naturelles, contamination chimique et modification physique du milieu naturel, ...). Les activités liées à cette révolution industrielle (production d'énergie, métallurgie, chimie de synthèse, agriculture, traitement des déchets, ...) ont engendré l'introduction en grandes quantités de divers contaminants dans l'environnement (hydrocarbures, substances radioactives, métaux, dioxines, solvants, polychlorobiphényles, alkylphénols, pesticides, engrais, ...). Les contaminants présentant des propriétés toxiques, c'est-à-dire possédant la capacité d'altérer les fonctions biologiques, sont appelés polluants ou xénobiotiques.

La forte exploitation du charbon puis du pétrole s'est ainsi ajoutée à l'utilisation du bois pour le chauffage ainsi qu'aux phénomènes naturels (feux de forêt, volcanisme, fuite de réservoirs naturels de pétrole) comme sources d'hydrocarbures. Ces contaminants sont rejetés dans l'atmosphère, l'eau et les sols, et tendent *in fine* à rejoindre les océans par le jeu de différents mécanismes de transport (Neff, 1979 ; McElroy et al., 1989).

Au sein de cette famille chimique, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) occupent une place particulière en raison de leurs propriétés toxiques (IARC, 1983; Baumann, 1989; NTP, 1999). Pour connaître le niveau de pollution en HAP du milieu marin, la mesure de la concentration en HAP dans celui-ci (eau, sédiment) est généralement réalisée mais ne reflète pas nécessairement la biodisponibilité de ces contaminants vis-à-vis des organismes marins. Dans l'optique de combler cette lacune, l'exposition des êtres vivants est évaluée par le dosage des HAP présents dans les tissus des organismes et plus particulièrement des bivalves. Ces mesures permettent de plus d'estimer les risques sanitaires pour l'homme de la consommation des produits de la mer.

Cependant, dans le cas d'organismes supérieurs tels que les poissons, cette approche est peu utile compte tenu de leurs capacités de biotransformation (Varanasi et al., 1989a ; Altenburger et al., 2003). L'étude des poissons présente un intérêt particulier en raison de leur importance économique et de la fragilisation généralisée des stocks de poissons notamment observée en Atlantique du nord-est (CIEM, 1996; OSPAR, 2000; EEA, 2002). Ces organismes sont présents dans l'ensemble de l'océan mondial (zone intertidale et subtidale, milieu estuarien, côtier et océan profond). Leur étude plus systématique permettrait donc de ne pas se limiter à la zone intertidale. D'autre part, en raison des propriétés toxiques exercées par les HAP une fois biotransformés (Varanasi et al., 1989a; Harvey, 1991; IPCS, 1998; Akcha et al., 2003), l'extension des travaux à l'étude des métabolites de HAP permettrait de mieux comprendre et de mieux évaluer la toxicité liée à la contamination du milieu par les HAP.

Les travaux réalisés lors de ce doctorat ont pour objectif d'étudier la possibilité d'utiliser les produits de biotransformation des HAP comme biomarqueurs d'exposition des organismes aux HAP dans le milieu marin. Pour cela, une méthode de dosage des métabolites de HAP chez les organismes a tout d'abord été mise au point. Ensuite, ce protocole analytique a été appliqué dans le cadre d'expositions de poissons à des HAP et à des produits pétroliers en laboratoire afin de mieux comprendre les phénomènes liés à la biotransformation des HAP en milieu contrôlé. Le dosage des métabolites de HAP a ensuite été appliqué dans le cadre d'études de terrain afin d'évaluer l'exposition de poissons aux HAP dans le cas de deux types de contamination différentes : le déversement d'un fioul lourd en mer suite au naufrage du pétrolier Erika au large de la côte atlantique française et la contamination provoquée par la forte activité industrielle sur le bassin versant d'un grand fleuve français, la Seine, au niveau de son embouchure. En parallèle, le suivi de la contamination du Traict du Croisic dans le temps plus de un an après la marée noire Erika a également été évaluée en utilisant les capacités de bioaccumulation de moules transplantées.

Dans une première partie, ce manuscrit présente les hydrocarbures aromatiques polycycliques, leurs origines, ainsi que leur comportement et leur devenir dans l'environnement. Le cas des

marées noires est ensuite décrit plus précisément. Enfin les principaux réseaux de surveillance environnementaux existant en France et les niveaux de contamination en HAP de l'environnement et des organismes marins en différents endroits du globe sont présentés.

Dans une seconde partie, les différentes études réalisées lors de ce travail sont présentées et les différentes techniques d'analyse mises en œuvre sont décrites.

La troisième partie du manuscrit est consacrée à la synthèse des résultats acquis lors de ces études.

Pour finir, ces résultats ont donné lieu à la rédaction de différentes publications présentées en fin de manuscrit. Dans un premier temps la mise au point du protocole de dosage des produits de biotransformation des HAP est présentée (Publications 1 et 2). Ensuite, les résultats obtenus lors des expérimentations en laboratoire sont exposés et discutés en détail (Publications 3, 4 et 5). Enfin, l'évaluation de l'exposition des soles aux HAP lors de la marée noire Erika (Publications 6, 7 et 8) ainsi que des moules (Publication 9) est présentée. L'étude de l'exposition des flets aux HAP en embouchure de Seine est exposée dans une dernière publication (Publication 10).

CHAPITRE I : SYNTHÈSE **BIBLIOGRAPHIQUE**

Ce chapitre expose le contexte scientifique de l'étude en établissant un état des lieux des connaissances actuelles.

Résumé :

Les HAP sont des contaminants ubiquistes de l'environnement en raison de la multiplicité de leurs sources, de leur capacité de transport et de leur stabilité. Leur forte hydrophobicité leur confère une grande capacité à s'adsorber sur les particules et à s'accumuler dans les sédiments dans les sédiments marins notamment. Cette hydrophobicité les rend également facilement accumulables dans les réserves lipidiques des invertébrés marins.

De nombreuses études ont mis en évidence une forte corrélation entre la teneur en HAP dans les sédiments et la présence de tumeurs hépatiques chez les poissons. Pourtant, certains travaux ont montré que des poissons capturés dans des zones fortement contaminées en HAP ne présentaient pas de fortes teneurs en contaminants dans leurs tissus. En effet, bien que les invertébrés comme les mollusques accumulent les HAP, les vertébrés ont tendance à biotransformer majoritairement ces molécules afin de les éliminer. Cependant, au cours de ces processus de biotransformation, certains intermédiaires se révèlent réactifs et capables de se lier de manière covalente avec des constituants cellulaires comme l'ADN ou les protéines, révélant alors notamment des propriétés mutagènes et cancérigènes.

Dans les années 70 et 80, des travaux ont été réalisés afin d'étudier le métabolisme des HAP par les organismes marins et de comprendre leurs mécanismes de toxicité. Ces études consistaient principalement à exposer des organismes ou des préparations hépatiques à des HAP radioactifs en laboratoire et ont permis d'identifier les principaux métabolites formés ainsi que leur principal lieu de stockage avant excrétion, la vésicule biliaire. A partir du milieu des années 80, des études ont commencé à s'intéresser aux métabolites de HAP en tant que biomarqueurs d'exposition des poissons aux HAP dans l'environnement afin d'évaluer le niveau de contamination du milieu et de mettre en évidence la biodisponibilité de ces contaminants vis-à-vis des organismes en vue de prédire les effets d'une telle contamination sur ceux-ci. La grande majorité de ces études s'attache uniquement à évaluer une quantité globale de métabolites (ou de classes de métabolites) dans la vésicule biliaire par une méthode semi-quantitative de détection, la fluorescence. Cependant, quelques travaux ont quantifié des métabolites biliaires individuels.

1. LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES	11
1.1. LES COMPOSES ETUDIES :	11
1.2. ORIGINE DES HAP :	12
1.3. CARACTERISATION DES SOURCES DE HAP :	12
1.3.1. Généralités :	12
1.3.2. Altération de l’empreinte :	13
1.4. COMPORTEMENT ET DEVENIR DES HAP DANS L’ENVIRONNEMENT :	14
1.4.1. Propriétés physico-chimiques :	14
1.4.2. Cycles biogéochimiques :	14
a) Généralités :	14
b) Comportement dans le milieu marin :	16
1.5. CAS DES MAREES NOIRES :	17
1.5.1. Origines :	17
1.5.2. Historique :	18
1.5.3. Les produits pétroliers :	21
a) Composition :	21
b) Classification des pétroles bruts :	22
c) Classification des produits de raffinage :	23
1.5.4. Comportement dans le milieu marin :	23
1.6. LES RESEAUX DE SURVEILLANCE :	24
1.7. LA MAREE NOIRE ERIKA DANS LE CONTEXTE DE LA CONTAMINATION CHRONIQUE DU MILIEU MARIN FRANÇAIS ET MONDIAL :	26
1.7.1. L’eau :	26
1.7.2. Les sédiments :	28
1.7.3. Les organismes :	28
2. BIOTRANSFORMATION ET TOXICITE DES HAP DANS LE MILIEU MARIN	30
2.1. MECANISMES DE BIOTRANSFORMATION :	30
2.1.1. Phase de fonctionnalisation :	31
2.1.2. Phase de conjugaison :	33
2.2. TOXICITE :	34
2.2.1. Mécanismes de toxicité :	34
a) Génotoxicité et cancérogénicité :	34
b) Effets sur la reproduction et le développement :	36

c) Autres effets :	37
2.2.2. Données toxicologiques :	37
a) Toxicité aiguë :	38
b) Toxicité chronique :	38
c) Classement des HAP en fonction de leur toxicité et valeurs guides :	38
2.2.3. Biomarqueurs :	43
3. LES METABOLITES DE HAP	44
3.1. TECHNIQUES ANALYTIQUES :	45
3.1.1. Déconjugaison :	45
3.1.2. Extraction :	45
a) Extraction liquide-liquide :	45
b) Extraction sur phase solide (SPE) :	47
c) Micro-extraction sur phase solide (SPME) :	48
3.1.3. Purification :	48
3.1.4. Séparation et détection des métabolites :	49
a) Techniques de spectrofluorimétrie :	50
Chromatographie en phase liquide haute performance couplée à la spectrofluorimétrie (CLHP-F)	50
Spectrométrie de fluorescence synchrone (SFS)	52
Fluorescence fixe (FF)	52
b) Techniques de spectrométrie de masse :	52
Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)	53
Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-SM)	53
Autres techniques	53
3.2. ETUDE DU METABOLISME ET IDENTIFICATION DES METABOLITES :	54
3.2.1. Localisation des métabolites chez les organismes aquatiques :	54
3.2.2. Identification des métabolites :	55
a) Généralités :	55
b) Naphtalène :	56
c) Phénanthrène :	56
d) Benzo(a)pyrène :	58
e) Pyrène :	61
f) Autres HAP :	62
g) Produits pétroliers :	63
3.3. ETUDE DU METABOLISME DES HAP :	65
3.3.1. Facteurs influençant le devenir des HAP :	65
a) Période de reproduction :	65
b) Age :	66
c) Température :	66
d) Nourriture :	67
e) Présence d'autres contaminants :	67

3.3.2. Différences entre espèces de poisson :	67
a) Différences quantitatives :	67
b) Différences qualitatives :	68
3.3.3. Etude cinétique du métabolisme des HAP :	68
a) Exposition ponctuelle et unique :	68
b) Exposition prolongée :	69
3.4. APPLICATION A LA SURVEILLANCE ENVIRONNEMENTALE :	70
3.4.1. Pollutions ponctuelles :	72
a) La marée noire de l'Exxon Valdez :	72
b) Autres pollutions pétrolières :	73
c) Autres pollutions ponctuelles d'origine anthropique :	75
d) Pollutions ponctuelles d'origine naturelle :	76
3.4.2. Pollutions chroniques :	76
3.4.3. Pollutions diffuses :	78
BUT DES TRAVAUX	83

1. LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES

1.1. LES COMPOSES ETUDIÉS :

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont une famille de molécules constituées uniquement de carbone et d'hydrogène dont la structure comprend au moins 2 cycles aromatiques fusionnés, chacun composé de 5 ou 6 atomes de carbone, et pouvant être substitués. Le HAP le plus simple, composé de deux cycles aromatiques fusionnés, est le naphthalène. Dans l'environnement, les HAP composés de 2 à 7 noyaux aromatiques sont les plus présents et les plus mobiles (Neff, 1979). La formule des principaux HAP non substitués classiquement étudiés est représentée sur la Figure I.1.

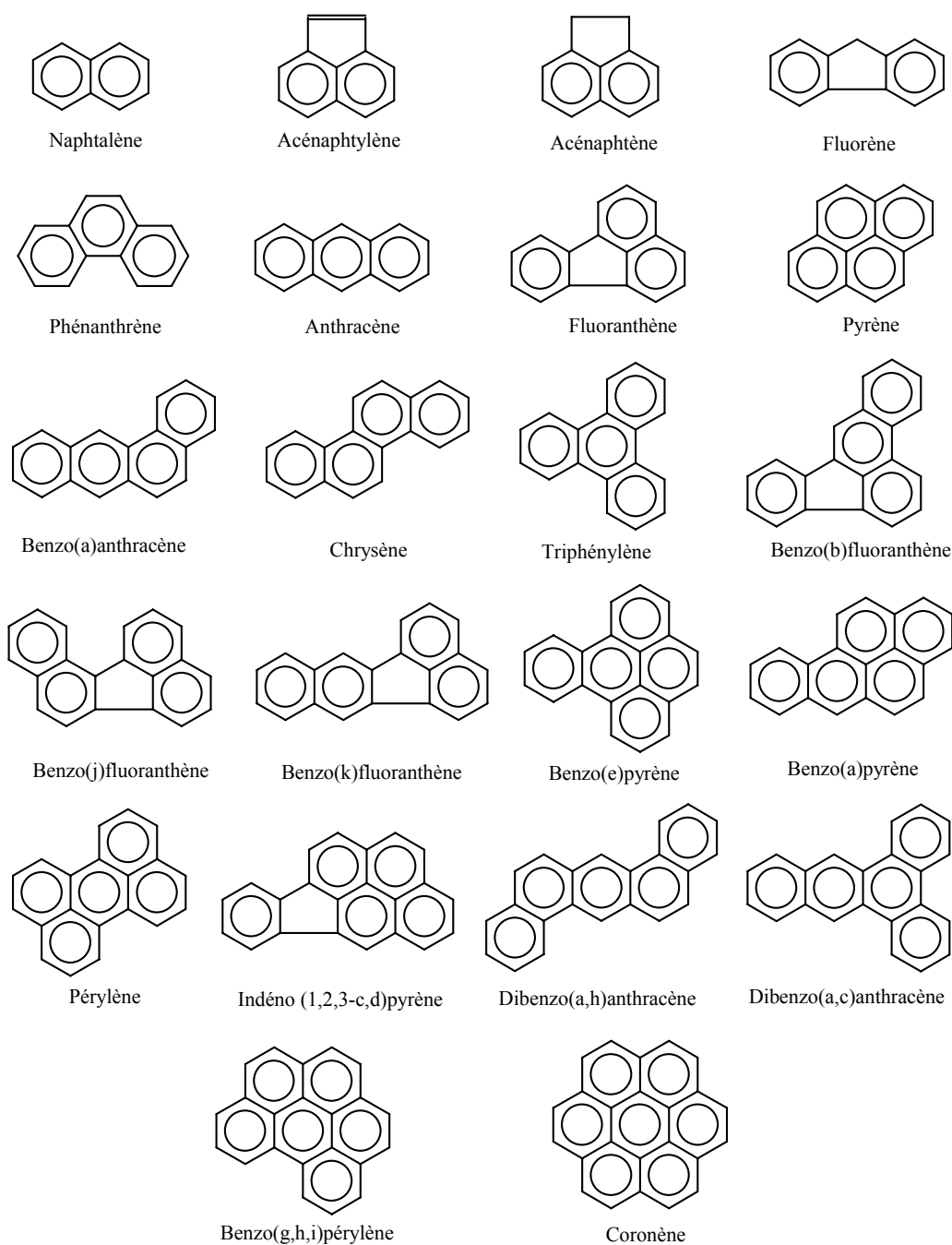


Figure I.1 : Formule semi-développée des principaux HAP parents étudiés

Des composés aromatiques polycycliques contenant des hétéroatomes (soufre, azote, oxygène) sont également présents en quantités importantes dans l'environnement (Clark et MacLeod, 1977).

1.2. ORIGINE DES HAP :

Les différentes sources de HAP ont pour point commun de produire des mélanges de composés. Il est établi que la majeure partie d'entre eux est d'origine pyrolytique (McElroy et al., 1989). Ces HAP proviennent de la combustion incomplète de la matière organique à haute température (Hase et Hites, 1978). Cette origine peut être naturelle (feux de forêts (U.S. National Academy of Sciences, 1972; Youngblood et Blummer, 1975; Freeman et Cattell, 1990), éruptions volcaniques (Greiner et al., 1977)) ou plus généralement anthropique (activité industrielle (production d'aluminium, d'énergie, cokeries), automobile, incinération des déchets, chauffage domestique). La fumée de cigarette (Schmeltz et Hoffmann, 1976) ainsi que certains procédés de préparation et de cuisson des aliments (fumage, grillade, chauffage de l'huile de cuisine) constituent également une source pyrolytique non négligeable d'exposition de l'homme aux HAP.

Les HAP peuvent également être d'origine pétrogénique, issus de la maturation lente (plusieurs millions d'années) de la matière organique lors de la diagenèse et de la catagenèse dans le milieu sédimentaire profond (plusieurs milliers de mètres de profondeur à des températures de 100 à 150°C et des pressions de 300 à 1500 bars). Ces mécanismes produisent des mélanges complexes appelés pétroles dont la part massique des composés aromatiques atteint 20 à 45%, les HAP (HAP alkylés et soufrés compris) représentant environ 65% des aromatiques (Tissot et Welte, 1978). Ces composés sont introduits dans le milieu marin soit lors de déversements pétroliers dus à l'activité humaine (naufrages, dégazages, activité des plates-formes pétrolières), soit par des fuites de réservoirs naturels à travers l'écorce terrestre (Neff, 1979; Laflamme et Hites, 1979; Wakeham et al., 1980a; GESAMP, 1993 ; U.S. National Academy of Sciences, 2003).

Enfin, les HAP peuvent dériver de la modification chimique lors de la diagenèse précoce de précurseurs naturels (origine diagénétique), tels que les terpénoïdes, les pigments, les stéroïdes, les quinones, accumulés dans les dépôts sédimentaires (Aizenshtat, 1973; Neff, 1979; Laflamme et Hites, 1979; Wakeham et al., 1980a). Cette dernière source est toutefois minoritaire par rapport aux deux autres excepté en certains endroits très localisés (Budzinski et al., 1997).

1.3. CARACTERISATION DES SOURCES DE HAP :

1.3.1. Généralités :

Les différentes sources de HAP produisent des mélanges de HAP dont l'abondance relative constitue une empreinte moléculaire spécifique. Ces caractéristiques peuvent permettre de déterminer l'origine de la contamination d'un environnement donné.

Ces différences d'abondances relatives sont dues à la température de formation des HAP et à la composition chimique de la matière organique d'origine (précurseurs naturels). Lors de la formation de pétrole, la lente maturation de la matière organique à faible température (inférieure à 200°C) permet la formation de composés de plus faible poids moléculaire et de HAP substitués. Lors de la pyrolyse, des températures plus élevées sont atteintes, pouvant aller jusqu'à 1500 - 2000°C (activité industrielle, moteur automobile), et permettent la formation de composés de plus haut poids moléculaire. A ces températures, les composés substitués ne sont pas stables. Il faut des températures inférieures à 800°C (feux de forêt, cigarette) pour en former en quantité non

négligeable (Youngblood et Blumer, 1975; Laflamme et Hites, 1978; Neff, 1979; Wakeham et al., 1980a).

Ainsi, les processus pyrolytiques produisent majoritairement des HAP non substitués sans discrimination de masse alors que les pétroles sont plus riches en composés de plus faible poids moléculaire et substitués (Reed et Kaplan, 1977; Budzinski, 1993).

L'utilisation d'indices exprimant le rapport de composés substitués sur composés parents peut alors permettre de déterminer une source de contamination (Youngblood et Blumer, 1975; Laflamme et Hites, 1978; Wakeham et al., 1980a et b; Hughes, 1984; Barrick et Prahl, 1987; Readman et al., 1987; Kvalheim et al., 1987; Garrigues et al., 1988, 1990; Bouloubassi et Salot, 1993; Budzinski et al., 1993a et b, 1995a, 1997; Yunker et al., 1993, 1999, 2002; Fernandes et Sicre, 1999).

Les différences de stabilité thermodynamique entre isomères parents s'avèrent également discriminantes (Blumer, 1976; Gschwend et Hites, 1981; Sicre et al., 1987; Yunker et McDonald, 1995; Yunker et al., 1996, Yunker, 2002; Budzinski et al., 1997). Ainsi, le phénanthrène (Phe) et le pyrène (P) sont respectivement plus stables que l'anthracène (A) et le fluoranthène (F), leurs isomères respectifs (Alberty et Reif, 1988). Des rapports Phe/A inférieurs à 10 et F/P supérieurs à 1 sont caractéristiques d'une origine pyrolytique (Soclo, 1986; Sicre et al., 1987; Raoux, 1991; Baumard et al., 1998a). Cependant, il est préférable de croiser les deux indices pour une meilleure fiabilité (Budzinski et al., 1998, Yunker et al., 2002).

Les rapports entre HAP concernent en général des composés de même masse moléculaire pour éviter de comparer des composés qui ont des comportements différents vis-à-vis de la volatilité, la solubilité dans l'eau, l'adsorption..., ceci pouvant fausser les rapports (Readman et al., 1987; McVeety et Hites, 1988).

Dans le cas d'une origine diagénétique, l'empreinte est moins complexe que dans les deux cas précédents. La présence en quantité non négligeable de quelques composés comme le pérylène est caractéristique de cette origine. Le pérylène pourrait provenir de pigments d'origine terrestre et de structures quinoniques (Venkatesan, 1988; Budzinski et al., 1997).

1.3.2. Altération de l'empreinte :

Les HAP sont soumis à différents processus (physico-chimiques et biologiques) dans le milieu marin altérant leur empreinte moléculaire. Certains phénomènes comme la biodégradation peuvent être mis en évidence par l'observation de la modification de cette empreinte entre le pétrole d'origine et le résidu échantillonné. Ainsi, la biodégradation conduit à des dégradations sélectives entre isomères alkylés de HAP (Bayona et al., 1986; Wang et Fingas, 1995a; Budzinski et al., 1998). La distribution relative des méthyl-dibenzothiophènes a par exemple permis, dans le cas d'échantillons récupérés 12 ans après la marée noire ayant eu lieu dans les îles Baffin, de mettre en évidence l'effet de la biodégradation (Wang et Fingas, 1995b). En effet, la distribution des méthyl-dibenzothiophènes dans les résidus retrouvés est caractérisée par une plus faible abondance relative du 3+2 méthyl-dibenzothiophènes (isomères les plus rapidement biodégradés) par rapport au pétrole déversé 12 ans plutôt. Dans une étude portant sur le suivi de la contamination des sédiments pendant 36 mois après la marée noire de l'Exxon Valdez, Hostettler et Kvenvolden (1994) ont mis en évidence la dégradation préférentielle du 2- et du 3-méthylphénanthrène par rapport au 9- et au 1-méthylphénanthrène.

1.4. COMPORTEMENT ET DEVENIR DES HAP DANS L'ENVIRONNEMENT :

La distribution des HAP dans les différents compartiments de l'environnement est régie par leurs propriétés physico-chimiques (lipophilie, stabilité, réactivité...) (Mackay, 1991).

1.4.1. Propriétés physico-chimiques :

Les HAP se trouvent sous forme solide à température ambiante et sont plutôt inertes chimiquement. Ils sont faiblement polaires avec des points d'ébullition et de fusion élevés.

Certains paramètres et indices décrivant les coefficients de partage des HAP entre différents milieux ont été évalués afin de connaître et de comparer l'affinité de ces composés pour tel ou tel milieu (Tableau I.1). Ils permettent de mieux comprendre le comportement des HAP dans les différents compartiments de l'environnement (sol et sédiment, eau et atmosphère). Leur faible pression de vapeur leur confère une volatilité limitée dans l'atmosphère (hormis les HAP les plus légers). Ils sont d'autant moins solubles dans l'eau et d'autant plus hydrophobes (hydrophobicité évaluée par le Log de Kow) et incorporables à la matière organique (Koc et Kp) que leur masse moléculaire est élevée. Ainsi, la solubilité du phénanthrène dans l'eau est, par exemple, plus de 500 fois supérieure à celle du benzo[a]pyrène. De même, les composés alkylés sont plus hydrophobes que les composés parents.

1.4.2. Cycles biogéochimiques :

a) Généralités :

Les HAP sont des contaminants ubiquistes de l'environnement, c'est-à-dire qu'ils sont présents dans tous les compartiments de celui-ci (Blumer, 1976; Neff, 1979; IARC, 1983; McElroy et al., 1989; Menzie et al., 1992). Cette caractéristique s'explique par la multiplicité de leurs sources, mais également par leur stabilité et leur transport sur de longues distances (Lunde et Bjorseth, 1977; Windsor et Hites, 1979; Neff, 1985; Law et Biscaya, 1994). Ils sont présents sous différentes formes dans l'environnement. Dans l'atmosphère, ils peuvent être sous forme gazeuse ou adsorbés sur les particules atmosphériques. Dans l'eau, ils se trouvent sous forme dissoute, associés à la matière organique dissoute ou adsorbés sur les particules (ou colloïdes) en suspension. Enfin, dans les sédiments, ils sont principalement adsorbés sur les particules mais peuvent également être dissous dans l'eau interstitielle.

Les HAP peuvent être transportés sur de longues distances dans l'atmosphère (Windsor et Hites, 1979; Bjorseth et Olufsen, 1983) puis transférés au milieu continental ou marin par dépôt sec ou humide (Neff, 1979). Les HAP déposés sur le milieu continental peuvent également atteindre le milieu marin par lessivage des sols (Brummage, 1975; Borneff, 1977; MacKenzie et Hunter, 1979; Brown et al., 1985; Latimer et al., 1990) puis par les transports fluviaux (Figure I.2).

Au cours de ces transports, les HAP peuvent subir des transformations. Des mécanismes chimiques ou physiques peuvent ainsi avoir lieu, consistant en des oxydations chimiques ou photo-oxydations en présence d'oxygène, d'ozone ou de radicaux hydroxyles sous l'effet du rayonnement solaire. Les produits formés sont des cétones, aldéhydes, acides carboxyliques... (Butler et Crossley, 1981; Nikolaou et al., 1984; Behymer et Hites, 1985; Baek et al., 1991; Atkinson et Arey, 1994; Barbas et al., 1996; Allen et al., 1997; Letzel et al., 1999; Rivas et al., 2000). Les HAP peuvent également être absorbés puis accumulés ou transformés par les êtres vivants.

Composé	Pression de vapeur saturante ^a à 25°C (Pa) ⁽¹⁾	Solubilité dans l'eau ^b (mg/l) à 25°C ⁽⁶⁾	Log Kow ^{c(8)}	Log Koc ^d CO/eau ⁽²⁾	Log Kp ou Kd ^e sédiment/eau ⁽⁹⁾	Log Ksa ^f sol/air ⁽⁵⁾	Log Kea ^g eau/air ⁽⁵⁾	Cte de Henry ^h atm.m ³ /mol 10 ⁻⁶ air/eau ⁽²⁾
N	10,5 ⁽²⁾	31,8 ^(2,4)	3,4 ^(2,4)	3,0	1,7 ⁽⁴⁾	3,4	1,7	483 ⁽²⁾ 490 ⁽⁴⁾
Ae	0,356 ⁽²⁾	3,7 ⁽²⁾	3,9 ⁽²⁾	3,7	-	-	-	145
Fe	9.10 ⁻² ⁽²⁾	1,98 ⁽²⁾	4,2 ⁽²⁾	3,9	-	-	-	91
Phe	1,8.10 ⁻²	1,2 ⁽²⁾ 1,28 ⁽⁵⁾	4,6 ⁽²⁾ 4,57 ⁽⁷⁾	4,2	2,73	6,6	2,8	39,3
A	7,5.10 ⁻⁴	1,29 ⁽²⁾	4,57	4,4	2,73	-	-	49,7
1-C ₁ Phe	-	1,53 ⁽⁷⁾	-	-	-	-	-	-
2-C ₁ Phe	-	0,98 ⁽⁷⁾	-	-	-	-	-	-
3-C ₁ Phe	-	2,11 ⁽⁷⁾	-	-	-	-	-	-
4-C ₁ Phe	-	2,50 ⁽⁷⁾	-	-	-	-	-	-
9-C ₁ Phe	-	1,92 ⁽⁷⁾	-	-	-	-	-	-
2-C ₁ A	-	3.10 ⁻²	5,07	-	3,30	-	-	-
DBT	-	1,03	4,38	-	2,51	-	-	-
F	1,2.10 ⁻³ ⁽²⁾	0,26 ^(2,5) 0,3 ⁽⁴⁾	5,1 ⁽²⁾ 5,2 ⁽⁴⁾ 5,17 ⁽⁷⁾	4,9	3,7 ⁽⁴⁾ 3,42 ⁽⁸⁾	7,2	3,5	11,6-16,1 ⁽²⁾ 6,5 ⁽⁴⁾
P	8,86.10 ⁻⁴ ⁽³⁾	0,15	5,2 ⁽⁴⁾ 5,17 ⁽⁷⁾	-	3,7 ⁽⁴⁾ 3,42 ⁽⁸⁾	7,4	3,7	5 ⁽⁴⁾
BaA	7,3.10 ⁻⁶	1,1.10 ⁻²	5,84	-	4,19	-	-	-
C	5,7.10 ⁻⁷	3.10 ⁻³	5,84	-	4,19	-	-	-
T	2,3.10 ⁻⁶	4,1.10 ⁻²	5,69	-	4,02	-	-	-
BbF	-	0,001 ⁽⁴⁾ 1,5.10 ⁻³ ⁽⁵⁾	6,6 ⁽²⁾ 6,4 ⁽⁴⁾ 6,44 ⁽⁷⁾	5,2-5,8	5,0 ⁽⁴⁾ 4,88 ⁽⁸⁾	8,3	3,3	12 ⁽⁴⁾
BkF	6.10 ⁻⁷	7,6.10 ⁻⁴ ⁽²⁾ 7,6.10 ⁻⁴ ⁽⁵⁾	6,8 ⁽²⁾ 6,44 ⁽⁷⁾	5,9	4,88	-	-	0,68
BjF	-	2,5.10 ⁻³	6,44	-	4,88	-	-	-
BeP	-	6,3.10 ⁻³	6,44	-	4,88	-	-	-
BaP	7,3.10 ⁻⁷ ⁽²⁾	3,8.10 ⁻³ 3.10 ⁻³ ⁽²⁾ 2.10 ⁻³ ⁽⁴⁾	6,44 6,0 ⁽²⁾ 6,4 ⁽⁴⁾	6,0	4,88 4,7 ⁽⁴⁾	8,9	4,2	0,4
Per	-	3,0.10 ⁻³	6,44	-	4,88	-	-	-
IP	-	1,9.10 ⁻⁴	6,6 ⁽²⁾ 7,04 ⁽⁷⁾	6,8	5,57	-	-	0,29
BPer	6.10 ⁻⁸	5,5.10 ⁻³	7,04	-	5,57	-	-	-
DBahA	3,7.10 ⁻¹⁰	5.10 ⁻⁴ ^(2,5) 3.10 ⁻⁴ ⁽⁴⁾	6,7 ⁽²⁾ 7,1 ⁽⁴⁾ 7,11 ⁽⁷⁾	6,1	5,6 ⁽⁴⁾ 5,65 ⁽⁸⁾	11,2	5,6	0,047 ⁽²⁾ 0,05 ⁽⁴⁾
DBacA	1,3.10 ⁻⁹	2,3.10 ⁻²	7,1	-	5,65	-	-	-
DBajA	-	1,2.10 ⁻²	7,11	-	5,65	-	-	-

⁽¹⁾ De Kruif, 1980; ⁽²⁾ Fiches toxicologiques de l'INERIS; ⁽³⁾ Mackay et Shiu, 1981; ⁽⁴⁾ Rapport de l'ADEME, 1995, fiche n°4; ⁽⁵⁾ Pearlman et al., 1984; ⁽⁶⁾ Karcher et al., 1991; ⁽⁷⁾ Govers, 1984; ⁽⁸⁾ Karcher, 1988

^a La pression de vapeur saturante est la pression de saturation au-dessus d'une substance liquide ou solide

^b La solubilité dans l'eau d'une substance est la concentration massique de la substance dans l'eau à saturation

^c Kow : Coefficient de partage n-octanol/eau. Ce coefficient est défini comme le rapport des concentrations d'équilibre d'une substance dissoute dans un système à deux phases constitué de deux solvants qui ne se mélangent pratiquement pas

^d Koc : Coefficient de partage carbone organique/eau. Ce coefficient est défini comme le rapport entre la quantité adsorbée d'un composé par unité de masse de carbone organique du sol ou du sédiment et la concentration de ce même composé en solution aqueuse à l'équilibre

^e Kd : Coefficient de partage sédiment/eau. Ce coefficient est défini comme le rapport entre la concentration en élément adsorbé sur les sédiments et la concentration de ce même composé en solution aqueuse à l'équilibre

^f Ksa : Coefficient de partage sol/air

^g Kea : Coefficient de partage eau/air

^h La constante de Henry caractérise la propriété d'une substance à se partager entre les deux phases d'un système binaire air/eau (ici, à 25°C)

Tableau I.1 : Propriétés physico-chimiques des HAP

b) Comportement dans le milieu marin :

Du fait de leurs propriétés physico-chimiques, les HAP introduits dans le milieu marin ont tendance à s'associer à la matière organique dissoute ou à s'adsorber sur la matière en suspension présente dans l'eau (Neff, 1979; Gardner, 1979; Knezovich et al., 1987; Landrum et Robbins, 1990) et à sédimenter.

Ils peuvent également se concentrer dans le film hydrophobe présent à la surface de l'eau (Cincinelli et al., 2001). Lors de leur sédimentation, les HAP peuvent également être photo-oxydés dans la zone photique (Zepp et Schlotzhauer, 1979; Mill et al., 1981) ou bien être biodégradés par des bactéries (Neff, 1985; Cerniglia et Heitkamp, 1989; Cerniglia et al., 1994; Narro et al., 1992; Brodkorb et Legge, 1992; Sutherland et al., 1995; Ravelet et al., 2000; Yuste et al., 2000; Grishchenkov et al., 2000). La sédimentation aboutit à l'incorporation des HAP dans les sédiments qui constituent un compartiment de stockage important des contaminants hydrophobes (Clark et MacLeod, 1977; McElroy, 1989; James et Kleinow, 1994). En 1997, une étude de Lipiatou et al. concernant la zone ouest de la Méditerranée a estimé que 50% des HAP introduits dans cette zone finissent incorporés dans les sédiments côtiers (0-200m de profondeur) et près de 13% dans les sédiments compris entre 1000 et 2000m de profondeur.

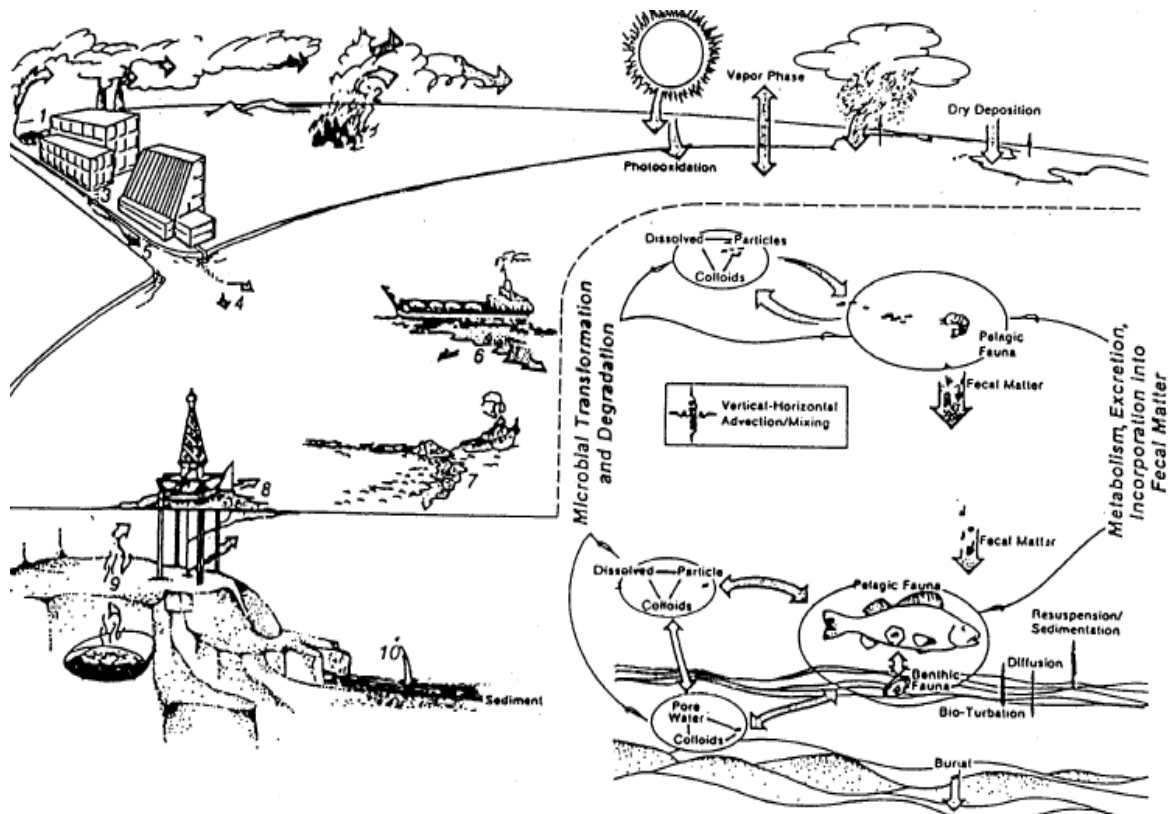


Figure I.2 : Schéma récapitulatif des cycles biogéochimiques des HAP dans l'environnement (d'après McElroy et al., 1989)

Des phénomènes de biodégradation peuvent également avoir lieu dans les sédiments et affectent particulièrement les HAP de faible poids moléculaire (Bailey et al., 1973; Gardner et al., 1979; Sims et al., 1990; Bence et al. 1996; Douglas et al. 1996; Venosa et al., 1996; Sugiura et al., 1997). Les HAP peuvent également être libérés dans la colonne d'eau par des phénomènes de remise en suspension dus aux courants marins ainsi que par la bioturbation (Windsor et Hites, 1979; Karickhoff et Morris, 1985; McElroy et al., 1990).

Cependant, outre leurs propriétés physico-chimiques, la distribution des HAP dans l'environnement marin dépend également des caractéristiques du milieu. Ainsi, l'affinité des HAP pour les particules en suspension ou les sédiments peut varier en fonction de différents paramètres liés au milieu (Landrum et al., 1992; Harkey et al., 1994). La teneur en carbone organique, la granulométrie, le temps de contact avec le polluant (Harkey et al., 1994) et l'âge de la matrice sont des paramètres déterminants. Ainsi, Knezovich et al. (1987) ont observé que plus les particules sont riches en carbone organique, plus l'affinité des HAP pour ces particules est forte. De plus, Gobas et Zhang (1994) ont montré que la part des HAP les moins solubles présents sous forme dissoute dépend de la teneur en particules organiques de la colonne d'eau alors que la teneur en matière organique dissoute ne semble pas influencer. Les particules de faible granulométrie présentent également une surface d'adsorption plus élevée que les particules de plus forte granulométrie. Harkey et al. (1995) ont constaté que la biodisponibilité des HAP dans une carotte sédimentaire diminue avec la profondeur, illustrant ainsi que plus le sédiment est âgé, plus les interactions « contaminant-matrice » sont fortes. Cependant, ce phénomène ne se vérifie pas pour le sédiment de surface. Les auteurs font l'hypothèse d'une plus forte concentration de macromolécules avec des groupes fonctionnels contenant un atome d'oxygène à l'interface avec l'eau pour expliquer cette différence de biodisponibilité.

Au cours de ces cycles géochimiques, les HAP peuvent être ingérés par les organismes marins. La disponibilité des HAP pour ces organismes dépend de leur état dans le milieu. Ainsi, les HAP dissous sont plus biodisponibles que les HAP adsorbés (Neff, 1985). Du fait de leur hydrophobicité et de leur poids moléculaire relativement faible, une fois absorbés, les HAP peuvent être transférés et piégés dans les organes riches en lipides des organismes par diffusion passive à travers les membranes. On parle alors de bioaccumulation.

La biodisponibilité des HAP varie également en fonction du mode de vie de l'organisme. Ainsi, les organismes vivant dans la zone intertidale sont en général davantage exposés aux HAP que ceux de l'océan profond. Le comportement migratoire, le régime alimentaire et la localisation dans la colonne d'eau des espèces gouvernent aussi leur exposition. Des organismes fixés, dit « filtreurs », c'est-à-dire qui se nourrissent en filtrant l'eau, comme les moules, accumulent les contaminants hydrophobes dans leurs tissus (Lee et al., 1972a; Stegeman et Lech, 1991; Meador et al., 1995 et 1996 ; Meador, 2003). Des poissons vivant en contact avec les sédiments comme les poissons plats ou ceux se nourrissant d'organismes benthiques sont ainsi particulièrement exposés aux HAP de haut poids moléculaire.

Chez les organismes invertébrés, les HAP peuvent être accumulés dans les tissus puis transférés au maillon supérieur du réseau trophique (James et al., 1991; McElroy et al., 1991; Rice et al., 2000). Cependant, les vertébrés marins n'accumulent que faiblement les HAP, empêchant la bioamplification de ces composés aux niveaux supérieurs de la chaîne alimentaire (Varanasi et al., 1989a ; Suedel et al., 1994; Meador, 2003).

1.5. CAS DES MAREES NOIRES :

Dans le cas d'une marée noire, les HAP sont introduits dans le milieu marin associés au pétrole. Le pétrole est la principale source d'énergie des pays industrialisés et est donc sujet à un commerce très important. Son exploitation et son transport font régulièrement l'objet d'accidents responsables de déversements de pétrole en mer. En 1990, Neff estimait à 5 millions de tonnes, la quantité de pétrole déversée dans le milieu marin par an.

1.5.1. Origines :

La plupart des déversements de pétrole en mer provient des opérations de chargement et déchargement de la cargaison des pétroliers et de la vidange des cuves. 92% de ces incidents

donnent lieu à des déversements de moins de 7 tonnes. Environ un cinquième des collisions et des naufrages de pétroliers provoque des déversements de plus de 700 tonnes. La proportion du nombre d'accidents en fonction de la quantité de pétrole déversée est représentée sur la Figure I.3. Les déversements de plus de 700 tonnes de pétrole ne représentent que 3% (en nombre) de la totalité des accidents (d'après l'International Tanker Owners Pollution Federation (ITOPF), <http://www.itopf.com>, 15 septembre 2003).

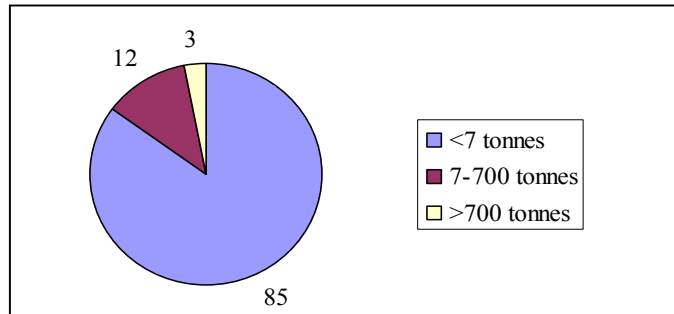


Figure I.3 : Pourcentage du nombre des accidents pétroliers en fonction de la quantité déversée de 1974 à 2002 (<http://www.itopf.com>, 15 septembre 2003)

Les déversements de pétrole supérieurs à 7000 tonnes (entre 1974 et 2002) sont majoritairement dus à des échouages (35% en nombre), des collisions (28%) ou des ruptures de coques (14%). Les principales causes des déversements compris entre 7 et 700 tonnes sont les accidents survenant lors du chargement et du déchargement des pétroliers (29%), les collisions (23%) et les échouages (18%). Les déversements plus faibles, inférieurs à 7 tonnes, sont essentiellement dus aux activités de chargement et déchargement (36%), les ruptures de coques, vidanges en mer, échouages, collisions, incendies et explosions ne représentant, cumulés, que 21% de ces accidents (<http://www.itopf.com>, 15 septembre 2003).

1.5.2. Historique :

Une diminution du nombre des marées noires, liée à l'apparition de réglementations plus strictes, a été constatée au cours de ces 20 dernières années (Figure I.4). Ainsi, le nombre d'accidents majeurs est passé de 24 par an dans les années 70 à 9 dans les années 80 puis à 7 dans les années 90.

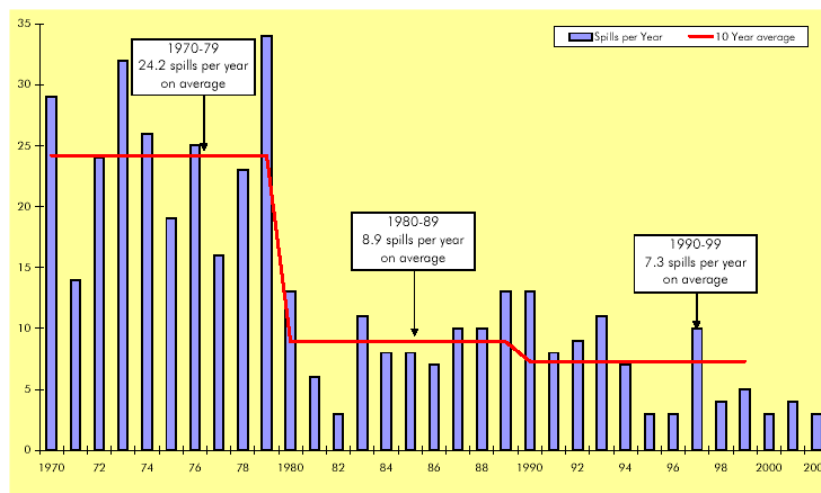


Figure I.4 : Evolution du nombre des accidents pétroliers supérieurs à 7000 tonnes depuis 1970 (<http://www.itopf.com>, 15 septembre 2003)

Une tendance à la diminution de la quantité de pétrole déversée est également observable (Figure I.5). Cependant, cette diminution au cours du temps est moins nette en raison de la survenue de marées noires majeures (Castillo de Beller en Afrique du sud, ABT Summer au large de l'Angola).

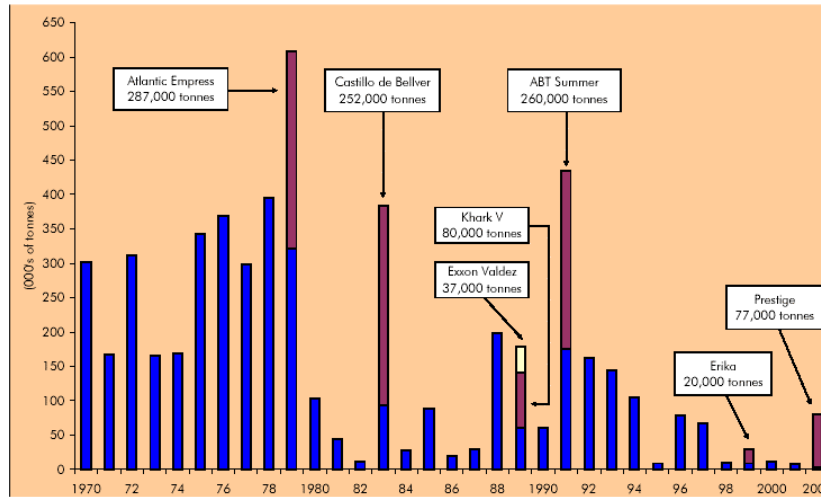


Figure I.5 : Evolution de la quantité de pétrole déversée en mer depuis 1970 (<http://www.itopf.com>, 15 septembre 2003)

Les principales marées noires ayant eu lieu depuis 1967 sont localisées géographiquement sur la Figure I.6 et récapitulées dans le Tableau I.2, où sont précisées la date de l'accident et la quantité de pétrole déversé. La façade ouest de l'Europe est une zone particulièrement touchée par les accidents pétroliers, notamment en raison d'un fort trafic des pétroliers dans cette zone.

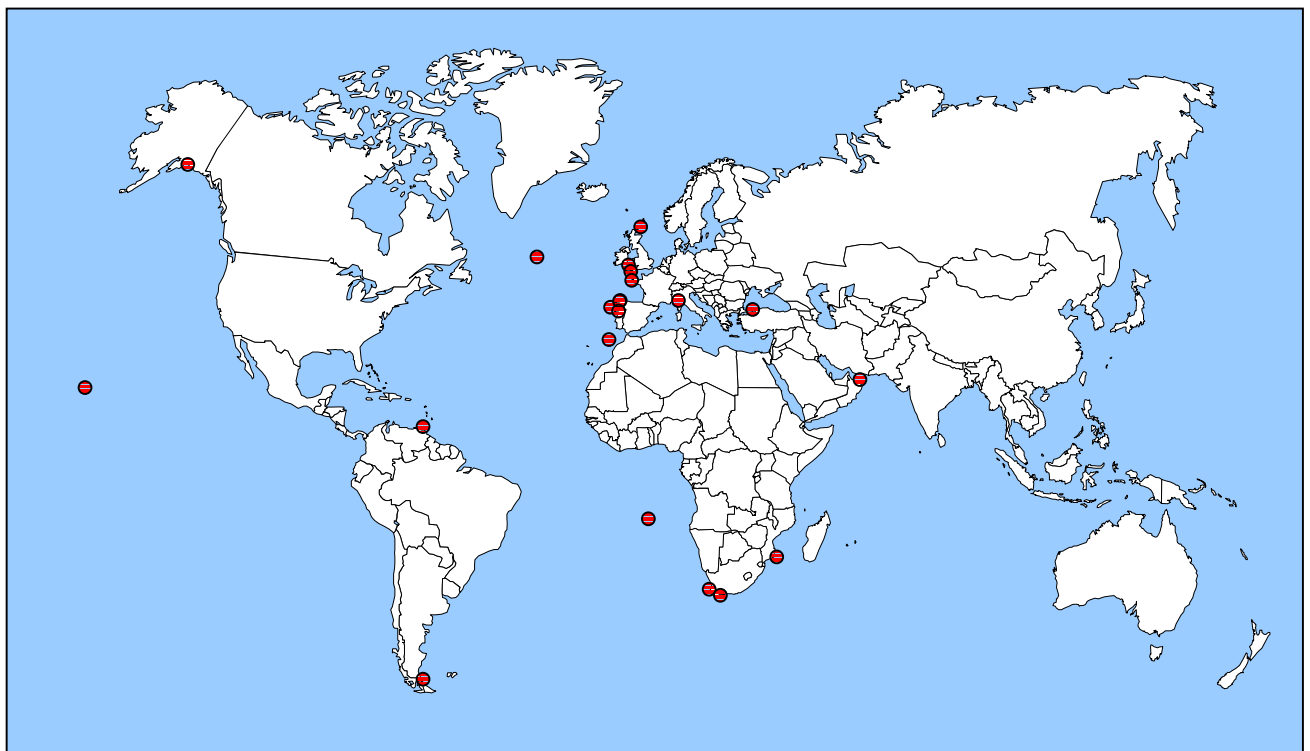


Figure I.6 : Localisation des principaux accidents pétroliers depuis 1967

	Nom du navire	Année	Lieu de l'accident	Quantité de pétrole déversé (en tonnes)
1	Atlantic Empress	1979	Tobago, Caraïbes	287000
2	ABT Summer	1991	au large de l'Angola	260000
3	Castillo de Belver	1983	Afrique du sud	252000
4	Amoco Cadiz	1978	Bretagne, France	223000
5	Haven	1991	Genes, Italie	144000
6	Odyssey	1988	Nova Scotia, Canada	132000
7	Torrey Canyon	1967	îles Scilly, Royaume-Uni	119000
8	Urquiola	1976	La Corogne, Espagne	100000
9	Hawaian Patriot	1977	au large d'Honolulu	95000
10	Independenta	1979	Bosphore, Turquie	95000
11	Jakob Maersk	1975	Oporto, Portugal	88000
12	Braer	1993	îles Shetlands, Royaume-Uni	85000
13	Khark 5	1989	au large du Maroc	80000
14	Aegean Sea	1992	La Corogne, Espagne	74000
15	Sea Empress	1996	Milford Haven, Royaume-Uni	72000
16	Katina P.	1992	au large de Maputo, Mozambique	72000
17	Assimi	1983	au large de Muscat, Oman	53000
18	Metula	1974	Détroit de Magellan, Chili	50000
19	Wafra	1971	Afrique du sud	40000
20	Exxon Valdez	1989	Détroit Prince William, Alaska	37000

Tableau I.2 : Principaux accidents pétroliers depuis 1967 (<http://www.itopf.com>, 15 septembre 2003)

La France est l'un des pays les plus touchés par les marées noires. Ainsi, pas moins de 16 marées noires d'importance variée ont touché les côtes françaises depuis les années 60 (Tableau I.3).

Date	Navire	Lieu	Quantité de pétrole déversé (en tonnes) et nature du pétrole
18 mars 1967	Torrey Canyon	Manche	119000 (pétrole brut)
12 novembre 1975	Olympic Alliance	Manche	10000
24 janvier 1976	Olympic Bravery	île d'Ouessant (Bretagne)	800-1200 (fioul)
15 octobre 1976	Boehlen	île de Sein (Bretagne)	7000-8000 (pétrole brut lourd)
16 mars 1978	Amoco Cadiz	Portsall (Bretagne)	223000 (pétrole brut)
28 avril 1979	Gino	île d'Ouessant (Bretagne)	41000 (bitume « carbon black »)
15 novembre 1979	Peter Sif	île d'Ouessant (Bretagne)	fuite progressive de fioul
7 mars 1980	Tanio	île de Batz (Nord Bretagne)	6000-8000 (fioul lourd n°2)
29 mars 1981	Cavo Cambanos	Corse	18000 (fioul lourd)
31 mars 1988	Amazzone	île d'Ouessant (Bretagne)	2000-3000 (pétrole brut, coupe paraffinique)
11 avril 1991	Haven	Gènes (Italie) et Côte d'Azur	144000 (pétrole brut)
18 août 1993	Lyria	Provence	2200-2800 (pétrole brut)
7 août 1997	Katja	port du Havre et côtes de Seine-Maritime	187 m ³ (fioul lourd n°2)
12 décembre 1999	Erika	nord du golfe de Gascogne	19000-20000 (fioul lourd)
13 novembre 2002	Prestige	Galice, côte atlantique européenne	Plus de 60000 (fioul lourd)
14 décembre 2002	Tricolor	Pas-de-Calais (Nord)	Plusieurs m ³ (fioul)

Tableau I.3 : Principaux accidents pétroliers ayant touché la France depuis 1967 (Gilbert, 1998; <http://www.le-cedre.fr>, 18 mars 2004; <http://www.marenoire.com>, 18 mars 2004; <http://www.itopf.com>, 18 mars 2004; <http://www.polmar.com>, 18 mars 2004)

1.5.3. Les produits pétroliers :

a) Composition :

Les pétroles sont des mélanges dont la composition générale est représentée sur la Figure I.7. Les alcanes (linéaires, ramifiés et cycliques) sont généralement majoritaires, les composés aromatiques constituant classiquement de 20 à 45% de ces mélanges en poids. Les chaînes insaturées telles que les alcènes, les alcynes et leurs dérivés cycliques sont par contre rarement présents dans les pétroles en raison de leur faible stabilité (Tissot et Welte, 1978).

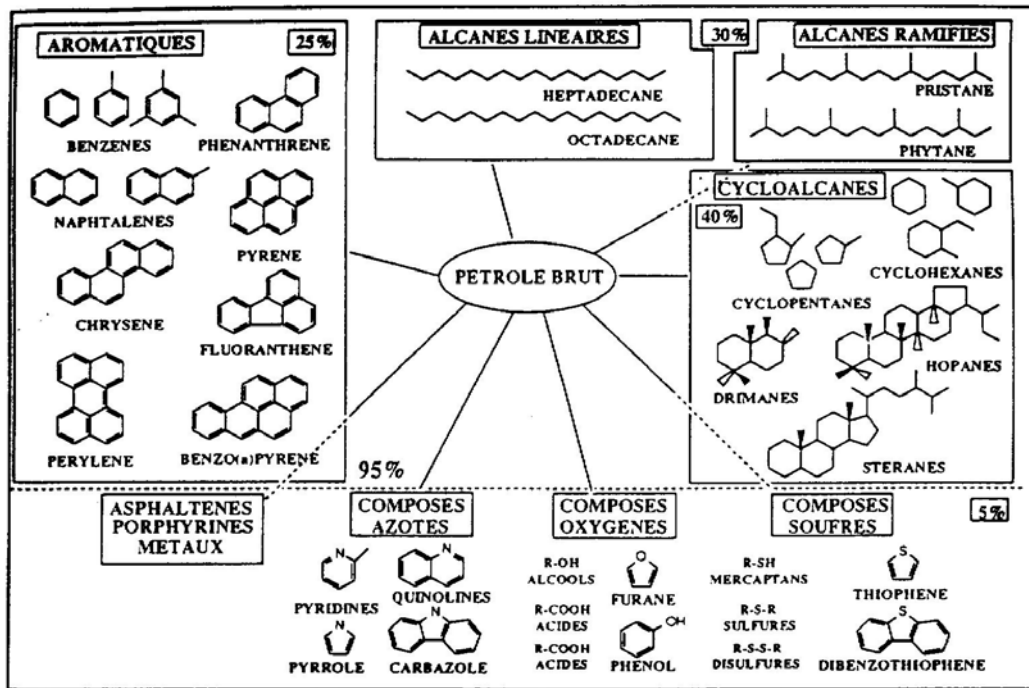


Figure I.7 : Ensemble des hydrocarbures présents dans les pétroles bruts (d'après Bertrand et Mille, 1989)

b) Classification des pétroles bruts :

Il existe différents types de pétrole brut classés en quatre catégories par l'agence américaine de protection de l'environnement (US-EPA) (<http://www.epa.gov/oilspill/crude.htm>, 28 mars 2004) :

- La classe A regroupe les pétroles légers, volatils. Ils sont fluides, souvent clairs, s'étalent rapidement sur les solides et à la surface de l'eau, s'évaporent rapidement et sont inflammables. Ils pénètrent dans les surfaces poreuses telles que le sable où ils persistent. Ils n'adhèrent pas sur les solides tels que les rochers. Ces pétroles peuvent être fortement toxiques pour la flore et la faune. Beaucoup de produits légers de raffinage appartiennent à cette catégorie.
- La classe B regroupe les pétroles dits « non gluants ». Ils ont un aspect cireux ou huileux. Ils sont moins toxiques que ceux de classe A et adhèrent plus aux surfaces solides telles que les rochers. Lorsque la température augmente, ils pénètrent dans les surfaces poreuses (sables). L'évaporation de la fraction légère de ces pétroles peut les transformer en pétrole de classe C ou D. Les pétroles moyennement ou fortement paraffiniques appartiennent à cette catégorie.
- La classe C regroupe les pétroles lourds et gluants. Ils sont de couleur marron ou noire, sont visqueux et gluants. Ils adhèrent aux surfaces solides (rochers) mais ne pénètrent pas les surfaces poreuses (sables). La densité de ces pétroles, proche de celle de l'eau fait qu'ils coulent souvent. L'évaporation et le lessivage de ces produits dans le milieu marin produit des résidus de type D retrouvés sur les côtes sous forme de boulettes de goudron. Ces pétroles présentent une toxicité faible. Cette catégorie regroupe les pétroles bruts moyens à lourds.
- La classe D regroupe les pétroles non fluides. Ils sont généralement marron foncé ou noir, ne pénètrent pas les surfaces poreuses mais adhèrent fortement aux surfaces solides après liquéfaction sous l'effet du chauffage dû au rayonnement lumineux. Les résidus de pétrole, les pétroles bruts lourds et certains pétroles vieillissants font partie de cette catégorie.

c) Classification des produits de raffinage :

Les produits de raffinage sont obtenus à partir des pétroles bruts, soit par craquage catalytique, soit par distillation fractionnée. Les différents types de dérivés pétroliers sont classés dans le Tableau I.4 reprenant les dénominations américaines (entre parenthèses) et les équivalents français utilisés par Marchand et Kantin (1995). Les fiouls lourds (4 types différents selon la classification américaine) sont des résidus de distillation des pétroles bruts. Il est important de préciser que le produit pétrolier Erika a été classé comme fioul lourd n°2 par Total Fina d'après la norme AFNOR NF M 15-011. Il ne faut pas confondre cette dénomination avec celle de « fuel oil n°2 » de la classification américaine. Dans celle-ci, le fioul de l'Erika équivaut au « fuel oil n°6 » (mazout n°6). L'AFNOR (Agence Française de Normalisation) a elle aussi classé les fiouls lourds en 4 groupes en se basant notamment sur leur teneur en soufre (normes AFNOR NF M 15-010 à 15-013) :

- Fioul lourd n°1 : fuel domestique
- Fioul lourd n°2 HTS (haute teneur en soufre) : teneur en soufre maximale : 4% (fuel de soute)
- Fioul lourd BTS (basse teneur en soufre) : teneur en soufre maximale : 2%
- Fioul lourd TBTS (très basse teneur en soufre) : teneur en soufre maximale : 1%

Dénomination	Caractéristiques	Comportement en mer
Essence (Gasoline)	produit léger (densité : 0,65 à 0,75) point d'ébullition entre 30 et 200°C risque d'explosion	dispersion rapide évaporation complète en quelques heures biodégradation efficace
Kérosène (Kerosene)	produit léger (densité : 0,8) point d'ébullition entre 160 et 290°C	dispersion rapide évaporation rapide persistant dans l'environnement
Mazout n°2 (Fuel oil n°2)	produit léger (densité : 0,85) point d'ébullition entre 180 et 360°C	dispersion rapide peu volatil pas de formation d'émulsion peu persistant dans l'environnement
Mazout n°4 (Fuel oil n°4)	produit de masse moyenne (densité : 0,9) point d'ébullition entre 180 et 360°C	facilement dispersé peu volatil persistant dans l'environnement
Mazout n°5 (Fuel oil n°5, BUNKER B)	produit intermédiaire à lourd (densité 0,95) point d'ébullition entre 180°C et 360°C)	peu volatil difficile à disperser
Mazout n°6 (Fuel oil n°6, BUNKER C)	produit lourd (densité 0,98) point d'ébullition entre 180°C et 500°C)	peu volatil impossible à disperser formation d'émulsions et de boulettes

Tableau I.4 : Classification des différents types de produits de raffinage, caractéristiques et comportement dans le milieu marin (Adapté de la classification de l'US-EPA (<http://www.epa.gov/oilspill/refined.htm>, 8 mai 2004) et de Marchand et Kantin, 1995)

1.5.4. Comportement dans le milieu marin :

Dans le milieu marin, le pétrole déversé forme une nappe en raison de son hydrophobicité et de sa densité légèrement inférieure à 1 en moyenne. Le devenir de cette nappe dépend de sa nature

même et des conditions environnementales (courants, vent, vagues, température). Après quelques heures, la nappe tend à se fractionner, formant des nappes de différentes tailles et des gouttes. Ce phénomène de dispersion, amplifié par les courants, le vent et les vagues, favorise les processus de dissolution, de biodégradation, de photo-oxydation et de sédimentation. L'addition de dispersants chimiques (surfactants) peut accélérer la dispersion naturelle. Plus le pétrole est fluide, plus les nappes peuvent s'étendre et se disperser et plus les HAP qui le constituent sont solubilisés. De plus, ces pétroles fluides sont constitués de composés légers, plus solubles dans l'eau mais également plus sensibles à l'évaporation dans l'atmosphère. Les constituants dont le point d'ébullition est inférieur à 200°C tendent à s'évaporer durant les premières 24 heures. L'évaporation est amplifiée par des températures élevées, des vents importants et une mer agitée. Des gouttes d'eau peuvent s'incorporer au pétrole pour former des émulsions. Les produits pétroliers dispersés sédimentent lorsqu'ils présentent une densité supérieure à celle de l'eau ou après fixation sur la matière en suspension. Une proportion importante des résidus pétroliers atteint alors le compartiment sédimentaire (Gilfillan et al., 1976; U.S. National Academy of Sciences, 2003).

Les HAP pétroliers déversés en mer sont facilement disponibles pour les organismes car présents sous forme d'émulsions ou faiblement adsorbés aux particules, contrairement aux HAP pyrolytiques, plus fortement adsorbés sur les particules (Farrington, 1986).

Une étude réalisée sur le devenir du pétrole déversé en 1989 par le pétrolier Exxon Valdez en Alaska a estimé que 20% du poids total de pétrole déversé a été volatilisé puis photo-oxydé dans l'atmosphère, que 50% a été biodégradé ou photolysé, soit dans la colonne d'eau, soit au sein des sédiments (Figure I.8). Le pourcentage de produit pétrolier toujours présent trois ans après l'accident dans la colonne d'eau a été estimé à 1% (sans tenir compte des produits de biodégradation) et à 13%, sous forme fortement altérée, dans les sédiments (Wolfe et al., 1994).

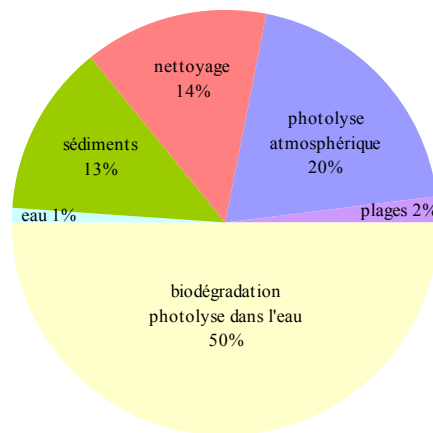


Figure I.8 : Devenir du pétrole déversé trois ans après le naufrage de l'Exxon Valdez (Wolfe et al., 1994)

1.6. LES RESEAUX DE SURVEILLANCE :

Afin d'évaluer la qualité du milieu marin, différents réseaux de surveillance nationaux ainsi que locaux ont été mis en place le long des côtes françaises (<http://www.ifremer.fr/envlit/surveillance/>, 8 mai 2004). Les principaux réseaux nationaux sont gérés par l'institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (IFREMER). Il s'agit du réseau national d'observation de la qualité du milieu marin (RNO, créé en 1974), le réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines (REPHY, créé en 1984) et le réseau de contrôle microbiologique (dans les coquillages) (REMI, créé en 1989). S'ajoute à ceux-là le « réseau mollusques des rendements aquacoles » (REMORA, créé en 1993; Suivi de la croissance et de la mortalité des mollusques), le réseau de pathologie des mollusques (REPAMO, créé à la fin des années 80) et dernièrement le

réseau benthique (REBENT, lancement en 2003-2004). Des réseaux locaux ont également été mis en place à la demande et/ou sur financement des agences de l'eau, des régions, d'EDF (IGA, créé en 1974 : surveillance écologique et halieutique de l'impact et des gènes causés par l'aménagement du littoral pour les centrales nucléaires) ou des collectivités locales. Il s'agit d'études à l'échelle départementale, estuarienne, portuaire, etc...

Le RNO est le principal réseau s'intéressant aux contaminants. Ainsi, depuis 1979, la mesure de certains contaminants dans les organismes (Tableau I.5) et les sédiments a été intégrée au RNO. Aucune mesure de contaminant n'est réalisée dans l'eau en raison de la présence des contaminants à l'état de traces dans celle-ci, rendant difficile la collecte d'échantillons valides, et de la faible représentativité spatiale et temporelle de ces mesures. Les organismes sentinelles choisis sont des mollusques (moules et huîtres). Ces organismes ont été choisis en raison de leur large distribution sur les côtes françaises ainsi que pour leur capacité d'accumulation des contaminants. 80 points sont échantillonnés quatre fois par an afin d'intégrer les variations saisonnières. Les sédiments sont également étudiés pour une évaluation à plus long terme des pollutions. Une campagne annuelle d'échantillonnage de carottes sédimentaires, portant sur des sites différents chaque année, est réalisée. Les teneurs en aluminium, fer, lithium et manganèse ainsi que celles déjà suivies dans les organismes (Tableau I.5) sont mesurées à différentes profondeurs afin de retracer l'historique de la contamination sur plusieurs dizaines d'années. La granulométrie, la teneur en carbone organique et en carbonates sont également mesurées.

Famille de contaminant	Contaminant suivi
Métaux	mercure, cadmium, plomb, zinc, cuivre
Organochlorés	dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), dichlorodiphényl trichloroéthane (DDD), dichlorodiphényléthylène (DDE) lindane (γ -hexachlorocyclohexane), α -hexachlorocyclohexane polychlorobiphényles (congénères 28, 52, 101, 105, 118, 138, 153, 180)
HAP	naphtalène, acénaphthylène, acénaphtène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benz(a)anthracène, chrysène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)pyrène, dibenz(a,h)anthracène, benzo(g,h,i)pérylène, indéno(1,2,3-cd)pyrène

Tableau I.5 : Contaminants suivis dans les organismes dans le cadre du RNO

Depuis 1991, un volet « effets biologiques » a également été développé dans le cadre de ce réseau. Son but principal est de soutenir des études de développement de biomarqueurs (§ I.2.2.3) afin de les intégrer à terme aux suivis du réseau. Ainsi, actuellement, la mesure de l'activité enzymatique EROD (activité éthoxyrésorufin-*O*-dééthylase) est effectuée chez les populations de limandes de la baie de Seine (<http://www.ifremer.fr/envlit/surveillance/rnooeuvre.htm>, 8 mai 2004).

Les suivis mis en œuvre dans le cadre du RNO présentent cependant plusieurs limites. Le principal problème posé est la difficulté à relier les concentrations mesurées en contaminants chimiques avec des effets biologiques potentiels sur les organismes. Le développement de différents biomarqueurs, dont certains sont déjà utilisés à l'étranger (Working Group on Biological Effects of Contaminants, 2002), permettrait de mieux évaluer ce lien. D'autre part, le choix des

mollusques comme uniques organismes cibles pose plusieurs problèmes. La contamination des crustacées ou des poissons, organismes ayant des capacités de biotransformation plus importantes que les mollusques (§ I.2), n'est ainsi pas évaluée. De plus, plusieurs mois de présence des bivalves dans le milieu sont nécessaires avant d'atteindre un équilibre d'accumulation des contaminants. L'observation des phénomènes est donc décalée dans le temps. De plus, les variations ponctuelles et rapides étant difficilement observables dans ces conditions, seules les variations moyennes sont mesurées. L'utilisation de bivalves est nécessaire pour étudier la contamination de la zone intertidale, cependant, la zone infratidale (également appelée zone subtidale) n'étant pas colonisée par ces organismes, la contamination de cette zone n'est pas évaluée. L'étude de la contamination des poissons permettrait de combler ces lacunes. Enfin, le suivi des HAP alkylés et des composés aromatiques soufrés n'était pas réalisé jusqu'ici dans le cadre du RNO. Suite au programme de suivi de la marée noire Erika (§ I.1.7), ces composés (voir Annexe 1) viennent d'être ajoutés au suivi du RNO et permettront de réaliser un meilleur diagnostic des contaminations observées.

1.7. LA MAREE NOIRE ERIKA DANS LE CONTEXTE DE LA CONTAMINATION CHRONIQUE DU MILIEU MARIN FRANÇAIS ET MONDIAL :

1.7.1. L'eau :

Dans le cadre du RNO, une campagne réalisée en février 1999 a permis d'établir des niveaux de référence en HAP dissous parents (HAP de l'US-EPA) et alkylés (Annexe 1) pour la partie nord du golfe de Gascogne. Les concentrations sont comprises entre 0,8 et 4 ng/l pour les HAP parents de l'US-EPA et entre 1,6 et 8 ng/l pour les HAP alkylés. Les zones présentant les concentrations les plus faibles sont celles situées en zone franchement marine alors que les zones estuariennes sont généralement les plus contaminées, les zones côtières présentant des concentrations intermédiaires (Tableau I.6). Au début de l'année 2000, suite au naufrage du pétrolier Erika, une augmentation généralisée des concentrations est observée. Les zones côtières sont les plus touchées avec des concentrations maximales au niveau du traict du Croisic (entre 18 et 118 ng/l). On constate une augmentation moyenne du niveau des HAP parents d'un facteur 5 et des HAP alkylés d'un facteur 5 à 20 traduisant une augmentation de la proportion des HAP alkylés (Tableau I.6), composés fortement présent dans le fioul Erika. Un profil moléculaire caractéristique d'une contamination d'origine pétrogénique se dégage alors dans les échantillons contaminés (Figure I.9). Le suivi réalisé dans le traict du Croisic entre mars 2000 et mai 2002 met de plus en évidence une contamination à long terme de cette zone par les HAP du fioul Erika puisque elle est significative jusqu'en mai 2001, soit plus de un an et demi après le naufrage du pétrolier. Ceci suggère une dissolution lente des HAP présents dans le fioul déversé en mer, sans doute en raison de la libération progressive de fioul piégé dans les roches et les sédiments côtiers.

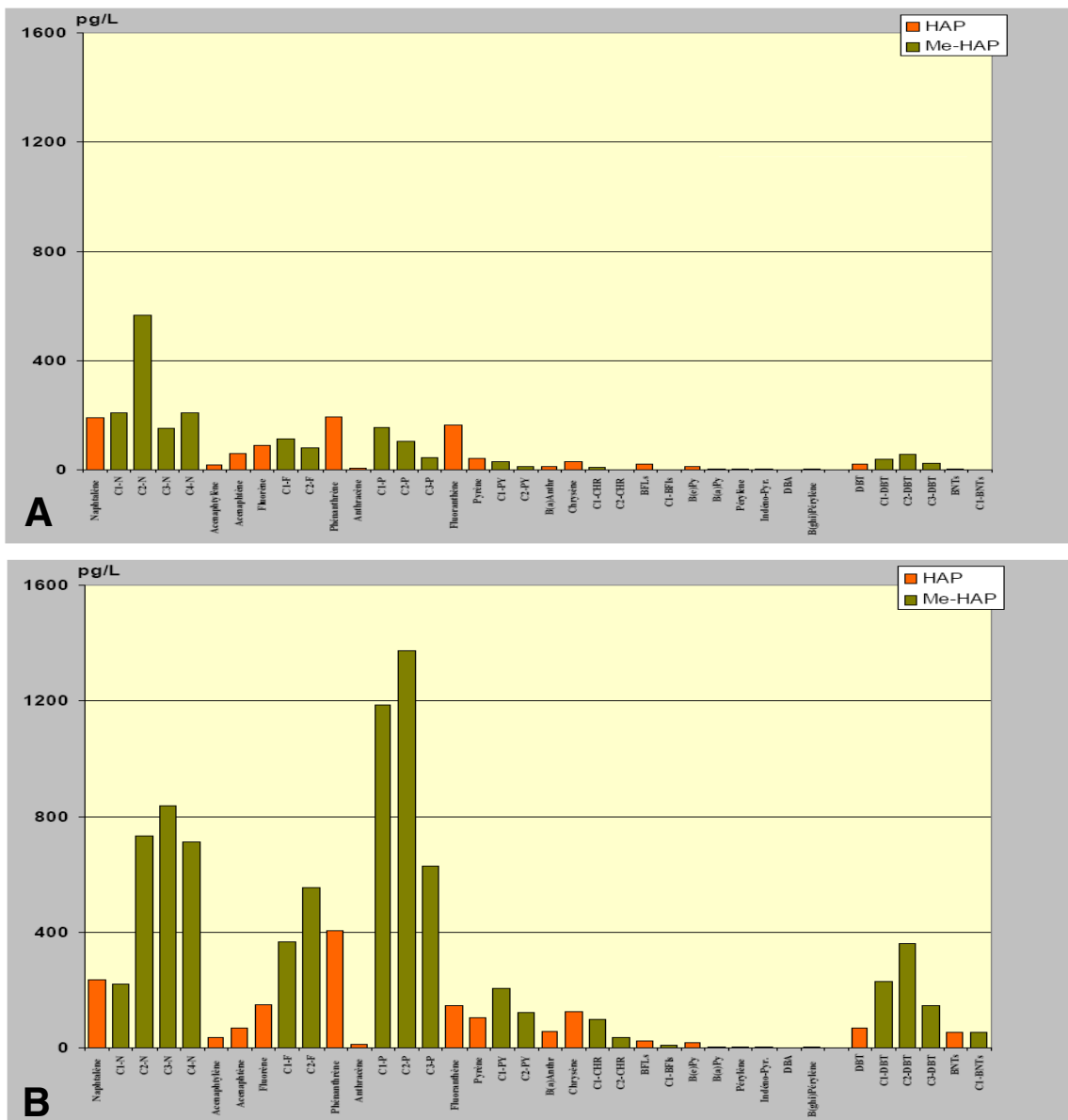
Station	Date	$\Sigma 16$ HAP US-EPA +3 (ng/l) min - max	Σ HAP alkylés (ng/l) min -max	$\Sigma 16$ HAP+3/ Σ HAP alkylés min -max
<i>Avant le naufrage de l'Erika</i>				
Zone marine	Février 1999	0,820 - 0,895	1,672 - 2,058	0,43 - 0,57
Panache de la Loire - zone côtière	Février 1999	1,160 - 2,748	1,833 - 5,407	0,47 - 0,81
Zone estuarienne	Février 1999	2,355 - 3,677	4,722 - 7,988	0,44 - 0,71

Après le naufrage de l'Erika

Zone de l'épave (profil 115 m)	Mars 2000	1,328 - 1,423	5,421 - 7,084	0,19 - 0,24
Côtes sud Bretagne	Mars 2000	1,847 - 2,697	7,691 - 8,495	0,23 - 0,35
Côtes Pays de la Loire - Batz/mer	Février 2000	4,724 - 5,919	29,404 - 40,772	0,15 - 0,20
Baie de Vilaine (Suivi)	Mars - Juin 2000	0,661 - 2,754	2,927 - 8,847	0,23 - 0,49
Côtes traict du Croisic (Suivi)	Mars 2000 - Mai 2001	3,780 - 20,939	18,300 - 118,309	0,17 - 0,22

La liste des HAP quantifiés lors de ces études est présentée dans l'Annexe 1

Tableau I.6 : Dosages de HAP dissous réalisés dans le nord du golfe de Gascogne dans le cadre du RNO et du « suivi Erika » (Tronczynski et al., 2003)



Me-HAP : HAP alkylés

Figure I.9 : Exemple de modification du niveau et du profil de concentration en HAP dissous dans l'eau avant (A) et après la marée noire (B) (Tronczynski et al., 2003)

Un nombre limité de données concernant les concentrations en HAP dissous et particulaires dans les eaux est par ailleurs disponible dans la littérature. En ce qui concerne le littoral français, les données sont particulièrement peu nombreuses et concernent principalement les estuaires de deux fleuves français : la Seine et le Rhône. Les concentrations en HAP (somme de 12 des 16 HAP de l'US-EPA à partir du phénanthrène + coéluant) mesurées dans ces deux estuaires indiquent une contamination non négligeable de ces milieux (entre 6 et 26 ng/l de HAP dissous pour l'embouchure de la Seine et jusqu'à 50 ng/l dans le delta du Rhône). Elles sont du même ordre que les concentrations moyennes mesurées en zone côtière pendant la phase aiguë de la marée noire Erika (excepté pour les valeurs maximales obtenues dans le traict du Croisic).

Ces concentrations sont toutefois bien moindres que celles observées dans certains estuaires britanniques ou chinois (jusqu'à 25000 ng/l et 27000 ng/l respectivement, pour la somme des 15 HAP de l'US-EPA à partir de l'acénaphylène + coéluant) (Annexe 2).

1.7.2. Les sédiments :

Les campagnes d'échantillonnage réalisées par le RNO avant la marée noire Erika permettent d'établir une concentration moyenne de 575 ng/g de poids sec (somme des 16 HAP de l'US-EPA + coéluant ; cf Annexe 1) dans les sédiments superficiels du Golfe de Gascogne avec des valeurs pouvant atteindre 2000 à 5000 ng/g par endroit. Ces résultats indiquent une contamination chronique en HAP du Golfe de Gascogne, imputable aux activités urbaines, portuaires et industrielles côtières. Cette contamination est en moyenne supérieure aux niveaux mesurés dans des zones peu exposées à des sources importantes de pollution (Antarctique, îles peu industrialisées) (Annexe 3). Les sites de référence du golfe de Gascogne présentent par contre des teneurs (entre 80 et 135 ng/g) proches de celles mesurées dans ces sites reculés et équivalentes aux niveaux de référence de la zone OSPAR de l'Atlantique nord (entre 25 et 125 ng/g de poids sec) (Tronczynski et al., 2003). Les analyses du RNO mettent de plus en évidence une hétérogénéité spatiale des teneurs en HAP. Cette hétérogénéité peut être due aux sources de contamination mais également à la nature du sédiment (Budzinski et al., 1997).

Suite au naufrage du pétrolier Erika, une contamination est principalement mise en évidence dans les sédiments intertidaux (et localement subtidaux) du traict du Croisic (augmentation des HAP de l'US-EPA d'un facteur 1,5) ainsi que sur quelques échantillons de la baie de Bourgneuf et de la baie de Vilaine. Parallèlement, les concentrations en HAP alkylés des sédiments du traict du Croisic augmentent en moyenne d'un facteur 6,5 provoquant une modification significative de l'empreinte moléculaire de la contamination, caractéristique du fioul de l'Erika. Par contre, les sédiments subtidaux prélevés dans les autres sites (baie d'Audierne, Glénan, Aven, Belon, la Laïta, rade de Lorient, Etel, baie de Quiberon, estuaire de la Loire, Olonne et pertuis Breton) ne montrent pas de contamination par le fioul de l'Erika (Tronczynski et al., 2003).

1.7.3. Les organismes :

Entre 1994 et 1999, la moyenne nationale française de concentration en HAP (somme des 16 HAP de l'US-EPA + coéluant) dans les bivalves marins (huîtres et moules) était de l'ordre de 150 ng/g de poids sec (RNO, 2000). En ce qui concerne la façade « Manche-Atlantique », la moyenne était de 142 ng/g de poids sec pour les moules et de 203 ng/g pour les huîtres sur la période 1995-1999. Les valeurs moyennes mesurées dans différents sites de la côte atlantique sont présentées sur la Figure I.10. Les bivalves collectés sur la façade méditerranéenne présentaient par contre une contamination plus importante, avec une concentration moyenne de 254 ng/g. La moyenne nationale américaine mesurée dans les huîtres est quant-à-elle deux fois plus élevée que la moyenne nationale française (Annexe 4). Il faut cependant noter que cette moyenne est déterminée à partir de

la somme de 18 HAP dont certains dérivés alkylés (voir l'Annexe 1 pour le détail des composés pris en compte).

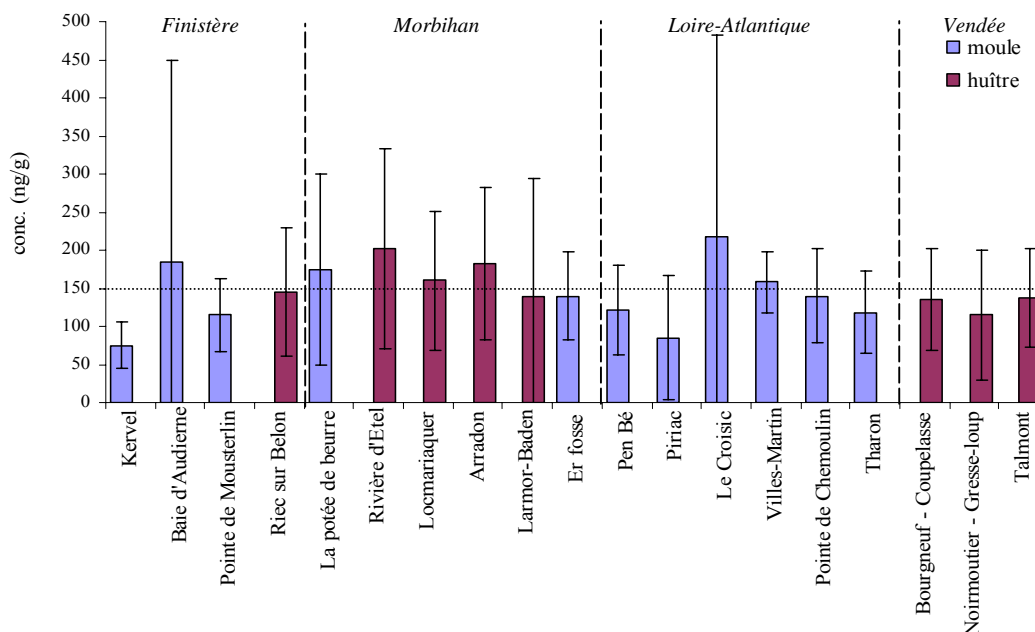


Figure I.10 : Somme des HAP de l'US-EPA mesurés par le RNO dans les huîtres et les moules (poids sec) de 1994 à 1999 sur les zones du littoral atlantique français touchées par la marée noire Erika (adapté de Jeanneret et al., 2002).

Lors de la marée noire Erika, une forte augmentation des teneurs a principalement été observée sur le littoral du Morbihan, de la Loire-Atlantique et de la baie de Bourgneuf (Jeanneret et al., 2002). Des bivalves collectés dans certains sites comme le Croisic ou l'île de Noirmoutier ont été particulièrement impactés, avec des teneurs totales en HAP de l'US-EPA pouvant atteindre 5000 ng/g de poids sec (Annexe 5). On peut également noter une forte variabilité spatiale des teneurs en HAP entre des sites très proches, suggérant une importante hétérogénéité de la contamination due à la marée noire. On observe par ailleurs une augmentation des niveaux de HAP dès les mois de janvier-février avec une diminution rapide pour certains sites et des niveaux restant élevés jusqu'au début de l'été pour d'autres. Sur les sites les plus contaminés, des teneurs élevées en HAP sont de nouveau observées durant l'hiver 2000-2001, traduisant la remise en circulation probable, lors des tempêtes d'hiver, de pétrole piégé dans les roches et les sédiments (Annexe 5). Au printemps 2001, la plupart des sites ont retrouvé des concentrations proches de 150 ng/g, niveau moyen de contamination avant la marée noire. Par contre, l'analyse du profil moléculaire des HAP montre que, deux ans après le naufrage du pétrolier, l'empreinte caractéristique de l'Erika est toujours présente dans les mollusques.

Les résultats détaillés des mesures de HAP réalisées sur les mollusques du littoral français entre 1994 et 2000 dans le cadre du RNO et du « suivi Erika » sont résumées dans l'Annexe 4.

Au niveau mondial, le Programme National Américain de Toxicologie (NTP, 1999) fait une différence entre les sites sans source spécifique de contamination en HAP et ceux reconnus comme ayant des sources spécifiques. Il indique des concentrations moyennes variant de 1 à 100 ng/g de poids sec en moyenne pour le premier groupe où les concentrations les plus élevées mesurées atteignent des niveaux de l'ordre de 1000 ng/g (16 HAP de l'US-EPA + 3 HAP coéluant). Concernant les sites reconnus comme ayant des sources spécifiques de contamination, les concentrations moyennes varient de 10 à 500 ng/g de poids sec en moyenne avec des concentrations maximales pouvant atteindre 5000 ng/g. Les niveaux de HAP dans les mollusques du littoral français ne sont que légèrement supérieurs à la gamme la plus basse déterminée par le

NTP, suggérant une contamination relativement faible des bivalves dans le milieu côtier français. Il est intéressant de noter par ailleurs que les concentrations maximales rapportées par le NTP sont similaires aux teneurs maximales mesurées lors de la marée noire Erika.

2. BIOTRANSFORMATION ET TOXICITE DES HAP DANS LE MILIEU MARIN

Les HAP sont considérés comme des contaminants importants de l'environnement du fait de leur ubiquité. Seize d'entre eux ont d'ailleurs été retenus en 1976 par l'US-EPA (Agence pour la Protection de l'Environnement des Etats-Unis) comme polluants prioritaires à rechercher dans les eaux, les sols et l'atmosphère en raison de leur abondance dans l'environnement ou/et de leur toxicité (Keith et Telliard, 1979; Annexe 1). En 1983, l'IARC (Agence Internationale de Recherche sur le Cancer) a également classé certains HAP comme cancérigènes (§ I.2.2.2). Ce classement en contaminants prioritaires n'est pas uniquement dû à leur ubiquité mais également à leur toxicité potentielle. De nombreuses études ont de plus montré que des poissons et des mammifères marins collectés dans des milieux fortement pollués en HAP ne présentaient pas de teneurs importantes en contaminants (McCain et al., 1978; Baumann et al., 1982; Malins et al., 1982; Varanasi et al., 1990; Béland et al., 1992; McDonald et al., 1995; Baumard et al., 1998a; Nakata et al., 2003) alors qu'une forte corrélation entre le niveau de HAP dans le milieu et la fréquence de lésions hépatiques chez les poissons, notamment de nature cancéreuse, a été observée (Baumann et al., 1982 et 1987; Baumann et Harshbarger, 1985; Murchelano et Wolke, 1985; Mix, 1986; Rhodes et al., 1987; Myers et al., 1987, 1990, 1991, 1993, 1994 et 1998a et b; Landahl et al., 1990; Schiewe et al., 1991; O'Neill et al., 1998; PSWQAT, 2000).

Les HAP sont des composés inertes qui ne sont pas toxiques en tant que tels mais qui peuvent le devenir après avoir subi une étape d'oxydation ou de biotransformation. De nombreuses études ont ainsi été menées afin de mieux comprendre le devenir de cette classe de contaminants dans les organismes marins ainsi que leurs mécanismes de transformation et de toxicité.

2.1. MECANISMES DE BIOTRANSFORMATION :

La biotransformation des HAP s'effectue en deux phases que sont la fonctionnalisation (phase I) et la conjugaison (phase II) (Figure I.11). La plupart des mécanismes impliqués dans ces étapes sont de type enzymatique.

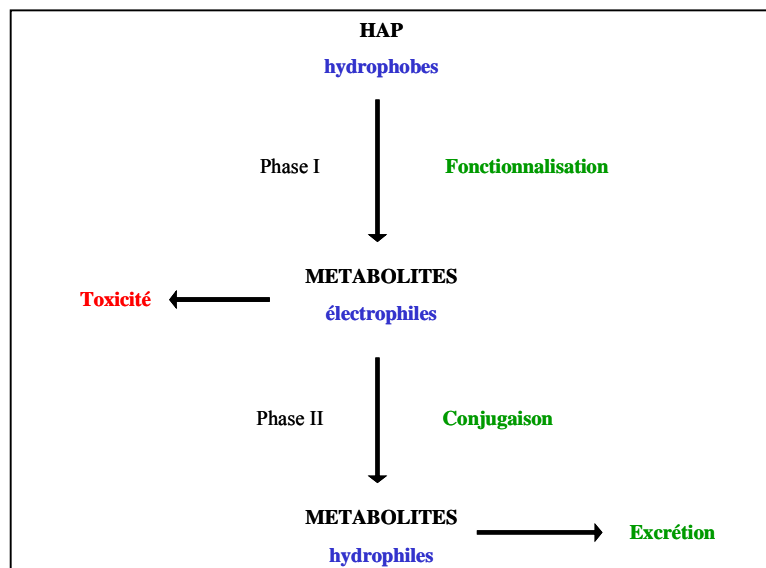


Figure I.11 : Schéma général de biotransformation des HAP

Différentes études ont mis en évidence la présence chez les organismes marins des enzymes impliquées dans les mécanismes de biotransformation préalablement identifiées chez les mammifères (Khan et al., 1972; Pohl et al., 1974; Bend et James, 1978; Lee, 1981; Narbonne et Suteau, 1983; Andersson et al., 1985; Suteau, 1987; Buhler et Williams, 1989; James, 1989; Livingstone, 1989, 1991, 1994, 1998; Stegeman et Lech, 1991; Stegeman et Hahn, 1994; George, 1994; Wootton et al., 1995, 1996; Stegeman et Livingstone, 1998).

Ces processus de biotransformation se déroulent principalement au niveau du foie chez les poissons, des glandes antennaires, de l'hépatopancréas et de l'estomac chez les crustacés (Khan et al., 1972; Singer et Lee, 1977; Singer et al., 1980) et de la glande digestive chez les mollusques (Livingstone, 1989).

Une fois absorbés, les HAP sont principalement acheminés jusqu'au foie (pour les poissons) 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 via les reins et la vessie (urine) ou, majoritairement, via la vésicule biliaire puis les intestins (excréments).

2.1.1. Phase de fonctionnalisation :

La phase I du processus de biotransformation est appelée phase de fonctionnalisation et a pour but de former des métabolites électrophiles plus enclins que les composés parents à se lier à des groupement hydrophiles lors de la phase II.

Elle consiste en une oxydation réalisée par des enzymes appartenant au système enzymatique cytochrome P-450. Ces enzymes sont appelées mono-oxygénases (également appelées « mixed-function oxygenases », MFO), nommées CYP1A1 (classification de Nebert et al. (1991) et Nelson et al. (1996)), à activité AHH (Aryl Hydrocarbon Hydroxylase). Elles sont essentiellement localisées dans les microsomes (fraction sub-cellulaire du réticulum endoplasmique lisse) des cellules du foie des poissons mais également dans les mitochondries et le cytosol des cellules hépatiques ainsi que dans les branchies, les intestins, la peau, les reins, les gonades, le placenta, le sérum, les glandes surrénales, etc... (Celander, 1993).

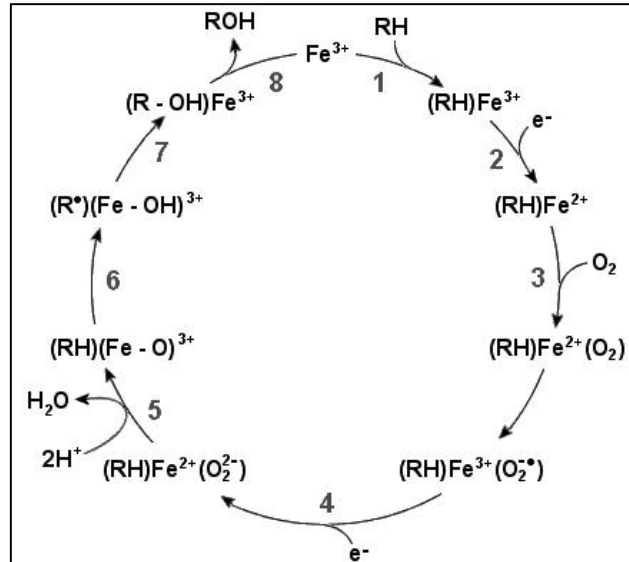
Le cytochrome P-450 a notamment été étudié par Stegeman et Hahn (1994) chez différentes espèces aquatiques, par Goksøyr et Förlin (1992) et Buhler et Wang-Buhler (1998) chez les poissons, par James (1989), Livingstone (1991) et James et Boyle (1998) chez les crustacés ainsi que par Livingstone (1984, 1988 et 1991) chez les mollusques. Ces études montrent que de grandes différences dans les capacités de biotransformation existent entre ces organismes. Ainsi, les poissons ont un niveau de biotransformation plus élevé que celui des crustacés (crabes, homards, crevettes), lui-même supérieur à celui des mollusques (moules, huîtres, palourdes, coques, coquilles Saint-Jacques, balanes), alors que les mammifères ont généralement des capacités plus importantes que les poissons. Le niveau de cytochrome P-450 est par exemple relativement élevé chez les crustacés (James, 1989) mais leur activité enzymatique est faible (Livingstone, 1991). L'état des connaissances sur ce système a été résumé par Stegeman et Livingstone en 1998. Le classement des organismes en terme de capacité de biotransformation est ainsi généralement le suivant :

mammifères > poissons > crustacés > mollusques

Un système à cytochrome P-450 est en réalité un complexe multienzymatique formé de :

* 2 flavoprotéines, transporteuses d'électrons : la NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogéné) cytochrome P-450 réductase (78 kDa) et la NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogéné) cytochrome b5 réductase

* 2 hémoprotéines, le cytochrome b5 et le cytochrome P-450. Ce dernier constitue une famille d'hémoprotéines de masse moléculaire comprise entre 43 et 60 kDa, possédant un noyau tétrapyrrolique qui complexe un atome de fer pouvant passer de l'état ferreux « Fe²⁺ » à l'état ferrique « Fe³⁺ » de manière réversible, ce qui confère des propriétés d'oxydo-réduction au cytochrome P-450. Ce système peut réaliser l'addition d'un atome d'oxygène sur le composé par réduction d'une molécule d'oxygène moléculaire dissous. Les différentes étapes de cette réaction sont représentées dans la Figure I.12.



« Fe » représente l'atome de fer du site actif, « RH » un HAP type et « ROH » le métabolite formé

Figure I.12 : Schéma récapitulatif de l'action oxygénasique du système cytochrome P-450 sur les HAP (d'après Estabrook et al., 1978)

Les différentes étapes identifiées par des numéros sur la Figure I.12 sont les suivantes (Stegeman et Hahn, 1994; Bucheli et Fent, 1995; Goepfert et al., 1995) :

1. Fixation du HAP sur le site catalytique
2. Réduction des 2 flavines de la NADPH cytochrome P-450 réductase par le NADPH, H⁺ (libération de 2 électrons) et transfert d'un électron au cytochrome P-450
3. Fixation d'une molécule d'oxygène pour donner un complexe cytochrome P-450 dioxygéné ferreux
4. Transfert d'un second électron au complexe dioxygéné par le cytochrome b5 ou la NADPH cytochrome P-450 réductase et formation d'un peroxyde
5. Rupture de la liaison « oxygène-oxygène » avec formation d'une molécule d'eau
6. Activation du HAP par formation d'un substrat radicalaire
7. Transfert du second atome d'oxygène au HAP par hydroxylation
8. Dissociation et libération du métabolite

Cette première étape aboutit à la formation d'époxydes et de phénols qui peuvent ensuite être pris en charge par les enzymes de phase II. D'autres transformations peuvent avoir lieu préalablement à la phase de conjugaison. Les époxydes formés peuvent être hydratés par des enzymes microsomiales non dépendantes du système cytochrome P-450, appelées époxydes hydrolases (EH), pour former des dihydrodiols (Figure I.14) (Stegeman et Hahn, 1994; Penning et al., 1999, Atlas et Cerniglia, 1995; Harvey et al., 1999). Ces molécules peuvent à nouveau être

prises en charge par le cytochrome P-450 conduisant alors à la formation de diols-époxydes. Les dihydrodiols peuvent également être transformés en quinones ou bien en diols (catéchols) par action d'enzymes dihydrodiols déshydrogénases (DD) (Buhler et Williams, 1989; Penning et al., 1999).

D'une manière générale, les HAP sont principalement transformés en époxydes, phénols, phénols-oxydes, dihydrodiols, dihydrodiols-époxydes, quinones, diols, triols et tétrols (Lech et Vodcnik, 1985; Bucheli et Fent, 1995).

De plus, lors de l'oxydation des HAP par les enzymes mono-oxygénases (étape 5 de la Figure I.12), lors de la respiration ou lors de tout cycle d'oxydo-réduction, les transferts d'électrons réalisés peuvent provoquer un stress oxydatif par la production de formes très instables et hautement réactives de l'oxygène. Il s'agit de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), du radical hydroxyle ($\cdot OH$) et de l'hydroperoxyde d'hydrogène (H_2O_2), précurseur de radicaux libres. Ces radicaux peuvent réagir avec les HAP et leurs métabolites ou avec des acides gras membranaires (péroxydation lipidique), formant notamment des peroxydes (Ingelman-Sundberg et Hagbjörk, 1982; Machlin et Bendich, 1987; Suteau, 1987; Ribera et al., 1990; Winston et Di Giulio, 1991; Lemaire et al, 1994).

2.1.2. Phase de conjugaison :

La majeure partie des métabolites issus de la phase de fonctionnalisation est ensuite prise en charge par les enzymes dites de phase II (George, 1994). Cette phase consiste en la liaison des molécules oxydées avec des groupements hydrophiles dans le but de favoriser leur excrétion (Mulder et al. 1990; Vermeulen et al., 1992; Commandeur et al., 1995). Ces molécules hydrophiles peuvent être l'acide glucuronique, l'acide sulfurique, le glutathion, des acides aminés (Dutton et Montgomery, 1958; Huang et Collins, 1962; Chasseaud, 1979; Lech et Vodcnik, 1985; Foureman, 1989; James et Boyle, 1998). Cette étape, comme la première, peut se dérouler au niveau du cytosol, des microsomes ou des mitochondries des cellules. Des réactions enzymatiques de *O*-méthylation (Scheline, 1962) et d'acétylation (Litchfield, 1939; Huang et Collins, 1962) peuvent également avoir lieu.

Les principaux conjugués produits sont représentés sur la Figure I.13. Les UDPGT (uridine-diphosphate-glucuronyltransférases) effectuent la liaison de l'acide glucuronique avec les fonctions phénoliques nucléophiles des métabolites de phase I. Les phénols peuvent également être conjugués à des groupements sulfate par l'action de sulfo-transférases. Les glutathion S-transférases (GST) réalisent, quant à elles, une attaque nucléophile des fonctions époxydes électrophiles conduisant à des conjugués au glutathion (thio-éthers) (Hesse et Jernstrom, 1984). Chez les poissons, la sulfoconjugaison est en général bien moins importante que la glucuronidation ou que la conjugaison au glutathion (George, 1994).

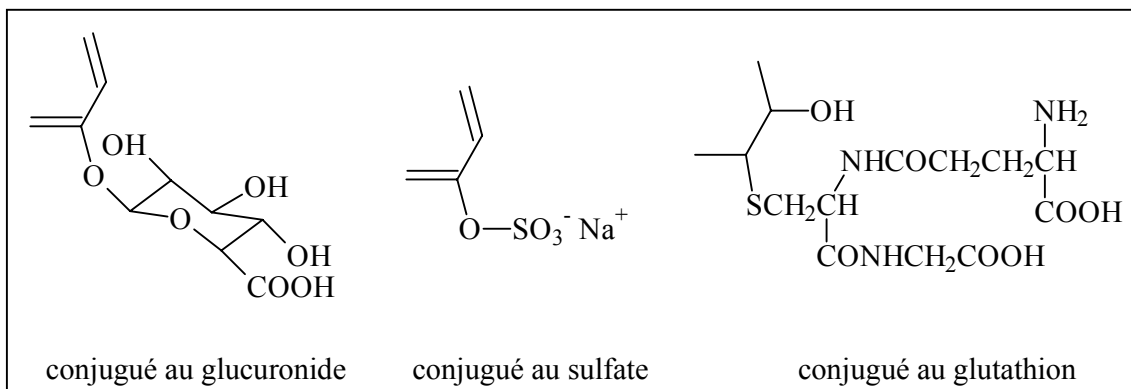


Figure I.13 : Formule des principaux conjugués formés chez les poissons

2.2. TOXICITE :

La toxicité est la capacité inhérente à une substance de produire un effet délétère sur un organisme. Les HAP n'ont pas tous les mêmes propriétés toxiques et ont différents effets toxiques. De nombreuses études ont évalué la toxicité des HAP par la réalisation de tests de toxicité aigus et chroniques sur différents organismes aquatiques. Le benzo(a)pyrène est le HAP le plus étudié en raison des importantes propriétés toxiques que lui confère certains de ses métabolites.

2.2.1. Mécanismes de toxicité :

La génotoxicité, la cancérogénicité, l'effet sur la reproduction et le développement ainsi que l'immunotoxicité des HAP ont principalement été mis en évidence et à des degrés divers selon les HAP. Certains HAP peuvent également provoquer des modifications physiologiques qui peuvent altérer les performances de nage et la respiration des poissons (IPCS, 1998).

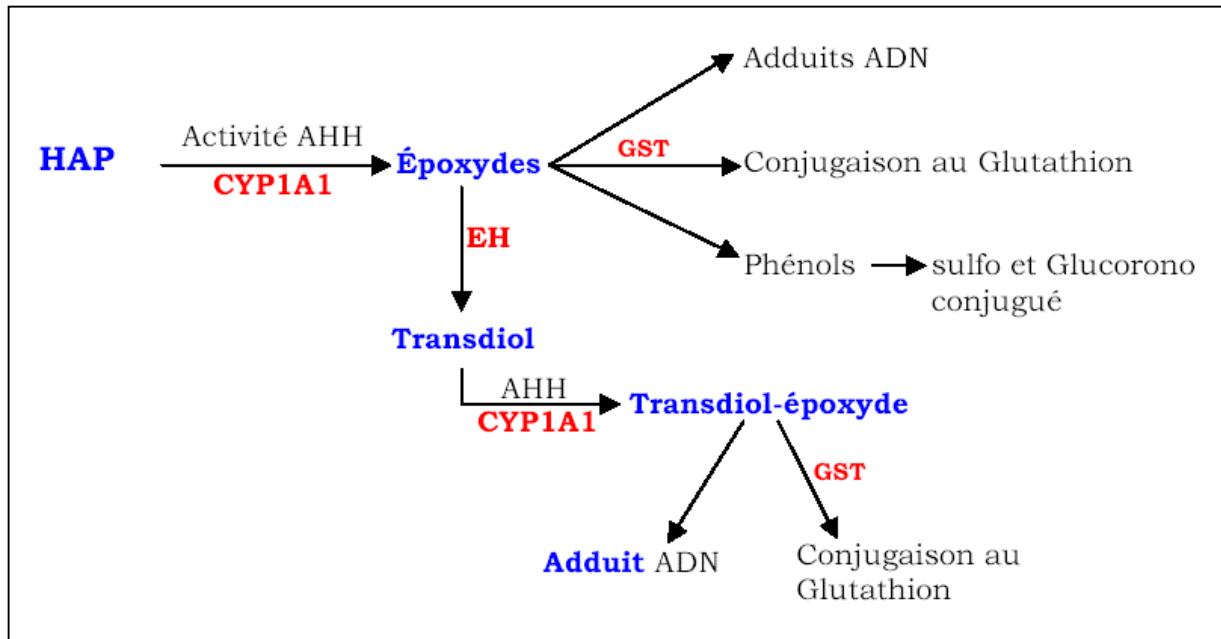
a) Génotoxicité et cancérogénicité :

L'aspect génotoxique (mutagène) et cancérigène des HAP est au premier plan des propriétés toxiques des HAP. C'est d'ailleurs l'aspect le plus étudié.

Il a été montré lors de tests en laboratoire sur des rongeurs et lors d'études épidémiologiques que certains HAP (benzo(a)pyrène, benz(a)anthracène, dibenz(a,h)anthracène, benzo(b)fluoranthène, benzo(j)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène et indéno(1,2,3-cd)pyrène) sont des cancérigènes chimiques (NTP, 1999; White, 1986). De nombreuses études ont montré que la mutagénicité et la cancérogénicité des HAP s'exerçaient également sur la faune et la flore marine (Blumer, 1976; Schultz et Schultz, 1982; Hendricks et al., 1985; White, 1986; Schell et al., 1989; Baumann, 1989; James et al., 1991; De Flora et al., 1991; Eddy et al., 1993; Belkin et al., 1994; Moore et Myers, 1994; Myers et al., 1994 et 1998a).

Les intermédiaires électrophiles formés lors de la première phase de biotransformation (§ I.2.1.1 et Figure I.14) peuvent ne pas être pris en charge par la phase de conjugaison. Certains d'entre eux, comme les diols-époxydes, peuvent se lier de manière covalente avec l'ADN (acide désoxyribonucléique), l'ARN (acide ribonucléique) ou des protéines (Figure I.15) (Brookes et Lawley, 1964; Sims et Grover, 1974; Sims et al., 1974; Miller et Miller, 1981; Jerina et Daly, 1974; Ahokas et al., 1979; Varanasi et Gmur 1980a et c, 1981; Varanasi et al., 1982, 1986a; 1987 et 1989b, c et d; Ahokas et Pelkonen, 1984; Neff, 1985; James, 1986; Harvey, 1991; Harvey et al., 1999; Akcha et al., 2003) entraînant ainsi des dysfonctionnements cellulaires, des mutations génétiques et la formation de tumeurs cancérigènes (Pahlman et Pelkonen, 1987; Nesnow et al., 2002; Akcha et al., 2003). Plus précisément, ces métabolites peuvent s'insérer entre les plans de bases de l'ADN et former des adduits stables avec celles-ci. Lors de la réplication de l'ADN, des erreurs de reconnaissance de bases complémentaires peuvent alors avoir lieu conduisant à des mutations de celle-ci. Le HAP le plus étudié en terme de toxicité est le benzo(a)pyrène. Il a ainsi été montré que la régiosélectivité des enzymes de biotransformation était cruciale en terme de toxicité. Ainsi, la biotransformation du benzo(a)pyrène peut aboutir à la formation de composés *anti*- ou *syn*-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde benzo(a)pyrène (*anti*- ou *syn*-BPDE) où l'époxyde positionné en région « baie » ou « fjord » (Figure I.15) lui confère une forte capacité à se lier avec l'ADN (Jerina et al., 1978; Yan, 1985; Phillips et Grover, 1994; Peltonen et Dipple, 1995; Harvey et al., 1999). Le principal adduit détecté dans le foie de poissons ou des microsomes hépatiques exposés à du benzo(a)pyrène est l'*anti*-BPDE-deoxyguanosine (Ahokas et Pelkonen, 1984; Varanasi et al., 1987, 1989c; Sikka et al., 1990b, 1991). Le 7,8-dihydrodiolbenzo(a)pyrène est

considéré comme un métabolite en région baie car il est le précurseur du BPDE par formation d'un époxyde en position 9,10. La région située à l'opposé de la région baie est appelée région K.



Activité AHH : activité Aryl Hydrocarbon Hydroxylase; CYP1A1 : enzymes mono-oxygénases du cytochrome P-450 1A1; EH : enzymes Epoxyde Hydrolases; GST : enzymes Glutathion S-Transférases

Figure I.14 : Exemple de voies métaboliques et de formation d'adduits possibles

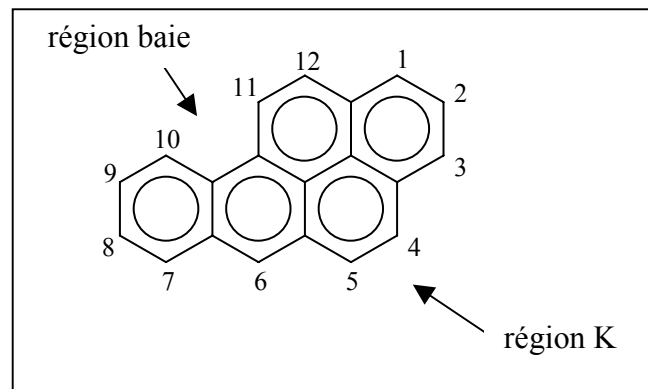


Figure I.15 : Localisation des régions K et baie du benzo(a)pyrène

De plus, les phases I et II de biotransformation peuvent être induites par la présence de xénobiotiques tels que les HAP mais aussi les polychlorobiphényles et les dioxines (Bigelow et Nebert, 1982; Conney, 1982; Denison et Wilkinson, 1985; van Schooten, 1991; van der Weiden et al., 1993; Stegeman et Hahn, 1994; Safe, 2001). Ainsi, la molécule absorbée puis distribuée dans l'organisme par le sang peut être prise en charge au sein des cellules par une protéine cytosolique appelée AhR (Aryl hydrocarbon Receptor), associée à une protéine Hsp 90 (Heat shock protein 90), dès sa pénétration dans le cytoplasme et être ainsi transportée jusqu'au noyau cellulaire dans lequel le complexe HAP/AhR se lie à son tour à une protéine nucléaire (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator). Le complexe formé joue alors le rôle de facteur de transcription induisant l'expression du cytochrome P450 et de certaines isoformes de GST (Bucheli et Fent, 1995; Whitlock et al., 1996; Safe, 2001). Il a également été observé que, d'une manière générale, plus le

degré d'alkylation des HAP était élevé, plus l'activité des enzymes du cytochrome P-450 (CYP1A) était induite et la toxicité élevée (Basu et al., 2001). Le métabolisme des HAP ou de tout substrat de ces enzymes est alors accéléré par la présence de ces inducteurs. Ainsi, bien que des HAP comme le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthène, le pyrène ou le benzo(g,h,i)pérylène soient considérés comme non cancérigènes (§ I.2.2.2), des études sur des rongeurs ont montré qu'ils pouvaient augmenter la toxicité du benzo(a)pyrène (van Duuren et al., 1973; van Duuren et Goldschmidt, 1976; Rice et al., 1984; Warshawsky et al., 1993). On parle alors de composés co-cancérogènes.

De plus, l'induction enzymatique peut provoquer un stress oxydatif par la production de radicaux libres en excès. Les conséquences de ces phénomènes sont des peroxydations lipidiques, des atteintes aux membranes cellulaires, des oedèmes et des hémorragies (Cantrell et al., 1996; Billiard et al., 2000; Hawkins et al., 2002).

b) Effets sur la reproduction et le développement :

Certains HAP et leurs métabolites hydroxylés ainsi que d'autres contaminants possèdent des structures qui s'apparentent plus ou moins à une catégorie d'hormones, les stéroïdes (dérivés d'hydrocarbures cycliques). Les trois autres familles d'hormones sont les amines, les prostaglandines et les hormones peptidiques et protéiques. La structure de certains xénobiotiques leur confère la capacité d'interagir avec les fonctions endocrines des organismes. On parle alors de perturbateurs endocriniens. Ces molécules sont définies par l'US-EPA comme des « agents exogènes qui interfèrent avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison, l'activité ou l'élimination des hormones naturelles agissant sur l'homéostasie, la reproduction, le développement ou le comportement des organismes ». Elles peuvent présenter un effet agoniste (activité estrogénique ou androgénique) ou antagoniste (anti-estrogénique ou anti-androgénique) chez les êtres vivants. Elles peuvent de plus perturber la synthèse et le métabolisme des hormones naturelles.

Concrètement, elles peuvent prendre la place des hormones stéroïdiennes sur leurs sites de fixation (récepteurs hormonaux) et jouer le même rôle que celles-ci (effet agoniste; certains PCB hydroxylés et certains isomères du DDT) ou bloquer le site de fixation de l'hormone sur le récepteur sans induire de réponse (effet antagoniste) et ainsi modifier la biodisponibilité des hormones et par là même perturber les fonctions endocrines (Chaloupka et al., 1992; Tran et al., 1996; Santodonato, 1997; Klaasen, 1997, Gillesby et Zacherewski, 1998; van Lipzig et al., 2000; Fertuck et al., 2001). Dans le cas d'un effet antagoniste, les récepteurs ne sont alors plus capables de stimuler la transcription des gènes activés dans des conditions normales. Les cytochromes P-450 étant impliqués dans la régulation des stéroïdes, les HAP peuvent de plus influencer sur le métabolisme des hormones en induisant l'activité de ces enzymes.

Les effets toxiques des HAP sur le système de reproduction des organismes marins ont été démontrés en laboratoire et en milieu naturel, en particulier sur les poissons benthiques (Johnson et al., 2002). Il faut cependant relativiser la capacité de ces composés à perturber le système endocrinien. En effet, les hormones naturelles et de synthèse (utilisées dans les pilules contraceptives), certains pesticides (DDT, DDE, ...), les alkylphénols, les PCB, les dioxines, les organostanniques et les phtalates présentent généralement un potentiel perturbateur plus important (Spooner et al., 1991; Donohoe et Curtis, 1996; Nimrod et Benson, 1996; Jobling et al., 1996; Tyler et al., 1998; Aruwke et Goksøyr, 1998; Fent et al., 2000; BKH, 2000). Le benzo(a)pyrène est néanmoins classé dangereux pour la reproduction (catégorie 2) par l'union européenne.

Les études réalisées sur les HAP mettent en évidence un comportement typiquement anti-estrogénique dans la plupart des cas. Parmi les effets constatés sur les poissons femelles, on peut citer :

- La diminution de la concentration plasmatique du 17 β -estradiol (estrogène) initiant notamment la synthèse de protéines telles que la vitellogénine (Johnson et al., 1988, 1995, 1997, 1999; Stein et al., 1991; Arukwe et Goksøyr, 1998)
- La diminution de la vitellogénèse (synthèse d'une phospho-glyco-lipoprotéine, la vitellogénine, essentielle à la croissance des ovocytes, de la formation de l'œuf et du développement de l'embryon chez les ovipares) (Johnson et al., 1988, 1997, 1999; Anulacion et al., 1997)
- La perturbation du cycle ovarien de la plie (*Pleuronectes platessa*) dans le nord du Finistère suite à la marée noire de l'Amoco Cadiz (Stott et al., 1983)
- La diminution du développement des gonades (Johnson et al., 1988, 1991, 1999; Sol et al., 1999)
- La diminution de la production des œufs (Johnson et al., 1988, 1997)
- l'atrésie (rétrécissement des conduits) des ovaires (Johnson et al., 1988, 1997)
- La diminution de la capacité de reproduction (Casillas et al., 1991).

Chez les mâles, une diminution de la concentration plasmatique de testostérone et de 11-ketotestostérone (androgènes) a été détectée dans des milieux particulièrement fortement pollués en HAP (Sol et al., 1999). La diminution de production de sperme et de sa qualité a également été observée (Nagler et Cyr, 1997).

La réduction de la croissance de soles exposées à des HAP en laboratoire a également été observée (Kubin, 1997; Rice et al., 2000). Cette diminution de croissance pourrait engendrer une réduction de la fécondité ou retarder la période de maturité sexuelle (Brandt et al., 1992). La réduction de la croissance chez des juvéniles peut également provoquer une augmentation de la mortalité (Peterson et Wroblewski, 1984; Lorenzen, 1996; McGurk, 1996).

c) Autres effets :

Il a été constaté dans différentes études que le benzo(a)pyrène était capable d'inhiber les réponses immunitaires de différents organismes (Dean et al., 1983 et 1986; Blanton et al., 1986; White, 1986; Deal, 1995; Klaasen, 1997). L'immunotoxicité des HAP a également été montrée sur des carlottins anglais, *Parophrys vetulus* (Arkoosh et al., 1996).

L'embryotoxicité et les effets tératogènes de certains HAP ont par ailleurs été observés chez des organismes marins (Barbieri et al., 1986; De Flora et al., 1991).

2.2.2. Données toxicologiques :

Des expérimentations en laboratoire ont été réalisées afin d'évaluer la toxicité aiguë et chronique des HAP sur des organismes aquatiques. La toxicité des HAP dépend de différents paramètres comme la voie (orale, cutanée, respiration), le niveau et la durée d'exposition, l'espèce, le stade de développement des organismes (œuf, embryon, larve, juvénile, adulte) et les paramètres environnementaux (lumière, température, ...). On observe ainsi en général une toxicité plus forte

des HAP lors des premiers stades de développement et en présence de lumière (propriétés toxiques des HAP photooxydés) (IPCS, 1998).

a) Toxicité aiguë :

La toxicité aiguë est évaluée par une brève exposition d'un organisme à une substance chimique à forte dose. Ces tests permettent d'établir des valeurs de CL_{50} (concentration létale). La CL_{50} est la concentration d'une substance déduite statistiquement qui devrait provoquer au cours d'une exposition ou, après celle-ci, pendant une période définie, la mort de 50% des animaux exposés pendant une durée déterminée (JOCE (Journal Officiel des Communautés Européennes) n° L383A).

La toxicité aiguë des HAP est faible à modérée. Différentes études réalisées sur des poissons sont résumées dans en Annexe 6 et montrent une toxicité généralement plus forte des HAP de plus haut poids moléculaire. De plus, il a été observé que la toxicité aiguë des HAP variait peu d'une espèce de poisson à une autre (NRCC, 1983; Jørgensen et al., 1991).

b) Toxicité chronique :

La toxicité chronique est évaluée par une exposition faible d'un organisme à une substance chimique sur une longue durée. Ces tests permettent d'établir des valeurs de NOEC (No Observed Effect Concentration) et LOEC (Lowest Observed Effect Concentration). La NOEC correspond à la plus forte concentration testée n'entraînant pas d'effet statistiquement significatif par rapport au témoin. La LOEC correspond à la plus faible concentration testée entraînant un effet statistiquement significatif par rapport au témoin.

Différentes études réalisées sur des organismes marins sont résumées dans l'Annexe 7. Comme pour la toxicité aiguë, les HAP de plus haut poids moléculaire présentent une toxicité chronique plus forte.

c) Classement des HAP en fonction de leur toxicité et valeurs guides :

Certains organismes internationaux comme l'IPCS (Programme International de Sécurité Chimique) ont classé les HAP en fonction de leur potentiel mutagène et cancérigène envers les mammifères (Tableau I.7). L'US-EPA a retenu 16 HAP (les 15 classés dans la colonne US-EPA plus l'acénaphthène ; Annexe 1) comme polluants prioritaires à rechercher dans les eaux, les sols et l'atmosphère. Le benz(a)anthracène, le benzo(a)pyrène et le dibenz(a,h)anthracène sont généralement considérés comme les HAP les plus toxiques. On trouve ensuite principalement le chrysène, les benzo(a)fluoranthènes ainsi que l'indéno(1,2,3-cd)pyrène.

Le CSHPF (Conseil de Sécurité et d'Hygiène Publique Française) a quant à lui désigné 7 HAP à suivre dans les aliments : le benz(a)anthracène, les benzo(b+j)fluoranthènes, le benzo(k)fluoranthène, le benzo(a)pyrène, le dibenz(a,h)anthracène et l'indéno(1,2,3,cd)pyrène. Le dibenz(a,c)anthracène coéluant avec le dibenz(a,h)anthracène en CPG/SM, on quantifie en fait 8 HAP.

Certains mélanges de HAP, environnements de travail et sources mobiles ont également été classés en fonction de leurs propriétés cancérigènes par l'IARC (International Agency for Research on Cancer) (Boffetta et al., 1997; Tableau I.8).

Une échelle de toxicité a également été réalisée par différents organismes en calculant un facteur d'équivalent toxique (FET) au benzo(a)pyrène, l'un des HAP les plus toxiques. Ces données sont récapitulées dans le Tableau I.9. L'US-EPA ne fournit de FET que pour les 7 HAP les plus toxiques (classés B2).

Composé	Génotoxicité		Cancérogénicité	
	IPCS, 1998 ^a	IPCS, 1998 ^a	US-EPA ^b	IARC, 1987 ^c
N	-	(?)	C	2B (2002)
Ay	(?)		D	
Ae	(?)	?		
Fe	-	-	D	3
Phe	?	(?)	D	3
A	-	-	D	3
F	+	(+)	D	3
P	(?)	(?)	D	3
BaA	+	+	B2	2A
C	+	+	B2	3
1-,2-,3-,4- et 6-C ₁ C				3
5-C ₁ C				2B
T				3
BbF	+	+	B2	2B
BjF	+	+		2B
BkF	+	+	B2	2B
BaP	+	+	B2	2A
IP	+	+	B2	2B
DBahA	+	+	B2	2A
DBacA				3
BPer			D	3

^a Classification IPCS :
 + : effet positif
 - : effet négatif
 ? : incertain
 () : résultats dérivant d'un faible nombre de données

^b Classification US-EPA :
 A : cancérogène pour l'homme
 B1 et B2 : cancérogène probable pour l'homme
 C : cancérogène possible pour l'homme
 D : inclassable
 E : probablement non cancérogène

^c Classification IARC :
 1 : cancérogène pour l'homme
 2A : probablement cancérogène pour l'homme
 2B : possiblement cancérogène pour l'homme
 3 : inclassable

Tableau I.7 : Classement des HAP en fonction de leur génotoxicité et de leur cancérogénicité

1 ^a	2A ^a	2B ^a
Goudron de houille	Créosotes	Extraits de noir de charbon
Huiles minérales	Emanations de moteurs diesel	Emanations de moteurs essence
Huiles de schiste		
Suie		
Fumée de tabac		
Production d'aluminium		
Gazification du charbon		
Production de coke		
Fonderies de fer et d'acier		

^aClassification IARC :
 1 : cancérogène pour l'homme
 2A : probablement cancérogène pour l'homme
 2B : possiblement cancérogène pour l'homme
 3 : inclassable

Tableau I.8 : Classification des mélanges de HAP, des milieux de travail et de sources mobiles par l'IARC (d'après Boffetta et al., 1997)

Composé	US-EPA, 1993	Kalberlah et al., 1995	Nisbet et Lagoy, 1992	Baars, 2000	Hempfling et al. 1997	INERIS, 2003
N			0.001		0	0.001
Ay		0,01	0.001	0.001	0.01	0.001
Ae		0,001	0.001	0.01	0	0.001
Fe			0.001		0	0.001
Phe		<0,001	0.001	0.001	0	0.001
A			0.01		0.01	0.01
F		0,01	0.001	0.01	0.01	0.001
P		0,001	0.001	0.001		0.001
BaA	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
C	0.001	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
BbF	0,1	0,1	0,1	0,1	1	0,1
BjF		0,1				
BkF	0,01	0,01	0,1	0,1	0,1	0,1
BaP	1,0	1,0	1,0	1	1	1,0
IP	0,1	0,1	0,1	0,1	0,01	0,1
DBahA	1.0	1.0	5	1	1	1
BPer			0,01		0,01	0,01

US-EPA : Agence américaine de protection de l'environnement; INERIS : Institut National de l'Environnement industriel et des Risques

Tableau I.9 : Récapitulatif des facteurs d'équivalent toxique au benzo(a)pyrène

Il a également été proposé que les HAP alkylés et soufrés pouvaient présenter une toxicité au moins équivalente à celle du benzo(a)pyrène (Sinsheimer et al., 1992)

Différents pays et organisations ont fixées des valeurs guides de concentration en HAP dans l'environnement. Ainsi, des seuils de sécurité vis-à-vis des organismes aquatiques ont été fixés en ce qui concerne la teneur en HAP dans l'eau (Tableau I.10).

Pays / Organisation	Pays-Bas	Danemark	Union Européenne	Commission Oslo - Paris	Etats-Unis	Canada	Québec
Critère défini (ng/l)	Concentration maximale permise	Critère de qualité	Concentration maximale admissible	Provisional ecotoxicological assessment criteria	Critère de qualité environnementale	Draft interim water quality criteria	Critère de protection de la vie aquatique
N		1000		1000-10000		11000	
Fe							3000
Phe	2000				4600	800	400
A		10		5-50		120	12
F	500			50-500			40
P							25
BaA	200						18
BkF	100						
BaP	100			10-100		8	15
BPer	20						
Σ HAP			200		30		

Tableau I.10 : Seuils de sécurité de concentrations en HAP dans l'eau (ng/l) concernant les organismes aquatiques dans différents pays et organisations (BKH, 1995; OSPARCOM, 1994; Rondeau, 2002)

Si l'on considère la somme des HAP de l'US-EPA, aucun échantillon d'eau analysé durant la marée noire Erika ne dépasse les critères de qualité définis par l'Union Européenne et les Etats-Unis.

Le NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration (USA)) a également proposé une valeur guide pour la somme des HAP non-substitués dans les sédiments de 4000 ng/g de poids sec (Long et al., 1995). Cette valeur représente la teneur pour laquelle 10% des études ont observé des effets biologiques irréversibles sur les organismes benthiques. Dans ces conditions, quelques échantillons de sédiment prélevés lors de la marée noire Erika dépassent cette valeur guide.

En terme de risques sanitaires pour la consommation humaine, l'AFSSA (Agence française sanitaire et de santé alimentaire) et les autorités de gestion de la marée noire Erika ont proposé des

valeurs guides de concentration en HAP dans les organismes marins destinés à la consommation (Tableau I.11). De plus, la Direction des Pêches Maritimes et de l’Aquaculture (DPMA) a fixé un seuil d’exclusion de 1000 ng/g de poids sec (somme des HAP de l’US-EPA), valeur au-dessus de laquelle l’exploitation des coquillages est strictement interdite. Des périodes d’interdiction de l’exploitation des zones conchylicoles ont ainsi été décidées pour différents départements suite à la marée noire (Figure I.16).

Organisme	Somme des HAP de l’US-EPA	Somme des 7 HAP du CSHPF
Mollusques	500	200
Poissons	50	20
Crustacés et céphalopodes		40

Tableau I.11 : Valeurs guides de concentration (ng/g de poids sec) en HAP dans les organismes marins destinés à la consommation dans le cadre de la marée noire Erika (AFSSA, 2003)

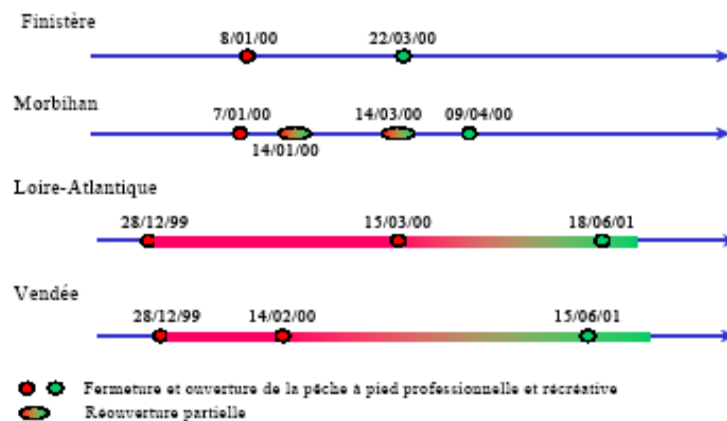


Figure I.16 : Bilan de la gestion des zones conchylicoles et de pêche à pied de loisir suite au naufrage du pétrolier Erika (RNO, 2002)

Une étude française a répertorié les concentrations moyennes en 7 HAP (benz(a)anthracène, benzo(b+j)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)pyrène, dibenz(a,h)anthracène, benzo(g,h,i) pérylène) mesurées dans les produits de la mer prélevés sur les marchés à partir de 2000 pour les poissons et entre juin et novembre 2001 pour les mollusques et les crustacés (AFSSA, 2003). Les résultats sont compris entre 0,0012 et 0,0015 µg/g de poids sec pour les poissons et entre 0,035 et 0,039 µg/kg de poids sec pour les mollusques et crustacés. Les teneurs mesurées dans les organismes sont donc inférieures aux valeurs guides fixées par l’AFSSA. Les poissons contribueraient pour 2% à 3% de l'exposition moyenne par voie alimentaire de la population générale (adultes et enfants de 3-14 ans) et les mollusques et crustacés pour 5 à 9% pour un adulte et 3 à 5% pour un enfant. Il faut noter que la source majeure de contamination des denrées alimentaires par les HAP est liée aux procédés de traitement thermique des aliments (§ I.1).

Il faut noter que les concentrations en HAP généralement présentes dans les aliments sont largement inférieures à celles produisant des effets toxiques (Commission Européenne, 2002).

Dans le cas du benzo(a)pyrène, le CSHPF (avis du 17/09/1997) et le MATE (Ministère de l’Aménagement du Territoire et de l’Environnement) ont retenu un risque de 10⁻⁵ comme valeur

limite environnementale. Cela signifie que l'on considère comme « risque acceptable » la survenue d'un cas supplémentaire de cancer dans une population de 100000 personnes exposées au risque considéré sur une vie entière arbitrairement fixée à 70 ans.

2.2.3. Biomarqueurs :

Un biomarqueur est défini comme un changement ou une altération biologique apparaissant rapidement après pénétration de substances chimiques dans l'organisme. Il est ainsi interprété comme un signal précoce en relation avec une exposition aux contaminants chimiques dans l'environnement. Trois classes de biomarqueurs ont été définies (NRC, 1987; IPCS, 1993). Il s'agit des biomarqueurs d'exposition, d'effets et de susceptibilité.

- Les biomarqueurs d'exposition peuvent être des molécules exogènes, leurs métabolites ou le produit de leur interaction avec des molécules ou cellules cibles dans l'organisme.
- Les biomarqueurs d'effets sont des altérations biochimiques, physiologiques, comportementales ou autres au sein d'un organisme qui, en fonction de leur intensité, peuvent être assimilées à un trouble ou une maladie.
- Les biomarqueurs de susceptibilité sont des indicateurs d'une capacité inhérente ou acquise d'un organisme à répondre à un xénobiotique spécifique.

Ces outils sont des indicateurs précoces permettant d'anticiper les effets irréversibles des xénobiotiques. Il est en général nécessaire de suivre et de croiser différents biomarqueurs en raison de la difficulté d'attribuer un biomarqueur à un polluant donné et de la complexité de contamination des milieux.

Les métabolites biliaires de HAP sont essentiellement utilisés comme biomarqueurs chez les poissons (§ I.3). Ils sont considérés comme des biomarqueurs d'exposition. Leur intérêt a notamment été souligné dans une publication comparant la pertinence de différents biomarqueurs chez les poissons (van der Oost et al., 2003).

Les adduits formés par les métabolites avec l'ADN ainsi que les dommages causés sur celui-ci (test Comet) sont également fréquemment utilisés chez les organismes marins (Tableau I.12). Ils sont à la fois considérés comme des biomarqueurs d'exposition et d'effet et permettent d'évaluer l'impact mutagène d'un milieu sur les êtres vivants.

Parmi les autres biomarqueurs utilisés, ceux concernant l'activité des enzymes de phase I de biotransformation sont étudiés depuis de nombreuses années (van der Oost et al., 2003). Il s'agit de biomarqueurs d'exposition dont l'un des plus utilisés est l'activité EROD qui consiste à mesurer l'activité catalytique éthoxyrésorufin-*O*-dééthylase des cytochromes CYP1A. L'activité Aryl Hydrocarbon Hydrolase (AHH), l'activité du cytochrome P-450 1A (CYP1A) et l'activité des cytochrome P-450 (Cyt P450) sont également des biomarqueurs permettant de mesurer l'activité des enzymes de phase I ou la quantité de protéines correspondantes (van der Oost et al., 2003). Un autre biomarqueur plus spécifique aux HAP consiste à évaluer l'activité de l'enzyme Benzo(a)Pyrène Hydroxylase (BPH).

Les enzymes de phases II sont également utilisés pour évaluer l'exposition des organismes aux HAP. Pour cela, les activités des enzymes GST (glutathion S-transférases) et UDPGT (uridine-diphosphate-glucuronyltransférases) peuvent être mesurées.

Certains biomarqueurs suivent également le stress oxydatif généré par certains contaminants en produisant des radicaux. Ils consistent à mesurer l'activité inhibitrice de stress oxydatif de certaines enzymes, les catalases (CAT) et les superoxydes dismutases (SOD).

Biomarqueur	Etudes
Métabolites de HAP	cf § I.3
Adduits à l'ADN	Gupta et al., 1982; Varanasi et al., 1986a, 1987, 1989b; Dunn et al., 1987, 1990; Kurelec et al., 1989, 1993; Shields et al., 1993; Collier et al., 1993a; Harvey et al., 1997; Aas et al., 2000a
Test Comet	Shugart et al., 1988, 1990; Everaarts et al., 1994; Steinert et al., 1998
EROD	Burke and Mayer, 1974; Vindimian et Garric, 1989; Stegeman et al., 1990 et 1992; van der Oost et al., 1991, 1994a, 1996, 1998; Goksøyr et al., 1991, 1994; Narbonne et al., 1991; Lemaire-Gony et Lemaire, 1992; Collier et al., 1993a, 1995; Burgeot et al., 1994, 1996; McDonald et al., 1995; Flammarion et Garric, 1997; Viganò et al., 1995; Stagg et al., 2000; Aas et al., 2000a; Whyte et al., 2000
BPH	Payne, 1976; Kurelec et al., 1977; Ahokas et al., 1977; Stegeman, 1979
GST	Collier et Varanasi, 1991; Collier et al., 1992; Lemaire-Gony et Lemaire, 1992; Viganò et al., 1995; Burgeot et al., 1996; Lemaire et al., 1996; Förlin et al., 1996; Beyer et al., 1996 et 1997; van der Oost et al., 1994a, 1996 et 1998; Tuvikene et al., 1999; van Schanke et al., 2002
UDPGT	Goksøyr et al., 1991; Viganò et al., 1995; Lemaire et al., 1996; Förlin et al., 1996; Beyer et al., 1997; van der Oost et al., 1998; Tuvikene et al., 1999
CAT et SOD	Di Giulio et al., 1989; Livingstone et al., 1993; Burgeot et al., 1996; Van der Oost et al., 1996 et 1998

EROD : Ethoxyrésorufin-O-dééthylase; BPH : Benzo(a)pyrène hydroxylase; GST : Glutathion S-transférases; UDPGT : Uridine-diphosphate-glucuronyltransférases; CAT : Catalases; SOD : Superoxydes dismutases

Tableau I.12 : Principales études mettant en œuvre des biomarqueurs afin d'évaluer l'exposition aux HAP chez les organismes marins et ses effets

3. LES METABOLITES DE HAP

En raison de la faible accumulation des HAP chez les organismes supérieurs et de leur toxicité une fois biotransformés, il est apparu nécessaire de rechercher les métabolites de HAP dans les organismes (van der Oost et al., 2003; Altenburger et al., 2003). Des protocoles analytiques ont été mis au point afin d'identifier et de doser ces composés. Des expérimentations ont également été menées afin de mieux comprendre le devenir des HAP dans les organismes. Ces différents travaux ont enfin permis d'aboutir à la réalisation d'études de terrain utilisant les métabolites de HAP comme indicateurs de contamination et de biodisponibilité des HAP dans le milieu marin.

3.1. TECHNIQUES ANALYTIQUES :

Des techniques analytiques ont été mises au point afin de doser les métabolites de HAP dans les matrices biologiques. Pour cela, des méthodes de préparation d'échantillon, d'extraction, de purification, de séparation et de détection des composés ont été réalisées.

3.1.1. Déconjugaison :

Les métabolites se trouvant sous différentes formes conjuguées dans l'organisme, il est possible de recourir à une étape de déconjugaison afin de quantifier les métabolites sous forme libre (non conjuguée).

Pour cela, une technique faisant appel à des enzymes est principalement utilisée (Solbakken et al., 1980a; Varanasi et Gmur, 1981; Krahn et al, 1984; Stein et al, 1984; Hellou et Payne, 1987; Ariese et al, 1993a; Escartín et Porte, 1999a; Stephensen et al, 2000; Ruddock et al, 2002). Ces enzymes, β -glucuronidase et aryl-sulfatase, sont généralement utilisées en mélange afin de libérer les métabolites conjugués à l'acide glucuronique et au sulfate. Elles peuvent également être utilisées individuellement, notamment par inhibition de l'une ou de l'autre (Varanasi et Gmur, 1981; Varanasi et al, 1986a; Steward et al, 1990b; Law et al, 1994).

Certaines études ont également recours à une attaque acide avec de l'acide chlorhydrique (Lee, 1989; Yu et al, 1995; Escartín et Porte, 1999b) ou avec de l'acide sulfurique (Law et al., 1994) afin de libérer les métabolites conjugués au glutathion. Steward et ses collaborateurs (1990a) utilisent une enzyme appelée gamma-glutamyltransférase afin de libérer les conjugués au glutathion.

3.1.2. Extraction :

Cette étape permet d'extraire les composés des échantillons biologiques. Elle est nécessaire dans le cas de matrices solides au sein desquels les composés sont adsorbés ou dans le cas de matrices liquides lorsque les étapes suivantes du protocole nécessitent de se trouver dans un solvant organique. Les principales techniques utilisées pour l'extraction des métabolites sont l'extraction liquide-liquide, l'extraction sur phase solide (SPE) et la micro-extraction sur phase solide (SPME). Pour les deux premières techniques, l'affinité des composés pour la phase organique utilisée est prépondérante. En fonction de sa sélectivité, l'étape d'extraction peut également permettre de purifier les échantillons.

a) Extraction liquide-liquide :

L'extraction liquide-liquide est la technique la plus utilisée pour extraire les métabolites de HAP, que se soit avec ou sans déconjugaison préalable. Cette méthode permet d'extraire les métabolites d'une matrice aqueuse vers un solvant organique non miscible avec l'eau par agitation. Le solvant utilisé dans la majorité des travaux sur les métabolites de HAP est l'acétate d'éthyle (Tableau I.13). Il est également intéressant de noter que Varanasi et al. (1986a) ont ajouté un antioxydant dans leur protocole sans en expliquer la raison. Une saponification peut également être réalisée par chauffage de l'échantillon en présence d'une solution d'hydroxyde de potassium éthanolique (crustacé entier; Stroomberg et al., 1996).

Matrice	Exposition	Solvant	Référence
organes de poisson	N et A	C ₆ H ₁₄ et NaOH	Roubal et al., 1977
foie et peau	N	C ₆ H ₁₄ et NaOH	Varanasi et al., 1978
bile	ports	C ₆ H ₁₄ /(CH ₃) ₃ C(OCH ₃) (2:1, v:v)	Stephensen et al., 2000
bile	Sédiment contaminé	C ₆ H ₁₄	Ariese et al., 1993a; Hyötyläinen et Oikari, 1999
microsomes hépatiques		CH ₃ COOC ₂ H ₅	Ahokas et al., 1977 et 1979
foie	BaP		Varanasi et Gmur, 1980a
foie			Egaas et Varanasi, 1982
muscle, foie et bile			Gmur et Varanasi, 1982
fraction d'hépatopancréas de crabe	Fe et BaP		Lee, 1989
bile	N et BaP		Varanasi et Gmur, 1981
divers organes de poisson	N		Collier et al., 1978
bile			Solbakken et al., 1980a
foie	Phe		Goksøyr et al., 1986
microsomes			Pangrekar et al., 2003a et b
bile	C		Jonsson et al., 2003 et 2004
microsomes	DBaP		Yuan et al., 1999
bile	milieu aquatique		Escartín et Porte (1999a,b,c); Fernandes et al., 2002; Porte et al., 2002
bile	BaP	CH ₃ COOC ₂ H ₅ /(CH ₃) ₂ CO puis CH ₃ COOC ₂ H ₅	Steward et al., 1990b
muscle et foie	pétrole	CH ₂ Cl ₂	Krone et al, 1992
bile	P		Law et al., 1994
crabe entier	P		Stroomberg et al., 1996
bile	pétrole	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH puis CH ₂ Cl ₂	Hellou et Payne, 1987, Upshall et al, 1993
bile	milieu marin	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH (10:1, v/v) puis CH ₂ Cl ₂	Krahn et al, 1992 et 1993a
bile	pétrole		Yu et al., 1995
bile	milieu marin	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH	McDonald et al, 1992
micro-crustacé entier	BaP et F	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH/H ₂ O	Gourlay et al., 2002
néréis	P marqué	CHCl ₃ /CH ₃ OH/H ₂ O	Christensen et al., 2002
bile	BaP	CH ₃ OH/CHCl ₃ , BHT	Varanasi et al., 1986a
bile, foie	Phe et rétène	CH ₃ OH	Hawkins et al., 2002
poisson entier	BaP	CH ₃ CN	Koloc et al., 1996
palourde entière	P		Simpson et al., 2002

DBaP : dibenzo(a,l)pyrène; C₆H₁₄ : hexane; NaOH : soude; (CH₃)₃C(OCH₃) : méthyl t-butyl éther (MTBE); CH₃COOC₂H₅ : acétate d'éthyle; (CH₃)₂CO : acétone; CH₂Cl₂ : dichlorométhane; CH₃OH : méthanol; H₂O : eau; CHCl₃ : chloroforme; BHT : CH₃C₆H₂OH(C(CH₃)₃)₂ : 2,6-di-tert-butyl-p-crésol (antioxydant); CH₃CN : acétonitrile

Tableau I.13 : Travaux mettant en oeuvre une extraction liquide-liquide des métabolites de HAP

b) Extraction sur phase solide (SPE) :

L'extraction sur phase solide permet quant à elle d'extraire les métabolites contenus dans les matrices liquides par rétention des composés sur une phase. L'élimination de la matrice est réalisée par rinçage de la phase avec une phase éluante à base d'eau dans un flacon poubelle. Les métabolites sont ensuite récupérés par passage d'un solvant organique dont l'affinité avec les composés adsorbés est suffisamment forte pour permettre leur élution. On peut noter que cette technique a été développée dans de nombreux travaux concernant les métabolites urinaires du pyrène chez l'homme (Tableau I.14). Toutes les études faisant appel à cette technique d'extraction utilisent des cartouches remplies de phase octadécyl (C₁₈) ou, plus rarement, des disques en fibre de verre greffés C18. Un protocole pour l'extraction du 1-hydroxypyrene a été décrit par Jongeneelen et al. (1987) puis utilisé par différentes équipes (Siwinska et al. 1999; Li et al. 2000). Le passage de l'échantillon sur la cartouche se fait après hydrolyse enzymatique. La phase est rincée avec de l'eau et l'élution est réalisée à l'aide de méthanol. Les rendements varient entre 81 et 91%. D'autres protocoles présentés dans le Tableau I.14 ont également été mis au point pour d'autres métabolites. L'application de cette technique au milieu marin a été réalisée par quelques équipes. McElroy et al. (1990) et Simpson et al. (2002) ont ainsi mis au point une méthode pour doser les métabolites du pyrène et du benzo(a)anthracène dans l'eau. Law et al. (1994) ainsi que Hawkins et al. (2002) utilisent la SPE pour extraire les métabolites de différents HAP d'échantillons de bile et de foie de poisson (avec et sans déconjugaison enzymatique).

Etude	Matrice	Métabolites (du)	Rinçage	Elution
Jongeneelen et al., 1987; Siwinska et al., 1999; Li et al., 2000	urine	1-OHP	H ₂ O	CH ₃ OH
Lee et al., 1999	urine	1-OHP glucuronide	H ₂ O/CH ₃ OH (70:30, v:v)	H ₂ O/CH ₃ OH (20:80, v:v)
Andreoli et al., 1999	urine	OHN et conjugués	H ₂ O	CH ₃ OH acidifié
Ferrari et al., 2002	urine	1-OHP	H ₂ O puis C ₆ H ₁₄	CH ₂ Cl ₂
Singh et al., 1995	urine	1-OHP et conjugués	H ₂ O	H ₂ O/CH ₃ CN (60:40, v:v)
Gündel et Angerer, 2000	urine	3-OHBaP et 3- OHBaA	H ₂ O	C ₂ H ₅ OC ₂ H ₅
Algarra et al., 2000	urine	1-OHP	-	fluorescence fixe
McElroy et al, 1990	eau	BaA	H ₂ O	CH ₃ CN
Simpson et al., 2002	eau	P	H ₂ O	CH ₃ CN/ H ₂ O puis CH ₃ CN
Law et al, 1994	bile de poisson	P	H ₂ O/CH ₃ OH (70/30)	CH ₃ OH
Hawkins et al, 2002	bile et foie de poisson	Phe et rétène	non précisé	non précisé

OH : hydroxy; *H₂O* : eau; *CH₃OH* : méthanol; *C₆H₁₄* : hexane; *CH₂Cl₂* : dichlorométhane; *CH₃CN* : acétonitrile;
C₂H₅OC₂H₅ : diéthyléther

Tableau I.14 : Principaux protocoles mettant en oeuvre une extraction sur phase solide C₁₈ des métabolites de HAP

De rares études font appel à des phases autres que celles greffées C₁₈. Statham et al. (1976) ont utilisé une phase polymérique XAD-2 pour extraire les métabolites du naphthalène et d'un méthyl-naphthalène d'échantillons de bile de truite (rinçage à l'eau et élution au méthanol). De plus, une technique particulière d'extraction sur phase solide par passage de l'échantillon non déconjugué sur la phase par centrifugation à l'aide d'un automate a été présentée par Krahn et al. (1982) et utilisée par Krahn et Malins (1982) ainsi que Krahn et al. (1984 et 1987). Ce protocole a été mis au point pour l'extraction de métabolites du naphthalène, du 2,6-diméthyl-naphthalène et du benzo(a)pyrène dans différentes matrices (plasma, bile et foie). La phase est ici constituée de billes de verre greffées de styrène-divinylbenzène. La matrice est éliminée par rinçage à l'eau puis les métabolites sont élués par un mélange de solvants.

c) Micro-extraction sur phase solide (SPME) :

La micro-extraction sur phase solide est une technique qui ne nécessite pas l'utilisation de solvants organiques. Cette technique consiste en l'adsorption des composés sur une fibre. Les composés sont ensuite généralement désorbés thermiquement directement dans un injecteur de chromatographe en phase gazeuse pour analyse. Comme pour la SPE, cette méthode a essentiellement été appliquée à des échantillons d'urine humaine pour l'extraction des métabolites de HAP. Ainsi, Gmeiner et al. (1998) utilisent une fibre polyacrylate plongée pendant 45 minutes dans un échantillon d'urine hydrolysé. Dans cette étude, différents composés hydroxylés sont extraits (les 1-, 2- et 4-hydroxypyrene, les 1- et 2-hydroxynaphthalène et les 1-, 2-, 3-, 4- et 9-hydroxyphénanthrène). Cette méthode a ensuite été modifiée en 2002 afin d'extraire des métabolites du fluorène (les 1-, 2-, 4-, 9-hydroxyfluorène). La fibre est alors immergée toute une nuit à 35°C avec agitation magnétique. Elle est ensuite lavée avec de l'eau déionisée puis séchée avec du papier avant désorption.

3.1.3. Purification :

Les matrices biologiques sont des mélanges complexes dont certains constituants peuvent interférer avec les composés à doser et qui peuvent encrasser les appareils d'analyse. Une étape de purification des échantillons peut être envisagée afin d'éliminer certains constituants de la matrice. Les différentes techniques utilisées sont fondées sur la différence d'affinité des composés pour une phase stationnaire solide et une phase mobile liquide.

La chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP) a été utilisée dans différentes études, tout particulièrement pour la purification d'échantillons d'urine humaine. La plupart de ces travaux décrivent un protocole, adapté aux métabolites comportant au moins trois cycles aromatiques, impliquant une précolonne d'enrichissement remplie de silice modifiée greffée de phthalocyanine de cuivre (Boos et al., 1992; Hackl et al., 1996; Gundel et al., 1996; Angerer et al., 1997). Les métabolites sont adsorbés sur la phase de la précolonne alors que la matrice est évacuée dans un flacon poubelle. Une élution à l'aide de méthanol est ensuite réalisée afin d'entraîner les métabolites.

Dans le cas des poissons, différents protocoles CLHP ont également été utilisés, en phase normale et en phase inverse (Tableau I.15). Krahn et al. (1980) ont mis au point un protocole utilisant un fractionnement des métabolites en phase inverse. Par la suite, un protocole, toujours en phase inverse, destiné à éliminer les composés interférents de foies de poissons mais également pour séparer les métabolites conjugués, non-conjugués et les HAP parents a été mis au point (Krahn et Malins, 1982). La séparation des métabolites conjugués et non-conjugués d'échantillons de foie, bile et plasma a également été développé par chromatographie en phase normale (phase greffée diol) (Krahn et al., 1982).

Peu de travaux décrivent par contre des protocoles de purification par SPE. Ferrari et al. (2002) proposent une purification d'échantillons d'urine de bovin dans le but de doser le 1-hydroxypyrene. Elle est réalisée sur gel de silice en utilisant un mélange éluant dichlorométhane/acétate d'éthyle (9:1 (v:v)).

Quelques études ont de plus eu recours à l'élimination des protéines présentes dans la bile de poisson ou dans l'hémolymphe de crabe par précipitation à l'aide d'acétone (Thomas et al., 1977; Collier et al., 1978), d'éthanol (Ariese et al., 1993a; Eickhoff et al., 2003) ou d'un mélange éthanol/hexane (Leonard et Hellou, 2001). Dans cette dernière étude, une extraction avec du méthyl-tert-butyléther (MTBE) est réalisée suite à la précipitation des protéines afin d'éliminer des composés organiques solubles.

Etude	Matrice	Exposition	Phase CLHP	Description
Krahn et al., 1980	bile	N	inverse	fractionnements
Varanasi et Gmur, 1980a	surnameant de foie	BaP		
Krahn et Malins, 1982	foie	pétrole		séparation conjugués/ non-conjugués
Krahn et al., 1984	bile	milieu naturel		isolement des conjugués glucuronides et sulfates
Varanasi et al., 1986a	bile	BaP		isolement des diols
Plakunov et al., 1987	cultures cellulaires	BaP		séparation des glucuronides, sulfates et thio-éthers
Simpson et al., 2002	mollusque entier	P		isolement non-conjugués
Krahn et al., 1982	foie, bile, plasma	N et BaP	normale (diol)	séparation conjugués/non- conjugués
Krahn et al., 1988a et b, 1992, 1993a et b; Varanasi et al., 1990; McDonald et al., 1992	bile	mélanges	normale (exclusion stérique)	récupération du Bi au 1-OHP
Yu et al., 1995	bile	pétrole		récupération du Bi au 1-OHBaP

Tableau I.15 : Principaux travaux mettant en œuvre une purification CLHP d'échantillons de poissons

3.1.4. Séparation et détection des métabolites :

D'une manière générale, afin de détecter des composés, il est nécessaire que ceux-ci arrivent séparément au niveau du détecteur. Différentes techniques de séparation couplées à des détecteurs ont ainsi été utilisées. Ces détecteurs permettent la quantification des composés par l'enregistrement d'un signal proportionnel à leur concentration.

De nombreuses études ont été réalisées en laboratoire à l'aide de HAP radioactifs facilitant la détection des métabolites qui se fait alors à l'aide d'un compteur à scintillation, la séparation des composés se faisant par chromatographie sur couche mince ou par CLHP.

a) Techniques de spectrofluorimétrie :

La spectrofluorimétrie est basée sur la propriété qu'ont les composés aromatiques de fluorescer lorsqu'ils sont soumis à une excitation. Cette propriété est due à la présence d'électrons délocalisés dans ces molécules.

Différentes techniques basées sur la fluorimétrie ont été utilisées pour détecter les métabolites de HAP. Les plus utilisées comme la chromatographie liquide haute performance couplée à la fluorimétrie, le balayage de fluorescence synchrone (SFS) et la fluorescence fixe (FF) sont détaillés dans les paragraphes suivants. Cependant, d'autres techniques peuvent être utilisées comme le balayage des longueurs d'onde d'émission à une excitation fixe (Gourlay et al., 2002; Hawkins et al., 2002), la fluorescence induite par laser (Weeks et al., 1990; Ariese et al., 1993b et d; Kozin et al., 1996; Larsen et al., 1998; Smith et al., 1998; Kuijt et al., 2001) ou la chromatographie électrocinétique micellaire couplée à la fluorimétrie (Krismann et Kleiböhmer, 1997; Smith et al., 1998; Kodama et al., 2000).

Chromatographie en phase liquide haute performance couplée à la spectrofluorimétrie (CLHP-F)

La majorité des études concernant les métabolites de HAP chez les poissons utilise la chromatographie en phase liquide haute performance en phase inverse (phase stationnaire apolaire et phase mobile polaire) couplée à la fluorimétrie comme méthode de dosage des métabolites de HAP. Cette technique a également été utilisée dans le cas de micro-crustacés *Daphnia magna* (Gourlay et al., 2002), de palourdes (Simpson et al., 2002) et d'un isopode terrestre (Stroomberg et al., 1996). La CLHP en phase normale a également été utilisée pour la séparation de diols du benzo(a)pyrène dans la bile de poisson (Varanasi et al., 1986a).

La plupart des études réalisées en phase inverse s'inspirent du protocole mis au point par Krahn et al. (1984, 1986a et c) (Tableau I.16). La bile est directement injectée en CLHP et la fluorescence est mesurée à une longueur d'onde d'excitation et d'émission fixe. 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 mesures peuvent être effectuées à 290/335 nm (longueurs d'onde d'excitation/émission) pour détecter les métabolites de type naphthalénique (généralement utilisés pour mettre en évidence une exposition à du pétrole), à 260/380 nm pour les phénanthréniques et à 380/430 nm pour ceux du benzo(a)pyrène (généralement utilisés pour mettre en évidence une origine pyrolytique de contamination). Dans ces conditions, la contribution de composés interférents au signal global est considérée comme faible. Cependant, la présence d'interférents dans les chromatogrammes CLHP est parfois notée dans la bile de poissons aux longueurs d'onde des métabolites du naphthalène et du phénanthrène (McDonald et al., 1992). Les quantités sont respectivement exprimées en équivalents naphthalène, phénanthrène et benzo(a)pyrène, composés utilisés pour l'étalonnage. L'auteur précise cependant que certains métabolites du phénanthrène répondent aux longueurs d'onde du naphthalène et inversement, et que ceux du fluoranthène et du pyrène peuvent également répondre à celles du benzo(a)pyrène. Ainsi, certaines études utilisent le 1-hydroxypyrene comme étalon externe pour doser les métabolites du benzo(a)pyrène (Gagnon et Holdway, 2000). Le tétrahydrotétrolbenzo(a)pyrène a également été utilisé comme étalon interne (Deshpande, 1989). Aas et al. (2001) dosent également les métabolites du pyrène à 340/384 nm.

Certains travaux décrivent également une déconjugaison enzymatique de la bile avant quantification globale des métabolites (Krahn et al., 1986a; Ariese et al., 1993a; Upshall et al., 1993; Escartín et Porte, 1999a et b).

D'autres études utilisent la CLHP-F après déconjugaison enzymatique afin de détecter individuellement les métabolites présents (Krahn et al., 1987; Ruddock et al., 2002 et 2003; Eickhoff et al., 2003; Jonsson et al. 2003 et 2004). Parmi les composés détectés dans ces études, on

trouve le 7,8-dihydrodiolbenzo(a)pyrène, les 1- et 3-hydroxybenzo(a)pyrène, le 1-hydroxypyrene, le 1-hydroxyphénanthrène, le 1-hydroxychrysène,

Etude	Exposition ou milieu	Métabolites du ...
Krahn et al., 1984, 1986a et c; Willett et al., 1997	milieu côtier	N, Phe et BaP
Krahn et al., 1986b	marée noire rivière	
McDonald et al., 1992; Kennicutt et al., 1995	Antarctique	
McDonald et al., 1995	Antarctique, pétrole, BaP	
Roy et al., 2003	sédiment fuite naturelle de pétrole	
Krahn et al., 1992	Exxon Valdez	
Aas et al., 2001	proximité usine	N, P et BaP
Varanasi et al., 1990 et 1993b; Jewett et al., 2002	Exxon Valdez	N et Phe
Spies et al., 1996	fuite naturelle de pétrole	
Klumpp et al., 2002	port et baie	
Hellou et Payne, 1987; Upshall et al., 1993	pétrole	N
Krahn et al., 1993a	marée noire Golfe	Phe
Krahn et al., 1993b et c; Huggett et al., 2003	Exxon Valdez	
Krahn et al., 1987	détroit et pétrole	N et BaP
Myers et al., 1993; Stein et al., 1995; McCain et al., 1996, 2000	milieu côtier	
Lin et al., 1996	rivières	
Viganò et al., 2002	fleuve	Phe et BaP
Varanasi et al., 1986b; Willett et al., 1995; Koloc et al., 1996	BaP	BaP
Varanasi et al., 1985; Stein et al., 1987; French et al., 1996	sédiment de milieu côtier	
Collier et Varanasi, 1987; Varanasi et al., 1989b, 1993a; McCain et al., 1990; Myers et al., 1990, 1994; Stein et al., 1992; Collier et al., 1998a et b; Escartín et Porte, 1999a	milieu côtier	
Escartín et Porte, 1999c	océan profond	
Varanasi et al., 1989a	Exxon Valdez	
Johnston et Baumann, 1989; Deshpande, 1989; Metcalfe et al., 1997; Arcand-Hoy et Metcalfe, 1999; Leadly et al., 1999; Deshpande et al., 2002	rivières	

Tableau I.16 : Récapitulatif des études réalisées par analyse directe d'échantillons en CLHP-F sans étape de déconjugaison enzymatique

Spectrométrie de fluorescence synchrone (SFS)

Afin de diminuer le temps d'analyse et de simplifier les manipulations, une technique de mesure de fluorescence directe de la bile sans séparation CLHP a été mise au point. Elle consiste à balayer les longueurs d'onde d'excitation et d'émission monochromatiques des échantillons dilués avec une différence de longueur d'onde constante. La plupart des études se basent sur les méthodes misent au point par Ariese et al. (1993a), Lin et al. (1994) et van der Oost et al. (1994b) pour le dosage des métabolites globaux du pyrène (Tableau I.17). Les métabolites sont généralement quantifiés par rapport au 1-hydroxypyrene et exprimés en équivalents hydroxypyrene. La quasi-totalité des études réalisées s'intéresse uniquement aux métabolites du pyrène en raison de l'abondance de ce composé dans l'environnement, de son métabolisme simple (production prépondérante d'un unique métabolite de phase I), et de la forte présence de ses métabolites dans la bile de poisson (Krahn et al., 1987; Ariese et al., 1993a). Cependant, le dosage des métabolites du phénanthrène a également été réalisé par cette technique dans l'urine et l'hémolymphe de crabes (Fillmann et al., 2002).

Fluorescence fixe (FF)

Il s'agit de la méthode la plus simple puisqu'elle consiste à effectuer la mesure de la fluorescence dans des échantillons dilués (quasiment exclusivement des échantillons de bile) aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission des métabolites comme en CLHP-F. La plupart des études se basent sur les travaux de Lin et al. (1996), Beyer et al. (1996) et Aas et al. (1998a). La quantification est réalisée en étalonnage externe, soit par rapport aux composés étalons phénoliques disponibles (équivalents 1-hydroxynaphtalène, 9-hydroxyphénanthrène, 1-hydroxypyrene ou 3-hydroxybenzo(a)pyrene), soit par rapport aux HAP parents. Les longueurs d'onde utilisées varient d'une étude à l'autre mais sont globalement proches de celles utilisées par CLHP-F. On peut noter que Beyer et al. (1996) ont réalisé un dosage cumulé des métabolites du naphtalène et du phénanthrène à 275/383 nm alors que Lin et al. (1996) ont mesuré les métabolites du naphtalène à 290/335 nm et Fillmann et al. (2002) ceux du phénanthrène seuls à 252/357 nm. Les principales études de détection par FF sont récapitulées dans le Tableau I.17. Lin et al. (1996), comparant la CLHP-F et la FF, remarquent que les valeurs obtenues pour les métabolites du benzo(a)pyrene par CLHP-F sont toujours supérieures à celles obtenues par FF alors que ce n'est pas le cas pour les métabolites du naphtalène où le rapport entre les deux méthodes est beaucoup plus variable. Cependant, les valeurs exprimées en unités relatives sont équivalentes par les deux méthodes.

Technique	Références
SFS	Ariese et al., 1993a et c; van der Oost et al., 1994b; Lin et al., 1994; Lewis, 1997; Hyötyläinen et Oikari, 1999; Fillmann et al., 2002
FF	Britvić et al., 1993; Lin et al., 1996 et 2001; Beyer et al., 1996 et 1998; Aas et al., 1998, 2000b et 2001; Fillmann et al., 2002

Tableau I.17 : Principales études concernant la mise au point du dosage des métabolites de HAP chez des organismes marins par SFS (Spectrométrie de Fluorescence Synchrone) et FF (Fluorescence Fixe)

b) Techniques de spectrométrie de masse :

La spectrométrie de masse est une technique de détection dite universelle, à l'inverse de la fluorimétrie. Toute molécule ionisable peut être détectée par spectrométrie de masse.

Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)

La CPG/SM est une technique utilisée lors d'études d'identification de métabolites en laboratoire mais également pour le dosage des métabolites dans le milieu marin.

Après une étape d'extraction des métabolites, l'extrait obtenu est généralement injecté après avoir subi une étape de dérivation (Tableau I.18). Krahn et al. (1984) justifient l'étape de dérivation par la possibilité de déshydratation de certains composés comme les diols en condition d'analyse en chromatographie gazeuse. Cependant, certaines études soulignent la diminution de sensibilité provoquée par cette étape (Krahn et al., 1984; Escartín et Porte, 1999b et c). La dérivation consiste généralement en une triméthylsilylation des fonctions alcools à l'aide de bis(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide (BSTFA). Krahn et al. (1987) n'effectuent pas de purification par HPLC avant injection en CPG/SM comme ils le faisaient précédemment mais soulignent la nécessité du nettoyage fréquent de l'appareil dans ce cas.

Méthode	Etude en laboratoire	Etude en milieu naturel
avec dérivation	Krahn et al., 1980, 1987; Solbakken et al, 1980a; Solbakken et Palmork, 1981; Gmur et Varanasi, 1982; Goksøyr et al., 1986; Hellou et Payne, 1987; Law et al., 1994; Hellou et al., 1997; Leonard et Hellou, 2001; Jonsson et al., 2003 et 2004	Krahn et al., 1984, 1987, 1992, 1993a et b; McDonald et al., 1992; Yu et al., 1995
sans dérivation	Krahn et al., 1980, 1987; Krahn et Malins, 1982; Simpson et al., 2002	Escartín et Porte, 1999a, b et c; Stephensen et al., 2000; Fernandes et al., 2002; Porte et al., 2002

Tableau I.18 : récapitulatif des études utilisant la GC/MS pour détecter les métabolites de HAP dans les organismes marins

Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-SM)

La CLHP-SM a plus particulièrement été utilisé pour le dosage des métabolites dans l'urine humaine, de rongeur ou de bovin (Galceran et Moyano, 1996; Johnson et al., 1996; Yang et al, 1997; Johnson et Greenberg, 1999; Andreoli et al. 1999; Ferrari et al, 2002). Les sources d'ionisation dites APCI (Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique) et ESI (Ionisation Electrospray), ont toutes deux été utilisées. Quelques équipes ont travaillé sur les organismes marins mais uniquement dans le but d'identifier des métabolites lors d'expositions en laboratoire (Law et al., 1994; Leonard et Hellou, 1999; Simpson et al., 2002).

Autres techniques

D'autres techniques ont été utilisées afin de doser les métabolites de HAP. Cependant, leur utilisation reste rare et concerne essentiellement des études sur l'urine humaine ou de rongeurs. Ainsi, l'électrophorèse capillaire a été utilisée pour séparer différents métabolites hydroxylés (Xu et Hurtubise, 1998; Kuijt et al., 2001). Des protocoles utilisant la CLHP couplée à une détection ampérométrique (Nirmaier et al., 1998; Fisher et al., 1998), électrochimique (Barek et al., 1997) ou d'absorption (Haddad et al., 1997) ont également été utilisés ainsi qu'une technique par ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Knopp et al., 1999; Fillmann et al., 2002).

3.2. ETUDE DU METABOLISME ET IDENTIFICATION DES METABOLITES :

L'étude du métabolisme des HAP a été réalisée chez de nombreux êtres vivants. Les rongeurs ont plus particulièrement été étudiés (cf études de Boyland et/ou Sims). Des expérimentations d'expositions aux HAP (pyrène et benzo(a)pyrène principalement) ont ainsi été effectuées, recherchant principalement les métabolites dans l'urine, le foie et la vésicule biliaire. De nombreuses études de biotransformation de HAP par des microsomes hépatiques de rongeurs ont été réalisées (Prough, 1979; Jacob, 1982; Varanasi et al., 1986a; Hong et al., 1999).

Des identifications de métabolites ont également été réalisées chez différents autres organismes comme les bovins par exemple (Ferrari et al, 2002), les canards (Honey et al., 2000), les crickets (Kumi et al., 1991) et autres insectes (He et al., 1998).

3.2.1. Localisation des métabolites chez les organismes aquatiques :

Chez les organismes aquatiques, les poissons sont les animaux les plus étudiés. Différentes recherches ont été menées, utilisant notamment des HAP radiomarqués, afin d'étudier le devenir des HAP dans l'organisme.

Parmi les premiers travaux étudiant la métabolisation des HAP chez les poissons, ceux de Lee et al. (1972b) et Statham et al. (1976) ont mis en évidence une forte accumulation des métabolites dans la vésicule biliaire. Par la suite, différentes études consistant à exposer des poissons à des HAP se sont intéressées à la distribution des métabolites dans l'organisme des poissons et ont confirmé que l'organe présentant la plus forte concentration de métabolites était la vésicule biliaire (Tableau I.19). Vient ensuite généralement le foie, principal organe de biotransformation, puis la peau et d'autres organes comme les branchies, les gonades, les reins, les intestins, la vessie, le sang, le cerveau et la rate avec des ordres variables selon les études. Les muscles présentent en général les concentrations les plus faibles (Varanasi et Stein, 1991).

Espèce	Exposition	Référence
killie (<i>Fundus Similis</i>)	N radioactif	Neff et al., 1976; Dixit et Anderson, 1977
plie étoilée (<i>Platichthys stellatus</i>), fausse limande du Pacifique (<i>Lepidopsetta bilineata</i>)	[³ H] N	Varanasi et al., 1979
carlottin anglais (<i>Parophrys vetulus</i>)	[¹⁴ C] N, [³ H] BaP	Varanasi et Gmur, 1981
truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	N, 2,6-C ₂ N et BaP	Krahn et al., 1982
saumon coho (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	[¹⁴ C] N et [¹⁴ C] A	Roubal et al., 1977
flet (<i>Platichthys flesus</i>)	N, Phe et BaP radioactifs	Solbakken et al., 1984
lieu noir (<i>Pollachius virens</i>)	[¹⁴ C] Phe	Solbakken et al., 1980b
aiguillat commun (<i>Squalus acanthias</i>), truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	[¹⁴ C] Phe	Solbakken et Palmork, 1980
gorette catire (<i>Haemulon sciurus</i>)	[¹⁴ C] Phe	Solbakken et al., 1982
flet (<i>Platichthys flesus</i>), truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) et aiguillat commun (<i>Squalus acanthias</i>)	Phe	Solbakken et Palmork, 1981

Espèce	Exposition	Référence
carlottin anglais (<i>Parophrys vetulus</i>)	[³ H] ou [¹⁴ C] BaP	Varanasi et Gmur, 1980b; Gmur et Varanasi, 1982; Varanasi et al., 1983a et 1985; Stein et al., 1984 et 1987
carlottin anglais (<i>Parophrys vetulus</i>), plie étoilée (<i>Platichthys stellatus</i>)	[³ H] BaP	Varanasi et al., 1986a
brochet (<i>Esox lucius</i>)	[³ H] BaP	Balk et al., 1984
poisson-chat (<i>Ictalurus nebulosus</i>)	[³ H] BaP	Steward et al., 1990b

[³H] : isotope 3 de l'hydrogène; [¹⁴C] : isotope 14 du carbone

Tableau I.19 : Travaux étudiant la distribution des métabolites dans différents organes de poisson dont la vésicule biliaire

Chez les crustacés, les métabolites sont principalement présents dans l'hépatopancréas (Lee et al., 1976; Varanasi et al., 1985; James, 1991) et dans les glandes antennaires (Solbakken et Palmork, 1981). Leur présence dans l'urine et, dans des proportions plus faibles, dans l'hémolymphe de crabes a également été mise en évidence (Paine et al., 1996; Fillmann et al., 2002).

La plupart des études s'intéressant aux métabolites de HAP chez les mollusques, les microcrustacés (*Daphnia magna*) et les vers (*Nereis diversicolor*, *Nereis virens*, *Arenicola marina*) ont réalisé un dosage sur la totalité de l'organisme (McElroy et Sisson, 1989; McElroy, 1990; Gourlay et al., 2002; Simpson et al., 2002; Christensen et al., 2002; Akkanen et Kukkonen, 2003). Chez les mollusques, le principal organe de métabolisation et de stockage des métabolites est la glande digestive bien qu'il ait été montré que, chez des palourdes (*Macoma nasuta*) exposées à du benzo(a)pyrène, cet organe contenait davantage de composés parents que de métabolites en raison des faibles capacités de biotransformation des mollusques (Varanasi et al., 1985).

3.2.2. Identification des métabolites :

a) Généralités :

Différentes études ont montré que les poissons transformaient les HAP en métabolites de structure similaires à ceux produits par les rongeurs (composés hydroxylés) (Egaas et Varanasi, 1982; Swain et Melius, 1984; Varanasi et al., 1986a; Sikka et al., 1990a; Yuan et al., 1999; Pangrekar et al., 2003a et b). Il a par contre été observé une majorité de quinones chez les mollusques, supposant un mécanisme de biotransformation majoritairement radicalaire et une faible activité des enzymes dépendantes du cytochrome P-450 (Anderson, 1978; Stegeman, 1985).

De nombreuses études ont de plus observé que les métabolites avaient un temps de résidence dans les tissus et les fluides plus long que les composés parents chez différents organismes marins (Statham et al., 1976; Lee et al., 1976; Sanborn et Malins, 1977; Roubal et al., 1977; Varanasi et al., 1978 et 1979; Malins, 1980; Schnell et al., 1980; Varanasi et Gmur, 1981; Varanasi et al., 1989a).

Les métabolites peuvent se trouver sous forme conjuguée ou libre dans l'organisme. Dans la bile, la forme conjuguée est généralement prépondérante même si le pourcentage de conjugaison est très variable d'un métabolite à l'autre (Collier et al., 1978; Varanasi et al., 1979; Solbakken et al., 1980a; Solbakken et Palmork, 1980 et 1981; Leonard et Hellou, 2001).

Les conjugués sulfatés des HAP sont d'une manière générale moins abondants que les glucuronides chez les poissons (Varanasi et Gmur, 1981; Balk et al., 1982; Morrison et al., 1985; Hellou et al., 1986; Plakunov et al., 1987; Steward et al., 1990a et b; Clarke et al., 1991; Sikka et al., 1991; Leonard et Hellou, 2001) et majoritairement éliminés via l'urine (Layiwola et al., 1983; Pritchard et Bend, 1984; Pritchard et Renfro, 1984) alors que les conjugués glucuronidés sont majoritairement excrétés dans la bile (Hellou et al., 1986; Leonard et Hellou, 2001).

Les paragraphes suivants traitent en détail de l'identification des métabolites chez des organismes marins exposés à des HAP individuellement et plus précisément de quatre d'entre eux particulièrement étudiés : le naphthalène, le phénanthrène, le benzo(a)pyrène et le pyrène. Les métabolites biliaires de poissons exposés à des produits pétroliers sont également présentés.

b) Naphtalène :

Le naphthalène est le plus léger des HAP. Il a été constaté que ce HAP pouvait être excrété sans transformation préalable par les branchies et la peau chez les poissons (Varanasi et al., 1978, 1985; Thomas et Rice, 1981 et 1982; Solbakken et al., 1984).

Lors de sa biotransformation, le naphthalène est tout d'abord principalement oxydé en naphthalène-1,2-oxide qui produit les 1- et 2-hydroxynaphthalène ainsi que le 1,2-dihydroxynaphthalène (Lee et al., 1972b; Melancon et Lech, 1978; Malins et al., 1979; Varanasi et al., 1979). Les principaux résultats obtenus chez divers poissons exposés à ce HAP montrent une prédominance du 1,2-dihydroxynaphthalène, des 1- et 2-hydroxynaphthalène ainsi que des glucuronides de ces composés dans le foie (Malins et al., 1979; Collier et al., 1980). Dans la bile, les conjugués glucuronidés sont largement majoritaires par rapport aux sulfates (Roubal et al., 1977; Collier et al., 1978; Varanasi et al., 1979; Krahn et al., 1980; Varanasi et Gmur, 1981) et notamment ceux du 1,2-dihydroxynaphthalène. Les conjugués sulfatés des HAP sont d'une manière générale moins abondamment produits que les glucuronides chez différentes espèces de poissons (Varanasi et Gmur, 1981; Morrison et al., 1985; Plakunov et al., 1987). De plus, il a été constaté sur des HAP phénoliques que les conjugués sulfatés étaient majoritairement éliminés via l'urine (Layiwola et al., 1983) alors que les glucuronides l'étaient principalement par la bile (Nagel et Urich, 1980; Layiwola et al., 1983). Dans cette dernière étude où douze espèces de poissons sont exposées au 1-hydroxynaphthalène, entre 77 et 93% des métabolites biliaires sont conjugués à l'acide glucuronique et entre 4 et 12% à l'acide sulfurique. Cependant, il a été remarqué qu'à faible dose, la sulfatation des métabolites du naphthalène et du phénol pouvait être importante et qu'elle diminuait lorsque la dose d'exposition augmentait (Krahn et al., 1980; Nagel, 1983). Les autres organes comme la peau, les muscles ou le cerveau contiennent majoritairement des métabolites non-conjugués du naphthalène et principalement le 1,2-dihydroxynaphthalène (Roubal et al., 1977; Collier et al., 1978; Malins et al., 1979).

En ce qui concerne les crustacés, Corner et al (1973) détectent la formation de 1,2-dihydrodiol, de son conjugué sulfaté et de deux glucosides dans l'urine d'araignées de mer (*Maia squinado*).

c) Phénanthrène :

Différentes études consistant à exposer des poissons à du phénanthrène ont montré que ce composé pouvait s'accumuler de manière non négligeable dans les tissus (Solbakken et al., 1984; Leonard et Hellou, 2001; Hawkins et al., 2002) et que son temps de résidence dans l'organisme (évalué chez des truites arc-en-ciel) était l'un des plus long parmi les HAP (9 jours contre 6 pour le fluoranthène et 7 pour le fluorène et l'anthracène à 11°C; Niimi et Palazzo, 1986). Il a de plus été constaté que le phénanthrène n'induisait pas ou très peu d'activité EROD (Bols et al., 1999; Basu et

al., 2001; Hawkins et al., 2002). Ces phénomènes s'expliquent par l'absence d'affinité de liaison du phénanthrène avec le récepteur AhR (Billiard, 2001) rendant impossible l'induction de l'activité enzymatique CYP1A (Piskorska-Pliszczynska et al., 1986). Lorsque l'activité enzymatique CYP1A est induite, comme c'est le cas en milieu naturel puisque les HAP sont présents en mélange, le phénanthrène est alors fortement métabolisé. Shailaja et D'Silva (2003), exposant des juvéniles de tilapia (*Oreochromis mossambicus*) à différentes doses de phénanthrène, expliquent les plus fortes teneurs en composé parent observées dans le foie des poissons exposés aux plus faibles doses par l'induction enzymatique provoquée aux plus fortes doses. Ils en effet ont observé une augmentation de l'activité EROD.

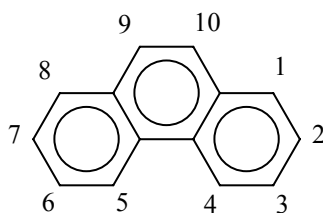


Figure I.17 : Formule semi-développée du phénanthrène

Des expérimentations réalisées sur différentes espèces marines (Tableau I.20) ont permis de mettre en évidence deux voies principales de transformation du phénanthrène. Dans les deux cas, les principaux métabolites détectés après hydrolyse enzymatique sont des dihydrodiols.

Chez les poissons cartilagineux comme l'aiguillat commun (*Squalus acanthias*), l'époxyde se forme majoritairement en position 9,10 menant à la formation du 9,10-dihydrodiol (Solbakken et Palmork, 1981) comme chez les crustacés (Solbakken et Palmork, 1981) et les rongeurs (Sims, 1962; Boyland et Sims, 1965; Solbakken et al., 1980a; Kandaswami et al., 1988; Ng et al., 1991). Dans la bile d'aiguillat commun, le second métabolite en quantité est le 3-hydroxyphénanthrène (34% des métabolites), suivi du 3,4-dihydrodiol (19%). Les 2- et 4-hydroxyphénanthrène sont faiblement présents (1,2 et 0,7%) alors que le 1,2-dihydrodiol n'est pas détecté.

Par contre, différentes études ont montré que, après hydrolyse enzymatique de la bile de divers poissons osseux, le 1,2-dihydrodiol était prédominant (de 91 à 99% des métabolites) par rapport à l'isomère 9,10- (Tableau I.20); les hydroxyphénanthrènes étant minoritaires avec une majorité relative du 1-hydroxyphénanthrène puis de l'isomère 3. La prépondérance du 1,2-dihydrodiol est également observée dans l'urine, l'estomac et les intestins de flet (Solbakken et Palmork, 1981) ainsi que dans l'urine de lieu noir (Solbakken et al., 1980a). A l'opposé, les intestins de truites et les microsomes hépatiques de truite, de flet et de morue montrent la présence majoritaire de 9,10-dihydrodiol. Lorsque les microsomes de foie sont préparés à partir d'individus dont le système enzymatique a préalablement été induit, l'isomère majoritaire devient le 1,2-dihydrodiol. Ces résultats sont délicats à interpréter, notamment au regard de ceux obtenus récemment sur une espèce de poisson-chat (*Ameriurus nebulosus*) montrant la formation majoritaire de l'isomère 9,10 dans les microsomes hépatiques d'un poisson osseux avec et sans induction enzymatique (Pangrekar et al., 2003b). Dans cette dernière étude, la quantification individuelle des différents isomères phénoliques du phénanthrène n'a pas pu être réalisée en raison de la séparation incomplète des composés par CLHP. Cependant, la somme des phénols représente de 41 à 55% des métabolites produits.

D'autre part, ces études mettent en évidence la prédominance des conjugués dans la bile. Leonard et Hellou (2001) montrent qu'il s'agit majoritairement de conjugués glucuronidés.

Espèce	Matrice	Référence
lieu noir (<i>Pollachius virens</i>) (et rat)	urine, bile	Solbakken et al., 1980a
flet (<i>Platichthys flesus</i>)	Estomac et intestin, bile, urine	Solbakken et Palmork, 1981
truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	intestin, bile	
aiguillat commun (<i>Squalus acanthias</i>)	bile	
langoustine (<i>Nephrops norvegicus</i>)	glande antennaire ou glande verte, intestins, gonades	
morue (<i>Gadus morhua</i>)	bile, microsomes hépatiques	Goksøyr et al., 1985, 1986
morue (<i>Gadus morhua</i>), truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	microsomes hépatiques	Goksøyr et al., 1987

Tableau I.20 : Principaux travaux étudiant le métabolisme du phénanthrène chez des organismes marins

d) Benzo(a)pyrène :

Il apparaît qu'une proportion importante des métabolites biliaires du benzo(a)pyrène est constituée de 42 à 70% de thio-éthers (conjugués au glutathion) les glucuronides et les sulfates représentant de 23 à 58% des métabolites (Tableau I.21). De plus, le 7,8-diol-9,10-époxyde-7,8,9,10-tétrahydrobenzo(a)pyrène-glutathion (BPDE-GSH) a été identifié comme étant le principal thio-éther présent dans la bile (Varanasi et al., 1983b; Nishimoto et Varanasi, 1987).

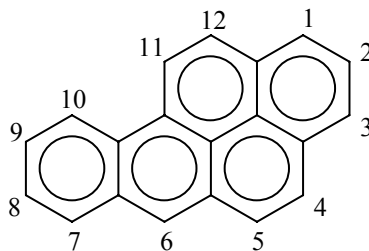


Figure I.18 : Formule semi-développée du benzo(a)pyrène

Espèce	% de glucuronides et de sulfates	% de thio-éthers	Référence
carlottin anglais en période de reproduction (<i>Parophrys vetulus</i>)	mâle : 23 femelle : 27	mâle : 77 femelle : 73	Thomas et Rice, 1981
carlottin anglais adulte (<i>Parophrys vetulus</i>)	32	68	Mannervik, 1985
juvénile de carlottin anglais (<i>Parophrys vetulus</i>)	43	57	
carlottin anglais adulte (<i>Parophrys vetulus</i>)	53	47	Varanasi et al., 1986a
juvénile de carlottin anglais (<i>Parophrys vetulus</i>)	56	44	
plie étoilée adulte (<i>Platichthys stellatus</i>)	58	42	
juvénile de plie étoilée (<i>Platichthys stellatus</i>)	43	57	
fausse limande du Pacifique (<i>Lepidopsetta bilineata</i>)	51	49	Varanasi et al., 1986b
truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	54	46	

Tableau I.21 : Proportion des principales classes de métabolites conjugués dans la bile de poissons exposés à du benzo(a)pyrène radioactif

Dans la bile de carlottin anglais et de plie étoilée, les principaux métabolites du benzo(a)pyrène sont des conjugués glucuronidés de phénols et de 7,8-dihydrodiol tandis que les conjugués sulfatés sont en très faible proportion (Varanasi et al., 1986a et b). Ces résultats sont en accord avec d'autres études sur le benzo(a)pyrène mettant en évidence la prépondérance des conjugués glucuronidés par rapport aux sulfatés (Varanasi et Gmur, 1981; Balk et al., 1982; Steward et al., 1990b) chez le carlottin anglais, le brochet et une espèce de poisson-chat (*Ictalurus nebulosus*) respectivement. Après déconjugaison enzymatique de la bile de différents poissons, permettant de libérer les conjugués au glucuronide et au sulfate, le 3- et le 1-hydroxybenzo(a)pyrène ainsi que le 7,8-dihydrodiolbenzo(a)pyrène ont principalement été détectés (Krahn et al., 1981; Varanasi et Gmur, 1982). Plus précisément, le métabolite le plus abondant est le 3-hydroxybenzo(a)pyrène, représentant de 18 à 46% des métabolites identifiés après déconjugaison (Tableau I.22). Le 7,8-dihydrodiolbenzo(a)pyrène et la somme des quinones (1,3-, 3,6- et 6,12-quinones) sont également présent en quantité importante. Viennent ensuite le 1-hydroxybenzo(a)pyrène puis le 9,10-dihydrodiolbenzo(a)pyrène, le 4,5-dihydrodiolbenzo(a)pyrène et le 9-hydroxybenzo(a)pyrène. Gmur et Varanasi (1982) ont également mis en évidence la présence en quantité importante de 3,9-dihydroxybenzo(a)pyrène dans la bile de juvénile de

carlottin anglais. Cependant, Steward et al. (1990b) observent une prépondérance des quinones dans la bile de poisson-chat. La non détection de triols et de tétrols pourrait s'expliquer par la capacité de leurs précurseurs (phénols-oxydes et diols-époxydes) à se lier avec les macromolécules cellulaires et le glutathion.

Espèce	3-OH	7,8-diOH	Q	1-OH	9,10-D	4,5-D	9-OH	Référence
carlottin anglais								Varanasi et al., 1986a; Stein et al., 1986; Plesha, 1986
plie étoilée								Varanasi et al., 1986a
fausse limande du Pacifique, poisson-chat (<i>Ictalurus nebulosus</i>), truite arc-en-ciel	18-46	13-33	12-30	7,5-18	3,9-11	3,3-8,3	0-7,4	Varanasi et al., 1986b

OH : hydroxy, diOH : dihydrodiol, Q : somme des quinones

Tableau I.22 : Pourcentage des différents métabolites identifiés après déconjugaison des conjugués glucuronidés et sulfatés dans la bile de poissons exposés à du benzo(a)pyrène

En revanche, les glucuronides et les sulfates sont généralement peu présents dans le foie, les gonades et les muscles *in vivo* (6 à 12%) alors que les thio-éthers et les métabolites liés aux macromolécules représentent de 48 à 54% des métabolites, les 40% restants correspondant aux métabolites non conjugués (Varanasi et Gmur, 1981; Varanasi et al., 1982; Stein et al., 1987; Steward et al., 1990b). Cependant, les microsomes hépatiques ou des hépatocytes isolés de poisson-chat et de carpe miroir produisent majoritairement des conjugués glucuronidés du benzo(a)pyrène (de 38 à 51% des métabolites formés) puis des conjugués au glutathion (de 14 à 21%) et enfin des sulfates (4 à 6%) (Steward et al., 1989, 1990a; Sikka et al., 1991; Zaleski et al., 1991). Ces résultats suggèrent que les conjugués glucuronidés sont rapidement excrétés dans la vésicule biliaire alors que les conjugués au glutathion sont plus rémanents dans le foie. Chez le carlottin anglais par exemple, le rapport des conjugués glucuronidés sur les thio-éthers est ainsi 10 à 15 fois plus élevé dans la bile que dans le foie. Les études concernant l'identification des métabolites hépatiques *in vivo*, et d'une manière plus générale des métabolites extra-biliaires, sont peu nombreuses en raison de la complexité des matrices et de la faible concentration des analytes. Le 3-hydroxybenzo(a)pyrène a cependant été identifié comme étant généralement majoritaire dans le foie, suivi du 7,8-dihydrodiol et de la somme des quinones (Krahn et al., 1981; Varanasi et al., 1986a). Après déconjugaison des glucuronides et des sulfates, les principaux métabolites sont identifiés comme étant les 3- et 1-hydroxybenzo(a)pyrène ainsi que le 7,8-dihydrodiol (Stein et al., 1986). Il a de plus été proposé que le 9,10-dihydrodiolbenzo(a)pyrène puisse être davantage

distribué dans l'organisme alors que le 7,8-dihydrodiol et le 3-hydroxybenzo(a)pyrène nécessitent d'être conjugués avant d'être éliminés du foie (Varanasi et al., 1989a).

En ce qui concerne l'excrétion rénale, Pritchard et ses collaborateurs (1984a et b) ont montré que du benzo(a)pyrène non métabolisé arrivant dans les reins d'un poisson, *Paralichthys lethostigma*, n'était pas excrété et que les hydroxybenzo(a)pyrènes (majoritairement des glucuronides) le sont faiblement alors que les dihydroxybenzo(a)pyrènes (majoritairement des sulfates) sont excrétés 10 fois plus. La différence d'excrétion entre les deux types de métabolites serait essentiellement due au groupement de conjugaison.

Andersson et Pärt (1989) ont d'autre part montré que des branchies de truites arc-en-ciel perfusées exposées à du benzo(a)pyrène produisaient essentiellement des glucuronides.

Comparés aux résultats obtenus chez les rongeurs, les poissons produisent davantage de 1-hydroxybenzo(a)pyrène, de 7,8- et de 9,10-dihydrodiolbenzo(a)pyrène, et moins de 9-hydroxybenzo(a)pyrène et de 4,5-dihydrodiol. Ces différences sont très importantes en terme de toxicité car il apparaît que les enzymes présentes chez les poissons favorisent la formation de métabolites en région baie.

Chez les crustacés, des dihydrodiols, quinones et phénols sont présents dans l'hépatopancréas (James, 1989; James et al., 1991). Singer et al. (1980) mettent en évidence la formation majoritaire de phénols par des tissus stomacaux de crabe. Lemaire et al. (1993) constatent la formation prépondérante des phénols (43%) par des microsomes d'hépatopancréas de crabe *Carcinus Maenas* (crabe vert ou crabe enragé), suivis des diones (27%) et des diols (22%).

Chez les mollusques, les quinones sont reconnues comme étant prépondérantes même si les 7,8- et 9,10-dihydrodiols et les phénols sont également présents en quantités non négligeables. (Anderson, 1978; Stegeman, 1985; Lemaire et al., 1993). Lemaire et al. (1993), exposant des microsomes de glande digestive de moule commune à du benzo(a)pyrène, ont mis en évidence la formation majoritaire de quinones (50%) puis de diols (24%) et de phénols (22%). Michel (1993) met cependant en évidence des différences de métabolisme entre des études *in vivo* et *in vitro* chez la moule *Mytilus galloprovincialis*. Ainsi, lors d'une étude *in vivo*, les moules produisent majoritairement des quinones (47% : 1,6, 3,6 et 6,12-quinones) puis des phénols (36% : 1, 3 et 9-OH) et des diols (17% : 9,10-, 4,5- et 7,8-diols) alors que, *in vitro*, la part des quinones formées par la fraction subcellulaire de glande digestive est beaucoup plus importante (82%). Suteau (1987) a de plus rapporté la formation majoritaire de phénols, suivis des quinones et dans une moindre mesure des diols par des microsomes de moule commune entière. De même, Anderson (1985) a observé la formation d'une majorité de dihydrodiols chez certains mollusques.

e) Pyrène :

Contrairement aux autres HAP, le pyrène semble avoir un schéma de biotransformation moins complexe. En effet, un seul métabolite de phase I est détecté dans la plupart des études, le 1-hydroxypyrene (Tableau I.23). Dans la bile de carlottin anglais et de truite arc-en-ciel, la présence en très faible quantité d'autres phénols et de dihydrodiols a également été détectée après déconjugaison enzymatique (Krahn et al., 1987; Law et al., 1994). Chez un crustacé terrestre, le cloporte *Porcellio scaber*, la présence d'un métabolite ayant perdu son aromaticité a également été mise en évidence (Stroomberg et al., 1999). En ce qui concerne les formes conjuguées de ces métabolites, les glucuronides sont majoritaires dans la bile de poisson alors que les glucosides et les sulfates sont majoritaires chez des organismes moins évolués comme les crustacés et chez les mollusques.

f) Autres HAP :

Les identifications de métabolites du 2,6-diméthylnaphtalène et du biphenyle réalisées chez les poissons confirment la prédominance des composés conjugués dans la bile, et particulièrement des glucuronides, de même que dans l'urine (Tableau I.24). Les métabolites non conjugués du biphenyle sont par contre produits en quantités non négligeables par des hépatocytes isolés et des microsomes hépatiques, les phénols et dihydrodiols étant les principaux métabolites de phase I identifiés dans différentes études concernant le 2,6-diméthylnaphtalène, le biphenyle, le chrysène, le 5-méthylchrysène et le dibenzo(a,l)pyrène.

Espèce	Contamination	Organe	Métabolites	Référence
carlottin anglais (<i>Parophrys vetulus</i>)	injection	bile	après déconjugaison : 1-OHP majoritaire; 2 autres phénols et un dihydrodiol	Krahn et al., 1987
truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	intra- péritonéale	bile et urine	majorité de glucuronides et sulfates dans la bile; après déconjugaison : 1-OHP, un peu de 1,6- et 1,8-diOH	Law et al., 1994
omble de fontaine (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	orale	bile	P-1-glucuronide (>99%), 1-OHP; après déconjugaison : 1-OHP	Leonard et Hellou, 1999 et 2001
flet (<i>Platichthys flesus</i>)	intra- péritonéale	bile	P-1-glucuronide et sulfate	Luthe et al., 2002
crabe dormeur (<i>Cancer magister</i>)	intra- vasculaire	hémolymphe	1-OHP et P-1-glucoside	Eickhoff et al., 2003
cloporte (<i>Porcellio scaber</i>)	nourriture	hépatopancréas et intestins	P-1-glucoside, P-1-sulfate, 1- OHP, un métabolite ayant perdu son aromaticité	Luthe et al., 2002; Stroomberg et al., 1999
mye des sables (<i>Mya arenaria</i>), palourde du Pacifique (<i>Protothaca staminea</i>)	dissolution dans l'eau	organisme entier	pyrène-1-sulfate, 1-hydroxypyrene (minoritaire).	Simpson et al., 2002

diOH : dihydrodiol

Tableau I.23 : Travaux étudiant la biotransformation du pyrène chez différents organismes

Composé	Organisme	Organe	Métabolites	Référence
2,6-C ₂ N	plie étoilée	bile	glucosides et glucuronides de phénols, quinones, diols et méthanol	Gruger et al., 1981
Bi	truite arc-en-ciel	bile	Bi-4-glucuronide (32%) Bi-2-glucuronide (10%) Bi-4,4-sulfate (8%)	Cravedi et al., 1999
		urine	4,4-diOH-glucuronide (64%), Bi-2-glucuronide (13%), Bi-4-glucuronide (10%)	
		hépatocytes isolés	4-OHBi (27%), 2,2-diOH-glucuronide (10%), 4,4-diOH-sulfate (8%)	
C	morue	bile	après déconjugaison : 1,2-diOH majoritaire, 2-OH, 1- et 4-OH, 3,4-diOH, 3-OH	Jonsson et al., 2004
	poisson-chat	microsomes hépatiques	après déconjugaison : 1,2-diOH et 1-OHC majoritaires 3,4-diOH et 3-OHC minoritaires	Pangrekar et al., 2003a
	truite arc-en-ciel		diOH	Shappell et al., 2003
5-C ₁ C			5-C ₁ OHC et diOH	
DBaP	truite arc-en-ciel		7-OH, 11,12-diOH, diones et 8,9-diOH	Yuan et al., 1999

DBaP : dibenzo(a,l)pyrène; diOH : dihydrodiol; OH : hydroxy

Tableau I.24 : Principaux métabolites de différents HAP chez des organismes aquatiques

g) Produits pétroliers :

Les métabolites biliaires de HAP pétroliers ont été identifiés suite à l'exposition de poissons à différents produits pétroliers par injection. Les métabolites semblent être exclusivement conjugués dans la bile, principalement avec des groupement glucuronides (Hellou et al., 1986; Hellou et Payne, 1987). Après déconjugaison, les métabolites dominants sont identifiés comme étant des

composés monohydroxylés de HAP légers alkylés et plus particulièrement des dérivés naphtaléniques et phénanthréniques (Tableau I.25). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus après injection de pétrole brut altéré par voie intra-musculaire à des flétans du Pacifique (*Hippoglossus stenolepis*) et à des truites de dolly varden (*Salvelinus malma*) (Krahn et al., 1992). Les concentrations en métabolites naphtaléniques, dibenzothiophéniques et phénanthréniques mesurées dans cette étude sont récapitulées dans le Tableau I.26. Il faut ajouter que la distinction entre métabolites phénoliques et alcooliques n'a pas été réalisée dans les études citées dans ce paragraphe et que les termes hydroxynaphtalènes, hydroxyphénanthrènes et autres englobent les deux types de métabolites. Yu et al. (1995) observent l'apparition de métabolites en faible quantité dans la bile d'un poisson originaire d'Antarctique, *Notothenia gibberifons*, 24h après une injection intra-musculaire de fioul. Après 120h, une forte concentration est par contre observée (56 µg/g). L'identification des métabolites met en évidence une majorité de métabolites phénanthréniques malgré une prédominance des alkynaphtalènes par rapport aux alkylphénanthrènes dans le mélange injecté. Ils remarquent également un rapport « métabolites alkylés sur HAP parents » plus élevé dans la bile que dans le produit injecté suggérant ainsi une métabolisation préférentielle des HAP alkylés.

Espèce	Exposition	Métabolites	Référence
		- (C ₂ ,C ₃)OHN majoritaires	
truite arc-en-ciel (100-160 g)	0,3 ml de fioul n°2 en intra-péritonéal	- tétrahydroOHPhe ou OHA, OHPhe ou OHA, (C ₄ ,C ₅)OHBi ou (C ₂ ,C ₃)tétrahydroOHA ou (C ₂ ,C ₃)tétrahydroOHPhe, triméthylOHFe, hexaméthylOHN, diOhtétraméthylFe	Hellou et al., 1986; Hellou et Payne, 1987
flétan du Pacifique et truite de dolly varden	1 µl de pétrole brut altéré / g de poisson en intra-musculaire	- (C ₂ ,C ₃)OHN, OHFe, (C ₁ -C ₃)OHPhe, OHDBF, (C ₁ -C ₃)OHDBT majoritaires - alkyls OHF/OHP et alkyls OHBaA/OHC plus faibles	Krahn et al., 1992
<i>Notothenia gibberifons</i>	100 µl de Diesel Fuel Arctic en intra-musculaire	- (C ₀ -C ₃) OHPhe/OHA majoritaires, - (C ₀ -C ₃)OHN, (C ₀ -C ₃)OHBi, (C ₀ -C ₃)OHFe, (C ₀ -C ₃)OHDBT, (C ₀ -C ₃)OHDBF, (C ₀ -C ₂)OHP/OHF, (C ₀ -C ₂)OHC, (C ₀ -C ₃)OHBaP/OHBF	Yu et al., 1995

DBF : dibenzofurane; C₀ : composé non alkylé, C₁ : méthyl, C₂ : diméthyl, ...; OH : hydroxy; diOH : dihydrodiol

Tableau I.25 : Métabolites identifiés après déconjugaison enzymatique dans la bile de poissons exposés à des produits pétroliers

Métabolites (ng/g)	Flétan du Pacifique	Truite de dolly varden
OHN		
C ₂	66	<14
C ₃	1600	53
OHDBT		
C ₁	17000	150
	5900	350
	2600	290
C ₂	14000	250
	9800	160
	11000	290
	21000	160
	9100	270
C ₃	9000	74
	4200	80
	4600	96
OHPhe		
C ₁	14000	370
	1200	93
	3100	580
C ₂	3200	<23
	2700	270
	1900	91
	6600	560
C ₃	1400	<23
	3200	<23
somme	147166	4187

C₁ : méthyl, C₂ : diméthyl, C₃ : triméthyl

Tableau I.26 : Concentration en métabolites de HAP légers identifiés dans la bile de 2 espèces de poissons exposées à du pétrole brut altéré par injection intra-musculaire (Krahn et al., 1992)

3.3. ETUDE DU METABOLISME DES HAP :

3.3.1. Facteurs influençant le devenir des HAP :

a) Période de reproduction :

Plusieurs études ont observé des niveaux de métabolites biliaires similaires chez les individus des deux sexes de différentes espèces de poissons, suggérant une influence négligeable du sexe sur le devenir des HAP dans l'organisme (Varanasi et al., 1981 et 1985; Gmur et Varanasi, 1982; Spies et al., 1996). Cependant, en période de reproduction, des différences de métabolisme et d'accumulation ont été remarquées. Ainsi, une augmentation de l'accumulation du naphthalène

(Reichert et Varanasi, 1982) et du benzo(a)pyrène (Varanasi et al., 1982) dans les tissus ont été observées en période de reproduction chez le carlottin anglais, plus particulièrement dans les gonades et le sang. De plus, le suivi du 1-hydroxypyrene dans la bile de flet en mer de Wadden tout au long de l'année a montré que le niveau le plus bas était mesuré juste après la période de reproduction (Eggen et al., 1996b).

b) Age :

Lors d'une expérimentation, des juvéniles de carlottins anglais et des adultes ont été exposés à du benzo(a)pyrène (Varanasi et al., 1987). La mesure des adduits à l'ADN montre un niveau 10 fois plus élevé chez les juvéniles que chez les adultes. Ces résultats suggèrent que l'âge des poissons pourrait avoir une influence sur le devenir et la biotransformation des HAP dans l'organisme.

c) Température :

Chez des bivalves (la palourde du Pacifique, *Protothaca staminea*, et la palourde de l'Atlantique, *Rangia cuneata*) et des copépodes, une augmentation de l'accumulation du naphthalène à basse température a été observée (Fucik et Neff, 1977; Harris et al., 1977).

Chez les poissons, Jimenez et al. (1987) et Black et al. (1991) ont constaté, quel que soit le mode de contamination, une diminution de l'absorption des HAP lors d'une diminution de température, respectivement de 28°C à 22°C, 23°C à 13°C et de 17°C à 8°C. Black et al. ont expliqué les différences observées, dans le cas d'une exposition par la phase aqueuse, par une diminution de perméabilité de la membrane branchiale des poissons à basse température. Jimenez et al. ont de plus observé une biotransformation plus lente et une excrétion plus faible du benzo(a)pyrène à 13°C chez des crapets arlequin (*Lepomis macrochirus*).

En revanche, Collier et al. (1978) ont observé une augmentation de l'accumulation du naphthalène dans les tissus de saumon coho (*Oncorhynchus kisutch*) à basse température (étude à 4°C et 10°C) après ingestion intra-gastrique alors que les niveaux de métabolites biliaires mesurés sont équivalents. L'augmentation de la bioaccumulation de HAP légers dans les tissus de truites de dolly varden et de plie étoilée à basse température a également été mesurée dans plusieurs études (Varanasi et al., 1981; Thomas et Rice, 1986)

Il a par contre été montré que des microsomes hépatiques de truite arc-en-ciel conditionnées à 7°C produisaient davantage de métabolites que ceux de truites arc-en-ciel conditionnées à 16°C (Egaas et Varanasi, 1982). Une plus grande proportion de métabolites non conjugués est de plus observée à 7°C. Cette augmentation du métabolisme à basse température est expliquée par l'augmentation des acides gras polyinsaturés au niveau des membranes hépatiques dans ces conditions qui favoriseraient l'oxydation des HAP (Egaas et Varanasi, 1982; Hazel, 1979; Wills, 1980).

De plus, des niveaux de métabolites biliaires et des temps de résidence des métabolites plus élevés ont été observés à basse température chez des truites arc-en-ciel exposées à un fioul n°2 par injection intra-péritonéale (Hellou et Payne, 1987; étude à 7°C et 14°C) ou exposées à un mélange de composés (fluorène, dibenzothiophène, carbazole et dibenzofurane) associé à leur nourriture (Hellou et al., 1999; étude à 5°C et 10°C). Dans cette dernière expérimentation, la concentration en métabolites biliaires est de 0,5 à 1,8 fois plus importante à basse température. On peut cependant noter que, lors de la première étude, le maximum de concentration en métabolites biliaires observé (dosage global) apparaît 2 jours plus tôt à 14°C. Des quantités et des temps de résidence plus élevés de métabolites à basse température ont également été observés dans les tissus de différents autres poissons (Collier et al., 1978; Varanasi et al., 1981; Thomas et Rice, 1986).

d) Nourriture :

Il a été montré que, chez le crapet arlequin, l'absorption du benzo(a)pyrène était deux fois plus rapide, que son taux de métabolisation était accéléré et que son excrétion était dix fois plus importante lorsque le poisson était nourri (Jimenez et al., 1987).

De plus, dans le cas des métabolites biliaires, la phase de digestion du poisson au moment de la dissection peut avoir une influence sur les concentrations mesurées. En effet, juste après s'être alimentés, la vésicule biliaire des poissons se vide et contient donc une plus faible quantité de métabolites (Kennedy et Law, 1990; McCarthy et Shugart, 1990; Collier et Varanasi, 1991; Ariese et al., 1993a; Haasch et al., 1993).

e) Présence d'autres contaminants :

Une étude réalisée par Egaas et Varanasi (1982), consistant à traiter des truites arc-en-ciel avec un mélange de PCB, l'Arochlor, puis à mettre en présence une fraction hépatique avec du benzo(a)pyrène, montre une augmentation de la proportion de certains métabolites (3-hydroxy, 7,8- et 9,10-diol) en présence de ce mélange de PCB.

Le TBT (tributylétain), quant à lui, provoque la diminution de la production des métabolites du benzo(a)pyrène chez des saumons de fontaine (Padrós et al., 2000).

3.3.2. Différences entre espèces de poisson :

Outre les différences qualitatives et quantitatives de biotransformation observées entre poissons osseux et poissons cartilagineux (Pohl et al., 1974; Guarino et al., 1972; Solbakken et Palmork, 1980 et 1981), différentes études ont également montré l'existence de différences de biotransformation des HAP entre espèces de poissons osseux.

a) Différences quantitatives :

L'étude de la métabolisation du benzo(a)pyrène par des microsomes de truites de lac (*Salmo trutta lacustris*), de gardons (*Rutilus rutilus*) et de rats a permis de mettre en évidence des différences très nettes entre les trois espèces. Les microsomes de gardon biotransforment ainsi très faiblement le benzo(a)pyrène alors qu'une très forte activation métabolique est constatée chez la truite, environ 3 à 4 fois supérieure à celle du rat (Ahokas et Pelkonen, 1984). Une autre étude comparant la métabolisation du benzo(a)pyrène par des microsomes de carlottins anglais, de plies étoilées et de rats concluant à des taux de transformation environ trois fois plus faibles chez les deux espèces de poisson par rapport au rat (Varanasi et al., 1986a), on peut en déduire que la truite biotransforme le benzo(a)pyrène en proportion beaucoup plus importante que les deux autres espèces de poisson.

L'ingestion d'une même quantité de phénanthrène par des truites arc-en-ciel et des flets conduit à des concentrations en métabolites du phénanthrène 10 fois plus élevées chez ces derniers (Solbakken et Palmork, 1981). De même, la quantité de métabolites présents dans la bile de flétans du Pacifique ayant subi une injection préalablement de pétrole brut altéré est 35 fois supérieure à celle observée chez des truites de dolly varden (Krahn et al., 1992).

Il a également été observé in vitro que les hépatocytes de carpe, *Cyprinus carpio*, biotransformaient deux fois plus vite le benzo(a)pyrène que ceux de poissons-chats, qui présentent d'ailleurs moins d'adduits à l'ADN. Le poisson-chat présente pourtant généralement une plus grande sensibilité aux HAP que la carpe en milieu naturel (Steward et al., 1989).

b) Différences qualitatives :

Une étude consistant à étudier la métabolisation du benzo(a)pyrène par des carlottins anglais et des plies étoilées exposés à du benzo(a)pyrène a tout d'abord permis de montrer que ce HAP était biotransformé à des vitesses similaires par les microsomes des deux espèces de poisson et que la vitesse de formation du 7,8-dihydrodiolbenzo(a)pyrène était la même chez les deux espèces (Varanasi et al., 1986a). Pourtant, dans, une plus grande quantité de 7,8-dihydrodiol est mesurée dans la bile de soles. La plie étoilée a par contre une activité GST environ 3 fois plus forte. La faible proportion de benzo(a)pyrènediolépoxyde (BPDE) constatée chez la plie étoilée s'expliquerait donc par la forte conjugaison des premiers métabolites formés, époxydes et phénols, avec le glutathion. De cette manière, une part moins importante de BPDE se forme chez la plie étoilée, ce qui se traduit par l'observation d'adduits à l'ADN hépatique plus nombreux chez le carlottin anglais.

3.3.3. Etude cinétique du métabolisme des HAP :

Différents études ont observé l'évolution des métabolites de HAP dans la bile de poissons exposés à des HAP. Pour cela, certaines expérimentations consistent en une exposition ponctuelle et unique tandis que d'autres consistent en une exposition prolongée.

a) Exposition ponctuelle et unique :

Le benzo(a)pyrène semble être rapidement métabolisé. Deux études réalisées l'une sur des poissons-chats et l'autre sur des killies (*Fundus similis*) ont permis de montrer qu'il est rapidement biotransformé après injection intra-péritonéale. Ainsi, une forte augmentation des métabolites biliaires est observée dès le premier temps de prélèvement (1 jour pour l'une et 2 jours pour l'autre) (Steward et al., 1990b; Willett et al., 1995). Dans la première étude, réalisée à 20-23°C, un deuxième prélèvement à 3 jours permet de montrer une augmentation des métabolites d'un facteur 3 par rapport au premier prélèvement. La deuxième étude (température non précisée) permet d'observer un maximum de métabolites dans la bile au deuxième et troisième temps de prélèvement, c'est-à-dire à 4 et 8 jours (environ 110000 ng équivalents benzo(a)pyrène par grammes de bile contre 78000 à 2 jours et 830 à t=0). Une diminution est ensuite observée à 14 jours (48000 ng/g). Les autres biomarqueurs suivis dans cette étude (activité EROD, activité AHH et adduits à l'ADN) se sont par contre avérés moins sensibles que les métabolites de HAP. En ce qui concerne un HAP léger, le fluorène, Hellou et al. (1999) observent un maximum de métabolites dans la bile de truites arc-en-ciel 10 jours après l'ingestion de ce HAP associé à de l'huile d'olive.

Dans le cas d'expositions à des mélanges, Upshall et al. (1993) ont par contre observé, après ingestion d'huile de moteur usagée par des truites arc-en-ciel, un signal maximum par fluorescence aux longueurs d'onde des métabolites du naphthalène après seulement 4 jours. Dans cette étude, un décalage de 2 jours est par ailleurs observé entre le maximum d'activité EROD (2 jours après ingestion) et le maximum de métabolites dans la bile. Après 12 jours, le niveau de métabolite est redevenu similaire à avant l'exposition. Hellou et Payne (1987) ont quant à eux observé un maximum de métabolites (dosage global) dans la bile de truites arc-en-ciel exposés à du fioul n°2 par injection intra-péritonéale après 4 à 6 jours suivant la température (14°C et 7°C respectivement). Au cours d'une exposition de poissons originaires d'Antarctique, *Notothenia gibberifrons*, à du pétrole par injection intra-musculaire, Yu et al. (1995) montrent une augmentation légère de la somme des métabolites analysés par CPG/SM dès 12h, le premier temps de prélèvement (la somme considérée prend en compte les métabolites naphthaléniques, dibenzothiophéniques et phénanthréniques des composés parents (C0) aux composés triméthylés

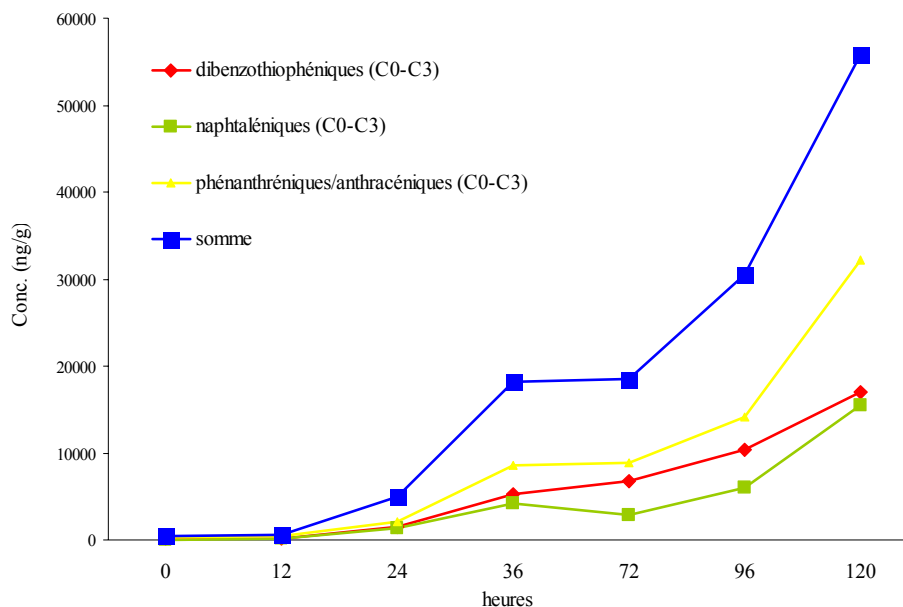
(C3)). Cependant, il est remarqué que bien que les niveaux des métabolites dibenzothiophéniques et phénanthréniques ont en effet augmenté dès 12h, ce n'est pas le cas pour les naphthaléniques qui n'augmentent qu'à 24h. Il s'en suit une faible augmentation de la somme des métabolites jusqu'à 24h puis une autre, plus forte, entre 24 et 36h (Figure I.19). Un plateau est ensuite observé entre 36 et 72h suivi d'une forte augmentation entre 72 et 120h, plus particulièrement due à l'augmentation des métabolites phénanthréniques.

b) Exposition prolongée :

Différentes études se sont intéressées à l'étude de l'évolution de la concentration en métabolites biliaires chez les poissons après une exposition plus ou moins prolongée à des HAP.

Plusieurs études montrent l'augmentation rapide de la concentration des métabolites dans la bile en début d'exposition suivie d'une augmentation plus lente ou de l'apparition d'un plateau à long terme. Le placement en bassin de décontamination en fin d'expérimentation met généralement en évidence une diminution rapide de la concentration biliaire des métabolites.

Une exposition de morues (*Gadus morhua*) à différentes doses de pétrole dispersé pendant 30 jours a mis en évidence l'augmentation des concentrations biliaires des métabolites du naphthalène, du pyrène et du benzo(a)pyrène tout au long de l'exposition (Aas et al., 2000a). Plus précisément, les niveaux de métabolites augmentent fortement pendant les 3 premiers jours puis plus lentement par la suite et diminuent fortement après 4 et 7 jours de décontamination. A une dose de pétrole de 1 ppm, l'augmentation est visible dès 12h, à 0, 25 ppm elle est visible dès 24h et au bout de 3 jours à 0, 06 ppm. Boelas et al. (1998), exposant des juvéniles de turbots (*Psetta maxima*) à du benzo(a)pyrène dissous dans l'eau en continu sur une durée de 12 jours, ont également observé une augmentation de la concentration en métabolites du benzo(a)pyrène dans la bile tout au long de l'exposition. Cependant, celle-ci paraît être plus régulière que dans l'étude précédente. De plus, lors de la décontamination (16 jours), l'augmentation de la concentration en métabolites continue. La même évolution est constatée pour les poissons du groupe témoin. Pour ces derniers, l'augmentation lente des métabolites au cours du temps pourrait s'expliquer par l'absence d'alimentation des poissons provoquant une concentration de la bile au cours du temps (Collier et Varanasi, 1991; Ariese et al., 1993a).



C0-C3 : somme des métabolites des HAP parents et des HAP alkylés jusqu'aux triméthylés

Figure I.19 : Evolution de la concentration de certaines classes de métabolites dans la bile de *Notothenia gibberifrons* après une injection intra-musculaire de fioul (Yu et al., 1995)

D'autre part, des carlottins anglais exposés aux sédiments d'un site contaminé pendant 5 semaines montrent des niveaux de métabolites du benzo(a)pyrène en augmentation entre 0 et 2 semaines (seule mesure intermédiaire réalisée) puis la présence d'un plateau entre 2 et 5 semaines (French et al., 1996). Parallèlement, les adduits à l'ADN augmentent tout au long de l'expérimentation. De la même manière, l'existence d'un plateau traduisant l'atteinte d'un équilibre entre métabolisation et excrétion est constatée lors de l'exposition de flets à un mélange de HAP (phénanthrène, pyrène, benzo(a)pyrène et benzo(a)anthracène) à différentes concentrations via la nourriture (Reynolds et al., 2003). Après 28 jours d'exposition, la concentration d'équivalents 1-hydroxypyrene dans la bile est proportionnelle à la dose d'exposition. Après 6 mois d'exposition, les niveaux mesurés sont inchangés. De la même manière, l'exposition de truites arc-en-ciel à un mélange de différents composés (fluorène, dibenzothiophène, carbazole et dibenzofurane) via l'alimentation a permis d'observer des résultats similaires. Ainsi, le suivi des métabolites biliaires après 5, 10, 15 et 19 semaines montre des concentrations constantes à long terme (Hellou et al., 1999).

Cependant, des turbots exposés en continu pendant 21 jours à différentes doses de pétrole brut dispersé dans l'eau présentent un maximum de métabolites biliaires au quatrième jour pour les 2 plus fortes doses (0,5 mg/l et 2 mg/l) puis une diminution est observée à 21 jours (Camus et al., 1998). Il est par contre remarqué qu'aucune augmentation n'a lieu à la dose la plus faible (0,125 mg/l) tout au long de l'exposition. Pour les 2 doses les plus fortes, l'augmentation du niveau de métabolites biliaires du pyrène est observée à partir de 24h (pas d'augmentation à 6 et 15h). La différence de dose n'est observable en terme de métabolites qu'au bout de 4 jours, sans pour autant que les niveaux observés soient proportionnels à l'exposition. Après 9 jours de décontamination, les niveaux de métabolites sont quasiment revenus à leur niveau initial. L'activité EROD, également mesurée dans cette étude, ne montre par contre pas d'augmentation significative, quels que soient la dose et le temps d'exposition.

Dans une autre étude consistant à exposer des juvéniles de saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*) à la fraction soluble d'un pétrole brut pendant 6 jours, le dosage des métabolites du naphthalène et du benzo(a)pyrène est réalisé après 2, 4 et 6 jours de contamination puis après différents jours de décontamination (Gagnon et Holdway, 2000). Les métabolites du naphthalène augmentent dès le deuxième jour alors que ceux du benzo(a)pyrène n'augmentent qu'après 4 jours et rediminuent dès le sixième. Le niveau maximum de métabolites du naphthalène est par contre observé entre 4 et 6 jours et ne diminue que pendant la décontamination. Dans cette même étude, des poissons sont également exposés à du pétrole brut associé à un dispersant. Aucune augmentation des métabolites du benzo(a)pyrène n'est observée alors que ceux du naphthalène augmentent régulièrement et sont d'une manière générale plus élevés que pour l'exposition à la fraction soluble du pétrole. Après 2 jours de décontamination, le niveau de ces métabolites a encore augmenté puis diminue fortement 2 jours après. Leadly et al. (1999) observent également un décalage entre le placement en bassin de décontamination et la baisse de la concentration des métabolites du benzo(a)pyrène. Une augmentation est ainsi observée après 4 jours de décontamination lors d'une expérimentation consistant à exposer une espèce de poissons-chats à un sédiment portuaire. Par contre, une diminution est mise en évidence après 2 jours de décontamination dans le cas de carpes exposées pendant 12 jours à la fraction soluble d'un fioul (Britvić et al., 1993).

3.4. APPLICATION A LA SURVEILLANCE ENVIRONNEMENTALE :

Suite à l'identification des composés de biotransformation des HAP et à la compréhension des mécanismes gouvernant leur production, des études ont cherché à appliquer le dosage de ces molécules en milieu naturel afin de disposer d'un outil de diagnostic de l'exposition des organismes aux HAP dans l'environnement.

La quasi-totalité de ces travaux consiste en un dosage des métabolites dans la bile de poissons. Seuls de rares travaux s'intéressent au dosage des métabolites dans l'hémolymphe (Paine et al., 1996; Eickhoff et al., 2003) ou l'urine (Fillmann et al., 2002) de crabes. Cette dernière étude n'est pas classée dans les tableaux suivants car les lieux d'échantillonnages ne sont pas précisés.

Plus des trois quarts des études consistant à évaluer la biodisponibilité des HAP envers les organismes aquatiques dans l'environnement (78% : 60 études sur 77) recensées au cours de ce travail bibliographique s'attachent à effectuer des campagnes de prélèvements d'organismes résidents. Cependant, quelques travaux utilisent la méthode dite du « caging » (9% : 7 études sur 77) consistant à placer des organismes non contaminés dans des cages sur des sites choisis (Beyer et al., 1996 et 1998; Aas et al., 1998; Leadly et al., 1999; van der Oost et al., 2000; Barra et al., 2001; Ahmad et al., 2003). D'autres réalisent des prélèvements de sédiments ou d'eau sur le terrain afin d'exposer des organismes non contaminés en mésocosmes (13% : 10 études sur 77) afin d'évaluer la biodisponibilité des HAP provenant d'un compartiment isolé du milieu d'étude (Varanasi et al., 1985; Stein et al., 1987; Britvić et al., 1993; Ariese et al., 1993a (Vethaak et al. 1996, Eggens et al., 1996a); Ariese et al., 1993c; French et al., 1996; Leadly et al., 1999; Barra et al., 2001; Roy et al., 2003; Gravato et Santos, 2003). On peut noter qu'en raison de la faible présence de poissons sauvages dans une baie chinoise, Klumpp et al. (2002) ont eu recours à des prélèvements de poissons dans différentes aquacultures de cette baie afin de bénéficier d'un matériel biologique suffisant à la réalisation de leur étude.

85% des dosages réalisés lors de ces études sont des dosages semi-quantitatifs globaux par fluorescence de classes de métabolites. Les 15% restants correspondent à des dosages quantitatifs de métabolites individuels par CPG/SM ou par CLHP-F (Tableau I.27). Parmi les techniques de dosage semi-quantitatives globales utilisées, 63% des analyses sont réalisées par CLHP-F, 20% par fluorescence fixe et 16% par SFS.

Ces études d'évaluation de la biodisponibilité des HAP dans l'environnement peuvent être classées en trois catégories. Celles qui s'intéressent aux pollutions ponctuelles, aux pollutions chroniques et aux pollutions diffuses.

Contexte	Nature de la pollution	Détection	Référence
marée noire de l'Exxon Valdez	ponctuelle	CPG/SM avec dérivation	Krahn et al., 1992 et 1993b
marée noire de la guerre du Golfe	ponctuelle		Krahn et al., 1993a
péninsule Antarctique (marée noire et station scientifique)	ponctuelle et chronique		McDonald et al., 1992
détroit	diffuse		Krahn et al., 1984 et 1987
eaux profondes du nord-ouest de la méditerranée	diffuse	CPG/SM sans dérivation	Escartín et Porte, 1999c
milieu côtier du nord-ouest de la méditerranée	diffuse		Escartín et Porte, 1999a (Porte et al., 2002)
port	diffuse		Stephensen et al., 2000
rivière	diffuse		Fernandes et al. 2002
lacs de montagne européens	diffuse		Escartín et Porte, 1999b
détroit	diffuse	CLHP-F	Krahn et al., 1987
estuaire	diffuse		Ruddock et al., 2002 et 2003

Tableau I.27 : Etudes de terrain réalisant des dosages quantitatifs de métabolites individuels dans la bile de poisson

Un certain nombre d'études ont constaté une variabilité interindividuelle importante de la concentration en métabolites chez des organismes d'une même zone (Johnston et Baumann, 1989; Maccubbin et al., 1988; McDonald et al., 1992; Krahn et al., 1993a; Lin et al., 1994; Kennicutt et al., 1995; McDonald et al., 1995). Ces variations peuvent être d'une part imputables à l'hétérogénéité des sédiments sur le site de capture et au comportement migratoire des poissons. D'autre part, le polymorphisme génétique des enzymes de biotransformation (IARC, 1999; Wormhoudt et al., 1999; INSERM, 2001) et la phase de digestion des poissons au moment de la capture peuvent également être responsables des variations observées (Collier et Varanasi, 1991).

3.4.1. Pollutions ponctuelles :

Les pollutions ponctuelles sont caractérisées par une introduction des contaminants dans l'environnement à un temps donné. Elles peuvent être d'origine anthropiques (marées noires, dragage de sédiments) ou naturelles (fuite de pétrole de réservoirs naturels). Les études s'intéressant à ce type de pollution sont résumées dans le tableau I.28 (études utilisant un dosage semi-quantitatif global des métabolites) et dans le tableau I.27 (études utilisant un dosage quantitatif individuel des métabolites).

a) La marée noire de l'Exxon Valdez :

Différents travaux ont étudié l'exposition des organismes marins aux HAP suite à la marée noire de l'Exxon Valdez en 1989 (Tableau I.28). Ils ont permis de montrer la biodisponibilité des HAP contenus dans le pétrole déversé vis-à-vis de différents poissons et mammifères marins et de délimiter géographiquement la zone impactée par la marée noire.

Contexte	Détection	Types de métabolites	Références
marée noire de l'Exxon Valdez	CLHP-F	N, Phe et BaP	Krahn et al., 1992
	CLHP-F	N et Phe	Varanasi et al., 1990, 1993b et c; Armstrong et al., 1995; Jewett et al., 2002; Marty et al., 2003
	CLHP-F	Phe	Krahn et al., 1993b et c; Collier et al., 1993b; Huggett et al., 2003
marée noire de la guerre du golfe	CLHP-F	Phe	Krahn et al., 1993a
marée noire rivière	CLHP-F	N, Phe et BaP	Krahn et al., 1986b
fuite naturelle de pétrole	CLHP-F	N et Phe	Spies et al., 1996
fuite naturelle de pétrole (sédiment)	CLHP-F	N, Phe et BaP	Roy et al., 2003
péninsule Antarctique (marée noire et station scientifique)	CLHP-F	N, Phe et BaP	McDonald et al., 1992 et 1995; Kennicutt et al., 1995
	CLHP-F	BaP	Lin et al., 1994
	SFS	P	Lin et al., 1994 et 2001

Tableau I.28 : Travaux consistant à évaluer la biodisponibilité des HAP en milieu naturel lors de pollutions ponctuelles par un dosage semi-quantitatif global

Ainsi, Krahn et al. (1992) ont mis en évidence des niveaux particulièrement élevés de métabolites biliaires de HAP caractéristiques des pétroles chez des saumons roses du Pacifique (*Oncorhynchus gorbuscha*) capturés 5 mois après la marée noire (de 416 ng/g au site de référence à 137870 ng/g pour le poisson le plus contaminé) et chez des lieux de l'Alaska (*Theragra chalcogramma*) capturés 1 an après la marée noire (de 434 ng/g au site de référence à 4680 ng/g pour le poisson le plus contaminé (Tableau I.29)). L'auteur remarque de plus une très bonne corrélation statistique entre la quantification par CLHP-F et la CPG/SM. Cependant, l'empreinte détectée par CLHP-F est très variable, rendant difficile une identification de source de pollution alors que la détection par CPG/SM permet de mettre en évidence une proportion importante des métabolites de dérivés alkylés de HAP (Krahn et al., 1992 et 1993b).

Dans une autre étude, les métabolites sont tout d'abord recherchés dans la bile par CLHP-F (Varanasi et al., 1990). Les poissons, collectés en 1989, identifiés comme ayant été exposés à la marée noire par cette technique ont alors fait l'objet de dosages de HAP et de métabolites dans les muscles afin d'évaluer un risque sanitaire potentiel pour les consommateurs. Les métabolites étaient présents en quantités inférieures aux limites de détection dans les muscles de tous les poissons. De plus, chez des poissons présentant des concentrations en métabolites biliaires 25 fois supérieures au site de référence, la concentration en HAP dans les muscles était similaire à celle du site de référence.

La détection des métabolites biliaires permet également de montrer le retour au niveau de référence de certains sites de 1989 à 1990-1991 ou la diminution des concentrations en métabolites des sites contaminés (Varanasi et al., 1993b; Krahn et al., 1993c et Collier et al., 1993b). Varanasi et al. (1993b) constatent une prédominance des HAP non substitués dans les muscles de poissons présentant des niveaux de métabolites importants. L'auteur en conclue une métabolisation plus rapide des HAP alkylés, tout comme Yu et al. (1995) (§ I.3.2.2).

Une étude réalisée sur des plies à tête plate (*Hippoglossoides elassodon*) a également mis en évidence une exposition des poissons à la marée noire en 1989 puis une baisse en 1990 et 1991 (Armstrong et al., 1995). Cependant, une étude réalisée sur des sites similaires mais sur une espèce différente de poisson (sébastes, *Sebastes spp.*) montre des niveaux de métabolites importants en 1989 mais pas les années suivantes (Marty et al., 2003). Cette différence pourrait s'expliquer par les différents régimes alimentaires des poissons étudiés. En effet, la plie à tête plate se nourrit principalement de palourdes dont les tissus présentaient de fortes concentrations en HAP. Les sébastes se nourrissent quant à eux de nombreux poissons pélagiques (n'accumulant pas les HAP dans leurs tissus) et de crustacés (Marty et al., 2003).

En ce qui concerne l'évaluation de la contamination à long terme de cette marée noire, deux études récentes aboutissent à des conclusions différentes. L'une d'elles montre des niveaux élevés de métabolites (de 2000 à 5300 ng d'équivalents phénanthrène/mg de protéines), de CYP1A et d'EROD en 1999 sur les zones initialement touchées par la marée noire (Jewett et al., 2002) et l'autre montre des niveaux faibles de métabolites (de 1,5 à 5 ng d'équivalents phénanthrène/mg de protéines), de CYP1A et d'EROD sur des poissons collectés en 1999 et 2000 (Huggett et al., 2003). Ces résultats peuvent difficilement s'expliquer par des différences de régime alimentaire puisque certains des poissons de la deuxième étude citée ont des régimes alimentaires similaires à ceux de la première (crustacés) ou même davantage susceptibles d'être exposés (régime à base de mollusques).

b) Autres pollutions pétrolières :

D'autres contaminations par des produits pétroliers ont été étudiées par le biais des métabolites de HAP. Ainsi, l'exposition de poissons à la marée noire ayant eu lieu pendant la guerre du golfe (golfe Persique) en 1991 a pu être mise en évidence par la collecte de cichlidés (bossus dorés, *Lethrinus khallopterus*) un an après (Krahn et al., 1993a). En effet, malgré la forte variation

interindividuelle des niveaux de métabolites biliaires, empêchant de dégager des différences statistiques entre les sites contaminés et non contaminés par la mesure des métabolites du phénanthrène par CLHP-F, l'identification individuelle de métabolites de HAP caractéristiques des pétroles par CPG/SM en quantités importantes dans la bile a permis de distinguer les différents sites étudiés. La somme des métabolites détectés par CPG/SM varie de 660 ng/g de bile à 19000 ng/g, ce qui est comparable avec les valeurs observées pour la marée noire de l'Exxon Valdez (Krahn et al., 1992). Les concentrations extrêmes des principaux métabolites détectés par CPG/SM sont détaillées dans le Tableau I.30. Les niveaux de HAP dans les sédiments et de métabolites dans la bile sont de plus fortement corrélés.

Métabolites	Saumon rose du Pacifique		Lieu de l'Alaska	
	Référence	Contaminé	Référence	Contaminé
OHN				
C ₂	10	310	<1	<0,8
C ₃	10	960	<1	<0,8
OHDBT				
C ₁	56	6900	<3	220
	33	2600	<3	<2
	39	5100	<3	<2
C ₂	<29	11000	<3	480
	<29	10000	<3	250
	49	12000	<3	<2
	<29	15000	<3	1100
C ₃	<29	11000	<3	<2
	<29	9100	34	350
	<29	5800	<3	170
	<29	12000	<3	<2
OHPhe				
C ₁	140	10000	400	1100
	<11	1400	<2	<1
	<11	1800	<2	<1
C ₂	18	3700	<2	200
	44	4900	<2	290
	17	4200	<2	330
	<11	3200	<2	<1
C ₃	<11	3300	<2	190
	<11	3600	<2	<1
somme	416	137870	434	4680

C₁ : méthyl, C₂ : diméthyl, C₃ : triméthyl

Tableau I.29 : Concentration (ng/g) des métabolites biliaires détectés par CPG/SM chez 2 espèces de poissons après la marée noire de l'Exxon Valdez (d'après Krahn et al., 1992)

La contamination de la péninsule Antarctique suite au naufrage d'un navire (le Bahía Paraiso) a également été étudiée (McDonald et al., 1992 et 1995; Kennicutt et al., 1995). Les niveaux d'équivalents benzo(a)pyrène mesurés chez les poissons collectés sont inférieurs aux limites de détection dans tous les échantillons (McDonald et al., 1992). La présence d'interférents dans les

chromatogrammes CLHP est de plus notée par l'auteur aux longueurs d'onde du naphthalène et du phénanthrène. Cependant, les niveaux d'équivalents naphthalène sont corrélés avec la somme des métabolites du dibenzothiophène et du naphthalène détectés par CPG/SM ainsi que les niveaux d'équivalents phénanthrène avec la somme des hydroxyphénanthrènes (détectés par CPG/SM). Les niveaux de métabolites (équivalents naphthalène et phénanthrène) les plus élevés sont mesurés dans la bile de poissons prélevés à proximité de l'épave du Bahía Paraiso. Dans ces échantillons, des métabolites caractéristiques d'une contamination pétrolière sont identifiés par CPG/SM. Aucun métabolite n'est par contre détecté par cette technique dans les biles présentant les niveaux d'équivalents naphthalène et phénanthrène les plus faibles. D'autre part, aucune corrélation n'est mise en évidence entre les concentrations en métabolites biliaires et celles en HAP dans le foie, l'estomac ou les muscles (McDonald et al., 1992).

Métabolites	Concentration minimale (ng/g)	Concentration maximale (ng/g)
OHN	12	100
C ₁ -OHN	22	250
C ₂ -OHN	43	690
C ₃ -OHN	8	1400
OHFe	79	530
C ₁ -OHDBT	140	3300
C ₂ -OHDBT	83	5600
C ₃ -OHDBT	7	1200
OHPhe	55	670
C ₁ -OHPhe	70	3200
C ₂ -OHPhe	30	1800
OHP	69	1300

C₁ : méthyl, C₂ : diméthyl, C₃ : triméthyl

Tableau I.30 : Concentrations minimales et maximales en métabolites détectées dans la bile de bossus dorés (*Lethrinus kallopterus*) collectés un an après la marée noire consécutive de la guerre du golfe (Krahn et al., 1993a)

La biodisponibilité de HAP provenant d'un déversement accidentel de pétrole dans une rivière a également été mis en évidence par le suivi des métabolites de HAP dans la bile de poissons (Krahn et al., 1986b). En effet, les concentrations en métabolites du naphthalène, du phénanthrène et du benzo(a)pyrène observées 5 jours après le déversement, sont respectivement environ 6, 22 et 33 fois supérieures chez des esturgeons blancs (*Acipenser transmontanus*) prélevés 92 km en aval, sur un site connu pour ne pas avoir de sources importantes de HAP mais où des boulettes de pétrole sont visibles après l'accident, par rapport à ceux prélevés en amont de l'accident.

c) Autres pollutions ponctuelles d'origine anthropique :

Quelques travaux ont également tenté d'utiliser les métabolites de HAP afin de mettre en évidence l'effet sur l'exposition des organismes aux HAP à la suite d'un dragage réalisé dans une rivière en 1990 sur des sédiments fortement contaminés en HAP (Lin et al., 1994 et 2001). La

mesure d'équivalents 1-hydroxypyrene dans la bile d'une espèce de poisson-chat a montré un niveau constant pendant le dragage et durant l'année suivant celui-ci. Par contre, une baisse significative est observée lors de nouveaux échantillonnages réalisés en 1993 (diminution de 101 à 12 ng d'équivalents 1-hydroxypyrene par ml de bile). Les niveaux observés en 1993 ont ensuite été confirmés par de nouveaux prélèvements en 1998.

d) Pollutions ponctuelles d'origine naturelle :

L'évaluation de l'exposition de poissons aux HAP a été étudiée dans le cas d'une fuite naturelle de pétrole se déroulant dans un canal (Spies et al., 1996). Les niveaux d'équivalents naphthalène et phénanthrène sont supérieurs chez le poisson *Hypsurus caryi* collecté sur le lieu de la fuite par rapport à ceux d'un site référence. Par contre, pour une autre espèce de poisson, *Rachochilus toxodes*, le niveau d'équivalents phénanthrène n'est pas discriminant.

D'autre part, dans une étude menée en mésocosme, des turbots (*Pleuronichthys verticalis*) ont été exposés pendant 7 jours à différents pourcentages de sédiments (0, 33, 66 et 100%) provenant d'une zone de suintement sous-marin de pétrole (Roy et al., 2003). Le dosage des HAP pour les expositions à 33% et 66% de sédiments contaminés ne montre aucune différence de concentration au niveau des HAP de faible poids moléculaire alors que la concentration des HAP de haut poids moléculaire est bien proportionnelle au pourcentage de sédiments contaminés. Parallèlement, les concentrations des différentes classes de métabolites biliaires suivies (équivalents naphthalène, phénanthrène et benzo(a)pyrène) sont toutes plus élevées à la dose 66% qu'à la dose 33%. De plus, les concentrations en métabolites sont plus faibles à la dose 100% qu'à la dose 66% alors que les niveaux d'adduits et de dommages à l'ADN sont proportionnels à la dose. Cette non-linéarité du niveau de métabolites pourrait s'expliquer par l'exposition à une dose trop forte, altérant les capacités de biotransformation des poissons. L'augmentation de l'activité hépatique CYP1A n'est cependant observée qu'à la dose 100%. D'autre part, différentes études ont observé une bonne linéarité « exposition-niveau de métabolites chez les poissons » (Collier et Varanasi, 1991; Willet et al., 1995; Aas et al., 2000a)

3.4.2. Pollutions chroniques :

Les pollutions de type chronique sont caractérisées par l'introduction de contaminants dans l'environnement de manière récurrente. Elles ont généralement pour origine les rejets d'usines et de stations d'épuration (Tableaux I.31 et I.27).

Afin de mieux appréhender la pollution générée dans une rivière par les rejets d'une usine de coke, une étude visant à étudier les métabolites de HAP chez des poissons-chats suite à la fermeture de cette usine est menée (Lin et al., 2001). Ainsi, les poissons collectés moins de 1 an après la fermeture de l'usine présentaient une baisse significative d'équivalents 1-hydroxypyrene dans la bile par rapport à des mesures réalisées antérieurement (de 105 à 8 ng d'équivalents 1-hydroxypyrene par ml de bile).

La pollution engendrée par les rejets d'une usine d'aluminium située dans un détroit au sud-ouest de la Norvège a été étudiée de différentes manières. Une première étude menée en 1996 a fait appel au caging de morues dans 2 sites situés de part et d'autre de l'usine à une distance de 300 mètres (Beyer et al., 1998) et l'autre au prélèvement de morues et de crénilabres mélops (*Symphodus melops*) sur les mêmes sites en 1998 (Aas et al., 2001). Dans la première étude, deux cages sont utilisées par site, l'une posée sur le fond et l'autre 2 mètres sous la surface. On peut également noter que les poissons prélevés dans la deuxième étude sont maintenus en cage sur le site de capture sans nourriture pendant une durée de 3 à 5 jours avant dissection afin de disposer de poissons au même stade de digestion et ainsi de vésicules biliaires de concentrations homogènes.

Les sites proches de l'usine sont ceux présentant les niveaux de métabolites les plus élevés pour les deux études. La concentration en métabolites est par exemple 37 fois plus forte dans une cage placée sur le fond près de l'usine que dans le site référence choisi alors que les sédiments des deux sites présentent des niveaux de pyrène équivalents. Il est cependant intéressant de noter que les poissons placés 2 mètres sous la surface présentent des niveaux de métabolites largement supérieurs à ceux placés en contact avec les sédiments. Ces observations suggèrent que l'exposition des poissons aux HAP est due aux rejets chroniques de l'usine directement par la colonne d'eau et non pas par les HAP accumulés dans les sédiments. Leadly et al. (1999), utilisant le même type de stratégie de caging avec des poissons-chats, et Koloc et al. (1996), par ligature de l'œsophage d'aloses à gésier (*Dorosoma cepedianum*), aboutissent également à la conclusion d'une contamination principale des poissons par la colonne d'eau. D'autres études concluent quant à elles au rôle prédominant des sédiments dans l'exposition de différents poissons tels que le médaka (*Oryzias latipes*), le flet (*Platichthys flesus*) ou la plie (*Pleuronectes platessa*) aux HAP (Fabacher et al., 1991; Ariese et al., 1993a; Eggens et al., 1996a; Barra et al., 2001).

Contexte	Détection	Types de métabolites	Référence
péninsule Antarctique (marée noire et station scientifique)	CLHP-F	N, Phe et BaP	McDonald et al., 1992 et 1995; Kennicutt et al., 1995
mer du Nord (proximité exploitations offshore)	FF	N, P, BaP	Aas et Klungsøyr, 1998
estuaire et port (proximité usine d'aluminium)	SFS	P	Paine et al., 1996 : hémolymphe de crabe
détroit (proximité usine d'aluminium)	FF et CLHP-F	N, P et BaP	Aas et al., 2001
détroit : proximité usine d'aluminium (<i>caging</i>)	FF	P	Beyer et al., 1998
rejet de station d'épuration en milieu côtier (<i>exposition à l'eau</i>)	FF	N et BaP	Gravato et Santos, 2003
Fjord (rejets usines) (<i>caging</i>)	FF	P	Aas et al., 1998
	FF	N+Phe, P, BaP	Beyer et al., 1996
rivière (industrie pétrolière)	SFS	P	Lin et al., 2001

Tableau I.31 : Travaux consistant à évaluer la biodisponibilité des HAP en milieu naturel lors de pollutions chroniques par un dosage semi-quantitatif global

Certaines études n'ont pas observé de biodisponibilité des HAP à proximité de sources chroniques potentielles de contamination. Ainsi, une étude visant à évaluer la contamination de la mer du Nord par les nombreuses exploitations offshore qui y sont présentes n'a pas mis en évidence de niveaux élevés de métabolites biliaires du naphthalène, du pyrène ou du benzo(a)pyrène par fluorescence fixe chez des morues, des haddocks (*Melanogrammus aeglefinus*) et des plies canadiennes (*Hipoglossoides platessoides*) collectés à proximité des plates-formes (Aas et

Klungsoyr , 1998). De même, des crabes dormeurs prélevés à proximité d'une usine d'aluminium ne présentent pas de niveaux supérieurs à ceux d'un site non contaminé dans leur hémolymphe contrairement à ce que l'on aurait pu attendre en se basant sur les concentrations en HAP dans les sédiments (Paine et al., 1996). Dans une autre étude, des bars (*Dicentrarchus labrax*) sont exposés en laboratoire à de l'eau provenant d'un effluent sous-marin côtier de station d'épuration (Gravato et Santos, 2003). Aucune augmentation des métabolites biliaires du naphtalène et du benzo(a)pyrène n'est constatée après 96 h d'exposition.

3.4.3. Pollutions diffuses :

Les pollutions à caractère diffus sont la combinaison de sources multiples dont les contributions individuelles sont difficiles à évaluer et concernent des zones géographiques non ponctuelles. Les études de pollutions diffuses par le biais de la détermination des métabolites de HAP dans les organismes aquatiques sont récapitulées dans le Tableau I.32.

Le monitoring des métabolites dans la bile de poissons de la péninsule Antarctique a permis de montrer que les apports atmosphériques de HAP transportés sur longues distances sont négligeables par rapport à la contribution des sources locales existantes (Kennicutt et al., 1995). Cependant, certaines études ont permis de mettre en évidence le transport sur longue distance des HAP, provoquant la contamination d'environnements reculés tels que le milieu marin profond (1500-1800 mètres; Escartín et Porte, 1999c) ou certains lacs de haute altitude éloignés de zones industrielles (Escartín et Porte, 1999b). Les concentrations extrêmes de métabolites biliaires dosés dans différents poissons lors de ces études sont résumées dans le Tableau I.33. Des résultats obtenus le long de la côte nord-ouest de la Méditerranée et dans des rivières proches de Barcelone sont également présentés dans ce tableau pour comparaison. On peut ainsi remarquer que certains poissons vivant entre 1500 et 1800 mètres de profondeur en mer Méditerranée ou bien dans les lacs étudiés présentent des niveaux de métabolites supérieurs à certains poissons côtiers méditerranéens. Cependant, les niveaux observés sont inférieurs à ceux réalisés dans des rivières proches de Barcelone. Les valeurs obtenues chez les carpes capturées dans ces rivières sont de plus proches de celles déterminées chez des anguilles (*Anguilla anguilla*) de différents estuaires anglais (Tableau I.34) bien que dans cette dernière étude, des différences importantes entre estuaires aient été observées (Ruddock et al., 2003). Les anguilles collectées dans les différents estuaires présentent des compositions relatives en métabolites biliaires caractéristiques de chacun de ces estuaires. Le 1-hydroxypyrene est cependant majoritaire (de 57 à 94% des métabolites pris en compte) quels que soient l'estuaire (Ruddock et al., 2003) et l'espèce étudiés (anguille, flet et congre (*Conger conger*); Ruddock et al., 2002).

Contexte	Détection	Types de métabolites	Référence
eaux profondes	CLHP-F	BaP	Escartín et Porte, 1999c
mer de Wadden	SFS	P	Eggens et al., 1996b
milieu côtier	CLHP-F	N, Phe et BaP	Krahn et al., 1984 et 1986a; Willett et al., 1997
	CLHP-F	N, P et BaP	Escartín et Porte, 1999a
	CLHP-F	N et BaP	Myers et al., 1993; Stein et al., 1995; McCain et al., 1996 et 2000
	CLHP-F	BaP	Collier et Varanasi, 1987; Varanasi et al., 1989b et 1993a; McCain et al., 1990; Myers et al., 1994; Stein et al., 1992; Collier et al., 1998a,b

Contexte	Détection	Types de métabolites	Référence
milieu côtier (<i>exposition aux sédiments</i>)	CLHP-F	BaP	Varanasi et al., 1985 Stein et al., 1987 French et al., 1996
côtier (15 à 40 mètres de profondeur)	SFS	P	Eickhoff et al., 2003 (hémolymphe de crabe)
détroit	CLHP-F	N et BaP	Krahn et al., 1987
estuaire	SFS	P	Lyons et al., 1999
estuaire (<i>exposition à l'eau et caging</i>)	SFS et FF	P et BaP	Barra et al., 2001
baie	CLHP-F	N et BaP	Stehr et al., 1997
	FF	N, P et BaP	Gagnon et Holdway, 2002
baie et port (aquaculture)	CLHP-F	N et Phe	Klumpp et al., 2002
port (<i>caging</i>)	FF	N, P et BaP	Ahmad et al., 2003
port (<i>exposition aux sédiments</i>)	SFS	P	Ariese et al., 1993c
			Ariese et al., 1993a; Vethaak et al. 1996; Eggens et al., 1996a
port et lac (Amsterdam)	SFS	P	van der Oost et al., 1994b
port de lac (<i>exposition aux sédiments</i>)	CLHP-F	BaP	Leadly et al., 1999
eau douce (Amsterdam) (<i>caging</i>)	SFS	P	van der Oost et al., 2000
rivière	FF	N et BaP	Schrank et al., 1997; Cormier et al., 2000; Yang et al., 2003
	FF et CLHP-F	N et BaP	Lin et al., 1996
	CLHP-F	Phe et BaP	Maccubbin et al., 1988; Viganò et al., 2002
	CLHP-F	BaP	Johnston et Baumann, 1989; Lin et al., 1994; Metcalf et al., 1997; Arcand-Hoy et Metcalfe, 1999; Deshpande et al., 2002
	SFS	P	Lin et al., 1994
rivière (<i>caging</i>)	CLHP-F	BaP	Leadly et al., 1999
rivière (<i>exposition à l'eau</i>)	FF	BaP	Britvić et al., 1993
lacs de montagne	CLHP-F	N et P	Escartín et Porte, 1999b

Tableau I.32 : Travaux consistant à évaluer la biodisponibilité des HAP en milieu naturel lors de pollutions diffuses par un dosage semi-quantitatif global

Les résultats obtenus le long de la côte nord-ouest méditerranéenne (Escartín et Porte, 1999a), pour des poissons collectés entre 30 et 50 mètres de profondeur, mettent en évidence des zones fortement contaminées comme celle de Barcelone comparativement au site de Couronne par exemple, situé entre le delta du Rhône et Marseille (1589 et 91 ng/ml respectivement pour la somme des métabolites étudiés). Ils permettent également de montrer des différences entre espèces vivant sur une même zone. Ainsi, le rouget-barbet présente généralement des niveaux de métabolites plus élevés que le serran chèvre. Il est de plus constaté que la bile de rouget-barbet contient moins de métabolites de faible poids moléculaire et davantage de ceux de haut poids moléculaire que le serran chèvre. Le 1-hydroxypyrene représente ainsi de 71 à 87% (en concentration) des métabolites détectés chez le rouget-barbet alors que le 1-hydroxynaphtalène et le 2-hydroxybiphényle ne représentent à eux deux que 3 à 11% de la totalité des métabolites. Par contre, pour le serran chèvre, le 1-hydroxypyrene représente de 0 à 48% des métabolites et la somme du 1-hydroxynaphtalène et du 2-hydroxybiphényle de 30 à 100%. Ces différences sont confirmées par les dosages d'équivalents hydroxynaphtalène et hydroxypyrene. L'auteur explique ces résultats par les modes de vie différents des 2 poissons. En effet, le rouget-barbet vit dans des milieux sableux et vaseux (exposé aux HAP adsorbés de haut poids moléculaire) et est donc représentatif de la contamination du sédiment alors que le serran chèvre vit dans des milieux rocheux se nourrissant de petits poissons et de crustacées (exposé aux HAP plus légers, dissous) et est donc représentatif de la contamination de la colonne d'eau.

Milieu	Milieu marin profond (ng/ml)	Lacs de haute altitude (ng/ml)	Côte nord-ouest méditerranéenne (ng/ml)	Rivières (ng/g)
Référence	Escartín et Porte, 1999c	Escartín et Porte, 1999b	Escartín et Porte, 1999a (et Porte et al., 2002)	Fernandes et al., 2002
Espèce	<i>Coryphaenoides guentheri</i> , <i>Lepidion lepidion</i> , <i>Mora moro</i> , <i>Bathypterois mediterraneus</i> , <i>Alepocephalus rostratus</i>	truite d'Europe (<i>Salmo trutta</i>), omble de fontaine (<i>Salvelinus fontinalis</i>), omble chevalier (<i>Salvelinus alpinus</i>)	rouget-barbet (<i>Mullus barbatus</i>)	serran chèvre (<i>Serranus cabrilla</i>) carpe (<i>Cyprinus carpio</i>)
1-OHN	10-125	10-50		
2-OHBi	8-193	21-70		
9-OHFe	20	7-51		
9-OHPhe	nd	nd-362		
1-OHP	10-163	nd-466		400-5500
Somme	57-501	69-991	91-1589	15-159 1000-6000

nd : non détecté

Tableau I.33 : Concentrations extrêmes de métabolites dosés individuellement dans la bile de poissons collectés dans différents environnements

Milieu	Estuaires anglais
1-OHPhe	23-2093
1-OHP	119-7600
1-OHC	nd-3206
1-OHBaP	nd-177
3-OHBaP	nd-147
7,8-OHBaP	nd-2286
Somme	164-10860

nd : non détecté

Tableau I.34 : Concentrations (ng/ml) extrêmes de métabolites dosés dans la bile d'anguilles *Anguilla anguilla* collectées dans différents estuaires anglais (d'après Ruddock et al., 2003)

La côte ouest des Etats-Unis a également été largement étudiée en terme de monitoring des métabolites biliaires de HAP chez les poissons (Krahn et al., 1984, 1986a et 1987; Varanasi et al., 1985, 1989b et 1993a; Collier et Varanasi, 1987; Collier et al., 1998a et b; Stein et al., 1987, 1992 et 1995; McCain et al., 1990 et 2000; Myers et al., 1993 et 1994; French et al., 1996). L'exposition des poissons aux HAP a ainsi été montrée dans des zones fortement industrialisées avec d'importants trafics maritimes et portuaires comme le détroit de Puget situé près de la ville de Seattle. On peut cependant noter que Stein et al. (1992) n'ont pas observé de différences entre les sites considérés comme sites de référence et ceux considérés comme contaminés par la mesure des niveaux d'équivalents benzo(a)pyrène dans la bile de différents poissons (carlottin anglais, plie étoilée et fausse limande du Pacifique) alors que les autres biomarqueurs suivis (activités EROD, AHH, GSH et adduits à l'ADN) mettent en évidence d'importantes différences. Certaines études ont permis d'identifier les métabolites biliaires les plus abondants chez des poissons de ces milieux (Krahn et al., 1984 et 1987). Ces composés sont récapitulés dans le Tableau I.35 où figure également une étude réalisée dans différents ports islandais pour comparaison. On peut tout d'abord remarquer que les principaux composés identifiés sont des phénols, composés similaires à ceux formés lors d'exposition de poissons à des produits pétroliers avec cependant une prépondérance des métabolites des HAP alkylés dans ce cas (§ I.3.2.2). On peut ensuite observer que les niveaux de certains métabolites, plus particulièrement ceux du phénanthrène et du pyrène sont extrêmement élevés dans les sites étudiés par Krahn et al. (300000 ng/g pour le 1-hydroxypyrene) comparativement à ceux du port de Reykjavik (11 ng/g), de la mer Méditerranée (1240 ng/ml à proximité de Barcelone), d'estuaires anglais (7600 ng/ml) ou d'une rivière proche de Barcelone (environ 5500 ng/g). On peut noter que Krahn et al. (1987) ne détectent pas de métabolites individuels du benzo(a)pyrène par CPG/SM. Cependant, Ariese et al. (1993a) établissent un rapport variant de 300 à 600 entre le 1-hydroxypyrene et le 3-hydroxybenzo(a)pyrène dans la bile de poisson dans la plupart des cas.

Référence	Krahn et al., 1984	Krahn et al., 1987	Stephensen et al., 2000
Milieu	voies navigables dont détroit de Puget	détroit de Puget	ports islandais
Espèce	carlottin anglais (<i>Parophrys vetulus</i>)	carlottin anglais (<i>Parophrys vetulus</i>)	chaboisseau à épines courtes (<i>Myoxocephalus scorpius</i>)
Métabolites identifiés (ng/g)	C ₂ OHN (nd-410)	5 OHFe (40000, 9000, 8000, 4000, 4000)	1 OHFe
	C ₁ N méthanol (nd-90)	4 OHDBF (10000, 10000, 6000 et 1000)	1 OHC ₁ fluorénone
	OHBi (nd-1400)	3 OHF (60000, 40000 et 30000)	2 OHbenzofurane
	2 OHFe (nd-4390)	2 OHPhé (300000 et 200000)	1 OHC ₁ Phé
	1,2-diOHPhé (10900-35000)	diOHPhé (6000)	1 anthraquinone
	9,10-Anthraquinone (nd-4800)	1-OHP (300000)	1 OHF
	Phé carboxaldéhyde (nd-560)	2 OHBaP (20-300 équivalents BaP par CLHP-F)	1-OHP (nd-11)
	A carboxaldéhyde (nd-2700)		

nd : non détecté; OH : hydroxy

Tableau I.35 : Récapitulatif des métabolites détectés dans la bile de poissons collectés dans différents environnements et concentrations (ng/g)

BUT DES TRAVAUX

Afin d'évaluer l'état de santé d'un écosystème marin du point de vue de la contamination en hydrocarbures aromatiques polycycliques, il apparaît essentiel de connaître la biodisponibilité de ces composés vis-à-vis des organismes. L'étude de la biotransformation des HAP et la quantification des métabolites formés chez des organismes vertébrés tels que les poissons semble constituer dans cette optique une approche complémentaire de la mesure de la bioaccumulation classiquement réalisée chez les invertébrés.

Les travaux de cette thèse ont consisté dans un premier temps à développer un outil de dosage de certains produits de biotransformation des HAP chez les poissons. Il s'agissait de mettre au point un protocole analytique permettant de quantifier les métabolites de HAP de manière individuelle dans différentes matrices et plus particulièrement dans la bile.

Cet outil a par la suite été appliqué dans le cadre de la marée noire faisant suite au naufrage du pétrolier Erika en décembre 1999. En effet, bien que les conséquences de cette pollution aient été observées sur différents organismes dépendant du milieu marin (oiseaux, organismes benthiques de la zone intertidale et invertébrés marins), aucune anomalie n'a été montrée à court terme chez les poissons, tant au niveau du dénombrement des populations que du point de vue biologique (Claireaux et al., 2004 ; Publication 8). Il est alors apparu nécessaire d'évaluer l'exposition de ces organismes aux HAP lors de la marée noire. Dans cet objectif, différentes expositions de soles (*Solea solea*) à du fioul lourd de type Erika ont été réalisées en bassin afin de mieux comprendre le devenir de HAP présents dans un fioul lourd déversé dans le milieu marin et leur biodisponibilité vis-à-vis des poissons. Ces expérimentations ont de plus permis d'évaluer l'influence de différents facteurs sur le comportement et la biotransformation des HAP (température, sexe, âge). Des expositions séparées à différents HAP ont également été réalisées afin d'étudier plus particulièrement certains composés individuellement. Le dosage des métabolites de HAP a enfin été réalisé sur des soles échantillonnées consécutivement à la marée noire et ce sur une période de 3 ans (2000, 2001 et 2002). Par ailleurs, la capacité de bioaccumulation de mollusques a été utilisée afin d'évaluer la contamination à moyen terme d'un site particulièrement touché par la marée noire, le traict du Croisic. Différentes transplantations de moules provenant de l'entrée du bassin d'Arcachon ont été réalisées entre avril et août 2001.

Les phénomènes de biotransformation et de bioaccumulation des HAP ont également été étudiés chez des turbots et des morues exposés à un même produit pétrolier. Il s'agissait de comparer le métabolisme des HAP chez deux espèces de poisson, l'un benthique et l'autre pélagique.

Enfin, dans le cadre de l'évaluation de la qualité du milieu aquatique en estuaire de Seine, la biodisponibilité des HAP vis-à-vis des poissons et leur biotransformation a été évaluée en embouchure du fleuve. Le dosage des métabolites de HAP a été réalisé sur un organisme largement distribué sur le littoral français, le flet (*Platichthys flesus*). Trois autres sites du littoral français ont été étudiés pour comparaison. Le premier se situe au nord de la baie de Seine, entre le port pétrolier d'Antifer et l'estuaire de la Seine, le second à la pointe sud de la Bretagne et le troisième dans l'estuaire de la Gironde.

CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

Dans une première partie, les différentes études réalisées dans ce travail sont décrites. Ainsi, différentes études ont été menées dans le cadre du programme de « suivi des conséquences écologiques et écotoxicologiques dues au naufrage de l'Erika » afin d'évaluer l'exposition d'une espèce de poisson, la sole (*Solea solea*), lors de la marée noire Erika. Pour ce faire, des soles ont tout d'abord été exposées en bassin pendant 5 jours à deux produits pétroliers, de compositions proches de celle du fioul Erika, déposés en surface en début d'expérimentation. Plusieurs doses de fiouls ont été utilisées à différentes températures et sur des soles mâles et femelles appartenant à différents groupes d'âge. D'autre part, des soles ont également été exposées à quatre HAP séparément, dissous dans l'eau en début d'expérimentation, sur une période de 7 jours. Lors de ces différentes expérimentations, les poissons n'étaient pas nourris. Certaines périodes d'exposition ont été suivies de périodes de décontamination de courte ou de longue durée. Cinq campagnes en bateau ont également eu lieu suite au naufrage du pétrolier Erika, entre février 2000 et septembre 2002, dans leurs nourriceries de poissons situées le long de la côte atlantique française afin d'échantillonner des soles. De plus, dans le cadre du projet Liteau-Erika, des transplantations de moules ont été réalisées afin d'exposer sur une période de 1 mois des moules provenant du bassin d'Arcachon (faiblement contaminées en HAP) placées dans des cages à la pollution potentielle de différents sites du traict du Croisic suite à la marée noire Erika. Une étude a également été menée dans le cadre du projet européen BEEP (Biological Effects of Environmental Pollution in Marine Coastal Ecosystems) afin d'exposer deux espèces de poisson, des turbots (*Scophthalmus maximus*) et des morues (*Gadus morhua*), à un même pétrole brut dispersé dans l'eau en continu durant 3 semaines. Dans certains bassins, l'exposition au pétrole s'est déroulée en présence d'un mélange d'alkylphénols dissous dans l'eau. Lors de cette expérimentation, les poissons étaient nourris. Enfin, des flets (*Platichthys flesus*) ont été capturés à l'embouchure de la Seine, au large du port pétrolier d'Antifer, dans un estuaire du sud de la Bretagne et à l'embouchure de la Gironde.

Dans une seconde partie, les différentes techniques analytiques utilisées au cours de ces études sont décrites. Le dosage des HAP dans différentes matrices environnementales et biologiques, ainsi que celui des métabolites de HAP (protocole mis au point lors de ces travaux) par des techniques de chromatographie couplée à spectrométrie de masse sont décrits. Les étapes d'extraction, purification, séparation et détection sont ainsi détaillées.

1. SITES D'ETUDE ET EXPERIMENTATIONS	89
1.1. LA MAREE NOIRE ERIKA :	89
1.1.1. Campagnes d'échantillonnage :	90
1.1.2. Expérimentations en bassin :	93
a) Exposition à du fuel lourd n°2 :	93
b) Exposition à des HAP individuels :	95
1.1.3. Etude du traict du Croisic :	97
1.2. EXPERIMENTATION EN BASSIN :	99
1.3. ESTUAIRE DE LA SEINE :	102
2. DOSAGE DES COMPOSES ETUDIES	104
2.1. DOSAGE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES :	104
2.1.1. Préparation des échantillons :	104
2.1.2. Introduction des étalons internes :	105
2.1.3. Extraction :	106
a) Extraction des HAP dissous dans l'eau :	106
b) Extraction micro-ondes des matrices solides :	107
c) Extraction liquide-liquide :	107
2.1.4. Concentration :	107
2.1.5. Purification :	107
a) Chromatographie en phase liquide sur colonnes d'alumine et de silice :	107
b) Chromatographie liquide haute-performance (CLHP) :	108
c) Saponification :	108
2.1.6. Analyse par couplage CPG/SM :	108
a) Description de l'analyse :	108
b) Méthode de quantification :	109
c) Validation des analyses :	109
2.2. DOSAGE DES METABOLITES DE HAP (PUBLICATION 2) :	110
2.2.1. Préparation de l'échantillon :	110
2.2.2. Etalonnage interne :	111
2.2.3. Déconjugaison enzymatique :	111
2.2.4. Extraction :	111
2.2.5. Purification :	111
2.2.6. Détection des métabolites de HAP (Publication 1) :	112
a) Détection par CPG/SM :	112
b) Détection par CLHP/SM :	113
2.2.7. Dosage de l'activité enzymatique EROD :	115
2.2.8. Dosage des protéines :	115

1. SITES D'ETUDE ET EXPERIMENTATIONS

1.1. LA MAREE NOIRE ERIKA :

Le 12 décembre 1999 le pétrolier Erika se brisait en deux au large des côtes bretonnes, à environ 70 km de la pointe de Penmarc'h (Figure II.1 et Annexe 8). Il transportait 31000 tonnes de fuel lourd n°2 (classification AFNOR). Entre 5000 et 10000 tonnes de fuel sont alors immédiatement libérées dans le milieu. La partie avant du navire coule sur place dans la nuit du 12 au 13 décembre alors que la partie arrière, prise en charge par un remorqueur, coulera le lendemain. Les deux morceaux de l'épave, éloignés de 10 km l'un de l'autre, gisent à environ 120 m de profondeur. Au total, environ 20000 tonnes de ce fuel ont été déversées en mer et, le 23 décembre, les premières nappes de pétrole ont atteint les côtes du Finistère. Des échouages massifs se sont poursuivis les jours suivants, atteignant les îles du Morbihan (Groix et Belle-Ile) les 25 et 26 décembre, la Loire-Atlantique le 26 et la Vendée, au nord de Noirmoutier, le 27 décembre. Des arrivages moins importants ont suivi au cours de l'année 2000 (cf cartes présentées dans l'Annexe 8). La zone d'échouage des nappes le long de la côte Atlantique s'étend sur environ 400 km de la pointe sud de la Bretagne au nord (Penmarc'h) à l'île d'Oléron au sud (Figure I.1). Il s'agit de la pollution aux hydrocarbures la plus importante sur les côtes françaises depuis l'Amoco Cadiz en 1979 qui déversa 223000 tonnes de pétrole. D'importants impacts socio-économiques ont été ressentis dans les secteurs de la pêche et du tourisme. Ainsi, la zone couverte par la marée noire, représentant 50000 tonnes de production annuelle de produits de la pêche, c'est-à-dire 25% de la production française, a été sujette à différentes réglementations suite à la marée noire (§ I.7.3) (marine nationale, 2000; Cedre, 2000; RNO, 2002; <http://www.environnement.gouv.fr>, 4 juin 2004).

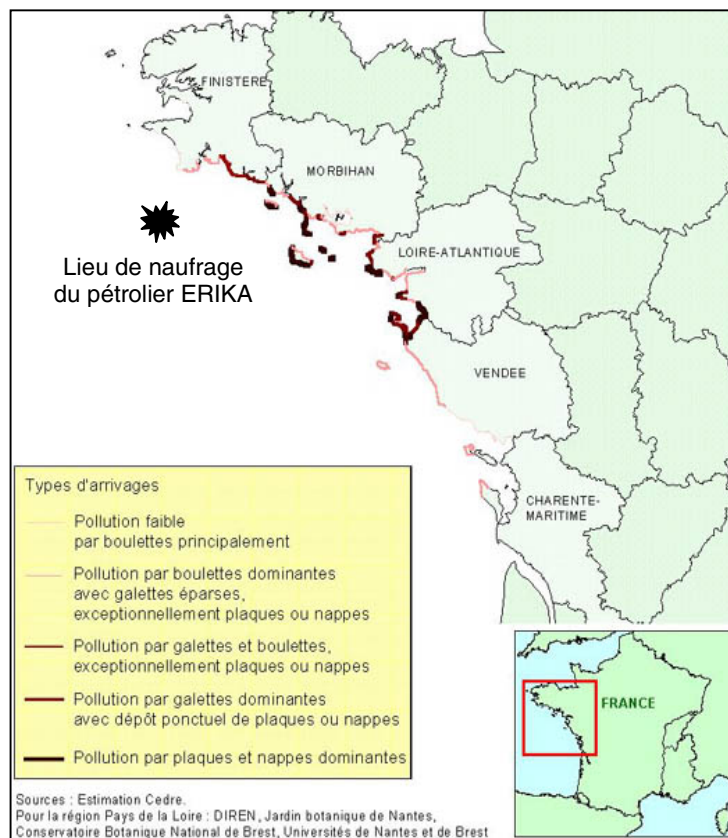


Figure II.1 : Localisation du naufrage du pétrolier ERIKA et des principales côtes touchées par les nappes (Estimation Cedre)

Suite à cette marée noire, différentes études ont été réalisées afin d'évaluer l'impact d'une telle pollution sur les organismes aquatiques vivant dans les zones côtières et estuariennes touchées dans le cadre du « programme Erika » (suivi des conséquences écologiques et écotoxicologiques dues au naufrage de l'Erika). Ce programme a été mis en place par le ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement le 28 février 2000 et regroupe 30 projets. Il en a confié la co-animation à l'Ifremer (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) et à l'Ineris (Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques). Ce programme regroupe 30 projets couvrant l'étude du devenir du fuel dans l'environnement et l'impact écologique de la marée noire sur les populations d'oiseaux, la faune et la flore marine ainsi que les conséquences du nettoyage des sites impactés (<http://www.suivi-erika.info>, 4 juin 2004).

Les zones côtières et estuariennes touchées par la marée noire sont généralement propices, de part leur richesse, au peuplement par des invertébrés benthiques (polychètes, crustacés, bivalves). Ces organismes constituant la base du régime alimentaire des jeunes poissons comme les juvéniles de sole, ces zones sont d'importants sites de nourriceries pour les populations de poissons du golfe de Gascogne.

Cependant, bien que les conséquences de la marée noire aient été observées sur les oiseaux (entre 80000 et 150000 oiseaux ont péri consécutivement à la marée noire (Cadiou et Bouludier, 2003)), les organismes benthiques de la zone intertidale et les invertébrés marins de la zone côtière, aucune anomalie imputable à cet événement n'a par contre été démontrée chez les poissons, tant au niveau du dénombrement des populations que du point de vue biologique.

Ce travail de thèse prend place dans le cadre de deux projets. Le premier d'entre-eux est le projet mené par le Laboratoire de Physico- et Toxicochimie des Systèmes Naturels (LPTC) de l'université de Bordeaux I, dirigé par H. Budzinski, consistant à utiliser les métabolites de HAP comme biomarqueurs d'exposition des organismes marins aux HAP et le second est le projet ECTOPHY (suivi écologique, toxicologique et physiologique des poissons exposés à la marée noire de l'Erika), partie intégrante du « suivi Erika » (Suivi des conséquences écologiques et écotoxicologiques dues au naufrage de l'Erika). Ce projet est co-dirigé par Y. Desaunay du département d'écologie halieutique de l'IFREMER et G. Claireaux du CREMA (Centre de Recherche sur les Ecosystèmes Marins et Aquacoles) de l'Houmeau. Dans le cadre de ces projets, des campagnes d'échantillonnage et des expérimentations contrôlées en bassin ont été menées afin d'évaluer l'exposition des populations de poissons à la marée noire et de mieux comprendre le devenir des HAP en milieu marin et leur biodisponibilité vis-à-vis des poissons.

1.1.1. Campagnes d'échantillonnage :

Différentes campagnes ont été menées par l'IFREMER (coordonnées par Y. Desaunay) sur les principaux sites de nourriceries de poissons le long de la côte Atlantique.

L'organisme choisi dans cette étude est la sole (*Solea solea*) en raison de sa présence sur la zone couverte par la marée noire, sa biologie et son comportement migratoire bien connus ainsi que par le fort intérêt économique que représente le renouvellement des populations de soles dans le golfe de Gascogne où elle est la première espèce en valeur marchande. Le stock de soles est d'ailleurs considéré comme étant en dessous des limites de renouvellement des populations dans la zone Atlantique du nord-est (OSPARCOM, 2000). La sole est un poisson plat, de la famille des vertébrés téléostéens, vivant généralement sur des fonds sableux et ayant une croissance relativement lente. Elle se nourrit essentiellement de petits invertébrés, vers, mollusques bivalves et crustacés. La sole adulte (Figure II.2) vie et fraie (début février à hauteur de la Gironde, début mars dans le secteur Loire-Vilaine) sur des fonds de 40 à 70 m

de profondeur dans le golfe de Gascogne. Les larves pélagiques migrent ensuite vers les zones estuariennes (nourriceries) puis, après 1 à 2 mois, avec la métamorphose, les juvéniles adoptent un comportement benthique et restent dans ces zones de nourriceries jusqu'à maturité sexuelle (3 à 5 ans) (Figure II.3; Amara et al., 2000; Koutsikopoulos et al., 1995).

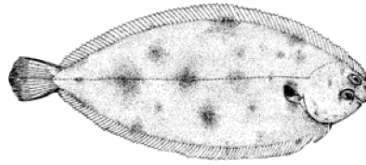


Figure II.2 : La sole *Solea solea*

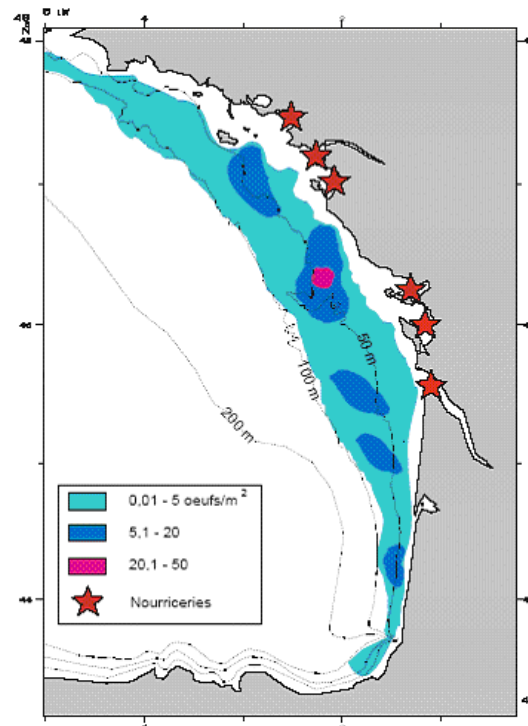


Figure II.3 : Concentrations en oeufs dans les frayères de soles du golfe de Gascogne en février et localisation des principales nourriceries (adapté de Arbault et al.,1986 et Le Pape et al.,2003)

Une première campagne d'échantillonnage de juvéniles de soles a été effectuée en février 2000. Deux autres campagnes ont suivi en Juillet et Septembre 2000. Deux campagnes supplémentaires, nommées ont ensuite été menées en Septembre 2001 et 2002. Les sites d'échantillonnages sont représentés sur la Figure II.4. Les poissons ont été pêchés à l'aide d'un chalut constitué de mailles de 2 cm. Lors de la campagne de février 2000, la présence de fuel a été observée dans le chalut à différentes reprises. Ces zones sont répertoriées sur la Figure II.5.

Immédiatement après la remontée du chalut, les soles sont comptées, mesurées et pesées. Elles sont ensuite tuées puis disséquées. La vésicule biliaire est prélevée en entier, placée dans un tube eppendorf individuel puis stockée dans de l'azote liquide jusqu'à l'arrivée des échantillons au laboratoire où ils sont ensuite stockés dans un congélateur à -80°C . Le foie est stocké dans un tube eppendorf à -20°C au congélateur. Les filets de muscles sont également stockés à -20°C dans des barquettes aluminium après avoir enlevé la peau. Les vésicules biliaires sont destinées au dosage des métabolites de HAP alors que les muscles et

les foies sont destinés au dosage des HAP. Les prélèvements ont été réalisés sur différentes classes d'âge (g0, g1, g2, g3) lorsque cela était possible (Tableau II.1). En ce qui concerne la baie de Vilaine, deux parties ont été distinguées, la partie interne de la baie et la partie externe, située plus au large. 10 individus ont été prélevés pour chaque classe d'âge. Le groupe 0 correspond à des individus nés l'année du prélèvement, le groupe 1 à des poissons nés l'année précédent la capture et ainsi de suite. Les individus du groupe 1 des trois premières campagnes (2000) sont donc issus de la même génération que ceux du groupe 2 de la quatrième campagne (septembre 2001).

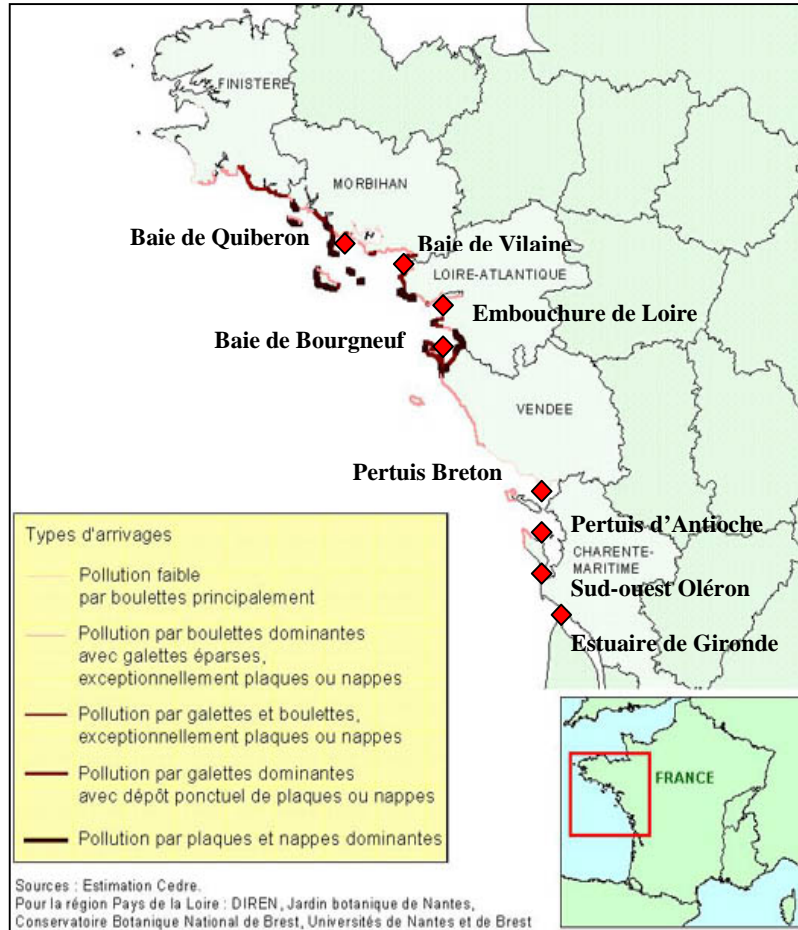


Figure II.4 : Localisation des zones échantillonnées lors des campagnes Black et Nurse

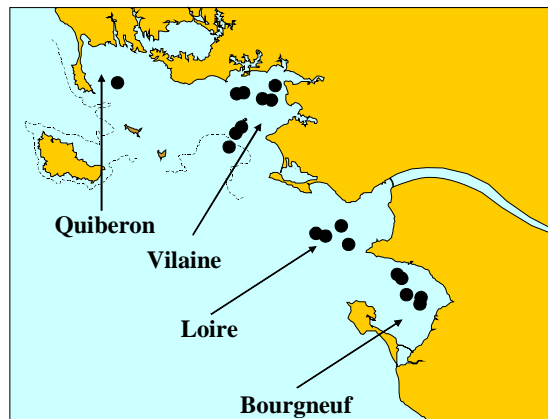


Figure II.5 : Localisation des traits de chalut contenant du fuel lors de la campagne Black 1

Site	Février 2000	Juillet 2000	Septembre 2000	Septembre 2001	Septembre 2002
Baie de Quiberon	g2 (6) g2-3 (4)	-	-	-	-
Baie de la Vilaine	g2 (10) g1 (s-o) (10) g2 (s-o) (10)	g1 (int) (10)	g1 (10)	g1 (10) g2 (10)	g1 (10) g2 (10)
Embouchure de la Loire	g1 (10) g2 (10)	g1 (10)	g1 (10)	g1 (10) g2 (8)	g1 (10) g2 (10)
Baie de Bourgneuf	g1 (10) g2 (10)	g1 (10)	g1 (10)	g1 (8) g2 (5)	g0 (7) g1 (10) g2 (10)
Pertuis Breton	g1 (10) g2 (10)	g1 (10)		g2 (8)	g2 (9)
Pertuis d'Antioche	-	g1 (10)	g1 (10)*	g1 (8)	g0 (6) g1 (10) g2 (8)
Ile d'Oléron (s-o)	-	-	-	g1 (7)	-
Estuaire de la Gironde	-	-	-	g1 (8)	g1 (10) g2 (7)

s-o: sud-ouest; int, ext : intérieur, extérieur de la baie; - : non échantillonné. Le nombre d'individus échantillonnés pour chaque groupe est indiqué entre parenthèses

Tableau II.1 : Récapitulatif des échantillonnages de soles réalisés le long de la côte Atlantique lors des 5 campagnes réalisées

1.1.2. Expérimentations en bassin :

Parallèlement à ces études de terrain, des expérimentations en bassin ont été réalisées au sein du laboratoire de G. Claireaux, dans le cadre du même projet ECTOPHY. L'objectif final de ces expérimentations est d'interpréter les altérations fonctionnelles causées par une exposition à du fuel en terme de performance écologique (fitness), ceci dans le but de mieux évaluer l'impact écologique d'une telle pollution dans l'environnement (Capuzzo, 1980; Connolly, 1991).

a) Exposition à du fuel lourd n°2 :

Des expérimentations ont été menées afin d'étudier le comportement et l'impact d'un fuel lourd n°2 fourni par le Cedre (Centre de Documentation, de Recherche et d'expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux) sur des soles en conditions contrôlées. Les soles ont été pêchées au chalut dans le Pertuis Breton. Les poissons ont ensuite été transférés au laboratoire dans un bassin d'élevage puis acclimatés durant trois semaines.

Les expérimentations se sont déroulées en intérieur sur une durée de cinq jours. Les animaux ont été répartis par groupes d'environ 40 individus dans des bassins de 500 l dont les

parois sont protégées par une bâche de polyéthylène et dont le fond est recouvert de sable. La contamination a été effectuée par déversement d'un volume de fuel donné en surface. Aucun brassage ou homogénéisation n'a été réalisé, hormis le bullage nécessaire à l'oxygénation de l'eau (Figure II.6). De plus, les poissons n'ont pas été nourris pendant l'expérimentation.



Figure II.6 : Exposition de soles en bassin à différentes concentrations de fuel lourd

Trois expérimentations ont été menées de cette façon à 6°C et à 15°C, à différentes concentrations (Tableau II.2). Lors de la dernière expérimentation, un second fuel (B) fourni par le Cedre a été utilisé pour remplacer le premier (A) épuisé.

Expérimentation	Date	Dose (v/v)	Nombre de soles	Taille (cm)	Température	Fioul utilisé	
I	03/2002	contrôle	10 (5m et 5f)	20±2 (g2)	6°C	A	
		1/2000	10 (5m et 5f)	19±1 (g2)			
		1/100	10 (5m et 5f)	20±1 (g2)			
II	05/2002	contrôle	10	16±4 (g1)	15°C	A	
		1/1000	10	15±4 (g1)			
		1/200	10	16±3 (g1)			
III	05/2003	1/2000	contrôle	8	13±1 (g1)	15°C	B
			3	26±1 (g2-3)			
			6	14±1 (g1)			
		1/200	3	25±1 (g2-3)			
			4	13±1 (g1)			
			3	26±1 (g2-3)			

m : mâle ; f : femelle ; g1, g2, g3 : groupes d'âge

Tableau II.2 : Récapitulatif des expérimentations réalisées avec du fuel lourd n°2

A la fin des expérimentations, des échantillons d'eau sont prélevés afin de déterminer les concentrations en HAP. Lors de la troisième expérimentation, du sable a également été échantillonné. Les poissons sont ensuite récupérés et disséqués selon le même protocole que lors des campagnes de terrain. L'azote liquide est ici remplacé par de la carboglace pour le stockage temporaire des échantillons à -80°C. Des prélèvements de sang ont été réalisés lors de la première expérimentation afin de disposer de plasma, stocké à -80°C (description du

protocole dans l'Annexe 9). De plus, une partie du foie a été stockée dans un tube eppendorf à -80°C lors de cette expérimentation. Les échantillons de plasma, vésicule biliaire et foie stockés à -80°C sont destinés au dosage des métabolites de HAP alors que les muscles et les foies stockés à -20°C sont destinés au dosage des HAP.

Lors de la première expérimentation, la contamination a été suivie d'une période de décontamination de 5 jours en eau non contaminée. Durant cette période, des prélèvements de vésicules biliaires ont été réalisés après 1, 2, 4 et 5 jours sur un individu à chaque temps.

La deuxième expérimentation consistait dans un premier temps à contaminer les soles sur une période de 5 jours puis à relâcher les groupes « contrôle » et « 1/200 » dans 2 bassins (marais) de manière aléatoire après marquage (pit tag) sur une durée de 3 et 6 mois pour étudier les effets à long terme de la contamination. Des soles ont ensuite été capturées dans les marais (Figure II.7) après 3 et 6 mois et disséquées afin de prélever des échantillons de vésicule biliaire, foie et muscle. L'eau de ces marais est renouvelée à chaque marée et la faune benthique naturellement présente couvre les besoins alimentaires des animaux (60 individus par bassin).

La quatrième expérimentation consistait à exposer des individus de groupes d'âge distincts afin d'évaluer d'éventuelles différences de biotransformation en fonction de l'âge.

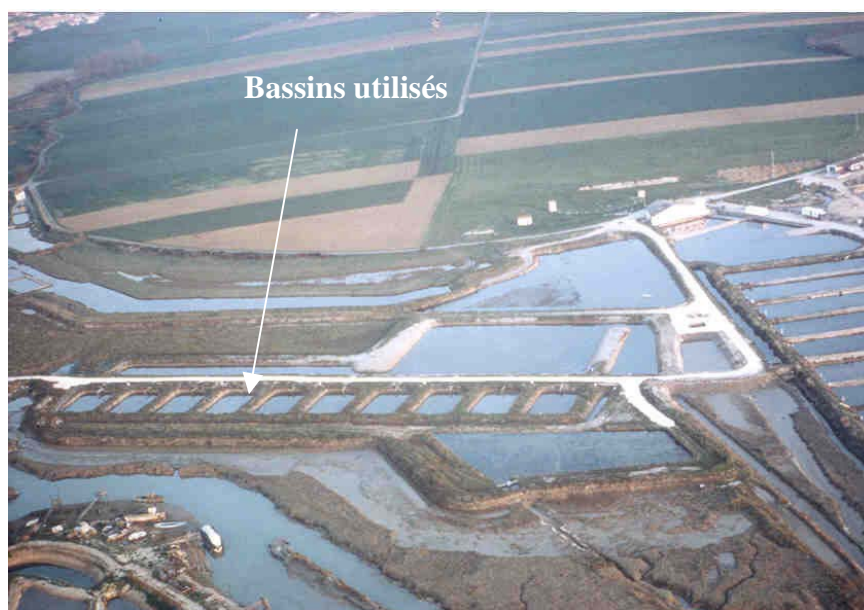


Figure II.7 : Localisation des bassins utilisés lors de la troisième expérimentation dans les marais de l'Houmeau

b) Exposition à des HAP individuels :

Une expérimentation visant à étudier la biotransformation de HAP individuellement au cours du temps a également été réalisée. Il s'agissait d'exposer des soles à une quantité donnée de HAP individuels de manière ponctuelle au temps $t=0$.

Les bassins de 500 l utilisés sont situés en extérieur (sous l'influence du vent, de la pluie et de la lumière ; Figure II.8). Les HAP choisis sont le phénanthrène, le fluoranthène et le pyrène en raison de leur présence en quantité importante dans les fuels ainsi que le benzo(a)pyrène en raison de sa toxicité.

Un contrôle (bassin avec de l'eau sans contamination) a également été réalisé en parallèle. L'expérimentation comprend 7 jours de contamination suivis d'une période de 7 jours de décontamination pendant laquelle les poissons restants sont transférés dans des bassins propres avec une alimentation d'eau en circuit ouvert.

La pêche et l'acclimatation des poissons se sont déroulées de manière identique à celles des précédentes expérimentations.

Préalablement à la contamination, le fond des bassins est recouvert de sable puis ceux-ci sont remplis par 100 l d'eau. La contamination en HAP individuel se fait par ajout de solutions contenant 100 µg de cristaux de HAP dissous dans 1 ml d'éthanol afin d'obtenir une concentration théorique de 1 µg/l. 36 individus sont ensuite disposés par bassin. Les poissons ne sont pas nourris durant l'expérimentation.

La totalité des prélèvements réalisés est résumée dans le Tableau II.3. Des prélèvements d'eau sont réalisés 2 heures (H2), 3 jours (J3) et 7 jours (J7) après la contamination afin de suivre la concentration en HAP dissous et particulaires dans l'eau. L'adsorption des HAP dans les sédiments est également suivie (prélèvements à J1, J3 et J7). Des prélèvements de muscles et de foies sont réalisés pour le dosage des HAP ainsi que de vésicules biliaires pour le dosage des métabolites aux temps J1, J3, J7 et Jd (Jd : après la période de décontamination de 7 jours). Pour cela, 9 soles sont disséquées à chaque temps et pour chaque bassin.

Bassin	Contamination	Temps de prélèvement des échantillons		
		Eau	Sédiment	Foie, bile, muscle
1	contrôle	H2, J3, J7	J1, J3, J7	J1, J3, J7, Jd
2	phénanthrène	H2, J3, J7	J1, J3, J7	J1, J3, J7, Jd
3	fluoranthène	H2, J3, J7	J1, J3, J7	J1, J3, J7, Jd
4	pyrène	H2, J3, J7	J1, J3, J7	J1, J3, J7, Jd
5	benzo(a)pyrène	H2, J3, J7	J1, J3, J7	J1, J3, J7, Jd

Tableau II.3 : Récapitulatif des expositions aux HAP individuels et des échantillonnages réalisés



Figure II.8 : Photographie des bassins extérieurs utilisés pour les expositions aux HAP individuels

1.1.3. Etude du traict du Croisic :

Suite à la marée noire consécutive au naufrage du pétrolier ERIKA, le site du traict du Croisic, situé entre l'estuaire de la Vilaine et celui de la Loire, a été particulièrement touchée par l'arrivée de nappes de pétrole sur ses côtes (Annexe 8). Le traict du Croisic est une région où les activités liées à la mer telles que le tourisme, la conchyliculture ou la production de sel jouent un rôle économique primordial. En effet, le traict abrite et alimente les marais salants de Guérande. Afin d'évaluer l'impact de la marée noire sur ce milieu, une expérimentation de caging utilisant des moules a été réalisée.

Les moules utilisées dans cette étude, considérées comme faiblement contaminées en HAP, ont été prélevées sur le site du Moulleau à l'entrée du bassin d'Arcachon, où deux espèces de moules semblent s'hybrider, *Mytilus edulis* (Figure II.9) et *Mytilus galloprovincialis*. La moule est un mollusque bivalve marin largement utilisé dans les études de surveillance de la contamination du milieu marin (le RNO, le Mussel Watch ou le programme européen BIOMAR « Biochemical Markers of Environmental Contamination in Marine Ecosystems »). Cet organisme est utilisé pour différentes raisons. Tout d'abord, il est présent en abondance tout au long de l'année dans la plupart des eaux côtières, ce qui facilite l'échantillonnage, le suivi et la comparaison géographique des études. De plus, ce sont des organismes invertébrés fixés filtreurs possédant de faibles capacités de biotransformation, permettant ainsi d'évaluer la biodisponibilité des contaminants en un site donné par la mesure de leur bioaccumulation dans les tissus. Ces organismes sont relativement tolérants vis-à-vis des milieux contaminés et de la transplantation. Enfin, leur exploitation à des fins de consommation confère aux études réalisées un intérêt sanitaire et commercial (Gosling, 1992; Dame, 1996).



Figure II.9 : *Mytilus Edulis*

Les moules prélevées sur le site du Moulleau ont été déposées dans des cages à différents endroits du traict du Croisic pour une durée d'environ 1 mois. Le schéma de principe de l'expérimentation est présenté sur la Figure II.10. Suite à cette exposition, le dosage des HAP dans les sédiments et dans les moules de ces sites ainsi que l'examen histologique des tissus de moules ont été réalisés. Pour le dosage des HAP (protocole analytique décrit dans la partie II.1), 10 moules entières (sans coquille) ont été congelées à -20°C, tout comme les sédiments. 4 moules entières (avec coquille) ont de plus été prélevées pour l'étude histologique, réalisée par S. Lemaire, selon le protocole présenté dans l'Annexe 10 afin de rechercher d'éventuelles perturbations structurales au sein des branchies, de l'estomac, de la glande digestive et des reins.

Entre les mois d'avril et juillet 2001, soit environ un an et demi après la marée noire, des moules mesurant entre 3,5 et 4,5 cm ont été prélevées chaque mois au Moulleau (Mou) (4 expositions). Après nettoyage des coquilles à l'aide d'un couteau pour éliminer les algues et les coquillages, les moules sont ramenées au laboratoire. Une partie d'entre-elles sont gardées afin de déterminer les indices de condition (longueur, poids total et poids des tissus humides)

puis les prélèvements nécessaires aux analyses sont réalisées. Les individus restants sont conservés durant la nuit dans trois seaux contenant de l'eau du Moulleau maintenue à 16°C avec oxygénation.

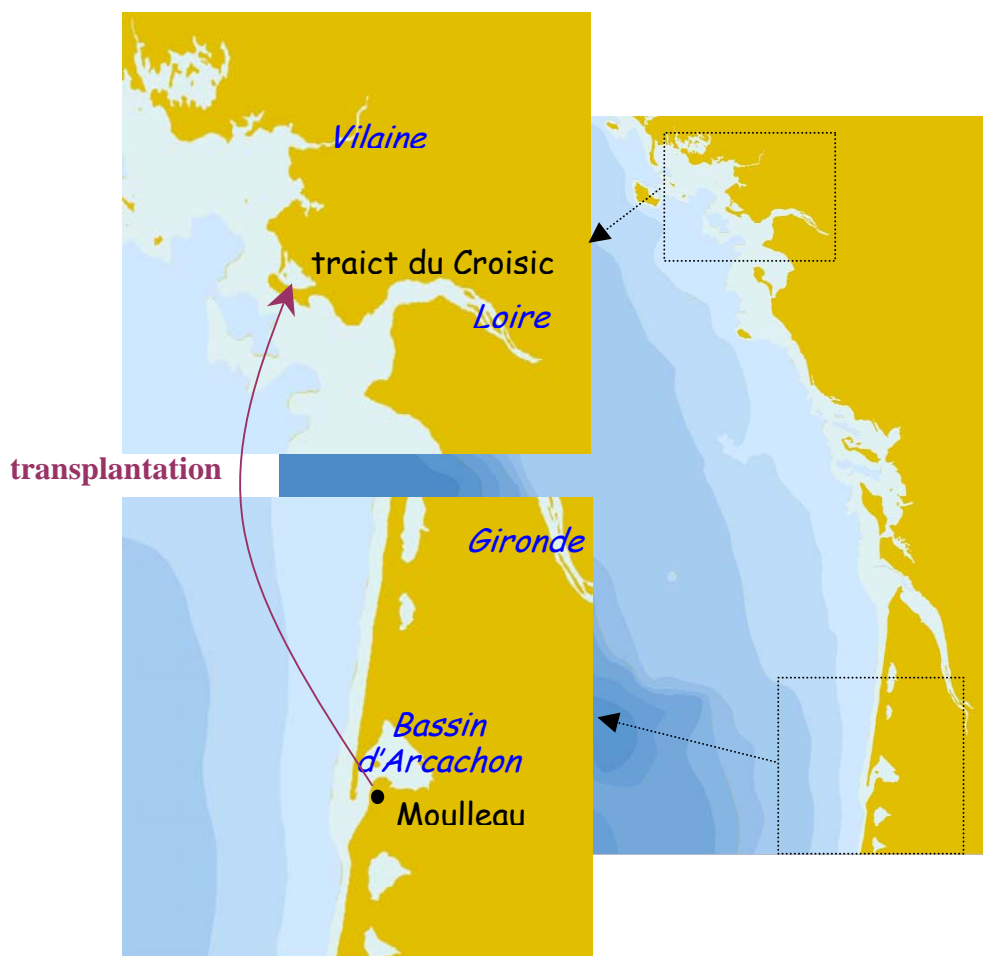


Figure II.10 : Schéma de l'expérimentation de caging entre le Moulleau et le traict du Croisic

Le lendemain, les moules conservées sont mises en cage en différents sites du traict du Croisic (Figure II.11). Une première cage est placée en pleine eau à l'entrée du traict, dans la zone nommée Pen Bron (Pen) alors que deux autres sont placées au fond du traict, à différentes entrées des marais salants, l'une à l'entrée de l'étier de Sibéron (Sib), situé dans le sud du traict, et l'autre à l'entrée de l'étier de Plinet (Pli), situé au milieu du traict. Lors de la première mission, la zone de Pen Bron étant interdite, la cage a été déposée à Lenclly (Len). Les cages de Plinet, Sibéron et Lenclly sont fixées sur le sédiment (plus ou moins vaseux) à l'aide d'une pierre. A chaque marée basse, la cage se trouve à découvert. Dans le site de Pen Bron, la cage étant attachée à une bouée fixe à quelques mètres de profondeur en pleine eau, celle-ci se trouve en permanence sous le niveau de l'eau. Après un mois, les cages sont récupérées. La deuxième exposition a duré 1 mois et demi, au lieu de 1 mois pour les autres.

Le récapitulatif des quatre missions est présenté dans le Tableau II.4. A la fin de la première mission, aucune moule vivante n'a été retrouvée dans la cage placée à Sibéron, sans doute en raison de l'envasement partiel de celle-ci. A la fin de la deuxième mission, la cage placée à Plinet n'a pas été retrouvée.

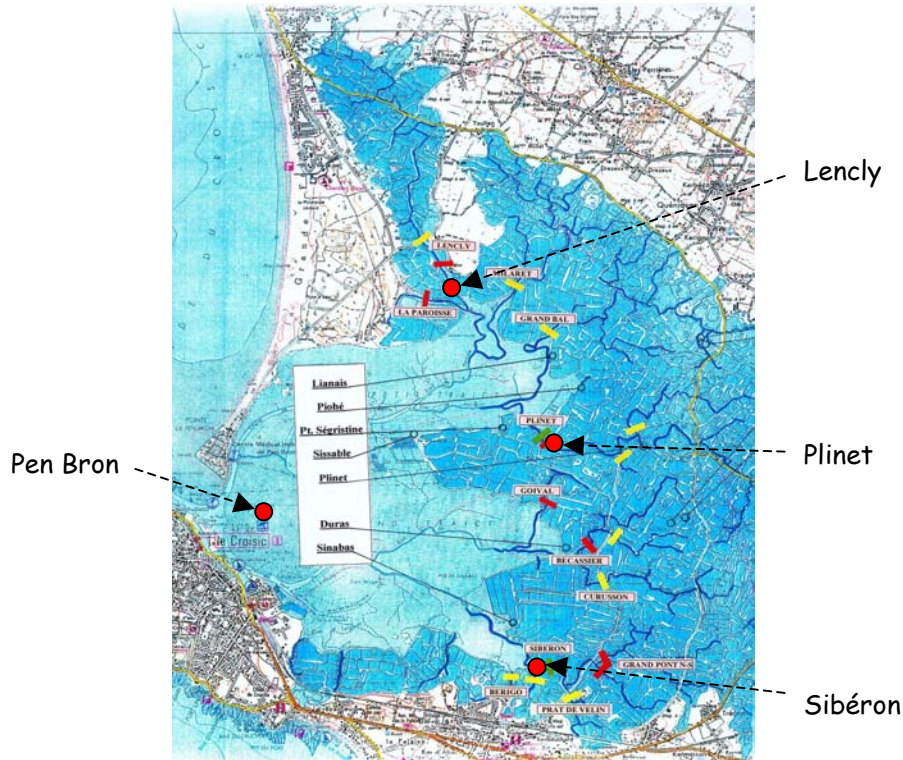


Figure II.11 : Localisation des sites de caging dans le traict du Croisic

Mission	Mou	Pli	Sib	Pen	Len
8-9 avril	1				
8-9 mai	2	1	1 : mortalité		1
24-25 juin	3	2 : perte	2	2	
23-24 juillet	4	3	3	3	
20-21 août		4	4	4	

Tableau II.4 : Récapitulatif des quatre missions de caging de moules réalisées au cours de l'année 2001 dans le Traict du Croisic

1.2. EXPERIMENTATION EN BASSIN :

Une expérimentation consistant à exposer des juvéniles de turbots et de morues à un pétrole brut de la mer du Nord, introduits sous forme dispersée dans la colonne d'eau, ainsi qu'à ce même pétrole en présence d'alkylphénols a été réalisée. Elle s'est déroulée au centre de recherche Rogaland (RF-Rogaland research, Stavanger, Norvège). Cette étude fait partie du projet européen BEEP (Biological Effects of Environmental Pollution in Marine Coastal Ecosystems).

Cette expérimentation a été réalisée afin d'étudier la biotransformation des HAP contenus dans un pétrole brut et l'effet des alkylphénols, qui sont des dérégulateurs endocriniens, sur celle-ci. Le mélange « pétrole-alkylphénols » a été choisi car, lors de l'extraction de pétrole sur les exploitations de gisements offshore, l'eau pompée avec le pétrole est généralement rejetée en surface alors qu'elle contient des quantités non négligeables d'alkylphénols. Il a ainsi été évalué à 44 tonnes la quantité d'alkylphénols rejetée de cette façon au niveau de la plaque continentale norvégienne en 2000 (Meier et al., 2002).

La morue (*Gadus morhua*; Figure II.12) est un poisson démersal, c'est-à-dire vivant à proximité du fond marin, bien qu'il adopte parfois un comportement pélagique. Ce poisson, de la famille des téléostéens, vit sur des fonds généralement compris entre 150 et 200 m de profondeur, sur des fonds aussi bien sablo-vaseux que rocheux (Bellail, 2002). On le trouve en Atlantique nord, en mer de Norvège, en mer Baltique et dans l'océan glacial Arctique (Figure II.13). La morue, de croissance relativement rapide, se nourrit de bivalves, de crustacés et de poissons et atteint de 50 à 90 cm à l'âge adulte. C'est l'un des poissons les plus importants du point de vue du commerce mondial (FAO, 2000-2003). Sa surexploitation est telle que la biomasse du stock d'individus matures de mer du Nord a atteint son niveau le plus bas en 2001 (Figure II.14; EEA, 2002).



Figure II.12 : La morue *Gadus morhua*



Figure II.13 : Répartition de la morue dans l'océan mondial (FAO, 2000-2003)

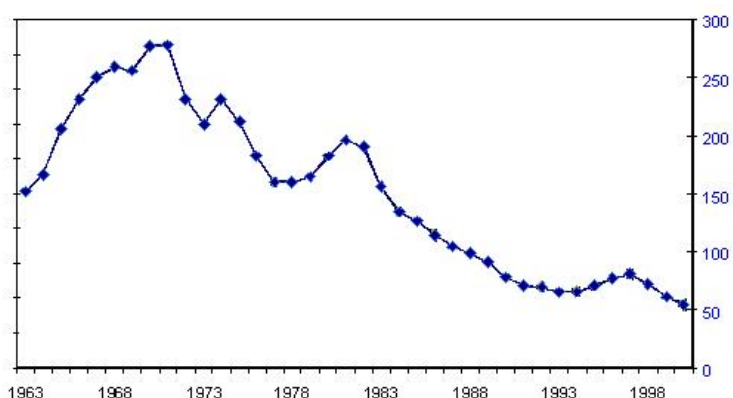


Figure II.14 : Evolution de la biomasse féconde de morues (milliers de tonnes) en mer du Nord (EEA, 2002)

Le turbot (*Scophthalmus maximus*; Figure II.15) est un poisson plat de 30 à 50 cm à l'âge adulte. Il se nourrit majoritairement de petits poissons, mais peut également ingérer des

crustacés et des mollusques. On le retrouve majoritairement sur la façade ouest européenne, de la Norvège à Gibraltar, ainsi qu'en mer du Nord, Baltique, Méditerranée et mer Noire. Il vit dans des eaux de 10 à 200 m de profondeur sur des fonds sableux ou rocheux. Il s'agit d'un poisson d'intérêt commercial important en raison de sa chair réputée.



Figure II.15 : Le turbot *Scophthalmus maximus*

Ces deux espèces ont été choisies en raison de leur importance commerciale et de leur présence en mer du Nord et en mer de Norvège où sont situées de nombreuses exploitations pétrolières offshore. Les morues, provenant de la station de Øygarden de l'IMR (Institute of Marine Research, Norvège) et les turbots sont acclimatés dans de grands bassins pendant 2 semaines puis transférés dans des bassins d'expérimentation 4 jours avant le début de la contamination. Les poissons sont nourris avec de la nourriture lyophilisée (dried pellets, Felleskjøpet Fiskefor AS, Norvège) hormis la dernière semaine afin d'éviter toute excrétion de bile. Après 3 semaines d'exposition, des prélèvements de bile, stockés à -80°C , ont été réalisés sur 10 turbots et 5 morues par exposition pour le dosage des métabolites de HAP. L'expérimentation s'est déroulée à une température variant entre 10 et 12°C et à une salinité de 34‰.

Les expositions se sont déroulées selon le schéma présenté sur la Figure II.16. La dispersion du pétrole dans l'eau est réalisée mécaniquement par une soupape de mélange et une hélice Dispax® (IKAMaschinenbau; Janke & Kunkel GmbH, Allemagne).

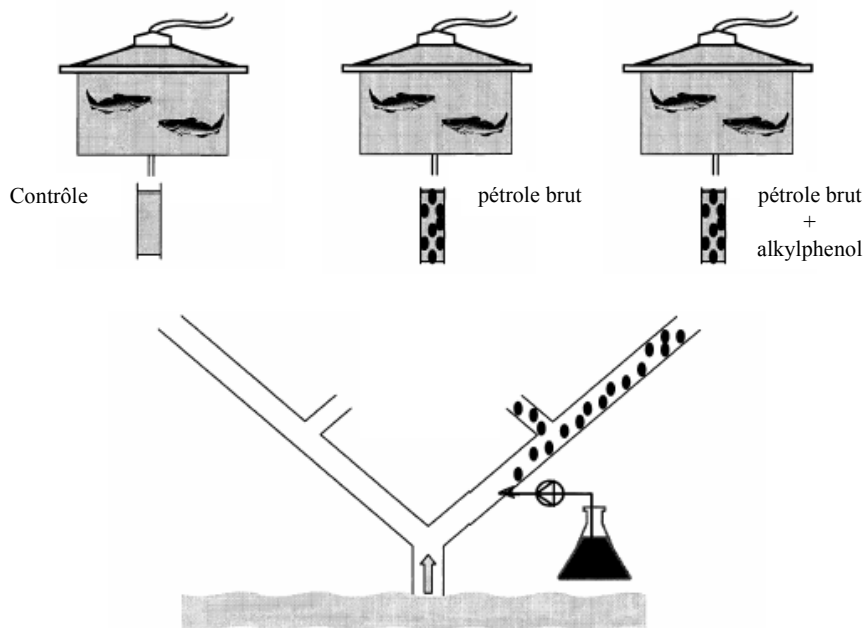


Figure II.16 : Schéma du dispositif de contamination des morues et des turbots

1.3. ESTUAIRE DE LA SEINE :

L'estuaire de la Seine est à l'interface entre différents bassins versants et la baie de Seine. Ses caractéristiques physiques se sont vues profondément modifiées par l'activité humaine au cours des 150 dernières années (Guézennec, 1999; Dauvin, 2002). Il présente des niveaux de contamination chimique très importants (Galgani et al., 1991; Jaouen et al., 1999; Abarnou et al., 2000) dont les HAP constituent l'une des principales familles (Claisse, 1989; Fernandes et al., 1997; Tronczynski, 1999). Ces niveaux s'expliquent par la présence d'importants ports comme Le Havre ou Rouen ainsi que de nombreux sites industriels dont des usines pétrolières. 40% de l'activité économique française est ainsi localisée sur son bassin versant, ce dernier représentant 50% des transports fluviaux français (Rapport d'avancement du programme Seine-Aval, 2002). Parallèlement, une faible biodiversité des espèces de poissons a été observée dans l'estuaire (Dauvin, 2002; <http://seine-aval.crihan.fr/>, 19 novembre 2003). Il apparaît donc important d'évaluer l'impact de la contamination en HAP sur les poissons peuplant ce milieu.

Des prélèvements de poissons ont ainsi été réalisés à l'embouchure de l'estuaire (site de La Fosse) afin d'effectuer des dosages de HAP dans les tissus et de métabolites de ceux-ci dans la bile. Le flet (*Platichthys flesus*; Figure II.17) a été choisi comme organisme cible en raison de son abondance dans l'estuaire, assurant ainsi un échantillonnage satisfaisant. Il s'agit d'un poisson plat démersal se nourrissant de petits poissons, de mollusques, de vers, d'annélides et de pectinaires. Il se reproduit vers le mois de février sur des fonds de 30 à 40 m au large de l'estuaire. Les larves pélagiques rejoignent ensuite l'estuaire en mars-avril avant la métamorphose en juvéniles benthiques. Celles-ci se développent ensuite rapidement dans l'estuaire (pendant un à deux ans) sur des fonds sablo-vaseux. L'individu adulte atteint une taille d'environ 50 cm et vit sur des fonds de 1 à 100 m (Masson, 1981 et 1984; Abarnou et al., 2000; www.ifremer.fr).

Cette étude fait partie du programme Seine-Aval dont le but est de faciliter la compréhension de l'estuaire de la Seine.



Figure II.17 : Le flet *Platichthys flesus*

Des prélèvements ont également été réalisés sur trois autres sites pour comparaison (Figure II.18). Le site le plus proche de l'embouchure de la Seine est celui nommé Antifer, situé dans le nord de la baie de Seine, à proximité d'un terminal pétrolier. Le site de Lesconil, localisé dans l'estuaire du Ster, en sud Bretagne, et considéré comme faiblement contaminé en HAP, a été choisi comme site contrôle. Enfin, des prélèvements de flets ont été effectués dans l'estuaire de la Gironde afin de comparer les niveaux mesurés dans l'estuaire de la Seine avec ceux d'un autre fleuve français, la Garonne, considérée comme modérément contaminée en HAP (Budzinski et al., 1997).

Les dates de prélèvement ainsi que les longueurs moyennes des poissons sont résumées dans le Tableau II.5. En raison de l'importante dispersion des tailles de poissons pêchés en

février 2003 pour le site de La Fosse, les flets ont été séparés en deux groupes correspondant aux individus de petite taille (1) et de grande taille (2) (Tableau II.5).

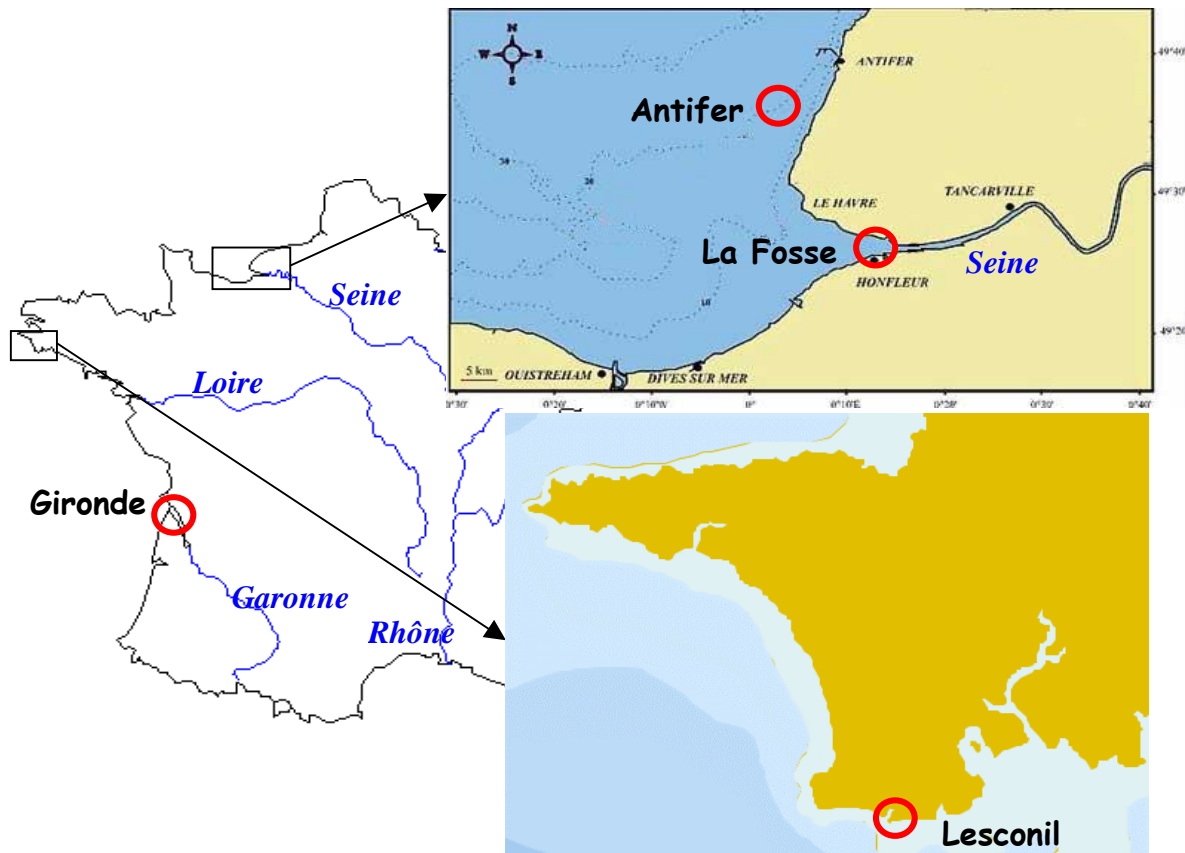


Figure II.18 : Localisation des sites de prélèvement de flets

Site	Date	Nombre d'individus	Longueur (cm)
	5/04/2002	10	30 ± 2
La Fosse (embouchure de la Seine)	18/06/2002	10	21 ± 3
	17-18/09/2002	4	29 ± 7
	17-18/02/2003	10 ^a	25 ± 3 ^a
		10 ^b	34 ± 3 ^b
Lesconil (estuaire du Ster)	05/2002	10	21 ± 3
	31/01/2003	10	35 ± 3
Antifer	16/11/2002	10	32 ± 2
Estuaire de la Gironde	31/01/2003	10	25 ± 2

1 : classe de taille la plus petite ; 2 : classe de taille la plus grande

Tableau II.5 : Récapitulatif des échantillonnages de flets

2. DOSAGE DES COMPOSES ETUDIÉS

Afin d'être dosé, tout composé doit être détecté par un appareillage permettant sa détection quantitative. De plus, en raison de la sélectivité limitée des détecteurs, les différents composés à analyser doivent être préalablement séparés.

Qu'il s'agisse des HAP ou bien des métabolites de HAP, le mode de détection qui a été utilisé dans le cadre de ce travail est la spectrométrie de masse. Ce détecteur a été choisi car il permet la détection sélective de toute molécule ionisable ainsi qu'une identification fiable des composés par leur spectre de masse. La chromatographie en phase gazeuse (CPG), offrant une capacité importante de séparation, a pu être utilisée en couplage avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) en raison du caractère suffisamment volatil des molécules étudiées. La chromatographie en phase liquide haute-performance (CLHP) a également été utilisée pour le dosage des métabolites de HAP.

Différentes étapes de préparation de l'échantillon ont été nécessaires afin de réaliser une quantification correcte. Les composés doivent être solubilisés dans un solvant organique afin d'être injectés dans le système. Une étape d'extraction des composés de la matrice solide ou aqueuse doit pour cela être réalisée. De plus, en raison de leur présence à l'état de traces dans les échantillons naturels, les composés à détecter doivent être concentrés au cours du protocole analytique. Enfin, les échantillons analysés étant souvent complexes (présence de pigments, lipides, ...), une étape de purification est nécessaire afin d'éliminer les composés interférents non séparés, par chromatographie en phase gazeuse ou liquide, de ceux à doser.

La méthode de quantification par étalonnage interne a été choisie pour les HAP ainsi que pour leurs métabolites car elle permet une quantification juste et précise.

2.1. DOSAGE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES :

Outre les HAP parents, des HAP alkylés et des composés aromatiques soufrés ont été dosés dans différents types de matrices selon les protocoles décrits dans cette partie et résumés sur la Figure II.19. La liste exhaustive des composés dosés est présentée dans l'Annexe 11. Le dibenzothiophène, composé aromatique hétérocyclique contenant un atome de soufre, a également été étudié ainsi que les HAP alkylés de certains composés comme le naphthalène (de mono- à tétra-substitués), le phénanthrène (de mono- à tri-substitués), le chrysène (mono-substitués) ainsi que le dibenzothiophène (mono- et di-substitués). Les étalons internes deutérés utilisés sont également précisés et sont généralement les homologues deutérés des HAP natifs. Les HAP n'ayant pas d'homologue deutéré sont quantifiés par rapport à l'étalon interne le plus proche structurellement (celui qui les précède dans le tableau de l'Annexe 11).

Toute la verrerie utilisée au cours de l'analyse des HAP est préalablement lavée à l'eau et au détergent (RBS 25 MD, Chemical products, Frelinghien, France) puis calcinée à 450°C pendant 6 h afin d'éliminer toute trace organique. Pour éviter toute contamination, il existe différents jeux de verrerie dédiés selon le niveau de contamination des matrices (eaux, tissus biologiques et sédiments, pétroles).

2.1.1. Préparation des échantillons :

Afin de subir le protocole analytique, les différents échantillons doivent être préparés. Les eaux sont filtrées par passage sur filtre GFF Whatman de 0,7 µm (VWR, Strasbourg, France) afin de retenir les particules en suspension et de doser séparément les HAP dissous et

particulaires. Les sédiments, les particules et les tissus biologiques subissent une première étape de lyophilisation afin de les déshydrater (lyophilisateur RP2V, CIRP, Argenteuil, France). Les sédiments sont ensuite tamisés à 2 mm et les tissus biologiques sont broyés. Les pétroles sont dissous dans du dichlorométhane.

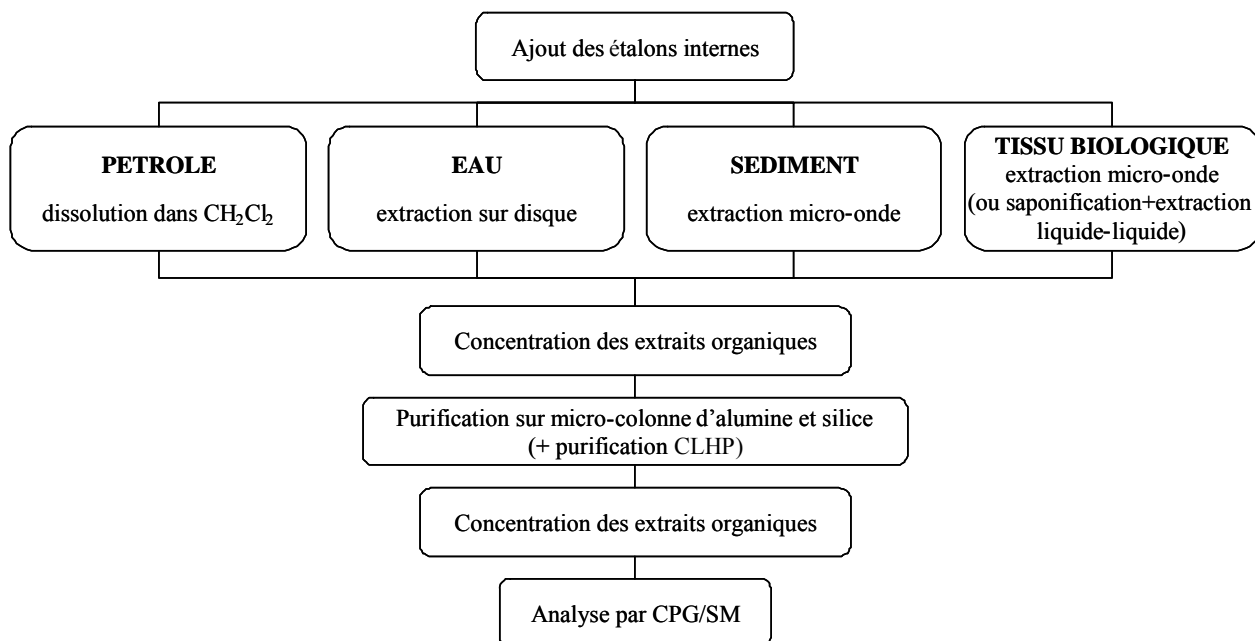


Figure II.19 : Protocoles analytiques permettant le dosage des HAP dans les différentes matrices étudiées

2.1.2. Introduction des étalons internes :

Les étalons internes introduits au tout début du protocole sont des HAP perdeutérés. Ils ont été choisis pour quantifier les HAP en raison de leurs propriétés physico-chimiques très proches (Baumard et Budzinski, 1997; Baumard et al., 1997). Leur comportement au cours du protocole est donc très semblable à celui des composés à doser et permet de compenser les pertes absolues provoquées par celui-ci. Le volume de solution d'étalons internes ajouté est contrôlé par gravimétrie, assurant ainsi une bonne précision de la quantité d'étalon introduite. Le mélange d'étalons est préparé dans l'isooctane. Dans le cas des eaux, les étalons internes sont dissous dans un petit volume d'éthanol (500 μ l) avant d'être introduits dans l'échantillon afin d'assurer une bonne miscibilité des composés dans le volume d'eau à analyser.

Deux HAP perdeutérés supplémentaires sont ajoutés à l'extrait organique juste avant analyse afin de contrôler le rendement des étalons internes. Il s'agit du pyrène d10 et du benzo(b)fluoranthène-d12, composés absents de la solution d'étalons internes introduite en début de protocole. Les étalons servant à quantifier les composés à doser ainsi que ceux servant à contrôler les rendements sont résumés dans le Tableau II.6. La liste complète des composés ainsi que leur abréviation est présentée dans l'Annexe 11.

Composé	Etalon interne	
	quantification	contrôle
Naphtalène	Naphtalène-d8	Pyrène-d10
Alkyl-naphtalènes	Naphtalène-d8	Pyrène-d10
Acénaphthylène	Naphtalène-d8	Pyrène-d10
Biphényle	Naphtalène-d8	Pyrène-d10
Acénaphène	Naphtalène-d8	Pyrène-d10
Fluorène	Naphtalène-d8	Pyrène-d10
Dibenzothiophène	Dibenzothiophène-d8	Pyrène-d10
Alkyl-dibenzothiophènes	Dibenzothiophène-d8	Pyrène-d10
Phénanthrène	Phénanthrène-d10	Pyrène-d10
Alkyl-phénanthrènes	Phénanthrène-d10	Pyrène-d10
Anthracène	Phénanthrène-d10	Pyrène-d10
2-méthylanthracène	Phénanthrène-d10	Pyrène-d10
Fluoranthène	Fluoranthène-d10	Pyrène-d10
Pyrène	Fluoranthène-d10	Pyrène-d10
Chrysène + Triphénylène	Chrysène-d12	Pyrène-d10
Méthylchrysènes	Chrysène-d12	Pyrène-d10
Benz(a)anthracène	Chrysène-d12	Pyrène-d10
1,2-benzonaphtothiophène	Chrysène-d12	Pyrène-d10
2,3-benzonaphtothiophène	Chrysène-d12	Pyrène-d10
Benzo(a)fluoranthènes	Benzo(e)pyrène-d12	Benzo(b)fluoranthène-d12
Benzo(e)pyrène	Benzo(e)pyrène-d12	Benzo(b)fluoranthène-d12
Pérylène	Benzo(e)pyrène-d12	Benzo(b)fluoranthène-d12
Benzo(a)pyrène	Benzo(a)pyrène-d12	Benzo(b)fluoranthène-d12
Benzo(g,h,i)pérylène	Benzo(g,h,i)pérylène-d12	Benzo(b)fluoranthène-d12
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	Benzo(g,h,i)pérylène-d12	Benzo(b)fluoranthène-d12
Dibenz(a,h)anthracène + Dibenz(a,h)anthracène	Benzo(g,h,i)pérylène-d12	Benzo(b)fluoranthène-d12

Tableau II.6 : Liste résumée des composés dosés ainsi que des étalons internes utilisés pour les quantifier et de ceux servant à contrôler les rendements du protocole

2.1.3. Extraction :

a) Extraction des HAP dissous dans l'eau :

Il s'agit d'une extraction sur phase solide (SPE). Un disque greffé de molécules de type octadécyle (Speedisk expanded extraction station C₁₈, Baker, Atlantic Labo, Floirac, France) permet la rétention des HAP dissous lors du passage de l'eau au travers de celui-ci.

Afin d'optimiser l'extraction, le disque est préalablement conditionné par 60 ml de dichlorométhane Ultra Resi-Analysed (Atlantic Labo, Floirac, France) puis 60 ml de méthanol Suprasolv (VWR, Strasbourg, France), 10 ml d'acétate d'éthyle Multisolvent Scharlau (ICS Nationale, Belin Beliet, France), 10 ml de méthanol et enfin 10 ml d'eau ultrapure Milli-Q (désionisation par cartouche SP15 Aquadem et passage sur système Milli-Q Plus avec pack QPAK₂ (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France)). L'échantillon d'eau est percolé sur le disque qui est ensuite séché en tirant sous vide durant 5 minutes. Les HAP sont récupérés par élution avec du dichlorométhane (2*5 ml), un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle 50/50 v/v (3*3 ml) et à nouveau du dichlorométhane (3*5 ml). Les traces d'eau contenues dans l'extrait obtenu sont éliminées par filtration sur Na₂SO₄ anhydre (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Falavier, France).

b) Extraction micro-ondes des matrices solides :

Les HAP contenus dans les sédiments et les tissus biologiques (foie et muscle de poisson) sont extraits par application d'un champ micro-ondes en présence de dichlorométhane (30 ml) (Budzinski et al., 1995b, 1996, 1999; Letellier, 1998; Letellier et al., 1997, 1999a et b, Letellier et Budzinski, 1999). Une rotation des molécules de solvant va alors se produire afin de s'aligner suivant le champ micro-ondes provoquant une agitation (énergie vibrationnelle et rotationnelle des molécules) et un chauffage de l'extrait. L'extracteur micro-ondes (Figure II.20; Prolabo, Fontenay-sous-bois, France) est programmé pour produire un champ micro-ondes d'une puissance de 30 W pendant 10 min. Les HAP sont ainsi transférés de la matrice au solvant et l'extrait organique est définitivement séparé de la matrice par filtration sur coton de verre (VWR, Strasbourg, France).

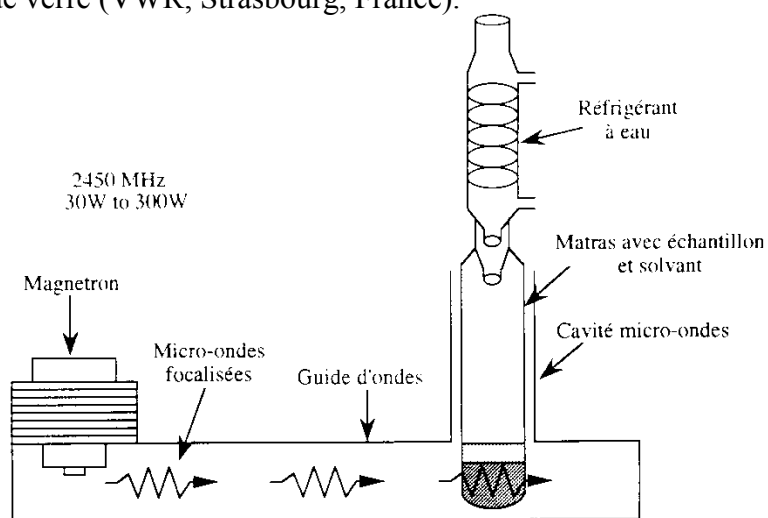


Figure II.20 : Schéma de l'extracteur micro-ondes Maxidigest MX 4350

c) Extraction liquide-liquide :

Une extraction liquide-liquide est effectuée dans le cas de matrices biologiques particulièrement riches en lipides (Baumard et al., 1997b) après avoir réalisé une saponification (§ II.2.1.5). Après saponification, l'échantillon est transféré dans une ampoule à décanter afin de réaliser une extraction liquide-liquide à l'aide de pentane (3*30 ml). On neutralise ensuite l'extrait organique par ajout d'eau milli-Q (x*40 ml) dans l'ampoule à décanter et agitation. Les traces d'eau contenues dans l'extrait obtenu sont éliminées par filtration sur Na_2SO_4 .

2.1.4. Concentration :

Les extraits organiques obtenus sont ensuite concentrés à l'évaporateur rotatif puis sous flux d'azote afin d'obtenir un volume de 500 μl .

2.1.5. Purification :

a) Chromatographie en phase liquide sur colonnes d'alumine et de silice :

La purification des extraits organiques est réalisée par chromatographie en phase liquide sur micro-colonnes ouvertes d'alumine et de silice (Béhar et al., 1989; Baumard et al., 1997;

Mazéas et Budzinski, 2002). L'alumine et la silice (VWR, Strasbourg, France) sont préalablement lavées trois fois par extraction aux ultra-sons à l'aide de dichlorométhane. Les phases chromatographiques sont ensuite conditionnées et stockées à 150°C.

L'alumine (aluminium oxide 150 basic type T; 0,063-0,2 mm) est introduite dans une micro-colonne de verre puis conditionnée par 5 ml de dichlorométhane. L'extrait organique (500 µl) est ensuite déposé en tête de colonne puis élué à l'aide de dichlorométhane (3*5 ml). Les macromolécules et les composés polaires restent piégés sur l'alumine alors que les hydrocarbures sont récupérés dans l'éluat. Dans le cas des sédiments, du cuivre (40 mesh, 99,5 % de pureté, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) préalablement activé avec de l'acide chlorhydrique (7N), est introduit dans la colonne afin de piéger le soufre élémentaire présent par complexation (Wise et al., 1995; Budzinski et al., 1997; Baumard et al., 1998c; Mazéas et Budzinski, 2002).

Après concentration sous flux d'azote de l'extrait précédemment obtenu et remplacement du dichlorométhane par de l'isooctane, une purification sur micro-colonne de silice (Silica gel 60; 0,063-0,2 mm) est réalisée. La silice est tout d'abord conditionnée par du n-pentane (5 ml) puis l'extrait est déposé en tête de colonne. Les hydrocarbures saturés, interférant avec les HAP par CPG/SM (Huynh et Vu Duc, 1984), sont éliminés à l'aide de n-pentane (2 ml). Les HAP sont ensuite élués avec un mélange de n-pentane/dichlorométhane (65/35, v/v; 3*5 ml).

b) Chromatographie liquide haute-performance (CLHP) :

Une purification CLHP est parfois nécessaire afin d'éliminer les interférents matriciels dans le cas de matrices biologiques particulièrement complexes (Baumard et al., 1998a). Elle permet de réduire l'importance de la matrice complexe non résolue éliminant ainsi les interférents. Cette purification est réalisée sur une colonne Rainin Microsorb-MV remplie d'une phase de silice greffée aminosilane (NH₂, 5 µm, 250*10 mm; Interchim, Montluçon, France) à l'aide de n-pentane (Budzinski et al., 1993c).

c) Saponification :

Dans le cas de matrices biologiques particulièrement riches en lipides, une saponification est parfois nécessaire afin d'éliminer des interférents (Baumard et al., 1998a). Cette digestion se fait par chauffage à reflux d'un mélange constitué de l'échantillon auquel est ajoutée une solution d'hydroxyde de potassium (2N; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Falavier, France) éthanolique (60 ml) pendant 4 h. Cette étape est suivie d'une extraction liquide-liquide (§ II.2.1.3).

2.1.6. Analyse par couplage CPG/SM :

Après concentration des extraits obtenus et ajout par gravimétrie des 2 composés perdeutérés permettant le contrôle du rendement des étalons internes, les extraits sont analysés par CPG/SM afin de doser les HAP.

a) Description de l'analyse :

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse permet la séparation et la détection des composés ainsi que leur identification. Les principes

de fonctionnement d'un CPG/SM sont décrits dans l'Annexe 12. On obtient ainsi un chromatogramme de l'extrait injecté et les spectres de masse correspondant aux molécules, suffisamment volatiles et ionisables, dans la gamme de masse de l'appareil, présentes dans celui-ci. Les paramètres d'analyse des HAP sont présentés dans l'Annexe 13. La détection des différents HAP parents quantifiés lors de ce travail et des étalons internes a été réalisée en utilisant la masse moléculaire de chaque composé (Annexe 11) en raison de la faible fragmentation des ions moléculaires.

Deux exemples de chromatogrammes sont présentés dans l'Annexe 14. Celui obtenu pour l'analyse (A) d'un sédiment (SRM 1941a : sédiment de voie navigable entre l'état de New York et celui du New Jersey) et (B) d'un pétrole brut (SRM 1582). L'identification des différents HAP parents est également présentée. L'identification des dérivés alkylés est décrite dans l'Annexe 15. Un SRM (Standard Reference Material) est un échantillon naturel dont les concentrations en composés donnés sont certifiées.

b) Méthode de quantification :

La méthode de quantification retenue ici est celle de l'étalonnage interne. Elle procède par comparaison de l'aire du pic du composé étudié avec celle du pic de l'étalon interne rajouté au début de la manipulation en quantité connue (cf § II.1.2).

Les composés choisis doivent répondre à plusieurs conditions pour être utilisés comme étalons internes. Ils doivent présenter des propriétés physico-chimiques proches des composés à doser afin de compenser au mieux les pertes absolues intervenant lors des différentes étapes de traitement des échantillons. De plus, ces composés doivent être chimiquement stables, avoir sensiblement les mêmes temps de rétention que les composés à doser (Boyd, 1993) et ne pas être présents naturellement dans les échantillons à analyser. Les homologues perdeutérés des HAP remplissent ces critères et ont donc été utilisés comme cela est indiqué dans l'Annexe 11. Pour réaliser une quantification correcte, un HAP perdeutééré doit être utilisé par classe d'aromaticité (Baumard, 1997; Baumard et al., 1997).

Le composé à doser et l'étalon interne servant à le quantifier ne répondant pas de la même façon lors de la détection par spectrométrie de masse, il est nécessaire de déterminer un coefficient de réponse (coefficient correctif) entre ces deux composés. Cette détermination est réalisée par l'injection, avant et après chaque série d'analyse d'environ 10 échantillons, d'un mélange constitué d'une solution de composés non deutérés en concentrations connues et de la solution d'étalons internes utilisée.

c) Validation des analyses :

Afin de valider les analyses de HAP réalisées, un blanc de manipulation est effectué à chaque série d'analyse afin de tenir compte d'éventuelles contaminations lors de l'application du protocole. De plus, les étalons internes ajoutés en fin de manipulation permettent de vérifier le rendement de récupération des étalons internes ajoutés en début de manipulation.

Les protocoles analytiques décrits ont enfin été appliqués à différentes matrices certifiées (triplicat) : un pétrole brut, le SRM 1582, un sédiment marin, le SRM 1944, et un échantillon de moule, le SRM 2977 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA). Les rendements obtenus (Annexe 16), compris entre 81 et 124% pour le pétrole, entre 74 et 126% pour le sédiment et, entre 71 et 126% pour l'échantillon de moule, montrent une justesse satisfaisante du protocole dans ce domaine d'analyse. Les écarts types obtenus, du même ordre de grandeur que ceux certifiés, montrent la bonne répétabilité des manipulations.

2.2. DOSAGE DES METABOLITES DE HAP (PUBLICATION 2) :

Les métabolites de HAP dosés dans cette étude sont des HAP monohydroxylés, représentés dans la Figure II.21.

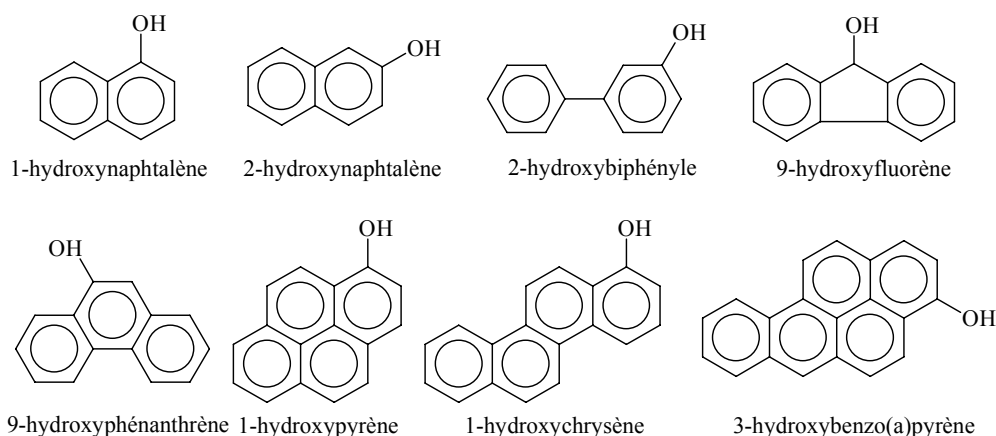


Figure II.21 : Formule des métabolites de HAP étudiés (un seul hydroxyphénanthrène est représenté)

Le protocole mis au point pour le dosage de ces molécules dans les matrices liquides est résumé sur la Figure II.22. Les principes de l'étalonnage interne et du couplage CPG/SM sont expliqués dans la partie II.1.

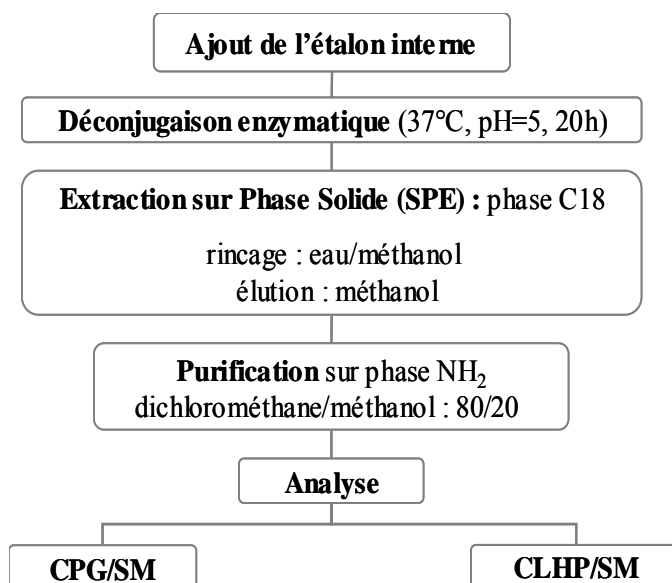


Figure II.22 : Protocole de dosage des métabolites de HAP dans les matrices liquides

2.2.1. Préparation de l'échantillon :

Les vésicules biliaires de poissons, conservées à -80°C , sont décongelées. La bile est ensuite récupérée dans un flacon en verre préalablement taré par perçage de la vésicule à l'aide d'une pince de dissection. La quantité de bile analysée (environ $100\ \mu\text{l}$) est donc contrôlée par gravimétrie. Les échantillons de plasma sont également décongelés puis pesés dans un flacon en verre. Un flacon en verre est utilisé afin d'éviter les phénomènes d'adsorption sur paroi des composés.

2.2.2. Etalonnage interne :

Ici, un seul étalon interne est ajouté en début de protocole en raison d'un choix limité dans le commerce de la classe de composés choisis comme étalon interne. Il s'agit de l'homologue deutéré du 1-hydroxypyrene, le 1-hydroxypyrene-d9 (seul l'hydrogène de la fonction alcool est conservé). La solution mère de 1-hydroxypyrene-d9 mère est préparée dans le méthanol puis une solution fille diluée dans l'eau est utilisée pour l'étalonnage interne.

2.2.3. Déconjugaison enzymatique :

Des enzymes sont ajoutées à l'échantillon afin de convertir les métabolites conjugués présents dans les échantillons en HAP hydroxylés. On utilise un mélange composé de β -glucuronidase et d'aryl-sulfatase (20 μ l pour 100 μ l de bile), 100000 et 7500 unités/ml respectivement, extraits de l'organisme *Haelix pomatia* (HP-2, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). On ajoute également 20 μ l d'un antioxydant, le β -mercaptoéthanol, pour éviter toute oxydation des métabolites au cours du protocole analytique. Pour optimiser l'activité des enzymes, du tampon acétate (acétate de sodium trihydrate 99% (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) et acide acétique 100% Normapur (VWR, Strasbourg, France)) à pH 5 est ajouté à l'échantillon et les flacons sont placés dans un incubateur à une température de 37°C pendant 20 heures (Solbakken et al., 1980a; Varanasi et Gmur, 1981; Krahn et al., 1984; Escartín et Porte, 1999a).

2.2.4. Extraction :

Lorsque la déconjugaison est terminée, des cartouches SPE octadécyle Bakerbond (Atlantic Labo, Floirac, France) sont conditionnées avec du méthanol (2 ml) puis de l'eau (4 ml). Les flacons sont sortis de l'incubateur et passés aux ultra-sons afin d'éliminer d'éventuels phénomènes d'adsorption aux parois. Les échantillons sont transférés dans des tubes à centrifugation afin d'être centrifugés à 5000g pendant 5 minutes. Le surnageant est récupéré et on répète une seconde fois la centrifugation après ajout d'eau (2 ml).

Les surnageants récupérés sont ensuite regroupés et déposés en tête de colonne SPE et entraînés sur la phase à un débit de 2 ml/min. Les métabolites sont retenus sur la phase et la matrice est éliminée. La cartouche est alors rincée par de l'eau (2 ml) puis par un mélange eau/méthanol 70/30, v/v (2 ml) afin d'éliminer les molécules hydrophiles et les molécules faiblement polaires. Les cartouches sont ensuite lyophilisées afin d'éliminer toute trace d'eau puis les métabolites sont élués à l'aide de méthanol (6 ml). Les extraits sont ensuite évaporés à sec sous flux d'azote et repris dans 500 μ l d'un mélange dichlorométhane/méthanol (80:20, v/v).

Dans le cas des échantillons de foie, une extraction assistée par micro-ondes (10 min; 30 W) dans un mélange tampon acétate pH 5/méthanol 4/5, (v/v) est tout d'abord réalisée. Une étape préalable d'homogénéisation des échantillons dans du tampon acétate à pH 5 est réalisée à l'aide d'un ultra-turrax.

2.2.5. Purification :

Des cartouches remplies de phase NH₂, Supelclean LC-NH₂ (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Falavier, France), sont conditionnées par 3 ml d'un mélange dichlorométhane/méthanol (80:20, v/v). Les extraits organiques sont ensuite déposés en tête de colonne et élués

avec le même mélange. Les HAP hydroxylés sont élués alors que les composés plus polaires sont retenus sur la phase. Les extraits obtenus sont ensuite concentrés sous flux d'azote et transférés dans des flacons d'injection.

2.2.6. Détection des métabolites de HAP (Publication 1) :

a) Détection par CPG/SM :

Préalablement à leur injection, les extraits subissent une étape de dérivation afin d'améliorer la séparation et la détection des composés. Pour cela, 30 μl de bis(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide (BSTFA; Acros organics, Noisy-Le-Grand, France) est ajouté à l'extrait. La réaction de dérivation est accélérée en plaçant les échantillons à 65°C pendant 30 minutes. Comme pour les HAP, un composé deutéré est ensuite ajouté afin de contrôler le rendement du 1-hydroxypyrene-d9.

Les conditions d'analyse sont décrites dans l'Annexe 17 et le chromatogramme obtenu après extraction d'ion (analyse en mode SIM) pour le mélange des métabolites est représenté sur la Figure II.23. Les composés sont généralement détectés sous la forme HAP-O-Si(CH₃)₃⁺ à la valeur $m/z = \text{« masse moléculaire} + 72 \text{ »}$ hormis pour le 1-hydroxynaphtalène, le 2-hydroxybiphényle et le 9-hydroxyfluorène. L'ion [HAP-H]⁺ détecté pour le 9-hydroxyfluorène correspond à la molécule ayant perdue H₂O. Les principaux ions des spectres de masse obtenus avec et sans dérivation sont présentés dans le Tableau II.7.

La séparation obtenue pour les différents isomères d'hydroxyphénanthrène est présentée sur la Figure II.24.

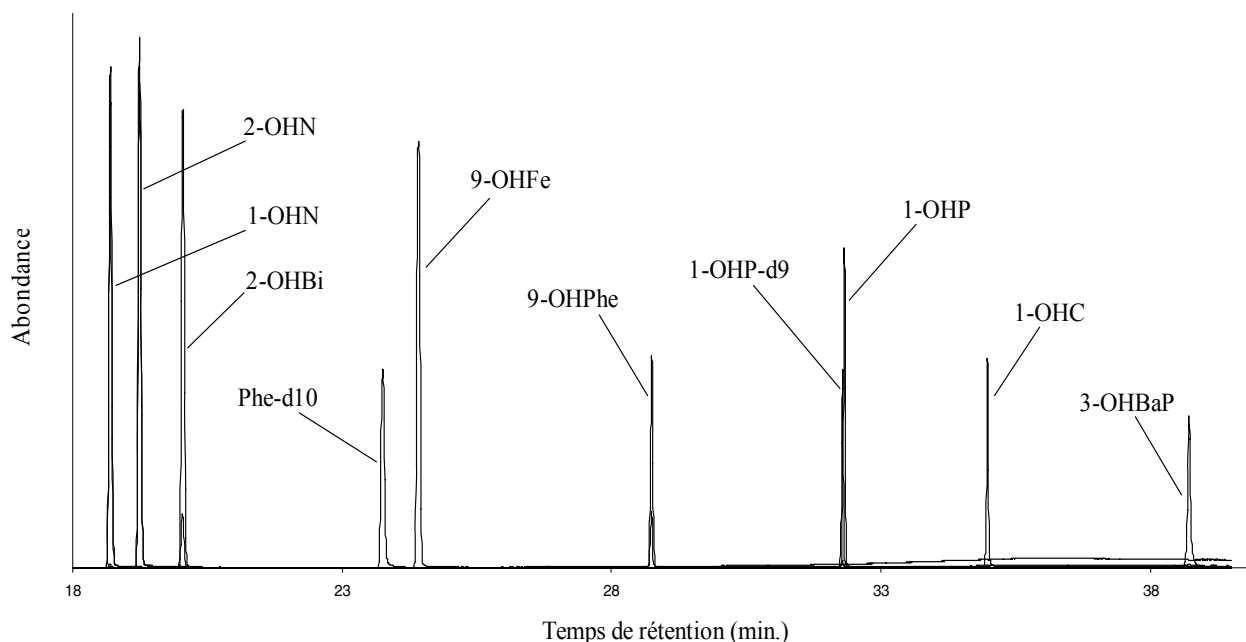


Figure II.23 : Chromatogramme obtenu en CPG/SM par injection d'un mélange contenant les métabolites étudiés (un seul isomère d'hydroxyphénanthrène) après dérivation

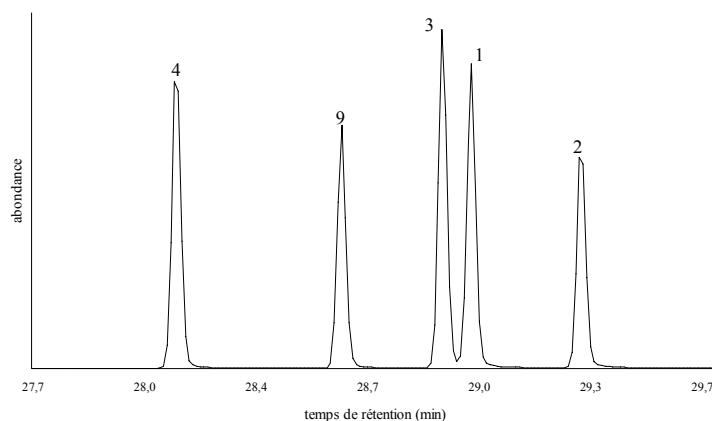


Figure II.24 : Séparation des différents isomères (1, 2, 3, 4 et 9) d'hydroxyphénanthrène obtenue en CPG/SM après dérivation

Composés	sans dérivation	avec dérivation
1-OHN	144, 115 (85)	201, 216 (90)
2-OHN	144, 115 (60)	216, 201 (65)
2-OHBi	170, 169 (75), 141 (32)	211, 227 (60), 242 (40)
9-OHFe	181, 182 (77), 152 (38)	165, 254 (25), 73 (25), 180 (10)
9-OHPhe	194, 165	266, 251 (63)
1-OHP	218, 189 (77)	290, 275 (25), 291 (20)
1-OHC	244, 215 (75)	316, 301, 285
3-OHBaP	268, 239 (68)	340, 341 (30)

les nombres entre parenthèses sont les pourcentages d'abondance de chaque ion par rapport au premier, fixé à 100%

Tableau II.7 : Principaux ions (m/z) caractéristiques des spectres de masse obtenus par CPG/SM avec et sans dérivation

b) Détection par CLHP/SM :

Tout comme la CPG/SM, le couplage de la chromatographie liquide haute-performance et de la spectrométrie de masse permet la séparation et la détection des composés ainsi que leur identification. Les principales différences avec la CPG/SM sont la séparation des composés en phase liquide et les modes d'ionisation utilisés, l'ionisation électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Les caractéristiques de cette technique sont présentées dans l'Annexe 18.

L'analyse des métabolites de HAP est réalisée en mode négatif en raison de la capacité de ces composés à former des anions. Des colonnes spécifiques aux deux différentes sources présentées dans l'Annexe ont été utilisées. En effet, la source électrospray est plus adaptée à de faibles débits alors que l'APCI peut traiter de forts débits d'éluant. Une colonne de faible diamètre est donc utilisée en ESI (Zorbax SB-C18 narrow-bore; 2,1*150 mm, 3,5 µm; Bios Analytique, l'Union, France) et une plus large (Eclipse XDB-C8; 4,6*150 mm, 5 µm; Bios Analytique, l'Union, France) en APCI.

Les paramètres utilisés pour la séparation des métabolites et leur détection sont résumés dans l'Annexe 19. Le chromatogramme du mélange de métabolites obtenu par CLHP-ESI-SM après extraction d'ion en mode SIM est représenté sur la Figure II.25. Le 9-hydroxyfluorène n'est pas détecté dans ces conditions. Les principaux ions des spectres de masse obtenus en

APCI positif et négatif ainsi qu'en ESI négatif (détection très mauvaise en ESI positif) sont présentés dans le Tableau II.8. La séparation (incomplète) obtenue pour les différents isomères d'hydroxyphénanthrène en ESI est présentée sur la Figure II.26.

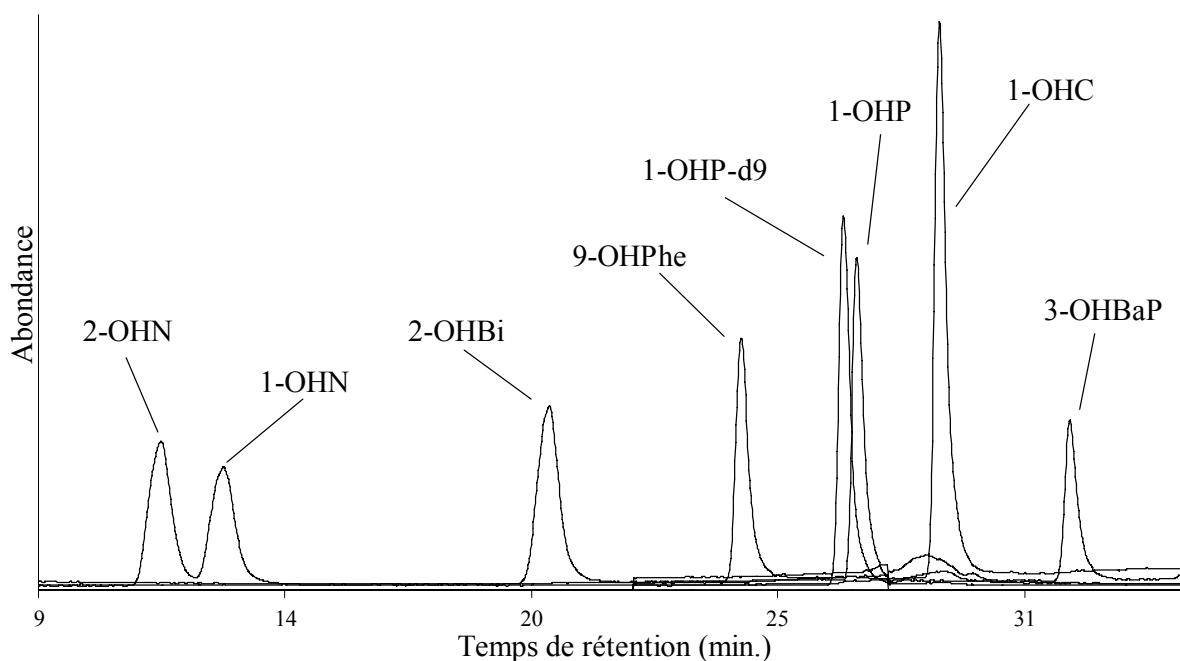


Figure II.25 : Chromatogramme obtenu en CLHP-ESI-SM par injection d'un mélange contenant les métabolites étudiés (un seul isomère d'hydroxyphénanthrène)

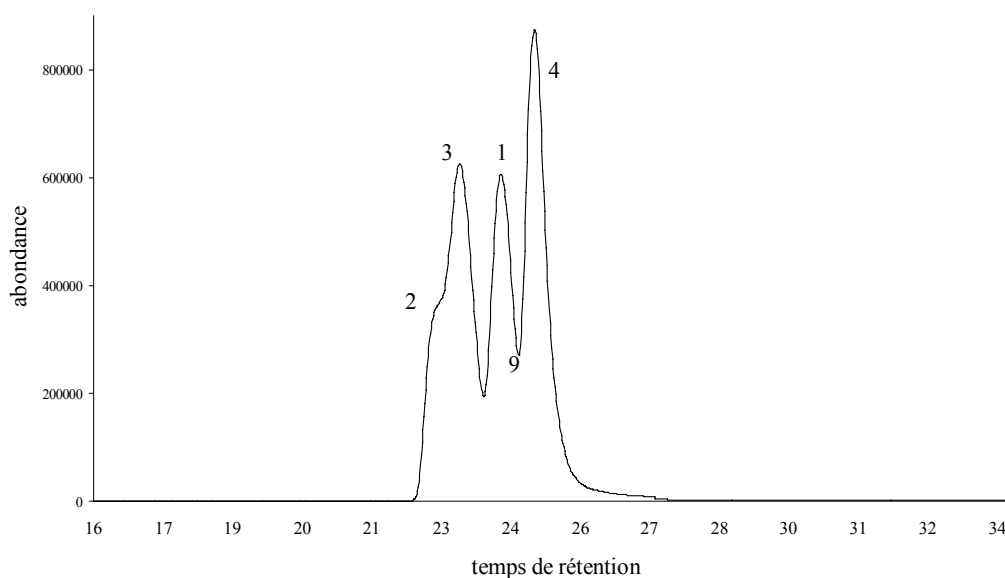


Figure II.26 : Séparation des différents isomères (1, 2, 3, 4 et 9) d'hydroxyphénanthrène obtenue en CLHP-ESI-SM

Source	APCI			ESI		
	Polarité	Positive	Négative		Négative	
1-OHN	144	[M] ⁺	143	[M-H] ⁻	143	[M-H] ⁻
	145 (20)	[M+H] ⁺	144 (10)	[M] ⁻	144 (10)	[M] ⁻
2-OHN	145	[M+H] ⁺	143	[M-H] ⁻	143	[M-H] ⁻
	144 (25)	[M] ⁺	144 (10)	[M] ⁻	144 (10)	[M] ⁻
2-OHBi	nd		169,	[M-H] ⁻	169	[M-H] ⁻
			170 (10)	[M] ⁻	170 (12)	[M] ⁻
9-OHFe	165 (15V)	[M+H-H ₂ O] ⁺	180 (15V)	[M-2H] ⁻	nd	
	166 (20)	[M+2H-H ₂ O] ⁺	165 (90)	[M-OH] ⁻		
	165 (90V)	[M+H-H ₂ O] ⁺	195 (10)	[M+CH ₃] ⁻		
	181 (45)	[M-H] ⁺				
9-OHPhe	nd		193	[M-H] ⁻	193	[M-H] ⁻
			194 (15)	[M] ⁻	194 (15)	[M] ⁻
1-OHP	219	[M+H] ⁺	217	[M-H] ⁻	217	[M-H] ⁻
			218 (17)	[M] ⁻	218 (15)	[M] ⁻
1-OHC	-		-		243	[M-H] ⁻
					244 (15)	[M] ⁻
3-OHBaP	-		267	[M-H] ⁻	267	[M-H] ⁻
			268 (20)	[M] ⁻	268 (20)	[M] ⁻
			282 (5)	[M+CH ₃] ⁻		

nd : non détecté, - : non déterminé en raison de l'ajout tardif des composés correspondant à l'analyse ; les nombres entre parenthèses sont les pourcentages d'abondance de chaque ion par rapport au premier, fixé à 100%

Tableau II.8 : Principaux ions (m/z) caractéristiques des spectres de masse obtenus par CLHP/SM

2.2.7. Dosage de l'activité enzymatique EROD :

Le dosage de l'activité enzymatique éthoxyrésorufin-*O*-dééthylase (EROD) est réalisé d'après le protocole de Galgani et Payne (1991) présenté dans l'Annexe 20.

2.2.8. Dosage des protéines :

La détermination de la concentration en protéines biliaires et hépatique est réalisée d'après le protocole de Lowry et al. (1951) adapté au lecteur microplaques présenté dans l'Annexe 21.

CHAPITRE III : SYNTHÈSE

Ce chapitre présente de manière synthétique les principaux résultats en les discutant.

1. MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DOSAGE DES METABOLITES DE HAP DANS LES MATRICES LIQUIDES	121
1.1. SEPARATION ET DETECTION (Publication 1)	121
1.2. PREPARATION DES ECHANTILLONS (Publication 2)	121
2. EXPERIMENTATIONS EN BASSIN	123
2.1. EXPOSITION A DES COMPOSES INDIVIDUELS (Publication 3)	123
2.2. EXPOSITION A DES PRODUITS PETROLIERS	128
2.2.1. Exposition à un fioul lourd n°2 (Publication 4)	128
a) Fiouls lourd n°2	128
b) Phase dissoute	129
c) Bioaccumulation dans les tissus	131
d) Biotransformation	134
2.2.2. Exposition à un pétrole brut (Publication 5)	139
3. ETUDES DE TERRAIN	141
3.1. LA MAREE NOIRE ERIKA :	141
3.1.1. Etude des nourriceries de sole du golfe de Gascogne (Publications 6, 7 et 8) :	141
3.1.2. Etude du traict du Croisic - Transplantation de moules (Publication 9) :	143
a) Les sédiments :	143
b) Les moules :	146
3.2. L'EMBOUCHURE DE LA SEINE (Publication 10) :	148

1. MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DOSAGE DES METABOLITES DE HAP DANS LES MATRICES LIQUIDES

La plupart des études réalisées sur les métabolites de HAP mettent en œuvre un dosage semi-quantitatif global de ces composés. Le protocole mis au point lors de ces travaux permet de réaliser un dosage quantitatif des métabolites de HAP individuellement.

1.1. SEPARATION ET DETECTION (Publication 1)

Une méthode a tout d'abord été mise au point afin de détecter et de séparer les différents composés étudiés. Pour cela, deux méthodes de chromatographie couplée à la spectrométrie de masse ont été comparées, la chromatographie en phase liquide (CLHP/SM) et la chromatographie en phase gazeuse (CPG/SM). Cette dernière s'est révélée être plus complète, permettant de détecter tous les composés et d'obtenir une bonne séparation des hydroxynaphtalènes et des hydroxyphénanthrènes (§ II.2.2.6). La CLHP/SM, que ce soit avec une source d'ionisation APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) ou ESI (Electrospray ionisation), n'a pas permis de détecter tous les composés de manière satisfaisante et de séparer correctement les différents hydroxyphénanthrènes. Une étape de dérivation a toutefois été nécessaire en CPG/SM afin d'optimiser la détection des composés. De plus, cette méthode permet d'obtenir une bonne justesse au niveau de la quantification des différents métabolites étudiés. Les conditions d'analyse et les spectres de masse obtenus en CPG/SM sont respectivement détaillés dans l'Annexe 17 et dans le paragraphe II.2.2.6.

1.2. PREPARATION DES ECHANTILLONS (Publication 2)

Un protocole de préparation a été développé afin de réaliser des analyses d'échantillons naturels tels que la bile de poisson par CPG/SM. Le protocole global est décrit dans le paragraphe II.2.2. Il couple une étape d'extraction et de purification.

L'étape combinée de déconjugaison enzymatique et d'extraction sur phase solide (phase octadécyle C₁₈) a tout d'abord été mise au point et validée sur des eaux supplémentées en HAP hydroxylés. Pour cela, l'extrait obtenu après extraction est évaporé à sec et repris dans du dichlorométhane. Après dérivation et ajout de phénanthrène-d₁₀ pour quantifier le rendement d'extraction du 1-hydroxypyrene-d₉, l'extrait est analysé par CPG/SM. Les rendements obtenus par rapport à l'étalon interne sont généralement compris entre 82 et 110% (Tableau III.1). Cependant, les rendements du 2-hydroxybiphényle et du 3-hydroxybenzo(a)pyrène, respectivement 65 et 41%, ne sont pas entièrement satisfaisants. L'étalon interne a quant à lui un rendement correct ($79 \pm 5\%$; n=3). Des tests réalisés en changeant de solvant d'élution (dichlorométhane, acétate d'éthyle en remplacement du méthanol) n'ont pas permis d'améliorer ces rendements. Les résultats obtenus pour l'étape d'extraction seule ne sont pas significativement différents de ceux obtenus pour le protocole combiné, ce qui prouve que l'étape de déconjugaison n'induit pas de perte de composés (Tableau III.1).

Une étape de purification sur phase solide (phase aminopropyle NH₂) a ensuite été mise au point. Les rendements obtenus sont satisfaisants pour tous les composés, compris entre 77 et 92%. Le rendement du 1-hydroxypyrene-d₉ est quant à lui de $90 \pm 3\%$ (n=3).

Le protocole entier a ensuite été appliqué à des eaux supplémentées pour validation et à des échantillons de bile de poisson pour vérifier son applicabilité. Les rendements obtenus pour les eaux supplémentées sont généralement supérieurs à 70%, hormis pour le 2-hydroxybiphényle et le 3-hydroxybenzo(a)pyrène, en raison de leur faible rendement

d'extraction. Le rendement d'extraction de l'étalon interne est quant à lui de $74 \pm 4\%$ ($n=3$). Les écarts types obtenus, compris entre 3 et 8%, montrent la bonne répétabilité du protocole.

Composé	Extraction	Déconjugaison + extraction	Purification	Protocole global
1-OHN	93 ± 9	95 ± 10	79 ± 7	78 ± 7
2-OHN	84 ± 8	82 ± 9	77 ± 6	70 ± 6
2-OHBi	65 ± 8	65 ± 7	81 ± 8	62 ± 8
9-OHFe	87 ± 6	85 ± 6	80 ± 8	74 ± 8
9-OHPhe	109 ± 7	110 ± 8	86 ± 4	94 ± 4
1-OHP	100 ± 4	100 ± 3	92 ± 3	96 ± 3
1-OHC	83 ± 9	84 ± 8	90 ± 4	70 ± 4
3-OHBaP	43 ± 10	41 ± 11	85 ± 4	36 ± 4

Tableau III.1 : Rendements d'extraction obtenus pour les différents composés étudiés par rapport à l'étalon interne pour les différentes étapes du protocole de dosage ainsi que pour le protocole entier ($n=3$)

L'application du protocole à des échantillons de bile de flet (*Platichthys flesus*) de la baie de Seine a permis de montrer la faisabilité du protocole de dosage. Ce protocole s'est tout d'abord montré efficace à purifier les échantillons. En effet, l'étape de rinçage sur phase C_{18} et, plus particulièrement, l'étape d'éluion sur phase NH_2 permettent d'éliminer la majorité des pigments biliaires et d'obtenir un extrait limpide et faiblement coloré. Cette sélectivité se traduit par la détection de certains métabolites dans les échantillons et l'absence d'interférents. Ainsi, les 1- et 2-hydroxynaphtalènes, le 2-hydroxybiphényle, le 9-fluorène et le 1-hydroxypyrene ont pu être identifiés (Figure III.1). D'autre part, le 9-

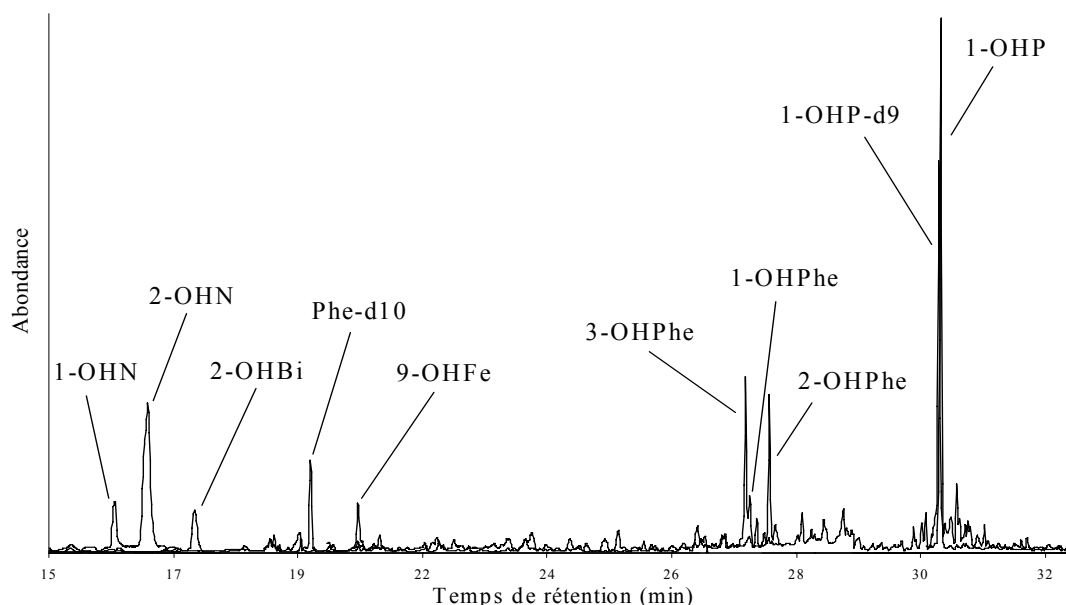


Figure III.1 : Exemple de chromatogramme obtenu par CPG/SM en mode de sélection d'ions pour les échantillons de bile de flet après application du protocole analytique

hydroxyphénanthrène n'a pas été détecté, cependant, la présence des isomères 1, 2 et 3 a pu être mise en évidence. Le 3-hydroxybenzo(a)pyrène n'a par contre été détecté dans aucun échantillon, ce qui pourrait s'expliquer par le faible rendement d'extraction qui lui est associé. Le rendement d'extraction de l'étalon interne ($76 \pm 5\%$) est quant à lui non significativement différent de celui obtenu avec des eaux supplémentées ($74 \pm 4\%$). La quantification des composés permet d'obtenir des écarts types corrects, généralement compris entre 3 et 14% (Tableau III.2). De plus, le protocole utilisé permet de mettre en évidence une contamination plus importante des flets de l'embouchure de la seine (La Fosse) que de ceux capturés à Antifer.

Composés	Antifer			La Fosse		
	Conc.	E.T.	C.V.	Conc.	E.T.	C.V.
1-OHN	11	1	8	28	4	13
2-OHN	94	10	10	214	16	7
2-OHBi	29	5	16	74	10	14
9-OHFe	54	5	10	169	24	14
3-OHPhe	20	2	8	48	4	7
1-OHPhe	8	1	8	35	4	12
2-OHPhe	29	3	9	82	6	7
1-OHP	299	16	5	2782	84	3
Somme	543	30	5	3432	149	4

Conc. : concentration ; E.T. : écart type ; C.V. : coefficient de variation

Tableau III.2 : Concentration en ng/g des différents métabolites détectés dans la bile de flet (n=3)

2. EXPERIMENTATIONS EN BASSIN

Différentes expérimentations consistant à exposer des poissons aux HAP en bassin ont été réalisées afin d'étudier le comportement de ces contaminants dans un milieu simplifié et de mieux comprendre leur devenir dans les organismes marins et plus particulièrement leur biotransformation. Des soles ont ainsi été exposées à des HAP individuels et à des fiouls lourds du même type que celui déversé lors de la marée noire Erika. Des turbots et des morues ont également été exposés à un pétrole brut.

2.1. EXPOSITION A DES COMPOSES INDIVIDUELS (Publication 3)

Dans le but d'avoir une meilleure compréhension du comportement des HAP dans le milieu marin et de leur devenir une fois absorbés par des organismes marins, des soles ont été exposées en bassin à différents HAP séparément par contamination de l'eau, uniquement en début d'expérimentation (temps T0). Ces expérimentations avaient également pour but de mettre en évidence les différences de comportement des HAP étudiés. Les résultats bruts sont donnés dans l'Annexe 22.

Le dosage des HAP dans l'eau au cours du temps a permis de mettre en évidence des différences de comportement entre HAP. Les concentrations mesurées dans la phase dissoute montrent une dissolution proportionnelle à la solubilité des composés. Ainsi, malgré la contamination de l'eau des bassins par des quantités similaires de HAP (par le biais de l'ajout d'une solution de HAP individuel dans de l'éthanol), l'exposition des poissons par la phase dissoute est plus importante dans le bassin du phénanthrène que dans les autres bassins (Figure III.2).

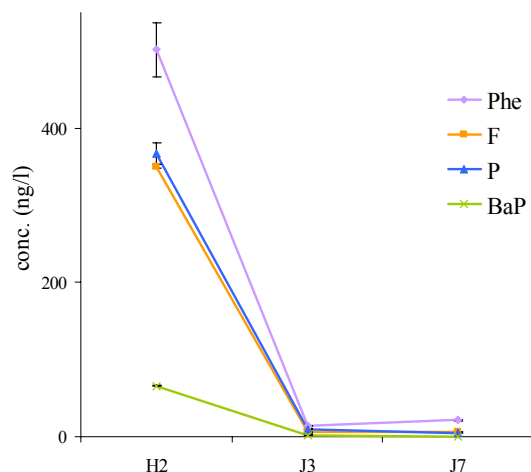


Figure III.2 : Concentration moyenne en HAP dans la phase dissoute pour les quatre expositions exprimées en ng/l (analyses réalisées en duplicat)

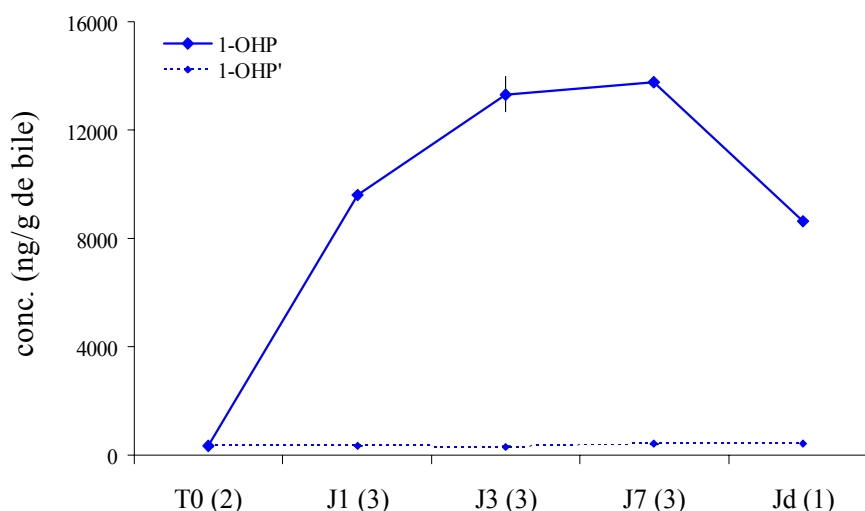
Le benzo(a)pyrène est quant à lui faiblement présent dans la phase dissoute en raison de sa faible solubilité dans l'eau. Les concentrations du fluoranthène et du pyrène sont largement supérieures à celle du benzo(a)pyrène et sont de plus similaires en raison de leurs solubilités proches. Toutefois, on peut noter que la concentration du phénanthrène est largement inférieure à la concentration théorique prévue ($1 \mu\text{g/l}$). Il serait donc logique de penser que les HAP sont en partie adsorbés sur les particules en suspension ou dans les sédiments. Cependant, aucune accumulation n'a été mesurée dans ces compartiments lors de l'expérimentation. Ces résultats indiquent que l'exposition des organismes s'est faite uniquement par la phase dissoute. Ces expositions s'étant déroulées en extérieur, la photo-oxydation des composés a pu jouer un rôle non négligeable ainsi que leur adsorption sur les parois des bassins. On remarque de plus qu'après trois jours, les concentrations mesurées dans la phase dissoute ont fortement diminuées mais restent supérieures à celles du bassin contrôle (concentrations dans le bassin contrôle variant entre 3,3 et 4,2 ng/l pour le phénanthrène, entre 0,8 et 1,2 ng/l pour le fluoranthène, entre 0,5 et 0,7 ng/l pour le pyrène et inférieur à 1 ng/l pour le benzo(a)pyrène). Après 7 jours, on observe des concentrations toujours supérieures au bassin contrôle pour le phénanthrène, une légère augmentation de la concentration est même mesurée entre J3 et J7 (passant de 14 à 21 ng/l), pour le pyrène, en baisse (passant de 10 à 5 ng/l), et pour le fluoranthène, restant stable (entre 5 et 6 ng/l). Seul le bassin du benzo(a)pyrène ne montre pas d'exposition significative par la phase dissoute après 7 jours, le benzo(a)pyrène n'étant plus détecté à J7, tout comme dans le bassin contrôle ($<1 \text{ ng/l}$).

Concernant le devenir des différents HAP dans l'organisme, les soles échantillonnées ne présentent aucune bioaccumulation significative lors des expositions, que ce soit dans les muscles ou dans les foies et quel que soit le temps d'échantillonnage. On peut donc penser que les niveaux de contamination choisis pour ces expérimentations n'ont pas provoqué de surexposition conduisant à leur accumulation directe dans les réserves lipidiques.

Dans le cas de l'exposition au benzo(a)pyrène, l'un des principaux métabolites de ce HAP dans la bile de poisson, le 3-hydroxybenzo(a)pyrène (Krahn et al., 1981; Varanasi et

Gmur, 1982; Varanasi et al., 1986a et b; Stein et al., 1986; Plesha, 1986), n'a pas été détecté dans les échantillons (<50 ng/g). Ceci pourrait s'expliquer par le faible rendement obtenu pour ce composé après application du protocole de dosage. De plus, comme l'ont montré les mesures réalisées dans la phase dissoute, l'exposition des soles au benzo(a)pyrène a été plus faible que dans le cas des trois autres composés. On peut donc conclure de cette expérimentation que la démarche mise en œuvre ne permet pas de mettre en évidence la moindre exposition des soles au benzo(a)pyrène à une concentration initiale de 66 ng/l.

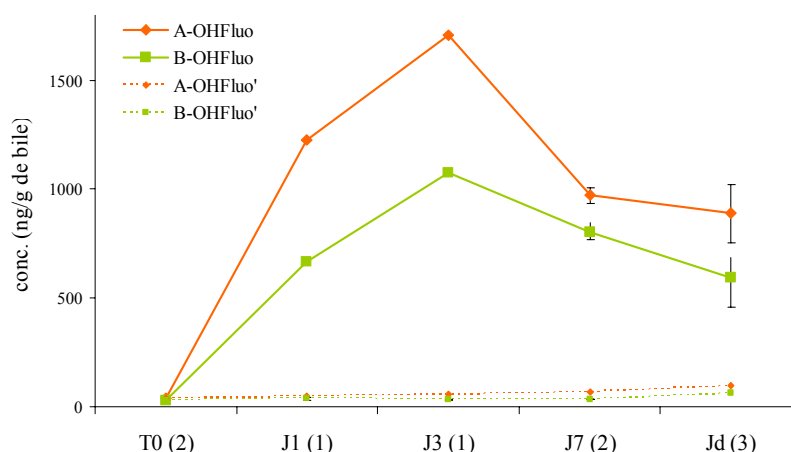
La mesure du 1-hydroxypyrene dans la bile de sole permet par contre de mettre en évidence l'exposition des poissons au pyrène. Aucun autre métabolite monohydroxylé du pyrène n'est détecté dans la bile. La biotransformation pour ainsi dire exclusive du pyrène en 1-hydroxypyrene a déjà été observée chez le flet *Platichthys flesus* (Luthe et al., 2002). Ainsi, dès 24 h après la contamination, une forte augmentation de la concentration biliaire du 1-hydroxypyrene est observée. On constate plus précisément une augmentation d'un facteur 30 entre T0 et J1 (respectivement 321 et 9613 ng/g). La concentration en 1-hydroxypyrene continue à augmenter entre J1 et J3 bien qu'un ralentissement soit observé (Figure III.3). Ceci pourrait être mis en relation avec la forte diminution de l'exposition des organismes par la phase dissoute mesurée entre H2 et J3. On aurait toutefois pu s'attendre à une diminution de la concentration en métabolite en raison de cette forte diminution et de l'absence de pyrène dans le foie, principal organe de biotransformation. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une non excrétion de la bile vers les intestins en raison du jeûne des poissons et la subsistance d'une exposition faible mais mesurable. Ce ralentissement se confirme entre J3 et J7 puisque les valeurs obtenues à ces 2 temps sont très proches. Une diminution est ensuite mise en évidence après 7 jours de décontamination, traduisant l'arrêt de l'apport en pyrène et de sa biotransformation ainsi que l'élimination de la bile (ou la dilution possible de la bile en raison du jeûne des poissons empêchant ou limitant l'élimination de la bile). Le niveau atteint après décontamination reste cependant très élevé, plus proche de la concentration atteinte à J1 que de la concentration initiale. Au total, la concentration en 1-hydroxypyrene a augmenté d'un facteur 43 dans la bile entre T0 et J7 (respectivement 321 et 13765 ng/g) alors que la concentration en pyrène dissous montre une augmentation maximale mesurée d'un facteur 667 après 2 h (H2).



Le nombre d'analyses réalisées par temps d'échantillonnage est indiqué entre parenthèses sur l'axe des abscisses

Figure III.3 : Evolution de la concentration en 1-hydroxypyrene dans la bile de soles exposées à du pyrène (1-OHP) et dans la bile de soles du bassin contrôle (1-OHP')

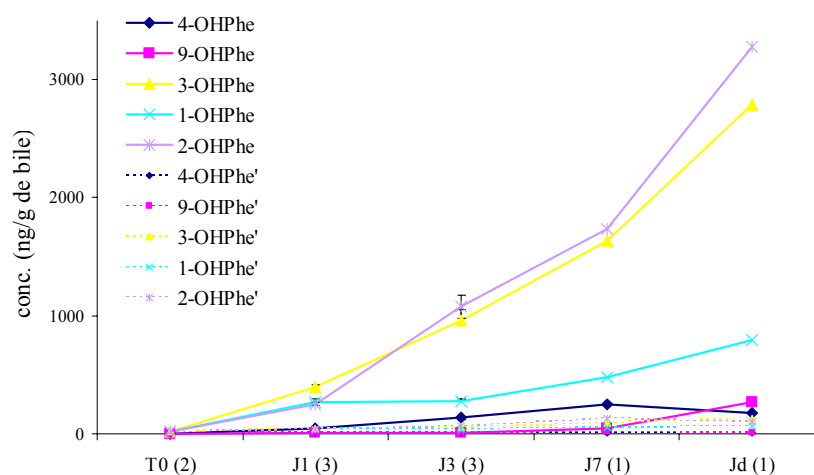
En ce qui concerne la biotransformation du fluoranthène, la présence de deux composés hydroxylés (appelés A et B) a été mise en évidence dans la bile de sole. Comme pour le 1-hydroxypyrene, une forte augmentation est constatée pendant les premières 24 heures, suivie d'une augmentation plus faible entre J1 et J3 traduisant un ralentissement (Figure III.4). Les teneurs maximales mesurées sont toutefois environ 10 fois moins importantes que pour le 1-hydroxypyrene. Pourtant, la concentration des deux HAP dans la phase dissoute était équivalente pour les deux expositions et aucune bioaccumulation n'a été observée quelque soit le composé. La différence de niveau de concentration des métabolites hydroxylés pourrait alors s'expliquer par l'existence de processus de biotransformation plus complexes pour le fluoranthène, donnant lieu à la formation de métabolites tels que des diols-époxydes ou des dihydrodiols en plus des 2 composés monohydroxylés identifiés. D'autre part, à la différence du 1-hydroxypyrene, la concentration des métabolites du fluoranthène diminue entre le troisième et le septième jour alors que la concentration en fluoranthène dissous reste constante pendant cette période. Cette observation pourrait s'expliquer par la présence en plus faible quantité des métabolites du fluoranthène dans la bile comparativement au 1-hydroxypyrene. La présence des métabolites du fluoranthène serait alors insuffisante pour compenser l'élimination de la bile vers les intestins et maintenir une concentration élevée en métabolites. Une faible diminution est ensuite observée au temps de décontamination, les concentrations en métabolites restant très élevées par rapport aux valeurs initiales. On peut également remarquer la prépondérance du métabolite A sur le métabolite B tout au long de l'expérimentation. On peut enfin comparer l'augmentation de la concentration des métabolites du fluoranthène avec celle du 1-hydroxypyrene. Il faut noter que bien que les soles aient été exposées à des concentrations similaires de composé par la phase dissoute au temps H2, la concentration en fluoranthène dissous n'a augmenté que d'un facteur 347 au lieu de 667 pour le pyrene en raison de la concentration plus forte du fluoranthène à l'état initial (environ 1 ng/l pour le fluoranthène contre environ 0,6 ng/l pour le pyrene). On constate pourtant que la concentration de l'hydroxyfluoranthène A augmente d'un facteur 30 entre T0 et J1 et d'un facteur 42 au maximum, c'est-à-dire de manière équivalente au 1-hydroxypyrene. Au vu du niveau beaucoup plus élevé de la concentration en hydroxypyrene, on aurait pu s'attendre à obtenir une augmentation plus faible pour les hydroxyfluoranthènes, cependant la concentration initiale de 1-hydroxypyrene est beaucoup plus forte que celles des métabolites du fluoranthène. L'hydroxyfluoranthène B augmente par contre plus faiblement, d'un facteur 22 entre T0 et J1 et d'un facteur 35 au maximum.



Le nombre d'analyses réalisées par temps d'échantillonnage est indiqué entre parenthèses sur l'axe des abscisses

Figure III.4 : Evolution des concentrations en hydroxyfluoranthènes dans la bile de soles exposées à du fluoranthène (x-OHF) et dans la bile de soles du bassin contrôle (x-OHF')

Les teneurs en métabolites mesurées chez les soles exposées au phénanthrène sont du même ordre de grandeur que celles obtenues pour le fluoranthène. Pourtant, l'exposition au phénanthrène par la phase dissoute était plus importante que celle au fluoranthène ou au pyrène. On peut donc en déduire, tout comme pour le fluoranthène, que les voies de biotransformation du phénanthrène sont plus complexes que celles du pyrène. Différentes études ont d'ailleurs montré la présence de dihydrodiols du phénanthrène dans la bile de poisson (Solbakken et al., 1980; Solbakken et Palmork, 1981; Goksøyr et al., 1986; Pangrekar et al., 2003). L'évolution des concentrations en hydroxyphénanthrènes est par contre différente de celle des métabolites du pyrène et du fluoranthène. En effet, après une augmentation globale des teneurs en métabolites jusqu'à J7, on observe des concentrations encore plus élevées après la période de décontamination (hormis pour le 4-hydroxyphénanthrène) (Figure III.5). Ce phénomène est difficilement explicable. Cependant, il est également observé dans les autres bassins où les teneurs en hydroxyphénanthrènes augmentent sensiblement entre J7 et Jd (de 92 à 208 ng/g dans le cas de l'exposition au pyrène). De fortes pluies s'étant déroulées lors de la phase de décontamination, l'eau utilisée, provenant des marais voisins, pourrait s'être enrichie préférentiellement en phénanthrène par ruissellement en raison de la plus forte solubilité des composés de faible poids moléculaire dans l'eau. Cette hypothèse est étayée par l'augmentation en parallèle des teneurs en métabolites d'autres HAP de faible poids moléculaire tels que ceux du naphtalène (de 67 à 224 ng/g pour le 2-hydroxynaphtalène dans le cas de l'exposition au pyrène par exemple). On peut d'autre part remarquer que les 2- et 3-hydroxyphénanthrènes sont les deux métabolites les plus présents dans la bile alors que les isomères 4 et 9 sont les plus faiblement représentés, l'isomère 1 ayant une position intermédiaire. La prédominance des isomères 2 et 3 avait déjà été observée dans de précédentes études concernant la bile de poisson, cependant, l'isomère 1 était généralement présent à des proportions équivalentes (Solbakken et al., 1980; Solbakken et Palmork, 1981; Goksøyr et al., 1986). Entre T0 et J1, l'augmentation des différents métabolites du phénanthrène est plus lente que celles des métabolites du fluoranthène et du pyrène (augmentation d'un facteur 3 à 19 suivant les composés, excepté pour l'isomère 4 pour lequel ce calcul est impossible en raison de sa non détection à T0). Par contre, l'augmentation globale des isomères 3 et 2 (entre T0 et T7) est plus importante que celles mesurées pour les hydroxyfluoranthènes et le 1-hydroxypyrene (augmentation d'un facteur 82 et 80 respectivement).



Le nombre d'analyses réalisées par temps d'échantillonnage est indiqué entre parenthèses sur l'axe des abscisses

Figure III.5 : Evolution des concentrations en hydroxyphénanthrènes dans la bile de soles exposées à du phénanthrène (x-OHPhe) et dans la bile de soles du bassin contrôle (x-OHPhe')

Au vu de ces résultats, le 1-hydroxypyrene pourrait s'avérer être un bon indicateur général d'exposition aux HAP en raison du schéma de biotransformation simple du pyrene et de son excrétion rapide dans la vésicule biliaire.

2.2. EXPOSITION A DES PRODUITS PETROLIERS

2.2.1. Exposition à un fioul lourd n°2 (Publication 4)

Les résultats bruts de cette étude sont présentés dans l'Annexe 23.

Les HAP pris en compte dans cette étude sont, dans l'ordre croissant de leur poids moléculaire, les suivants :

Naphtalène* (N), méthylnaphtalènes (C₁-N), diméthylnaphtalènes (C₂-N), triméthylnaphtalènes (C₃-N), tétraméthylnaphtalènes (C₄-N), biphenyle (Bi), acénaphtylène* (Ay), acénaphène* (Ae), fluorène* (Fe), phénanthrène* (Phe), dibenzothiophène (DBT), méthylphénanthrènes (C₁-Phe), méthyldibenzothiophènes (C₁-DBT), diméthylphénanthrènes (C₂-Phe), diméthyldibenzothiophènes (C₂-DBT), fluoranthène* (F), pyrene* (P), benz(a)-anthracène* (BaA), chrysène*+triphénylène (C+T), méthylchrysènes (C₁-C), benzo(b)fluoranthène*+benzo(j)fluoranthène+benzo(k)fluoranthène* (BbF+BjF+BkF=BF), benzo(a)-pyrene* (BaP), indéno(1,2,3-cd)pyrene* (IP), benzo (g,h,i)pérylène* (BPer), dibenz(a,h)-anthracène*+dibenz(a,c)anthracène (DB(ah)A+DB(ac)A =DBA).

« * » : 15 des 16 HAP de l'US-EPA. L'anthracène n'est pas pris en compte dans cette étude car il n'a pas pu être quantifié dans la totalité des échantillons en raison de la présence d'interférents dans certains d'entre eux. Dans la pratique, le dosage réalisé par CPG/SM ne permet pas de s'affranchir de certaines coélutions. Ainsi, comme cela apparaît dans la liste ci-dessus, le triphénylène coélue avec le chrysène, le benzo(j)fluoranthène avec le benzo(b)fluoranthène et le benzo(k)fluoranthène, ainsi que le dibenz(a,c)anthracène avec le dibenz(a,h)anthracène. C'est pourquoi il sera toujours fait référence à la somme des HAP de l'US-EPA et de leurs coéluant.

Dans cette étude, on considèrera la plupart du temps les 10 HAP de l'US-EPA de plus haut poids moléculaire (à partir du fluoranthène) dans un seul ensemble représentant les HAP parents de moyen et haut poids moléculaire, symbolisé par « F-DBA » (somme des HAP de l'US-EPA à partir du fluoranthène et jusqu'au dibenz(a,h)anthracène ainsi que des 3 HAP coéluant).

De même, la somme des composés parents compris entre le biphenyle et le dibenzothiophène dans la liste des HAP étudiés sera symbolisée par « Bi-DBT ».

D'autre part, sur les graphiques, la somme des composés alkylés du dibenzothiophène, du phénanthrène et du chrysène est symbolisée par « (DBT+Phe+C)alk » et la somme des composés naphtaléniques par « (C0-C4)N ».

a) Fiouls lourd n°2

Les teneurs en HAP des deux fiouls lourds fournis par le CEDRE (fioul A utilisé lors des expérimentations I et II, et fioul B lors de l'expérimentation III) ont tout d'abord été caractérisées et comparées à celles du fioul Erika. Il apparaît que les deux fiouls fournis par le Cedre sont d'une manière générale plus riches en dérivés naphtaléniques alkylés que le fioul Erika (Figures III.6 et 7). Cette différence mise à part, le fioul B est très proche du fioul Erika alors que le fioul A présente des teneurs beaucoup plus faibles en HAP de moyen et haut poids moléculaire (à partir des alkylphénanthrènes). La somme des HAP quantifiés dans le fioul A est ainsi largement inférieure à celle du fioul B (31000 µg/g et 54000 ng/g

respectivement). La différence d'abondance observée au niveau des composés de haut poids moléculaire pourrait avoir une influence sur la toxicité des différents produits pétroliers (IARC, 1987; US-EPA, 1993; IPCS, 1998).

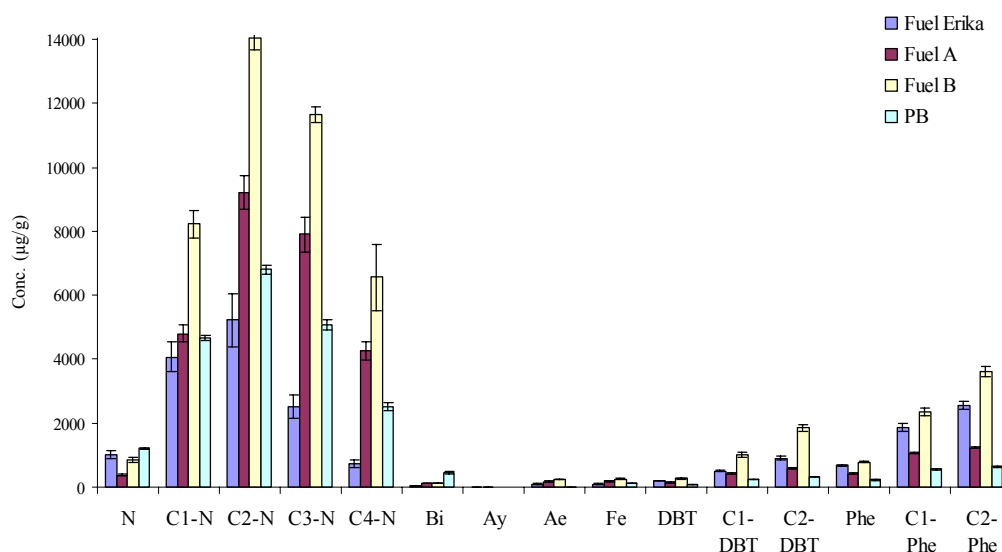


Figure III.6 : Composition en HAP de faible poids moléculaire (moyenne de triplicats) du fioul de l'Erika, des fiouls lourds A et B et du pétrole brut de la mer du Nord (PB) exprimée en µg/g

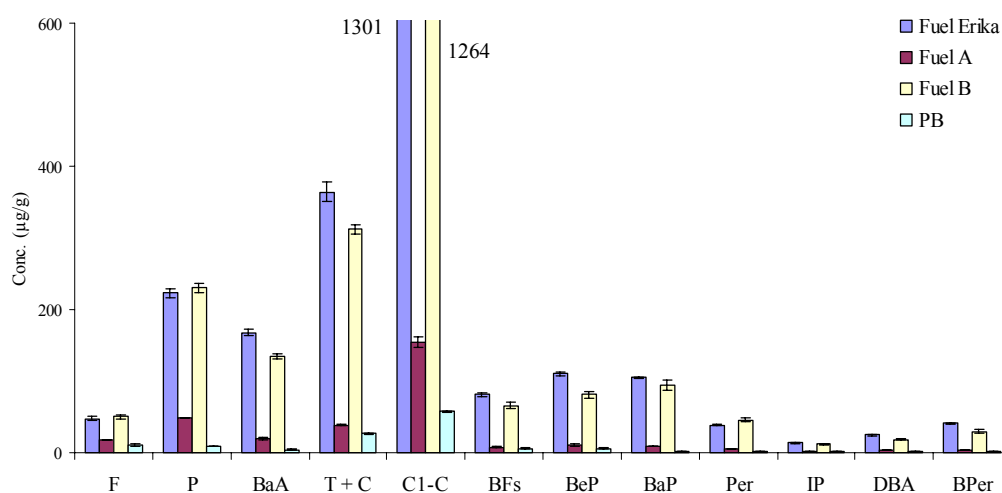


Figure III.7 : Composition en HAP de haut poids moléculaire (moyenne de triplicats) du fioul de l'Erika, des fiouls lourds A et B et du pétrole brut de la mer du Nord (PB) exprimée en µg/g

b) Phase dissoute

Les dosages de HAP réalisés dans la phase dissoute à la fin de la phase de contamination (5 jours) ont permis de mettre en évidence différents phénomènes. On remarque tout d'abord que l'utilisation du fioul B (expérimentation III) induit une exposition beaucoup plus forte des organismes aux HAP par la phase dissoute que le fioul A (Figure III.8). Ainsi, la somme des HAP dissous est comprise entre 13000 et 32000 ng/l lors de la troisième expérimentation alors qu'elle varie entre 300 et 1600 ng/l lors des deux premières expérimentations.

De plus, les dérivés alkylés du naphthalène, du dibenzothiophène et du phénanthrène sont majoritaires dans la phase dissoute. Les composés naphthaléniques sont particulièrement prédominants lors de la troisième expérimentation, les autres composés alkylés et les HAP

parents de moyen et haut poids moléculaire (à partir du fluoranthène) étant présent en proportions plus faibles que lors des deux premières expérimentations. Pourtant, les composés naphthaléniques et ceux de moyen et haut poids moléculaire représentent respectivement 86% et 0,5% des HAP contenus dans le fioul A contre 78% et 1,8% pour le fioul B.

D'autre part, à 5°C, on constate que les teneurs en HAP sont proportionnelles aux doses utilisées (341 ng/l de HAP totaux pour la dose 1/2000 et 1407 ng/l pour la dose 1/100 ; Figure III.8). En revanche, à 15°C, on constate des niveaux de HAP totaux très proches pour les deux expositions réalisées (341 ng/l pour la dose 1/2000 et 1407 ng/l pour la dose 1/100), avec des HAP parents de moyen et haut poids moléculaire (F-DBA) et des dérivés alkylés ((DBT+Phe+C)alk) plus concentrés à la dose la plus faible (1/1000), excepté pour les dérivés alkylés du dibenzothiophène. Cette caractéristique de dissolution à 15°C est confirmée dans l'expérimentation III (avec cette fois-ci des concentrations en dérivés alkylés du dibenzothiophène plus élevées à la dose la plus faible) bien que pour celle-ci, la somme des HAP totaux soit tout de même largement supérieure à la dose nominale la plus forte. Lors de cette expérimentation, la détermination des teneurs en HAP associés au sable des bassins a également mis en évidence des concentrations plus fortes de HAP de haut poids moléculaire à la dose théoriquement la plus faible. De plus, la comparaison des expositions réalisées à la dose 1/100 lors de la première expérimentation (5°C) et celle réalisée à la dose 1/200 lors de la deuxième expérimentation (15°C) permet d'observer une dissolution plus importante des HAP de faible poids moléculaire lors de l'expérimentation menée à 15°C. Ainsi, on constate une plus grande quantité des HAP légers (du naphthalène au phénanthrène) à 15°C et une inversion à partir des méthylphénanthrènes alors même que le volume de fioul utilisé est deux fois plus important à 5°C (Figure III.8).

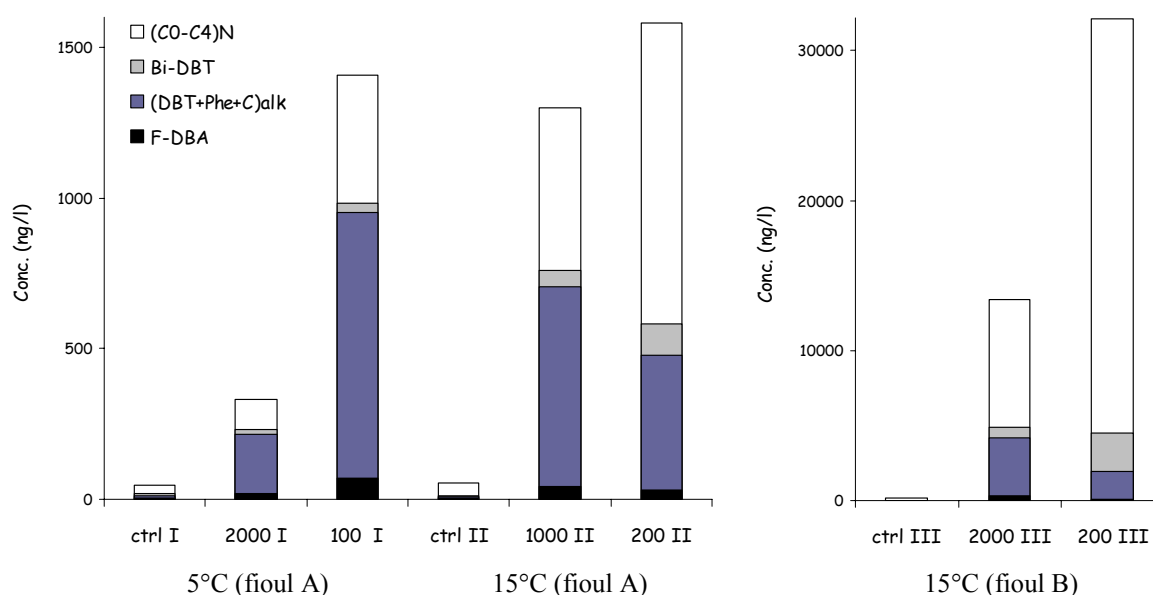


Figure III.8 : Concentrations en HAP dissous (ng/l) à la fin des expositions I, II et III

Les teneurs en HAP dissous obtenues ici pour la somme des 15 HAP de l'US-EPA quantifiés (ainsi que les 3 coéluants) sont supérieures à celles mesurées lors de la marée noire Erika le long de la côte atlantique française. La dose 1/2000 lors de l'expérimentation I (33 ng/l) est celle qui se rapproche le plus des teneurs observées lors de cet épisode (4-19 ng/l pour la même somme de HAP plus l'anthracène) (Tronczynski et al., 2003). Lors des expositions au fioul B, les concentrations individuelles de HAP dissous (concentration maximale de 140 ng/l pour le phénanthrène et de 116 ng/l pour le pyrène) sont beaucoup plus proches de celles obtenues lors des expositions aux HAP individuels (500 ng/l pour le

phénanthrène et 370 ng/l pour le pyrène) que lors des expositions au fioul A (concentration maximale de 10 ng/l pour le phénanthrène et de 28 ng/l pour le pyrène).

c) Bioaccumulation dans les tissus

Le dosage des HAP bioaccumulés dans les tissus (foie et muscles) suggère tout d'abord des différences de bioaccumulation entre organes. Ainsi, on constate une bioconcentration plus forte des composés les plus lourds (à partir des méthylphénanthrènes) dans le foie que dans les muscles. Cette bioaccumulation préférentielle peut être évaluée par le calcul de facteurs de bioconcentration (BCF). Ils représentent le rapport entre la concentration mesurée dans les organismes et celle mesurée dans l'eau et sont exprimés en l/g. Dans le foie (Tableau III.3), les BCF des HAP parents de plus haut poids moléculaire (F-DBA) varient ainsi de 0,44 à 1,76 l/g et ceux des HAP alkylés ((DBT+Phe+C)alk) de 0,20 à 0,26 l/g alors qu'ils varient respectivement de 0,02 à 0,14 l/g et de 0,04 à 0,16 l/g dans les muscles (Tableau III.4).

Si l'on compare les niveaux de HAP totaux mesurés dans les muscles lors des trois expérimentations, on peut remarquer que, malgré des concentrations de HAP beaucoup plus élevées dans la phase dissoute lors de l'expérimentation III, les niveaux de HAP bioaccumulés dans les muscles sont du même ordre de grandeur, voire plus faibles pour la troisième expérimentation (de 150 à 240 ng/g contre de 40 à 1100 ng/g pour les deux premières expérimentations). Seuls les concentrations des HAP parents de moyen et haut poids moléculaire sont plus élevées lors de cette troisième expérimentation (entre 7 et 16 ng/g contre entre 2 et 10 ng/g pour les deux premières). De très faibles facteurs de bioconcentration sont d'ailleurs mesurés pour les HAP parents de plus faible poids moléculaire (biphényle, acénaphthylène, acénaphtène, fluorène, dibenzothiophène, phénanthrène) lors de la troisième expérimentation (de 0,05 à 0,18 l/g contre de 2 à 33 l/g pour les expérimentations I et II; Tableau III.4), ce qui entraîne de plus des proportions moins importantes de ces composés (de 40 à 45% pour l'expérimentation III contre de 59 à 87% pour les expérimentations I et II).

D'autre part, pour les expérimentations I et II, on constate des facteurs de bioconcentration beaucoup plus faibles pour les composés parents de haut poids moléculaire et les composés alkylés que pour ceux de faible poids moléculaire (de 0,2 à 1,8 l/g dans le foie et de 0,08 à 0,16 dans les muscles contre de 1,5 à 18 l/g dans le foie et de 2 à 33 l/g dans les muscles pour les composés parents légers). Ces différences de comportement entre classes de HAP se traduisent par un changement radical de la distribution relative des HAP dans les tissus par rapport à celle de la phase aqueuse. Ainsi, alors que les HAP alkylés sont prédominants dans la phase dissoute, les composés parents légers deviennent largement majoritaires dans les tissus (Figures III.9 et III.10). D'autre part, on peut remarquer que les teneurs globales en HAP dans les tissus sont largement supérieures à la dose 1/100 de l'expérimentation I qu'aux doses 1/1000 et 1/200 de l'expérimentation II (Figures III.9 et III.10). Pourtant, les teneurs globales en HAP dissous étaient peu différentes (1407 ng/l pour la dose 1/100, 1300 ng/l pour la dose 1/1000 et 1580 ng/l pour la dose 1/200). Cette différence est essentiellement due à la forte bioaccumulation des HAP parents de faible poids moléculaire dans les tissus à la dose 1/100. En effet, alors que les BCF sont du même ordre de grandeur pour les autres classes de composés, pour les HAP parents légers, de fortes valeurs sont observées (18 l/g dans le foie et 33 l/g dans les muscles contre 4,4 et 1,51 l/g dans le foie et 3,6 et 3,3 l/g dans les muscles pour les doses 1/1000 et 1/200).

En ce qui concerne les deux expositions réalisées à 5°C (expérimentation I), la plus forte bioaccumulation mesurée dans les tissus à la dose 1/100 (Figures III.9 et III.10) est en accord avec les niveaux observés dans la phase aqueuse pour les deux expositions. Dans le cas de l'expérimentation II, réalisée à 15°C, on constate une bioaccumulation plus importante des différentes classes de HAP dans les foies à la dose la plus faible (1/1000) et, à l'inverse, une

bioaccumulation globalement plus forte dans les muscles à la dose la plus élevée (1/200). La bioaccumulation dans les tissus (foie+muscles) est alors globalement équivalente aux deux doses, ce qui est en accord avec les niveaux mesurés dans la phase dissoute. On peut remarquer que la forte bioaccumulation des HAP parents légers (Bi-DBT) dans les muscles à la dose 1/200 par rapport à la dose 1/1000 (353 ng/g et 188 ng/g respectivement) est due à la forte concentration de ces composés dans la phase dissoute (52 ng/l pour l'exposition 1/1000 et 107 ng/l pour l'exposition 1/200) et non à une bioconcentration plus forte à cette dose (BCF de 3,6 l/g pour l'exposition 1/1000 et de 3,3 l/g pour l'exposition 1/200). Il en est de même pour les composés alkylés dont les teneurs sont par contre plus fortes à la dose 1/1000. En revanche, les fortes teneurs mesurées dans les foies à la dose la plus faible (1/1000) ne sont pas en accord avec les concentrations mesurées dans la phase dissoute. Des facteurs de bioaccumulation plus élevés sont d'ailleurs observés à cette dose pour tous les composés (Tableau III.3).

Pour l'expérimentation III, l'exposition de deux groupes d'âge distincts permet de mettre en évidence des tendances de bioaccumulation différente en fonction de l'âge. Ainsi, les individus les plus âgés (groupe 2) présentent une plus forte accumulation des HAP de faible poids moléculaire et des dérivés alkylés que les individus plus jeunes, tout particulièrement pour la dose 1/200 (Figure III.11). A l'inverse, les individus les plus jeunes présentent globalement une plus forte accumulation des HAP de moyen et haut poids moléculaire (10 des 16 HAP de l'US-EPA + 3 HAP coéluant). Les HAP de plus faible poids moléculaire étant prédominants, les individus les plus âgés présentent une bioaccumulation globale plus forte.

D'autre part, les niveaux observés dans le foie pour la somme de 14 HAP (Phe + F-DBA + coéluants) lors des deux premières expérimentations (entre 60 et 260 ng/g de poids sec) sont globalement du même ordre de grandeur que ceux obtenus pour la somme des 14 HAP et de l'anthracène dans le foie de certaines soles capturées suite à la marée noire Erika (entre 50 et 125 ng/g ; § III.3.1).

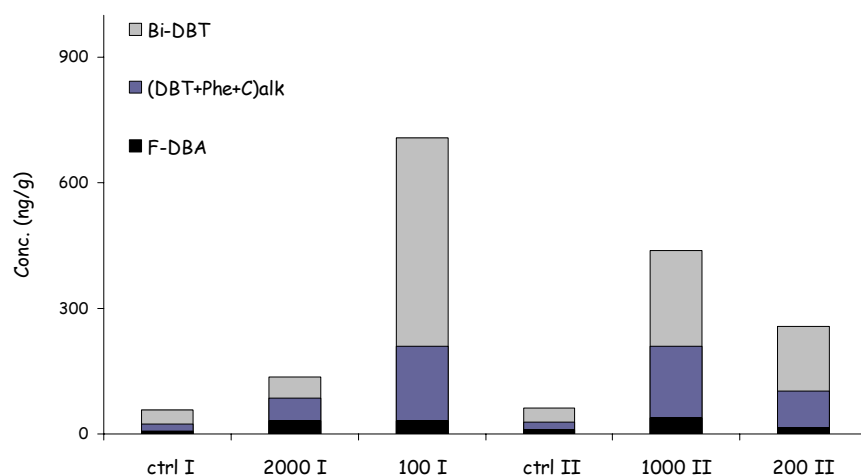


Figure III.9 : Concentrations en HAP dans les foies (ng/g de matière sèche) à la fin des expositions I (5°C) et II (15°C) (fioul A)

Expérimentation	I		II	
	1/2000	1/100	1/1000	1/200
(DBT+Phe+C)alk	0,26	0,20	0,26	0,20
Bi-DBT	3,86	17,79	4,44	1,46
F-DBA	1,76	0,44	0,93	0,46

Tableau III.3 : Facteurs de bioconcentration (BCF) dans les foies pour les différents groupes de HAP définis au début de cette étude

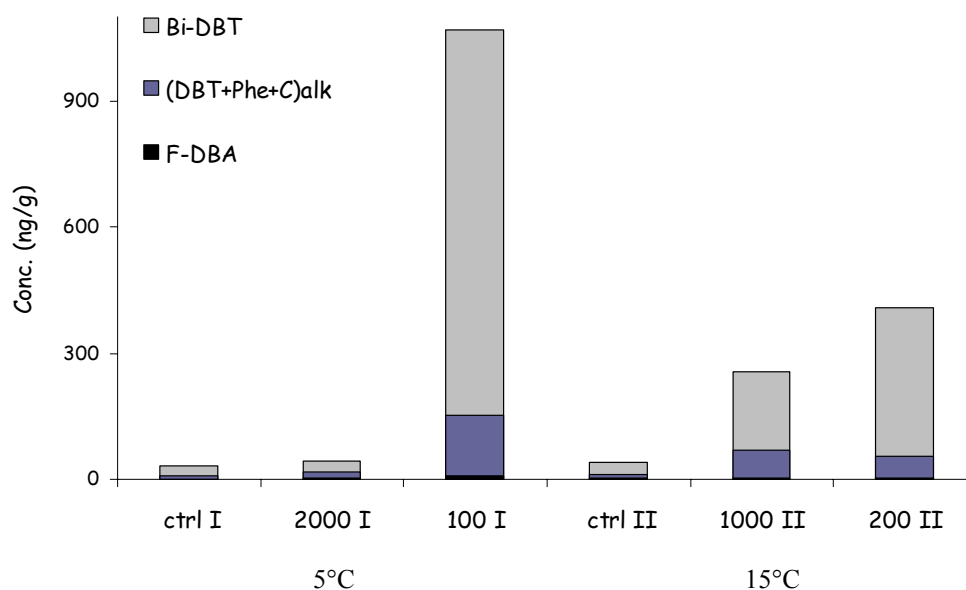


Figure III.10 : Concentrations en HAP dans les muscles (ng/g de matière sèche) à la fin des expositions I et II (fioul A)

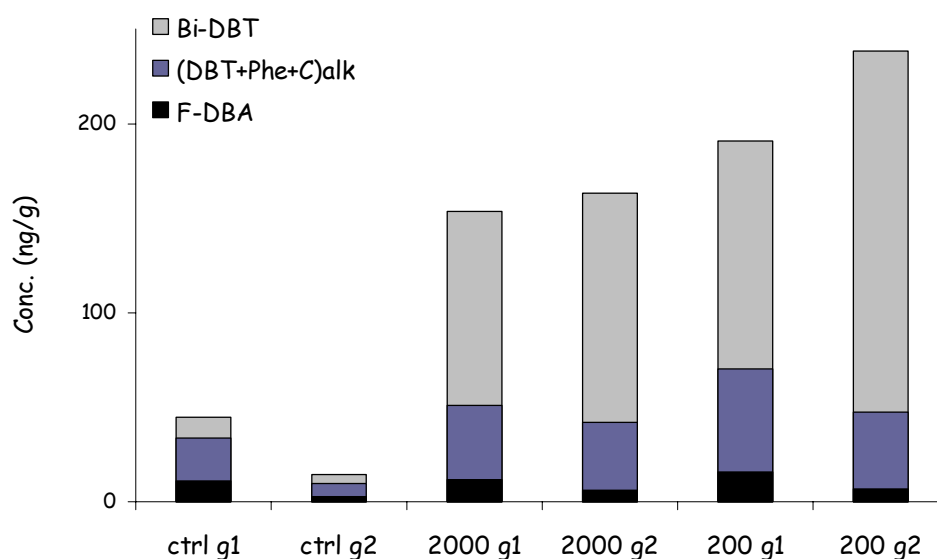


Figure III.11 : Concentrations en HAP dans les muscles (ng/g de matière sèche) à la fin de l'exposition III réalisée à 15°C

Expérimentation	I		II		III			
	1/2000	1/100	1/1000	1/200	1/2000 (g1)	1/2000 (g2)	1/200 (g1)	1/200 (g2)
(DBT+Phe+C)alk	0,08	0,16	0,10	0,11	0,04	0,04	0,10	0,13
Bi-DBT	1,99	32,76	3,63	3,32	0,16	0,18	0,05	0,08
F-DBA	0,08	0,14	0,08	0,10	0,04	0,02	0,14	0,06

Tableau III.4 : Facteurs de bioconcentration (BCF) dans les muscles pour les différents groupes de HAP définis au début de cette étude

d) Biotransformation

Les concentrations en métabolites de HAP ont été déterminées dans le foie, le plasma et la bile lors de la première expérimentation. Les analyses réalisées dans le foie et le plasma montrent que les métabolites y sont présents en quantités très faibles, avoisinant les limites de détection. Par contre, les dosages réalisés dans la bile indiquent des concentrations beaucoup plus importantes de métabolites. La présence de 1-hydroxychrysène et de 3-hydroxybenzo(a)pyrène n'a cependant été détectée dans aucun échantillon. La non détection de ce dernier pourrait s'expliquer par son faible rendement d'extraction et sa mauvaise limite de détection (§ III.1.2).

Les résultats obtenus pour les trois expérimentations montrent tout d'abord que les concentrations les plus fortes de métabolites sont obtenues lors de la troisième expérimentation, à l'exception du 2-hydroxybiphényle dont les concentrations moyennes sont équivalentes pour les trois expérimentations (aux alentours de 250 ng/g) (Figures III.12, III.13 et III.14). Ainsi, la somme des métabolites détectés dans la bile est d'environ 8000 ng/g lors des deux premières expérimentations contre environ 22000 ng/g pour les deux doses de la troisième. On observe donc des niveaux de métabolites globalement 3 fois plus élevés pour l'expérimentation III. Cette supériorité globale des niveaux de métabolites lors de l'expérimentation III reflète les fortes concentrations en HAP dissous mesurées pour cette expérimentation. Hors, la somme des HAP correspondant aux métabolites détectés (naphtalène, biphényle, fluorène, phénanthrène et pyrène) est d'environ 50 ng/l dans la phase dissoute lors des expérimentations I et II, et de 376 et 1645 ng/l lors de l'expérimentation III (pour les doses 1/2000 et 1/200 respectivement). Les niveaux de HAP dissous correspondant sont donc entre 8 et 33 fois supérieurs lors de la troisième expérimentation par rapport aux deux premières. On observe d'ailleurs des facteurs de biotransformation très faibles pour cette troisième expérimentation (Tableau III.5). Le facteur de biotransformation représente le rapport entre la concentration en métabolite mesurée dans la bile et la concentration en HAP correspondant mesurée dans l'eau ; il est exprimé en l/g. Ainsi, si l'on considère la somme des métabolites étudiés et la somme des HAP parents correspondant, on obtient des facteurs de biotransformation variant de 120 à 280 l/g pour les expérimentations I et II contre de 10 à 63 l/g pour l'expérimentation III. Ceci pourrait suggérer une forte bioaccumulation des HAP dans les tissus lors de cette dernière expérimentation. Cependant, les teneurs mesurées dans les muscles suggèrent au contraire une faible bioaccumulation (Figure III.11).

Dans le cas de l'expérimentation I, réalisée à 5°C, les niveaux de métabolites totaux (somme des métabolites étudiés) mesurés dans la bile pour les deux doses ne sont pas significativement différents (6724 ± 309 ng/g pour la dose 1/2000 et 8532 ± 1576 ng/g pour la dose 1/100). Pourtant, les concentrations en HAP dissous mesurées étaient beaucoup plus faibles à la dose 1/2000 (Figure III.8). Cette différence entre HAP dissous et métabolites se traduit par un facteur de biotransformation plus fort pour la dose 1/2000 (279 l/g) que pour la dose 1/100 (164 l/g). Les niveaux globalement équivalents de métabolites pourraient ici s'expliquer par la forte bioaccumulation observée à la dose 1/100 (cf III.2.2.1 c)).

Dans le cas de l'expérimentation II, réalisée à 15°C, les niveaux de métabolites totaux mesurés dans la bile montrent des concentrations globales très légèrement supérieures pour la dose la plus forte (8363 ± 480 et 9148 ± 248 ng/g respectivement pour les doses 1/1000 et 1/200). La concentration mesurée dans la phase dissoute pour la somme des HAP correspondant aux métabolites détectés (naphtalène, biphényle, fluorène, phénanthrène et pyrène) était pourtant 1,5 fois plus importante à la dose 1/200 (Tableau III.6). Le facteur de biotransformation global est ainsi 1,3 fois plus élevé pour la dose la plus faible (Tableau III.5). Si l'on prend l'exemple précis du 1-hydroxypyrene, sa concentration est légèrement plus élevée à la plus forte dose (3076 ± 76 ng/g contre 2725 ± 23 ng/g à la dose 1/1000) alors

que la concentration en pyrène est légèrement inférieure à cette dose (11 ng/g contre 16 ng/g à la dose 1/1000). De même, les teneurs en métabolites du naphthalène sont équivalentes pour les deux doses alors que le naphthalène dissous est 3 fois plus concentré à la dose 1/200.

Expérimentation Exposition (et âge)	I		II		III			
	1/2000	1/100	1/1000	1/200	1/2000 (g1)	1/2000 (g2)	1/200 (g1)	1/200 (g2)
1-OHN	24	20	74	32	10	11	3,1	1,4
2-OHN	39	25	99	32	58	52	16,7	7,5
OHN	63	45	174	64	69	63	19,8	8,9
2-OHBi	70	122	110	81	4	30	2,1	4,8
9-OHFe	429	289	40	22	16	18	4,7	2,0
4-OHPhe	53	55	47	37	-	-	-	-
9-OHPhe	3	4	7	9	-	-	-	-
3-OHPhe	165	180	127	142	34	34	21	12
1-OHPhe	174	132	120	133	16	11	7	4
2-OHPhe	124	117	53	76	35	26	21	10
OHPhe	519	488	353	397	85	71	48	26
1-OHP	313	100	175	279	93	74	75	62
Somme	279	164	165	124	63	54	18	10

Tableau III.5 : Facteurs de biotransformation dans la bile

En comparant les expérimentations I et II, on peut tout d'abord remarquer que les niveaux de métabolites totaux mesurés dans la bile lors de la deuxième expérimentation sont significativement supérieurs à celui mesuré pour la dose 1/2000 de la première expérimentation. Cette différence est en accord avec les niveaux de HAP mesurés dans l'eau (Tableau III.6). De plus, les niveaux de métabolites similaires mesurés pour les expositions 1/100 (I) et 1/1000 (II) confirment les teneurs en HAP dissous observées (Tableau III.6). L'examen des facteurs de biotransformation permet de plus de constater une métabolisation plus importante des HAP pour la dose la plus faible de chaque expérimentation ; il en est d'ailleurs de même pour l'expérimentation III (Tableau III.5). Aucune tendance claire n'a par contre été mise en évidence en ce qui concerne les facteurs de bioconcentration. D'autre part, on peut noter que les hydroxynaphtalènes et le 2-hydroxybiphényle sont plus abondants lors de l'expérimentation II que dans la première, reflétant la plus forte dissolution dans l'eau des HAP de faible poids moléculaire constatée à 15°C. Par contre, le 9-hydroxyfluorène est plus abondant lors de l'expérimentation à 5°C. Les facteurs de biotransformation de ce composé sont ainsi compris entre 289 (1/100) et 429 l/g (1/2000) à 5°C alors qu'ils ne sont que de 22 (1/200) à 40 l/g (1/1000) à 15°C. Des facteurs de bioconcentration beaucoup plus forts sont pourtant mesurés pour les composés de faible poids moléculaire dans les tissus pour l'exposition 1/100 (I) (Tableaux III.3 et 4).

Expérimentation	I		II	
Exposition	1/2000	1/100	1/1000	1/200
somme des 5 HAP dans l'eau (ng/l)	24	52	51	74
somme des métabolites dans la bile (ng/g)	6724 ± 309	8532 ± 1576	8363 ± 480	9148 ± 248

5 HAP : naphthalène, biphényle, fluorène, phénanthrène et pyrène

Tableau III.6 : Récapitulatif des teneurs globales en HAP dans l'eau et en métabolites dans la bile pour les expérimentations I et II

En ce qui concerne l'expérimentation III, on observe une biotransformation beaucoup plus importante à la dose la plus faible. Les facteurs de biotransformation globaux sont ainsi compris entre 54 et 63 l/g pour cette dose et entre 10 et 18 l/g pour la dose la plus forte. Le niveau de concentration global des HAP correspondant (naphtalène, biphényle, fluorène, phénanthrène et pyrène) dans l'eau étant plus de 4 fois supérieur à la dose la plus forte, on obtient des concentrations globales de métabolites du même ordre de grandeur pour les deux doses (entre 20000 et 24000 ng/g pour la dose 1/2000 et entre 16000 et 30000 ng/g pour la dose 1/200). On aurait ainsi pu s'attendre à de très faibles concentrations dans les tissus à la dose 1/2000, mais les dosages réalisés dans les muscles ne mettent pas en évidence ce phénomène (Figure III.11). On observe par ailleurs des teneurs en métabolites de HAP de faible poids moléculaire plus importantes à la plus forte dose (hydroxynaphtalènes, hydroxybiphényle), le 1-hydroxypyrene devenant même minoritaire, et inversement des teneurs en 1-hydroxypyrene élevées à la plus faible dose (Figure III.14). Ces observations sont en accord avec les profils de HAP observés dans la phase dissoute. Ainsi, le 2-hydroxynaphtalène devient majoritaire à la dose la plus forte en raison de la très forte teneur en naphtalène dissous à cette dose par rapport au pyrène (rapport pyrène/naphtalène de 1,8 à la dose 1/2000 et de 0,09 à la dose 1/200). Les facteurs de biotransformation de ces deux HAP sont tous les deux supérieurs pour la dose 1/2000. Par contre, les métabolites du phénanthrène sont globalement présents à des concentrations similaires pour les deux doses alors que celui-ci est 2 fois plus concentré dans la phase dissoute à la dose 1/200. Le dosage de l'activité enzymatique EROD dans les foies de soles pour cette dernière expérimentation montre quant à lui une activité enzymatique légèrement plus élevée chez les individus les plus âgés, contrairement aux teneurs globales en métabolites (cf § *Influence de l'âge sur le métabolisme ci-dessous*), aux facteurs de bioconcentration observés et aux niveaux de HAP accumulés dans les tissus (§ III.2.2.1 c)). De plus, les activités sont légèrement plus élevées pour la dose 1/2000, ce qui confirme les facteurs de biotransformation observés.

Concernant la composition du mélange de métabolites, une prépondérance du 1-hydroxypyrene est généralement constatée, hormis pour l'exposition 1/200 de l'expérimentation III (Figure III.12, 13, 14). Cependant, des différences de distribution sont observées suivant la nature de l'exposition. Ainsi, pour les soles non exposées (contrôles), le pourcentage du 1-hydroxypyrene par rapport à l'ensemble des métabolites varie entre 73 et 81% alors qu'il varie entre 33 et 37% lors des expositions au fioul A et entre 17 et 46% lors des expositions au fioul B. Parallèlement, on observe une augmentation importante de la part des métabolites du phénanthrène lors des expositions au fioul. Leur pourcentage augmente par exemple de 19 à 45% lors de la première expérimentation. Par contre, l'examen des facteurs de biotransformation permet difficilement de dégager des tendances de différence de concentration des métabolites dans la bile, notamment en raison de la forte variabilité de ces facteurs entre l'expérimentation III et les deux autres expérimentations. Il apparaît toutefois que les métabolites des HAP de plus haut poids moléculaire (phénanthrène et pyrène) sont les métabolites les plus présents dans la bile comparativement à leur teneur dans la phase dissoute. De plus, la prépondérance observée, lors de l'exposition individuelle au phénanthrène (§ III.2.1), des hydroxyphénanthrènes 3 et 2 de puis de l'isomère 1 est vérifiée pour l'expérimentation III. En revanche, pour les expérimentations I et II, l'isomère 1 présente une contribution identique aux deux autres isomères. De la même manière, en ce qui concerne les 1- et 2-hydroxynaphtalènes, des concentrations similaires sont mesurées lors des expérimentations I et II (fioul A) alors que l'isomère 2 est largement prédominant lors de l'expérimentation III (fioul B).

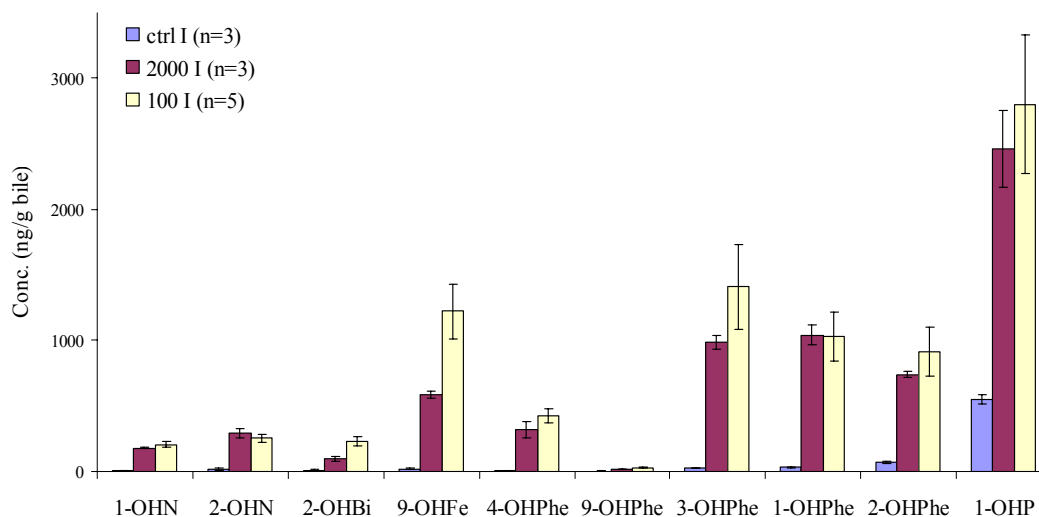


Figure III.12 : Concentrations en métabolites dans la bile (ng/g de bile) à la fin de l'exposition I

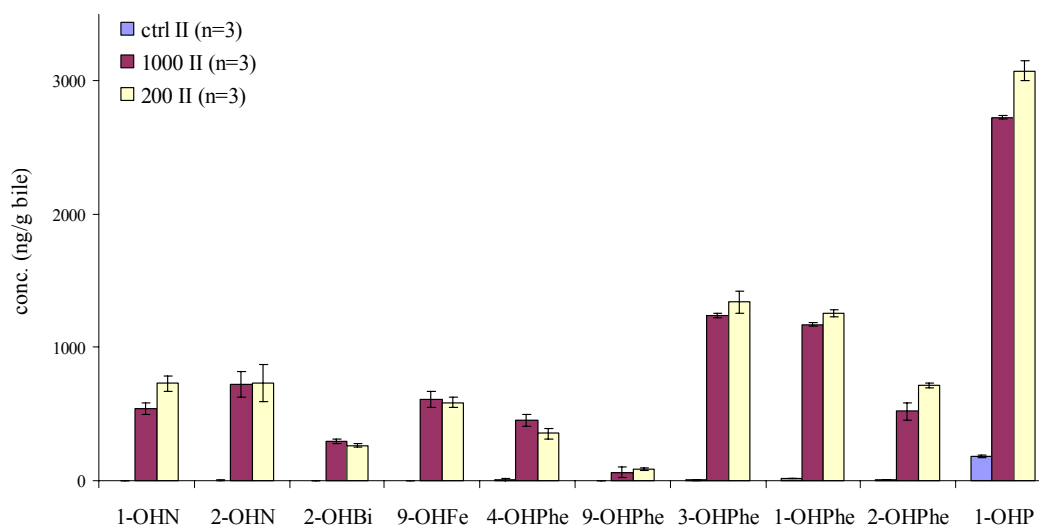


Figure III.13 : Concentrations en métabolites dans la bile (ng/g de bile) à la fin de l'exposition II

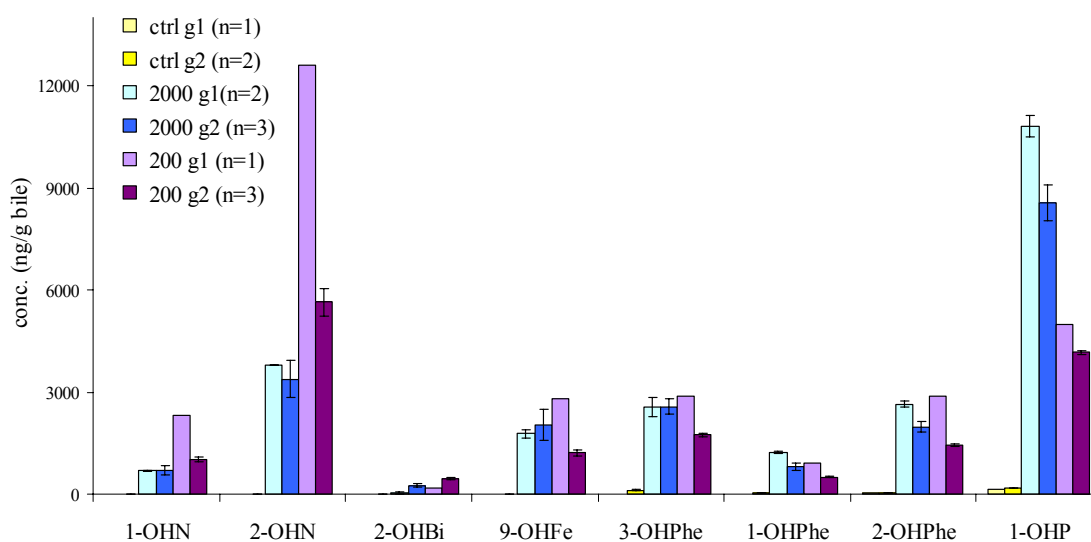


Figure III.14 : Concentrations en métabolites dans la bile (ng/g de bile) par groupe d'âge (g1 et g2) à la fin de l'exposition III

Le 1-hydroxypyrene apparaît donc comme étant un marqueur intéressant de contamination en raison de sa prépondérance. Cependant, il n'est pas suffisant pour caractériser l'origine d'une contamination. L'utilisation des métabolites du phénanthrène pourrait s'avérer être un bon complément pour identifier une source pétrolière de contamination.

D'autre part, les teneurs en métabolites du phénanthrène et du pyrène mesurées lors de ces trois expérimentations sont supérieures à celles attendues en se basant sur les concentrations mesurées lors des expositions individuelles à ces deux composés (§ III.2.1), où les teneurs en HAP dissous étaient bien plus importantes (§ III.2.2.1 c)). Les conditions d'exposition et les temps de mesure n'étant pas les mêmes, il est délicat de tirer des conclusions de ces observations. Cependant, ces différences pourraient s'expliquer par l'effet conjugué des différents HAP présents dans les fiouls induisant l'activité des enzymes de biotransformation (Stegeman et Hahn, 1994; Safe, 2001).

➤ Influence du sexe sur le métabolisme

La distinction réalisée entre mâles et femelles lors de l'expérimentation I n'a pas mis en évidence de teneurs en métabolites significativement différentes entre les deux sexes (Figure III.15). Il ne s'agit cependant que de résultats préliminaires qui nécessiteraient d'être confirmés par une étude approfondie.

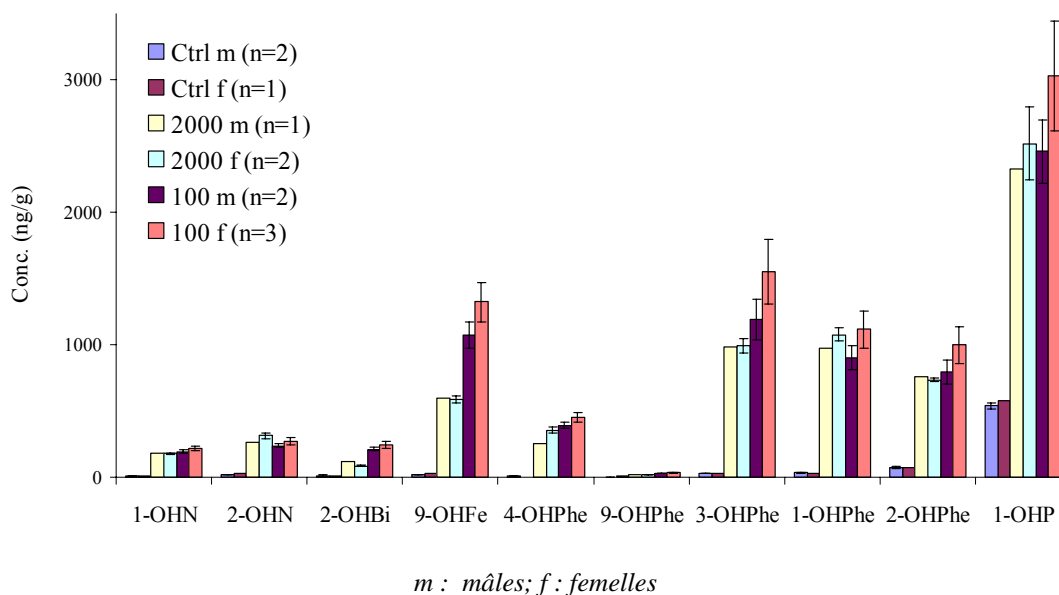


Figure III.15 : Concentrations en métabolites dans la bile (ng/g de bile) à la fin de l'exposition I en fonction du sexe

➤ Périodes de dépuraction

Deux études de dépuraction ont été réalisées, l'une de courte durée (de 1 à 5 jours) suite à la contamination I et l'autre de longue durée (3 et 6 mois) suite à la contamination II.

L'étude de la dépuraction à court terme a permis de montrer que, dans le cas de poissons non nourris, 5 jours en eau non contaminée n'étaient pas suffisants pour revenir au niveau de base des métabolites. Les teneurs mesurées après 5 jours de dépuraction sont supérieures à celles du contrôle d'un facteur 2 à 10 suivant le métabolite considéré. Les concentrations commencent à diminuer le deuxième jour (de 9000 ng/g à 5500 ng/g entre le premier et le deuxième jour pour la somme des métabolites). Après 5 jours, le niveau atteint est d'environ 3300 ng/g. On remarque d'autre part que la distribution relative des métabolites change au

cours de cette dépuración. Ainsi, le pourcentage de 1-hydroxypyrene passe de moins de 30% à 50% pendant que celui des hydroxyphénanthrènes passe de plus de 60% à 40%, suggérant une diminution de la contribution pétrogénique.

L'étude de la dépuración des individus placés en marais suite à l'expérimentation II et échantillonnés après 3 et 6 mois montre que les poissons préalablement exposés au fioul présentent, dès 3 mois, des teneurs en métabolites similaires à celles des individus non exposés. De plus, le dosage des HAP dans les muscles montre également un retour au niveau de base indiquant que les HAP bioaccumulés lors de la période de contamination ont été remis en circulation dans l'organisme pendant la période de dépuración.

➤ *Influence de l'âge sur le métabolisme*

La comparaison des deux groupes d'âge exposés lors de l'expérimentation III permet d'observer des teneurs généralement légèrement plus fortes dans la bile des individus les plus jeunes (Figure III.14) ainsi que des facteurs de biotransformation plus élevés. Ce résultat pourrait expliquer la bioaccumulation plus importante observée dans les muscles des individus les plus âgés des composés de plus haut poids moléculaire et des composés alkylés, par contre, les composés de faible poids moléculaire étaient plus fortement bioaccumulés chez les individus les plus jeunes (§ III 2.2.1 c) et Figure III.11).

2.2.2. Exposition à un pétrole brut (Publication 5)

Des juvéniles de turbots et de morues ont été exposés à un pétrole brut de la mer du Nord, introduit sous forme dispersée dans la colonne d'eau, ainsi qu'à ce même pétrole en présence d'alkylphénols. Les résultats bruts de cette étude sont présentés dans l'Annexe 24.

Le pétrole brut utilisé présente des teneurs plus faibles en HAP que les fiouls lourds A et B, particulièrement en ce qui concerne les HAP de haut poids moléculaire (Figures III.6 et 7).

Les résultats obtenus pour le dosage des métabolites dans la bile de turbot et de morue montrent une forte augmentation des teneurs en métabolites pour les individus exposés au pétrole brut ainsi qu'au pétrole brut en présence d'alkylphénols (Figures III.16 et 17).

La distribution des métabolites est totalement différente de celles obtenues pour les expositions à des fiouls lourds. Le métabolite prédominant est ici le 9-hydroxyfluorène alors que les niveaux de concentration du 1-hydroxypyrene sont inférieurs à ceux de certains métabolites du phénanthrène. Cette faible proportion du 1-hydroxypyrene s'explique par la faible concentration du pyrene dans le pétrole brut. Cependant, les concentrations importantes obtenues sont surprenantes car le fluorène est également faiblement représenté dans le pétrole brut. D'autre part, la présence des alkylphénols n'influe pas significativement sur la distribution des métabolites.

Chez le turbot, le pourcentage de 9-hydroxyfluorène est équivalent quel que soit l'exposition (contrôle, pétrole ou pétrole+alkylphénols), variant entre 58% et 65%. Par contre, comme dans le cas des fiouls lourds, la proportion des métabolites du phénanthrène est plus importante dans la bile (de turbots) exposés à du pétrole que dans celle de turbots non exposés, passant de 14% à 31%. Le pourcentage du 1-hydroxypyrene diminue parallèlement de 13% à 7%.

Chez la morue, le pourcentage de 9-hydroxyfluorène est par contre supérieur chez les individus exposés au pétrole associé aux alkylphénols (56%) que chez ceux exposés au pétrole seul (44%) ou que chez ceux du contrôle (31%). En revanche, on n'observe pas d'augmentation de la proportion des métabolites du phénanthrène chez les morues exposées au pétrole (avec ou sans alkylphénols) alors que le pourcentage du 1-hydroxypyrene diminue de 23% à 5%.

Le profil des isomères du phénanthrène est de plus différent chez les deux espèces. Chez le turbot, l'isomère 1 est largement prépondérant par rapport aux autres alors que, chez la morue, les isomères 1, 2 et 3 sont fortement représentés avec une prépondérance de l'isomère 2.

D'autre part, en comparant les teneurs cumulées de métabolites (composés représentés sur les Figures III.16 et III.17), on remarque des niveaux beaucoup plus forts dans la bile des morues (6500-6800 ng/g environ) que dans celle des turbots (4100-4400 ng/g environ). Les résultats obtenus suggèrent de plus une influence globalement nulle des alkylphénols sur les teneurs en métabolites de HAP dans la bile des deux espèces de poisson.

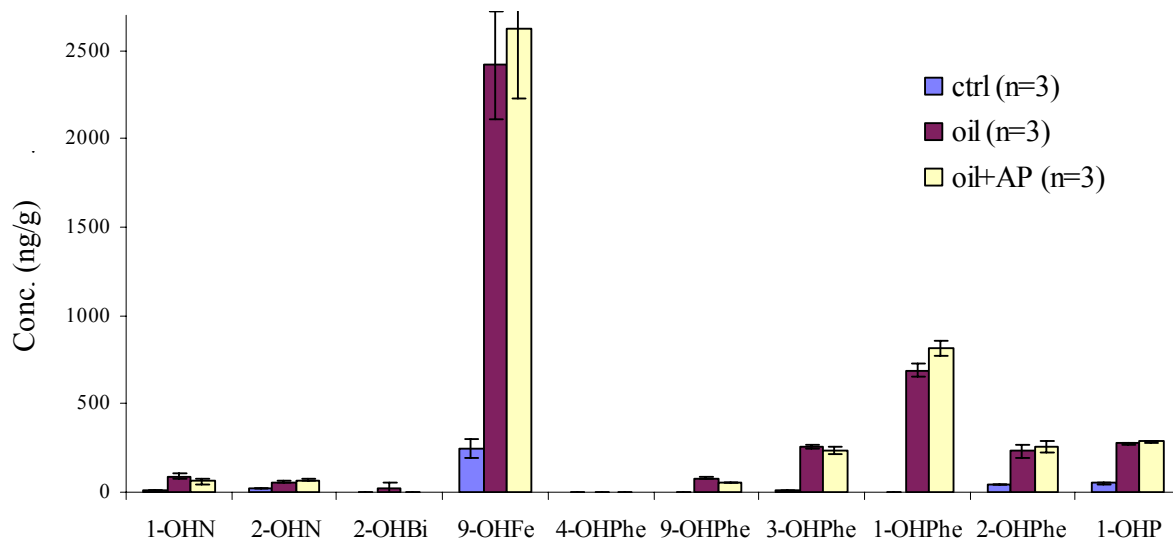


Figure III.16 : Concentrations en métabolites dans la bile de turbot exprimée en ng/g de bile pour les poissons non exposés (ctrl), les poissons exposés au pétrole brut (oil) et au pétrole brut en présence d'alkylphénols (oil+AP)

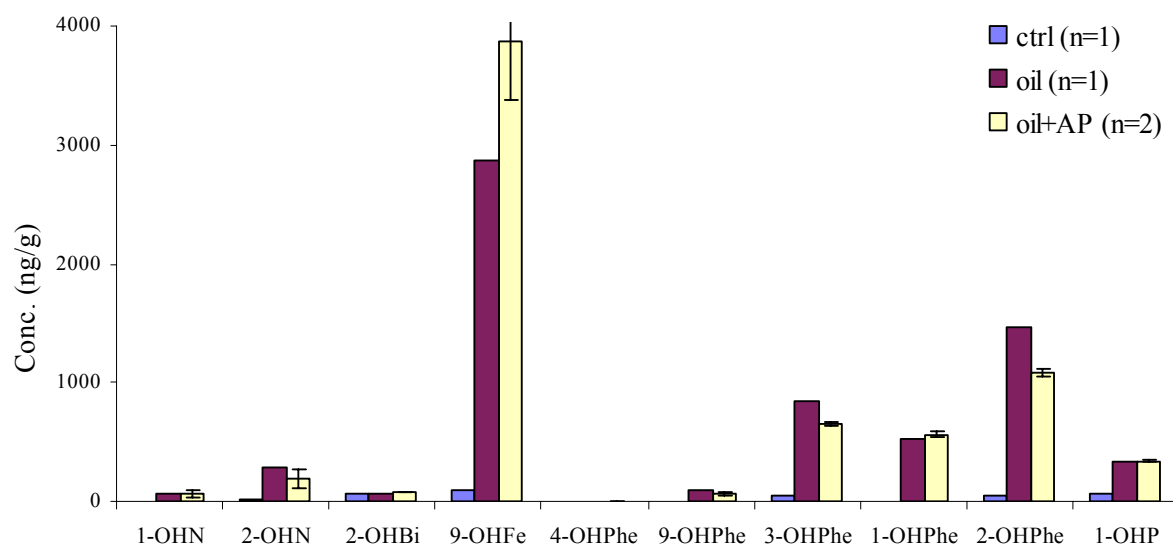


Figure III.17 : Concentrations en métabolites dans la bile de morue exprimée en ng/g de bile pour les poissons non exposés (ctrl), les poissons exposés au pétrole brut (oil) et au pétrole brut en présence d'alkylphénols (oil+AP)

3. ETUDES DE TERRAIN

3.1. LA MAREE NOIRE ERIKA :

3.1.1. Etude des nourriceries de sole du golfe de Gascogne (Publications 6, 7 et 8) :

Les dosages de métabolites biliaires réalisés dans les principales nourriceries du golfe de Gascogne entre février 2000 et Septembre 2002 ont permis de mettre en évidence l'exposition des juvéniles de soles aux HAP introduits dans le milieu marin lors de la marée noire Erika. Les résultats bruts de cette étude sont donnés dans l'Annexe 25.

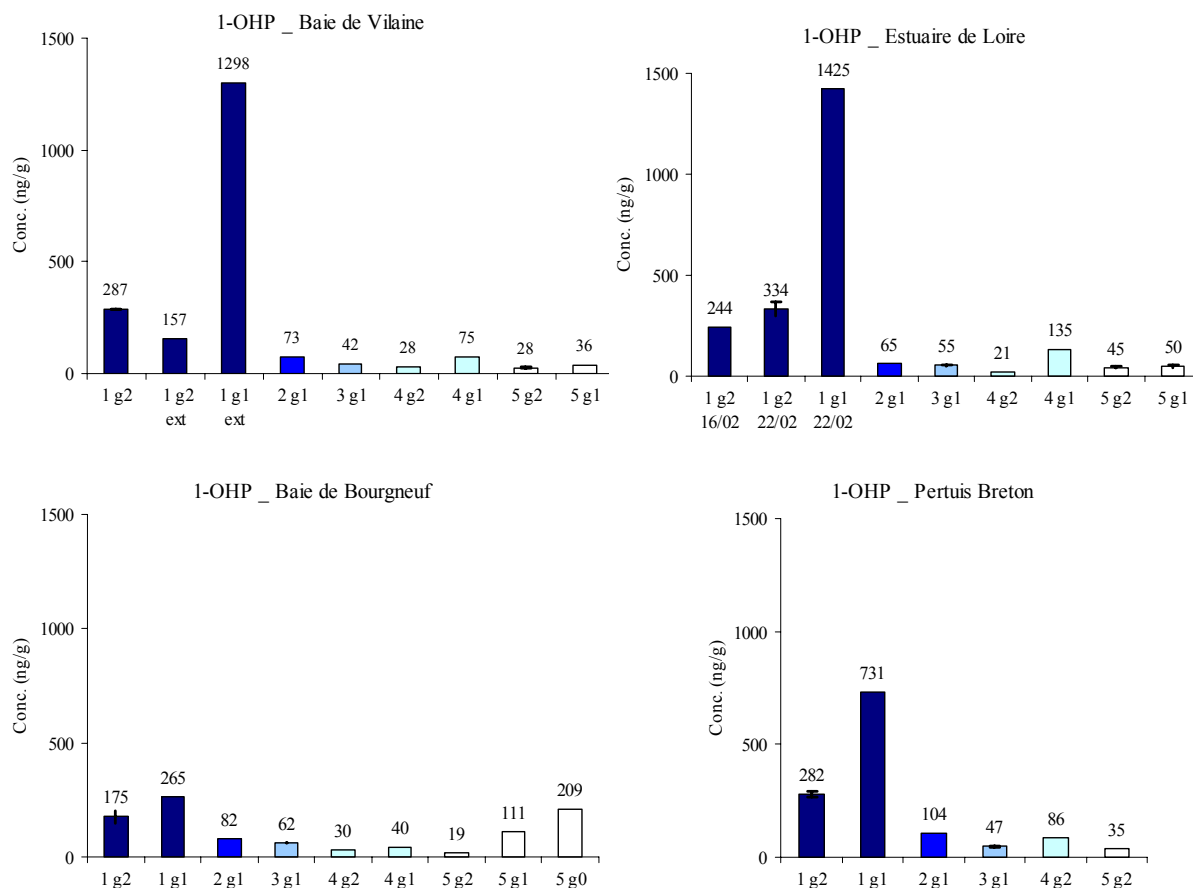
Pour les campagnes de juillet et septembre 2000 ainsi que celle de septembre 2001, seul le 1-hydroxypyrene a été dosé. Les résultats des campagnes réalisées en février 2000 et septembre 2002 montrent par ailleurs, que c'est le métabolite majoritaire parmi ceux recherchés dans la bile de sole. Cette prépondérance était déjà suggérée par les dosages réalisés lors des expérimentations en laboratoire (§ III.2.2.1). Le 1-hydroxypyrene est de plus le seul métabolite détecté dans tous les échantillons de bile lors de ces deux campagnes. C'est pourquoi les différentes campagnes ont tout d'abord été comparées en utilisant les teneurs en 1-hydroxypyrene. Le 1-hydroxychrysène et le 3-hydroxybenzo(a)pyrene n'ont quant à eux été détectés dans aucun échantillon, tout comme lors des expositions en laboratoire (§ III.2).

Les stations échantillonnées en février 2000 présentent des teneurs en 1-hydroxypyrene généralement largement supérieures à celles obtenues lors des campagnes suivantes. Les graphiques de la Figure III.18 résument les concentrations en 1-hydroxypyrene pour les 4 sites ayant fait l'objet d'échantillonnages sur l'ensemble des 5 campagnes. Les soles ayant subi les plus fortes expositions sont celles prélevées en embouchure de Loire et en baie de Vilaine. Par contre, les individus prélevés à cette période en baie de Bourgneuf présentent des concentrations largement inférieures alors que ce site a également été l'objet d'importantes arrivées de fioul pendant la marée noire. Les poissons appartenant aux deux autres sites échantillonnés lors de cette première campagne, la baie de Quiberon et le pertuis Breton, présentent également des niveaux de métabolites élevés, en particulier ceux du pertuis Breton, site pourtant relativement faiblement touché par les échouages de fioul sur la côte.

L'examen de la contribution relative des métabolites montre de plus une forte proportion des métabolites du phénanthrène lors de cette première campagne par rapport à celle de 2002, à l'exception du site de Quiberon dont l'empreinte est moins nette en février 2000 et qui n'a pas été ré-échantillonné par la suite. Les hydroxyphénanthrènes représentent ainsi de 20% à 40% des métabolites en février 2000 contre de 0% à 20% en septembre 2002. A l'opposé, le 1-hydroxypyrene représente en général environ 50% des métabolites en février 2000 contre 75 % en septembre 2002 (pour les sites échantillonnés lors de ces 2 campagnes). Ces évolutions de contributions relatives suggèrent une contamination d'origine pétrolière (§ III.2.2). Il apparaît donc clairement que les juvéniles de sole présentes dans les nourriceries de poisson du nord du golfe de Gascogne ont été exposées aux HAP issus du fioul déversé par le pétrolier Erika. Les résultats obtenus lors des campagnes suivantes montrent par contre que l'exposition des organismes liée à la marée noire Erika a eu lieu sur une durée limitée. En effet, dès le mois de juillet 2000, les concentrations en 1-hydroxypyrene atteignent des niveaux globalement aussi faibles que ceux mesurés en septembre 2002 (aux alentours de 50 ng/g).

On peut d'autre part observer que les concentrations obtenues sont toujours supérieures chez les individus jeunes. Ce phénomène est beaucoup plus marqué que lors de l'expérimentation en laboratoire (§ III.2.2.1 d)) et est confirmé chez les flets (§ III.3.2). Les

concentrations mesurées chez les soles capturées en septembre 2002 en baie de Bourgneuf, où trois groupes d'âge ont pu être échantillonnés, illustrent parfaitement cette tendance (Figure III.18). Seules les soles pêchées dans le pertuis d'Antioche en septembre 2002 ne suivent pas cette règle avec des concentrations respectives pour les groupes d'âge 2, 1 et 0 de 60, 49 et 55 ng/g.



1-5 : les 5 campagnes ; g0, g1, g2 : groupes d'âge ; ext : partie extérieure de la baie de Vilaine ; le nombre d'analyses effectuées par point est indiqué dans l'Annexe 25

Figure III.18 : Concentration en 1-hydroxypyrene dans la bile (ng/g de bile) de soles capturées dans certains sites du golfe de Gascogne

Ce suivi environnemental, réalisé le long des côtes françaises du golfe de Gascogne sur une période de trois ans et demi, a permis de déterminer un niveau de référence pour le 1-hydroxypyrene de 50 ± 30 ng/g de bile chez les juvéniles de sole du golfe de Gascogne. Sa contribution relative sur l'ensemble du golfe de Gascogne est par contre très variable (entre 26 et 100%). Le niveau de référence déterminé pourra se révéler très utile afin de mettre en évidence des épisodes de contamination du milieu marin lors de prochaines campagnes. En se basant sur cette valeur chez les individus du groupe 1, on peut d'ailleurs diagnostiquer 4 événements de contamination de relativement faible intensité en juillet 2000 dans le pertuis Breton (104 ng/g), en septembre 2001 à l'embouchure de la Loire (135 ng/g) et dans le pertuis d'Antioche (127 ng/g), et en septembre 2002 dans la baie de Bourgneuf (111 ng/g pour le groupe 1 et 209 ng/g pour le groupe 0). Plus les individus échantillonnés sont jeunes, plus l'amplitude de l'augmentation est importante. En revanche, la mise en évidence d'une exposition des organismes en utilisant des individus plus âgés (groupe 2) est dangereuse en raison de la faible amplitude de concentration observée chez ces individus. Ainsi, lors de la

phase aiguë de la marée noire, l'exposition des poissons aux HAP est beaucoup moins nette en étudiant les individus du groupe 2 que ceux du groupe 1. De plus, lors d'épisodes de contamination plus faibles comme dans le cas de la baie de Bourgneuf en septembre 2002 par exemple, l'étude de la concentration en 1-hydroxypyrene dans la bile des poissons du groupe 2 ne met en évidence aucune exposition aux HAP (21 ng/g), contrairement à l'étude des individus du groupe 1 et a fortiori du groupe 0.

En parallèle, le dosage des HAP accumulés dans le foie et les muscles des soles montre que seuls les foies de soles prélevées dans la baie de Vilaine en février 2000 présentent des teneurs élevées (entre 120 et 260 ng/g contre 10 - 80 ng/g en général en ce qui concerne la somme des HAP parents et alkylés présentés dans l'Annexe 25). Cette bioaccumulation est plus importante pour les individus les plus âgés, ce qui confirme les observations réalisées chez les soles exposées au fioul lourd B (§ III.2.2.1 c) Figure III.11) et semble confirmer la plus faible biotransformation des HAP par les individus appartenant à ce groupe d'âge suggérée par les faibles concentrations de métabolites mesurées dans la bile. L'absence de bioaccumulation dans la plupart des sites peut s'expliquer par une forte biotransformation des HAP. L'accumulation observée dans le foie des individus de la baie de Vilaine (jusqu'à 125 ng/g de poids sec pour la somme de 15 HAP (les 12 HAP de l'US-EPA à partir du phénanthrène ainsi que les 3 HAP coéluant ; Annexe 25) est du même ordre de grandeur que celle mesurée chez des poissons capturés en mer Méditerranée dans un site éloigné de sources connues de HAP (136 ng/g ; Baumard et al., 1998). On peut donc penser que les niveaux de HAP bioaccumulés dans les foies en baie de Vilaine n'indiquent pas de manière significative une exposition forte aux HAP. De plus, la faible présence des HAP dans les milieux peu contaminés pourrait expliquer leur bioaccumulation plus importante puisqu'ils n'induisent alors pas d'activité enzymatique importante chez les poissons (Meador, 2003).

3.1.2. Etude du traict du Croisic - Transplantation de moules (Publication 9) :

Les HAP pris en compte dans cette étude sont :

- pour les composés di-aromatiques : naphthalène, alkylnaphthalènes (mono-, di-, tri- et tétra-), acénaphtylène, biphényle, acénaphène, fluorène
- pour les tri-aromatiques : phénanthrène, alkylphénanthrènes (mono- et di-), anthracène, 2-méthylanthracène
- pour les tétra-aromatiques : fluoranthène, pyrène, chrysène + triphénylène, méthylchrysènes, benz(a)anthracène
- pour les penta-aromatiques : benzo(a)fluoranthènes, benzo(e)pyrène, benzo(a)pyrène, pérylène, dibenz(a,h)anthracène + dibenz(a,h)anthracène
- pour les hexa-aromatiques : benzo(g,h,i)perylène et indéno(1,2,3-cd)pyrène
- pour la somme totale des HAP étudiés, les concentrations de composés soufrés (dibenzothiophène, mono- et diméthylthiophènes, 1,2-benzonaphtothiophène et 2,3-benzonaphtothiophène) sont également prises en compte

Les composés suivants n'ont pas été quantifiés dans les sédiments Pli0, Len0 et Sib0 : biphényle, acénaphène, fluorène, méthylchrysènes, 1,2-benzonaphtothiophène et 2,3-benzonaphtothiophène.

Les données brutes de cette étude sont données dans l'Annexe 26.

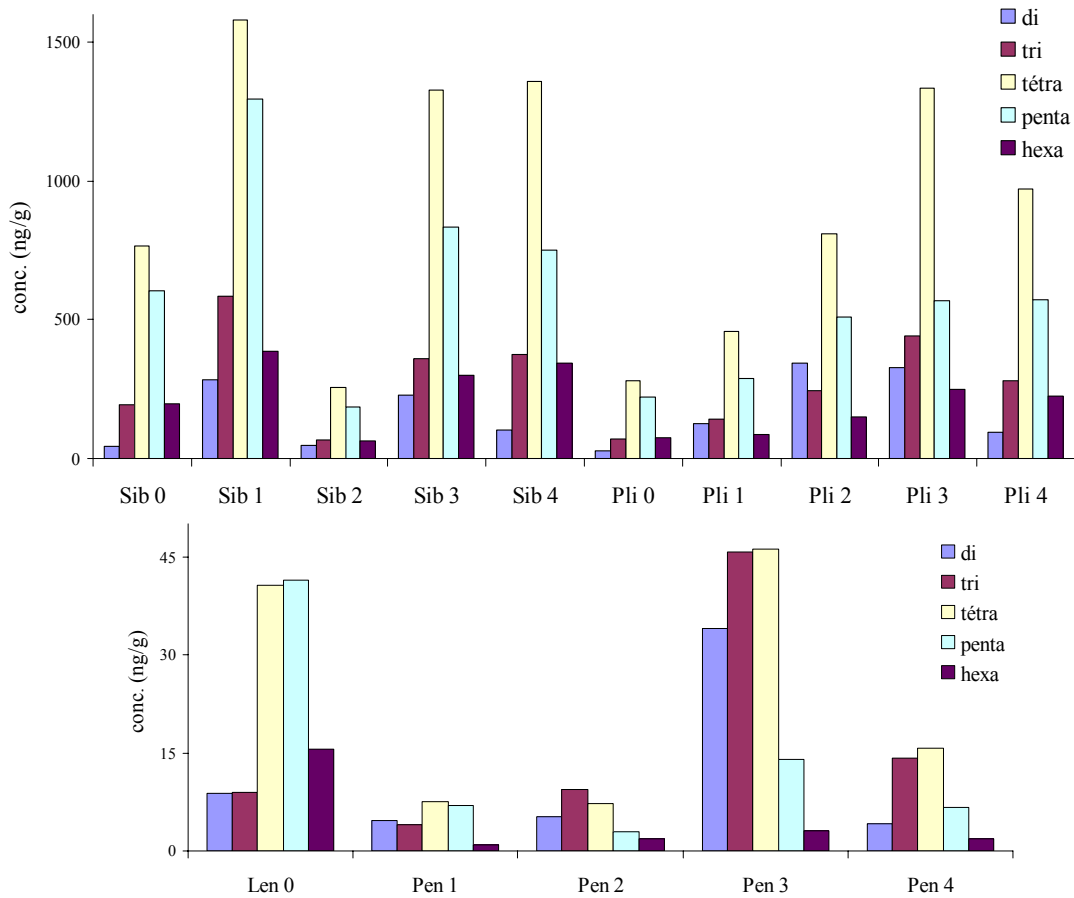
a) Les sédiments :

On observe une différence importante de concentration en HAP dans les sédiments des différents sites d'expérimentation (Figure III.19). Ainsi, les échantillons prélevés à Sibéron et

à Plinet présentent des concentrations totales de HAP beaucoup plus élevées que ceux prélevés à Pen Bron et à Lenclay (d'un facteur compris entre 4 et 170 avec un facteur moyen de 29). Cette différence de niveau peut s'expliquer par la nature des sédiments (Landrum et al., 1992 ; § I.1.4.2 b)). En effet, les sédiments de Pen Bron et de Lenclay sont constitués de particules de nature sableuse présentant une granulométrie beaucoup plus élevée et un taux de carbone organique plus faible que les particules à caractère vaseux des deux autres sites. On observe de plus une contamination variable des sédiments dans le temps. Cette variabilité des teneurs est de plus différente pour chaque site. On constate en général des concentrations plus faibles en avril, mai et juin qu'en juillet et des niveaux intermédiaires au mois d'août. Cependant, on observe des niveaux élevés de HAP dans les sédiments de Sibéron au mois de mai (4248 ng/g de poids sec pour la somme des HAP étudiés) et des niveaux particulièrement faibles le mois suivant (631 ng/g). En terme de composition, les sédiments de Sibéron et de Plinet sont relativement proches, avec une prédominance des HAP tétra- puis penta-aromatiques sur les autres classes de HAP (Figure III.19). L'examen des rapports Phe/A, F/P et Phe/C₁Phe confirme la similitude de composition en HAP des sédiments de ces deux sites (Figure III.20). L'examen de ces rapports permet de plus d'observer une contamination à tendance pyrolytique de ces sédiments avec notamment des rapports F/P et Phe/C₁Phe supérieurs à 1 (§ I.1.3.1). Cependant, le rapport C/C₁C met en évidence une proportion plus forte des méthylchrysènes par rapport au chrysène dans les sédiments de Plinet par rapport à ceux de Sibéron suggérant une contamination à la fois pyrolytique et pétrogénique des sédiments de Plinet. Les sites de Lenclay et de Pen Bron ont par contre des empreintes différentes. Les sédiments de Lenclay présentent une prépondérance à la fois des composés tétra- et penta-aromatiques et des indices moléculaires indiquant une contamination en HAP à la fois d'origine pyrolytique et pétrogénique (Phe/A > 10 et F/P > 1). Les sédiments de Pen Bron présentent quant à eux une contamination fortement pétrogénique avec une prépondérance générale des composés di- et tri-aromatiques (Figure III.19) et des indices moléculaires très proches de ceux du fioul Erika (Figure III.20).

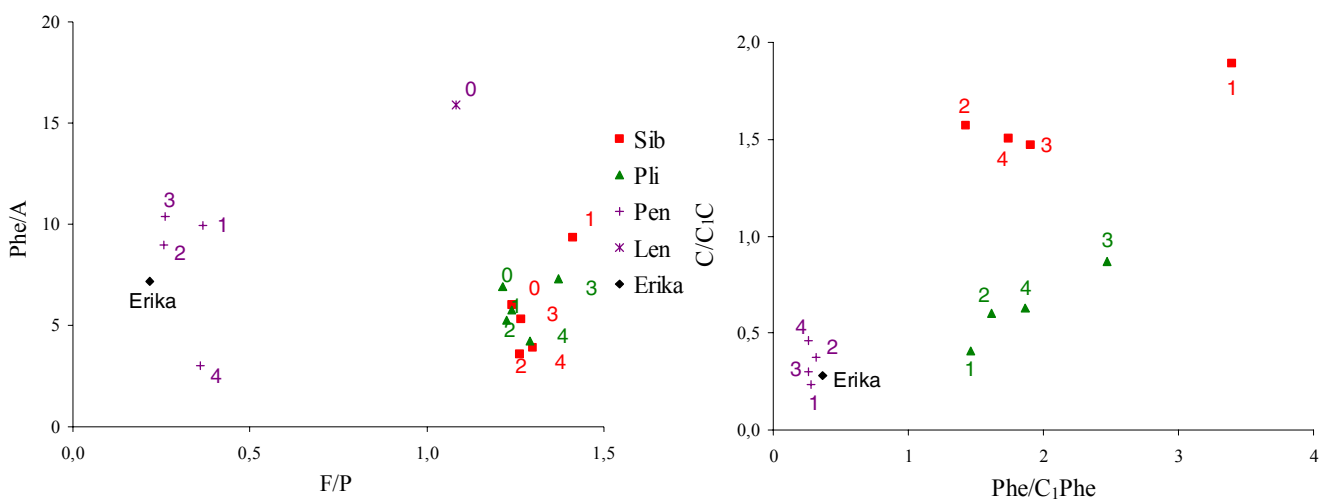
L'analyse des sédiments met donc en évidence une empreinte de HAP à fort caractère pétrogénique à l'entrée du traict du Croisic (site de Pen Bron). Les indices moléculaires suggèrent de plus que la contamination observée pourrait provenir du fioul Erika plus de 1 an et demi après le naufrage du pétrolier. Cette rémanence a également été mise en évidence lors d'une autre étude (Tronczynski et al., 2003; § I.1.7). Cependant, le niveau de cette contamination est très faible en raison de la nature sableuse des sédiments en cet endroit du traict. Ainsi, si l'on prend en compte la somme des 16 HAP de l'US-EPA (plus les 3 co-éluants que sont le triphénylène, le benzo(j)fluoranthène et le dibenz(a,c)anthracène), on obtient des niveaux particulièrement faibles à Pen Bron (18 ± 13 ng/g), même comparés aux niveaux de référence de la zone OSPAR de l'Atlantique nord (entre 25 et 125 ng/g de poids sec). Les sédiments du fond du traict présentent par contre une contamination majoritairement d'origine pyrolytique, non imputable à la marée noire. A l'entrée du bassin d'Arcachon, zone où les moules ont été prélevées, les sédiments sont sableux, tout comme à Pen Bron. Une étude réalisée en 1996 a d'ailleurs mis en évidence des niveaux également faibles de HAP dans ces sédiments (32 ng/g pour la somme de 12 des 16 HAP de l'US-EPA à partir du phénanthrène et les 3 HAP co-éluant ainsi que le benzo(a)fluoranthène, le benzo(e)pyrène et le pérylène) (Baumard et al., 1998b). Les sites localisés au fond du traict présentent par contre une contamination à caractère majoritairement pyrolytique avec des concentrations beaucoup plus importantes qu'à l'entrée du traict, notamment en raison de la nature vaseuse des sédiments. La somme des 16 HAP de l'US-EPA (+ 3 co-éluants) est ainsi de 2021 ± 1060 ng/g à Sibéron et de 1230 ± 660 ng/g à Plinet. Ces niveaux sont relativement élevés mais restent inférieurs aux niveaux les plus forts mesurés dans les sédiments superficiels du golfe de Gascogne (§ I.1.7.2) et bien moindres que ceux mesurés dans certains ports américains

(Annexe 3). Dans une autre étude, réalisée dans l'estuaire de la Gironde, on observe des différences similaires entre des sédiments sableux (19-252 ng/g) et vaseux (622-4888 ng/g) pour la somme des HAP décrite ci-dessus pour l'étude de Baumard et al. (1998b) à l'exception du benzo(a)fluoranthène (Budzinski et al., 1997).



di : di-aromatiques ; tri : tri-aromatiques ; tétra : tétra-aromatiques ; penta : penta-aromatiques ; hexa : hexa-aromatiques

Figure III.19 : Concentrations en HAP dans les sédiments des différents sites d'expérimentation



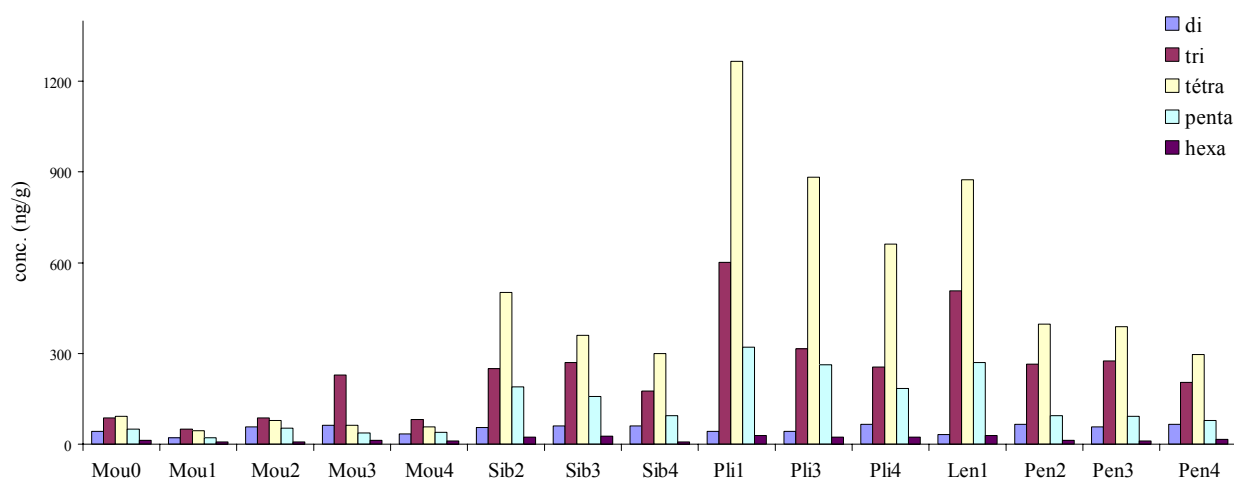
di : di-aromatiques ; tri : tri-aromatiques ; tétra : tétra-aromatiques ; penta : penta-aromatiques ; hexa : hexa-aromatiques ; Sib0, Pli0 et Len0 n'apparaissent pas sur la figure de droite en raison de la non quantification des méthylchrysènes lors de l'analyse de ces échantillons

Figure III.20 : Rapports de concentrations en HAP dans les sédiments des différents sites d'échantillonnage et dans le fioul Erika

b) Les moules :

L'application du protocole de dosage des métabolites de HAP dans les matrices solides aux glandes digestives des moules de cette étude n'a pas permis de mettre en évidence la présence de métabolites de HAP.

En ce qui concerne les teneurs en HAP dans les organismes entiers, on observe tout d'abord des niveaux beaucoup plus importants chez les moules transplantées que dans celles du Moulleau (Figure III.21). Ainsi, alors que les teneurs moyennes mesurées au Moulleau pour la somme des HAP de l'US-EPA (107 ± 27 ng/g) sont inférieures à la moyenne nationale (150 ng/g ; § I.1.7.3), on mesure des niveaux relativement élevées dans les différents sites u Traict du Croisic après un mois de caging. Ainsi, on obtient des concentrations de 544 ± 140 ng/g et 522 ng/g respectivement pour les moules de Plinet et de Lenclly qui présentent les teneurs les plus élevées et de 378 ± 67 ng/g et 287 ± 35 ng/g respectivement pour les organismes de Sibéron et de Pen Bron. On constate donc que les concentrations mesurées pour les moules de Pen Bron et de Lenclly sont, de manière inattendue, du même ordre de grandeur que celles mesurées à Sibéron et Plinet. Au vu des concentrations mesurées dans les sédiments, on aurait pourtant pu s'attendre à des niveaux beaucoup plus faibles. On peut ainsi penser que la contamination des organismes ne se fait pas ici principalement par le compartiment sédimentaire mais plutôt par la phase aqueuse. On peut également noter que les variations temporelles sont beaucoup moins importantes que celles observées dans les sédiments. On note toutefois une tendance à la diminution pour les 3 sites du Croisic entre le début et la fin de l'étude (Figure III.21).

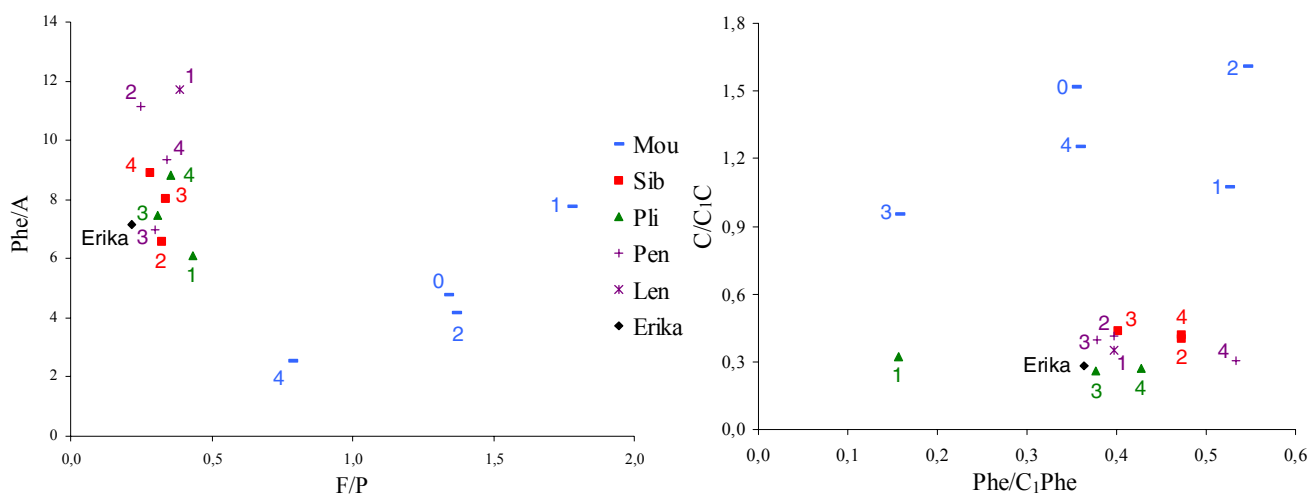


di : di-aromatiques ; *tri* : tri-aromatiques ; *tétra* : tétra-aromatiques ; *penta* : penta-aromatiques ; *hexa* : hexa-aromatiques

Figure III.21 : Concentrations en HAP par classe d'aromaticité dans les moules du bassin d'Arcachon et des différents sites d'expérimentation

D'autre part, le profil des HAP des moules de Pen Bron indique une prédominance des composés tétra-aromatiques (Figure III.21), contrairement aux sédiments (Figure III.19). Pourtant, les HAP de haut poids moléculaire sont généralement peu présents dans la phase dissoute qui présente plutôt des teneurs importantes en HAP di- et tri-aromatiques, composés plus solubles dans l'eau. On peut d'ailleurs constater que tous les organismes ayant été placés en cage pendant 1 mois dans le traict du Croisic présentent une majorité importante des composés tétra-aromatiques alors qu'avant transplantation (Moulleau), ils présentaient des teneurs de composés tri- et tétra-aromatiques similaires et moins prédominants. Pour ce dernier site, on constate par ailleurs une prépondérance des composés tri-aromatiques au mois

de juillet (Mou3, Figure III.21) en raison de fortes teneurs en alkylphénanthrènes. De plus, après un mois de caging dans le traict du Croisic, les organismes présentent des niveaux de composés tri-aromatiques supérieurs à ceux des composés penta-aromatiques, contrairement aux sédiments. Si l'on examine les indices moléculaires, on observe d'autre part des valeurs généralement proches de celles du fioul Erika pour tous les sites du traict du Croisic (Figure III.22), suggérant ainsi une contamination de l'ensemble de la masse d'eau du traict suite à la marée noire. Par contre, les moules du Moulleau se distinguent par leur empreinte à caractère pyrolytique (Phe/A faible, F/P>1, C/C₁C>1). Dans ce contexte, il apparaît étonnant de ne pas observer une empreinte pétrogénique plus importante dans les sédiments du fond du traict.



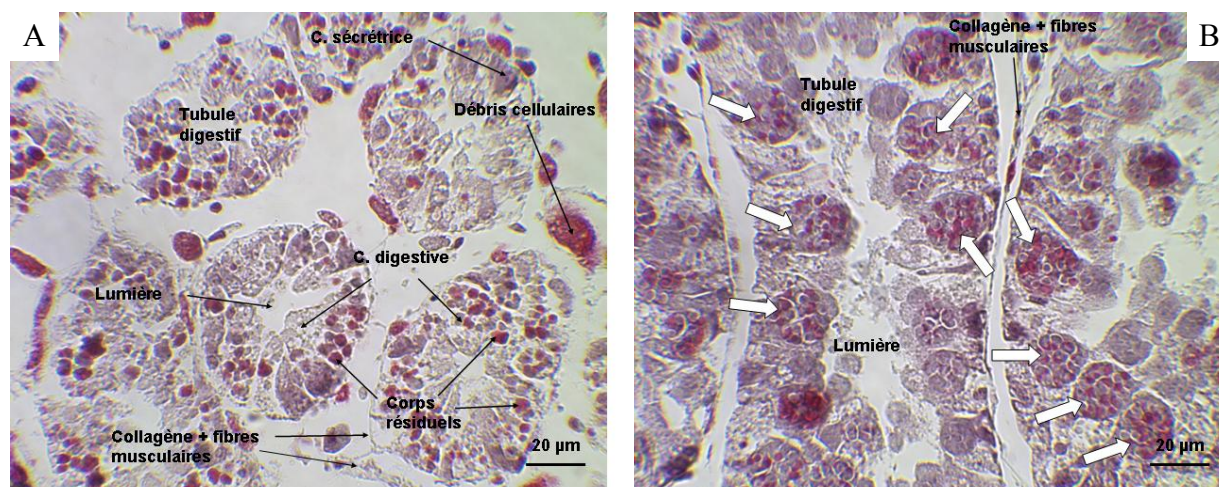
di : di-aromatiques ; tri : tri-aromatiques ; tétra : tétra-aromatiques ; penta : penta-aromatiques ; hexa : hexa-aromatiques ; Mou3 n'est pas indiqué dans le graphique de droite en raison de la présence d'un interférent empêchant la quantification du pyrène

Figure III.22 : Rapports de concentrations en HAP dans les sédiments des différents sites d'échantillonnage

L'analyse histologique des tissus de moules met en évidence des altérations particulièrement importantes des tissus des organismes de Pen Bron et plus particulièrement de la glande digestive.

On observe tout d'abord une accumulation de vacuoles graisseuses dans la glande digestive pour les sites de Pen Bron, Sibéron et Plinet à partir du mois de juin. Peu de modifications sont observées pour les glandes digestives du mois de mai en dépit de concentrations en HAP généralement maximales dans les organismes. L'accumulation de vacuoles graisseuses a été mise en relation avec l'ingestion d'hydrocarbures (Marty et al., 2003). Au mois de juillet, la ponte des moules provoque l'apparition de nombreux signes cicatriciels (débris cellulaires) correspondant à la disparition des très nombreux cystes germinaux (spermatocystes et oocystes). En août, les observations sont similaires à celles du mois de juin à l'exception du site de Pen Bron dont les glandes digestives présentent de nombreux nodules formés de très petites cellules à rapport nucléoplasmique très élevé, caractéristiques d'un phénomène de néoplasie. Le phénomène mis en évidence est particulièrement visible par comparaison avec les échantillons du Moulleau (Figure III.23). Les nodules observés (flèches blanches) sont tellement nombreux à Pen Bron qu'il devient difficile de distinguer les types cellulaires classiques du tubule digestif, et plus particulièrement les cellules sécrétrices. Des phénomènes néoplasiques ont été décrits dans des cas d'exposition d'organismes marins à des HAP et peuvent être mis en relation avec l'effet cancérogène de ces composés (Malins et al., 1988 ; Vethaak et Rheinallt, 1992 ; Moore et Myers, 1994 ; Spitsbergen et al., 2000). Les organismes de Pen Bron ne présentent pourtant

pas les teneurs en HAP les plus élevées et les individus mis en cage au mois d'août présentent les concentrations les plus faibles (Figure III.21).



Les flèches blanches indiquent la position des nodules

Figure III.23 : Coupe transversale de glande digestive de moule au microscope pour les individus du Moulleau (A) et de Pen Bron (B) prélevés à la fin du mois d'août

Les autres organes étudiés présentent des perturbations moins significatives du point de vue d'une éventuelle contamination par les hydrocarbures. Cependant, l'examen des branchies permet de mettre en évidence une perturbation importante chez les individus de Pen Bron confirmant les perturbations observées au niveau de la glande digestive. Des perturbations plus faibles sont également notées chez les individus de Sibéron, Lenclly et Plinet (par ordre décroissant). Ces perturbations consistent en une rétraction des cellules épithéliales qui se traduit par l'apparition d'espaces intercellulaires préférentiellement à la base des cellules entre l'épithélium et la lame basale. Ceci conduit à un élargissement de la barrière des échanges gazeux au niveau de l'épithélium respiratoire. Cette perturbation affecte à la fois l'épithélium cilié et l'épithélium respiratoire. Elle est donc susceptible d'être à l'origine de perturbations de la respiration en modifiant d'une part la circulation de l'eau (perturbation des mouvements ciliaires) et d'autre part les échanges eau/hémolymphe (épaisseur de la barrière des échanges gazeux). En ce qui concerne les reins, seuls les individus de Pen Bron présentent une anomalie par rapport à ceux du Moulleau avec un épithélium plus épais. Concernant l'estomac, seules les moules transplantées à Lenclly présentent un épithélium stomacal dont les cils sont raréfiés. La ligne des cinétosomes apparaît de plus discontinue et le volume des espaces intercellulaires s'est accru.

Il apparaît donc que, en dépit des fortes concentrations en HAP mesurées dans les sédiments de Sibéron et Plinet, ce sont les moules de Plinet et de Lenclly qui présentent les plus fortes teneurs en HAP. Ces résultats semblent indiquer une contamination importante des organismes par la phase aqueuse. Cependant, les organismes mis en cage pendant un mois sur le site de Pen Bron présentent les perturbations tissulaires les plus importantes.

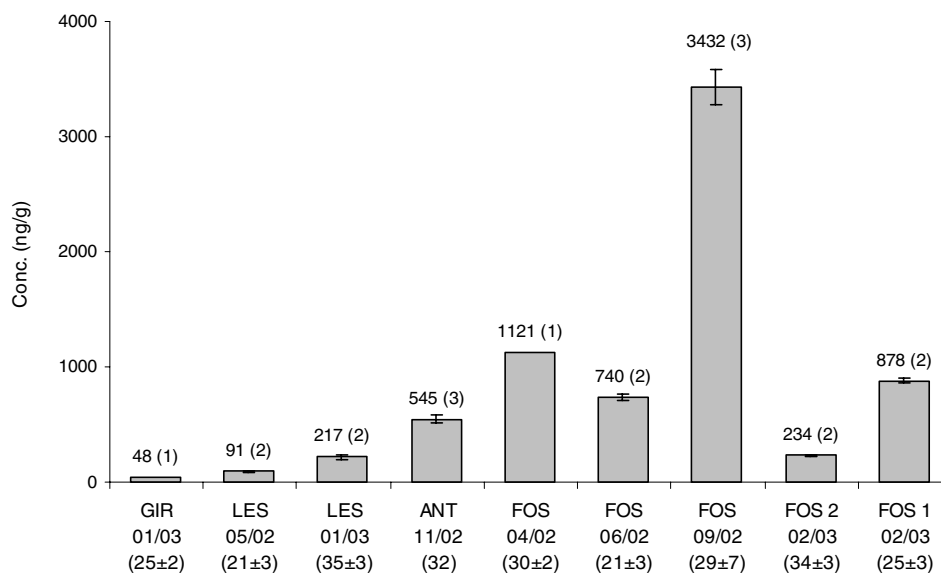
3.2. L'EMBOUCHURE DE LA SEINE (Publication 10) :

Le niveau d'exposition de flets résidant en embouchure de Seine (site de La Fosse) a été évalué et comparé à ceux de flets échantillonnés dans le nord de la baie de Seine (au large du

terminal pétrolier d'Antifer), dans le sud de la Bretagne (dans l'estuaire du Ster, à hauteur de Lesconil) et à l'embouchure de la Gironde. Les résultats bruts de cette étude sont donnés dans l'Annexe 27.

Les teneurs en métabolites mesurées dans la bile de flet de l'embouchure de la Seine se sont révélées être très variables dans le temps (Figure III.24). Elles sont généralement supérieures à celles des autres sites étudiés et notamment plus fortes que celles mesurées chez les flets pêchés au large du port d'Antifer. Les niveaux de métabolites obtenus à Lesconil, situé en sud Bretagne, et à l'embouchure de la Gironde sont par contre généralement largement inférieurs à celles des deux sites de la baie de Seine. Les contributions relatives des métabolites du phénanthrène (variant entre 0% et 15%) et du 1-hydroxypyrene (variant de 55% à 100%) n'indiquent pas de contamination particulière d'origine pétrolière.

Il faut par contre relativiser ces conclusions au vu des différences de concentrations observées en fonction de la taille des poissons (globalement proportionnelle à leur âge). En effet, lors de la dernière campagne réalisée à l'embouchure de la Seine, des individus de deux classes de tailles distinctes ont été échantillonnés (le groupe 1 correspond à la classe de taille la plus petite et le groupe 2 à la plus grande). Les résultats obtenus montrent des concentrations beaucoup plus importantes de métabolites dans la bile des flets les plus jeunes. Ce résultat confirme les résultats obtenus chez les soles du golfe de Gascogne. De plus, l'hypothèse d'une bile plus concentrée dans la vésicule biliaire des individus les plus jeunes pouvant expliquer les différences de concentration mesurées a été invalidée par la mesure de la concentration en protéines de la bile. En effet, l'expression des concentrations en métabolites par rapport à la quantité de protéines biliaires confirme la différence de concentration observée entre les deux classes de tailles (32 ng/mg de protéines pour le groupe 1 et 11 ng/mg de protéines pour le groupe 2). Il apparaît donc important de comparer les teneurs en métabolites pour des poissons appartenant au même groupe d'âge. La réalisation d'un échantillonnage plus large lors de prochaines campagnes permettrait de mieux comparer les différents sites et de mieux évaluer et prévoir les différences entre groupes d'âge.

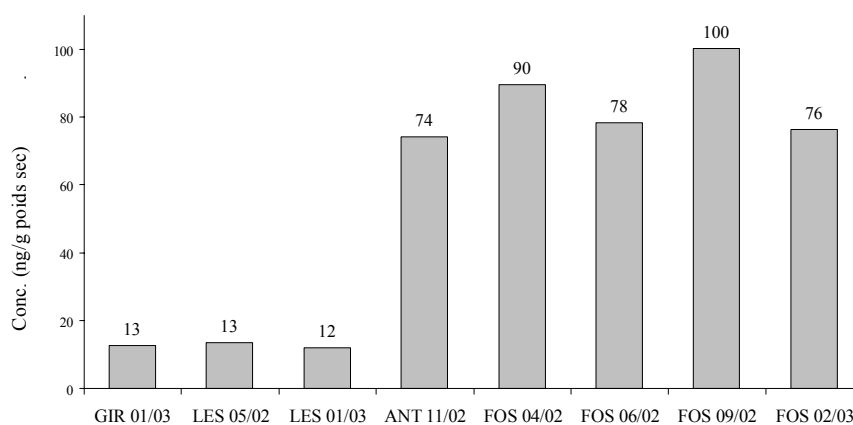


Les composés parents et alkylés quantifiés sont présentés dans l'Annexe 27; Le nombre d'analyses réalisées par échantillon poolé est indiqué entre parenthèses à côté des étiquettes de concentration. Les nombres entre parenthèses indiqués sous les noms des points d'échantillonnages sont les longueurs moyennes des poissons en cm. GIR : embouchure de la Gironde; LES : Lesconil; ANT : large d'Antifer; FOS : La Fosse (FOS 1 : individus les plus petits ; FOS 2 : individus les plus grands)

Figure III.24 : Somme des concentrations en métabolites dans la bile (ng/g)

On peut remarquer que les valeurs les plus faibles obtenues chez le flet sont comparables aux valeurs moyennes obtenues chez la sole en dehors de l'épisode de contamination Erika. Ces résultats confirment d'ailleurs la faible contamination de la Gironde en HAP. En effet, tout comme chez la sole, le niveau de métabolites le plus faible est observé chez les organismes de la Gironde (§ III.3.1). De plus, les teneurs mesurées à l'embouchure de la Seine sont globalement du même ordre de grandeur que celles obtenues lors de la phase aiguë de la marée noire Erika avec cependant un point d'échantillonnage plus élevé chez les flets de La Fosse en septembre 2002. Ces résultats sont compatibles avec les teneurs en HAP mesurées dans la phase dissoute à l'embouchure de la Seine en 1993 (6-26 ng/l pour la somme des 12 HAP de l'US-EPA à partir du phénanthrène + les 3 coéluants ; Fernandes et al., 1997) et suite à la marée noire de l'Erika (4-19 ng/l pour la somme des 16 HAP + coéluants ; Tronczynski et al., 2003).

Contrairement aux résultats obtenus dans les tissus des soles capturées suite à la marée noire de l'Erika, on constate que les teneurs globales en HAP mesurées dans les foies de flets ont globalement le même profil que celles des métabolites mais avec des différences d'amplitude plus faible entre points d'échantillonnage (Figure III.25). On observe ainsi une bioaccumulation plus importante pour le site d'Antifer et surtout pour celui de La Fosse mais avec des variations temporelles et entre sites plus faibles que pour les métabolites. Ces différences peuvent s'expliquer par les différences de contribution et/ou de temps de réponse des phénomènes de biotransformation et de bioaccumulation. En effet, la biotransformation des HAP est un phénomène prépondérant chez les vertébrés alors que la bioaccumulation a une contribution beaucoup plus faible. Ainsi, la mesure des métabolites de HAP permet d'avoir une information sur la différence d'exposition entre individus avec des différences d'amplitude importante (van der Oost et al., 2003) alors que la bioaccumulation, lorsqu'elle a lieu, donne une information avec des différences d'amplitude plus faibles. De même, la biotransformation des HAP est un phénomène rapide chez les vertébrés alors que la bioaccumulation est plus lente. Ainsi, la mesure des métabolites de HAP donne une information sur l'exposition des individus à court terme (quelques jours) alors que l'information donnée par la mesure de la bioaccumulation est à plus long terme (à l'échelle du mois) et est plus délicate à interpréter (Ariese et al., 1993a et c; Altenburger et al., 2003; Meador, 2003). Les teneurs en HAP mesurées chez les flets de Gironde et de Lesconil sont tout à fait comparables avec les niveaux de base observés chez les soles de la côte atlantique (§ III.3.1). De même, les teneurs mesurées chez les flets d'Antifer et de Lesconil sont du même ordre de grandeur que celle observée chez les soles de la baie de Vilaine en février 2000.



GIR : embouchure de la Gironde; LES : Lesconil; ANT : large d'Antifer; FOS : La Fosse

Figure III.25 : Somme de 15 HAP (12 des 16 HAP de l'US-EPA à partir du phénanthrène + 3 coéluants) dans les foies de flet

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le but de cette thèse était de mettre au point un outil permettant d'évaluer l'exposition des organismes, en particulier des poissons, aux HAP dans le milieu marin. La possibilité d'utiliser les produits de biotransformation des HAP chez les organismes marins a été étudiée afin de répondre à cet objectif.

La mise au point d'un protocole analytique permettant le dosage quantitatif de métabolites de HAP individuellement dans les fluides biologiques a été réalisée. Ce protocole, basé sur la technique de l'extraction sur phase solide, permet le traitement simultané d'un grand nombre d'échantillons, contrairement à l'extraction liquide-liquide classiquement employée. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a été retenue pour l'analyse des métabolites de HAP. Ce protocole analytique s'est montré adapté au dosage des métabolites de HAP dans la bile de poisson notamment.

Des expositions en laboratoire ont ensuite permis d'évaluer dans le milieu le comportement de HAP individuels ou présents dans des produits pétroliers, ainsi que leur biotransformation par différentes espèces de poisson.

Le devenir de HAP tels que le phénanthrène, le fluoranthène, le pyrène et le benzo(a)pyrène dans des bassins contenant des soles a ainsi été étudié. Après avoir observé des différences de dissolution entre HAP proportionnelles à leur poids moléculaire et l'absence d'accumulation dans les sédiments lors de ces expositions, des différences d'intensité et de cinétique de biotransformation (et d'excrétion des métabolites dans la bile) ont été mises en évidence. La forte proportion des métabolites de HAP dans la vésicule biliaire des organismes par rapport au foie et au plasma a de plus été mise en évidence. Ces expérimentations ont notamment permis de montrer le potentiel du 1-hydroxypyrene comme indicateur d'exposition des poissons aux HAP en raison du schéma de biotransformation simple du pyrène, de son excrétion rapide dans la vésicule biliaire et de l'ubiquité de ce HAP dans l'environnement. Les 5 isomères monohydroxylés du phénanthrène et 2 métabolites monohydroxylés du fluoranthène ont été détectés dans la bile de sole. De plus, la comparaison des niveaux de HAP dans la phase dissoute avec ceux des métabolites mesurés dans la bile semble indiquer la formation de métabolites autres que monohydroxylés pour ces HAP. Le phénanthrène et le fluoranthène présentent donc des voies de biotransformation plus complexes que le pyrène. Aucun métabolite du benzo(a)pyrène n'a par contre été détecté.

Des expositions de soles à deux fiouls lourds n°2 de type Erika ont permis d'étudier le comportement des HAP issus de ces mélanges dans le milieu aquatique ainsi que leur devenir chez les organismes vertébrés. Il est important de remarquer que des concentrations en HAP généralement plus importantes ont été mesurées dans le deuxième fioul utilisé (fioul B). La première constatation faite au vu des résultats obtenus est que les phénomènes de dissolution dans l'eau des HAP contenus dans un fioul lourd sont des phénomènes très complexes. Ainsi, outre cette différence de composition, une dissolution beaucoup plus importante des HAP dans l'eau a notamment eu lieu lors de l'utilisation du fioul B. Par contre, la bioaccumulation mesurée dans les muscles n'est pas supérieure chez les poissons de cette expérimentation et les différences de teneurs en métabolites indiquent une biotransformation moins importante que ce que les teneurs en HAP dissous laissent suggérer. D'autre part, une prédominance des HAP alkylés a été constatée dans les fiouls et dans la phase dissoute. Par contre, les HAP parents de faible poids moléculaire sont prépondérants dans les tissus de poisson. Ceci suggère des différences de devenir entre HAP dans les organismes. D'ailleurs, différents groupes de HAP ont pu être distingués en fonction de leur devenir dans le milieu et dans les organismes. Ainsi, des différences de dissolution dans l'eau ont été constatées entre HAP en fonction de la température : les composés de plus faible poids moléculaire semblent être davantage présents dans l'eau à 15°C qu'à 5°C, et inversement pour les composés de plus

haut poids moléculaire (à partir des méthylphénanthrènes). A 15°C, les proportions de métabolites de HAP de faible poids moléculaire (hydroxynaphtalènes et 2-hydroxybiphényle) sont plus importantes qu'à 5°C. De plus, à 15°C, les composés parents de moyen et haut poids moléculaire (à partir du fluoranthène) et les composés alkylés (excepté ceux du naphthalène) sont plus abondants dans l'eau des bassins où le pourcentage de fioul est le plus faible. Des différences de bioaccumulation dans les tissus de sole ont également été constatées entre HAP. Ainsi, les composés de plus haut poids moléculaire (à partir des méthylphénanthrènes) sont davantage accumulés dans le foie que dans les muscles alors qu'il n'y a pas de différence significative pour les composés plus légers. De plus, comme il a déjà été remarqué, les HAP parents de faible poids moléculaire (du biphenyle au dibenzothiophène) sont davantage bioaccumulés dans les tissus que les HAP plus lourds et les composés alkylés. Parmi les métabolites de HAP détectés, ceux de plus haut poids moléculaire (hydroxyphénanthrènes et 1-hydroxypyrene) apparaissent d'ailleurs globalement davantage éliminés dans la vésicule biliaire que ceux des HAP de plus faible poids moléculaire. Les métabolites de HAP de plus haut poids moléculaire (chrysène et benzo(a)pyrène) n'ont par contre été détectés dans aucun échantillon. L'âge des poissons semble également provoquer des différences de bioaccumulation entre HAP. Ainsi, les individus les plus jeunes tendent à bioaccumuler plus faiblement les HAP de faible poids moléculaire et plus fortement ceux de haut poids moléculaire dans les muscles que les individus plus âgés. De plus, les métabolites de HAP légers et lourds étudiés présentent des concentrations et des facteurs de biotransformation plus élevés dans la bile des individus jeunes. D'autre part, des résultats préliminaires n'ont pas permis de montrer de différences significatives de biotransformation en fonction du sexe. Le placement des organismes en conditions de dépuraction suite aux expositions a permis de suivre les teneurs en métabolites biliaires lors de la décontamination des poissons à court et à long terme. La prépondérance du 1-hydroxypyrene dans la bile de sole a généralement été constatée ainsi que l'augmentation de la proportion relative des métabolites du phénanthrène par rapport au 1-hydroxypyrene en présence de fioul. Le suivi des métabolites du phénanthrène et du pyrène semble donc être intéressant dans l'optique de caractériser une source de contamination.

L'exposition de turbots et de morues à un pétrole brut en laboratoire a permis de montrer la prédominance du 9-hydroxyfluorène dans la bile de ces organismes contrairement aux soles exposées à un fioul lourd. Les morues présentent des niveaux de métabolites plus élevés dans la bile que les turbots. Les résultats obtenus lors de l'addition d'un mélange d'alkylphénols (perturbateurs endocriniens) lors de certaines expositions indique une influence globalement nulle de ces composés sur les teneurs en métabolites de HAP dans la bile des deux espèces de poisson.

Le protocole de dosage des métabolites de HAP mis au point a ensuite été appliqué lors d'études de terrain afin d'évaluer l'exposition d'organismes aux HAP dans le milieu naturel.

Dans le cadre de la marée noire Erika, l'exposition aux HAP de soles juvéniles vivant dans les nourriceries du golfe de Gascogne a pu être mise en évidence. En effet, des teneurs fortes en métabolites ont été relevées chez les soles capturées environ 2 mois après le naufrage du pétrolier au large des côtes françaises du golfe de Gascogne. Tout comme lors des expositions de soles à du fioul lourd, la distribution des métabolites est caractérisée par la prédominance du 1-hydroxypyrene dans la bile. De plus, la contribution relative des métabolites du phénanthrène lors de cette première campagne est plus importante que lors des campagnes réalisées par la suite. Ces résultats ont montré une contamination des nourriceries de poissons du golfe de Gascogne et la biodisponibilité des HAP issus du fioul de l'Erika vis-à-vis des juvéniles de poissons benthiques. La détermination en parallèle des teneurs en HAP accumulés dans les tissus n'a pas permis de mettre en évidence cette contamination. De plus,

ce suivi environnemental a permis de montrer le caractère passager de cette exposition par la mesure de niveaux faibles de métabolites dès la deuxième campagne (environ 6 mois après le naufrage du pétrolier). Un niveau de référence pour le 1-hydroxypyrene de 50 ± 30 ng/g de bile a été par ailleurs proposé pour les juvéniles de sole du golfe de Gascogne appartenant au groupe d'âge 1, c'est-à-dire étant nées l'année précédant leur capture. La distinction de différents groupes d'âge a de plus permis d'observer des teneurs en métabolites beaucoup plus importantes chez les individus les plus jeunes.

D'autre part, l'étude de la contamination du traict du Croisic suite à la marée noire Erika par la transplantation et le caging de moules provenant de l'entrée du bassin d'Arcachon a permis de mettre en évidence une contamination de ces organismes par des HAP d'origine pétrogénique dont l'empreinte est proche de celle du fioul Erika. Ces résultats suggèrent une contamination rémanente du traict du Croisic par les HAP introduits dans le milieu depuis la marée noire. Cependant, la distribution des HAP dans les moules est caractérisée par une faible proportion des HAP de faible poids moléculaire, pourtant fortement présents dans les fiouls lourds. De plus, seuls les sédiments de l'entrée du traict (Pen Bron) présentent une empreinte pétrogénique et avec des teneurs particulièrement faibles en raison de la nature sableuse des sédiments de ce site. Les teneurs en HAP mesurées dans les moules de ce site sont pourtant du même ordre de grandeur que celles mesurées dans les moules placées au fond du traict. Ces résultats suggèrent une contamination majoritaire des organismes par la phase aqueuse. Cependant, la faible proportion des HAP de faible poids moléculaire dans les moules transplantées semble peu compatible avec une contamination pétrogénique par la phase aqueuse. Les moules transplantées sur le site de Pen Bron sont par ailleurs, d'une manière générale, celles qui présentent les plus fortes altérations tissulaires au niveau des organes examinés. Aucun métabolite de HAP n'a par contre pu être détecté dans la glande digestive des moules transplantées.

Par ailleurs, l'étude des métabolites de HAP dans la bile de flets de baie de Seine et du littoral atlantique français a permis de montrer une exposition importante des organismes aux HAP à l'embouchure et en baie de Seine par rapport aux sites du sud de la Bretagne et de Gironde. La distribution des métabolites est également caractérisée par la prédominance du 1-hydroxypyrene dans la bile de flet. L'examen de la contribution relative des métabolites n'a pas mis en évidence de contamination d'origine pétrogénique significative. Des différences de concentrations en métabolites entre groupes d'âge ont également été mesurées chez les flets. De plus, la comparaison des niveaux de métabolites dans la bile et de HAP dans les tissus a permis de mieux comprendre les phénomènes de biotransformation et de bioaccumulation, tant d'un point de vue cinétique que quantitatif.

Ces travaux ont permis de mettre au point un protocole analytique permettant d'étudier la biotransformation des HAP par les poissons en laboratoire puis d'utiliser les métabolites biliaires de HAP comme biomarqueurs d'exposition des poissons à ces contaminants dans le milieu naturel. Le potentiel particulier de certains métabolites comme le 1-hydroxypyrene a ainsi été mis en évidence ainsi que les précautions à prendre afin de comparer les niveaux de métabolites en fonction de l'âge des poissons.

Les résultats obtenus lors de ces travaux ouvrent de nombreuses perspectives. Il serait ainsi nécessaire de réaliser des études complémentaires afin de mieux comprendre certains phénomènes observés. De nouvelles expérimentations en laboratoire sont ainsi à envisager afin de documenter l'effet de la température, de l'âge et du sexe sur la bioaccumulation et la biotransformation de HAP individuels, en mélange ou présents dans des produits pétroliers. Il apparaît également important de documenter ces effets en milieu naturel. L'élargissement de

ces études à d'autres poissons permettrait de plus d'étudier les différences de biotransformation entre espèces afin d'évaluer la possibilité de comparer les niveaux de métabolites biliaires d'une espèce à l'autre. D'autre part, l'extension de l'étude à d'autres métabolites tels que ceux des dérivés alkylés permettrait de s'intéresser à une classe de composés particulièrement présents dans le cas de contaminations pétrogéniques. De plus, ceci permettrait d'élaborer des outils plus précis de diagnostic de source de contamination.

Les métabolites de HAP pourraient également être utilisés comme biomarqueurs d'effets précoces puisque certains d'entre eux sont reconnus pour leur toxicité. De plus, il apparaît nécessaire de mener des études pluridisciplinaires afin de relier les concentrations de métabolites mesurées chez les organismes avec d'autres types de biomarqueurs tels que les activités enzymatiques, les adduits à l'ADN ainsi que les dommages à l'ADN. Il serait également important d'étudier plus en avant les relations entre ces biomarqueurs et les effets toxiques observés, comme les altérations tissulaires (nécrose, tumeur, cancer,...), les performances physiques (nage, comportement,...) et les effets au niveau des populations (reproduction, renouvellement, migration,...).

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Aas E, Beyer J and Goksøyr A, 1998. PAH in fish bile detected by fixed wavelength fluorescence. *Mar. Environ. Res.*, 46(1-5) : 225-228.
- Aas E and Klungsøyr J, 1998. PAH metabolites in bile and EROD activity in North Sea fish. *Mar. Environ. Res.*, 46(1-5) : 229-232.
- Aas E, Baussant T, Balk L, Liewenborg B and Andersen OK, 2000a. PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquat. Toxicol.*, 51 : 241-258.
- Aas E, Beyer J and Goksoyr A, 2000b. Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic hydrocarbon exposure in fish: an evaluation of compound specificity, inner filter effect and signa interpretation. *Biomarkers*, 5(1) : 9-23.
- Aas E, Beyer J, Jonsson G, Reichert WL and Andersen OK, 2001. Evidence of uptake, biotransformation and DNA binding of polyaromatic hydrocarbons in Atlantic cod and corkwing wrasse caught in the vicinity of an aluminium works. *Mar. Environ. Res.*, 52 : 213-229.
- Abarnou A, Loizeau V, Cugier P, Le Guellec A-M et Ménesguen A, 2000. Modélisation de la bioaccumulation : l'exemple des PCB dans le réseau trophique du bar en estuaire de Seine. Les cahiers du Club CRIN. Modélisation en écologie, Actes Colloque PNETOX, 41-60, Paris, mars 1999.
- Academy_of_Natural_Sciences, 1981. Early life stage studies using the fathead minnow (*Pimephales promelas*) to assess the effects of isophorone and acenaphthene. US Environmental Protection Agency. Philadelphia, PA. (<http://www.epa.gov/>)
- ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie), 1995. Fiche n°4, conention Ademe / IRH environnement, contrat n°2750008.
- AFSSA, 2003. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation des risques sanitaires qui pourraient résulter de la contamination des produits de la mer destinés à la consommation humaine, suite au naufrage du pétrolier Prestige. Saisine n° 2003-SA-0007
- Ahmad I, Pacheco M and Santos MA, en cours d'impression en 2003. Enzymatic and nonenzymatic antioxidants as an adaptation to phagocyte-induced damage in *Anguilla anguilla* L. following in situ harbor water exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*
- Ahokas JT, Pelkonen O and Kärki NT, 1977. Characterisation of benzo(a)pyrene hydroxylase of trout liver. *Cancer Res.*, 37 : 3737-3743.
- Ahokas JT, Saarni DW, Nebert DW and Pelkonen O, 1979. The in vitro metabolism and covalent binding of benzo[a]pyrene to DNA catalysed by trout liver microsomes. *Chem. Biol. Interact.*, 25 : 103-111.
- Ahokas JT and Pelkonen O, 1984. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fish liver cytochrome P-450. *Mar. Environ. Res.*, 14(1-4) : 59-69.
- Aizenshtat Z, 1973. Perylene and its geochemical significance. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 37(3) : 559-567.
- Akcha F, Burgeot T, Narbonne JF and Garrigues P, 2003. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons: role of DNA adduct formation in induced carcinogenesis. In *PAHs: an ecological perspective* (Douben P ed), 65-79. Wiley and Sons, London.
- Akkanen J and Kukkonen JVK, 2003. Biotransformation and bioconcentration of pyrene in *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.*, in press.
- Alberty RA and Reif AK, 1988. Standard chemical thermodynamic properties of polycyclic aromatic hydrocarbons and their isomer groups I. Benzene series. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 17 : 241-253.
- Algarra M, Radin C, De Violet P, Lamotte M, Garrigues P, Hardy M and Gillard R, 2000. Direct fluorimetric analysis of PAHs in water and in urine following liquid solid extraction. *J. Fluorescence*, 10(4) : 355-359.
- Allen JO, Dookeran NM, Taghizadeh K, Lafleur AL, Smith KA and Sarofim AF, 1997. Measurement of Oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Associated with a Size-segregated Urban Aerosol. *Environ. Sci. Technol.*, 31 : 2064-2070.

- Altenburger R, Segner H and van der Oost R, 2003. Biomarkers and PAHs - prospects for the assessment of exposure and effects in aquatic systems. In *PAHs: an ecological perspective* (Douben P ed), 297-328. Wiley and Sons, London.
- Amara R, Lagardère F, Desaunay Y and Marchand J, 2000. Metamorphosis and estuarine colonisation in the common sole, *Solea solea* L. : implications for recruitment regulation. *Oceanologica Acta*, 23(4) : 469-484.
- Anderson JW, Neff JM, Cox BA, Tatem HE and High tower GM, 1974. The effects of oil on estuarine animals: Toxicity, uptake and depuration, respiration. In *Pollution and Physiology of marine organisms*, 285-310.
- Anderson RS, 1978 : Benzo(a)pyrene metabolism in the American oyster *Crassostrea virginica*. *EPA Ecol. Res. Ser. Monogr.*, EPA-600/3-78-009.
- Anderson RS, 1985. Metabolism of a model environmental carcinogen by bivalve molluscs. *Mar. Environ. Res.*, 17 : 137-140.
- Andersson T, Pesonen M and Johansson C, 1985. Differential induction of cytochrome P-450-dependent monooxygenase, epoxide hydrolase, glutathione transferase and UDP glucuronyl transferase activities in the liver of the rainbow trout by β -naphthoflavone or clophen A50. *Biochem. Pharmacol.*, 34(18) : 3309-3314.
- Andersson T and Pärt P, 1989. Benzo[a]pyrene metabolism in isolated perfused rainbow trout gills. *Mar. Environ. Res.*, 28(1-4) : 3-7.
- Andreoli R, Manini P, Bergamaschi E, Mutti A, Franchini I, Niessen WMA, 1999. Determination of naphthalene metabolites in human urine by liquid chromatography-mass spectrometry with electrospay ionization. *J. Chrom. A*, 847(1-2) : 9-17.
- Angerer J, Gündel J, Mannschreck C, Ewers U, Büttner K., 1997. Assessment of PAH Exposure - Residents of an Industrial Area in Germany: Determination of 1-Hydroxyphenanthrene in Urine. *Umweltmedizin in Forschung und Praxis*, 2(1) : 17-22.
- Anulacion B, Lomax D, Bill B, Johnson L and Collier T, 1997. Assessment of antiestrogenic activity and CYP1A induction in English sole exposed to environmental contaminants. In *Proceedings of the SETAC 18th annual meeting*, 137.
- Arbault S, Camus P and Le Bec C, 1986. Estimation of the common sole (*Solea vulgaris*, Quensel 1806) spawning stock by egg survey in the Bay of Biscay. *J. Applied Ichthyology*, 2(4) : 145-156.
- Arcand-Hoy LD and Metcalfe CD, 1999. Biomarkers of exposure of brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*) to contaminants in the lower Great Lakes, north America. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18(4) : 740-749.
- Arkoosh MA, Clemons E, Huffman P, Sanborn HR, Casillas E and Stein JE, 1996. Leukoproliferative response of splenic leukocytes from English sole (*Pleuronectes vetulus*) exposed to chemical contaminants. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15 : 1154-1162.
- Ariese F, Kok SJ, Verkaik M, Gooijer C, Velthorst NH and Hofstraat JW, 1993a. Synchronous fluorescence spectrometry of fish bile: A rapid screening method for the biomonitoring of PAH exposure. *Aquat. Toxicol.*, 26 : 273-286.
- Ariese F, Kok SJ, Verkaik M, Hoornweg GP, Gooijer C, Velthorst NH and Hofstraat JW, 1993b. Chemical derivatization and Shpol'skii spectrofluorometric determination of benzo[a]pyrene metabolites in fish bile. *Anal. Chem.*, 65 : 1100-1106.
- Ariese F, Kok SJ, Verkaik M, Gooijer C, Velthorst NH and Hofstraat JW, 1993c. Monitoring of PAH exposure levels in the marine environment using synchronous scanning fluorescence analysis of 1-hydroxypyrene in fish bile. In *PAH : synthesis, properties, analytical measurements, occurrence and biological effects* (Garrigues P and Lamotte M eds), 1039-1046. Gordon and Breach, London.
- Ariese F, Kok SJ, Gooijer C, Velthorst NH and Hofstraat JW, 1993d. Trace analysis of benzo[a]pyrene metabolites in fish bile using Laser-excited Shpol'skii spectroscopy (LESS). In *PAH : synthesis, properties, analytical measurements, occurrence and biological effects* (Garrigues P and Lamotte M eds), 757-764. Gordon and Breach, London.

- Armstrong DA, Dinnel PA, Orensanz JM, Armstrong JL, McDonald TL, Cusimano RF, Nemeth RS, Landolt ML, Skalski JR, Lee RF and Huggett RJ, 1995. Status of selected bottomfish and crustacean species in Prince William Sound following the Exxon Valdez oil spill. In *Exxon Valdez oil spill: fate and effects in Alaskan waters* (Wells PG, Butler JN and Hughes JS, eds), 485–547. Philadelphia: PA: ASTM STP 1219, American Society for Testing and Materials.
- Arukwe A and Goksøyr A, 1998. Xenobiotics, xenoestrogens and reproduction disturbances in fish. *Sarsia*, 83 : 225-241.
- Atkinson R and Arey J, 1994. Atmospheric chemistry of gas-phase polycyclic aromatic hydrocarbons: Formation of atmospheric mutagens. *Environ. Health. Perspect.*, 102(4) : 117-126.
- Atlas RM and Cerniglia CE, 1995. Bioremediation of petroleum pollutants: Diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation. *BioScience*, 45(5) : 332-338.
- Baars AJ, 2000. Update of the human health-based maximum permissible risk (MPR) for polycyclic aromatic hydrocarbons. RIVM-CSR advisory report n°7059A00. National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands.
- Baek SO, Field RA, Goldstone ME, Kirk PW, Lester JN and Perry R, 1991. A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Sources, fate and behavior. *Water Air Soil Pollut*, 60 : 279-300.
- Bailey NJL, Krouse HH, Evans CR, Rogers MA, 1973. Alteration of crude oil by waters and bacteria - Evidence from geochemical and isotope studies. *AAPG Bull.*, 57 : 1276-1290.
- Balk L, Knall A and DePierre JW, 1982. Separation of the different classes of conjugates formed by metabolism of benzo[a]pyrene in the northern pike (*Esox lucius*). *Acta Chem. Scand. B*, 36 : 403-420.
- Balk L, Meijer J, DePierre JW and Applegren L-E, 1984. The uptake and distribution of [³H]benzo(a)pyrene in the Northern pike (*Esox lucius*). Examination by whole-body radiography and scintillation counting. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 74 : 430.
- Barbas JT, Sigman ME and Dabestani R, 1996. Photochemical oxidation of phenanthrene sorbed on silica gel. *Environ. Sci. Technol.*, 30 : 1776–1780.
- Barbieri O, Ognio E, Rossi O, Astigiano S and Rossi L, 1986. Embryotoxicity of benzo(a)pyrene and some of its synthetic derivatives in Swiss mice. *Cancer Res.*, 46 : 94-98.
- Barek J, Bencko V, Cvacka J, Mejstrik V, Slamova A, Svagrova I, Zima J, 1997. Determination of 1-hydroxypyrene using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Chemicke Listy*, 91(10) : 871-876.
- Barra R, Sanchez-Hernandez JC, Orrego R, Parra O and Galivan JF, 2001. Bioavailability of PAHs in the Biobio river (Chile): MFO activity and biliary fluorescence in juvenile *Oncorhynchus mykiss*. *Chemosphere*, 45 : 439-444.
- Barrick RC and Prahlg FG, 1987. Hydrocarbon geochemistry of the Puget Sound region-III. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments, estuarine, coastal and shelf. *Science*, 25(5) : 175-191.
- Basu N, Billiard S, Fragoso N, Omoike A, Tabash S, Brown S and Hodson P, 2001. Ethoxyresorufin-O-deethylase induction in trout exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20 : 1244-1251.
- Baumann PC, Smith WD and Ribick M, 1982. Hepatic tumor rates and polynuclear aromatic hydrocarbon level in two populations of brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*). In *Polynuclear aromatic hydrocarbons: physical and biological chemistry* (Cooke M, Dennis AJ and Fisher GL, eds), 93-102, Batelle Press, Columbus, OH.
- Baumann PC and Harshbarger JC, 1985. Frequencies of liver neoplasia in a feral fish population and associated carcinogens. *Mar. Environ. Res.*, 17 : 324-327.
- Baumann PC, Smith WD and Parland WK, 1987. Tumor frequencies and contaminant concentrations in brown bullhead from an industrialized river and a recreational lake. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 116 : 76-86.

- Baumann PC, 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, 1997. Les composés aromatiques dans l'environnement marin: biogéochimie et biodisponibilité. *Thèse de l'Université de Bordeaux I*, n° 1788.
- Baumard P and Budzinski H, 1997. Internal standard quantification method and Gas Chromatograph-Mass Spectrometer (GC-MS): a reliable tool for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) quantification in natural matrices. *Analisis*, 25 : 246-252.
- Baumard P, Budzinski H and Garrigues P, 1997. Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues by gas chromatography coupled to mass spectrometry : application to mussels. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 359(6) : 502-509.
- Baumard P, Budzinski H, Garrigues P, Sorbe JC, Burgeot T and Bellocq J, 1998a. Concentrations of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Mar. Pollut. Bull.*, 36(2) : 951-960.
- Baumard P, Budzinski H, Michon Q, Garrigues P, Burgeot T and Bellocq J, 1998b. Origin and Bioavailability of PAHs in the Mediterranean Sea from mussel and sediment records. *Estuarine, Coastal and Shelf Sci.*, 47 : 77-90.
- Bayona JM, Albaiges J, Solanas AM, Pares R, Garrigues P and Ewald M, 1986. Selective aerobic degradation of methyl-substituted polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by pure microbial cultures. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 23 : 289-303.
- Béhar F, Leblond C, Saint Paul C, 1989. Analyse quantitative des effluents de pyrolyse en milieu ouvert et fermé. *Rev. Inst. Français du pétrole*, 44 : 387-509.
- Behymer TD and Hites RA, 1985. Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed on simulated atmospheric particulates. *Environ. Sci. Technol.*, 19 : 1004-1006.
- Béland P, De Guise S et Plante R, 1992. Toxicology and pathology of St. Lawrence marine mammals. Rept. Wildlife Toxicology Fund, World Wildlife Fund (Canada), Toronto.
- Belkin S, Stieber M, Tiehm A, Frimmel FH, Abeliovich A, Werner P and Ullitzur S, 1994. Toxicity and genotoxicity enhancement during polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation. *Environ. Toxicol. Wat. Qual.*, 9 : 303-309.
- Bellail R, 2002. Morue (*Gadus morhua*). Stock de mer Celtique. Divisions VIIe-k du CIEM. Conseil International pour l'Exploitation de la Mer. Ifremer/Porche.
- Bence AE, Kvenvolden KA and Kennicutt MC, 1996. Organic geochemistry applied to environmental assessments of Prince William Sound, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill- a review. *Org. Geochem.*, 24(1) : 7-42.
- Bend JR and James MO, 1978. Xenobiotic metabolism by marine and freshwater species. In *Biochemical and biophysical perspectives in marine biology, Vol. IV* (Malins DC and Sargent HH, eds), 125. Academic Press, New York.
- Bertrand JC and Mille G, 1989. Devenir de la matière organique exogène. Un modèle : les hydrocarbures (Bianchi M, Marty D, Bertrand JC, Caumette P and Gautier M, eds), 373. Masson Paris.
- Beyer J, Sandvik M, Hylland K, Fjeld E, Egaas E, Aas E, Skåre JU and Goksøyr A, 1996. Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed by caging to polluted sediments in Sjørfjorden, Norway. *Aquat. Toxicol.*, 36 : 75-98.
- Beyer J, Sandvik M, Skaare JU, Egaas E, Hylland K, Waagbø R, Goksøyr A, 1997. Time- and dose-dependent biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) exposed to benzo[a]pyrene, 2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyl (PCB-156) and cadmium. *Biomarkers*, 2 : 35-44.
- Beyer J, Aas, E, Borgenvik HK and Ravn P, 1998. 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 Environ. Res.*, 46(1-5) : 233-236.

- Bigelow S and Nebert D, 1982. The Ah regulatory gene product. Survey of nineteen polycyclic aromatic compounds and fifteen benzo(a)pyrene metabolites capacity to the cytosolic receptor, *Toxicol. Lett.* 10, 109-118.
- Billiard SM, Hodson PV, Bols NC, 2000. Does the potency of polycyclic aromatic hydro-carbons (PAHs) for inducing CYP1A1 in juvenile trout (*Oncorhynchus mykiss*) predict dioxin-like toxicity in early life stages? *Mar. Environ. Res.*, 50(1-5) : 308-309.
- Billiard SM, 2001. Toxicological significance of CYP1A induction in teleosts exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *PhD thesis*. Queen's University, Kingston, ON, Canada.
- Bjorseth A and Olufsen S, 1983. Long transport of polycyclic aromatic hydrocarbons. In *Polycyclic aromatic hydrocarbons* (Bjorseth A, ed), 507-524. Marcel Dekker, New York.
- Blanton RH, Lyte M, Myers MJ and Bick PH, 1986. Immunomodulation by polyaromatic hydrocarbons in mice and murine cells. *Cancer Res.*, 46 : 2735-2739.
- Blumer M, 1976. Polycyclic aromatic compounds in nature. *Scientific American*, 234 : 35-45.
- Boffetta P, Jourenkova N et Gustavsson P, 1997. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control*, 8 : 444-472.
- Boleas S, Fernandez C, Beyer J, Tarazona JV and Goksøyr A, 1998. Accumulation and effects of benzo(a)pyrene on cytochrome P450 in waterborne exposed and intraperitoneal injected juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Mar. Environ. Res.*, 46(1-5) : 17-20.
- Bols NC, Schirmer K, Joyce EM, Dixon DG, Greenberg BM and whyte JJ, 1999. Ability of polycyclic aromatic hydrocarbons to induce 7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity in a trout liver cell line. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 44 : 118-128.
- Boos KS, Lintelmann J and Kettrup A, 1992. Coupled-column high-performance liquid chromatographic method for the determination of 1-hydroxypyrene in urine of subjects exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Chromatogr.*, 600 : 189-194.
- Borneff J, 1977. Fate of carcinogens in aquatic environments. In *Fate of pollutants in the air and water environments, part 2* (Suffet IH, ed), 393-408. Wiley, New York.
- Bouloubassi I and Saliot A, 1993. Investigation of anthropogenic and natural organic inputs in estuarine sediments using hydrocarbon markers. *Oceanologica Acta*, 16(2) : 145-161.
- Boyd RK, 1993. Quantitative trace analysis by combined chromatography and mass spectrometry using external and internal standards. *Rapid communications in mass spectrometry*, 7 : 257-271.
- Boyland E et/ou Sims P. Metabolism of polycyclic compounds. *Biochem. J.* Série de publications.
- Boyland E and Sims P, 1965. Metabolism of polycyclic compounds: the metabolism of phenanthrene in rabbits and rats: dihydrodihydroxy compounds and related glucosiduronic acids. *Biochem. J.*, 84 : 571
- Brandt SG, Mason DM and Patrick EV, 1992. Spatially explicit models of fish growth rate. *Fisheries*, 17 : 23-35.
- Britvić S, Lucić D and Kurelec B, 1993. Bile fluorescence and some early biological effects in fish as indicators of pollution by xenobiotics. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12 : 765-773.
- Brodkorb TS and Legge RL, 1992. Enhanced biodegradation of phenanthrene in oil tar-contaminated soils supplemented with *phanerochaete chysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 : 3117-3121.
- Brookes P and Lawley PD, 1964. Evidence of the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin: Relation between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to deoxyribonucleic acid. *Nature*, 202 : 781-784.
- Brown RC, Pierce RH and Rice SA, 1985. Hydrocarbon contamination in sediments from urban stormwater runoff. *Mar. Pollut. Bull.*, 16 : 236-240.
- Brummage KG, 1975. The sources of oil entering the sea. In *Background papers for a workshop on inputs, fate and effects of petroleum in the environment*, 1-6. National academy of science, Washington, DC.

- Bucheli TD and Fent K, 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 25 : 201-268.
- Budzinski H, 1993. Les composés aromatiques alkylés dans les échantillons pétroliers : Aspects physico-chimiques et thermodynamiques. *Thèse de doctorat de l'Université de Bordeaux I*, n°893.
- Budzinski H, Garrigues P, Conan J and Bellocq J, 1993a. Thermodynamic calculations on alkylated phenanthrenes: geochemical applications to maturity and origin of hydrocarbons. *Org. Geochem.*, 20(7) : 917-926.
- Budzinski H, Garrigues P, Radke M, Conan J and Oudin JL, 1993b. Identification of alkylated dibenzothiophenes : Application to organic geochemistry. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 3(suppl) : 611-620.
- Budzinski H, Garrigues P, Conan J and Bellocq J, 1993c. Chromatographic fractionation of aromatic compounds from ancient and recent sediments for access to alkylated PAH by GC-FID and GC-MS. *Quimica Analytica*, 12 : 69-74.
- Budzinski H, Garrigues P, Conan J, Devillers J, Donine D, Radke M and Oudin JL, 1995a. Alkylated phenanthrene distribution as maturity and origin indicators in crude oils and rock extracts. *Geochem. Cosmo. Acta*, 59(10) : 2043-2056.
- Budzinski H, Papineaud A, Baumard P et Garrigues P, 1995b. Extraction assistée par chauffage micro-ondes focalisées (MOF) à pression ambiante des composés organiques dans les matrices naturelles: application à l'analyse des composés aromatiques. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 321 : 69-76.
- Budzinski H, Baumard P, Papineaud A, Wise S and Garrigues P, 1996. Focused microwave assisted extraction of polycyclic aromatic compounds from standard reference materials, sediments and biological tissues. In *Proceeding of the 15th international symposium on polycyclic aromatic compounds*, Belgrate, Italy, 225-232.
- Budzinski H, Jones I, Bellocq J, Pierard C and Garrigues P, 1997. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Mar. Chem.*, 58 : 85-97.
- Budzinski H, Raymond N, Nadalig T, Gilewicz M, Garrigues P, Bertrand JC and Caumette P, 1998. Aerobic biodegradation of alkylated aromatic hydrocarbons by a bacterial community. *Org. Geochem.*, 28(5) : 337-348.
- Budzinski H, Raymond N, Nadalig T, Gilewicz M, Garrigues P, Bertrand JC, Caumette P, 1998. Aerobic biodegradation of alkylated aromatic hydrocarbons by a bacterial community. *Org. Geochem.*, 28(5) : 337-348.
- Budzinski H, Letellier M, Garrigues P and Le Menach K, 1999. Optimization of the microwave-assisted extraction in open cell of polycyclic aromatic hydrocarbons from soils and sediments : Study of moisture effect. *J. Chrom.*, 837(1-2) : 187-200.
- Buhler DR et Williams DE, 1989. Enzymes involved in metabolism of PAH by fishes and other aquatic animal: oxidative enzymes (or phase I enzymes). In *Metabolism of PAH in the aquatic environment* (Varanasi U, ed), 151-184. CRC, Boca Raton, FL, USA.
- Buhler DR and Wang-Buhler JL, 1998. Rainbow trout cytochrome P450s: purification, molecular aspects, metabolic activity, induction and role in environmental monitoring. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 121 : 107-137.
- Burgeot T, Bocquené G, Pingray G, Godefroy D, Legrand J, Dimeet J, Marco F, Vincent F, Henocque Y, Jeanneret HO, Galgani F, 1994. Monitoring biological effects of contamination in marine fish along French coasts by measurement of ethoxyresorufin-O-deethylase activity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 29 : 131-147.
- Burgeot T, Bocquené G, Porte C, Dimeet J, Santella RM, Dimeet J, Santella RM, Garcia de la Parra LM, Pftol-Leszkowicz A, Raoux C and Galgani F, 1996. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean. *Sea. Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 131 : 125-141.
- Burke MD and Mayer RT, 1974. Ethoxyresorufin: direct fluorometric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab. Dispos.*, 2 : 583-588.

- Butler JD and Crossley P, 1981. Reactivity of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed on soot particles. *Atmos. Environ.*, 15 : 91-94.
- Cadiou B et Boulinier T, 2003. Détermination de l'origine géographique des oiseaux impactés par le naufrage du pétrolier Erika. Colloque scientifique *L'après Erika, le milieu marin sous surveillance*, présentation orale.
- Camus L, Aas E, Børseth JF, 1998. Ethoxyresorufin-O-deethylase activity and fixed wavelength fluorescence detection of PAHs metabolites in bile in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) exposed to dispersed topped crude oil in a continuous flow system. *Mar. Environ. Res.*, 46(1-5) : 29-32.
- Cantrell SM, Lutz LH, Tillit DE and Hannink M, 1996. Embryotoxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): The embryonic vasculature is a physiological target for TCDD-induced DNA damage and apoptotic cell death in medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 141 : 23-34.
- Capuzzo JM, 1980. Biological effect of petroleum hydrocarbons on marine organisms : integration of experimental results and predictions of impacts. *Mar. Environ. Res.*, 17 : 272-276.
- Casillas E, Misitano DA, Johnson LL, Rhodes LD, Collier TK, Stein JE, McCain BB and Varanasi U, 1991. Inducibility of spawning and reproductive success of female English sole (*Parophrys vetulus*) from urban and nonurban areas of Puget Sound, Washington. *Mar. Environ. Res.*, 31 : 99-122.
- Cedre, 2000. Bulletin d'information du centre de documentation de recherche et d'expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux n°13, 1^{er} et 2^e semestres 1999-1^{er} semestre 2000.
- Celander M, Leaver MJ, George SG and Förllin L, 1993. Induction of cytochrome P450 1A1 and conjugating enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver: a time course study. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 106 : 343-349.
- Cerniglia CE and Heitkamp MA, 1989. Microbial degradation of PAH in the aquatic environment. In *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment* (Varanasi U, ed), 41-68. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Cerniglia CE, Gibson DT and Dodge RH, 1994. Metabolism of benz(a)anthracene by the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 : 3931-3938.
- Chaloupka K, Krishnan V and Safe S, 1992. Polynuclear aromatic hydrocarbon carcinogens as antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells: role of the Ah receptor. *Carcinogenesis*, 13(12) : 2233-2239.
- Chasseaud LF, 1979. The role of glutathione and glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv. Cancer Res.*, 29 : 175-274.
- Christensen M, Andersen O and Banta GT, 2002. Metabolism of pyrene by the polychaetes *Nereis diversicolor* and *Arenicola marina*. *Aquat. Toxicol.*, 58 : 15-25.
- Cincinelli A, Stortini AM, Perugini M, Checchini L and Lepri L, 2001. Organic pollutants in sea-surface microlayer and aerosol in the coastal environment of Leghorn— (Tyrrhenian Sea). *Mar. Chem.*, 76 : 77-98.
- Claisse D, 1989. Chemical contamination of French coasts. The results of a ten years mussel watch. *Mar. Pollut. Bull.*, 20(10) : 523-528.
- Clark RC and MacLeod WD, 1977. Inputs, transport mechanisms and observed concentrations of petroleum on arctic and subarctic marine environments and organisms. In *Nature and Fate of Petroleum* (Malins DC, ed), 91-224. Academic Press, NY.
- Clarke DJ, George SG and Burchell B, 1991. Glucuronidation in fish. *Aquat. Toxicol.*, 20 : 35-56.
- Collier TK, Thomas LC and Malins DC, 1978. Influence of environmental temperature on disposition of dietary naphthalene in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) : isolation and identification of individual metabolites. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 61 : 23-28.
- Collier TK, Krahn MM and Malins DC, 1980. The disposition of naphthalene and its metabolites in the brain of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Environ. Res.*, 23(1) : 35-41.

- Collier TK and Varanasi U, 1987. Biochemical indicators of contaminant exposure in flatfish from Puget Sound, WA. In *Oceans 87 Proceedings, Vol. 5, Coastal and Estuarine Pollution*, 1544-1549. Available from IEEE, 445 Hoes Lane, Piscataway, NJ 08854.
- Collier TK and Varanasi U, 1991. Hepatic activities of xenobiotic metabolizing enzymes and biliary levels of xenobiotics in English sole (*Parophrys vetulus*) exposed to environmental contaminants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 20 : 462-473.
- Collier TK, Singh SV, Awasthi YC and Varanasi U, 1992. Hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in two species of benthic fish showing different prevalences of contaminant-associated liver neoplasms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 113 : 319-324.
- Collier TK, Stein JE, Goksøyr A, Myers MS, Gooch JW, Huggett RJ and Varanasi U, 1993a. Biomarkers of PAH exposure in oyster toadfish (*Opsanis tau*) from the Elisabeth River, Virginia. *Environ. Sci.*, 2 : 161-177.
- Collier TK, Krahn MM, Krone CA, Johnson LL, Myers MS, Chan S-L and Varanasi U, 1993b. Oil exposure and effects in subtidal fish following the Exxon Valdez oil spill. In *Proceedings of the 1993 International Oil Spill Conference*, Tampa Bay, FL.
- Collier TK, Anulacion BF, Stein JE, Goksøyr A and Varanasi U, 1995. A field evaluation of cytochrome P450 1A as a biomarker of contaminant exposure in three species of flatfish, *Environ. Toxicol. Chem.*, 14 : 143-152.
- Collier TK, Johnson LL, Stehr CM, Myers MS and Stein JE, 1998a. A comprehensive assessment of the impacts of contaminants on fish from an urban waterway. *Mar. Environ. Res.*, 46(1-5) : 243-247.
- Collier TK, Johnson LL, Myers MS, Stehr CM, Krahn MM and Stein JE, 1998b. Fish injury in the Hylebos Waterway in Commencement Bay, Washington. U.S. Dept. Commer., NOAA Tech. Memo. NMFS-NWFSC-36, 576 p.
- Commandeur JNM, Stijntjes GJ and Vermeulen NPE, 1995. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. *Pharmacol. Rev.*, 47 : 271-330.
- Commission Européenne, 2002. Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of PAH in food.
- Conney AH, 1982. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Res.*, 42 : 4875-4917.
- Connolly JP, 1991. Application of a food chain model to polychlorinated biphenyl contamination of the lobster and winter flounder food chains in New Bedford harbor. *Environ.Sci.Technol.*, 25 : 760-770.
- Cormier SM, Lin ELC, Fulk F and Subramanian B, 2000. Estimation of exposure criteria values for biliary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolite concentrations in white suckers (*Catostomus commersoni*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 19(4(2)) : 1120-1126.
- Corner EDS, Kilvington CC and O'Hara SCM, 1973. Qualitative studies on the metabolism of naphthalene in *Maia squinado* (Herbst). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 53 : 819-832.
- Cravedi JP, Lafuente A, Baradat M, Hillenweck A and Perdu-Durand E, 1999. Biotransformation of pentachlorophenol, aniline and biphenyl in isolated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes : comparison with in vivo metabolism. *Xenobiotica*, 29(5) : 499-509.
- Dame RF, 1996. Ecology of marine bivalves: an ecosystem approach. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Dauvin JC (coord.), 2002. Patrimoine biologique et chaînes alimentaires. Fascicule n°7, programme scientifique Seine-Aval.
- Deal CL, 1995. The role of metabolic activation in B[a]P-induced suppression of the humoral immune response. Doctoral Thesis, Richmond, Virginia, Virginia Commonwealth University, Medical College of Richmond.

- Dean JH, Luster MI, Boorman GA, Lauer LD and Leubke RW, 1983. Selective immunosuppression resulting from exposure to the carcinogenic congener benzopyrene in B6C3F1 mice. *Clin Exp Immunol*, 52 : 199-206.
- Dean JH, Ward EC, Murray MJ, Lauer LD, House RV, Stillman W, Hammilton TA and Adams DO, 1986. Immunosuppression following 7,12-dimethylbenz[a]anthracene exposure in B6C3F1 mice. II. Altered cell-mediated immunity and tumor resistance. *Int. J. Immunopharmacol.*, 8 : 189-198.
- De Flora S, Bagnasco M and Zanacchi P, 1991. Genotoxic, carcinogenic and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. *Mutat. Res.*, 258 : 285-320.
- DeGraeve GM, Elder RG, Woods DC and Bergman HL 1982. Effects of naphthalene and benzene on fathead minnows and rainbow trout. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 11 : 487-490.
- Denison M and Wilkinson C, 1985. Identification of the Ah receptor in selected mammalian species and induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *Eur. J. Biochem.*, 147 : 429-435.
- Deshpande AD, 1989. High performance liquid chromatographic separation of fish biliary polynuclear aromatic hydrocarbon metabolites. *Arch. Environ. Cont. Toxicol.*, 18 : 900-907.
- Deshpande AD, Huggett RJ and Halbrook RA, 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in the bile of a territorial benthic fish, oyster toadfish (*Opsanus tau*) from the Elizabeth River, Virginia. *Arch. Environ. Cont. Toxicol.*, 42 : 43-52.
- Di Giulio RT, Washburn PC, Wenning RJ, Winston GW and Jewell CS, 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.*, 8 : 1103-1123.
- Di Giulio RT, 1991. Indices of oxidative stress as biomarkers for environmental contamination. In *Aquatic toxicology and risk assessment: Fourteenth volume* (Mayes MA and Barron MG eds), 15-31. ASTM STP 1124, American society for testing and materials, Philadelphia, PA.
- Dixit D and Anderson JW, 1977. Distribution of naphthalenes within exposed *Fundus Similus* and correlations with stress behaviour. In *Proceedings, 1977 Oil Spill Conference*, 633-636. New Orleans, Louisiana. American Petroleum Institute, publication n°4284, New York, NY.
- Donohoe RM and Curtis LR, 1996. Estrogenic activity of chlordecone, o,p'-DDT and o,p'-DDE in juvenile rainbow trout: induction of vitellogenesis and interaction with hepatic estrogen binding sites. *Aquat. Toxicol.*, 36 : 31-52.
- Douglas GS, Bence AE, Prince RC, Mcmillen S and Butler EL, 1996. Environmental stability of selected hydrocarbon source and weathering ratios. *Environ. Sci. Technol.*, 30 : 2332-2339.
- Dunn BP, Black JJ and Maccubbin A, 1987. P-Postlabelling analysis of aromatic DNA adducts in fish from polluted areas. *Cancer Res.*, 47 : 6543-6548.
- Dunn BP, Fitzsimmons J, Stalling D, MacCubbin AE and Black JJ, 1990. Pollution-related aromatic DNA adducts in liver from populations of wild fish. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 31 : 570.
- Dutton GJ and Montgomery JP, 1958. Glucuronide synthesis in fish and the influence of temperature. *Biochem. J.*, 70 : 17.
- Eddy S, Misitano DA and Casillas E, 1993. Relative sensitivity of two species of larval flatfish to a model mixture of PCBs and fluoranthene. In *Proceeding of 1993 Pacific Northwest regional SETAC meeting*, Newport, OR.
- EEA (European Environment Agency), 2002. The North Sea cod stock ? Historical development in recruitment and spawning stock biomass. Eurostat 2002, EEA Data Service.
- Egaas E and Varanasi U, 1982. Effects of polychlorinated biphenyls and environmental temperature on *in vitro* formation of benzo[a]pyrene metabolites by liver of trout (*Salmo gairdneri*). *Biochem. Pharmacol.*, 31(4) : 561-566.
- Eggens ML, Vethaak AD, Leaver MJ, Horbach GJM, Boon JP and Seinen W, 1996a. Differences in CYP1A response between flounder (*Platichthys flesus*) and plaice (*Pleuronectes platessa*) after long-term exposure to harbour spoil in a mesocosm study. *Chemosphere*, 32(7) : 1357-1380.

- Eggens ML, Opperhuizen A and Boon JP, 1996b. Temporal variation of CYP1A indices, PCB and 1-OH pyrene concentration in flounder, *Platichthys flesus*, from the Dutch Wadden Sea. *Chemosphere*, 33(8) : 1579-1596.
- Eickhoff CV, Gobas FAPC and Law F, 2003. Screening pyrene metabolites in the hemolymph of dungeness crabs (*Cancer magister*) with synchronous fluorescence spectrometry: method development and application. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22(1) : 59-66.
- Escartín E and Porte C, 1999a. Assessment of PAH pollution in coastal areas from the NW Mediterranean through the analysis of fish bile. *Mar. Poll. Bull.*, 38(12) : 1200-1206.
- Escartín E and Porte C, 1999b. Biomonitoring of PAH pollution in high-altitude mountain lakes through the analysis of fish bile. *Environ. Sci. Technol.*, 33 : 406-409.
- Escartín E and Porte C, 1999c. Hydroxylated PAHs in bile of deep-sea fish. Relationship with xenobiotic metabolizing enzymes. *Environ. Sci. Technol.*, 33 : 2710-2714.
- Estabrook RW, Werringloer J, Capdevila J and Prough RA, 1978. The role of cytochrome P-450 and the microsomal electron transport system : the oxidative metabolism of benzo(a)pyrene. In *Polycyclic hydrocarbons and cancer* (Gelboin HV and Ts'o POP, eds). Academic Press.
- Everaarts JM, Sleiderink HM, den Besten PJ, Halbrook RS and Shugart LR, 1994. Molecular responses as indicators of marine pollution: DNA damage and enzyme induction in *Limanda limanda* and *Asterias rubens*. *Environ. Health Perspec.*, 102(suppl. 12) : 37-43.
- Fabacher DL, Besser JM, Schmitt CJ, Harshbarger JC, Peterman PH and Lebo JA, 1991. Contaminated sediments from tributaries of the Great Lakes; chemical characterization and carcinogenic effects in medaka (*Oryzias latipes*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 20 : 17-34.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2000-2003. Species Identification and Data Programme, Fisheries global Information System, Species Identification Sheets.
- Farrington JW, 1986. Fossil fuel aromatic hydrocarbon biogeochemistry in the marine environment: Research challenges. In *Strategies and advanced techniques for marine pollution studies: Mediterranean Sea* (Giam CS and Dou HJ-M, eds), 113-141. NATO ASI Series. Springer-Verlag, Berlin, Federal republic of Germany.
- Fent K, Ackermann G and Schaiger J, 2000. Long-term effects of nonylphenol on vitellogenine and zona radiate protein expression in juvenile rainbow trout. In Proceedings of the 6th International Conference on Reproduction Physiology of Fish (Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL, Andersson E and Stefansson SO, eds), 356-358. Bergen, Norway.
- Fernandes MB and Sicre M-A, Boireau A and Tronczynski, 1997. Polyaromatic hydrocarbon (PAH) distributions in the Seine River and its estuary. *Mar. Poll. Bull.*, 34(11) : 857-867.
- Fernandes MB and Sicre M-A, 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the Arctic Ob and Yenisei estuaries and Kara Sea shelf. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 48(6) : 725-738.
- Fernandes D, Potrykus J, Morsiani C, Raldua D, Lavado R and Porte C, 2002. The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality in two low-stream Rivers (NE Spain). *Environ. Res. Section A*, 90 : 169-178.
- Ferrari St, Mandel F and Berset, 2002. Quantitative determination of 1-hydroxypyrene in pobyne urine samples using high-performance liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometric detection. *Chemosphere*, 47 : 173-182.
- Fertuck KC, Kumar S, Sikka HC, Matthews JB and Zacharewski TR, 2001. Interaction of PAH-related compounds with the α and β isoforms of the estrogen receptor. *Toxicol. Letters*, 121 : 167-177.
- Fillmann G, Watson GM, Francioni E, Readman JW and Depledge MH, 2002. A non-destructive assessment of the exposure of crabs to PAH using ELISA analyses of their urine and haemolymph. *Mar. Environ. Res.*, 54 : 823-828.

- Fischer E, Henze G, Platt KL, 1998. Sensitive and selective determination of metabolically formed trans-dihydrodiols and phenols of benzo[a]pyrene in water and urine samples by HPLC with amperometric detection. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 360(1) : 95-99.
- Flammarion P and 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.
- Förlin L, Blom S, Celander M and Sturve J, 1996. Effects on UDP glucuronosyl transferase, glutathione transferase, DT-diaphorase and glutathione reductase activities in rainbow trout liver after long-term exposure to PCB. *Mar. Environ. Res.*, 42 : 213-216.
- Fouremant GL, 1989. Enzymes involved in metabolism of PAH by fishes and other aquatic animal: hydrolysis and conjugation enzymes (or phase II enzymes). In *Metabolism of PAH in the aquatic environment* (Varanasi U, ed), 185-202. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Freeman DJ and Cattell CR, 1990. Woodburning as a source of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.*, 24 : 1581-1585.
- French BL, Reichert WL, Hom T, Nishimoto M, Sanborn H and Stein JE, 1996. Accumulation and dose-response of hepatic DNA adducts in English sole (*Pleuronectes vetulus*) exposed to a gradient of contaminated sediments. *Aquat. Toxicol.*, 36 : 1-16.
- Fucik KW and Neff JM, 1977. Effects of temperature and salinity of naphthalene uptake in the temperate clam, *Rangia cuneata*, and the boreal clam, *Protothaca staminea*. In *Fate and Effects of Petroleum Hydrocarbons in Marine Organisms and Ecosystems* (Wolfe DA ed.), 305-312. Pergamon Press, New York.
- Gagnon MM and Holdway DA, 2000. EROD induction and biliary metabolite excretion following exposure to the water accommodated fraction of crude oil and to chemically dispersed crude oil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 38 (1) : 70-77.
- Gagnon MM and Holdway DA, 2002. EROD activity, serum SDH and PAH biliary metabolites in sand flathead (*Platycephalus bassensis*) collected in Port Phillip Bay, Australia. *Mar. Poll. Bull.*, 44 : 230-237.
- Galceran MT and Moyano E, 1996. Determination of hydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography-mass spectrometry. Comparison of atmospheric pressure chemical ionization and electrospray. *J. Chromatogr. A*, 731 : 75-84.
- Galgani F, Bocquene G, Lucon M, Grzebyk D, Letrouit F and Claisse D, 1991. EROD measurements in fish from the Northwest part of France. *Mar. Pollut. Bull.*, 22(10) : 494-500.
- Galgani F and Payne JF, 1991. Biological Effects of contaminants - Microplate method for measurements of ethoxyresorufin o-deethylase (EROD) in fish. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, n°13.
- Gardner WS, Lee RF, Tenore KR and Smith LW, 1979. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in coastal sediments: importance of microbes and polychaete worms. *Water Air Soil Pollut.*, 11 : 339.
- Garrigues P, de Sury R, Angelin ML, Bellocq J, Oudin JL and Ewald M, 1988. Relation of the methylated aromatic hydrocarbon distribution pattern to the maturity of organic matter in ancient sediments from the Mahakam delta. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 52 : 375-384.
- Garrigues P, Oudin JL, Parlanti E, Monin JC, Robcis S and Bellocq J, 1990. Alkylated phenanthrene distribution in artificially matured kerogens from Kimmeridge clay and the Brent formation (North Sea). Dans "Advances in organic geochemistry 1989". Org. *Geochem.*, 16 : 167-173.
- Gelboin HV, 1980. Benzo[a]pyrene metabolism, activation, and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol. Rev.*, 60 : 1107-1166.
- George SG, 1994. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In *Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular perspectives* (Malins DC and Ostrander GK, Eds), 37-85. Lewis Publishers, CRC press.

- GESAMP (Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection), 1993. Impact of oil and related chemicals and wastes on the marine environment. GESAMP Report 50.
- Gilfillan ES, Jiang LC, Donovan D, Hanson S and Mayo DW, 1976. Reduction in carbon flux in *Mya arenaria* caused by a spill of n°2 fuel oil. *Mar. Biol.*, 37 : 115.
- Gillesby BE and Zacherewski TM, 1998. Exoestrogens: mechanisms of action and strategies for identification and assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17 : 3-14.
- Gmeiner G, Krassnig C, Schmid E, Tausch H, 1998. Fast screening method for the profile analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in urine using derivatisation–solid-phase microextraction. *J. Chrom. B*, Short communication, 705 : 132–138.
- Gmeiner G, Gärtner P, Krassnig C and Tausch H, 2002. Identification of various urinary metabolites of fluorene using derivatization solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. B*, 766 : 209-218.
- Gmur DJ and Varanasi U, 1982. Characterisation of benzo[a]pyrene metabolites isolated from muscle, liver, and bile of a juvenile flatfish. *Carcinogenesis*, 3(12) : 1397-1403.
- Gobas FAPC and Zhang X, 1994. Interactions of Organic Chemicals with Organic Matter in the Aquatic Environment. *Environ. Toxicol. Chem.*, Special Publication on "Bioavailability: Physical, Chemical and Biological Interactions" (Hamelink JL, Landrum PF, Bergman HL and Benson WH, eds) , 83-91. Lewis Publishers, Chelsea, MI.
- Goeptar AR, Scheerens H and Vermeulen NPE, 1995. Oxygen reductase and substrate reductase activity of cytochrome P450. *Crit. Rev. Toxicol.*, 25 : 25-65.
- Goksøyr A, Klungsoyr J and Solbakken JE, 1985. Cytochrom P-450 in cod (*Gadus morhua*): Effects of inducers on regiospecificity of phenanthrene metabolism and immunochemical properties. *Mar. Environ. Res.*, 17(2-4) : 87-90.
- Goksøyr A, Solbakken JE and Klungsoyr J, 1986. Regioselective metabolism of phenanthrene in Atlantic cod (*Gadus morhua*) : studies on the effects of monooxygenase inducers and role of cytochromes P-450. *Chem.-Biol. Interactions*, 60 : 247-263.
- Goksøyr A, Anderson T, Hansson T, Klungsoyr J, Zhnag U and Forlin L, 1987. Species characteristics of the hepatic xenobiotic and steroid biotransformation systems of two teleost fish, Atlantic cod (*Gadus morhua*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 89 : 347-360.
- Goksøyr A, Husøy AM, Larsen HE, Klungsoyr J, Wilhelmsen S, Maage A, Brevik EM, Andersson T, Celander M, Pesonen M and Förlin L, 1991. Environmental contaminants and biochemical responses in flatfish from the Hvaler Archipelago in Norway. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 21 : 486-496.
- Goksøyr A and Förlin L, 1992. The cytochrome P450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquat. Toxicol.*, 22 : 287-312.
- Goksøyr A, Beyer J, Husøy AM, Larsen HE, Westrheim K, Wilhelmsen S and Klungsoyr J, 1994. Accumulation and effects of aromatic and chlorinated hydrocarbons in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) caged in a polluted fjord (Sørfjorden, Norway). *Aquat. Toxicol.*, 29 : 21-35.
- Gosling E, 1992. The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.
- Gourlay C, Miege C, Garric J, Tusseau-Vuillemin M-H and Mouchel J-M, 2002. The use of spectrofluorimetry for monitoring the bioaccumulation and the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Daphnia magna*. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 22 : 501-516.
- Govers HC, Ruepert C and Aiking H, 1984. Quantitative structure- activity relationships for polycyclic aromatic hydrocarbons: correlation between molecular connectivity, physico- chemical properties, bioconcentration and toxicity in *Daphnia Pulex*. *Chemosphere*, 13 : 227- 236.
- Gravato C and Santos MA, 2003. *Dicentrarchus labrax* biotransformation and genotoxicity responses after exposure to a secondary treated industrial/urban effluent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 55 : 300–306.

- Greiner AC, Spyckerelle C, Albrecht P and Ourisson G, 1977. Hydrocarbures aromatiques d'origine géologique. V. Dérivés mono- et di- aromatiques du hopane. *J. Chem. Res.*, Miniprint, 3829-3871.
- Grishchenkov VG, Townsend RT, McDonald TJ, Autenrieth RL, Bonner JS and Boronin AM, 2000. Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Process Biochem.*, 35(9) : 889-896.
- Gruger EH, Schnell JV, Fraser PS, Brown DW and Malins DC, 1981. Metabolism of 2,6-dimethylnaphthalene in starry flounder (*Platichthys stellatus*) exposed to naphthalene and *p*-cresol. *Aquat. Toxicol.*, 1 : 37.
- Gschwend PM and Hites RA, 1981. Fluxes of polycyclic aromatic hydrocarbons to marine and lacustrine sediments in the northeastern United States. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 45 : 2359-2367.
- Guarino AM, Briley PM, Anderson JB, Kinter MA, Schneiderman S, Klipp LD and Adamson RH, 1972. Renal and hepatic excretion of foreign chemicals by *Squalus acanthias*. *Bull. Mt. Desert Isl. Biol. Lab.*, 12 : 41.
- Guézennec L (coord.), 1999. Seine-Aval : un estuaire et ses problèmes. Fascicule n°1, programme scientifique Seine-Aval.
- Gündel J, Mannschreck C, Buttner K, Ewers U and Angerer J, 1996. Urinary levels of 1-hydroxypyrene, 1-, 2-, 3-, and 4-hydroxyphenanthrene in females living in an industrial area of Germany. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 31 : 585-590.
- Gündel J and Angerer J, 2000. High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the determination of 3-hydroxybenzo(a)pyrene and 3-hydroxybenz(a)anthracene in the urine of polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed workers. *J. Chrom. B*, 738(1) : 47-55.
- Gupta RC, Reddy MV and Randerath K, 1982. ³²P-postlabelling analysis of nonradioactive aromatic carcinogen DNA adducts. *Carcinogenesis*, 3 : 1081-1092.
- Haasch ML, Prince R, Wejksnora PJ, Cooper K, Rand Lech JJ, 1993. Caged and wild fish: induction of hepatic cytochrome P-450 (CYP1A1) as an environmental biomonitor. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12 : 885-895.
- Hackl C, Lintelmann J, Sauerbrey R and Kettrup A, 1996. Preliminary experiments for the analysis of tetrahydrotetraols of benz[a]anthracene and benzo[a]pyrene derived from their hemoglobin adducts using a coupled-column high-performance liquid chromatographic system. *J. Chromatogr. A*, 730(1-2) : 153-159.
- Haddad S, Tardif R, Withey J and Krishnan K, 1997. Rate of pyrene metabolism in rat liver post-mitochondrial fractions. *Toxicol. Lett.*, 93 : 177-184.
- Hall AT and Oris JT, 1991. Anthracene reduces reproductive potential and is maternally transferred during long-term exposure in fathead minnow. *Aquat. Toxicol.*, 19(3) : 249-264.
- Hannah JB, Hose JE, Landolt ML, Miller BS, Felton SP and Iwaoka WT, 1982. Benzo[a]pyrene-induced morphologic and developmental abnormalities in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 11 : 727-734.
- Harris RP, Berdugo V, Corner EDS, Kilvington CC and O'Hara SCM, 1977. Factors affecting the retention of a petroleum hydrocarbon by marine planktonic copepods. In *Fate and Effects of Petroleum Hydrocarbons in Marine Organisms and Ecosystems* (Wolfe DA ed.), 286-304. Pergamon Press, New York.
- Harkey GA, Landrum PF and Klaine SJ, 1994. Comparison of whole-sediment, elutriate, and pore-water exposures for use in assessing sediment-associated organic contaminants in bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13(8) : 1315-1329
- Harkey GA, Landrum PF and Vanhoof PL, 1995. Bioavailability of polycyclic aromatic-hydrocarbons from a historically contaminated sediment core. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14 : 1551-1560.
- Harvey JS, Lyons BP, Waldock M and Parry JM, 1997. The application of the ³²P-postlabelling assay to aquatic biomonitoring. *Mut. Res.*, 378 : 77-88.

- Harvey RG, 1991. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Chemistry and carcinogenicity. Cambridge University Press, Cambridge.
- Harvey RG, Penning TM, Jarabak J and Zhang F-J, 1999. Role of quinone metabolites in PAH carcinogenesis. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 16 : 13-20.
- Hase A and Hites RA, 1978. On the origin of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aqueous environment. In *Identification and analysis of organic pollutants in water* (Keith LH ed), 205-214. Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI.
- Hawkins SA, Billiard SM, Tabash SP, Brown RS and Hodson PV, 2002. Altering cytochrome P4501A activity affects polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 21(9) : 1845-1853.
- Hazel JR, 1979. Influence of thermal acclimation on membrane lipid composition of rainbow trout liver. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, 236 : R91-101.
- He S-X, Nicholson RA and Law FCP, 1998. Benzo(a)pyrene toxicokinetics in the cricket following injection into the haemolymph. *Environ. Toxicol. Pharma.*, 6 : 81-89.
- Hellou J, Banoub JH and Payne JF, 1986. ¹³C NMR spectroscopy in the analysis of conjugate metabolites in the bile of fish exposed to petroleum. *Chemosphere*, 15(6) : 787-793.
- Hellou J and Payne JF, 1987. Assessment of contamination of fish by water-soluble fractions of petroleum: a role for bile metabolites. *Environ. Toxicol. Chem.*, 6 : 857-862.
- Hellou J, Warren W, Andrews C, Mercer G, Payne JF and Howse D, 1997. Long-term fate of crankcase oil in rainbow trout : a time- and dose-response study. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16(6) : 1295-1303.
- Hellou J, Leonard J, Meade J, Sharpe S, Banoub J, Papiernik S, Eglinton L and Whelan J, 1999. Presence and biotransformation of three heteroatomic compounds compared to an aromatic hydrocarbon. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 14-15 : 221-230.
- Hempfling R et al., 1997. USM-System zur Atlantenbeurteilung.
- Hendricks JD, Meyeres TR, Shelton DW, Casteel JL and Bailey GS, 1985. Hepatocarcinogenicity of benzo(a)pyrene to rainbow trout by dietary exposure and intraperitoneal injection. *J. Natl. Cancer Inst.*, 74 : 839-851.
- Hesse S and Jernstrom B, 1984. Role of glutathione-S-transferase: detoxification of reactive metabolites of benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol by conjugation with glutathione. In *Biochemical basis of chemical carcinogenesis* (Greim H, Jung R, Kramer M, Marquardt H and Oesch F, eds). Raven Press, New York.
- Holcombe GW, Phipps GL and Fiandt JT, 1983. Toxicity of selected priority pollutants to various aquatic organisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 7 : 400-409.
- Honey S, O'Keefe P, Draushuk AT, Olson JR, Kumar S and Sikka HC, 2000. Metabolism of benzo(a)pyrene by duck liver microsomes. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 126 : 285-292.
- Hong F, Von Tungeln LS, Fu PP and Watson F, 1999. Stereoselective metabolism of anthracene, 9-methylanthracene, 9,10-dimethylanthracene, 9-chloroanthracene, and 9-nitroanthracene by liver microsomes of neonatal male B6C3F mice. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 16 : 235-244.
- Hooftman RJ and Evers-de Ruiter A, 1992a. Investigations into aquatic toxicity of phenanthrene (cover-report for reproduction tests with the waterflea *Daphnia magna* and an early life stage test with the zebra fish *Brachydanio rerio*). TNO Institute of Environmental Sciences. Delft, The Netherlands.
- Hooftman RJ and Evers-de Ruiter A, 1992b. Early life stage tests with *Brachydanio rerio* and several polycyclic aromatic hydrocarbons using an intermittent flow-through system. TBO Institute of Environmental Science. Delft. 35. IMW-R 92/210.
- Hostettler FD and Kvenvolden KA, 1994. Geochemical changes in crude oil spilled from the Exxon Valdez supertanker into Prince William Sound, Alaska. *Org. Geochem.*, 21(8/9) : 927-936.
- Huang KC and Collins SF, 1962. Conjugation and excretion of aminobenzoic acid isomers in marine fish. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 60 : 49-52.

- Huggett RJ, Stegeman JJ, Page DS, Parker KR, Woodin B, AND Brown JS, 2003. Biomarkers in Fish from Prince William Sound and the Gulf of Alaska: 1999-2000. *Environ. Sci. Technol.*, 37 : 4043-4051.
- Hughes WB, 1984. Use of thiophenic organosulfur compounds in characterizing crude oils derived from carbonate versus siliciclastic sources. In *Petroleum geochemistry and source rock potential of carbonate rocks* (Palacas JG, ed), 181-196. AAPG, Tulsa.
- Huynh CK and Vu Duc T, 1984. Peak purity in analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons by programmed-temperature capillary gas chromatography. *J. High Res. Chromatogr. And Chromatogr. Commun.*, 7 : 270-273.
- Hyötyläinen T and Oikari A, 1999. Assessment of the bioactivity of creosote-contaminated sediment by liver biotransformation system of rainbow trout. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 44 : 253-258.
- 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.
- IARC, 1987. Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42. Lyon, (IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Supplement 7). (<http://www.inchem.org/documents/iarc/iarc/iarc740.htm>)
- IARC, 1999. Metabolic polymorphism and susceptibility to cancer. *IARC Scientific Publications* (Vinels P, Malats N, Lang M, D'Errico A, Caporaso N, Cuzick J and Boffetta P, Eds), 148. IARC, Lyon, France.
- INERIS, 2003. Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs). Évaluation de la relation dose-réponse pour des effets cancérigènes : Approche substance par substance (facteurs d'équivalence toxique - FET) et approche par mélanges - Évaluation de la relation dose-réponse pour des effets non cancérigènes : Valeurs Toxicologiques de Référence (VTR). Rapport final (DOORNAERT B et PICHARD A). <http://chimie.ineris.fr/fr/lespdf/haps.pdf>
- Ingelman-Sunberg M and Hagbjörk A-L, 1982. On the significance of the cytochrome P-450-dependent hydroxyl radical-mediated oxygenation mechanism. *Xenobiotica*, 12(11) : 673-686.
- IPCS (International Programme on Chemical Safety), 1993. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. Environmental Health Criteria 155. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- IPCS, 1998. Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. Environmental Health Criteria 202. International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Jacob J, Schmoldt A and Grimmer G, 1982. Formation of carcinogenic and inactive chrysene metabolites by rat liver microsomes of various monooxygenase activities. *Arch. Toxicol.* : 51 : 255-265.
- James MO, 1986. Xenobiotic conjugation in fish and other aquatic species. In *Xenobiotic Conjugation Chemistry* (Paulson GD, Caldwell J, Hutson DH and Menn JJ eds), 29. American Chemical Society, Washington, DC.
- James MO, 1989. Cytochrome P450 monooxygenase in crustaceans. *Xenobiotica*, 19 : 1063-1076.
- James MO, Schell JD, Boyle SM, Altman AH, Cromer EA, 1991. Southern flounder hepatic and intestinal metabolism and DNA binding of benzo[a]pyrene (BaP) metabolites following dietary administration of low doses of BaP, BaP-7,8-dihydrodiol or a BaP metabolite mixture. *Chemico-Biological Interactions*, 79 : 305-321.
- James MO and Kleinow KM, 1994. Trophic transfert of chemicals in the aquatic environment. In *Aquatic toxicology: Molecular, biochemical and cellular perspectives* (Malins DC and Ostrander GK, eds), 69-92. Lewis, London.
- James MO and Boyle SM, 1998. Cytochromes P450 in crustacean. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 121 : 157-172.
- Jaouen A, Abarnou A, Loizeau V, Le Guellec A-M, Le Boulanger F and Minier C, 1999. Non ortho and ortho PCBs and PAHs in food webs from the Seine estuary. 9th Annual meeting of SETAC-EUROPE, Leipzig, 25-29 mai. Communication orale et poster.

- Jeanneret H, Chantereau S et Ratiskol G, 2002. L'impact environnemental d'une pollution accidentelle des eaux. Les journées du Cedre, Paris, 17 octobre 2002.
- Jerina DM and Daly JW, 1974. Arene oxides. A new aspect of drug metabolism. *Science*, 185 : 573.
- Jerina DM, Yagi H, Lehr RE, Thakker DR, Schaefer-Ridder M, Karle JM, Levin W, Wood AW, Chang RL and Conney AH, 1978. The bay region theory of carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons. In *Polycyclic hydrocarbons and cancer, vol. 1* (Gelboin HV and Ts'o POP, eds), 173-188.
- Jewett JC, Dean TA, Woodin BR, Hoberg MK and Stegeman JJ, 2002. Exposure to hydrocarbons 10 years after the Exxon Valdez oil spill : evidence from cytochrome P4501A expression and biliary FACs in nearshore demersal fishes. *Mar. Environ. Res.*, 54 : 21-48.
- Jimenez BD, Cirimo CP and McCarthy JF, 1987. Effects of feeding and temperature on uptake, elimination and metabolism of benzo(a)pyrene in the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Aquat. Toxicol.*, 10(1) : 41-57.
- Jobling S, Sheahan D, Osborne JA, Mathiessen P and Sumpter JP, 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15 : 194-202.
- Johnson C, Greenberg A and Sander LC, 1996. Separation of benzo[a]pyrene sulfate isomers by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chrom. A*, 753 : 201-206.
- Johnson C and Greenberg A, 1999. Extraction and high-performance liquid chromatography separation of selected pyrene and benzo[a]pyrene sulfate and glucuronides: preliminary application to the analysis of smokers' urine. *J. Chrom. B*, 728 : 201-206.
- Johnson LL, Casillas E, Collier TK, McCain BB and Varanasi U, 1988. Contaminant effects on ovarian development in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. *Canadian J. Fish. Aquat. Sci.*, 45 : 2133-2146.
- Johnson LL, Casillas E, Myers MS, Rhodes LD and Olson OD, 1991. Patterns of oocytes development and related changes in plasma estradiol 17 β , vitellogenin, and plasma chemistry in English sole (*Parophrys vetulus*). *J. Experimental Mar. Biol. and Ecology*, 152 : 161-185.
- Johnson LL, Stein JE, Hom T, Sol S, Collier TK and Varanasi U, 1995. Effects of exposure to Prudhoe Bay oil on reproductive function in gravid female flatfish. *Environ. Sci.*, 3 : 67-81.
- Johnson LL, Nelson GM, Sol SY, Lomax DP and Casillas E, 1997. Fecundity and egg weight in English sole (*Pleuronectes vetulus*) from Puget Sound, WA: influence of nutritional status and chemical contaminants. *Fishery Bull.*, 92 : 232-250.
- Johnson LL, Sol SY, Ylitalo GM, Hom T, French B, Olson OD and Collier TK, 1999. Reproductive injury in English sole (*Pleuronectes vetulus*) from the Ylebos Waterway, Commencement Bay, Washington. *J. Ecosystem Stress and Recovery*, 6 : 289-310.
- Johnson LL, Collier TK and Stein JE, 2002. An analysis in support of sediment quality thresholds for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to protect estuarine fish. *Aquat. Conserv.: Mar. Freshw. Ecosyst.*, 12 : 517-538.
- Johnston EP and Baumann PC, 1989. Analysis of fish bile with HPLC – fluorescence to determine environmental exposure to benzo(a)pyrene. *Hydrobiologia*, 188/189 : 561-566.
- Jongeneelen FJ, Anzion RBM and Henderson PT, 1987. Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. *J. Chrom.*, 413 : 227-232.
- Jonsson G, Beyer J, Wells D and Ariese F, 2003. The application of HPLC-F and GC-MS to the analysis of selected hydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons in two certified fish bile reference materials. *J. Environ. Monit.* 5 : 513-520.
- Jonsson G, Taban IC, Jørgensen KB and Sundt RC, 2004. Quantitative determination of de-conjugated chrysene metabolites in fish bile by HPLC-fluorescence and GC-MS. *Chemosphere*, 54 : 1085-1097.

- Kalberlah F, Frijus-Plessen N and Hassauer M, 1995. Toxicological criteria for the risk assessment of polyaromatic hydrocarbons (PAH) in existing chemicals. Part 1: The use of equivalency factors. *Altlasten-Spektrum*, 5 : 231-237 (in German).
- Kandaswami C, Kumar S, Rutkowski JP and Sikka HC, 1988. Comparative metabolism of phenanthrene and benzo[f]quinoline by rat liver microsomes. *Cancer Lett.*, 43(3) : 197-205.
- Karcher W, 1988. Spectral atlas of polycyclic aromatic compounds, Vol. 2. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp16-18, 55.
- Karcher W, Devillers J, Garrigues P and Jacob J, 1991. Spectral atlas of polycyclic aromatic compounds. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p21.
- Karickhoff SW and Morris KR, 1985. Sorption dynamics of hydrophobic pollutants in sediment suspensions. *Environ. Toxicol. Chem.* 4:469-479.
- Keith LH and Telliard WA, 1979. Priority pollutants. I. A perspective view. *Environ. Sci. Technol.*, 13 : 416-423.
- Kennedy CJ and Law FCP, 1990. Toxicokinetics of selected polycyclic aromatic hydrocarbons in rainbow trout following different routes of exposure. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10 : 917-923.
- Kennicutt MC, McDonald SJ, Sericano JL, Boothe P, Oliver J, Safe S, Presley BJ, Liu H, Wolfe D, Wade TL, Crockett A and Bockus D, 1995. Human contamination of the marine environment-Arthur harbor and McMurdo Sound, Antarctica. *Environ. Sci. Technol.*, 29 : 1279-1287.
- Kennish MJ, 1992. Polynuclear Aromatic hydrocarbons. In *Ecology of Estuaries: Anthropogenic effects*, 133-181. CRC Press, Boca Raton.
- Khan MAQ, Coello W, Khan AA and Pinto H, 1972. Some characteristics of the microsomal mixed-function oxidase in the freshwater crayfish, *Cambarus*. *Life Sci.*, 11 : 405-415.
- Klaasen CD, 1997. Cassarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons, 5th ed., McGraw-Hill, New-York.
- Klumpp DW, Huasheng H, Humphrey C, Xinhong W and Codi S, 2002. Toxic contaminants and their effects in coastal waters of Xiamen, China. I. Organic pollutants in mussel and fish tissues. *Mar. Poll. Bull.*, 44 : 752-760.
- Knezovich JP, Harrison FL and Wilhelm RG, 1987. The bioavailability of sediment-sorbed organic chemicals: a review. *Water Air Soil Pollut.*, 32 : 233-45.
- Knopp D, Schedl M, Achatz S, Kettrup A and Niessner R, 1999. Immunochemical test to monitor human exposure to PAH: urine as sample source. *Analytica Chimica Acta*, 399(1-2) : 115-126.
- Kodama S, Yamamoto A, Matsunaga A, Toriba A, Hayakawa K, 2000. Micellar electrokinetic chromatography of monohydroxybenzo[a]pyrene positional isomers using gamma-cyclodextrin. *Analyst*, 125(9) : 1555-1559.
- Koloc AS, Huckins JN, Petty JD and Oris JT, 1996. The role of water ventilation and sediment ingestion in the uptake of benzo[a]pyrene in gizzard shad (*Dorosoma cepedianum*). *Environ. Toxicol. Contam.*, 15(10) : 1752-1759.
- Koutsikopoulos C, Dorel D, Desaunay Y, Le Cann B and Forest A, 1995. Interactions entre processus physiques et comportement individuel : conséquences sur l'organisation et le fonctionnement du stock de sole (*Solea solea* L.) du Golfe de Gascogne (Orstom, ed), 49-74. Colloques et séminaires, premier forum halieumétrique.
- Kozin I, Gooijer C, Velthorst NH, Hellou J and Zitko V, 1996. Isomer-specific detection of PAHs and PAH metabolites in environmental matrices by shpol'skii luminescence spectroscopy. *Chemosphere*, 33(8) : 1435-1447.
- Krahn MM, Brown DW, Collier TK, Friedman AJ, Jenkins RG and Malins DC, 1980. Rapid analysis of naphthalene and its metabolites in biological systems: determination by high-performance liquid chromatography/fluorescence detection and by plasma desorption/chemical ionization mass spectrometry. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2 : 233-246.

- Krahn MM, Schnell JV, Uyeda MY and MacLeod WD, 1981. Determination of mixtures of benzo(a)pyrene, 2,6-dimethylnaphthalene and their metabolites by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection.
- Krahn MM, Collier TK and Malins DC, 1982. Aromatic hydrocarbon metabolites in fish: automated extraction and high-performance liquid chromatographic separation into conjugate and non-conjugate fractions. *J. Chromatogr.*, 236 : 441-452.
- Krahn MM and Malins DC, 1982. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of aromatic hydrocarbon metabolites from livers of fish exposed to fuel oil. *J. chromatogr.*, 248 : 99-107.
- Krahn MM, Myers M, Burrows DG and Malins DC, 1984. Determination of metabolites of xenobiotics in bile of fish from polluted waterways. *Xenobiotica*, 14 : 633-646.
- Krahn MM, Rhodes LD, Myers MS, Moore LK, MacLeod WD and Malins DC, 1986a. Associations between metabolites of aromatic compounds in bile and the occurrence of hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 15 : 61-67.
- Krahn MM, Kittle LJ and McLeod WD, 1986b. Evidence for exposure of fish to oil spilled into the Columbia River. *Mar. Environ. Res.*, 20 : 291-298.
- Krahn MM, Moore LK and McLeod WD, 1986c. Metabolites of aromatic compounds in fish bile. Standard analytical procedures of the NOAA National Analytical Facility, U.S. Dep. Commer. Tech. Memo. NMFS F/NWC-102, 25 p.
- Krahn MM, Burrows DG, MacLeod WD and Malins DC, 1987. Determination of individual metabolites of aromatic compounds in hydrolysed bile of English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 16 : 511-522.
- Krahn MM, Wigren CA, Pearce RW, Moore LK, Bogar RG, MacLeod WD, Chan S-L and Brown DW, 1988a. New HPLC cleanup and revised extraction procedures for organic contaminants. *Standard analytical procedures of the NOAA National Analytical Facility*, U.S. Dep. Commer. Tech. Memo NMFS F/NWC-153, 52 p.
- Krahn MM, Moore LK, Bogar RG, Wigren CA, Chan S-L and Brown DW, 1988b. High Performance liquid chromatographic method for isolating organic contaminants from tissue and sediment extracts. *J. Chromatogr.*, 437 : 161-175.
- Krahn MM, Burrows DG, Ylitalo GM, Brown DW, Wigren CA, Collier TK, Chan S-L and Varanasi, U, 1992. Mass spectrometric analysis for aromatic compounds in bile of fish sampled after the Exxon Valdez oil spill. *Environ. Sci. Technol.*, 26 : 116-126.
- Krahn MM, Ylitalo GM, Buzitis J, Bolton JL, Wigren CA, Chan S-L and Varanasi U, 1993a. Analyses for petroleum-related contaminants in marine fish and sediments following the Gulf oil spill. *Mar. Pollut. Bull.*, 27 : 285-292.
- Krahn MM, Ylitalo GM, Burrows DG, Buzitis J, Chan S-L and Varanasi U, 1993b. In *Proceedings of the Exxon Valdez Oil Spill Symposium* ; Anchorage, AK, 1993, General Services Administration Region 9 Printing Plant, Juneau, AK, 60.
- Krahn MM, Ylitalo GM, Buzitis J, Krone CA, Stein JE, Chan S-L and Varanasi U, 1993c. In *Proceedings of the 1993 International Oil Spill Conference*, Tampa Bay, FL.
- Krismann U and Kleiböhmer W, 1997. Separation of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chrom. A*, 774(1-2) : 193-201.
- Krone CA, Stein JE and Varanasi U, 1992. Estimation of levels of metabolites of aromatic hydrocarbons in fish tissues by HPLC/fluorescence analysis. *Chemosphere*, 24 : 497.
- Kubin LA, 1997. Growth of juvenile English sole exposed to sediments amended with aromatic compounds. MS thesis, Western Washington State University.

- Kuijt J, Garcya-Ruiz C, Stroomberg GJ, Marina ML, Ariese F, Brinkman UAT and Gooijer C, 2001. Laser-induced fluorescence detection at 266 nm in capillary electrophoresis. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in biota. *J. Chrom. A*, 907 : 291-299.
- Kumi CO, Nicholson RA and Law FC, 1991. Absorption, degradation and excretion of benzo(a)pyrene in the cricket (*Acheta domesticus*). *Xenobiotica*, 21(10) : 1357-1362.
- Kurelec B, Britvic S, Rijavec M, Müller M and Zahn RK, 1977. Benzo(a)pyrene monooxygenase induction in marine fish – molecular response to oil pollution. *Mar. Biol.*, 44 : 211-216.
- Kurelec B, Garg A, Krca S and Gupta RC, 1989. DNA adducts as biomarkers in genotoxic risk assessment in the aquatic environment, *Mar. Environ. Res.*, 28 : 317–321.
- Kurelec B and Gupta RC, 1993. Biomonitoring of aquatic systems. In *Postlabelling Methods for the Detection of DNA Adducts* (Phillips DH, Castegrano M, Bartsch H, Eds) , 365–372. IARC, Lyon.
- Kvalheim OM, Christy AA, Telnaes N and Bjorseth, 1987. Maturity determination of organic matter in coals using the methylphenanthrene distribution. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 51 : 1883-1888.
- Laflamme RE and Hites RA, 1978. The global distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 42 : 289-303.
- Laflamme RE and Hites RA, 1979. Tetra- and pentacyclic, naturally-occurring aromatic hydrocarbons in recent sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 43 : 1687-1691.
- Landahl JT, McCain BB, Myers MS, Rhodes LD and Brown DW, 1990. Consistent associations between hepatic lesions (including neoplasms) in English sole (*Parophrys vetulus*) and polycyclic aromatic hydrocarbons in bottom sediment. *Environ. Health Perspect.*, 89 : 195-203.
- Landrum PF and Robbins JA, 1990. Bioavailability of sediment-associated contaminants to benthic invertebrates. In *Sediments: Chemistry And Toxicity of In-place Pollutants* (Bando R, Giesy JP Jr and Muntau H, eds) , 237–263. Lewis Publishers, Inc, Ann Arbor.
- Landrum PF, Lee H and Lydy MJ, 1992. Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 11 : 1709-1725
- Larsen OFA, Kozin IS, Rijs AM, Stroomberg GJ, deKnecht JA, Velthorst NH and Gooijer C, 1998. Direct identification of pyrene metabolites in organs of the isopod *Porcellio scaber* by fluorescence line narrowing spectroscopy. *Anal. Chem.*, 70(6) : 1182-1185.
- Latimer JS, Hoffman EJ, Hoffman G, Fasching JL and Quinn JG, 1990. Sources of petroleum hydrocarbons in urban runoff. *Water air soil pollution*, 52 : 1-21.
- Law RJ and Biscaya JL, 1994. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)-Problems and progress in sampling, analysis and interpretation. *Mar. Pollut. Bull.*, 29 : 235-241.
- Law FC, Meng JX, He YT and Chui YC, 1994. Urinary and biliary metabolites of pyrene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica*, 24(3) : 221-229.
- Layiwola PJ, Linnecar DFC and Knights B, 1983. The biotransformation of three ¹⁴C-labelled phenolic compounds in twelve species of freshwater fish. *Xenobiotica*, 13 : 107.
- Leadly TA, Arcand-Hoy LD, Haffner GD and Metcalfe CD, 1999. Fluorescent aromatic hydrocarbons in bile as a biomarker of exposure of brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*) to contaminated sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18(4) : 750-755.
- Lech JJ and Vodcnik MJ, 1985. Biotransformation. In *Fundamentals of Aquatic Toxicology* (Rand GM and Petrocelli SR, eds), 526-557. Methods and Applications. Hemisphere Publishing Corporation, New York, USA.
- Lee RF, Sauerheber R and Benson AA, 1972a. Petroleum hydrocarbons: uptake and discharge by marine mussel, *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 17 : 201-208.
- Lee RF, Sauerheber R and Dobbs GH, 1972b. Uptake, metabolism, and discharge of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine fish. *Mar. Biol.*, 17 : 201-208.

- Lee RF, Ryan C and Neuhauser ML, 1976. Fate of petroleum hydrocarbons taken up from food and water by the blue crab *Callinectes Sapidus*. *Mar. Biol.*, 37 : 363-370.
- Lee RK, 1981. Mixed function oxygenase (MFO) in marine invertebrates. *Mar. Biol. Lett.*, 2 : 87-105.
- Lee RF, 1989. Metabolism and accumulation of xenobiotics within hepato-pancreas cells of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Mar. Environ. Res.*, 28(1-4) : 93-97.
- Lee CK, Cho SH, Kang JW, Lee SJ, Ju YS, Sung JH, Strickland PT and Kang DH, 1999. Comparison of three analytical methods for 1-hydroxypyrene-glucuronide in urine after non-occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Lett.*, 108 : 209-215.
- Lemaire P, Den Besten PJ, O'Hara SCM and Livingstone DR, 1993. Comparative metabolism of benzo[a]pyrene by microsomes of hepatopancreas of the shore crab *Carcinus maenas* L. and digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis* L. In *PAH : synthesis, properties, analytical measurements, occurrence and biological effects* (Garrigues P and Lamotte M eds), 1133-1140. Gordon and Breach, London.
- Lemaire P, Matthews A, Forlin L and Livingstone DR, 1994. Stimulation of oxyradical production of hepatic microsomes of flounder (*Platichthys flesus*) and perch (*Perca fluviatilis*) by model and pollutant xenobiotics. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 26(2) : 191-200.
- Lemaire P, Förlin L and Livingstone D, 1996. Responses of hepatic biotransformation and antioxidant enzymes to CYP1A-inducers (3-methylcholanthrene, b-naphthoflavone) in sea bass (*Dicentrarchus labrax*), dab (*Limanda limanda*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.*, 36, 141-160.
- Lemaire-Gony S and Lemaire P, 1992. Interactive effects of cadmium and benzo(a)pyrene on cellular structure and biotransformation enzymes of the liver of the European eel *Anguilla anguilla*. *Aquat. Toxicol.*, 22 : 145-160.
- Le Pape O, Chauvet F, Mahévas S, Lazure P, Guérault D and Désaunay Y, 2003. Quantitative description of habitat suitability for the juvenile common sole (*Solea solea*, L.) in the Bay of Biscay (France) and the contribution of different habitats to the adult population. *J. Sea Res.*, 50 : 139-149.
- Leonard JD and Hellou J, 1999. Bile metabolites in fish as indicators of contamination. In *Proceedings, Toxic chemicals progress and directions workshop*, Department of Fisheries and Oceans Canada, Ottawa, Ontario, Canada, October 28-30, 1998.
- Leonard JD and Hellou J, 2001. Separation and characterization of gall bladder bile metabolites from speckled trout, *Salvelinus fontinalis*, exposed to individual polycyclic aromatic compounds. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20(3) : 618-623.
- Letellier M, Budzinski H, Garrigues P and Wise SA, 1997. Focused microwave assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in open cell from reference materials (sediment, soil, air particulate). *Spectroscopy*, 13 : 71-80.
- Letellier M, 1998. Extraction assistée par micro-ondes de contaminants organiques dans les matrices environnementales. *Thèse de doctorat, Université de Bordeaux I*, n°1957.
- Letellier M, Budzinski H, Bellocq J and Conan J, 1999a. Focused microwave-assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes from sediments and source rocks. *Organic Geochem.*, 30(11) : 1353-1365.
- Letellier M, Budzinski H, Charrier L, Capes S and Dorthe A-M, 1999b. Optimization by factorial design of focused microwave assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediments. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 364(3) : 228-237.
- Letellier M and Budzinski H, 1999. Influence of grain size on the efficiency of focused microwave assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analyst*, 124(1) : 5-14.
- Letzel T, Rosenberg E, Wissiack R, Grasserbauer M and Niessner, 1999. Separation and identification of polar products of benzo(a)pyrene with ozone by atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry after optimized column chromatographic clean-up. *J. Chromatogr. A*, 855 : 501-514.

- Lewis J, 1997. Bioindicators of polycyclic hydrocarbon exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and fathead minnows (*Pimephales promelas*), M Sc. Thesis. Faculty of Graduate Studies, The University of Guelph.
- Li K, Woodward LA, Karu AE and Li QX, 2000. Immunochemical detection of polycyclic aromatic hydrocarbons and 1-hydroxypyrene in water and sediment samples. *Analytica Chimica Acta*, 419 : 1-8.
- Lin ELC, Cormier SM and Racine RN, 1994. Synchronous fluorometric measurement of metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in the bile of brown bullhead. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13 : 707-715.
- Lin ELC, Cormier SM and Torsella JA, 1996. Fish Biliary Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolites Estimated by Fixed-Wavelength Fluorescence: Comparison with HPLC-Fluorescent Detection. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 35 : 16-23.
- Lin ELC, Neiheisel TW, Flotemersch J, Subramanian B, Williams DE, Millward MR and Cormier SM, 2001. Historical monitoring of biomarkers of PAH exposure of brown bullhead in the remediated Black River and the Cuyahoga River, Ohio. *J. Gt. Lakes Res.*, 27(2) : 191-198.
- Lipiatou E, Tolosa I, Simo R, Bouloubassi I, Dachs J, Marti S, Sicre MA, Bayona JM, Grimalt J O, Saliot A and Albaige's J, 1997. *Deep-Sea Res. Part II*, 4 : 881-905.
- Litchfield JT, 1939. Effects of sulfanilamide on lower vertebrates. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 67 : 212-223.
- Livingstone DR and Farrar SV, 1984. Tissue and subcellular distribution of enzyme activities of mixed-function oxygenase and benzo[a]pyrene metabolism in the common mussel *Mytilus edulis* L. *Sci. Tot. Environ.*, 39 : 209-35.
- Livingstone DR, 1988. Responses of microsomal NADPH-cytochrome reductase activity and cytochrome P-450 in digestive glands of *Mytilus edulis* and *Littorina littorea* to environmental and experimental exposure to pollutants. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 46 : 37-43.
- Livingstone DR, 1989. Cytochrome P-450 and oxidative metabolism in molluscs. *Xenobiotica*, 1041-1062.
- Livingstone DR, 1991. Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. In *Advances in comparative and environmental physiology, Vol. 7* (Gilles R, ed), 46-185. Springer, Berlin.
- Livingstone DR, Lemaire P, Mathews A, Peters L, Bucke D and Law RJ, 1993. Pro-oxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity responses in liver of dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. *Marine Pollution Bull.*, 26 : 602-606.
- Livingstone DR, 1994. Recent developments in marine invertebrate organic xenobiotic metabolism. *Toxicol. Ecotoxicol. News*, 1 : 88-94.
- Livingstone DR, 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 120 : 43-49.
- Lorenzen K, 1996. The relationship between body weight and natural mortality in juvenile and adult fish: a comparison of natural ecosystems and aquaculture. *J. Fish Biol.*, 49 : 627-647.
- Lowry OH, Rosebrough, NJ, Farr AL and Randall RJ, 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275.
- Lunde G and Bjorseth A, 1977. Polycyclic aromatic hydrocarbons in long-range transported aerosols. *Nature*, 268 : 518-519.
- Luthe G, Stroomborg GJ, Ariese F, Brinkman UAT and van Straalen NM, 2002. Metabolism of 1-fluoropyrene and pyrene in marine flatfish and terrestrial isopods. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 12 : 221-229.

- Lyons BP, Stewart C and Kirby MF, 1999. The detection of biomarkers of genotoxin exposure in the European flounder (*Platichthys flesus*) collected from the River Tyne Estuary. *Mutat. Res.*, 446 : 111-119.
- Maccubbin AE, Chidambaram S and Black JJ, 1988. Metabolites of aromatic hydrocarbons in the bile of brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*). *J. Gt Lakes Res.*, 14 : 101-108.
- Machlin LJ and Bendich A, 1987. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.*, 1 : 441-445.
- Mackay D and Shiu WY, 1981. A critical review of Henry's law constants for chemicals of environmental interest. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 10 : 1175-1199.
- Mackay D, 1991. Multimedia environmental models: the fugacity approach. *Lewis Publishers Inc.*, Chelsea, MI,
- MacKenzie MJ and Hunter JV, 1979. Sources and fates of aromatic compounds in urban storm water runoff. *Environ. Sci. Technol.*, 13 : 179-183.
- Malins DC, Collier TK, Thomas LC and Roubal WT, 1979. Metabolic fate of aromatic hydrocarbons in aquatic organisms: analysis of metabolites by thin-layer chromatography and high-pressure liquid chromatography. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 6(1) : 55-66.
- Malins DC, 1980. Pollution of the marine environment. *Environ. Sci. Technol.*, 14(1) : 32-37
- Malins DC, McCain BB, Brown DW, Sparks AK and Hodgins HO, 1982. *NOAA Tech Memo*, OMPA-19, 168p.
- Malins DC, McCain BB, Landahl JT, Myers MS, Krahn MM, Brown DW, Chan S-L and Roubal WT, 1988. Neoplastic and other diseases in fish in relation to toxic chemicals: an overview. *Aquat. Toxicol.*, 11 : 43-67.
- Mannervik B, 1985. The isozymes of glutathione transferase. In *Advances in enzymology*, Vol. 57 (Meister A, ed), 357. John Wiley & Sons, New York.
- Marchand M et Kantin R, 1995. Contaminants chimiques en milieux aquatiques. Aspects généraux: nature, origine, effets et analyse. *Océanis*, 21(2), 430 pp.
- Marty GD, Hoffmann A, Okihiro MS, Hepler K and Hanes D, 2003. Retrospective analysis: bile hydrocarbons and histopathology of demersal rockfish in Prince William Sound, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. *Mar. Environ. Res.*, 56 : 569-584.
- Masson G, 1981. Biologie du flet *Platichthys flesus* L. sur les côtes européennes : connaissances actuelles. Rapport bibliographique, DEA Ecologie, Rennes.
- Masson G, 1984. Bioécologie d'un poisson plat migrateur : le flet *Platichthys flesus* L. dans l'estuaire de la Loire et ses milieux annexes. CIEM, Comité des poissons démersaux G:42..
- Mazéas L, 2000. Etude de l'origine et du devenir des hydrocarbures dans le milieu marin : approche moléculaire et isotopique. Application à l'étude des pollutions pétrolières. *Thèse de doctorat de l'Université de Bordeaux I*.
- Mazéas L and Budzinski H, 2002. Improved accuracy of GC-MS quantification of aliphatic and aromatic hydrocarbons in marine sediments and petroleum. Validation on reference matrices and application to the Erika oil spill. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 82(3) : 157-173.
- McCain BB, Hodgins HO, Gronlund WD, Hawkes JW, Brown DW, Myers MS and Vandermeulen JH, 1978. Bioavailability of crude oil from experimentally oiled sediments to English sole (*Parophrys vetulus*), and pathological consequences. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 35 : 657-664.
- McCain BB, Malins DC, Krahn MM, Brown DW, Gronlund WD, Moore LK and Chan, S-L, 1990. Uptake of aromatic and chlorinated hydrocarbons by juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in an urban estuary. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 19 : 10-16.
- McCain BB, Brown DW, Hom T, Myers MS, Pierce SM, Collier TK, Stein JE, Chan S-L and Varanasi U, 1996. Chemical contaminant exposure in four fish species from Tampa Bay, Florida. *Estuaries*, 19(1) : 86-104.

- McCain BB, Brown DW, Chan S-L, Landahl JT, MacLeod WD, Krahn MM, Sloan CA, Tilbury KL, Pierce SM, Burrows DG and Varanasi U, 2000. National benthic surveillance project: Pacific Coast. Organic chemical contaminants, cycle i to vii (1984-90). U.S. Dept. Commer., NOAA Tech. Memo. NMFSNWFS-40, 121 p.
- McCarthy JF and Shugart LR (eds), 1990. Biomarkers of environmental contamination. Lewis, Boca Raton, FL, USA.
- Mc Closkey JT and Oris JT, 1991. Effect of water temperature and dissolved oxygen concentration on the photo-induced toxicity of anthracene to juvenile bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Aquat. Toxicol.*, 21(3-4) : 145-146.
- McDonald SJ, Kennicutt MC and Brooks JM, 1992. Evidence of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure in fish from the Antarctic peninsula. *Mar. Poll. Bull.*, 25(9-12) : 313-317.
- McDonald SJ, Kennicutt MC, Liu H and Safe SH, 1995. Assessing aromatic hydrocarbon exposure in Antarctic fish captured near Palmer and McMurdo stations, Antarctica. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 29(2) : 232-240.
- McElroy AE, Farrington JW and Teal JM, 1989. Bioavailability of PAH in the aquatic environment. In *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment* (Varanasi U, ed), 1-40. CRC Press, Boca Raton, FL.
- McElroy AE and Sisson JD, 1989. Trophic transfer of benzo[a]pyrene metabolites between benthic marine organisms. *Mar. Environ. Res.*, 28(1-4) : 265-269.
- McElroy AE, 1990. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in the polychaete *Nereis virens*. *Aquat. Toxicol.*, 18(1) : 35-50.
- McElroy AE, Farrington JW and Teal JM, 1990. Influence of mode of exposition and the presence of a tubiculous polychaete on the fate of benz[a]anthracene in the benthos. *Environ. Sci. Technol.*, 24(11) : 1648-1655.
- McElroy AE, Cahill JM, Sisson JD and Kleinow KM, 1991. Relative bioavailability and DNA adduct formation of benzo[a]pyrene and metabolites in the diet of the winter flounder. *Biochem. Physiol. Part C*, 100 : 29-32.
- McGurk MD, 1996. Allometry of marine mortality of Pacific salmon. *Fish. Bull.*, 94 : 77-88.
- McVeety BD and Hites RD, 1988. Atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons to water surfaces a mass balance approach. *Atmos. Environ.*, 22(3) : 511-536.
- Meador JP, Stein JE, Reichert WL, Varanasi U, 1995. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 143: 79-165.
- Meador JP, Stein JE, Reichert WL and Varanasi U, 1996. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 143 : 79-165.
- Meador JP, 2003. Bioaccumulation of PAHs in marine invertebrates. In (Douben PET ed) *PAHs: An ecotoxicological perspective*, 147-172. *Ecological and Environmental Toxicology Series*, Wiley, UK.
- Meier S, Andersen TE, Hasselberg L, Kjesbu OS, Klunsoyr J and Svardal A, 2002. Hormonal effects of C₄-C₇ alkylphenols on cod (*Gadus morhua*). 1997-2001 project report of the Institute of Marine Research of Norway (disponible sur <http://www.imr.no>).
- Melancon M and Lech J, 1978. Distribution and elimination of naphthalene and 2-methylnaphthalene in rainbow trout during short- and long-term exposures. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 7 : 207-220.
- Menzie CA, Potocki BB and Santodonato J, 1992. Ambient concentrations and exposure to carcinogenic PAHs in the environment, *Environ. Sci. Technol.*, 26 : 1278-1283.
- Metcalfe CD, Metcalfe TL, Riddle G and Haffner GD, 1997. Aromatic hydrocarbons in biota from the Detroit River and western Lake Erie. *J. Gt. Lakes Res.*, 23 : 160-168.
- Michel X, 1993. Contribution à l'étude des interactions entre les contaminants chimiques organiques et les organismes marins : bases moléculaires et applications à la biosurveillance de l'environnement côtier. *Thèse de doctorat de l'Université de Bordeaux I*, n°993.

- Mill T, Mabey WR, Lan BY and Baraze A, 1981. Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Chemosphere*, 10 : 1281-1290.
- Millemann RE, Birge WJ, Black JA, Cushman RM, Daniels KL, Franco PJ, Giddings JM, McCarthy JF and Stewart AJ, 1984. Comparative acute toxicity to aquatic organisms of components of coal-derived synthetic fuels. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 113 : 74-85.
- Miller EC and Miller JA, 1981. Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer*, 47 : 2327-2345.
- Mix MC, 1986. Cancerous diseases in aquatic animals and their association with environmental pollutants: A critical literature review. *Mar. Environ. Res.*, 20(1-2) : 1-141.
- Moles A, Bates S, Rice SD and Korn S, 1981. Reduced growth of Coho salmon fry exposed to two petroleum components, Toluene and naphthalene in fresh water. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 110 : 430-436.
- Moore MJ, and Myers MS. 1994. Pathobiology of chemical-associated neoplasia in fish. In *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives* (Malins DC, Ostrander GK, eds), 327-386. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Morrison H, Young P and George S, 1985. Conjugation of organic compounds in isolated hepatocytes from a marine fish, the plaice, *Pleuronectes platessa*. *Biochem. Pharmacol.*, 34 : 3944.
- Mulder GJ, Coughty MWH and Burchell B, 1990. Glucuronidation. In *Conjugation Reactions in Drug Metabolism ; an Integrated Approach* (Mulder GJ, Ed.). Taylor and Francis, London.
- Murchelano RA and Wolke RE, 1985. Epizootic carcinoma in the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Science*, 228 : 587-589.
- Myers MS, Rhodes LD and McCain BB, 1987. Pathologic anatomy and patterns of occurrence of hepatic neoplasms, putative preneoplastic lesions, and other idiopathic hepatic conditions in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound. *J. Nat. Cancer Institute*, 788 : 333-363.
- Myers MS, Landahl JT, Krahn MM, Johnson LL, Schiewe MS and McCain BB, 1990. Overview of studies on liver carcinogenesis in English sole from Puget Sound; evidence for a xenobiotic chemical etiology. I : Pathology and epizootiology. *Sci. Tot. Environ.*, 94(1-2) : 33-50.
- Myers MS, Landahl JT, Krahn MM and McCain BB, 1991. Relationships between hepatic neoplasms and related lesions and exposure to toxic chemicals in marine fish from the U.S. West Coast. *Environ. Health Perspect.*, 90 : 7-16.
- Myers MS, Stehr CR, Olson OP, Johnson LL, McCain BB, Chan S-L and Varanasi U, 1993. Fish Histopathology and relationships between toxicopathic lesions and exposure to chemical contaminants for cycles I to V (1984-88). *NOAA Technical Memorandum NMFS-NWFSC-6*. National status and trends program, national benthic surveillance project: pacific coast.
- Myers MS, Stehr CM, Olson OP, Johnson LL, McCain BB, Chan S-L, Varanasi U, 1994. Relationships between toxicopathic hepatic lesions and exposure to chemical contaminant in English sole (*Pleuronectes vetulus*), starry flounder (*Platytychys stellatus*) and white croaker (*Genyonemus lineatus*) from selected marine sites on the Pacific Coast. *Environ. Health Perspect.*, 102(2) : 200-215.
- Myers MS, Johnson LL, Olson OP, Stehr CM, Horness BH, Collier TK and McCain BB, 1998a. Toxicopathic hepatic lesions as biomarkers of chemical contaminant exposure and effects in marine bottomfish species from the Northeast and Pacific coasts, USA. *Mar. Poll. Bull.*, 37 : 92-113.
- Myers MS, Johnson LL, Hom T, Collier TK, Stein JE and Varanasi U, 1998b. Toxicopathic hepatic lesions in subadult English sole (*Pleuronectes vetulus*) from Puget Sound, Washington, USA; relationship with other biomarkers of contaminant exposure. *Mar. Environ. Res.*, 45 : 47-67.
- Nagel R and Urich K, 1980. Kinetic studies on the elimination of different substituted phenols by goldfish (*Carassius auratus*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 24 : 374.
- Nagel R, 1983. Species differences, influence of dose and application on biotransformation of phenol in fish. *Xenobiotica*, 13 : 101.

- Nagler JJ and Cyr DG, 1997. Exposure of male American plaice (*Hippoglossoides platessoides*) to contaminated marine sediments decreases the hatching success of their progeny. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16 : 1733-1738.
- Nakata H, Sakai Y, Miyawaki T and Takemura A, 2003. Bioaccumulation and toxic potencies of polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in tidal flat and coastal ecosystems of the Ariake sea, Japan. *Environ. Sci. Technol.*, 37 : 3513-3521.
- Narbonne JF and Suteau P, 1983. Impact toxicologique des hydrocarbures aromatiques polycycliques sur les organismes du milieu dulçaquicole. Compte-rendu scientifique. D.R.A.S.S.
- Narbonne JF, Garrigues P, Ribera D, Raoux C, Mathieu A, Lemaire P, Salaun JP and Lafaurie M, 1991. Mixed-function oxygenase enzymes as tools for pollution monitoring: field studies on the French coast of the Mediterranean Sea. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 100 : 37-42.
- Narro ML, Cerniglia CE, Van Baalen C and Gibson DT, 1992. Metabolism of phenanthrene by the marine cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* pr-6. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1351-1359.
- Nebert DW, Nelson DR, Coon M.J, Estabrook RW, Feyereisen R, Furji-Kuriyama Y, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Loper JC, Sato R, Waterman MR and Waxmann DJ, 1991. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.*, 10 : 1-14.
- Neff JM, Cox BA, Dixit D and Anderson JW, 1976. Accumulation and release of petroleum-derived aromatic hydrocarbons by four species of marine animals. *Mar. Biol.*, 38(3) : 279-289.
- Neff JM, 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment : sources, fates and biological effects. London, Applied Sciences Publishers.
- Neff JM, 1985. Polycyclic aromatic hydrocarbons. In *Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications* (Rand GM and Petrocelli SR, eds), 416-454. Hemisphere Publishing Corporation, New York, USA.
- Neff JM, 1990. Composition and fate of petroleum and spill-treating agents in the marine environment. In *Sea mammals and oil: confronting the risks* (Geraci JR and Aubin DJ, eds), 1-32. Academic Press, London.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC and Nebert DW, 1996. P450 superfamily : Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6 : 1-42.
- Nesnow S, Davis C, Nelson GB, Lambert G, Padgett W, Pimentel M, Tennant AH, Kligerman AD and Ross JA. 2002. Comparison of the genotoxic activities of the K-region dihydrodiol of benzo[a]pyrene with benzo[a]pyrene in mammalian cells: morphological cell transformation, DNA damage, and stable covalent DNA adducts. *Mut. Res.*, 521 : 91-102.
- Ng KM, Chu I, Bronaugh RL, Franklin CA and Somers DA, 1991. Percutaneous absorption/metabolism of phenanthrene in the hairless guinea pig: comparison of in vitro and in vivo results. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 16(3) : 517-524.
- Niimi AJ and Palazzo V, 1986. Biological half-lives of eight polycyclic aromatic hydrocarbons in rainbow trout. *Water Res.*, 20 : 503-507.
- Nikolaou K, Masclet P and Mouvier G, 1984. Sources and chemical reactivity of polynuclear aromatic hydrocarbons in the atmosphere – A critical review. *Sci. Tot. Environ.*, 32 : 103-132.
- Nimrod AC and Benson WH, 1996. Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. *Critical Reviews in Toxicology*, 26 : 335-364.
- Nirmaier HP, Fischer E, Henze G, 1998. A comparison of ultratrace and glassy carbon working electrodes for the amperometric detection of benzo[a]pyrene and its hydroxylated metabolites after HPLC separation. *Electroanalysis*, 10(3) : 187-190.
- Nisbet ICT and LaGoy PK, 1992. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 16 : 290-300.

- Nishimoto M and Varanasi U, 1987. Unpublished observations. In *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment* (Varanasi U, ed), p124. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1989.
- NRC (National Research Council), 1987. Committee on biological markers. *Environ. Health Perspect.*, 74 : 3-9.
- NRCC, 1983. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: formation, sources, fate and effects on aquatic biota. National Research Council Canada 18981, 1-209.
- 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.
- O'Neill SM, Lippert GR, Myers SM, Horness BH and Landolt ML, 1998. Geographic and temporal patterns in toxicopathic liver lesions in English sole (*Pleuronectes vetulus*) from Puget Sound and relationship with contaminant concentrations in sediments and fish tissues. In *Puget Sound research '98 proceedings*. Puget Sound Water Quality Action Team: Olympia, WA, 730.
- Padrós J, Pelletier E, Reader S and Denizeau F, 2000. Mutual in vivo interactions between benzo[a]pyrene and tributyltin in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Environ Toxicol. Chem.*, 19(4) : 1019-1027.
- Pahlman R and Pelkonen O, 1987. Mutagenicity studies of different polycyclic aromatic hydrocarbons: The significance of enzymatic factors and molecular structure. *Carcinogenesis*, 8 : 773-778.
- Paine MD, Chapman PM, Allard PJ, Murdoch MH and Minifie D, 1996. Limited bioavailability of sediment PAH near an aluminium smelter-contamination does not equal effects. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15(11) : 2003-2018.
- Pangrekar J, Kole PL, Honey SA, Kumar S and Sikka HC, 2003a. Metabolism of chrysene by brown bullhead liver microsomes. *Environ. Toxicol.*, 71 : 67-73.
- Pangrekar J, Kole PL, Honey SA, Kumar S and Sikka HC, 2003b. Metabolism of phenanthrene by brown bullhead liver microsomes. *Aquat. Toxicol.*, 64 : 407-418.
- Payne JF, 1976. Field evaluation of benzopyrene hydroxylase induction as a monitor for marine pollution. *Science*, 191 : 945-949.
- Pearlman RS, Yalkowsky SH and Banerjee S, 1984. Water solubility of polynuclear aromatic and heteroaromatic compounds. *J. Phys. Chem. Ref. Data*. 13(2) : 555-562.
- Peltonen K and Dipple A, 1995. Polycyclic aromatic hydrocarbons chemistry of DNA adduct formation, *J. Occup. Environ. Med.*, 37 : 52-58.
- Penning TM, Burczynski ME, Hung C-F, McCoull KD, Palackal NT and Tsuruda L, 1999. Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: Generation of reactive and redox active O-quinones. *Chem. Res.*, 12 : 1-18.
- Peterson I and Wroblewski JS, 1984. Mortality rates of fishes in the pelagic ecosystem. *Canadian J. Fish. Aquat. Sci.*, 41 : 1117-1120.
- Phillips DH and Grover PL, 1994. Polycyclic hydrocarbon activation : bay regions and beyond, *Drug Metab. Rev.*, 26 : 443-467.
- Piskorska-Pliszczynska J, Keys B, Safe S and Newman MS, 1986. The cytosolic receptor binding affinities and AHH induction potencies of 29 polynuclear aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Lett.*, 34 : 67-74.
- Plakunov I, Smolarek TA, Fisher DL, Wiley JC and Baird WM, 1987. Separation by ion-pair high performance liquid chromatography of the glucuronide, sulfate and glutathione conjugates formed from benzo(a)pyrene in cell cultures from rodents, fish and humans. *Carcinogenesis*, 8 : 59.
- Plesha PP, 1986. Unpublished observations. In *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment* (Varanasi U, ed), 128. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1989.
- Pohl RJ, Bend JR, Guarino AM and Fouts JR, 1974. Hepatic microsomal mixed-function oxidase activity of several marine species from coastal Maine. *Drug Metab. Dispos.*, 2 : 545-555.

- Porte C, Escartín E, García de la Parra LM, Biosca X and Albaigés J, 2002. Assessment of coastal pollution by combined determination of chemical and biochemical markers in *Mullus barbatus*. *Mar. Ecology Progress Series*, 235 : 205–216.
- Pritchard JB and Bend JR, 1984. Mechanisms controlling the renal excretion of xenobiotics in fish: Effects of chemical structure. *Drug Metab. Rev.*, 15 : 655-671.
- Pritchard JB and Renfro JL, 1984. Interactions of xenobiotics with teleost renal function. In *Aquatic Toxicology*, Vol. 2 (Weber LJ, ed), p 51. Raven Press, New York.
- Prough RA, Patrizi VW, Okita RT, Masters B and Jacobsson SW, 1979. Characteristics of benzo[a]pyrene metabolism in kidney, liver and lung microsomal fractions from rodents and humans. *Cancer Res.*, 39(4) : 199-206.
- PSWQAT (Puget Sound Water Quality Action Team), 2000. 2000 Puget Sound update: Seventh report of the Puget Sound Ambient Monitoring Program, Puget Sound Water Quality Action Team, Olympia, WA.
- RAOUX CY, 1991. Modélisation du mécanisme de contamination par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) des sédiments marins côtiers de Méditerranée: conséquences sur la biodisponibilité des HAP dans le milieu marin. *Thèse de doctorat, Université de Bordeaux I*, n°565, 136 pp.
- Ravelet C, Krivobok S, Sage L and Steiman R, 2000. Biodegradation of pyrene by sediment fungi. *Chemosphere*, 40 : 557-563.
- Readman JW, Mantoura RFC and Rhead MM, 1987. A record of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) pollution obtained from accreting sediments of the Tamar estuary, U.K.: Evidence for non-equilibrium behaviour of PAH. *Sci. Total Environ.*, 66 : 73-94.
- Readman JW, Fillmann G, Tolosa I, Bartocci J, Villeneuve J-P, Catinni C and Mee LD, 2002. Petroleum and PAH contamination of the Black Sea. *Mar. Poll. Bull.*, 44(1) : 48-62.
- Reed WE and Kaplan IR, 1977. The chemistry of marine petroleum seeps. *J. Geochem. Explor.*, 7 : 255-293.
- Reichert WL and Varanasi U, 1982. Metabolism of orally administered naphthalene in spawning English sole (*Parophrys vetulus*). *Environ. Res.*, 27 : 316.
- Reynolds WJ, Feist SW, Jones GJ, Lyons BP, Sheahan DA, Stentiford GD, 2003. Comparison of biomarker and pathological responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) induced by ingested polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination. *Chemosphere*, 52 : 1135–1145.
- Rhodes LD, Myers MS, Gronlund WD and McCain BB, 1987. Epizootic characteristics of hepatic and renal lesions in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. *J. Fish Biol.*, 31 : 395-408.
- Ribera D, 1990. Métabolisme oxydatif chez la moule : peroxydation lipidique et biotransformation des xénobiotiques. *Thèse de doctorat de l'Université de Bordeaux I*.
- Rice JE, Hosted TJ Jr and LaVoie EJ, 1984. Fluoranthene and pyrene enhance benzo[a]pyrene-DNA adduct formation in vivo in mouse skin. *Cancer Lett.*, 24 : 327-333.
- Rice CA, Myers MS, Willis ML, French BL and Casillas E, 2000. From sediment bioassay to fish biomarker - connecting the dots using simple trophic relationships. *Mar. Environ. Res.*, 50 : 527-533.
- Rice SD and Thomas RE, 1989. Effect of pre-treatment exposures of toluene or naphthalene on the tolerance of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) and kelp shrimp (*Eualis suckleyi*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 94 : 289-293.
- Rivas FJ, Beltrán FJ and Acedo B, 2000. Chemical and photochemical degradation of acenaphthylene. Intermediate identification. *J. Hazardous Materials*, 75(1) : 89-98.
- RNO, 2002.- Surveillance du Milieu Marin. Travaux du RNO. Edition 2002. Ifremer et Ministère de l'Écologie et du Développement Durable. ISSN 1620-1124.

- Roubal WT, Collier TK and Malins DC, 1977. Accumulation and metabolism of carbon-14 labeled benzene, naphthalene, and anthracene by young coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 5 : 513-529.
- Roy LA, Steinert S, Bay SM, Greenstein D, Sapozhnikova Y, Bawardi O, Leifer I and Schlenk D, 2003. Biochemical effects of petroleum exposure in hornyhead turbot (*Pleuronichthys verticalis*) exposed to a gradient of sediment collected from a natural petroleum seep in CA, USA. *Aquat. Toxicol.*, 65 : 159-169.
- Ruddock PJ, Bird DJ and McCalley, 2002. Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in three species of fish from the Severn estuary. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 51 : 97-105.
- Ruddock PJ, Bird DJ, McEvoy J and Peters LD, 2003. Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in European eels *Anguilla anguilla* from United Kingdom estuaries. *Sci. Tot. Environ.*, 301 : 105-117.
- Safe S, 2001. Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. *Toxicol. Lett.*, 120 : 1-7.
- Sanborn HR and Malins DC, 1977. Toxicity and metabolism of naphthalene : A study with marine larval invertebrates. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 154 : 151-155.
- Santodonato J, 1997. Review of estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons: relationship to carcinogenicity. *Chemosphere*, 34(4) : 835-848.
- Scheline RR, 1962. O-Methylation in fish. *Nature*, 195 : 904-905.
- Schell JD, Cromer EA and James MO, 1989. Benzo(a)pyrene (BaP) DNA-adducts in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) fed contaminated shellfish. *Toxicologist*, 9 : 42.
- Schiewe MH, Weber DD, Myers MS, Jacques FJ, Reichert WL, Krone CA, Malins DC, McCain BB, Chan S-L and Varanasi, 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 J. Fish. Aquat. Sci.*, 48 : 1750-1760.
- Schmeltz I and Hoffmann D, 1976. Formation of polynuclear aromatic hydrocarbons from combustion of organic matter. In *Carcinogenesis-A comprehensive survey. Vol. 1. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. Chemistry, Metabolism, and Carcinogenesis*. Raven Press, New York. 225-240.
- Schnell JV, Gruger EH and Malins DC, 1980. Monooxygenase activities of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) liver microsomes using three polycyclic aromatic hydrocarbon substrates. *Xenobiotica*, 10 : 229-234.
- Schrank CS, Cormier SM and Blazer VS, 1997. Contaminant exposure, biochemical, and histopathological biomarkers in white suckers from contaminated and reference sites in the Sheboygan River, Wisconsin. *J. Gt. Lakes Res.*, 23(2) : 119-130.
- Schultz M and Schultz J, 1982. Induction of hepatic tumors with 7,12-dimethylbenzanthracene in two species of viviparous species (*genus Poeciliopsis*). *Environ. Res.*, 27 : 337-351.
- Shailaja MS and D'Silva C, 2003. Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chemosphere*, 53 : 835-841.
- Shappell NW, Carlino-MacDonald U, Amin S, Kumar S and Sikka HC, 2003. Comparative metabolism of chrysene and 5-methylchrysene by rat and rainbow trout liver microsomes. *Toxicol. Sci.*, 72 : 260-266.
- Shields PG, Harris CC, Petruzzelli S, Bowman ED and Weston A, 1993. Standardisation of the 32 P-postlabelling assay for polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts, *Mutagenesis*, 8 : 121-126.
- Shugart LR, 1988. Quantitation of chemically induced damage to DNA of aquatic organisms by alkalyne unwinding assay. *Aquat. Toxicol.*, 13 : 43-52.
- Shugart LR, 1990. Biological monitoring: testing for genotoxicity. In *Biomarkers of Environmental Contamination* (McCarthy, J.F., Shugart, L.R, Eds), 205-216. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA.

- Sicre MA, Marty JC, Saliot A, Aparicio X, Grimalt J and Albaiges J, 1987. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in different sized aerosols over the Mediterranean sea: occurrence and origin. *Atmos. Environ.*, 21 : 2247-2259.
- Sikka HC, Rutkowski JP and Kandaswami C, 1990a. Comparative metabolism of benzo[a]pyrene by liver microsomes from brown bullhead and carp. *Aquat. Toxicol.*, 16 : 101-112.
- Sikka HC, Rutkowski JP and Kandaswami C, Kumar S, Earley K and Gupta RC, 1990b. Formation and persistence of DNA adducts in the liver of brown bullheads exposed to benzo[a]pyrene. *Cancer Lett.*, 49 : 81-87.
- Sikka HC, Steward AR, Kandaswami C, Rutkowski JP, Zaleski J, Kumar S, Earley K and Gupta RC, 1991. Metabolism of benzo[a]pyrene and persistence of DNA adducts in the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 100(1-2) : 25-28.
- Simpson CD, Cullen WR, He TYT, Ikonomou M, Reimer KJ, 2002. Metabolism of pyrene by two clam species, *Mya arenaria* and *Protothaca staminea*. *Chemosphere*, 49 : 315-322.
- Sims P, 1962. Metabolism of polycyclic compounds 19. The metabolism of phenanthrene in rabbits and rats: phenols and sulfuric esters. *Biochem. J.*, 84 : 558-563.
- Sims P and Grover PL, 1974. Epoxides in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and carcinogenesis. *Adv. Cancer Res.*, 20 : 165-274.
- Sims P, Grover LL, Swaisland A Pal K and Hewer A, 1974. Metabolic activation of benzo[a]pyrene proceeds by a diol-epoxide. *Nature*, 252 : 326-328.
- Sims JL, Sims RC and Matthews JE, 1990. Approach to bioremediation of contaminated soil. *Hazardous Waste & Hazardous Materials*, 7 : 117-149.
- Singer SC and Lee RF, 1977. Mixed-function oxygenase activity in blue crab *Callinectes sapidus*: tissue distribution and correlation with changes during molting and development. *Biol. Bull.*, 153 : 377-386.
- Singer SC, March PE, Gonsoulin F and Lee RF, 1980. Mixed function oxygenase activity in the blue crab, *Callinectes sapidus*: characterization of enzyme activity from stomach tissue. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 65 : 129-134.
- Singh R, Tucek M, Maxa K, Tenglerova J and Weyand EH, 1995. A rapid and simple method for the analysis of 1-hydroxypyrene glucuronide : a potential biomarker for polycyclic aromatic hydrocarbon exposure. *Carcinogenesis*, 16(12) : 2909-2915.
- Sinsheimer JE, Hooberman BH, Das SK, Savla PM, Ashe AJ, 1992. Genotoxicity of chryseno(‘,5-bcd)thiophene and its sulfone derivative. *Environ. Mol. Mutagen.*, 19(3) : 259-264.
- Siwinska E, Mielzynska D, Bubak A, Smolik E, Baan Ra and Szyfter K, 1999. The effect of coal stoves and environmental tobacco smoke on the level of urinary 1-hydroxypyrene. Biomarkers in monitoring of occupational and environmental exposure to organic genotoxic substances. *Mut. Res., Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, ; 445(2) : 147-153.
- Smith CJ, Grainger J, Patterson DG, 1998. Separation of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites by gamma-cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection. *J. Chrom. A*, 803(1-2) : 241-247.
- Soclo HH, 1986. Etude de la distribution des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les sédiments marins récents, identification des sources. *Thèse de doctorat, Université de Bordeaux I*, n°50.
- Sol SY, Bill BD, Johnson LL and Collier TK, 1999. Effects of contaminants on reproductive parameters of male English sole (*Pleuronectes vetulus*) from Puget Sound, WA. In *Puget Sound Research '98 Proceedings*. Puget Sound Water Quality Action Team, Olympia, WA, 934.
- Solbakken JE, Palmork KH, Neppelberg T and Scheline RR, 1980a. Urinary and biliary metabolites of phenanthrene in the coalfish (*Pollachius virens*). *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 46 : 127-132.
- Solbakken JE, Palmork KH, Neppelberg T and Scheline RR, 1980b. Distribution of radioactivity in coalfish (*Pollachius virens*) following intragastric administration of [9-¹⁴C] phenanthrene. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 23 : 100-103.

- Solbakken JE and Palmork KH, 1980. Distribution of radioactivity in the chondrichthyes *Squalus acanthias* and the osteichthyes *Salmo gairdneri* following intragastric administration of (9-¹⁴C)phenanthrene. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 25 : 902-908.
- Solbakken JE and Palmork KH, 1981. Metabolism of Phenanthrene in various marine animals. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 70 : 21-26.
- Solbakken E, Knap AH and Palmork KH, 1982. Disposition of (9-¹⁴C)phenanthrene in a subtropical marine teleost (*Haemulon sciurus*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 28 : 285.
- Solbakken JE, Solberg M and Palmork KH, 1984. A comparative study on the disposition of three aromatic hydrocarbons in flounder (*Platichthys flesus*). *FiskDir. Skr. Ser. Havunders.*, 17 : 473.
- Spehar RL, Poucher S, Brooke LT, Hansen DJ, Champlin D and Cox DA, 1999. Comparative toxicity of fluoranthene to freshwater and saltwater species under fluorescent and ultraviolet light. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 37(4) : 496-502.
- Spies RB, Stegeman JJ, Hinton DE, Woodin B, Smolowitz R, Okihiro M and Shea D, 1996. Biomarkers of hydrocarbon exposure and sublethal effects in embiotocid fishes from a natural petroleum seep in the Santa Barbara Channel. *Aquat. Toxicol.*, 34 : 195-219.
- Spitsbergen JM, Tsai HW, Reddy A, Miller T, Arbogast D and Hendricks JD, 2000. Neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*) treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene by two exposure routes at different developmental stages. *Toxicol. Pathol.*, 28 : 705-715.
- Spooner N, Gibbs PE, Bryan GW and Goal LJ, 1991. The effect of tributyltin upon steroid titres in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, and the development of imposex. *Mar. Environ. Res.*, 32 : 37-49.
- Satham CN, Melancon MJ and Lech JJ, 1976. Bioconcentration of xenobiotics in trout bile: a proposed monitoring aid for some waterborne chemicals. *Science*, 193 : 680-681.
- Stagg RM, Rusin J, McPhail ME, McIntosh AD, Moffat CF and Craft JA, 2000. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on expression of CYP1A in salmon (*Salmo salar*) following experimental exposure and after the Braer oil spill. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19 : 2797-2805.
- Stegeman JJ, 1979. *J. Fish. Res. Bd Can.*, 36 : 1400.
- Stegeman JJ, 1985. Benzo(a)pyrene oxidation and microsomal enzyme activity in the mussel (*Mytilus edulis*) and other bivalve mollusc species from the Western North Atlantic. *Mar. Biol.*, 89 : 21-30.
- Stegeman JJ, Renton KW, Woodin BR, Zhang Y-S and Addison RF, 1990. Experimental and environmental induction of cytochrome P450E in fish from Bermuda waters. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 138 : 49-67.
- Stegeman JJ and Lech JJ, 1991. Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environ. Health Perspect.*, 90 : 101-109.
- Stegeman JJ, Brouwer M, Richard TDG, Förlin L, Fowler BA, Sanders BM, van Veld PA, 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In *Biomarkers: Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress* (Huggett RJ, Kimerly RA, Mehrle PM and Bergman HL, Eds), 235-335. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA.
- Stegeman JJ and Hahn ME, 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In *Aquatic toxicology : molecular, biochemical, and cellular perspectives* (Malins DC and Ostrander GK, eds), 87-206. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Stegeman JJ and Livingstone DR, 1998. *Comparative Biochemistry and Physiology, part C*, 121, 1-412.
- Stehr CM, Myers MS, Burrows DG, Krahn MM, Meador JP, McCain BB and Varanasi U, 1997. Chemical contamination and associated liver diseases in two species of fish from San Francisco Bay and Bodega Bay. *Ecotoxicology*, 6(1) : 35-65.

- Stein JE, Hom T and Varanasi U, 1984. Simultaneous exposure of English sole (*Parophrys vetulus*) to sediment-associated xenobiotics. I-Uptake and disposition of ¹⁴C-polychlorinated biphenyls and ³H-benzo(a)pyrene. *Mar. Environ. Res.*, 13 : 97-119.
- Stein JE et al., 1986. Unpublished observations. In Varanasi et al., 1989b.
- Stein JE, Hom T, Casillas E, Friedman A and Varanasi U, 1987. Simultaneous exposure of English sole (*Parophrys vetulus*) to sediment-associated xenobiotics. II-Chronic exposure to an urban estuarine sediment with added ³H-benzo[a]pyrene and ¹⁴C-polychlorinated biphenyls. *Mar. Environ. Res.*, 22(2) : 123-149.
- Stein JE, Hom T, Sanborn HR and Varanasi, 1991. Effects of exposure to a contaminated-sediment extract on the metabolism and disposition of 17β-estradiol in English sole (*Parophrys vetulus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 99 : 231-240.
- Stein JE, Collier TK, Reichert WL, Casillas E, Hom T and Varanasi U, 1992. Bioindicators of contaminant exposure and sublethal effects: studies with benthic fish in Puget Sound, Washington. *Environ. Toxicol. Chem.*, 11 : 701-714.
- Stein JE, Hom T, Collier TK, Brown DW and Varanasi U, 1995. Contaminant exposure and biochemical effects in outmigrant juvenile chinook salmon from urban and nonurban estuaries of Puget Sound, Washington. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14(6) : 1019-1029.
- Steinert SA, Streib-Montee R, Leather JM and Chadwick DB, 1998. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutat. Res.*, 399(1) : 65-85.
- Stephensen E, Svavarsson J, Sturve J, Ericson G, Adolfsson-Erici M and Förlin L, 2000. Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. *Aquat. Toxicol.*, 48 : 431-442.
- Steward AR, Zaleski J, Gupta RC and Sikka HC, 1989. Comparative metabolism of benzo[a]pyrene and (-)benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by hepatocytes isolated from two species of bottom-dwelling fish. *Mar. Environ. Res.*, 28(1-4) : 137-140.
- Steward AR, Zaleski J and Sikka HC, 1990a. Metabolism of benzo[a]pyrene and (-)-trans-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by freshly isolated hepatocytes of brown bullheads. *Chem. Biol. Interact.*, 74 : 119-138.
- Steward AR, Kandaswami C, Chdamaram S, Ziper C, Rutkowski JP and Sikka HC, 1990b. Disposition and metabolic fate of benzo[a]pyrene in the brown bullhead. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9 : 1503-1512.
- Stott GG, Haensly WE, Neff JM and Sharp JR, 1983. Histopathologic survey of ovaries of plaice, *Pleuronectes Platessa L.*, from Aber Wrac'h and Aber Benoit, Brittany, France: Long-term effects of the Amoco Cadiz crude oil spill. *J. Fish Diseases*, 6 : 429-437.
- Stroomberg GJ, Reuther C, Kozin I, van Brummelen TC, van Gestel CAM, Gooijer C and Cofino WP, 1996. Formation of pyrene metabolites by the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Chemosphere*, 33 : 1905-1914.
- Stroomberg GJ, de Knecht JA, Ariese F, Van Gestel CAM and Velthorst NH, 1999. Pyrene metabolites in the hepatopancreas and gut of the isopod *Porcellio scaber*, a new biomarker for polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in terrestrial ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18(10) : 2217-2224.
- Sugiura K, Ishihara M, Shimauchi T and Harayama S, 1997. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environ. Sci. Technol.*, 31: 45-51.
- Suteau P, 1987. Biotransformation des xénobiotiques liposolubles chez un bivalve marin : recherche intégrée pour la définition de tests de toxicité à terme. *Thèse de doctorat de l'Université de Bordeaux I*.
- Sutherland JB, Rafii F, Kahn AA and Cerniglia CE, 1995. Mechanisms of polycyclic aromatic Hydrocarbon degradation. In *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals* (Young LY and Cerniglia C, eds), 269-306. Wiley-Liss, New York.

- Swain L and Melius P, 1984. Characterisation of benzo[a]pyrene metabolites formed by 3-methylcholanthrene-induced goldfish, black bullhead, and brown bullhead. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 79 : 151-158.
- Thomas LC, MacLeod WD and Malins DC, 1977. Identification and quantification of aromatic hydrocarbons metabolites in marine biota. In *Proceedings of the 9th Materials Research Symposium*, National Bureau of Standards, Washington, D.C.
- Thomas RE and Rice SD, 1981. Excretion of aromatic hydrocarbons and their metabolites by freshwater and seawater Dolly Varden char. In *Biological Monitoring of Marine Pollutants* (Vernberg FJ, Calabrese A, Thurberg FP and Vernberg WB, eds), 425. Academic Press, New York.
- Thomas RE and Rice SD, 1982. Metabolism and clearance of phenolic and mono-, di- and polynuclear aromatic hydrocarbons by Dolly Varden char. In *Physiological Mechanisms of Marine Pollutant Toxicity* (Vernberg J, Calabrese A, Thurberg TP and Thurberg WB eds), 161. Academic Press, New York.
- Thomas RE and Rice SD, 1986. Effect of temperature on uptake and metabolism of toluene and naphthalene by Dolly Varden char, *Salvelinus malma*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 84 : 83.
- Tissot BP and Welte DH, 1978. Petroleum formation and occurrence. A new approach to oil and gas exploration. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Tran DQ, Ide CF, McLachlan JA and Arnold SF, 1996. The anti-estrogenic activity of selected polynuclear aromatic hydrocarbons in Yeast expressing human estrogen receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 229 : 102-108.
- Tronczynski J (coord.), 1999. Des contaminants organiques qui laissent des traces : sources, transport et devenir. Fascicule n°12, programme scientifique Seine-Aval.
- Tronczynski J (coordination), Munsch C, Boutier B, Averty B, Guiot N, Moisan K, Truquet I, Dugrais L, 2003. Etude comparative de la contamination des sédiments par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) avant et après le naufrage de l'Erika ; Etude et suivi de la contamination de la colonne d'eau (SEDERIKA). In *Suivi des conséquences écologiques et écotoxicologiques dues au naufrage de l'Erika ; Volet 1 : Etendues spatiale et temporelle : répartition dans le milieu*. Rapport annuel 2003.
- Tuvikene A, Huuskonen S, Koponen K, Ritola O, Mauer U, Lindström-Seppä P, 1999. Oil shale processing as a source of aquatic pollution: monitoring of the biologic effects in caged and feral freshwater fish. *Environ. Health Perspect.*, 107 : 745-752.
- Tyler CR, Jobling S and Sumpter JP, 1998. Endocrine disruption in wildlife : a critical review of the evidence. *Critical Review of Toxicology*, 28 : 319-361.
- Upshall C, Payne JF, Hellou J, 1993. Induction of MFO enzymes and production of bile metabolites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to waste crankcase oil. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12 : 2105-2112.
- US-EPA (Environmental Protection Agency), 1993. Provisional guidance for quantitative risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons. EPA/600/R-93/089, US Environmental Protection Agency, Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office, Cincinnati, Ohio, USA.
- U.S. National Academy of Sciences, 1972. Committee on biologic effects of atmospheric pollutants: Particulate polycyclic organic matter. Washington, DC.
- U.S. National Academy of Sciences, 2003. Oil in the sea III: inputs, fates, and effects. National Research Council. The National Academies Press.
- van der Oost R, Heida H, Opperhuizen A and Vermeulen NPE, 1991. Interrelationships between bioaccumulation of organic trace pollutants (PCBs, OCPs and PAHs), and MFO-induction in fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 100 : 43-47.

- van der Oost R, van Gastel L, Worst D, Hanraads M, Satumalay K, van Schooten FJ, Heida H and Vermeulen NPE, 1994a. Biochemical markers in feral roach (*Rutilus rutilus*) in relation to the bioaccumulation of organic trace pollutants. *Chemosphere*, 29 : 801-817.
- van der Oost R, Van Schooten F-J, Ariese F, Heida H, Satumalay K and Vermeulen NPE, 1994b. Bioaccumulation, biotransformation and DNA binding of PAHs in feral eel (*Anguilla anguilla*) exposed to polluted sediments : a field survey. *Environ.Toxicol. Chem.*, 13(6) : 859-870.
- van der Oost R, Goksøyr A, Celander M, Heida H and Vermeulen NPE, 1996. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*): II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquat. Toxicol.*, 36 : 189-222.
- van der Oost R, Lopes SCC, Komen H, Satumalay K, van den Bos R, Heida H and Vermeulen NPE, 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). *Mar. Environ. Pollut.*, 46 : 315-319.
- van der Oost R, Iero A, Satumalay K and Vermelen NPE, 2000. Validation of inland water pollution assessment using biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*). *Mar. Environ. Res.*, 50 : 431-441.
- van der Oost R, Beyer J and Vermeulen NPE, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 13 : 57-149.
- van der Weiden MEJ, Celander M, Seinen W, van den Berg M, Goksoyr A and Forlin L, 1993. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12 : 989-999.
- van Duuren BL, Katz C and Goldsmith BM, 1973. Brief communication : cocarcinogenic agents in tobacco carcinogenesis. *J. National Cancer Institute*, 51(2) : 703-705.
- van Duuren BL and Goldsmith BM, 1976. Cocarcinogenic and tumor promoting agents of tobacco leaf and tobacco condensate. *J. National Cancer Institute*, 56(6) : 1237-1242.
- van Lipzig M, Goedhart P, Van Haaen M, Vermeulen N and Meerman J, 2000. Binding of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites to the estrogen receptor. *Drug metabolism reviews*, 32 (1) : 115.
- Van Schanke A, Boon JP, Aardoom Y, van Leest A, van Schooten FJ, Maas L, van den Berg M, Everaarts J, 2002. Effect of a dioxin-like PCB (CB 126) on the biotransformation and genotoxicity of benzo[a]pyrene in the marine flatfish dab (*Limanda limanda*). *Aquat. Toxicol.*, 50 : 403-415.
- van Schooten FJ, 1991. Polycyclic aromatic hydrocarbon_/DNA adducts in mice and humans. *Academic thesis*, State University of Leiden, The Netherlands.
- Varanasi U, Uhler M, and Stranahan SI, 1978. Uptake and release of naphthalene and its metabolites in skin and epiderm mucus of salmonids. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 44 : 277-289.
- Varanasi U, Gmur DJ and Treseler PA, 1979. Influence of time and mode of exposure on biotransformation of naphthalene by juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*) and roke sole (*Lepidopsetta bilineata*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 8 : 673-692.
- Varanasi U and Gmur DJ, 1980a. Metabolic activation and covalent binding of benzo[a]pyrene to deoxyribonucleic acid catalysed by liver enzymes of marine fish. *Biochem. Pharmacol.*, 29 : 753-761 .
- Varanasi U and Gmur DJ, 1980b. Unpublished observations. In *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment* (Varanasi U, ed), 95-96. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1989.
- Varanasi U and Gmur DJ, 1980c. *Fedn Proc.*, 38 : 662.
- Varanasi U and Gmur DJ, 1981. Hydrocarbons and metabolites in English sole (*Parophrys vetulus*) exposed simultaneously to [³H]benzo(a)pyrene and [¹⁴C]naphthalene in oil-contaminated sediment, *Aquat. Toxicol.*, 1 : 49-67.

- Varanasi U, Gmur DJ and Reichert WL, 1981. Effect of environmental temperature on naphthalene metabolism by juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 10 : 203.
- Varanasi U, Nishimoto M, Reichert WL and Stein JE, 1982. Metabolism and subsequent covalent binding of benzo(a)pyrene to macromolecules in gonads and liver of ripe English sole (*Parophrys vetulus*). *Xenobiotica*, 12(7) : 417-425.
- Varanasi U, Stein JE, Nishimoto M and Hom T, 1983a. Benzo(a)pyrene metabolites in liver, muscle, gonads and bile of adult English sole (*Parophrys vetulus*). In *Polynuclear aromatic hydrocarbons : formation, metabolism and measurement* (Cooke M and Dennis AJ eds), 1221-1234. Battelle, Columbus, OH.
- Varanasi U, Nishimoto M and Stover J, 1983b. Analysis of biliary conjugates and hepatic DNA binding in benzo(a)pyrene-exposed English sole. In *Polyuclear aromatic hydrocarbons: 8th Int. Symp. on Mechanisms, Methods and Metabolism* (Cooke MW and Dennis AJ, eds), 1315. Batelle Press, Columbus, OH.
- Varanasi U, Reichert WL, Stein JE, Brown DW and Sanborn HR, 1985. Bioavailability and biotransformation of aromatic hydrocarbons in benthic organisms exposed to sediment from an urban estuary. *Environ. Sci. Technol.*, 19 : 836-841.
- Varanasi U, Nishimoto M, Reichert WL and Eberhart B-TL, 1986a. Comparative metabolism of benzo(a)pyrene and covalent binding to hepatic DNA in English sole, starry flounder, and rat. *Cancer Res.*, 46 : 3817-3824.
- Varanasi et al., 1986b. Unpublished results. In *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment* (Varanasi U, ed), p124. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1989.
- Varanasi U, Stein JE, Nishimoto M, Reichert W Land Collier TK, 1987. Chemical carcinogenesis in feral fish : uptake, activation, and detoxication of organic xenobiotics. *Environ. Health Perspect.*, 71 : 155-170.
- Varanasi U, Reichert WL and Stein JE, 1989a. ³²P-postlabelling analysis of DNA adducts in liver of wild English Sole (*Parophrys vetulus*) and Winter Flounder (*Pseudo-pleuronectes americanus*), *Cancer Res.* 49 : 1171-1177.
- Varanasi U, Stein JE and Nishimoto M, 1989b. Biotransformation and disposition of PAH in fish. In *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment* (Varanasi U, ed), 93-149. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Varanasi U, Reichert WL, Eberhart B-TL and Stein JE, 1989c. Formation and persistence of benzo[a]pyrene-diolepoxide-DNA adducts in liver of English sole (*Parophrys vetulus*). *Chem.-Biol. Interactions*, 69(2-3) : 203-216.
- Varanasi U, Nishimoto M, Baird WM and Smolarek TA, 1989d. Metabolic activation of PAH in subcellular fractions and cell cultures from aquatic and terrestrial species. In *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment* (Varanasi U, ed), 93-149. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Varanasi U, Chan S-L, MacLeod WD, Stein JE, Brown DW, Burrows DG, Tilbury KL, Landahl JT, Wigren CA, Hom T and Pierce SM, 1990. Survey of Subsistence Fish and Shellfish for exposure to Oil Spill from the Exxon Valdez, First Year : 1989. *NOAA Technical Memorandum NMFS F/NWC-191*, US Department of Commerce, Seattle, WA.
- Varanasi U and Stein JE, 1991. Disposition of xenobiotic chemicals and metabolites in marine organisms. *Environ. Health Perspect.*, 90 : 93-100.
- Varanasi U, Casillas E, Arkoosh MR, Hom T, Misitano DA, Brown DW, Chan S-L, Collier TK, McCain BB and Stein JE, 1993a. Contaminant Exposure and Associated Biological Effects in Juvenile Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) from Urban and Nonurban Estuaries of Puget Sound. *NOAA Technical Memorandum NMFS-NWFSC-8*.
- Varanasi U, Brown DW, Hom T, Burrows DG, Sloan CA, Jay Field L, Stein JE, Tilbury KL, McCain BB and Chan S-L, 1993b. Volume I: Survey of Alaskan subsistence fish, marine mammal, and

- invertebrate samples collected 1989-91 for exposure to oil spilled from the Exxon Valdez. *NOAA Technical Memorandum NMFS-NWFSC-12*.
- Varanasi U, Brown DW, Hom T, Burrows DG, Sloan CA, Field LJ, Stein JE, Tilbury KL, McCain BB and Chan S-L, 1993c. Volume II: Supplemental information concerning a survey of Alaskan subsistence fish, marine mammal, and invertebrate samples collected 1989-91 for exposure to oil spilled from the Exxon Valdez. *NOAA Technical Memorandum NMFS-NWFSC-13*.
- Venkatesan, 1988. Occurrence and possible sources of perylene in marine sediments- a review. *Mar. Chem.*, 25 : 1-27.
- Venosa AD, Suidan MT, Wrenn BA, Strohmeier KL, Haines JR, Eberhart BL, King D and Holder E, 1996. Bioremediation of an Experimental Oil Spill on the Shoreline of Delaware Bay. *Environ. Sci. Technol.*, 30 : 1764-1775.
- Vermeulen NP, Bessems JG and van de Straat R, 1992. Molecular aspects of paracetamol-induced hepatotoxicity and its mechanism-based prevention. *Drug Metab. Rev.*, 24(3) : 367-407.
- Vethaak AD and Rheinallt T, 1992. Fish disease as a monitor for marine pollution: the case of the North Sea. *Review of Fish Biology and Fisheries*, 2 : 1-32.
- Vethaak AD, Jol JG, Meijboom A, Eggens ML, Rheinallt TA, Wester PW, Van de Zande T, Bergman A, Dankers N, Ariese F, Baan RA, Everts JM, Opperhuizen A and Marquenie JM, 1996. Skin and liver diseases induced in flounder (*Platichthys flesus*) after long-term exposure to contaminated sediments in large-scale mesocosms. *Environ. Health Persp.*, 104(11) : 1218-1229.
- Viganò L, Arillo A, Melodia F, Bagnasco M, Bennicelli C and De Flora S, 1995. Hepatic and biliary biomarkers in rainbow trout injected with sediment extracts from the river Po (Italy). *Chemosphere*, 30 : 2117-2128.
- Viganò L, Camoirano A, Izzotti A, D'Agostini F, Polesello S, Francisci C, De Flora S, 2002. Mutagenicity of sediments along the Po River and genotoxicity biomarkers in fish from polluted areas. *Mutat. Res.*, 515 : 125-134.
- Vindimian E and Garric J, 1989. Freshwater fish cytochrome P450-dependent enzymatic activities: a chemical pollution indicator. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 18 : 277-285.
- Vindimian E, 2000. Complément au SEQ-Eau : méthode de détermination des seuils de qualité pour les substances génotoxiques. INERIS. Verneuil-en-Halatte. Rapport final.
- Wakeham SG, Schaffner C and Giger W, 1980a. Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent lake sediments. I- Compounds derived from biogenic precursors during early diagenesis. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 44 : 415-429.
- Wakeham SG, Schaffner C and Giger W, 1980b. Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent lake sediments. II- Compounds having anthropogenic origin. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 44 : 403-413.
- Wang Z and Fingas M, 1995a. Use of methyl dibenzothiophenes as markers for differentiation and source identification of crude and weathered oils. *Environ. Sci. Technol.*, 29 : 2842-2849.
- Wang Z and Fingas M, 1995b. Differentiation of the source of spilled oil and monitoring of the oil weathering process using gas chromatography-mass spectrometry. *J Chrom. A*, 712 : 321-343.
- Ward GS, Parrish PR and Rigby RA, 1981. Early life stage toxicity tests with a saltwater fish: effects of eight chemicals on survival, growth and development of sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*). *J. Toxicol. Environ. Health*, 8: 225-240.
- Warshawsky D, Barkley W and Bingham E, 1993. Factors affecting carcinogenic potential of mixtures. *Fundamental And Applied Toxicol.*, 20(3) : 376-382.
- Weeks S, Gilles S, Dobson R, Senne S and D'Silva AP, 1990. Derivatization of benz[a]anthracene metabolites for detection by laser excited Shpol'skii spectrometry. *Anal. Chem.*, 62(14) : 1472-1477.
- White KL, 1986. An overview of immunotoxicology and carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Carcino. Revs.*, 2 : 163-202.

- Whitlock JP Jr, Okino ST, Dong L, Ko HP, Clarke-Katzenberg R, Ma Q and Li H, 1996. Induction of cytochrome P-4501A1: a model for analyzing mammalian gene transcription. *FASEB J.*, 10 : 809-818.
- Whyte JJ, Jung RE, Schmitt CL and Tillitt DE, 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical Reviews in Toxicol.*, 30(4) : 347-550.
- Willet K, Steinberg M, Thomsen J, Narasimhan TR, Safe S, McDonald S, Beatty K and Kennicutt MC, 1995. Exposure of killifish to benzo[a]pyrene : comparative metabolism, DNA adduct formation and aryl hydrocarbon (Ah) receptor agonist activities. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, 112(1) : 93-103.
- Willet KL, McDonald SJ, Steinberg MA, Beatty KB, Kennicutt MC and Safe SH, 1997. Biomarker sensitivity for polynuclear aromatic hydrocarbon contamination in two marine fish species collected in Galveston bay, Texas. *Environ Toxicol. Chem.*, 16(7) : 1472-1479.
- Wills ED, 1980. In *Microsomes, drug oxidations, and chemical carcinogenesis* (Coon MJ, Conney AH, Estabrook RW, Gelboin HV, Gillette JR and O'Brien PJ, eds), 545. Academic Press, New York.
- Winkler DL, Duncan KL, Hose JE and Puffer HW, 1983. Effects of benzo(a)pyrene on the early development of California grunion, *Leuresthes tenuis* (Pisces, Atherinidae). *Fish Bull.*, 81 : 473-481.
- Winston GW and Di Giulio RT, 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.*, 19(2) : 137-161.
- Windsor JG and Hites RA, 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Gulf of Maine sediments and Nova Scotia soils. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 43 : 27-33.
- Wise SA, Schantz MM, Benner BA, Hays MJ and Schiller SB, 1995. Certification of polycyclic aromatic hydrocarbons in a marine sediment standard reference material. *Anal. Chem.*, 67 : 1171-1178.
- Wolfe DA, Hameedi MJ, Galt JA, Watabayashi G, Short J, O'claire C, Rice S, Michel J, Payne JR, Braddock J, Hanna S and Sale D, 1994. The fate of the oil spilled from the Exxon Valdez. *Environ. Sci. Technol.*, 28(13): 561-568.
- Wootton AN, Herring C, Spry JA, Livingstone DR and Goldfarb PS, 1995. Evidence for the existence of cytochrome P450 gene families, CYP1A1, 3A, 4A1, 11A1 in the common mussel, *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.*, 39 : 21-26.
- Wootton AN, Goldfarb PS, Lemaire P, O'Hara SCM and Livingstone DR, 1996. Characterisation of a CYP1A-like enzyme in digestive gland of the common mussel, *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.*, 42 : 297-301.
- Working Group on Biological Effects of Contaminants (WGBEC), 2002. Rapport annuel. Conseil International pour l'Exploration de la Mer. (www.ices.dk/reports/MHC/2002/WGBEC02.pdf)
- Wormhoudt LW, Commandeur JNM and Vermeulen NPE, 1999. Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes : relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.*, 29 : 59-124.
- Xu X and Hurtubise RJ, 1998. Determination of the pKa values of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites by capillary zone electrophoresis. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 22 : 669-679.
- Yang X, Peterson DS, Baumann PC and Lin ELC, 2003. Fish biliary PAH metabolites estimated by fixed-wavelength fluorescence as an indicator of environmental exposure and effects. *J. Great Lakes Res.*, 29(1) : 116-123.
- Yan L-S, 1985. Study of the carcinogenic mechanism for polycyclic aromatic hydrocarbons-extended bay region theory and its quantitative model. *Carcinogenesis*, 6 : 1-6.
- Yang Y, Griffiths WJ, Sjoval J, Gustafsson JA, Rafter J, 1997. Liquid chromatography mass spectrometry with collision-induced dissociation of conjugated metabolites of benzo[a]pyrene. *J. Am. Soc. Mass Spectrometry*, 8(1) : 50-61.
- Youngblood WW and Blummer M, 1975. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment : homologous series in soils and recent marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 39 : 1303-1314.

- Yu Y, Wade TL, Fang J, McDonald S, Brooks JM, 1995. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in Antarctic fish (*Notothenia gibberifrons*) injected with diesel fuel Arctic. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 29(2) : 241-246.
- Yuan Z-X, Honey SA, Kumar S and Sikka HC, 1999. Comparative metabolism of dibenzo[a,l]pyrene by liver microsomes from rainbow trout and rats. *Aquat. Toxicol.*, 45 : 1-8.
- Yunker MB, MacDonald RW, Cretney WJ, Fowler BR and McLaughlin FA, 1993. Alkane, terpene, and polycyclic aromatic hydrocarbon geochemistry of the Mackenzie River and Mackenzie shelf : riverine contributions to Beaufort Sea coastal sediment. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 57(13) : 3041-3061.
- Yunker M and MacDonald R, 1995. Composition and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Mackenzie River and on the Beaufort Sea shelf. *Arctic*, 48(2) : 118-129.
- Yunker MB, Snowdon LR, MacDonald RW, Smith JN, Fowler MG, Skibo DN, McLaughlin FA, Danyushevskaya AI, Petrova VI and Ivanov GI, 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbon composition and potential sources for sediment samples from the Beaufort and Barents Seas. *Environ. Sci. Technol.*, 30(4) : 1310-1320.
- Yunker MB, MacDonald RW, Goyotte D, Paton DW, Fowler BR, Sullivan D, Boyd J, 1999. Natural and anthropogenic inputs of hydrocarbons to the Strait of Georgia. *Sci. Total Environ.*, 225 : 181-209.
- Yunker MB, MacDonald RW, Vingarzas R, Mitchell RH, Goyette D and Sylvestre S, 2002. PAHs in the Fraser River basin : a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Org. Geochem*, 33(4) : 489-515.
- Yuste L, Corbella ME, Turiégano MJ, Karlson U, Puyet A and Rojo F, 2000. Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. *FEMS Microbiology Ecology*, 32(1) : 69-75.
- Zaleski J, Steward AR and Sikka HC, 1991. Metabolism of benzo[a]pyrene and (-)-trans-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by freshly isolated hepatocytes from mirror carp. *Carcinogenesis*, 12(2) : 167-174.
- Zepp RG and Schlotzhauer PF, 1979. Photoreactivity of selected aromatic hydrocarbons in water. In *Polynuclear aromatic hydrocarbons* (Jones PW and Leber P, eds), 141-158. Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, MI.

ANNEXES

ANNEXE 1

Listes de HAP

naphtalène, acénaphtylène, acénaphène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benz(a)anthracène, chrysène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)pyrène, dibenz(a,h)anthracène, benzo(g,h,i)pérylène, indéno(1,2,3-cd)pyrène

Liste des 16 HAP prioritaires de l'US-EPA (Agence Américaine de Protection de l'Environnement). En raison de la coélution du triphénylène et du chrysène, du benzo(j)fluoranthène avec le benzo(b)fluoranthène et le benzo(k)fluoranthène, et le dibenz(a,c)anthracène avec le dibenz(a,h)anthracène en CPG/SM, on quantifie en fait 19 HAP et non 16 HAP par cette méthode (16 HAP US-EPA + 3). Lorsque l'on parlera de la somme des HAP de l'US-EPA, il s'agira donc de la somme des 19 HAP.

(mono-, di-, tri-, tetra-)méthylnaphtalènes, (mono-, di-)méthylfluorènes, (mono-, di-, tri-)méthyldibenzothiophènes, (mono-, di-, tri-) méthylphénanthrènes, (mono-, di-)méthylpyrènes, (mono-, di-)méthylchrysènes, monométhylbenzonaphtothiophènes, monométhylbenzo-fluoranthènes

Liste des HAP alkylés recherchés lors du suivi Erika et récemment ajoutés au suivi du RNO en plus des 16 HAP de l'US-EPA, du dibenzothiophène et des benzonaphtothiophènes.

naphtalène, 1-méthylnaphtalène, 2-méthylnaphtalène, 2,6-diméthylnaphtalène, biphényle, acénaphène, phénanthrène, 1-méthylphénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benz(a)anthracène, chrysène, benzo(e)pyrène, benzo(a)pyrène, pérylène, dibenz(a,h)-anthracène, indéno(1,2,3-cd)pyrène

Liste des 18 HAP quantifiés dans les organismes dans le cadre du programme américain Mussel watch.

ANNEXE 2

Concentrations en HAP parents dissous et particulaires de différentes masses d'eau

Site	Année (nb HAP)	HAP dissous en ng/l (moyenne)	HAP particulaire ng/l ($\mu\text{g/g}$)	Référence
Baie de Seine	1993 (12)	4	2-25 (1-3)	Fernandes et al., 1997
Embouchure de la Seine	1993	6-26	33-449 (1-9)	
Fosse	1993		93-618 (4-6)	
Estuaire interne de la Seine	1993	30-36	158-687 (4-14)	
Delta du Rhône	1987 (12)	≤ 50	1-20 (0,4-6)	Bouloubassi et Saliot, 1991
Nord de la Grèce	1996 (16)	184-856 (465)		Manoli et al., 2000
Mer Egée	(14)	0,113-0,489		Maldonado et al., 1999
Mer Baltique	1995 (14)	0,3-0,594		Maldonado et al., 1999
Estuaire du Danube	1995 (14)	0,183-0,214		Maldonado et al., 1999
Royaume-Uni (milieu côtier)	1993- 1995 (15)	nd-83		Law et al., 1997
Royaume-Uni (estuariers)	1993- 1995	1-25000		Law et al., 1997
Baie de Chesapeake (USA)	1993 (17)	20-66		Gustafson et Dickhut, 1997
Mississippi (rivière ; USA)	avril 1999 (15)	surface : 20 ; fond : 7	surface : 117 ; fond : 97	Mitra et Bianchi, 2003
Mississippi (rivière ; USA)	nov. 1999 (15)	surface : 70 ; fond : 70	surface : 57 ; fond : 11	Mitra et Bianchi, 2003
Golfe du Mexique	avril 1999 (15)	surface : 0,06 ; fond : 84	surface : 6 ; fond : 5	Mitra et Bianchi, 2003
Rivière du St Laurent (Canada)	(12)	≤ 11		Pham et al., 1993
Rivière du sud de la Chine	2001 (16)	700-2600	160-430	Luo et al., 2004
Estuaire de Jiulong (Chine)	1999 (16)	6960-26920 (17050)		Maskaoui et al., 2002
Embouchure d'une Rivière proche de Pékin (Chine)	2002 (16)	193-2651 (762)		Zhang et al., 2004
Port de Macao	2001 (16)	700-6500	90-250	Luo et al., 2004

nb HAP : nombre de HAP quantifiés (hormis les HAP coéluant)

ANNEXE 3

Concentrations en HAP parents dans les sédiments de différents sites

Site	Date (nb HAP)	Concentration ng/g de poids sec (moyenne)	Référence
Rivière du nord de la France (eau douce)		(770000)	Ruban et al., 1998
Seine, Oise et Marne (rivière)	1996 (16)	1400-11780	Carpentier et al., 2002
Seine, Oise et Marne (rivière)	1999 (16)	1400-83800	Carpentier et al., 2002
Seine, Oise et Marne (rivière)	2000 (16)	3200-23700	Carpentier et al., 2002
Estuaire de la Gironde (int.)	1993 (17)	sableux : 19-252	Budzinski et al., 1997
Estuaire de la Gironde (int.)	1993 (17)	vaseux : 622- 4888	Budzinski et al., 1997
Gironde (ext.)	1995	214-364	Baumard et al., 1998a
Gironde (int.)		1000-2000	Baumard et al., 1998a
Bassin d'Arcachon ext. (entrée)	1996 (18)	32	Baumard et al., 1998b, Baumard et al., 1999a
Bassin d'Arcachon (int.)	1996 (18)	900-4100	Baumard et al., 1998b, Baumard et al., 1999a
Delta du Rhône		376-1878	Milano et al., 1986
Delta du Rhône		1225-2427	Lipiatou et Saliot, 1991
Delta du Rhône		1070-6364	Bouloubassi et saliot, 1993
Delta du Rhône	(11)	3000-5000	Lipiatou et al., 1997
Zone entre le Delta du Rhône et Monaco		128-238	Mille et al., 1982
Riviera-Marseille		103-1582	Narbonne et al., 1991
Riviera-Toulon		912-8525	Raoux et Garrigues, 1993
Riviera-Cannes		393-661	cité par Lipiatou et al., 1997
Monaco		599-723	Burns et Villeneuve, 1983
Corse		3,5-54	cité par Lipiatou et al., 1997
Toulon	(14)	≤48000	Benlahcen et al., 1997
Côte Méditerranéenne française	1995 et 1996 (14)	36-252	Baumard et al., 1998a et c, Baumard et al., 1999a
Ports Méditerranéens français	1995 et 1996 (14)	282-13000	
Corse	1995	1-17 ; ports : 43-20000	
Côte Méditerranéenne espagnole	1996	1-7	
Ports Méditerranéens espagnols	1996	844-8420	
Sardaigne	1995	1,5 ; port : 919	

Site	Date (nb HAP)	Concentration ng/g de poids sec (moyenne)	Référence
Golfe du Lion		182-763	Lipiatou et Saliot, 1991 ; Tolosa, 1994
Côtes Barcelone et Valence		1396-2313	Grimalt et al., 1984
Delta de l'Ebre		200-6500	Albaiges et al., 1982
Delta de l'Ebre		50-170	Tolosa et al., 1993
Rhin (rivière, Allemagne)		(2600)	van der Hurk et al., 1997
Delta de la Volga	1993	(40)	Winkels et al., 1998
Mer Adriatique		12-174	Marcomini et al., 1986
Mer Adriatique	1996	24-501	Magi et al., 2002
Mer Baltique		720-1900 (1200)	Witt, 1995
Mer Noire	1995	7-638	Readman et al., 2002
Mer Caspienne (Kazakhstan)	2000 (12)		Tolosa et al., 2004
Iles Shetland		≤40	Webster et al., 2001
Lac d'Ecosse	1980-1996	600	Rose and Rippey, 2002
Port de Fremantle (Australie)	1991	≤3200	Burt et Ebell, 1995
Port de Boston (USA)	1999	7300-358000	Wang et al., 2001
Port de Baltimore (USA)		89-46200 (10030)	Ashley et Baker, 1999
Baie de San Fransisco (USA)		2944-29590 (8195)	Pereira et al., 1996
Eaux douces navigables de Louisiane		(7300)	Mowat and Bundy, 2001
New Jersey (eau douce, USA)		(17400)	Pollice et al., 1996
Détroit (rivière, USA)		(76800)	Besser et al., 1996
Mer de Beaufort (Alaska)		159-1092 (275)	Valette-Silver et al., 1999
Antarctique	1988-1991	8-280	Cripps, 1994
Kazakhstan (mer Caspienne)	2000 (16)	1-72 (6)	Tolosa et al., 2004
Azerbaïdjan (mer Caspienne)	2000 (16)	98-1600 (440)	Tolosa et al., 2004
Iran (mer Caspienne)	2000 (16)	22-282 (73)	Tolosa et al., 2004
Turkménistan (mer Caspienne)	2000 (16)	15-51 (33)	Tolosa et al., 2004
Russie (mer Caspienne)	2000 (16)	1-145 (24)	Tolosa et al., 2004
Russie		428-3257 (1481)	Savinov et al., 2003
Corée (baie)		9-1400 (120)	Kim et al., 1999
Corée (baie)		10-3100 (339)	Khim et al., 2001
Malaisie		4-924 (187)	Zakaria et al., 2002
Rivière à Taiwan	(16)	8-356 (81)	Doong et Lin, 2004
Port de Victoria (Hong-Kong)	1992	350-450	Hong et al., 1995
Port de Xiamen (Chine)	1998 (16)	247-480 (367)	Zhou et al., 2000
Sud de la mer de Chine		25-275 (146)	Yang, 2000
Embouchure de rivière proche de Pékin (Chine)	2002 (16)	127-928 (540)	Zhang et al., 2004
Estuaire du Yang-tsé (Chine)	(13)	22-182	Bouloubassi et al., 2001

nb HAP : nombre de HAP quantifiés (hormis les HAP coéluant)

ANNEXE 4

Concentrations en HAP chez deux bivalves : la moule (M) et l'huître (H)

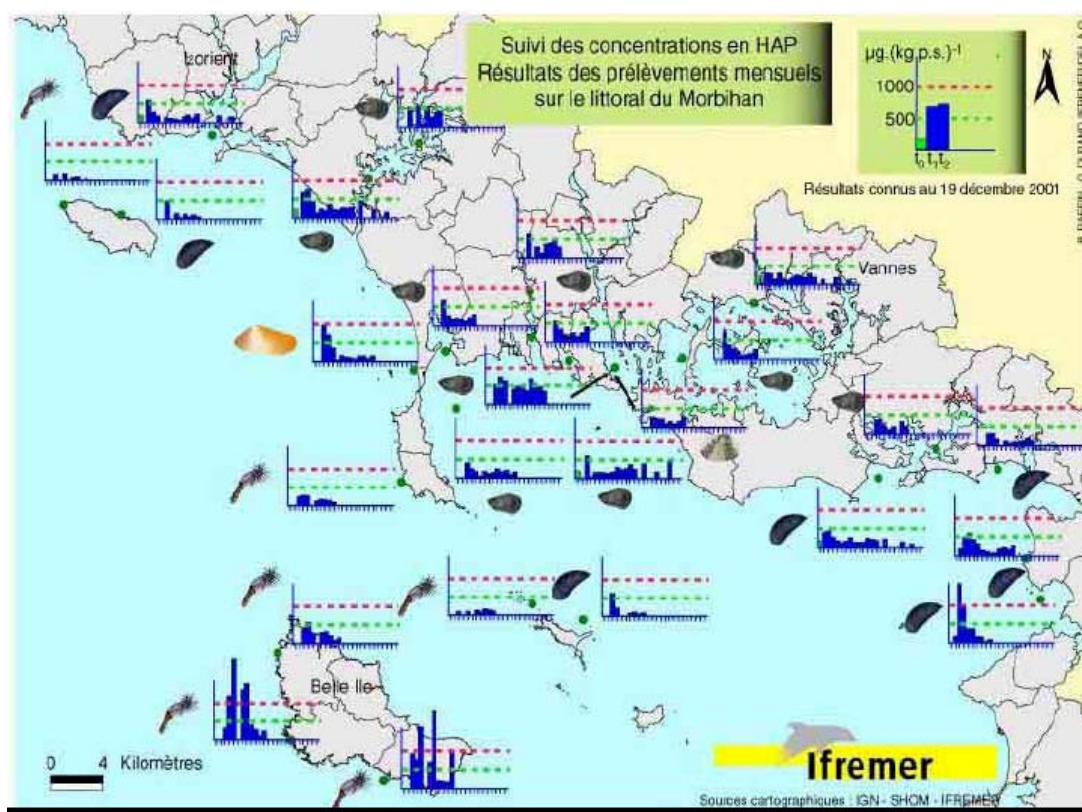
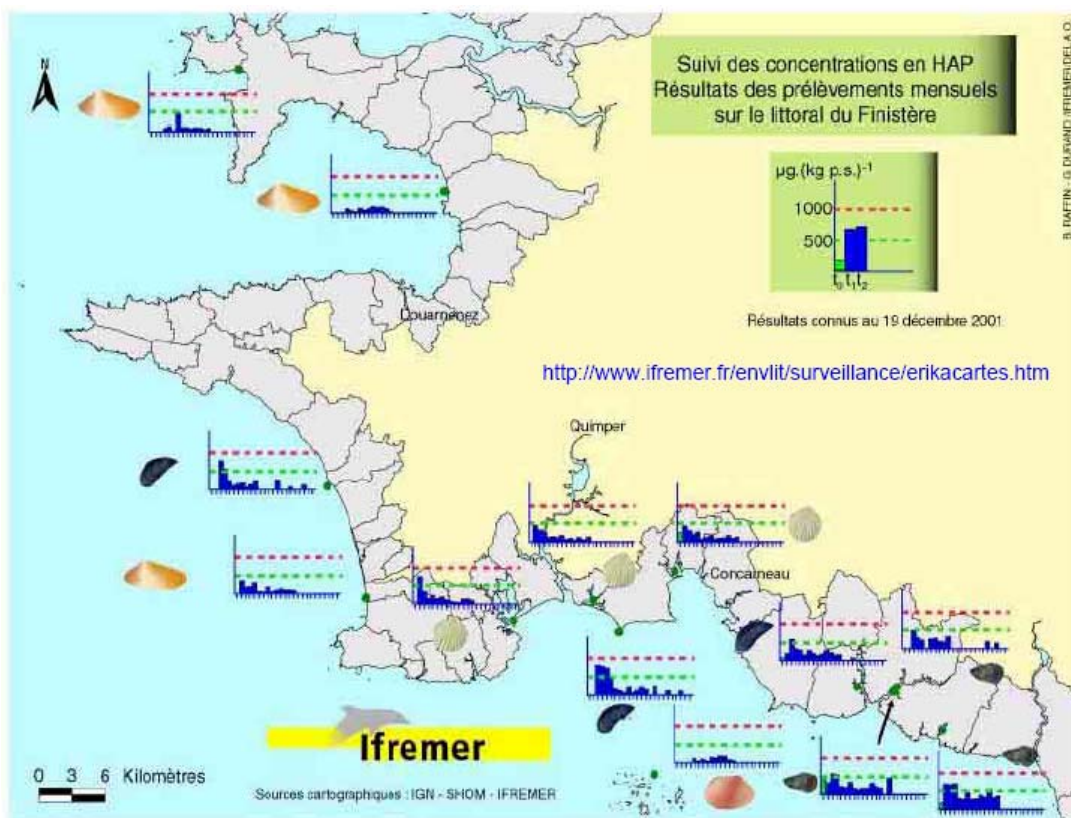
Site	date	Concentration ng/g de poids sec (moyenne)	Référence
Nord	1994-2000	160-270 (M)	Bulletin de surveillance Ifremer 2003 – Laboratoire côtier de Boulogne-sur-Mer
Pas de Calais	1994-2000	100-270	
Somme	1994-2000	75-320	
Seine Maritime	1994-2000	100-300	Bulletin de surveillance Ifremer 2003 – Laboratoire côtier de Port- en-Bessin
Antifer	1994-2000	200-400	
Baie de Seine	1994-1996	150->500	
Ouistreham	1994-2000	50-500	
Port en Bessin	1994-2000	100-225	
Baie des Veys	1994-2000	50-200	
Cherbourg	1994-2000	100-150	
Ouest Contentin	1994-2000	50-300	
Lorient	1994-2000	100-250	Bulletin de surveillance Ifremer 2003 – Laboratoire côtier Morbihan Pays de Loire
Etel	1994-2000	100-300 (H)	
Golfe du Morbihan	1994-2000	100-250	
Vilaine	1994-1999	75-150	Bulletin de surveillance Ifremer 2003 – Laboratoire côtier Morbihan Pays de Loire
	2000	500	
Le Croisic	1994-1999	0-400	
	2000	600	
Baie de Bourgneuf	1994-1999	50-200	
	2000	350	
P. Breton Est	1994-1999	75-175	
	2000	250	
P. Breton Sud	1994-1999	70-225	Bulletin de surveillance Ifremer 2003 – Laboratoires de La Rochelle et de La Tremblade et Laboratoire côtier d'Arcachon
	2000	300	
P. Antioche	1994-1999	75-250	
	2000	300	
Est. Gironde	1994-1999	20-175	
	2000	200-250	
Bassin d'Arcachon	1996-2000	50-300	Bulletin de surveillance Ifremer 2003 – Laboratoire côtier d'Arcachon
Pays basque	1997-2000	50-450 (M-H)	
Roussillon	1994-2000	<70->180 (M)	Bulletin de surveillance Ifremer 2003 – Laboratoire côtier de Sète
Languedoc	1994-2000	15->175	
Rhône	1994-2000	50->400	Bulletin de surveillance Ifremer 2003 – Laboratoire côtier Provence Azur Corse et Laboratoire côtier de Toulon et de la Corse
Var	1994-2000	50->400	
Alpes Maritimes	1994-2000	100-350	
Corse Ouest	1998-2000	80-120	
Corse Est	1995-2000	50-200	
Bassin d'Arcachon (entrée)	1996	300	Baumard et al., 1998b, Baumard et al., 1999a
Bassin d'Arcachon int.	1996	280-2400 (caging)	Baumard et al., 1998b, Baumard et al., 1999a

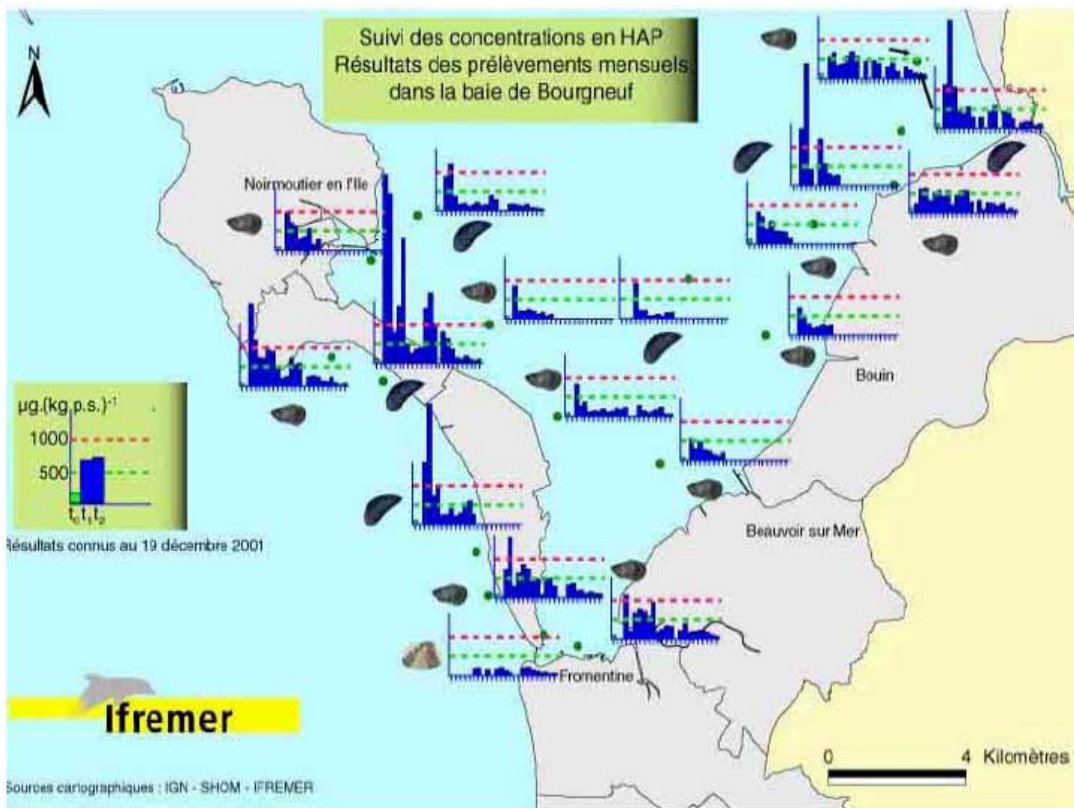
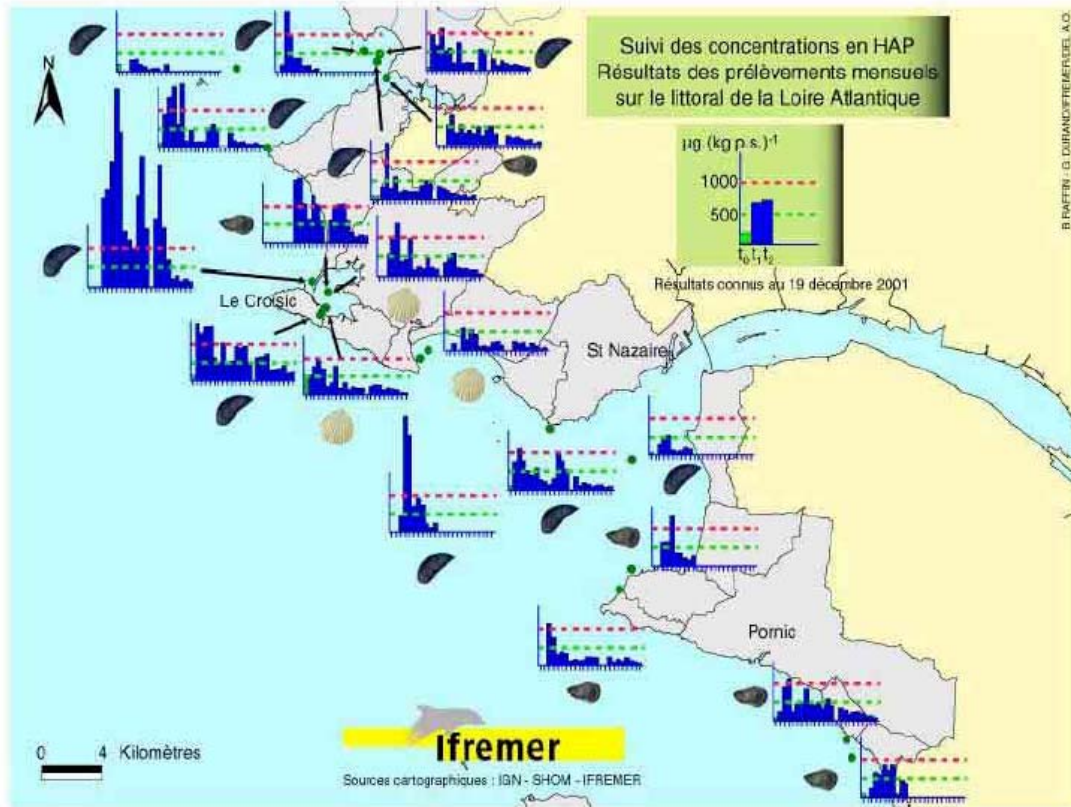
Site	date	Concentration ng/g de poids sec (moyenne)	Référence
Méditerranée (sud de la France)	1995 et 1996 (14)	39-305 ; ports: 48-373	Baumard et al., 1998a,c et d, Baumard et al., 1999a
Corse	1995	26-121 ; ports : 26-208	
Espagne (côte Méditerranéenne)	1996 (14)	38-82 ; ports : 25-336	
Sardaigne	1995 (14)	37-61 ; 390	
Mer Méditerranée et Baltique		25-2420	Baumard et al., 1999b
Mussel Watch (USA)	1986-1997 (18)	(300) (H)	Lauenstein et al., 2002
Golfe du Mexique (fuite naturelle)	(17)	36-7530	Wade et al., 1989
Golfe du Mexique (fuite naturelle)	(18)	214-1346	Powell et al., 1999
Alaska (marée noire de l'Exxon Valdez)	(18)	214-1346	Powell et al., 1999

ANNEXE 5

Suivi des concentrations en HAP de l'US-EPA chez différents mollusques dans le cadre du suivi mensuel Erika sur le littoral français
 (http://www.ifremer.fr/envlit/surveillance/erikacartes.htm, 6 mai 2004)

L'unité de temps des histogrammes est le mois





ANNEXE 6

Valeurs de toxicité aiguë déterminées chez différentes espèces de poisson

HAP	Organisme	Critère d'effet	Toxicité aiguë (µg/l)	Référence
N	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (13-21j)	CL ₅₀ (96h)	4500	Edsall, 1991
	<i>Pimephales promelas</i> (J)	CL ₅₀ (96h)	1990	Millemann et al., 1984
	<i>Pimephales promelas</i> (A)	CL ₅₀ (96h)	7900	De Graeve et al., 1982
	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (A)	CL ₅₀ (96h)	1600	De Graeve et al., 1982
	<i>Oncorhynchus gorbusha</i>	CL ₅₀ (48h)	900-1000	Rice et Thomas, 1989
	<i>Cyprinodon variegatus</i>	CL ₅₀ (96h)	2400	Anderson et al., 1974
Ae	<i>Cyprinodon variegatus</i> (J)	CL ₅₀ (96h)	2200	Heitmuller et al., 1981
	<i>Ictalurus punctatus</i>	CL ₅₀ (96h)	1720	Holcombe, et al., 1983
	<i>Lepomis macrochirus</i>	CL ₅₀ (96h)	1700	Buccafusco et al., 1981
	<i>Pimephales promelas</i> (J)	CL ₅₀ (96h)	1600	Holcombe, et al., 1983
	<i>Pimephales promelas</i> (J)	CL ₅₀ (96h)	608	Cairns et Nebeker, 1982
	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (J)	CL ₅₀ (96h)	670	Holcombe, et al., 1983
	<i>Salmo trutta</i> (J)	CL ₅₀ (96h)	580	Holcombe, et al., 1983
Fe	<i>Lepomis macrochirus</i>	CL ₅₀ (96h)	910	Finger et al., 1985
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CL ₅₀ (96h)	820	Finger et al., 1985
Phe	<i>Micropterus salmoides</i> (O-L)	CL ₅₀ (7j)	250	Millemann et al., 1984
	<i>Gambusia affinis</i>	CL ₅₀ (24h)	150	Neff, 1979
	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (O-L)	CL ₅₀ (7j)	40	Black et al., 1983
A	<i>Lepomis macrochirus</i> (1-1,5g)	CL ₅₀ (96h)	4,5	Oris et Giesy, 1986
	<i>Lepomis macrochirus</i>	CL ₅₀ (96h)	11,9	US-EPA, 1987
	<i>Pimephales promelas</i>	CL ₅₀ (1,6j)	5,4	Oris et Giesy, 1987
F	<i>Lepomis macrochirus</i> (0,3-1,2g)	CL ₅₀ (96h)	4000	Buccafusco et al., 1981
	<i>Pimephales promelas</i> (0,8g)	CL ₅₀ (24h)	200	Kagan et al., 1985
P	<i>Pimephales promelas</i>	CL ₅₀ (1,3h)	25,6	Oris et Giesy, 1987
BaA	<i>Pimephales promelas</i>	CL ₅₀ (3,7j)	1,8	Oris et Giesy, 1987
BkF	<i>Brachydanio rerio</i> (O-L)	CL ₅₀ (42j)	0,68	Hooftman et Evers-de Ruiten, 1992a
BaP	<i>Pimephales promelas</i>	CL ₅₀ (48h)	5,6 (>sol)	Oris et Giesy, 1987

Voir § I.2.2.2 pour la définition de CL₅₀.

xj : âge en jours, J : juvénile, A : adulte, xg : poids en grammes. O : œuf, L : larve.

« >sol » : valeur supérieure à la solubilité du composé dans l'eau.

ANNEXE 7

Valeurs de toxicité chronique déterminées chez différentes espèces de poisson

HAP	Organisme	Critère d'effet	Toxicité chronique (µg/l)	Référence
N	<i>Pimephales promelas</i> (E-L)	LOEC (30j) reproduction	850	De Graeve et al., 1982
	<i>Pimephales promelas</i> (E-L)	NOEC (30j) c	450	De Graeve et al., 1982
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	NOEC (40j) survie	120	Millemann et al., 1984
	<i>Micropterus salmoides</i> (O, L)	NOEC (7j) survie	28	Black et al., 1983
Ae	<i>Pimephales promelas</i> (J)	NOEC (32j) survie	509	Cairns et Nebeker, 1982
Fe	<i>Lepomis macrochirus</i>	NOEC (30j) prédation	19	Finger et al., 1985
	<i>Lepomis macrochirus</i>	NOEC (30j) c	42	Finger et al., 1985
	<i>Lepomis macrochirus</i>	NOEC (30j) m	49	Finger et al., 1985
Phe	<i>Brachydanio rerio</i> (O-L)	NOEC (28j) c	28	Hooftman et Evers-de Ruiter, 1992b
	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (O-L)	NOEC (23j) e	4	Black et al., 1983
	<i>Pimephales promelas</i>	NOEC (25j) m	10	Oris et Giesy, 1987
A	<i>Pimephales promelas</i>	NOEC (9w) déformation	6,6	Hall et Oris, 1991
	<i>Pimephales promelas</i>	NOEC (96h) m	5,4	Oris et Giesy, 1987
	<i>Lepomis macrochirus</i> (1-1,5g)	NOEC (200h) m	1,2-15	Oris et Giesy, 1986
F	<i>Brachydanio rerio</i> (O-L)	NOEC (41j) c	4,8	Hooftman et Evers-de Ruiter, 1992c
	<i>Brachydanio rerio</i> (O-L)	NOEC (41j) m	48	Hooftman et Evers-de Ruiter, 1992c
P	<i>Pimephales promelas</i>	NOEC (4j) m	25,6	Oris et Giesy, 1987
BaA	<i>Pimephales promelas</i>	NOEC (5j) m	1,8	Oris et Giesy, 1987
C	<i>Brachydanio rerio</i> (O-L)	NOEC (42j) c	> 0,9	Hooftman et Evers-de Ruiter, 1992c

HAP	Organisme	Critère d'effet	Toxicité chronique (µg/l)	Référence
BkF	<i>Brachydanio rerio</i> (O-L)	NOEC (42j) c	0,23	Hooftman et Evers-de Ruiters, 1992a
	<i>Brachydanio rerio</i> (O-L)	NOEC (42j) m	0,40	Hooftman et Evers-de Ruiters, 1992a
BeP	<i>Pimephales promelas</i>	NOEC (5j) m	2,9	Oris et Giesy, 1987
BaP	<i>Brachydanio rerio</i>	NOEC (28j) c, e, m	> 4	Hooftman et Evers-de Ruiters, 1992c
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	NOEC (36j) morphologie	2,4	Hannah et al., 1982
	<i>Leuresthes tenuis</i>	NOEC (14j) e	7	Winkler et al., 1983
Per	<i>Pimephales promelas</i> (L)	NOEC (5j) m	1,7 (>sol)	Oris et Giesy, 1987
DBahA	<i>Pimephales promelas</i> (L)	NOEC (5j) m	0,15	Oris et Giesy, 1987
BPer	<i>Pimephales promelas</i> (L)	NOEC (5j) m	0,15	Oris et Giesy, 1987
	<i>Brachydanio rerio</i> (O-L)	NOEC (28j) c, e, m	> 0,16	Hooftman et Evers-de Ruiters, 1992c

Voir § I.2.2.2 pour la définition de NOEC et LOEC.

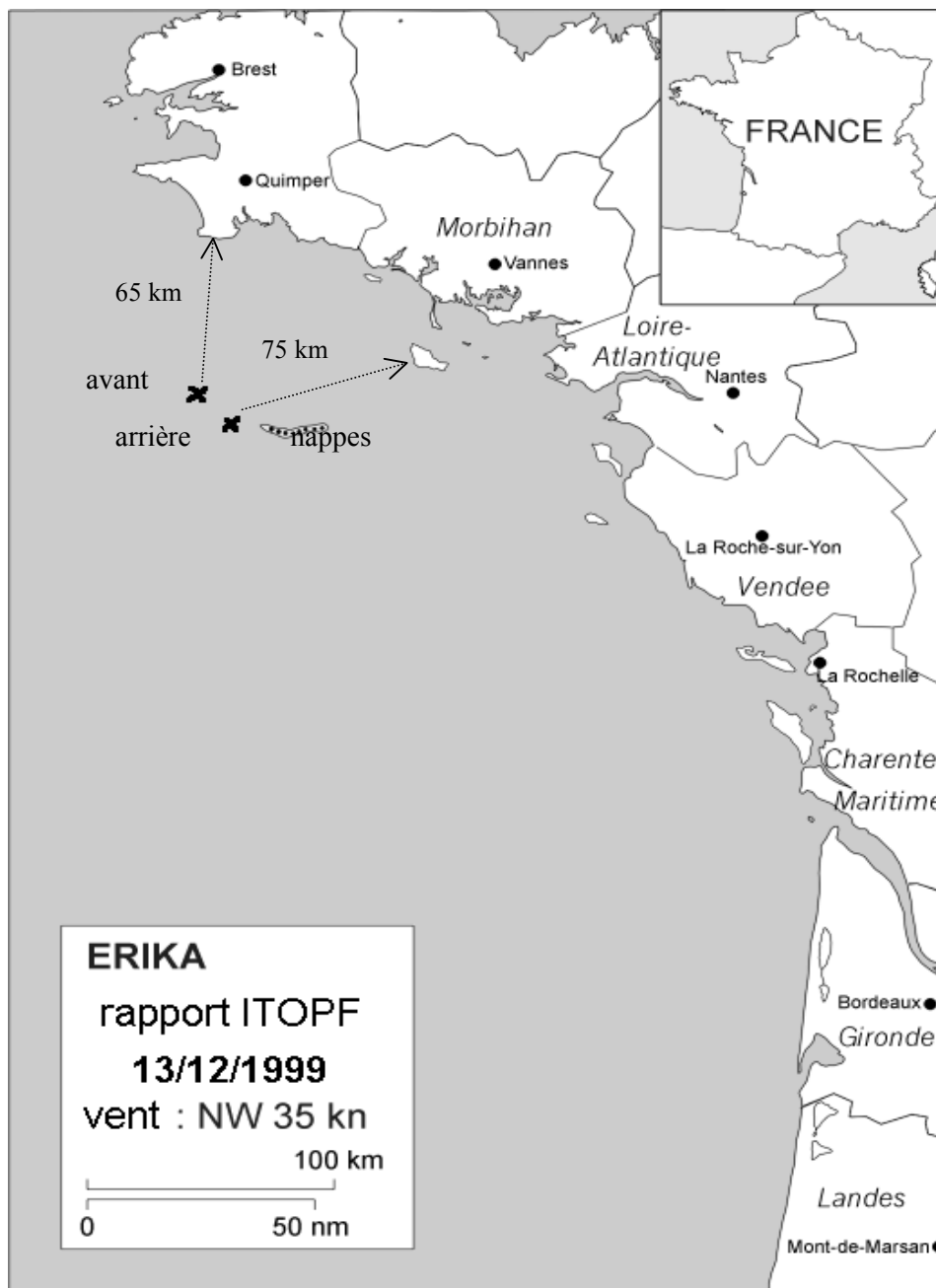
J : juvénile, A : adulte, xg : poids en grammes. E : embryon, O : œuf, L : larve.

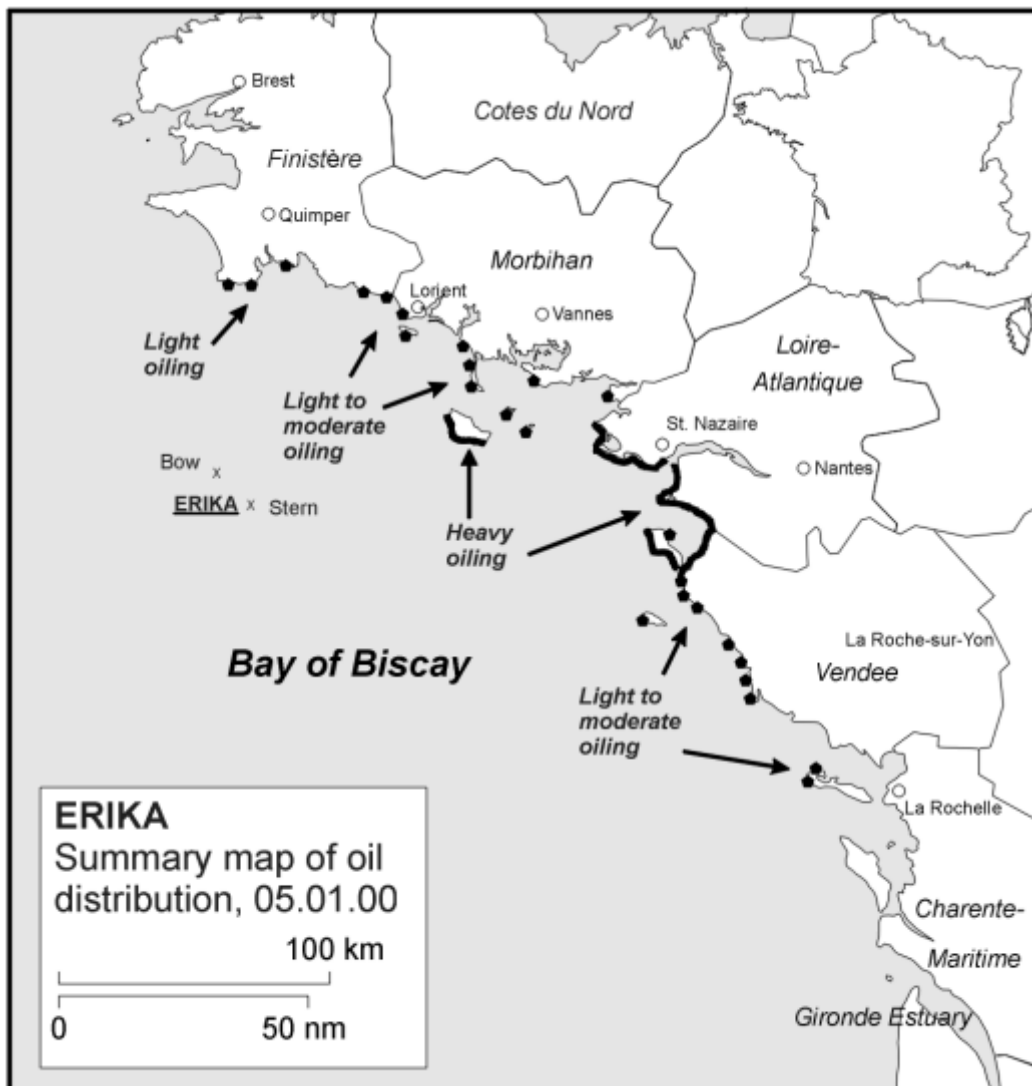
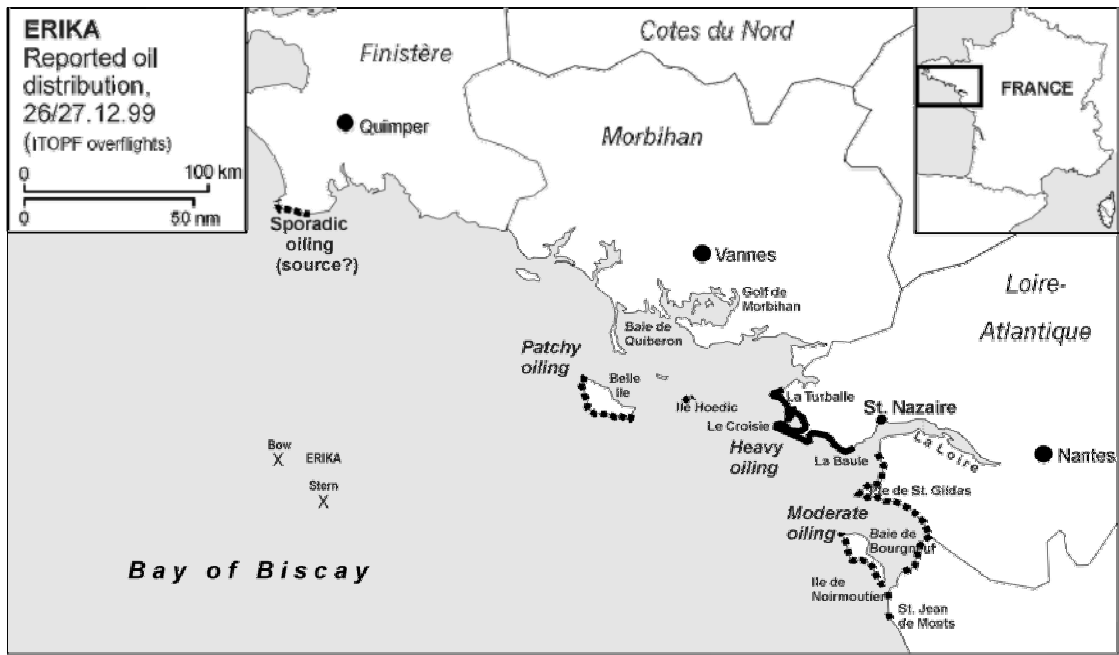
c : croissance, m : mortalité, e : éclosion.

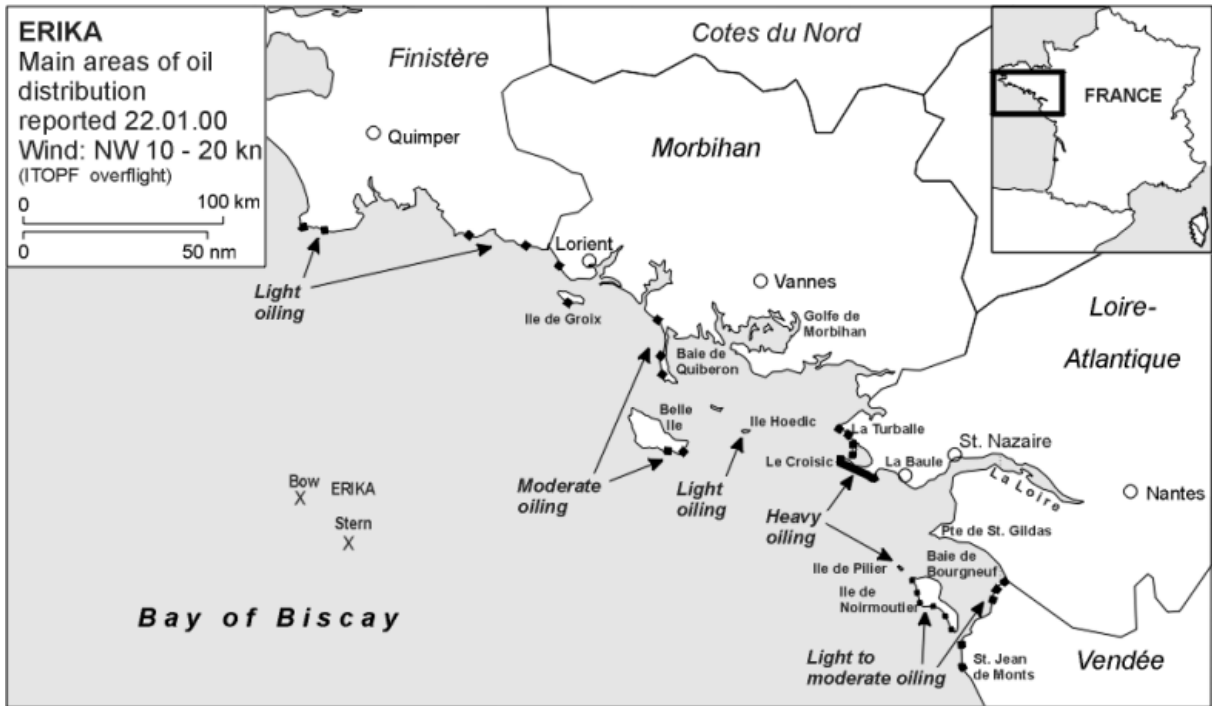
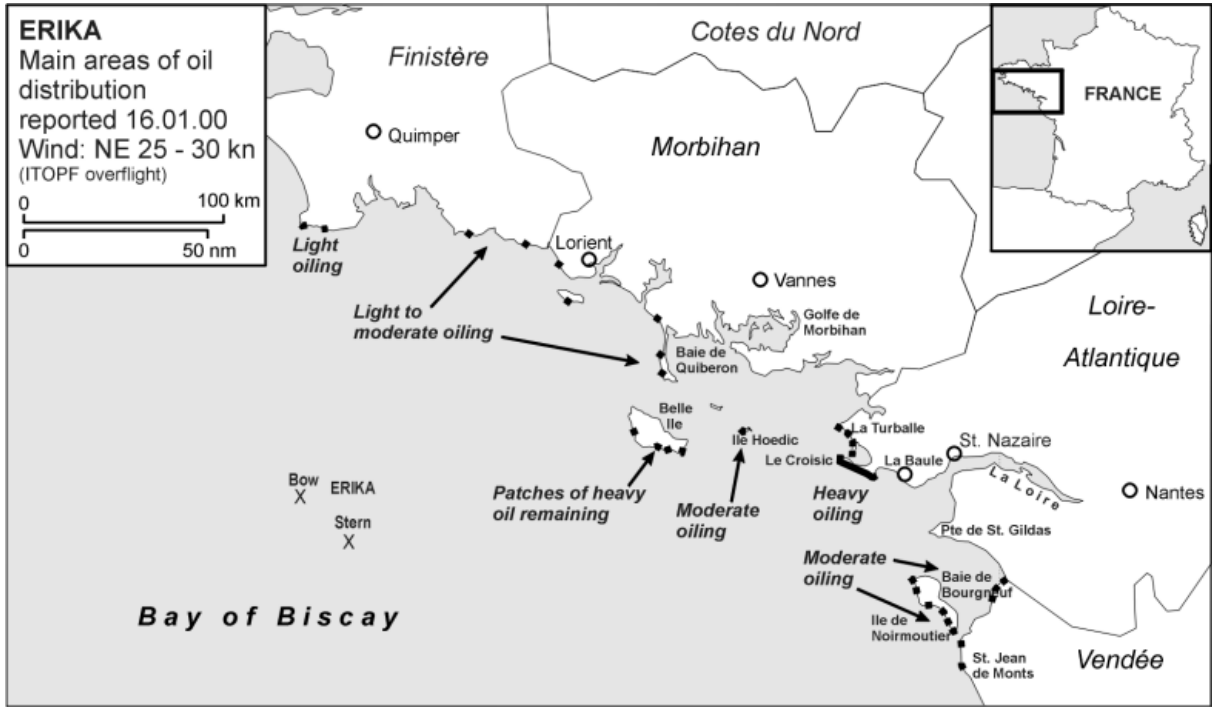
« >sol » : valeur supérieure à la solubilité du composé dans l'eau.

ANNEXE 8

Cartes résumées de la marée noire Erika du 13/12/1999 au 22/01/1999 selon l'ITOPF







ANNEXE 9

Protocole de préparation du plasma sanguin

Le sang est tout d'abord prélevé dans la veine caudale à l'aide d'une seringue stérile (Terumo, VWR, Strasbourg, France) préalablement héparinée (héparine, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Falavier, France). Le sang est récupéré dans un tube eppendorf également hépariné et contenant 2 µl d'aprotinine (aprotinine from bovine lung, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Falavier, France) pour éviter toute coagulation. Après centrifugation à 5000 rpm, 10 min à température ambiante, le plasma, correspondant au surnageant, est récupéré dans un tube eppendorf et stocké dans l'azote liquide (-80°C).

ANNEXE 10

Protocole d'analyse histologique

Les moules entières sont conservées dans du formol salé à 10% jusqu'à analyse. Après déshydratation à l'éthanol, les échantillons sont éclaircis au toluène puis inclus dans de la paraffine (Paraplast plus, Sherwood Medicals). Des coupes de 5 µm d'épaisseur sont réalisées, colorées par de l'hémalum de Mayer (coloration nucléaire), puis par du trichrome de Masson modifié (kit de coloration Sigma). L'observation se fait au microscope.

ANNEXE 11

Liste des composés aromatiques étudiés, de leurs étalons internes de quantification et des rapports masse sur charge (m/z) utilisés pour leur détection en CPG/SM

Composé	m/z	abréviation	Étalon	m/z
Naphtalène	128	N	N-d8	136
2-méthylnaphtalène	142	2-C ₁ N	N-d8	
1-méthylnaphtalène		1-C ₁ N	N-d8	
Ethylnaphtalènes	156	EtN	N-d8	
2,6+2,7-diméthylnaphtalène	156	2,6+2,7-C ₂ N	N-d8	
1,3+1,7-diméthylnaphtalène		1,3+1,7-C ₂ N	N-d8	
1,6-diméthylnaphtalène		1,6-C ₂ N	N-d8	
1,4+2,3-diméthylnaphtalène		1,4+2,3-C ₂ N	N-d8	
1,5-diméthylnaphtalène		1,5-C ₂ N	N-d8	
1,2-diméthylnaphtalène		1,2-C ₂ N	N-d8	
1,3,7-triméthylnaphtalène	170	1,3,7-C ₃ N	N-d8	
1,3,6-triméthylnaphtalène		1,3,6-C ₃ N	N-d8	
1,4,6+1,3,5-triméthylnaphtalène		1,4,6+1,3,5-C ₃ N	N-d8	
2,3,6-triméthylnaphtalène		2,3,6-C ₃ N	N-d8	
1,2,7+1,6,7+1,2,6-triméthylnaphtalène		1,2,7+1,6,7+1,2,6-C ₃ N	N-d8	
1,2,4-triméthylnaphtalène		1,2,4-C ₃ N	N-d8	
1,2,5-triméthylnaphtalène		1,2,5-C ₃ N	N-d8	
1,3,5,7-tétraméthylnaphtalène	184	1,3,5,7-C ₄ N	N-d8	
1,3,6,7-tétraméthylnaphtalène		1,3,6,7-C ₄ N	N-d8	
1,2,6,7+1,2,4,6+1,4,6,7-tétraméthylnaphtalène		1,2,6,7+1,2,4,6+1,4,6,7-C ₄ N	N-d8	
1,2,5,7-tétraméthylnaphtalène		1,2,5,7-C ₄ N	N-d8	
2,3,6,7-tétraméthylnaphtalène		2,3,6,7-C ₄ N	N-d8	
1,2,6,7-tétraméthylnaphtalène		1,2,6,7-C ₄ N	N-d8	
1,2,3,7-tétraméthylnaphtalène		1,2,3,7-C ₄ N	N-d8	
1,2,3,6-tétraméthylnaphtalène		1,2,3,6-C ₄ N	N-d8	
1,2,5,6+1,2,3,5-tétraméthylnaphtalène		1,2,5,6+1,2,3,5-C ₄ N	N-d8	
Acénaphtylène	152	Ay	N-d8	
Biphényle	154	Bi	N-d8	
Acénaphthène	154	Ae	N-d8	
Fluorène	166	Fe	N-d8	
Dibenzothiophène	184	DBT	DBT-d8	192
4-méthylthiophène	198	4-C ₁ DBT	DBT-d8	
1+3-méthylthiophène		1+3-C ₁ DBT	DBT-d8	
2-méthylthiophène		2-C ₁ DBT	DBT-d8	
Diméthylthiophènes	212	C ₂ DBT	DBT-d8	
Phénanthrène	178	Phe	Phe-d10	188
Anthracène	178	A	Phe-d10	
3-méthylphénanthrène	192	3-C ₁ Phe	Phe-d10	
2-méthylphénanthrène		2-C ₁ Phe	Phe-d10	
9+4-méthylphénanthrène		9+4-C ₁ Phe	Phe-d10	
1-méthylphénanthrène		1-C ₁ Phe	Phe-d10	
Diméthylphénanthrènes	206	C ₂ Phe	Phe-d10	
Triméthylphénanthrènes	220	C ₃ Phe	Phe-d10	
2-méthylanthracène	192	2-C ₁ A	Phe-d10	
Fluoranthène	202	F	F-d10	212
Pyrène	202	P	F-d10	
Chrysène+triphénylène	228	C+T	C-d12	240
Méthylchrysènes	242	C ₁ C	C-d12	
Benz(a)anthracène	228	BaA	C-d12	
1,2-benzonaphtothiophène	234	1,2-BNT	C-d12	
2,3-benzonaphtothiophène	234	2,3-BNT	C-d12	
Benzo(e)pyrène	252	BeP	BeP-d12	264
Benzo(a)fluoranthènes	252	BbF+BkF+BjF	BeP-d12	
Pérylène	252	Per	BeP-d12	
Benzo(a)pyrène	252	BaP	BaP-d12	264
Benzo(g,h,i)perylène	276	BPer	BPer-d12	288
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	276	IP	BPer-d12	
Dibenz(a,h)anthracène+ Dibenz(a,h)anthracène	278	DBaA+DBaA	BPer-d12	

ANNEXE 12

Principes de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)

Les composés sont tout d'abord volatilisés dans l'injecteur et entraînés dans le chromatographe le long de la colonne chromatographique par de l'hélium (gaz vecteur). Après avoir été séparés, les composés arrivent dans la source du spectromètre de masse. Il s'agit d'une source d'ionisation à impact électronique où les molécules sont ionisées sous vide par bombardement électronique. Les ions obtenus (ions précurseurs) sont ensuite plus ou moins fragmentés en fonction de leur stabilité (ions produits). Les ions sont ensuite séparés d'après leurs rapports masse sur charge (m/z) dans un analyseur quadripolaire et détectés par un multiplicateur d'électrons. On obtient ainsi un chromatogramme de l'extrait injecté et les spectres de masse des ions correspondant aux molécules, suffisamment volatiles et ionisables, dans la gamme de masse de l'appareil, présentes dans celui-ci.

Deux modes de détection sont possibles. On peut choisir d'effectuer un balayage complet des masses (mode scan) afin de détecter tous les ions formés et de pouvoir résoudre la formule de l'ion précurseur, ou bien on peut sélectionner des ions particuliers (mode SIM pour Single Ion Monitoring). Dans le cas d'analyses quantitatives de composés préalablement identifiés, le mode SIM a été privilégié car il permet d'obtenir une meilleure sensibilité.

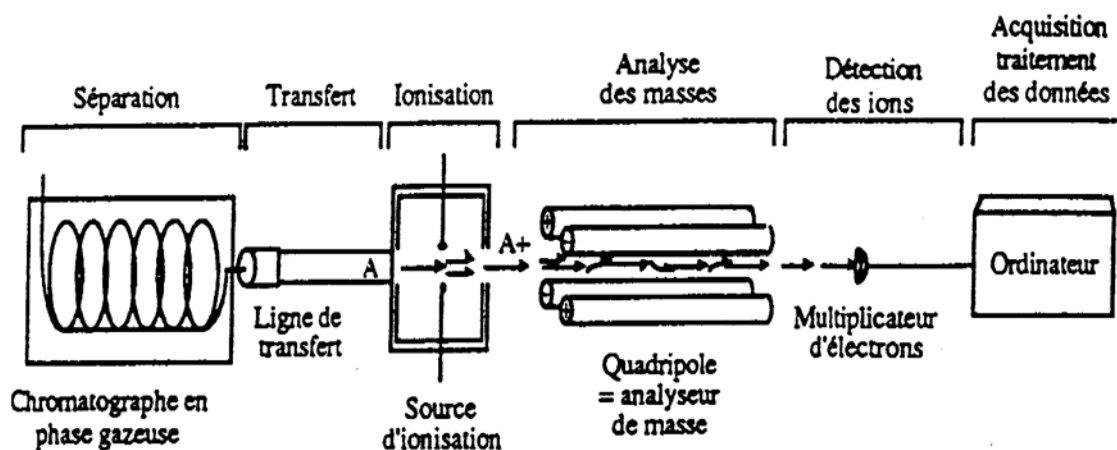


Schéma du couplage CPG/SM

ANNEXE 13

Conditions d'analyse des composés aromatiques par couplage CPG/SM

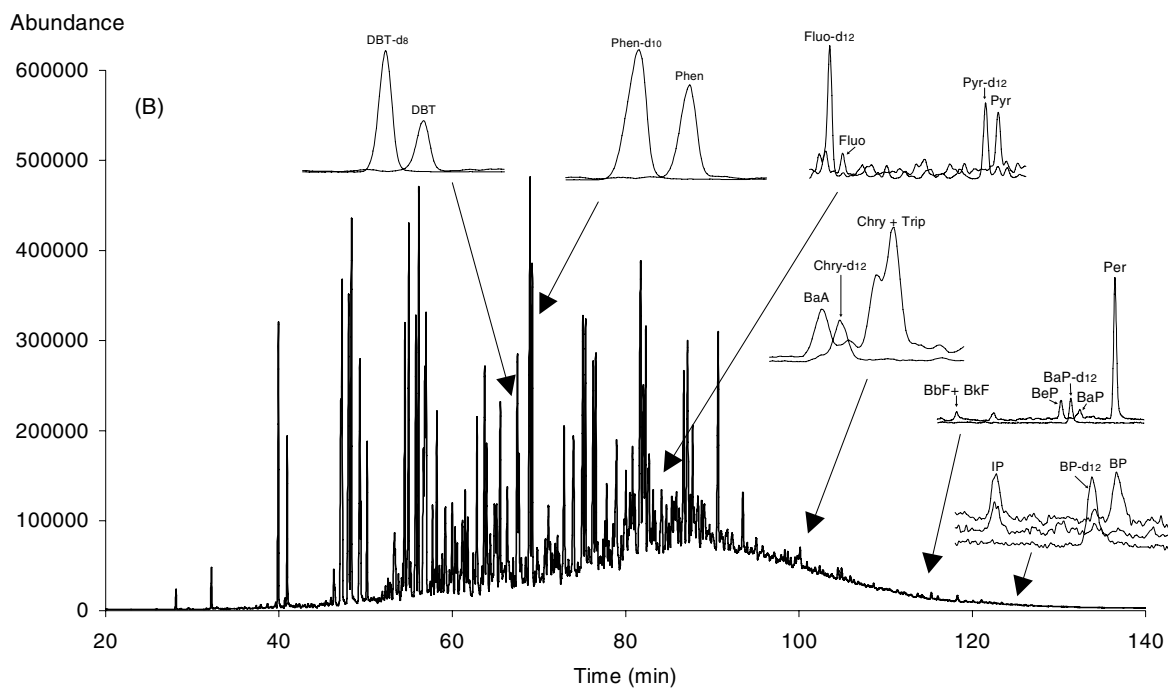
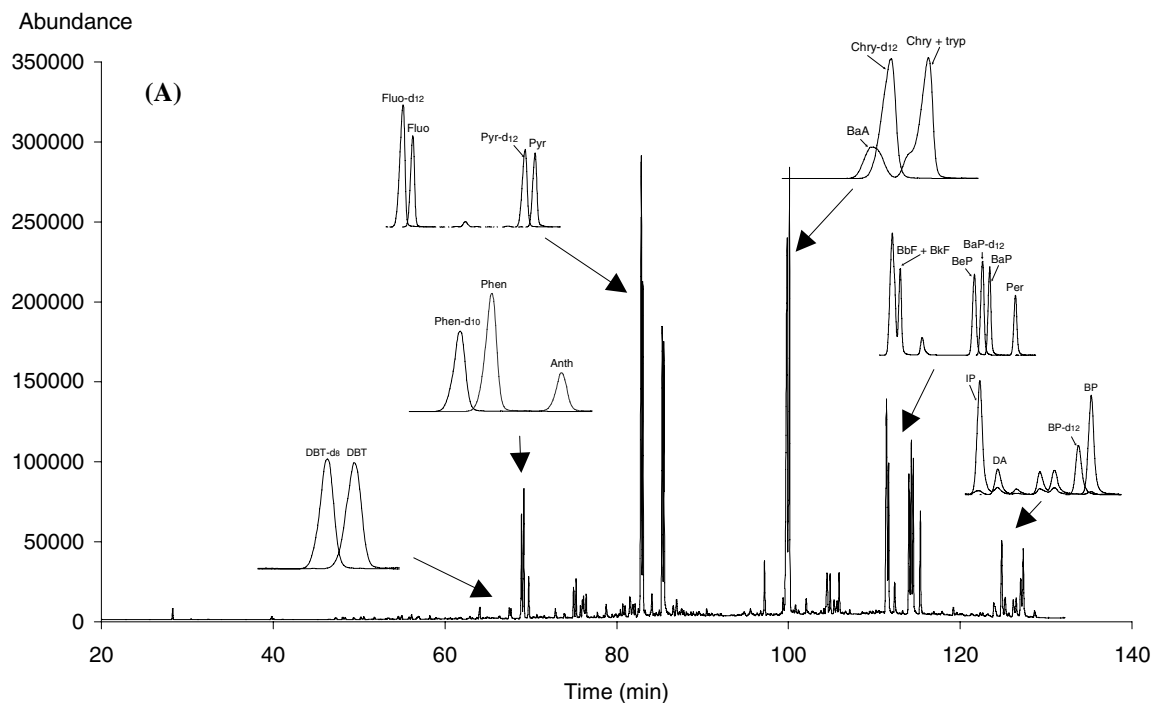
-Chromatographe en phase gazeuse : HP GC 6890A Agilent Technologies (BIOS Analytique, l'Union, France)

Injecteur : PTV automatique en mode splitless pulsé (25 psi, 1 min), 270°C
Gaz vecteur : Hélium 6.0 (Linde, Toulouse, France)
Débit : 1 ml/min
Température de l'interface : 280°C
Colonne : HP5-MS Agilent Technologies (BIOS Analytique, l'Union, France) : 30 m x 0,25 mm Ø x 0,25 µm d'épaisseur de phase constituée à 5% de diphenyl- et 95% de diméthyl-polysiloxane.
Programme de température : de 70°C (2 min) à 300°C (5 min) à 5°C/min.
Purge : 1 min, 60,6 ml/min

-Spectromètre de masse : HP MSD 5973 Network Agilent Technologies (BIOS Analytique, l'Union, France)

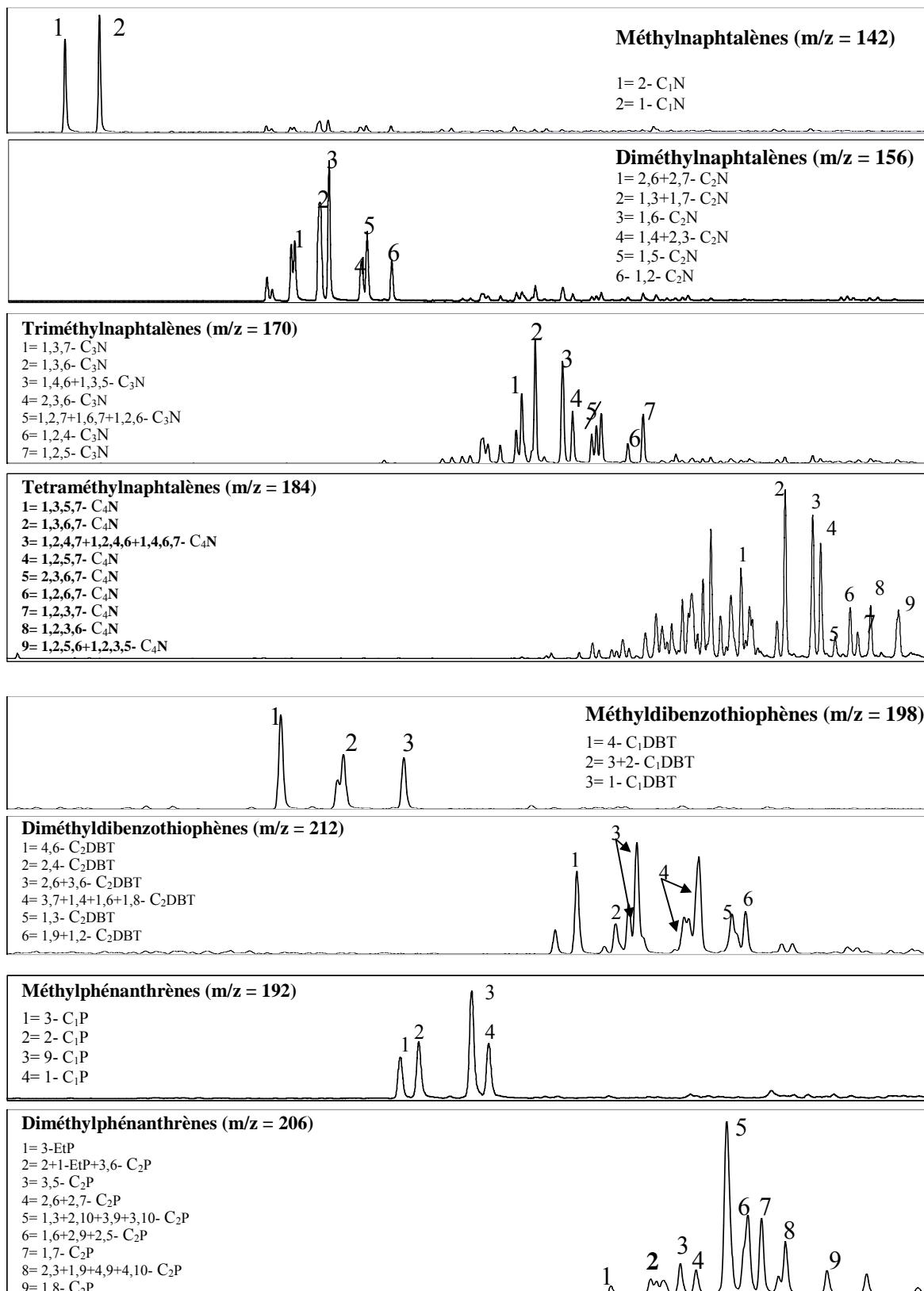
Ionisation par impact électronique : 70 eV
Température de la source : 150°C
Tension : 2000 V
Nombre de cycles par seconde : 1,3
Dwell time : 50 ms

ANNEXE 14

**Chromatogrammes obtenus par CPG-SM en mode SIM pour la fraction aromatique
(A) d'un sédiment marin (SRM 1941a) et (B) d'un pétrole brut (SRM 1582) et
identification des composés aromatiques parents**

ANNEXE 15

Identification des composés aromatiques alkylés



ANNEXE 16

Validation du dosage des HAP dans les matrices certifiées du NIST

	Valeur certifiée ou indiquée (ng/g)	Ecart-type certifié ou indiquée (ng/g)	Valeur obtenue (ng/g)	Ecart-type obtenu (ng/g)	Rendement (%)
DBT	33	2	35	5	106
Phe	101	5	118	3	117
F	2,5	0,3	2,7	0,3	108
P	7,27	0,40	6,45	0,84	89
BaA	3,0	0,3	2,6	0,3	87
BeP	3,5	0,5	2,9	0,3	81
BaP	1,1	0,3	1,3	0,2	118
Per	31	3	31	1	99
IP	0,17	0,04	0,21	0,03	124
BPer	1,7	0,1	1,9	0,3	111

Tableau 1 : Concentrations certifiées et obtenues en HAP dans le pétrole brut (SRM 1582)

	Valeur certifiée ou indiquée (ng/g)	Ecart-type certifié ou indiquée (ng/g)	Valeur obtenue (ng/g)	Ecart-type obtenu (ng/g)	Rendement (%)
N	1,65	0,31	1,99	0,26	121
2-C ₁ N	0,52	0,03	0,66	0,03	126
1-C ₁ N	0,95	0,05	0,81	0,00	85
Bi	0,32	0,07	0,31	0,11	96
Ae	0,57	0,03	0,53	0,00	92
Fe	0,85	0,03	0,63	0,00	74
Phe	5,27	0,22	4,16	0,32	79
A	1,77	0,33	1,31	0,04	74
3-C ₁ Phe	2,10	0,10	1,58	0,11	75
2-C ₁ Phe	1,90	0,06	1,50	0,10	79
2-C ₁ A	0,58	0,04	0,52	0,03	90
9+4-C ₁ Phe	1,60	0,20	1,24	0,04	77
1-C ₁ Phe	1,70	0,10	1,40	0,07	82
F	8,92	0,32	7,26	0,51	81
P	9,70	0,42	7,68	0,48	79
BaA	4,72	0,11	3,73	0,23	79
C+T	5,90	0,37	5,33	0,35	90
BbF	8,26	1,06	7,02	0,32	85
BeP	3,28	0,11	2,93	0,15	89
BaP	4,30	0,13	3,29	0,23	77
Per	1,17	0,24	0,91	0,06	77
IP	2,78	0,10	2,73	0,25	98
DBahA	0,76	0,08	0,65	0,09	85
BPer	2,84	0,10	2,53	0,22	89

Tableau 2 : Concentrations certifiées et obtenues en HAP dans le sédiment marin (SRM 1944)

	Valeur certifiée ou indiquée (ng/g)	Ecart-type certifié ou indiquée (ng/g)	Valeur obtenue (ng/g)	Ecart-type obtenu (ng/g)	Rendement (%)
N	19	5	22	7	115
2-C ₁ N	16	5	14	2	85
1-C ₁ N	18	5	13	1	72
Bi	6,8	0,6	6,1	0,0	90
Ae	4,2	0,4	4,9	0,8	116
Fe	10,24	0,43	10,23	0,79	100
Phe	35,1	3,8	27,9	1,1	79
A	8	4	6,2	0,4	78
3-C ₁ Phe	44,2	0,4	35,6	2,2	81
2-C ₁ Phe	43	1	33	1	77
9+4-C ₁ Phe	36	2	34	1	93
1-C ₁ Phe	44	2	31	3	71
F	38,7	1,0	33,9	1,5	88
P	78,9	3,5	64,2	3,1	81
BaA	20,34	0,78	15,14	0,10	74
C	49	2	56	1	115
BbF	11,01	0,28	13,87	0,51	126
BeP	13,1	1,1	13,6	0,5	104
BaP	8,35	0,72	6,48	0,14	78
Per	3,50	0,76	2,80	0,06	80
IP	4,84	0,81	4,00	0,24	83
DBahA	1,41	0,19	1,43	0,16	102
BPer	9,53	0,43	7,43	0,39	78

Tableau 3 : Concentrations certifiées et obtenues en HAP dans l'échantillon de moule (SRM 2977)

ANNEXE 17

Conditions d'analyse des métabolites de HAP par CPG/SM

-Chromatographe en phase gazeuse : HP GC 6890A Agilent Technologies (BIOS Analytique, l'Union, France)

Injecteur : PTV automatique en mode splitless pulsé (25 psi, 1,5 min), 250°C
Gaz vecteur : Hélium 6.0 (Linde, Toulouse, France)
Débit : 1 ml/min
Température de l'interface : 280°C
Colonne : HP5-MS Agilent Technologies (BIOS Analytique, l'Union, France) : 30 m x 0,25 mm Ø x 0,25 µm d'épaisseur de phase constituée à 5% de diphenyl- et 95% de diméthyl-polysiloxane.
Programme de température : de 70 (2 min) à 180°C (1 min) à 5°C/min puis de 180 à 290°C (1 min) à 10°C/min
Purge : 1,5 min, 60 ml/min

-Spectromètre de masse : HP MSD 5973 Network Agilent Technologies (BIOS Analytique, l'Union, France)

Ionisation par impact électronique : 70 eV
Température de la source : 150°C
Tension : 2000 V
Nombre de cycles par seconde : 1,53
Dwell time : 50

ANNEXE 18

Principes de la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP/SM)

Les composés sont généralement entraînés le long de la colonne par un mélange d'eau et de solvant organique afin de permettre leur séparation en phase liquide. Comme ils ne peuvent pas être analysés sous forme liquide dans l'analyseur de masse, la source d'ionisation, ici à pression atmosphérique, joue à la fois un rôle de désolvatation et d'ionisation des composés provenant de la séparation par chromatographie liquide. Un nébuliseur (figure 1) auquel peut être appliquée une pression et contenant une arrivée d'azote permet l'introduction de l'éluat dans la source sous forme de micro-gouttelettes (spray). Un contre-flux orthogonal d'azote chauffé provoque la diminution de la taille des gouttelettes. Plus les gouttelettes diminuent, plus la différence de charge augmente entre la surface et le centre de chaque goutte (force de Coulomb), provoquant un éclatement de celle-ci, c'est l'effet Rayleigh (figure 2). Ce phénomène se répète jusqu'à ce que les composés présents initialement dans l'éluant sous forme solvatée se retrouve désolvaté sous forme ionique en phase gazeuse.

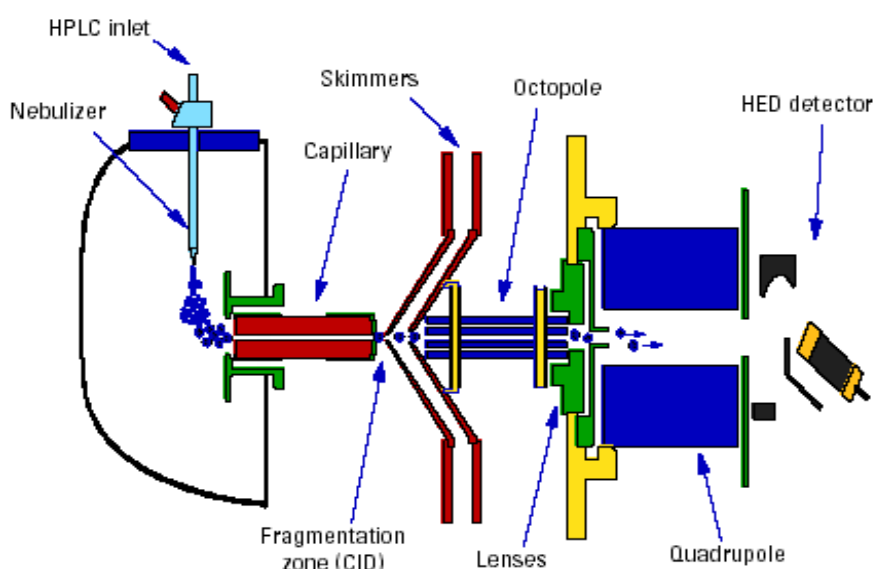


Figure 1 : Schéma du spectromètre de masse utilisé en couplage CLHP/SM

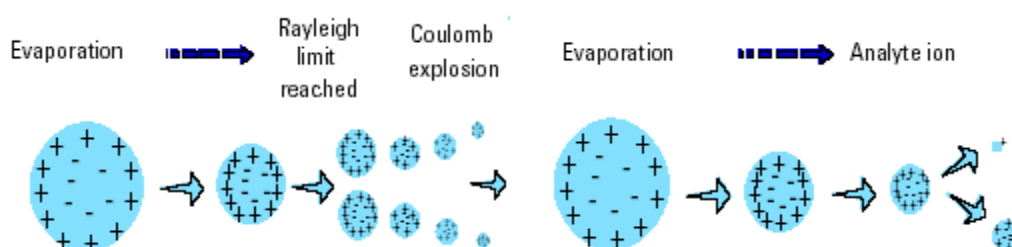


Figure 2 : Effet Rayleigh

Ces ions sont transférés de la source (pression atmosphérique) vers l'analyseur (vide poussé) par l'intermédiaire d'un capillaire sous tension dans lequel ils sont plus ou moins accélérés pour provoquer leur fragmentation. Une valeur de fragmenteur correspondant à la différence de tension entre l'entrée et la sortie du capillaire peut être réglée afin de contrôler

la fragmentation. Les ions obtenus sont séparés d'après leurs rapports masse sur charge (m/z) dans l'analyseur quadripolaire et détectés en proportion de leur nombre par un multiplicateur d'électrons.

La détection peut se faire en mode positif ou négatif selon les propriétés d'ionisation des molécules. Tout comme en CPG/SM, la détection peut se faire en mode SIM ou scan. Deux types d'ionisation sont principalement utilisables avec le couplage CLHP/SM : l'ionisation électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Dans ces deux sources, l'ionisation a lieu à pression atmosphérique. Celle-ci est plus douce que par le couplage CPG/SM où elle est réalisée sous vide par impact électronique.

En ESI (figure 3), la désolvatation et l'ionisation sont favorisées par la présence d'une électrode semi-cylindrique portée à un potentiel élevé. La différence de potentiel entre l'aiguille du nébuliseur et l'électrode crée un puissant champ électrique favorisant la polarisation de la surface des gouttelettes et donc la formation du spray. Cette méthode s'applique aux molécules de moyennement polaires à fortement polaires et sur une large gamme de poids moléculaire (figure II.15).

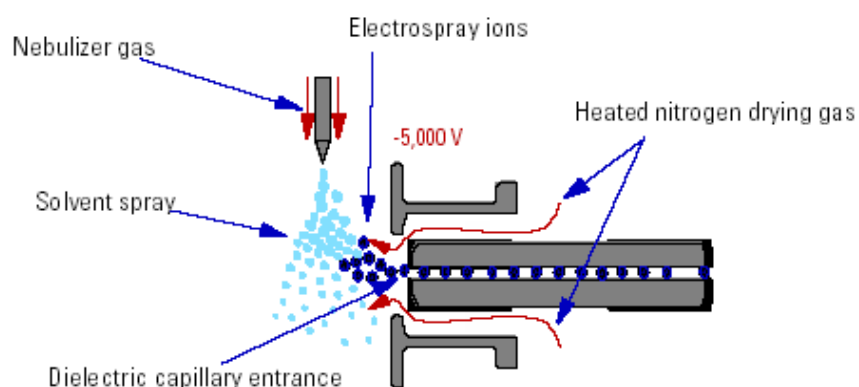


Figure 3 : Source d'ionisation électrospray (ESI)

En APCI, l'aiguille du nébuliseur est placée dans un cylindre chauffé (vaporiseur) permettant l'évaporation rapide des gouttelettes formées. La phase éluante CLHP et les composés sont sous forme gazeuse dans la source. Les molécules de solvants et d'azote sont alors ionisés par application d'une décharge électronique. Les analytes sont ensuite ionisés chimiquement par transfert de charge (figure 4).

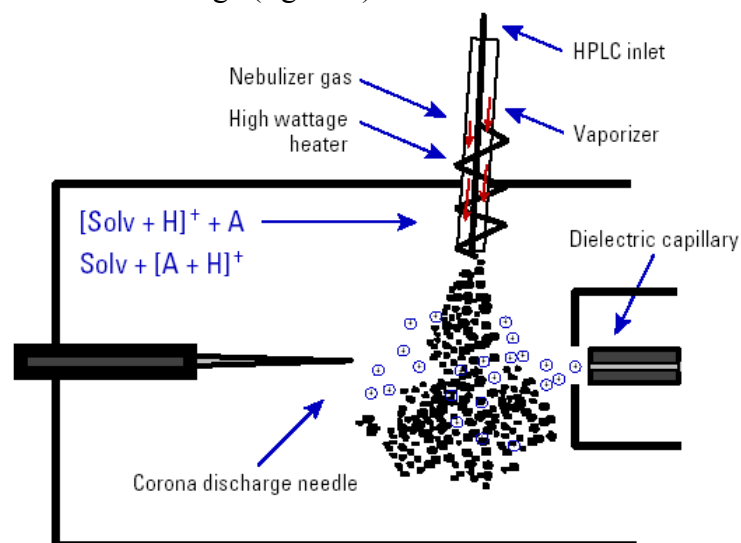


Figure 4 : Source d'ionisation APCI

Cette méthode peut s'appliquer à une gamme de polarité décalée vers les plus faibles polarités et à des molécules de plus faible poids moléculaire (figure 5)

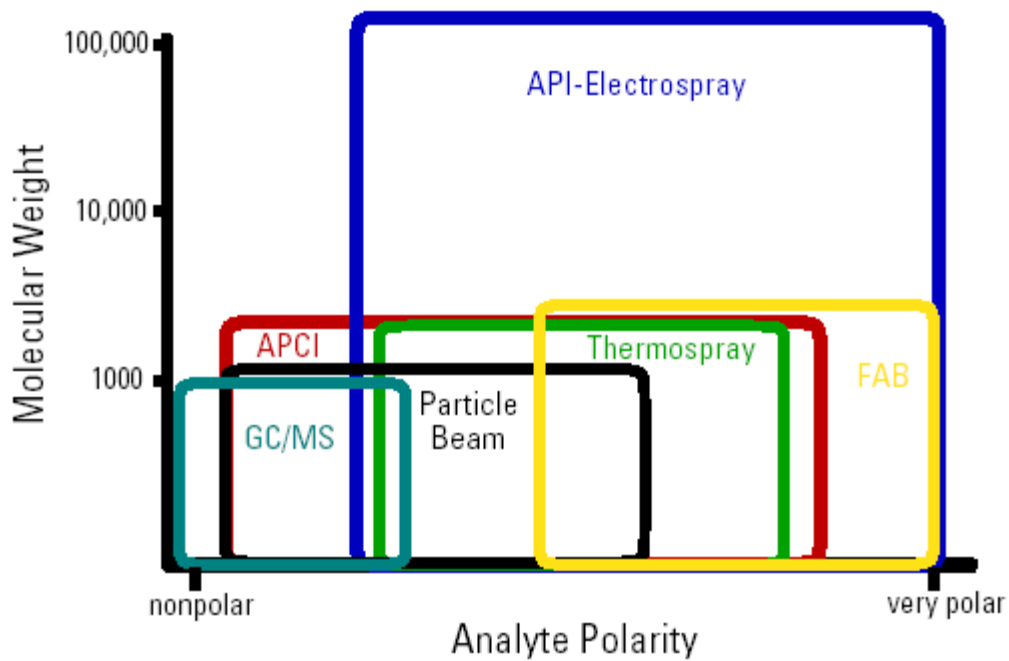


Figure 5 : Domaines d'application de différentes techniques de spectrométrie de masse

ANNEXE 19

Conditions d'analyse des métabolites de HAP par CLHP/SM

Les analyses sont réalisées par une CLHP 1100 et un spectromètre de masse G1946 VL de chez Agilent Technologies (Bios Analytique, l'Union, France). Le système est alimenté en azote par un générateur d'azote UHPLCMS18E et un compresseur d'air Junair 2000-25M (Domnick Hunter, Gateshead, England).

Temps (min)	ESI		Temps (min)	APCI	
	%méthanol dans l'eau	débit (mL/min)		%méthanol dans l'eau	débit (mL/min)
0	60	0,15	0	60	1
9	60	0,15	11	60	1
12	75	0,15	14	75	1
15	75	0,15	17.5	75	1
17	85	0,15	18	90	1

Gradients CLHP utilisés en ESI et en APCI

Paramètres	ESI	APCI
Débit N ₂	10 L/min	6 L/min
Pression de nébulisation	15 psig	6 psig
température N ₂	350 °C	300 °C
température du vaporisateur	-	500 °C
voltage du capillaire	4500 V jusqu'à 22 min, puis 5500 V	2500 V
Décharge électronique	-	6 µA
Fragmentation	de 0 à 6 min : 90 V, de 6 à 8 min : 15 V, 90 V jusqu'à 12,5 min, puis 120 V	de 0 à 6 min : 90 V, de 6 à 8 min : 15 V, 90 V jusqu'à 12,5 min, puis 120 V
Paramètres d'acquisition du SM	1,28 cycle/sec	1,28 cycle/sec

Paramètres d'ionisation et de détection

ANNEXE 20

Dosage microplaque de l'activité enzymatique EROD dans le foie d'après le protocole de Galgani et Payne (1991)

Ce dosage consiste à mettre en présence de la 7-éthoxyrésorufine avec la fraction enzymatique (S9) de l'échantillon dont on veut connaître l'activité enzymatique éthoxyrésorufine-*O*-dééthylase (EROD). En présence de NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucleotide phosphate), l'EROD transforme la 7-éthoxyrésorufine en résorufine que l'on mesure alors par fluorescence.

Les échantillons de foie stockés à -80°C sont décongelés et maintenus à 4°C pendant toute la manipulation. Les fractions S9 de foie sont préparées en broyant dans un mortier en verre placé dans de la glace pilée 1 g de foie dans 3 ml de tampon phosphate froid à pH 7,4 à l'aide d'un pilon en téflon couplé à un moteur. Le broyat est ensuite centrifugé à 9000g (30 mn ; 4°C). La fraction S9 (surnageant) est récupéré et séparée en différents aliquotes d'environ 200 μl par exemple (faire au moins 2 aliquotes : 1 pour le dosage EROD et 1 pour le dosage des protéines). Ces aliquotes peuvent être conservés à -80°C .

On prépare d'autre part une solution de 7-éthoxyrésorufine (substrat) à environ 20 $\mu\text{mol/l}$. Pour ce faire, on dissout 0,5 mg de 7-éthoxyrésorufine dans 250 μl de DMSO puis on dilue 10 μl de cette solution dans 1 ml de DMSO. On mesure ensuite la D.O. de cette solution à 482 nm que l'on dilue ensuite de manière à obtenir une D.O. d'environ 0,450 à 482 nm. On obtient alors une solution SF2 de concentration égale à D.O./22,5 (coeff. d'extinction moléculaire) $\mu\text{mol/l}$ (environ 20 $\mu\text{mol/l}$). 190 μl de cette solution sera diluée dans 210 μl de DMSO pour obtenir une solution à environ 9,4 $\mu\text{mol/l}$.

Une solution de NADPH à 5,57 mM est parallèlement préparée en ajoutant 0,4 ml de tampon phosphate pH=7,5-7,8 à 1,9 mg de NADPH (pour 4 répliquas de 6 échantillons).

On prépare par ailleurs une gamme étalon pour l'étalonnage externe de la résorufine. Pour cela, on prépare une solution diluée de résorufine (SF2) à 2 $\mu\text{mol/l}$. Dans un premier temps, on dissout 1 mg de résorufine dans 9,26 ml de diméthylsulfoxyde (DMSO) sous agitation pendant 2h (à l'abri de la lumière) pour disposer d'une solution mère. On dilue ensuite 40 μl de cette solution dans 960 μl de DMSO. Cette solution doit avoir une densité optique (D.O.) d'environ 0,850 à 572 nm. On dilue ensuite 260 μl de cette solution SF1 dans 1,240 ml de DMSO pour avoir une D.O. d'environ 0,146 à 572 nm. On obtient alors une solution SF2 à environ 2 $\mu\text{mol/l}$ (2 $\mu\text{mol/l}$ = D.O./73,2 (coeff. d'extinction moléculaire)).

La gamme étalon est ensuite préparée comme indiqué dans le tableau 1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
SF2 (μl)	10	20	30	40	50	75	100	125	150	175	200	250
DMSO (μl)	490	480	470	460	450	425	400	375	350	325	300	250
Conc. ($\mu\text{mol/l}$)	0,04	0,08	0,12	0,16	0,20	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70	0,80	1,00

Tableau 1 : Gamme étalon

Avant de remplir les puits de la microplaque, on dilue les échantillons de S9 (tubes placés dans de la glace pilée) par 5 dans du tampon phosphate à 4°C pour obtenir des échantillons à 1-2,5 mg prot/ml (S9'). On amène ensuite le tampon phosphate à 25°C et on prépare un mélange (M) contenant 300 µl de 7-éthoxyrésorufine diluée et 6 ml de tampon (pour 6 échantillons).

On prépare ensuite les microplaques en introduisant dans les puits :

- Pour la gamme étalon de résorufine :

 Pour les blancs : - 220 µl de tampon phosphate pH=7,5-7,8

 - 10 µl de DMSO

 Pour la gamme : - 220 µl de tampon

 - 10 µl de chaque point de gamme

- Pour les échantillons :

 210 µl de mélange M

 10 µl de S9'

 Laisser en contact 5 min à température ambiante

 Ajouter 10 µl de la solution de NADPH. Mélanger avec la pipette 3 fois et lire immédiatement

La lecture se fait ensuite en fluorimétrie toutes les 30 secondes pendant 10 min avec des filtres d'excitation à 530 nm et d'émission à 590 nm.

ANNEXE 21

Dosage des protéines dans la bile (et dans le foie) selon le protocole de Lowry et al. (1951) adapté au lecteur microplaques

1 - Dilution de la bile par 100 dans de l'eau distillée (dilution par 150 pour les S9 hépatiques)

2 - Préparation de la gamme étalon de Bovin Serum Albumin (BSA)

- Préparer une solution mère de BSA à 5mg/ml (5 mg dans 10 ml d'eau distillée)
- Préparer une solution fille (SF) diluée par 10 (2 ml dans 18 ml d'eau distillée)
- Préparer des solutions filles de 5 ml selon le tableau suivant :

Volume de SF (ml)	Volume d'eau distillée (ml)	Concentration de protéines (mg/ml) ^a
1	4	0,1
2	3	0,2
3	2	0,3
4	1	0,4
5	0	0,5

^agamme de 0,05 à 0,25 mg/ml pour les protéines hépatiques

3 - Préparation des réactifs

NaOH + NaHCO₃

- Dissoudre 4,5 g de NaOH dans un petit volume d'eau distillée
- Ajouter 8,5 g de NaHCO₃ (à dissoudre complètement) puis laisser refroidir
- Ajuster le volume de la solution à 100 ml avec de l'eau distillée

CuSO₄

- Dissoudre 100 mg de CUSO₄ dans un petit volume d'eau distillée
- Ajouter 200 mg de tartrate double Na, K (à dissoudre complètement)
- Ajuster le volume de la solution à 100 ml avec de l'eau distillée

Réactif de Folin : Diluer 20 ml de réactif dans 80 ml d'eau distillée

4 – Préparation de la microplaque

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	a	b	c	d	e	f
B	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	a	b	c	d	e	f
C	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	a	b	c	d	e	f
D	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	a	b	c	d	e	f
E	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	r
F	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	r
G	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	r
H	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	r

Schéma de la microplaque (la gamme est délimitée par les pointillées et les lettres minuscules représentent l'emplacement des échantillons. Ici, 4 réplicats sont réalisés)

- Dans chaque puits, introduire 90 μ l de solution (de BSA ou d'échantillon)
- Ajouter 30 μ l de solution de NaOH puis 90 μ l de CuSO₄ et 60 μ l de solution diluée de Folin
- Mélanger avec la pipette puis placer la microplaque à l'abri de la lumière pendant 30 min.
- Lecture Ultra-violet à 680 nm

ANNEXE 22

Exposition de soles a des HAP individuels (§ III.2.1)

	Phe	F	P	BaP
Ctrl T0	3,33 ± 0,11	1,01 ± 0,06	0,55 ± 0,03	<1
Ctrl J7	4,15 ± 0,13	0,96 ± 0,13	0,72 ± 0,05	<1
H2	501,58 ± 34,93	350,20 ± 2,04	366,94 ± 13,53	65,81 ± 0,51
J3	14,35 ± 0,04	5,83 ± 0,40	9,60 ± 0,94	2,27 ± 0,13
J7	21,18 ± 0,42	5,61 ± 0,22	5,15 ± 0,61	<1

Tableau 1 : Concentrations en HAP dissous dans l'eau des différents bassins

	T0	J1	J3	J7	Td
Contrôle	n=2	n=3	n=3	n=2	n=1
4-OHPhe	<0,5	8 ± 1	10 ± 3	10 ± 1	6
9-OHPhe	4 ± 0	11 ± 3	10 ± 1	14 ± 1	10
3-OHPhe	20 ± 1	50 ± 11	53 ± 6	88 ± 11	128
1-OHPhe	23 ± 3	41 ± 8	37 ± 4	55 ± 0	67
2-OHPhe	21 ± 0	41 ± 4	64 ± 4	125 ± 15	98
A-OHF	31 ± 1	37 ± 8	33 ± 2	34 ± 0	66
B-OHF	41 ± 3	50 ± 2	59 ± 6	69 ± 2	95
1-OHP	321 ± 11	332 ± 15	304 ± 12	413 ± 15	409
Phénanthrène		n=3	n=3	n=1	n=1
4-OHPhe		48 ± 11	135 ± 14	247	178
9-OHPhe		14 ± 3	14 ± 4	44	266
3-OHPhe		396 ± 17	963 ± 86	1635	2788
1-OHPhe		269 ± 24	274 ± 24	483	795
2-OHPhe		253 ± 14	1076 ± 93	1736	3283
<i>somme</i>		980 ± 61	2462 ± 214	4145	7310
Fluoranthène		n=1	n=1	n=2	n=3
A-OHF		668	1075	803 ± 32	593 ± 91
B-OHF		1225	1708	972 ± 25	889 ± 133
<i>somme</i>		1893	2783	1775 ± 7	1482 ± 224
Pyrène		n=3	n=3	n=3	n=1
1-OHP		9613 ± 54	13313 ± 646	13765 ± 41	8643

Tableau 2 : Concentrations en métabolites dans la bile des soles aux différents temps d'échantillonnage

ANNEXE 23

Exposition de soles à un fioul lourd n°2 (§ III.2.2.1)

	Fioul Erika		Fioul A		Fioul B	
	Conc.	e-t	Conc.	e-t	Conc.	e-t
N	1012	137	371	21	852	92
C ₁ -N	4076	467	4806	259	8223	411
C ₂ -N	5226	836	9200	530	14041	351
C ₃ -N	2510	377	7911	549	11656	234
C ₄ -N	733	115	4269	282	6567	1037
Bi	32	4	122	10	116	5
Ay	1	0	4	1	<1	
Ae	100	14	175	13	244	15
Fe	91	12	192	14	255	10
DBT	206	16	144	3	279	20
C ₁ -DBT	490	23	424	18	1021	77
C ₂ -DBT	903	66	584	10	1849	107
Phe	680	30	418	21	791	28
C ₁ -Phe	1868	116	1064	26	2355	104
C ₂ -Phe	2564	120	1235	19	3616	180
F	48	2	18	0	50	2
P	223	6	49	0	230	6
BaA	168	4	20	1	135	4
T + C	364	14	39	1	312	7
C ₁ -C	1301	43	154	7	1264	28
BF	81	3	8	1	66	5
BeP	110	2	11	1	81	5
BaP	105	1	10	0	94	7
Per	39	1	5	0	46	3
IP	14	1	2	0	12	1
DBA	25	1	3	0	19	1
BPer	41	1	4	0	30	2

Tableau 1 : Concentrations en HAP (écarts types sur 3 analyses) exprimées en µg/g dans le fioul Erika et dans les deux fiouls utilisés pour les expérimentations

ANNEXE 23 (suite)

Exposition de soles à un fioul lourd n°2 (§ III.2.2.1)

Expérimentations	I			II			III		
	Ctrl	2000	100	Ctrl	1000	200	Ctrl	2000	200
N	6,61	7,53	10,21	6,18	7,31	22,81	32,71	65,22	752,35
C ₁ -N	3,67	7,28	16,18	18,43	22,03	105,83	67,94	284,93	8006,12
C ₂ -N	4,42	9,26	28,46	8,23	47,61	204,41	27,40	1403,87	9747,67
C ₃ -N	9,15	17,64	127,86	4,96	183,12	233,37	5,58	4295,74	7172,06
C ₄ -N	5,09	65,37	242,58	2,27	280,65	430,86	0,00	2391,56	1961,91
Bi	0,73	1,39	1,91	1,24	2,71	3,34	<0,1	8,51	92,83
Ay	0,27	<0,1	0,15	0,21	2,08	4,33	<0,1	24,31	68,81
Ae	0,32	<0,1	4,03	0,95	16,7	17,71	0,77	414,20	1489,52
Fe	0,25	1,37	4,22	1,18	15,27	27,22	0,11	110,64	592,65
DBT	1,25	4,2	9,9	0,55	5,34	44,57	<0,2	67,05	136,31
C ₁ DBT	1,45	4,32	28,08	0,61	12,59	30,57	<0,3	390,69	200,63
C ₂ DBT	5,1	25,59	86,17	1,97	42,22	116,15	<0,1	794,60	307,15
Phe	3,21	5,99	7,81	2,27	9,78	9,45	<0,1	75,67	139,96
C ₁ -Phe	2,52	6,04	178,25	1,74	85,91	9,01	<1	915,94	666,65
C ₂ -Phe	2,35	155,9	547,24	1,61	513,99	283,7	1,69	1436,92	652,33
F	0,56	1,45	7,94	0,64	10,73	7,48	0,29	25,33	14,41
P	0,57	7,85	28,01	0,59	15,59	11,03	0,17	116,14	66,74
BaA	0,11	1,72	7,24	0,09	3,6	2,97	0,30	31,85	4,90
C+T	0,39	4,72	18,82	0,23	7,78	6,29	0,54	121,33	22,08
C ₁ C	0,46	11,67	44,08	0,24	11,89	7,5	1,29	336,59	32,11
1,2-BNT	0,09	0,59	2,32	<0,05	1,13	1,53	<0,05	59,73	9,79
2,3-BNT	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	11,20	0,31
BbF+BkF+BjF	0,35	0,68	2,45	0,18	0,71	0,49	0,45	16,76	3,66
BeP	0,29	0,98	4,09	<0,2	2,07	0,73	<0,2	19,83	1,72
BaP	<0,3	0,74	3,18	<0,3	1,48	0,55	<0,3	21,01	1,26
Per	<0,5	<0,5	0,98	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	8,14	0,90
IP	<0,1	0,14	0,58	<0,1	0,23	0,15	<0,1	<0,1	<0,1
DBA	<0,1	0,14	0,74	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
BPer	0,15	0,39	1,24	0,15	0,46	0,36	<0,1	6,66	0,64

Tableau 2 : Concentrations en HAP exprimées en ng/l dans la phase dissoute pour les trois expérimentations

ANNEXE 23 (suite)

Exposition de soles à un fioul lourd n°2 (§ III.2.2.1)

	I			II		
	ctrl	2000	100	ctrl	1000	200
Ay	0,29	0,33	0,67	0,71	1,33	0,89
Bi	4,46	4,72	12,57	4,02	23,33	9,39
Ae	4,65	4,14	14,37	9,32	38,26	9,12
Fe	6,26	10,53	51,22	3,34	23,65	17,81
DBT	3,14	5,21	191,08	9,86	73,12	61,10
C ₁ DBT	1,21	2,28	80,29	5,30	28,98	12,65
C ₂ DBT	0,00	5,42	16,42	0,00	72,83	32,99
Phe	14,42	25,11	228,68	6,32	70,49	57,36
C ₁ P	5,37	13,53	37,15	3,01	25,92	13,32
C ₂ P	9,20	32,07	43,09	10,81	42,65	28,46
F	2,65	7,88	9,17	3,96	12,45	4,84
P	4,41	20,79	17,29	4,99	22,82	7,95
BaA	<0,01	<0,01	0,28	<0,01	1,07	<0,01
C	0,17	0,81	0,72	<0,01	0,72	0,40
C ₁ C	<0,01	<0,01	1,45	<0,01	<0,01	1,49
1,2-BNT	<0,01	0,15	0,10	<0,01	<0,01	0,12
2,3-BNT	<0,01	<0,05	0,19	<0,01	<0,01	<0,01
BbF+BkF+BjF	<0,01	0,43	0,17	<0,01	<0,01	<0,01
BeP	0,69	0,52	0,60	<0,01	0,32	0,18
BaP	0,00	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,21
Per	<0,05	<0,01	<0,01	<0,01	0,46	<0,01
IP	<0,01	0,68	0,03	<0,01	0,42	<0,01
DBA	<0,01	0,39	0,13	<0,01	0,21	0,11
BPer	0,11	0,48	0,00	<0,01	0,34	0,00

Tableau 3 : Concentrations en HAP exprimées en ng/g de poids sec dans les foies de sole pour les expérimentations I et II

ANNEXE 23 (suite)

Exposition de soles à un fioul lourd n°2 (§ III.2.2.1)

	I			II			III					
	Ctrl	2000	100	Ctrl	1000	200	Ctrl g1	Ctrl g2	2000 g1	2000 g2	200 g1	200 g2
Ay	0,10	0,21	2,86	0,35	0,58	0,95	0,35	0,20	4,42	3,20	7,26	8,49
Bi	2,69	3,28	24,08	3,10	5,19	7,07	3,86	1,99	27,26	28,24	34,55	79,58
Ae	3,32	4,15	224,88	4,33	14,14	44,05	4,49	2,56	72,68	54,22	101,52	139,98
Fe	4,06	5,64	266,91	6,15	26,04	65,31	3,00	1,41	28,68	32,90	40,26	68,18
DBT	4,19	6,21	210,97	8,91	76,26	147,35	0,80	0,36	15,66	22,49	18,55	24,47
C ₁ DBT	2,00	3,79	71,03	2,57	32,27	28,90	1,42	0,50	8,11	10,04	8,64	9,93
C ₂ DBT	2,50	5,14	22,13	2,83	11,10	6,29	3,55	0,82	6,95	5,92	9,24	6,60
Phe	6,27	6,29	188,26	6,74	66,09	88,69	4,64	1,75	11,45	17,09	15,95	20,83
C ₁ P	2,85	4,84	52,48	3,46	23,00	16,87	10,02	3,15	19,69	11,35	14,79	14,28
C ₂ P	2,21	4,47	15,49	1,57	7,19	4,45	11,82	3,31	12,63	7,89	20,25	8,95
F	0,48	0,47	2,35	0,72	1,25	1,07	2,27	0,66	2,37	1,18	3,24	1,36
P	0,61	0,77	5,22	0,81	1,53	1,35	8,29	2,11	8,45	3,89	11,45	4,45
BaA	0,01	0,01	0,18	0,04	0,04	0,05	0,05	0,02	0,09	0,09	0,11	0,12
C	0,04	0,05	1,62	0,10	0,25	0,28	0,27	0,17	0,87	0,70	1,12	0,96
C ₁ C	<0,01	0,26	0,92	0,14	0,24	0,24	0,44	0,27	0,73	0,68	1,15	0,92
1,2-BNT	0,32	0,31	0,70	0,01	0,11	0,09	0,18	0,09	0,32	0,23	0,41	0,29
2,3-BNT	<0,01	0,01	0,09	<0,01	0,03	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,06
BF	<0,01	0,07	0,10	<0,01	0,04	0,04	0,03	0,02	0,04	0,02	0,07	0,04
BeP	0,06	0,04	0,13	0,05	0,08	0,06	0,01	0,02	0,08	0,07	0,10	0,09
BaP	<0,01	0,01	0,03	<0,01	0,01	0,01	0,03	0,03	0,04	0,03	0,05	0,05
Per	<0,01	<0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,02	0,05	0,03
IP	<0,01	0,04	0,03	0,07	0,04	0,07	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
DBA	<0,01	0,12	0,06	<0,01	0,26	0,13	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
BPer	<0,01	0,01	0,02	<0,01	0,03	0,02	0,03	0,04	0,03	0,03	0,08	0,03

Tableau 4 : Concentrations en HAP exprimées en ng/g de poids sec dans les muscles de sole des trois expérimentations

ANNEXE 23 (suite)

Exposition de soles à un fioul lourd n°2 (§ III.2.2.1)

	Ctrl f	Ctrl m (n=2)	2000 f (n=2)	2000 m	100 f (n=3)	100 m (n=2)	100+1	100+2	100+4	100+5
1-OHN	10	10±1	179±4	183	216±19	193±12	205	34	50	91
2-OHN	29	16±1	312±19	262	270±26	238±15	378	65	65	81
2-OHBi	12	12±2	85±3	119	246±28	212±17	22	9	19	41
9-OHFe	23	20±1	585±25	591	1322±146	1071±98	340	74	55	34
4-OHPhe	7	9±1	354±22	250	449±38	392±25	442	328	244	296
9-OHPhe	5	4±1	16±1	20	33±4	28±3	33	12	3	3
3-OHPhe	27	29±2	990±53	987	1553±242	1191±156	2215	775	598	398
1-OHPhe	26	34±3	1075±49	977	1116±140	906±90	1848	860	782	561
2-OHPhe	76	72±10	733±15	755	999±138	791±89	876	545	291	137
1-OHP	578	538±26	2521±272	2329	3030±415	2459±238	2493	2603	3297	1656

Tableau 5 : Concentrations en métabolites de HAP (ng/g) dans la bile de soles pour l'expérimentation I après 5 jours d'exposition et après décontamination des individus exposés à la dose la plus forte pendant 1, 2, 4 et 5 jours

	Ctrl (n=3)	1000 (n=3)	200 (n=3)	Ctrl 3 mois (n=2)	200 3 mois (n=3)	ctrl 6 mois (n=3)	200 6 mois (n=3)
1-OHN	<0,6	544±43	732±55	7±5	9±0	29±3	31±6
2-OHN	3±1	727±96	732±140	38±9	41±8	56±7	62±9
2-OHBi	<1	297±18	266±17	<1	<1	9±2	11±4
9-OHFe	<2	615±61	589±42	<2	<2	31±5	19±3
4-OHPhe	6±2	456±42	354±40	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
9-OHPhe	1±0	64±39	87±8	<0,3	3±0	<0,3	<0,3
3-OHPhe	5±2	1242±18	1342±183	20±3	34±8	52±7	60±12
1-OHPhe	18±2	1172±14	1255±26	10±1	11±1	51±5	55±4
2-OHPhe	8±0	522±66	716±15	12±0	19±4	83±13	92±18
1-OHP	180±9	2725±13	3076±75	134±4	184±11	766±16	824±11

Tableau 6 : Concentrations en métabolites de HAP (ng/g) dans la bile de soles pour l'expérimentation II après 5 jours d'exposition et après décontamination des individus exposés à la dose la plus forte pendant 3 et 6 mois dans les marais de L'Houmeau

	Ctrl g1	Ctrl g2 (n=2)	2000 g1 (n=2)	2000 g2 (n=3)	200 g1	200 g2 (n=3)
1-OHN	<0,6	<0,6	23±1	31±6	112	44±3
2-OHN	<0,6	<0,6	128±0	147±24	610	241±17
2-OHBi	<1	<1	1±0	11±2	9	19±1
9-OHFe	<2	<2	60±4	89±20	136	52±3
3-OHPhe	1	4±1	87±10	118±3	139	74±3
1-OHPhe	<0,3	1±0	42±1	38±3	44	21±1
2-OHPhe	2	2±0	90±3	90±1	139	61±1
1-OHP	7	7±0	366±11	374±23	241	177±2

Tableau 7 : Concentrations en métabolites de HAP (ng/g) dans la bile de soles pour l'expérimentation III après 5 jours d'exposition

ANNEXE 24

**Exposition de turbots et de morues à un pétrole brut et à un mélange d'alkylphénols
(§ III.2.2.2)**

	Conc.	e-t
N	1204.50	24.50
C ₁ -N	4664.97	85.98
C ₂ -N	6810.63	151.98
C ₃ -N	5091.76	160.85
C ₄ -N	2512.93	131.55
Bi	442.00	29.00
Fe	117.92	0.42
DBT	77.73	1.54
C ₁ -DBT	247.88	2.87
C ₂ -DBT	312.85	5.64
Phe	231.80	9.21
A	7.78	1.65
C ₁ -Phe	555.17	24.74
C ₂ -Phe	636.50	10.15
C ₃ -Phe	433.03	16.64
F	11.05	1.06
P	8.79	0.38
BaA	3.95	0.67
T + C	26.55	0.91
C ₁ -C	58.34	1.23
BF	6.21	0.55
BeP	5.54	0.62
BaP	1.02	0.11
Per	0.82	0.23
IP	0.83	0.21
DBA	1.08	0.05
BPer	2.47	0.21

Tableau 1 : Concentrations en HAP (µg/g) du pétrole brut utilisé pour les expositions (n=3)

ANNEXE 24 (suite)

**Exposition de turbots et de morues à un pétrole brut et à un mélange d'alkylphénols
(§ III.2.2.2)**

	Ctrl (n=3)	Oil (n=3)	Oil+AP (n=3)
1-OHN	12±4	89±18	62±14
2-OHN	19±1	57±6	69±9
2-OHBi	<1	19±3	<1
9-OHFe	244±54	2417±301	2630±401
4-OHPhe	<1	<1	<1
9-OHPhe	<1	78±4	56±2
3-OHPhe	9±2	257±11	236±21
1-OHPhe	1±0	689±39	810±44
2-OHPhe	41±3	232±41	255±30
1-OHP	49±2	276±6	288±6

Tableau 2 : Concentrations en métabolites de HAP dans la bile de turbots en ng/g

	Ctrl	Oil	Oil+AP (2)
1-OHN	<1	59	63±36
2-OHN	22	291	194±80
2-OHBi	71	58	76±3
9-OHFe	90	2869	3876±500
4-OHPhe	<1	<1	<1
9-OHPhe	<1	92	64±20
3-OHPhe	53	846	650±19
1-OHPhe	4	525	563±22
2-OHPhe	53	1467	1085±37
1-OHP	67	338	341±12

Tableau 3 : Concentrations en métabolites de HAP dans la bile de morues en ng/g

ANNEXE 25

Etude des nourriceries de sole du golfe de Gascogne suite à la marée noire Erika (§ III.3.1.1)

	Phe	C ₁ Phe	C ₂ Phe	A	C ₁ A	F	P	BaA	C+T	C ₁ C	1,2- BNT	2,3- BNT	BF	BeP	BaP	Per	IP	DBA	BPer	TOT	15 HAP	F/P
02/2000																						
A g2-3	24,10	14,46	17,62	0,23	0,21	5,71	4,56	0,41	3,28	2,98	0,45	<0,01	0,06	0,41	0,60	0,88	<0,01	<0,01	<0,01	74,20	38,94	1,25
B g2	20,73	23,58	38,65	0,48	0,24	7,47	18,05	0,28	2,26	5,75	0,26	<0,01	0,88	0,78	<0,01	0,18	0,42	0,87	0,24	119,90	51,68	4,14
B ext g2	34,69	43,20	79,47	0,52	0,10	23,60	44,05	4,59	9,34	10,27	1,59	0,96	4,70	1,84	0,99	0,49	0,96	0,25	1,04	257,78	124,73	5,36
B ext g1	39,10	42,24	72,38	0,44	0,08	12,14	30,39	<0,01	1,70	<0,01	0,26	0,28	1,33	1,35	0,36	0,44	0,54	0,34	0,22	201,25	86,55	3,99
C g2	20,19	14,46	12,95	0,18	<0,01	3,90	4,45	0,22	1,16	2,14	0,79	<0,01	0,64	0,15	0,38	<0,01	<0,01	0,17	<0,01	60,85	31,29	0,88
D g2	17,28	17,32	14,97	0,36	0,44	2,92	3,87	<0,01	4,46	7,20	0,55	1,49	1,09	0,65	*	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	69,91	29,98	0,75
E g2	10,80	6,00	5,65	0,16	<0,01	3,74	1,04	<0,01	0,56	1,26	<0,01	<0,01	0,28	<0,01	*	<0,01	<0,01	0,06	<0,01	29,55	16,63	3,60
07/2000																						
B g1	3,60	5,09	9,92	0,32	<0,01	1,73	4,49	0,41	0,55	2,42	0,84	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,15	0,29	0,35	29,31	11,89	3,85
C g1	4,17	6,62	12,68	0,72	<0,01	3,07	5,01	1,22	0,36	1,09	0,44	<0,01	0,27	0,75	1,63	1,21	0,67	0,74	0,17	38,41	18,02	0,61
D g1	3,45	4,10	8,96	0,28	0,06	1,81	4,08	0,53	0,44	1,81	0,63	0,04	0,07	<0,01	<0,01	<0,01	0,49	0,55	0,35	26,97	12,05	0,44
E g1	10,06	6,78	10,48	0,60	0,05	3,06	3,61	0,12	0,53	3,25	0,29	<0,01	0,17	0,04	<0,01	0,15	0,21	0,07	0,29	39,28	18,72	0,85
F g1	7,91	6,51	9,02	0,23	0,20	2,89	3,33	0,21	0,59	1,33	0,53	0,02	0,14	0,23	0,37	0,41	0,26	0,49	0,23	33,72	16,66	0,87
09/2000																						
B g1	3,33	4,33	10,26	0,22	0,22	3,75	5,64	0,07	0,35	1,20	0,32	<0,01	0,09	0,17	<0,01	0,61	0,20	*	0,17	29,83	13,82	6,65
C g1	12,77	3,99	6,04	0,24	0,29	2,48	3,53	0,55	1,56	1,37	0,18	<0,01	0,08	0,22	0,18	0,26	1,11	0,84	0,83	35,86	24,17	0,70
D g1	3,30	3,10	8,01	0,24	0,13	1,89	3,67	0,66	0,34	1,20	0,42	0,09	0,13	<0,01	<0,01	*	0,83	0,82	0,34	24,64	12,20	0,51
E-F g1	4,02	3,24	8,64	0,16	0,32	2,87	3,85	0,25	0,67	1,73	1,94	0,08	0,11	0,44	0,36	0,40	0,31	0,56	0,06	27,16	13,23	0,74
09/2001																						
B g2	11,68	6,47	10,79	0,60	0,26	2,14	1,90	0,36	0,50	0,66	0,77	0,05	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,47	*	0,52	36,35	18,17	11,30
B g1	6,82	6,00	7,16	0,25	0,17	1,78	2,37	0,25	0,53	2,01	0,17	<0,01	0,25	0,22	0,32	0,56	0,24	*	0,31	28,47	13,12	7,53
C g2	9,27	8,16	13,40	1,13	0,52	2,05	2,69	*	*	*	0,59	0,20	0,07	0,10	0,12	0,07	*	*	*	37,40	15,31	0,76
C g1	7,46	6,43	14,35	0,69	0,43	2,84	3,26	<0,01	1,58	4,81	1,27	<0,01	0,73	0,77	0,83	1,05	<0,01	*	<0,01	43,42	17,39	0,87
D g1-2	12,15	10,67	21,47	0,52	0,82	4,03	8,69	0,71	1,58	1,65	0,79	<0,01	0,83	0,85	0,52	1,37	1,89	<0,01	0,68	66,21	31,60	0,46
E g2	27,72	14,32	21,74	1,44	*	5,10	2,82	<0,01	<0,01	6,05	<0,01	<0,01	0,59	<0,01	<0,01	<0,01	0,47	<0,01	0,63	80,88	38,78	1,81
F g1	11,09	7,01	6,99	0,17	<0,01	1,79	3,21	0,34	0,44	1,56	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	*	*	0,27	1,16	0,37	34,41	18,85	0,56
G g1	20,43	11,36	7,07	0,25	0,14	2,80	2,43	0,18	0,30	1,12	0,67	0,17	<0,01	<0,01	*	*	0,27	*	0,52	46,87	27,18	1,15
H g1	15,11	8,19	12,02	0,20	0,30	3,44	6,67	0,70	0,90	1,39	0,40	<0,01	0,20	0,20	*	*	<0,01	*	<0,01	53,12	27,22	0,52
09/2002																						
B g2	4,08	3,13	*	0,29	0,15	1,33	1,09	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,15	10,21	6,94	12,20
B g1	5,76	2,79	5,23	0,45	*	1,04	1,40	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	*	*	*	*	*	*	*	16,67	8,65	7,42
C g2	6,57	3,81	2,87	0,51	*	1,39	1,69	0,14	0,74	1,32	<0,01	<0,01	0,31	0,52	0,31	0,27	<0,01	*	0,10	19,75	11,76	0,82
C g1	7,86	2,18	*	0,68	*	1,50	2,06	0,09	0,42	0,76	0,15	<0,01	0,65	0,27	*	0,23	<0,01	*	<0,01	16,19	13,25	0,73
D g2	4,68	2,27	2,08	0,12	0,04	1,12	0,83	<0,01	<0,01	3,53	<0,01	<0,01	0,25	0,18	0,05	<0,01	0,61	<0,01	<0,01	15,60	7,67	1,35
D g1	5,01	2,88	6,91	0,17	0,09	1,62	1,36	<0,01	<0,01	2,36	<0,01	<0,01	*	*	*	*	*	*	*	20,40	8,16	1,19
D g0	20,93	10,52	8,47	0,49	0,09	5,78	5,13	<0,01	1,56	3,13	0,22	<0,01	0,19	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	56,29	34,08	1,13
E g2	5,59	3,38	*	0,43	*	1,66	1,50	<0,01	1,20	3,34	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	17,11	10,39	1,11
F g2	7,78	8,31	7,56	0,36	<0,01	6,40	5,52	1,34	3,13	4,51	0,64	0,11	0,67	<0,01	*	<0,01	<0,01	*	0,68	46,24	25,87	1,16
F g1	9,73	9,79	13,28	0,33	0,33	5,11	3,90	<0,01	0,72	<0,01	<0,01	<0,01	0,21	0,26	0,11	0,04	0,21	0,23	0,18	44,14	20,74	1,31
H g2	14,28	18,20	<0,01	0,76	<0,01	3,89	2,75	0,47	0,89	2,12	0,56	<0,01	0,52	*	*	0,23	0,82	*	<0,01	44,72	24,40	1,41
H g1	8,46	13,94	12,53	0,50	<0,01	3,80	3,38	0,09	0,65	1,62	0,15	<0,01	0,25	*	<0,01	0,34	<0,01	*	0,16	45,38	17,28	1,12

Tableau 1 : Concentrations en HAP dans les foies de soles du golfe de Gascogne exprimées en ng/g de poids sec. Quiberon (A), Vilaine (B), Loire (C), Bourgneuf (D), Pertuis Breton (E), Pertuis d'Antioche (F), Oléron (G), Gironde (H).

ANNEXE 25 (suite)

Etude des nourriceries de sole du golfe de Gascogne suite à la marée noire Erika
(§ III.3.1.1)

	Phe	C ₁ Phe	C ₂ Phe	A	C ₁ A	F	P	BaA	C+T	C ₁ C	1,2- BNT	2,3- BNT	BF	BeP	BaP	Per	IP	DBA	BPer	TOT	15 HAP	F/P
02/2000																						
A g2-3	2,05	1,21	1,14	0,08	0,03	0,35	0,61	0,03	0,05	0,12	0,01	<0,01	0,03	0,03	*	<0,01	<0,01	0,02	<0,01	5,77	3,23	0,57
B g2	2,21	1,97	2,98	0,10	0,08	1,53	2,29	0,41	0,68	0,68	0,08	<0,01	0,38	0,19	0,14	0,05	0,06	0,05	0,08	13,96	7,93	0,67
B ext g2	2,37	2,11	4,31	0,13	0,06	4,91	4,04	1,83	2,99	2,44	0,38	0,01	1,93	0,89	0,63	0,27	0,37	0,23	0,54	30,46	19,98	1,22
B ext g1	5,31	3,34	2,82	0,06	0,08	1,16	1,57	0,13	0,22	0,16	0,05	<0,01	0,25	0,11	0,08	0,02	0,10	0,13	0,08	15,68	9,10	0,74
C g2	1,99	0,64	0,48	0,09	0,02	0,34	0,41	0,04	0,07	0,06	<0,01	<0,01	0,05	0,02	0,02	0,04	0,01	0,01	0,01	4,31	3,04	0,82
D g2	2,37	1,70	1,80	0,13	0,09	0,45	0,51	0,12	0,38	1,03	0,16	0,03	0,15	0,13	0,10	0,06	0,04	0,04	0,05	9,34	4,34	0,88
E g2	2,92	1,52	1,08	0,14	0,05	0,35	0,36	0,01	0,03	0,04	<0,01	<0,01	0,02	<0,01	0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	6,55	3,85	0,98
07/2000																						
B g1	0,83	1,01	1,86	0,05	0,05	0,62	0,90	0,08	0,18	0,17	0,04	<0,01	0,29	0,11	0,11	0,05	0,11	0,02	0,12	6,59	3,30	0,69
C g1	0,63	0,69	1,09	0,07	0,06	0,44	0,62	0,09	0,19	0,16	0,06	0,02	0,16	0,09	0,07	0,1	0,08	0,02	0,09	4,70	2,47	0,71
D g1	1,03	1,26	2,35	0,11	0,11	0,71	1,06	0,06	0,16	0,06	0,05	<0,01	0,17	0,07	0,09	0,07	0,07	0,01	0,06	7,50	3,52	0,67
E g1	1,24	1,88	3,14	0,10	0,08	0,77	1,25	0,09	0,25	0,16	0,07	<0,01	0,26	0,16	0,12	0,04	0,12	0,03	0,12	9,90	4,36	0,61
F g1	1,97	1,23	1,90	0,14	0,07	1,96	1,70	0,37	0,80	0,32	0,08	0,03	0,72	0,47	0,49	0,08	0,42	0,12	0,40	13,28	9,10	1,15
07/2000																						
B g1	0,66	0,90	1,56	0,08	0,09	0,31	0,54	0,06	0,12	0,17	0,04	0,01	0,16	0,08	0,07	0,05	0,07	0,01	0,08	5,05	2,16	0,57
C g1	1,01	2,21	5,34	0,12	0,13	2,20	2,38	0,35	0,57	0,47	0,27	0,06	0,31	0,22	0,20	0,14	0,15	0,01	0,53	16,67	7,82	0,92
D g1	0,89	1,16	2,00	0,06	0,05	0,39	0,75	0,05	0,09	0,12	0,01	<0,01	0,10	0,04	0,03	0,01	0,04	0,01	0,05	5,83	2,45	0,52
E-F g1	1,21	2,51	5,51	0,15	0,09	2,37	2,55	0,29	0,58	0,28	0,30	0,12	0,32	0,25	0,22	0,19	0,16	0,03	0,56	17,68	8,44	0,93
07/2001																						
B g2	1,29	1,77	3,30	0,12	0,05	0,52	0,98	0,02	0,04	0,15	0,12	0,08	0,26	0,15	0,01	0,03	0,07	0,05	0,10	9,10	3,45	0,53
B g1	3,46	3,79	6,52	0,31	0,11	1,11	2,05	0,04	0,09	0,10	0,06	0,03	0,44	0,25	<0,01	<0,01	0,15	0,08	0,17	18,76	7,91	0,54
C g2	4,14	2,71	5,15	0,35	0,11	1,77	2,93	0,07	0,16	0,07	0,04	<0,01	0,23	0,17	<0,01	<0,01	0,09	0,03	0,14	18,15	9,90	0,60
C g1	4,81	3,47	6,29	0,40	0,16	2,13	3,71	0,24	0,35	0,14	0,08	<0,01	0,29	0,15	0,16	0,10	0,10	0,05	0,13	22,77	12,37	0,57
D g2	1,82	5,08	11,97	0,17	0,15	1,87	2,76	0,18	0,36	0,23	0,08	<0,01	0,21	0,14	0,14	0,07	0,13	0,01	0,27	25,64	7,91	0,68
D g1	3,27	9,84	24,12	0,25	0,32	4,41	5,14	0,46	0,96	0,44	0,46	0,13	0,42	0,31	0,28	0,09	0,21	0,01	0,76	51,87	16,16	0,86
E g2	2,45	1,44	1,19	0,22	0,05	0,28	0,28	0,02	0,04	0,03	0,02	0,01	0,05	0,02	0,02	0,02	0,02	<0,01	0,04	6,20	3,42	1,02
F g1	2,62	4,06	10,50	0,43	0,25	5,23	4,90	0,92	1,33	0,84	0,43	0,15	0,92	0,57	0,64	0,30	0,60	0,15	1,31	36,14	19,04	1,07
G g1	1,52	1,14	1,33	0,15	0,05	0,33	0,28	0,03	0,11	0,02	0,03	<0,01	0,06	0,04	0,04	0,04	0,1	0,01	0,08	5,32	2,67	1,19
H g1	3,04	2,52	3,59	0,23	0,11	1,46	1,36	0,17	0,30	0,15	0,07	<0,01	0,19	0,14	0,13	0,11	0,10	0,02	0,29	13,97	7,29	1,07
07/2002																						
B g2	0,99	0,63	0,89	0,07	0,04	0,20	0,28	0,07	0,16	0,15	0,02	<0,01	0,08	0,04	0,02	0,03	0,01	<0,01	0,02	3,70	1,90	0,71
B g1	1,06	1,01	1,13	0,06	0,06	0,26	0,26	0,12	0,28	0,24	0,01	0,01	0,07	0,06	0,01	0,01	0,02	<0,01	0,02	4,69	2,17	1,00
C g2	1,03	0,51	0,75	0,09	0,07	0,17	0,19	0,04	0,09	0,25	0,03	<0,01	0,08	0,07	0,03	0,15	0,05	0,01	0,04	3,64	1,82	0,89
C g1	1,32	0,88	1,22	0,37	0,06	0,27	0,32	0,04	0,08	0,22	<0,01	<0,01	0,07	0,05	0,04	0,05	0,03	0,07	0,02	5,09	2,61	0,84
D g2	2,01	1,60	1,58	0,08	0,04	0,70	1,08	0,12	0,10	<0,01	0,02	<0,01	0,05	0,03	0,03	0,01	<0,01	<0,01	<0,01	7,46	4,18	0,65
D g1	1,16	0,72	0,94	0,06	*	0,33	0,27	0,03	0,10	0,17	0,01	<0,01	0,06	0,05	0,02	0,01	0,01	<0,01	0,03	3,97	2,06	1,23
D g0	2,89	2,19	2,73	0,18	0,05	1,34	1,84	0,03	0,17	0,23	0,03	<0,01	0,06	0,06	0,04	0,03	0,04	*	0,04	11,96	6,63	0,73
E g2	1,03	1,22	1,19	0,06	0,13	0,39	0,60	0,05	0,07	0,09	0,02	<0,01	0,11	0,06	0,04	0,02	0,07	<0,01	0,04	5,18	2,45	0,64
F g2	0,99	0,66	0,60	0,05	*	0,21	0,22	0,05	0,08	0,09	0,01	<0,01	0,09	0,05	0,03	0,03	0,04	<0,01	0,02	3,22	1,78	0,95
F g1	1,73	1,41	1,54	0,14	0,18	1,07	1,07	0,51	0,79	1,79	0,15	0,02	1,13	0,43	0,42	0,16	0,38	0,11	0,30	13,36	7,67	1,00
H g2	1,03	0,73	1,41	0,16	0,10	0,22	0,25	0,13	1,33	0,14	0,01	<0,01	0,06	0,08	0,04	0,02	0,05	<0,01	0,03	5,78	3,29	0,86
H g1	1,20	1,71	1,62	0,14	0,13	0,42	0,59	0,10	0,94	0,17	0,01	<0,01	0,06	0,03	0,02	0,02	0,02	0,04	0,02	7,24	3,55	0,71

Tableau 2 : Concentrations en HAP dans les muscles de soles du golfe de Gascogne exprimées en ng/g de poids sec. Quiberon (A), Vilaine (B), Loire (C), Bourgneuf (D), Pertuis Breton (E), Pertuis d'Antioche (F), Oléron (G), Gironde (H).

ANNEXE 25 (suite)

**Etude des nourriceries de sole du golfe de Gascogne suite à la marée noire Erika
(§ III.3.1.1)**

ng/g	1-OHN	2-OHN	2-OHBi	9-OHFe	4-OHPhe	9-OHPhe	3-OHPhe	1-OHPhe	2-OHPhe	1-OHP
02/2000										
Quiberon g2-3 (2)	*	<0,7	<1	<0,7	<0,5	<0,5	13±2	20±3	25±4	150±4
Quiberon g2	*	*	<1	<2	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	133
Vilaine g2 (2)	10±2	21±0	45±15	<2	<0,5	<0,5	7±4	16±6	74±21	287±0
ext. Vilaine g2	6	15	32	<2	<0,5	<0,5	12	34	72	157
ext. Vilaine g1	94	152	469	607	40	94	272	418	595	1298
Loire g2 16/02	<0,7	<0,7	96	29	<0,5	<0,5	<0,5	18	63	244
Loire g2 22/02 (2)	<0,7	<0,7	83±22	34±7	<0,5	<0,5	56±18	50±6	160±30	334±37
Loire g1 22/02	200	216	325	134	105	66	452	350	598	1425
Bourgneuf g2 (3)	<0,7	12±1	35±6	18±3	<0,5	<0,5	20±4	16±2	30±8	175±29
Bourgneuf g1	<0,7	16	45	39	<0,5	14	21	39	54	265
Breton g2 (3)	<0,7	35±4	71±12	68±15	<0,5	<0,5	31±3	35±1	61±5	283±12
Breton g1	92	89	109	128	31	16	107	143	235	730
07/2000										
int. Vilaine g1										73
ext. Vilaine g1 (2)										28±13
Loire g1										65
Bourgneuf g1										82
Breton g1										104
Antioche g1 (2)										42±7
09/2000										
Vilaine g1										42
Loire g1 (2)										55±3
Bourgneuf g1 (2)										62 ±1
Antioche-Breton g1 (2)										47±1
09/2001										
Vilaine g2										28
Vilaine g1										75
Loire g2										21
Loire g1										135
Bourgneuf g2										30
Bourgneuf g1										40
Breton g2										86
Antioche g1										127
Oléron g1										10
Gironde g1										58
09/2002										
Vilaine g2 (2)	<0,7	<0,7	8±0	*	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	28±3
Vilaine g1	<0,7	<0,7	<1	<2	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	36
Loire g2 (2)	<0,7	<0,7	16±4	<2	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	45±5
Loire g1 (2)	*	32±6	24±0	62±18	<0,5	1±2	9±3	14±6	<0,5	50±6
Bourgneuf g2	<0,7	<0,7	<1	<2	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	19
Bourgneuf g1	<0,7	<0,7	*	*	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	64	111
Bourgneuf g0	<0,7	<0,7	*	<2	<0,5	<0,5	<0,5	*	<0,5	209
Breton g2	<0,7	<0,7	10	26	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	35
Antioche g2	<0,7	25	21	47	<0,5	*	6	3	12	60
Antioche g1	18	8	15	22	<0,5	<0,5	3	4	7	49
Antioche g0	<0,7	5	11	18	<0,5	*	2	3	5	55
Gironde g2	<0,7	<0,7	16	6	<0,5	*	<0,5	11	<0,5	19
Gironde g1	4	18	14	45	<0,5	*	<0,5	<0,5	5	74

Tableau 3 : Concentrations en métabolites de HAP dans la bile des soles

ANNEXE 26
Etude de la contamination du traict du Croisic suite à la marée noire Erika
 (§ III.3.1.2) (* : interférent ; nq : non quantifié)

Sédiments (ng/g poids sec)	Pli 0	Len 0	Sib 0	Pli 1	Pen	Sib 1	Pli 2	Pen 2	Sib 2	Pli 3	Pen 3	Sib 3	Pli 4	Pen 4	Sib 4
N	2,91	1,18	8,86	7,39	0,18	29,29	8,16	0,41	1,42	11,18	0,65	7,82	11,52	0,65	9,62
2-C ₁ N	3,05	0,78	2,08	10,95	0,40	21,15	15,67	0,14	0,82	10,15	0,65	6,78	8,36	0,07	4,56
1-C ₁ N	1,94	0,39	1,39	8,11	0,31	14,36	12,32	0,14	0,82	7,25	0,65	4,84	4,55	0,08	2,54
EtN	0,55	0,18	0,46	2,76	0,13	4,57	4,39	<0,01	0,40	1,45	0,25	1,45	1,00	0,03	0,63
2,6+2,7-C ₂ N	2,22	0,59	2,08	10,30	0,39	16,65	21,68	0,14	1,33	9,43	0,74	6,78	5,83	0,10	3,49
1,3+1,7-C ₂ N	1,39	0,39	2,08	13,05	0,39	22,92	26,58	0,18	1,33	8,70	0,82	6,30	4,15	0,08	3,01
1,6-C ₂ N	1,66	0,59	2,08	8,25	0,30	9,31	21,42	0,14	1,33	7,25	0,74	5,33	3,38	0,09	2,73
1,4+2,3-C ₂ N	0,83	0,18	0,93	4,64	0,17	8,06	10,06	0,14	0,44	5,80	0,41	4,36	2,52	0,04	1,98
1,5-C ₂ N	0,55	0,20	0,69	2,88	0,09	3,40	5,42	0,04	0,40	2,18	0,33	1,45	0,96	0,04	1,06
1,2-C ₂ N	0,28	0,14	0,69	2,22	0,10	4,03	5,68	0,09	0,40	2,18	0,25	1,45	0,87	0,03	0,80
1,3,7-C ₃ N	1,11	0,20	1,85	4,79	0,23	9,22	14,45	0,18	1,77	5,08	1,64	4,36	1,88	0,15	2,18
1,3,6-C ₃ N	1,39	0,59	2,78	5,59	0,24	12,17	18,58	0,23	2,22	7,98	1,64	6,78	2,91	0,17	3,60
1,4,6+1,3,5-C ₃ N	1,11	0,39	2,08	7,12	0,24	6,45	15,23	0,18	1,77	5,08	0,82	4,36	3,08	0,19	2,71
2,3,6-C ₃ N	1,39	0,39	2,32	3,18	0,17	9,13	10,58	0,14	1,77	7,25	1,64	5,81	3,23	0,14	2,95
1,2,7+1,6,7+1,2,6-C ₃ N	1,94	0,59	3,24	6,31	0,27	13,52	24,00	0,32	3,11	10,88	3,27	8,24	3,65	0,23	4,45
1,2,4-C ₃ N	0,28	0,20	0,46	0,93	0,08	1,79	2,32	0,18	0,44	0,73	0,57	0,97	0,31	0,07	0,49
1,2,5-C ₃ N	0,83	0,20	1,39	2,88	0,11	4,03	9,29	0,09	0,89	4,35	0,65	3,88	1,65	0,07	1,68
1,3,5,7-C ₄ N	1,39	0,39	1,62	2,14	0,16	3,22	4,90*	0,14	0,89	3,63	2,45	3,39	1,44	0,34	1,76
1,3,6,7-C ₄ N	1,11	0,20	1,85	2,33	0,10	3,76	5,68	0,23	1,33	5,80	2,45	5,33	1,94	0,25	2,45
1,2,6,7+1,2,4,6+1,4,6,7-C ₄ N	0,55	0,18	1,16	1,51	0,13	2,42	3,35	0,28	0,89	3,63	3,27	3,39	1,42	0,33	1,46
1,2,5,7-C ₄ N	0,55	0,14	0,93	1,10	0,08	1,61	2,58	0,18	0,44	2,90	1,64	2,42	0,93	0,19	0,91
2,3,6,7-C ₄ N	0,55	0,12	0,46	0,85	0,05	1,07	1,55	0,23	0,31	2,18	0,82	1,94	0,58	0,12	0,52
1,2,6,7-C ₄ N	0,55	0,14	0,69	1,01	0,05	1,43	2,06	0,18	0,44	2,90	1,64	2,42	0,78	0,15	1,51
1,2,3,7-C ₄ N	0,28	0,08	0,46	0,53	0,02	0,63	1,03	0,23	0,27	1,45	0,82	1,45	0,45	0,07	0,41
1,2,3,6-C ₄ N	0,28	0,10	0,46	0,73	0,02	1,16	1,81	0,18	0,40	2,18	0,82	1,94	0,66	0,11	0,59
1,2,5,6+1,2,3,5-C ₄ N	0,83	0,20	1,16	1,26	0,06	1,88	3,87	0,14	0,89	4,35	1,64	3,88	1,51	0,18	1,45
Ay	nq	nq	nq	3,41	<0,01	9,47	39,7	0,08	13,80	85,27	0,22	65,21	10,36	<0,01	18,95
Ae	nq	nq	nq	3,26	0,08	29,26	15,58	0,15	2,11	21,74	0,52	16,82	4,87	0,08	5,63
Fe	nq	nq	nq	6,57	0,10	38,50	41,38	0,40	4,41	86,21	2,03	41,40	11,68	0,10	17,47
DBT	2,32	0,45	5,65	2,87	0,08	21,63	3,28	0,06	0,92	8,06	0,38	5,30	5,97	0,14	8,91
4-C ₁ DBT	1,90	0,30	2,54	2,29	0,13	4,17	2,08	0,18	0,56	2,53	0,85	2,23	3,44	0,33	3,20
1+3-C ₁ DBT	1,37	0,22	2,83	1,68	0,13	4,59	1,65	0,20	0,50	2,56	0,77	2,12	2,34	0,32	3,19
2-C ₁ DBT	0,63	0,07	1,13	0,77	0,06	1,46	0,56	0,07	0,19	1,27	0,38	0,95	1,07	0,25	1,77
C ₂ DBT	65,11	9,72	58,70	1,81	*	13,84	16,22	1,37	2,39	16,03	8,04	11,22	30,44	6,61	24,75
Phe	37,57	4,92	112,13	40,97	0,30	354,46	85,29	0,63	23,60	220,11	2,91	154,45	97,68	0,88	147,72
A	5,45	0,31	18,66	7,14	0,03	37,93	16,25	0,07	6,58	30,15	0,28	28,97	23,17	0,29	37,89
3-C ₁ Phe	7,20	0,97	15,32	8,08	0,25	29,18	13,62	0,33	3,82	24,62	2,56	25,26	13,23	0,62	18,37
2-C ₁ Phe	7,55	0,97	19,58	8,29	0,38	35,94	15,95	0,65	5,05	28,17	3,48	23,84	15,62	1,14	26,70
2-C ₁ A	1,56	0,15	4,57	2,14	0,04	9,48	5,17	0,15	1,47	7,80	0,32	8,51	5,64	0,26	10,84
9+4-C ₁ Phe+1-C ₁ A	5,81	0,89	11,67	7,00	0,23	20,97	13,44	0,49	4,31	17,13	2,62	16,45	12,05	0,80	21,06
1-C ₁ Phe	5,22	0,73	10,85	4,70	0,23	18,32	9,71	0,49	3,45	19,00	2,36	15,68	11,51	0,86	18,73
C ₂ Phe	nq	nq	nq	64,60	2,62	79,88	84,50	6,62	18,31	95,36	31,25	85,79	100,69	9,28	93,86
F	92,19	11,84	268,03	91,56	0,20	536,59	195,67	0,21	79,69	403,14	1,57	423,79	258,18	1,38	446,37
P	76,02	10,93	216,42	73,96	0,55	380,48	159,53	0,82	63,10	293,90	6,03	335,01	200,11	3,83	344,01
BaA	44,59	6,09	129,23	47,17	0,35	220,06	92,60	0,61	38,64	156,37	2,40	183,59	103,75	1,75	210,65
C+T	67,15	11,83	150,98	71,64	1,23	288,84	136,47	1,55	45,40	224,10	8,36	228,54	158,31	2,77	215,94
C ₁ C	nq	nq	nq	175,47	5,25	152,35	225,80	4,11	28,86	258,24	27,85	155,04	250,95	6,01	143,59
1,2-BNT	nq	nq	nq	18,73	0,29	49,77	17,34	0,27	4,33	22,56	1,45	21,92	23,27	0,20	19,18
2,3-BNT	nq	nq	nq	5,83	0,07	19,31	5,96	0,09	1,79	7,68	0,45	8,60	5,59	0,02	5,96
BbF+BkF+BjF	95,88	17,53	270,19	127,98	2,26	624,70	224,08	0,72	84,00	327,66	2,78	390,78	235,62	2,60	321,47
BeP	44,12	9,13	107,52	67,64	1,79	224,26	106,33	0,91	33,14	135,08	4,62	151,52	126,71	1,54	147,39
BaP	52,53	8,97	159,43	51,68	2,09	319,38	108,38	0,73	48,91	17,74	3,89	202,88	119,39	1,50	191,79
Per	18,34	3,59	43,88	28,67	0,67	79,64	44,80	0,33	12,61	55,81	1,74	57,20	53,47	0,61	54,75
DahA+DacA	11,37	2,15	22,01	13,71	0,18	48,07	24,92	0,25	7,78	32,90	0,99	33,07	36,25	0,42	36,21
IP	37,73	7,52	100,60	41,30	0,49	199,35	80,80	0,95	33,46	129,78	0,94	157,29	126,97	0,94	208,70
BPer	37,78	8,04	95,46	46,85	0,39	188,48	71,28	0,97	31,20	119,63	2,17	143,42	96,70	0,83	136,86
16+3 HAP US-EPA	561,17	91,31	1552,00	634,60	8,44	3304,86	1300,09	8,55	484,1	2159,88	35,74	2413,04	1494,55	18,03	2349,28
TOTAL	748,91	126,05	1871,63	1140,56	24,93	4247,56	2106,10	28,99	630,90	2986,54	155,5	3103,97	2214,58	50,33	3001,46

ANNEXE 26 (suite)
Etude de la contamination du traict du Croisic suite à la marée noire Erika
(§ III.3.1.2) (* : interférent ; nq : non quantifié)

Moules (ng/g de poids sec)	Mou 0	Mou	Len 1	Pli 1	Mou 2	Sib 2	Pen 2	Mou 3	Sib 3	Pen 3	Pli 3	Mou 4	Sib 4	Pen 4	Pli 4
N	2,71	1,80	1,87	1,94	*	4,07	1,44	10,83	2,10	1,64	0,69	2,73	4,2	4,43	1,75
2-C ₁ N	1,66	0,87	1,04	1,59	1,60	3,10	1,61	0,68	2,50	2,03	2,06	1,36	2,41	2,52	2,96
1-C ₁ N	1,66	0,87	0,83	1,11	1,80	3,24	2,80	0,95	2,30	1,63	1,6	1,09	3,4	2,19	2,38
EtN	0,72	0,23	0,35	0,48	0,50	1,08	0,70	0,81	1,26	0,61	1,15	1,09	2,13	1,75	1,78
2,6+2,7-C ₂ N	0,94	0,41	0,83	1,87	2,38	2,16	1,76	4,74	5,06	6,10	2,06	1,64	*	8,77	5,35
1,3+1,7-C ₂ N	0,94	0,35	0,83	1,24	0,91	1,80	2,47	1,22	1,83	1,83	1,6	1,36	3,84	3,07	2,97
1,6-C ₂ N	0,7	0,35	0,56	0,76	0,91	2,16	1,76	1,18	2,02	1,63	1,6	0,82	2,56	1,75	1,78
1,4+2,3-C ₂ N	0,72	0,29	0,42	0,55	0,55	0,68	0,70	0,64	1,26	1,02	0,92	0,82	1,70	0,88	1,19
1,5-C ₂ N	0,58	0,12	0,21	0,35	0,36	0,84	0,47	0,32	0,76	0,61	0,69	0,27	0,85	0,88	0,30
1,2-C ₂ N	0,72	0,35	0,35	0,41	0,73	0,68	0,70	0,59	0,51	0,61	0,69	0,55	0,85	1,32	0,59
1,3,7-C ₃ N	1,44	0,41	0,62	1,31	1,83	1,76	1,72	1,22	1,77	2,03	1,15	0,82	1,76	1,40	1,19
1,3,6-C ₃ N	1,9	0,64	0,97	1,66	2,93	1,30	2,67	1,58	1,48	0,99	0,99	1,36	2,19	0,96	1,79
1,4,6+1,3,5-C ₃ N	2,87	3,07	1,18	1,38	2,20	1,70	2,36	2,17	1,83	2,03	1,15	1,36	2,61	2,19	2,97
2,3,6-C ₃ N	1,16	0,58	0,97	1,31	2,19	0,84	1,51	1,31	2,03	1,58	1,12	1,36	0,27	1,21	1,77
1,2,7+1,6,7+1,2,6-C ₃ N	3,13	0,87	1,39	2,07	2,75	3,20	4,90	1,35	2,53	4,07	2,29	1,64	3,04	2,72	3,57
1,2,4-C ₃ N	0,96	0,46	0,62	0,62	0,73	1,04	1,37	0,37	1,26	1,22	0,92	0,27	0,85	0,88	1,19
1,2,5-C ₃ N	1,18	0,87	0,69	1,04	2,93	1,44	1,76	1,22	1,18	0,67	1,03	1,09	*	*	*
1,3,5,7-C ₄ N	2,15	1,10	2,08	2,90	2,56	3,50	5,88	3,39	2,53	2,66	2,06	1,36	*	2,63	2,38
1,3,6,7-C ₄ N	2,15	1,27	2,57	3,73	3,12	2,78	5,88	6,77	5,06	4,07	2,29	1,64	3,04	2,28	2,98
1,2,6,7+1,2,4,6+1,4,6,7-C ₄ N	1,68	0,81	2,01	2,63	2,20	1,76	3,48	4,06	2,53	2,66	2,29	1,09	3,84	3,95	2,97
1,2,5,7-C ₄ N	1,2	0,64	1,53	2,00	2,93	2,12	3,48	1,80	2,28	2,03	2,06	0,82	2,13	2,19	2,38
2,3,6,7-C ₄ N	0,77	0,58	1,04	1,31	1,83	0,70	2,15	1,72	1,26	1,42	1,37	0,82	2,13	1,32	1,78
1,2,6,7-C ₄ N	0,94	0,64	1,53	1,87	3,30	1,80	2,36	1,80	2,53	2,03	2,29	0,82	2,13	2,19	2,38
1,2,3,7-C ₄ N	0,6	0,35	0,76	1,04	1,47	0,88	1,56	1,18	1,26	1,22	0,92	0,27	1,28	0,88	1,19
1,2,3,6-C ₄ N	0,96	0,41	0,97	1,31	1,83	1,04	1,72	2,04	1,57	1,63	1,34	0,55	1,70	1,32	2,38
1,2,5,6+1,2,3,5-C ₄ N	2,15	0,87	1,73	2,56	3,12	2,20	3,07	4,06	2,53	3,02	1,22	1,36	3,41	2,63	2,97
Ay	1,13	0,53	0,63	0,95	2,92	1,05	0,30	1,57	2,05	0,73	1,44	1,42	1,85	1,14	2,58
Ae	0,70	0,58	0,60	0,81	3,20	2,16	0,91	1,74	2,02	1,63	1,47	1,69	2,43	3,21	2,84
Fe	2,55	1,17	1,67	2,45	3,28	3,68	3,59	2,33	3,15	5,06	2,85	1,85	4,92	5,06	4,79
DBT	1,70	0,54	2,43	2,47	1,20	3,80	3,60	3,46	3,35	4,18	3,44	1,68	3,22	3,45	3,82
4-C ₁ DBT	1,63	1,09	8,96	9,30	1,63	8,00	9,70	1,39	8,90	10,45	12,21	1,03	6,44	6,90	5,73
1+3-C ₁ DBT	0,97	0,55	7,05	7,25	1,20	6,40	8,00	0,25	6,70	8,36	6,80	0,72	3,22	5,20	3,83
2-C ₁ DBT	2,10	1,17	3,72	3,91	1,20	4,40	4,60	4,32	5,60	5,22	5,70	0,62	3,22	3,45	3,82
C ₂ DBT	33,80	8,08	161,12	176,88	16,80	62,06	81,16	7,78	112,00	138,17	145,03	9,60	61,15	67,25	86,22
Phe	10,01	7,37	14,53	14,18	9,40	25,00	23,40	8,42	28,15	26,88	22,86	5,97	19,23	22,86	15,82
A	2,10	0,95	1,24	2,33	2,26	3,80	2,10	3,32	3,51	3,84	3,06	2,33	2,16	2,44	1,79
3-C ₁ Phe	4,39	4,12	19,06	22,15	4,49	11,47	14,27	12,13	11,17	10,72	11,54	3,51	8,55	7,58	8,01
2-C ₁ Phe	10,02	3,26	18,72	21,75	4,70	15,60	20,43	14,59	23,60	21,51	17,15	4,79	14	13,33	9,89
2-C ₁ A	2,01	*	5,88	6,75	*	*	*	7,18	2,34	*	4,09	3,42	2,97	3,25	3,39
9+4-C ₁ Phe+1-C ₁ A	7,75	4,53	25,46	27,65	4,50	15,18	14,85	16,11	19,66	22,58	19,44	4,62	11,22	14,37	11,16
1-C ₁ Phe	6,03	2,08	14,42	19,22	3,50	10,70	9,27	10,62	15,73	16,13	12,58	3,68	6,99	7,62	7,91
C ₂ Phe	45,28	27,21	408,92	488,11	57,70	167,45	181,04	156,20	167,23	175,29	224,28	52,61	112,15	134,12	196,55
F	32,71	24,69	29,55	37,90	26,95	32,24	20,22	25,12	43,00	35,40	37,60	13,73	34,00	24,73	26,31
P	24,39	13,89	76,07	87,59	19,70	100,03	81,30	*	128,00	117,90	121,25	17,43	121,00	72,43	73,79
BaA	6,24	0,69	47,51	82,96	9,23	27,75	17,80	8,21	17,19	19,95	46,61	6,18	14,54	17,24	47,05
C+T	17,25	2,33	187,36	257,97	14,86	98,48	81,33	13,98	52,01	61,51	138,73	11,47	38,47	42,40	110,12
C ₁ C	11,37	2,17	533,46	800,11	9,23	243,08	196,32	14,63	119,02	155,12	539,34	9,16	91,97	138,72	405,74
1,2-BNT	3,23	0,33	50,30	69,48	2,06	34,06	32,17	2,12	17,08	22,79	54,62	2,10	13,22	17,29	51,57
2,3-BNT	0,82	0,15	9,22	13,16	1,30	8,57	6,75	0,85	2,50	4,15	8,78	0,53	2,73	2,88	6,60
BbF+BkF+BjF	21,08	9,20	95,36	112,90	11,15	82,60	25,46	10,25	64,68	30,32	96,84	9,80	44,70	29,00	73,94
BeP	11,33	7,97	112,95	120,67	11,35	59,26	42,41	10,70	41,93	37,38	88,30	12,63	30,15	26,90	67,76
BaP	7,17	1,79	27,59	42,05	8,29	22,81	10,27	5,44	28,60	6,90	37,90	5,72	6,34	10,24	14,88
Per	7,80	2,03	24,59	32,31	21,52	19,50	14,52	10,43	19,07	15,96	32,71	10,01	13,14	10,14	19,17
DahA+DacA	1,42	0,77	9,10	12,53	0,52	3,67	2,40	1,00	3,14	2,22	6,61	1,30	<0,01	3,78	7,19
IP	6,25	3,14	11,34	13,08	3,26	9,28	5,54	5,14	13,31	5,78	14,53	4,82	2,86	5,99	9,29
BPer	7,81	3,68	17,68	16,17	3,65	13,23	7,25	8,89	12,37	4,45	8,44	6,10	4,96	8,98	13,65
16+3 HAP US-EPA	144	73	522	686	119	430	283	106	403	324	541	93	302	254	406
TOTAL	328	155	1954	2544	309	1143	981	426	1030	1022	1764	239	734	768	1350

ANNEXE 27

**Etude de la contamination de la baie de Seine
(§ III.3.2)**

	GIR 01/2003	LES 05/2002 (n=2)	LES 01/2003 (n=2)	ANT 11/2002 (n=3)	FOS 04/2002	FOS 06/2002 (n=2)	FOS 09/2002 (n=3)	FOS 02/2003 1 (n=2)	FOS 02/2003 2 (n=2)
1-OHN	<0,7	8±2	7±2	11±1	53	51±4	28±4	4±1	<0,7
2-OHN	<0,1	5±1	5±1	94±10	48	60±3	214±16	6±2	<0,1
2-OHBi	<1,4	6±1	<1,4	29±5	43	41±3	74±10	7±2	5±1
9-OHFe	<3,6	22±5	61±11	54±5	156	56±3	169±24	114±14	13±1
3-OHPhe	<0,3	<0,3	<0,3	20±2	21	<0,3	48±4	36±0	11±3
1-OHPhe	<0,1	<0,1	<0,1	8±1	13	<0,1	35±4	24±2	8±4
2-OHPhe	<0,4	<0,4	<0,4	29±3	28	<0,4	82±6	57±1	15±1
1-OHP	48	51±1	144±12	299±16	758	533±20	2782±84	630±3	183±0
Somme	48	91±8	217±24	545±33	1121	740±30	3432±149	878±21	234±7

Tableau 1 : Concentrations en métabolites de HAP dans la bile de flet

	GIR 01/03	LES 01/03	ANT 11/02	FOS 09/02
Phe	6,50	6,47	42,43	40,16
A	0,29	0,33	3,62	4,96
C ₁ Phe	4,26	5,25	19,92	42,65
C ₂ Phe	6,79	6,81	19,83	50,71
C ₃ Phe	2,23	4,13	5,22	23,32
F	2,46	2,08	13,89	22,69
P	2,81	2,45	7,66	25,41
BaA	0,08	0,09	0,54	0,48
C+T	0,26	0,33	4,72	5,80
C ₁ -C	0,29	0,32	1,46	3,42
1,2-BNT	0,12	0,16	0,39	0,44
2,3-BNT	0,04	0,02	0,04	<0,01
BF	0,08	0,09	1,04	0,40
BeP	0,04	<0,01	0,50	0,68
BaP	0,03	0,01	0,08	0,10
Per	0,02	0,02	0,02	<0,01
IP	0,02	0,02	0,04	0,05
DBA	<0,01	<0,01	<0,01	0,11
BPer	0,07	0,04	0,15	0,18

Tableau 2 : Concentrations en HAP dans les foies de flet exprimées en ng/g de poids sec

PUBLICATIONS

- PUBLICATION 1 : Comparison of analytical methods for the individual detection and quantification of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites. Soumis à Journal of Chromatography A. 265
- PUBLICATION 2 : Solid phase extraction and purification for the quantification of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in biological fluids. Soumis à Analytical and Bioanalytical Chemistry. 285
- PUBLICATION 3 : Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by flat fish in waterborne laboratory exposures to individual polycyclic aromatic hydrocarbons. Soumis à Aquatic Toxicology. 299
- PUBLICATION 4 : Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons from heavy fuel oil in the marine environment : study of biotransformation by fish in laboratory experiments. Soumis à Environmental Toxicology and Chemistry. 319
- PUBLICATION 5 : Exposure of two fish species to dispersed crude oil : determination of individual biliary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons and evaluation of the additive effect of alkylphenols. Soumis à Marine Environmental Research. 349
- PUBLICATION 6 : Evaluation of the exposure of bottom fish to the Erika oil spill : biotransformation and bioaccumulation monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons. Soumis à Environmental Science and Technology. 369
- PUBLICATION 7 : Link between exposure of fish (*Solea solea*) to PAHs and metabolites: Application to the “Erika” oil spill. Aquatic Living Resources, 17 : 329–334 (2004). 397
- PUBLICATION 8 : 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 (2004). 403
- PUBLICATION 9 : Evaluation of the impact of the Erika oil spill on the traict du Croisic site by the way of mussel caging experiments. Soumis à Chemosphere. 421
- PUBLICATION 10 : Evaluation of the exposure of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons in the Seine River mouth through bile metabolites monitoring; comparison with other French Atlantic sites. Soumis à Marine Pollution Bulletin. 439

Comparison of analytical methods for the individual detection and quantification of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites

Olivier Mazéas¹ and Hélène Budzinski^{1*}

¹Laboratoire de Physico- et Toxicochimie des Systèmes Naturels, UMR 5472 CNRS, Université Bordeaux I, 351, cours de la libération, 33405 Talence, France.

* Corresponding author

Email: h.budzinski@lptc.u-bordeaux1.fr

Phone : 33 (0)5 40 00 69 98

Fax: 33 (0)5 40 00 69 98

Abstract - The use of two analytical techniques, liquid and gas phase chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS and GC/MS), were compared for the detection of different hydroxy-metabolites of PAHs. Two ionisation modes were experienced in LC/MS, atmospheric pressure chemical ionisation and electrospray ionisation, both in positive and negative polarity. In GC/MS, the ionisation was realized by electronic impact and the detection was investigated with and without prior derivatization.

LC/MS provided the best detection limits especially with electrospray. However, the whole compounds were only detected by GC/MS and with a good reliance after derivatization. Moreover, the separation of the different isomers of hydroxyphenanthrene was only achieved by gas chromatography. Finally, GC/MS with derivatization allowed an accurate quantification of the different compounds with results generally comprised between 100 and 103% of actual concentrations and standard deviations not exceeding 8%.

Keywords : PAHs, hydroxylated metabolites, LC/MS, GC/MS, quantification.

Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous contaminants of the environment [1]. The quantification of PAHs in tissues of marine organisms are usually carried out to evaluate the impact of such a contamination on these organisms. However, depending on the ability of organisms to metabolize PAHs, measurement of the bioaccumulated part of the absorbed PAHs can be restrictive and not representative of the contamination [2, 3, 4, 5, 6] due to their transformation into reactive intermediates. Toxicity of PAHs has been put in evidence in different studies concerning fish but also in mice and human beings [7, 8, 9, 10, 11, 12, 13]. In this respect, the study of PAHs fate in marine organisms appears necessary in order to access to the bioavailability and the toxicity of those contaminants.

The concentration of PAH metabolites is usually determined semi-quantitatively as global fluorescent aromatic compound equivalents (FACs) [14, 15, 16, 17, 18]. The present work consists in a comparison of two methods for the individual detection and quantitative determination of monohydroxylated PAHs. Those compounds are known to be some of the major metabolites produced by fish, present in their free form or more commonly conjugated with glucuronide, sulfate, glutathione groups... [19, 20, 21, 22, 23], and extensively excreted into the gall bladder [19, 21, 24, 25, 26]. The following compounds were chosen because they are potential metabolites of priority PAHs listed by the US EPA (United-States Environmental Protection Agency) for their interest in environmental surveys [27] : 1- and 2-hydroxynaphthalene (1- and 2-OHN), 9-hydroxyfluorene (9-OHFe), 9-hydroxyphenanthrene (9-OHPhe), 1-hydroxypyrene (1-OHP), 1-hydroxychrysene (1-OHC) and 3-hydroxybenzo(a)pyrene (3-OHBaP). 2-hydroxybiphenyl (2-OHBi) was added to this study due to the abundance of biphenyl in the environment. Their structure is indicated in Figure 1. Furthermore, the separation of the different isomers of hydroxyphenanthrene has been investigated.

The two compared methods are liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS) and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS). In LC/MS, different parameters have been tested : ionization parameters and type of ionisation, polarity mode, fragmentation and acidification of the aqueous phase. In GC/MS, detection and quantification have been compared with and without derivatization.

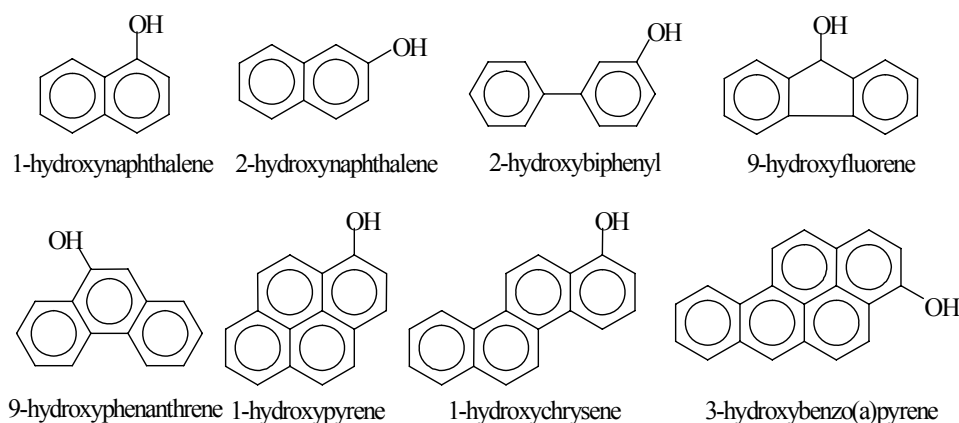


Figure 1 : The studied metabolites.

Experimental

Chemicals

1-hydroxynaphthalene and 2-hydroxynaphthalene were purchased from Lancaster (Bischheim, France), 2-hydroxybiphenyl, 9-hydroxyfluorene and 1-hydroxypyrene from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Falavier, France), 1-, 2-, 3-, 4-, 9-hydroxyphenanthrene, 1-hydroxychrysene and 3-hydroxybenzo(a)pyrene from Promochem (Molsheim, France). 1-hydroxypyrene-d9 and phenanthrene-d10 were obtained from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA).

Methanol Lichrosolv and acetic acid 100% Normapur were obtained from VWR (Strasbourg, France), water (sterilized water for injection) from laboratory Aguetant (Lyon, France) and methylene chloride Ultra Resi-Analysed Baker from Atlantic Labo (Floirac, France).

Bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA), N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA), ammonium iodide (NH₄I) and 2-mercaptoethanol were provided by Acros organics (Noisy-Le-Grand, France)

LC/MS analysis

After preparing individual mother standard solutions in methanol, diluted solutions were prepared in a 40/60 (v/v) mixture of methanol and water. In order to identify the different compounds, the analysis of each metabolite in SCAN mode was first performed in both positive and negative polarity with two different spray chambers, electrospray (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI). The LC/MS used was constituted of a HPLC 1100 and a mass spectrometer G1946 VL purchased from Agilent Technologies (Bios Analytique, l'Union, France). Nitrogen was produced by a UHPLCMS18E Nitrox generator supplied with air by a Junair compressor 2000-25M both purchased from Domnick Hunter (Gateshead, England).

The variations of different parameters were investigated in order to optimize the signal of each compound in SCAN and in SIM mode with ESI and APCI. For each detection mode, specific spray chamber and mass spectrometer parameters were tested. Some investigations were also carried out after acidification of the eluting phase (water adjusted at pH 3 using acetic acid). After this optimization step, each compound was definitively characterized in SCAN mode and detection limits were determined in selected ion monitoring (SIM) mode.

A mixture of all the studied metabolites was prepared in methanol/water (40/60; v/v) for chromatographic separation set up with two different columns. An Eclipse column XDB-C8 (4.6*150 mm, 5 µm), purchased from Agilent Technologies (Bios Analytique, l'Union, France), was first tested in both ionization modes. In a second time, a Zorbax column SB-C18 narrow-bore (2.1*150 mm, 3.5 µm) obtained from the same firm was used with electrospray ionization in order to work with lower HPLC flow, more adapted to ESI. Optimized parameters for the separation and detection of the different compounds are indicated in Table 1 and 2 respectively for APCI and ESI.

To allow the quantification of the different metabolites, the detection of an internal standard, 1-hydroxypyrene deuterated (1-hydroxypyrene-d₉) was also investigated. The repeatability of response coefficients and the accuracy of the quantification method were then evaluated.

GC/MS analysis

Identification, optimization and separation steps were led following the same logic as for LC/MS. For these developments, injections were performed in pulsed splitless mode using methylene chloride. Analyses were performed with an HP GC 6890A gas chromatograph Agilent Technologies coupled to an HP MSD 5973 Network mass selective detector Agilent Technologies, both purchased from BIOS Analytique (l'Union, France). The capillary column was an HP5/MS Agilent Technologies (30 m, 0.25 mm; phase: 5% diphenyl-, 95% dimethyl-siloxane) obtained from BIOS Analytique (l'Union, France) and the carrier gas used was helium 6.0 provided by Linde (Toulouse, France). Detection was also investigated after derivatization with bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA). For this purpose, solutions were kept 30 minutes in an oven at 65°C after adding 30 µl of BSTFA. Derivatization was also experienced with methylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) in presence of NH₄I (drying agent) and 2-mercaptoethanol (antioxidant).

In addition to the detection of the internal standard for quantification, the detection of perdeuterated phenanthrene (Phe-d₁₀) was investigated for further recovery determination.

GC/MS analytical conditions were as follow : automated PTV pulsed splitless injection (25 psi, 1.5 min); purge delay: 1.5 min and purge flow: 60 ml/min; injector temperature: 250°C; interface temperature: 280°C; oven temperature: from 70°C (2 min) to 180°C (1 min) at 5°C/min and from 180°C to 290°C (1 min) at 10°C/min; electron impact: 70 eV; voltage: 2000 V; source temperature: 150°C; 1.53 scan/s; dwell time: 50 ms for each ion).

Results and discussion

LC/MS developments

The different compounds were first characterized individually by their mass spectrum with both APCI and ESI spray chambers and in the two different polarity using SCAN mode for further identification in mixture and determination of major fragments for SIM detection. Then, different parameters were tested in order to optimize the detection.

Investigations led in APCI show that all the compounds are detected in negative mode (water at pH 6). The optimized parameters are approximately the same for all the metabolites in these conditions (Table 1).

Table 1 : APCI optimized parameters in negative and positive polarity.

Parameter	Negative polarity	Positive polarity
N ₂ flow	6 l/min	6 l/min
Nebulizer pressure	6 psig	6 psig
N ₂ temperature	300 °C	300 °C
Vaporizer temperature	500 °C	500 °C
Capillary voltage	2500 V	2500 V
Corona discharge	6 µA	6 µA
Fragmentor, MSD	from 0 to 6 min : 90 V, until 8 min : 15 V, and 90 V until 12.5 min, then 120 V (Dwell=189 msec); 1.28 cycle/sec	from 0 to 12.5 min : 90 V, then 120 V (Dwell=189 msec); 1.28 cycle/sec
LC injection volume	5 µl	5 µl
LC column	Eclipse XDB-C8 4.6*150 mm, 5 µm	Eclipse XDB-C8 4.6*150 mm, 5 µm
LC eluting flow	1 ml/min	1 ml/min
Eluting phase	Methanol/water gradient : 0-11 min : 60/40 11-14 min : from 60/40 to 75/25 14-17.5 : 75/25 17.5-18 : from 75/25 to 90/10	Methanol/water gradient : 0-11 min : 60/40 11-14 min : from 60/40 to 75/25 14-17.5 : 75/25 17.5-18 : from 75/25 to 90/10

The only real difference is the fragmentation voltage. The higher molecular weight compounds (9-hydroxyphenanthrene, 1-hydroxypyrene, 1-hydroxychrysene and 3-hydroxybenzo(a)pyrene) are

better detected at 120 V and the lower ones at 90 V except for 9-hydroxyfluorene which is better detected at 15 V. 1-hydroxypyrene is the only metabolite better detected after acidification of the aqueous phase to pH 3 (see below and Table 4 for the obtained detection limits in SIM mode after optimization); this may be due to dissociation increase, other metabolites being worse detected in those conditions. In positive polarity, hydroxynaphthalenes are weakly detected and 2-hydroxybiphenyl is not detected at all. On the contrary, 9-hydroxyfluorene is particularly better detected in positive mode with acidified water (pH 3) and a fragmentation of 90 V. The other optimized parameters are identical to the ones used in negative polarity (Table 1).

In ESI negative mode, all the compounds, except 9-hydroxyfluorene, are detected. It is interesting to notice that higher values of the different detection parameters are needed in ESI compared to APCI mode (Table 2). This phenomenon can be explained by the structure of the ESI spray chamber which does not include any vaporizer or corona discharge (compared to APCI). In this way, stronger conditions are necessary to vaporize the eluting phase and to form ions. As for APCI, most of the parameters are common to all the compounds. However, a higher capillary voltage is preferable for the highest molecular weight metabolites (9-hydroxyphenanthrene, 1-hydroxypyrene, 1-hydroxychrysene and 3-hydroxybenzo(a)pyrene). A fragmentation voltage of 110 V is needed for most of the compounds, only the two highest molecular weight metabolites are better detected at 160 V. Few investigations were carried out in positive mode and with acidified water (pH 3) because of the bad detection of all the compounds in those conditions.

In APCI positive mode, 1- and 2-hydroxynaphthalene do not have the same main ion ($m/z=144$ and 145 respectively), traducing the different ionisation properties of the two isomers. 1-hydroxypyrene is ionized in an exclusive $[M+H]^+$ ($m/z=219$) by proton addition. Ionization of 9-hydroxyfluorene is more complex. As it was said above, the detection of this compound is optimum with a fragmentor value of 15V allowing the major formation of the ion $[M+H-H_2O]^+$ ($m/z=165$) by proton addition and loss of the protonated alcohol function (McLafferty and Turecek, 1993). A

second protonation results in the formation of the second fragment, $[M+2H-H_2O]^+$ ($m/z=166$). With a fragmentation of 90 V, the second formed ion is $[M-H]^+$.

Table 2 : ESI optimized parameters in negative polarity. With the 4.6 mm diameter column, the used gradient was the same as for APCI.

Parameter	Value
N ₂ flow	10 l/min
Nebulizer pressure	15 psig
N ₂ temperature	350 °C
Capillary voltage	4500 V until 22 min, then 5500 V
Fragmentor, MSD	110 V until 28 min, then 160 V (Dwell=115 msec); 1.19 cycle/sec
LC column	Zorbax SB-C18 narrow-bore 2.1*150 mm, 3.5 μm
LC eluting flow	0.15 ml/min
Eluting phase	Methanol/water gradient : 0-9 min : 60/40 9-12 min : from 60/40 to 75/25 12-15 min : 75/25 15-17 min : from 75/25 to 85/15
Injection volume	5 μl

Main ions of the spectra obtained for the different compounds after optimization are summarized in Table 3. The acidification of the aqueous phase does not change the spectrum profile of any compound.

In APCI negative polarity, proton abstraction is the common route of ionization for this type of compounds except for 9-hydroxyfluorene. The second ion detected is $[M]^-$ with an abundance included between 10 and 20%. As regards 3-hydroxybenzo(a)pyrene, a third ion, $m/z=282$, is produced via the addition of methanol (eluting solvent) and loss of H₂O leading to the fragment $[M+CH_3]^-$. Concerning 9-hydroxyfluorene, the base peak is $[M-2H]^-$ ($m/z=180$) and the second ion ($m/z=165$) is $[M-OH]^-$. A third fragment is detected corresponding to the reaction with methanol as

for 3-hydroxybenzo(a)pyrene. The selected ions for SIM mode detection are $m/z=143, 169, 180, 193, 217, 267, 216$.

Table 3 : m/z values and ions constituting the spectra of the different studied compounds in LC/MS. ^a Fragmentation voltage, ^b nd : not detected, ^c - : not determined.

Spray chamber		APCI			ESI	
Polarity mode		Positive		Negative		
Compound (molecular mass)	m/z (relative abundance)	ion	m/z (relative abundance)	ion	m/z (relative abundance)	ion
1-OHN (144)	144 (100)	$[M]^+$	143 (100)	$[M-H]^-$	143 (100)	$[M-H]^-$
	145 (20)	$[M+H]^+$	144 (10)	$[M]^-$	144 (10)	$[M]^-$
2-OHN (144)	145 (100)	$[M+H]^+$	143 (100)	$[M-H]^-$	143 (100)	$[M-H]^-$
	144 (25)	$[M]^+$	144 (10)	$[M]^-$	144 (10)	$[M]^-$
2-OHBi (170)	nd ^b		169 (100)	$[M-H]^-$	169 (100)	$[M-H]^-$
			170 (10)	$[M]^-$	170 (12)	$[M]^-$
9-OHFe (182)	15V ^a : 165 (100)	$[M+H-H_2O]^+$	15V ^a :		nd ^b	
	166 (20)	$[M+2H-H_2O]^+$	180 (100)	$[M-2H]^-$		
	90V ^a : 165 (100)	$[M+H-H_2O]^+$	165 (90)	$[M-OH]^-$		
	181 (45)	$[M-H]^+$	195 (10)	$[M+CH_3]^-$		
9-OHPhe (194)	nd ^b		193 (100)	$[M-H]^-$	193 (100)	$[M-H]^-$
			194 (15)	$[M]^-$	194 (15)	$[M]^-$
1-OHP (218)	219 (100)	$[M+H]^+$	217 (100)	$[M-H]^-$	217	$[M-H]^-$
			218 (17)	$[M]^-$	218 (15)	$[M]^-$
1-OHC (244)	- ^c		- ^c		243 (100)	$[M-H]^-$
					244 (15)	$[M]^-$
3-OHBaP (268)	- ^c		267 (100)	$[M-H]^-$	267 (100)	$[M-H]^-$
			268 (20)	$[M]^-$	268 (20)	$[M]^-$
			282 (5)	$[M+CH_3]^-$		

In electrospray with negative ionization, the fragments formed are similar to the ones obtained in APCI. Only very small differences of relative abundance are noted. However, 9-hydroxyfluorene is not detected and the product of the reaction of methanol with 3-hydroxybenzo(a)pyrene ($m/z=282$) is not detected because of the absence of chemical ionization in ESI. The selected ions for SIM mode detection are $m/z=143, 169, 193, 217, 243, 267, 216$.

Chromatograms obtained in SIM mode are shown in Figure 2 and 3 respectively for APCI and ESI, both in negative mode. The separation of the two isomers of hydroxynaphthalene is compatible with quantification. As regards 1-hydroxypyrene and 1-hydroxypyrene deuterated, the ion extraction allows the separation of the two compounds. However, the separation obtained with the 2.1 mm diameter column in ESI is also shown in Figure 3 and shows incomplete separation forbidding the correct quantification of the different isomers individually.

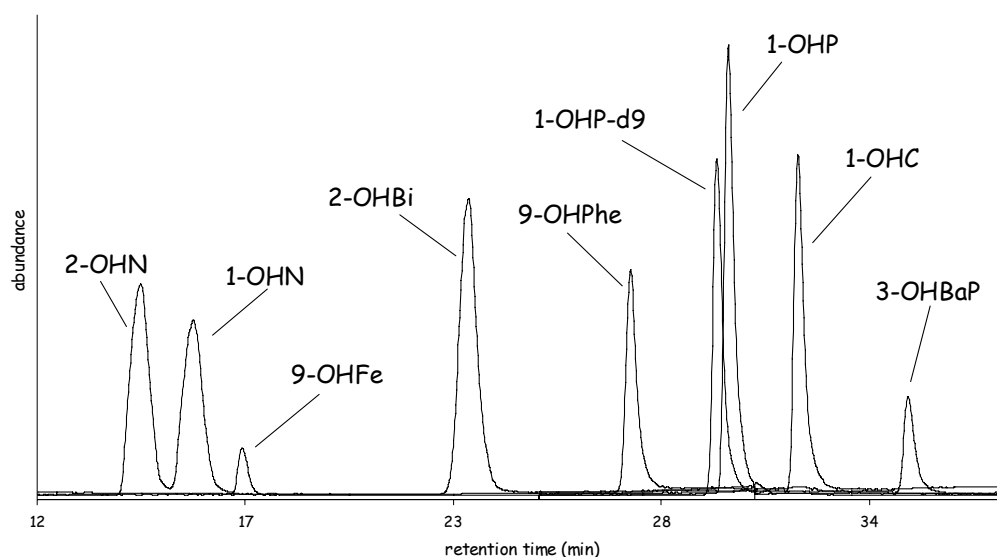


Figure 2 : APCI negative chromatogram in SIM mode.

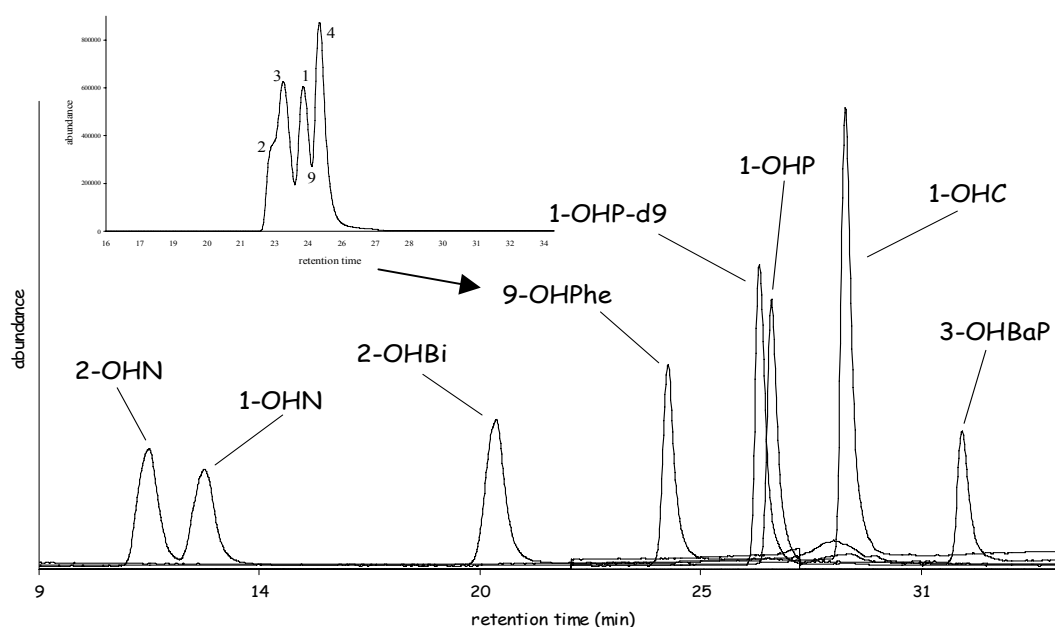


Figure 3 : LC-ESI-MS (-) chromatogram in SIM mode. The obtained separation of the different isomers (1, 2, 3, 4 and 9) of phenanthrol is also indicated.

Detection limits determined with the optimized conditions in SIM mode are given in Table 4. Values are about 10 times lower in ESI negative mode than in APCI negative mode for all the compounds. This result is unexpected when considering the relatively low polarity of the molecules, generally more adapted to APCI. Furthermore, detection limits in ESI are usually dependant of the molecular weight of the compounds. In the present study, this phenomenon is only observed for 3-hydroxybenzo(a)pyrene. Moreover, 9-hydroxyfluorene is only correctly detected in positive mode with acidification (pH 3). At last, the difference of detection limits obtained with the two columns in ESI mode put in evidence the importance of using a low flow of eluting phase for this ionization mode.

Table 4 : Detection limits obtained in LC/MS in SIM mode (signal to noise ratio = 3) expressed in pg injected. ^a 10 pg was obtained in positive polarity with acidification, ^b 20 pg was obtained after acidification, ^c not determined, ^d not detected.

	APCI (-)	ESI (-) column 4.6 mm	ESI (-) column 2.1 mm
1-OHN	7	- ^c	0,2
2-OHN	5	- ^c	0,3
2-OHBi	4	- ^c	0,3
9-OHFe	300 ^a	- ^c	nd ^d
9-OHPhe	9	26	1
1-OHP	47 ^b	7	0,6
1-OHC	- ^c	- ^c	3
3-OHBaP	100	32	20

Quantification abilities are then evaluated. The variation coefficients of response factors for three replicates are generally inferior to 5% except for 3-hydroxybenzo(a)pyrene (11%) in ESI negative mode (Table 5). The accuracy of the quantification is correct with typical results comprised between 96 and 105% of the reel concentration according to the compound and standard deviations between 0.5 and 4% except for 3-hydroxybenzo(a)pyrene (Table 6).

Table 5 : Variation coefficients (%) of response factors towards 1-hydroxypyrene-d9 for the different used analytical methods.

	LC-ESI-MS	GC/MS	GC/MS BSTFA	GC/MS MSTFA
1-OHN	4	27	3	7
2-OHN	3	25	3	7
2-OHBi	3	28	3	7
9-OHFe	-	25	5	8
9-OHPhe	3	14	5	6
1-OHP	3	7	0.5	0.2
1-OHC	5	15	3	7
3-OHBaP	11	52	10	11

Table 6 : Average estimation percentage of the real concentration of the different analytes and standard deviation for the different used analytical methods.

	LC-ESI-MS		GC/MS		GC/MS BSTFA	
	average	S. D.	average	S. D.	average	S. D.
1-OHN	98	4	106	20	100	3
2-OHN	104	0.5	109	22	101	3
2-OHBi	103	2	114	17	103	2
9-OHFe	-	-	107	20	102	3
9-OHPhe	96	2	96	14	101	2
1-OHP	103	2	95	1	103	1
1-OHC	105	4	109	18	104	4
3-OHBaP	108	8	112	32	105	6

GC/MS developments

As for LC/MS, the different compounds are first characterized individually in SCAN mode for further identification by means of their spectrum. The analytical conditions are precised in the experimental part. All the compounds are detected with this method. However, the detection of the different metabolites appears to be very sensitive to the good state of the injector leading to widening and tailing peaks as soon as the system is not perfectly clean. In this way, the injector needs to be cleaned and even replaced very often. The investigations led with the derivatization

agents BSTFA and MSTFA show the interest of silylating the analytes before injection in order to obtain Gaussian peaks even when the system is not perfectly clean.

Spectra obtained by electronic impact for the different metabolites and main fragments before and after derivatization with BSTFA are described in Table 7. It is to notice that GC/MS spectra are more complex than the LC/MS ones due to a softer way of ionisation in LC/MS. The obtained characteristic spectra can thus be useful to confirm compound identification.

Table 7 : Main ions (m/z) constituting the spectra (EI = 70 eV) of the hydroxylated PAHs. Relative abundances are indicated between brackets.

	GC/MS	
	without derivatization	With derivatization
1-OHN (144)	144 (100), 115 (85)	201 (100), 216 (90)
2-OHN (144)	144 (100), 115 (60)	216 (100), 201 (65)
2-OHBi (170)	170 (100), 169 (75), 141 (32)	211 (100), 227 (60), 242 (40)
9-OHFe (182)	181 (100), 182 (77), 152 (38)	165 (100), 254 (25), 73 (25), 180 (10)
9-OHPhe (194)	194 (100), 165 (70)	266 (100), 251 (63)
1-OHP (218)	218 (100), 189 (77)	290 (100), 275 (25), 291 (20)
1-OHC (244)	244 (100), 215 (75)	316 (100), 301 (70), 285 (15)
3-OHBaP (268)	268 (100), 239 (68)	340 (100), 341 (30)

Base peaks detected without derivatization correspond to the fragment $[M]^+$ except for 9-hydroxyfluorene for which it is $[M-H]^+$. For 2-hydroxybiphenyl, the second fragment is $[M-H]^+$. For the different compounds, the next main fragment is due to a rearrangement of $[M]^+$ leading to a loss of 29 u corresponding to the ion $[M-CHO]^+$ ($[(M-H)-CHO]$ for 9-hydroxyfluorene). The loss of aromaticity of $[RC_6H_5OH]^+$ happens by transfer of the hydroxyl hydrogen on the aromatic cycle. By the loss of C=O and H, the aromaticity is recovered with formation of $[RC_5H_5]^+$ ($[M-CHO]^+$). The selected ions for SIM mode detection are m/z=144, 170, 182, 194, 218, 244, 268, 217, 188.

After derivatization, the common base peak generally corresponds to the silylated molecular ion $[M+Si(CH_3)_3]^+$ (add of mass 72 corresponding to the derivatization group of BSTFA) (Table 7). However, 1-hydroxynaphthalene, 2-hydroxybiphenyl and 9-hydroxyfluorene do not follow this rule.

In fact, even though this molecular ion corresponds to the base peak for 2-hydroxynaphthalene ($m/z=216$), for 1-hydroxynaphthalene, the ion $m/z=201$, obtained by the loss of one CH_3 group from $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, is slightly more abundant. The relative abundance of the silylated molecular ion is only of 25% for 9-hydroxyfluorene, the base peak corresponding to $[\text{M}-\text{OH}]^+$ ($m/z=165$). At last, considering 2-hydroxybiphenyl, the ion $[\text{M}+41]^+$ ($m/z=211$), which could correspond to $[\text{HAP}-\text{O}(\text{SiCH}_2)]^+$, is mainly formed. The selected ions for SIM mode detection are $m/z=201, 216, 211, 165, 266, 290, 316, 340, 299$ and 188 .

The chromatograms obtained in SIM mode without and with derivatization using the conditions indicated in the experimental part are respectively presented on Figure 4 and 5. An increase of the gas flow is realized in the last part of the program in order to accelerate high molecular weight compounds, inducing higher and thinner peaks. The separation of the two isomers of hydroxynaphthalene is more effective after derivatization, however it is compatible with quantification in both cases. Moreover, the separation of the different hydroxyphenanthrene isomers after derivatization (Fig. 5) shows a good separation of the different compounds, compatible with individual quantification in opposite to LC/MS.

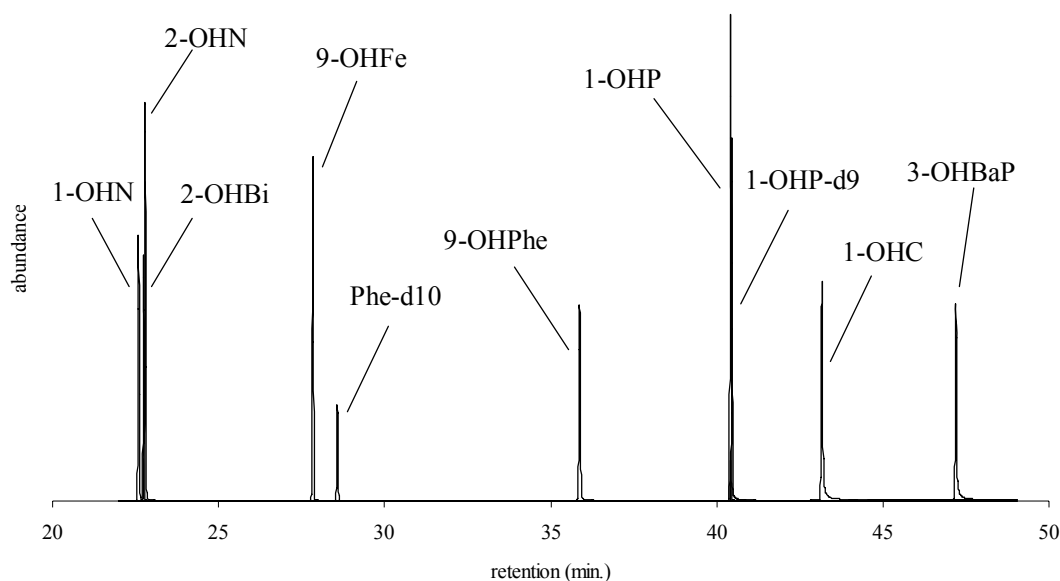


Figure 4 : GC/MS chromatogram without derivatization in SIM mode.

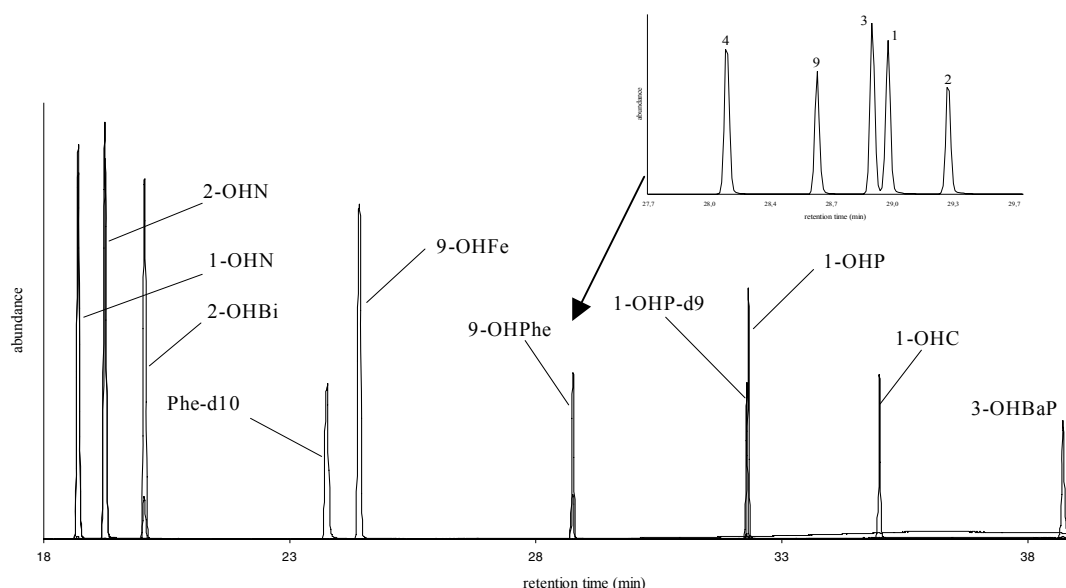


Figure 5 : GC/MS chromatogram after BSTFA derivatization in SIM mode. The obtained separation of the different isomers (1, 2, 3, 4 and 9) of phenanthrol is also indicated.

Best detection limits are obtained without derivatization except for 2-hydroxybiphenyl in SIM mode (Table 8). Relatively high detection limits are obtained for 3-hydroxybenzo(a)pyrene (64 and 130 injected pg without and with derivatization respectively) compared to other compounds.

Table 8 : Detection limits in injected pg obtained in GC/MS. “-“ : not determined.

	Without derivatization	With BSTFA
1-OHN	0.3	1.7
2-OHN	0.4	3.5
2-OHBi	0.6	0.4
9-OHFe	0.5	1.8
9-OHPhe	0.4	2.8
1-OHP	1	1.7
1-OHC	-	3.6
3-OHBaP	64	130

Compared to LC/MS, detection limits without derivatization are close to the ones obtained in LC-ESI-MS. However, compared to the ones obtained with derivatization, detection limits in LC-

ESI-MS negative are significantly lower except for 9-hydroxyfluorene, which is only detected in GC/MS, and for 2-hydroxybiphenyl.

Quantification abilities of the different methods are then evaluated. Typical variation coefficients of response factors for three replicates are generally around 15-25% (Table 5) without derivatization due to the particular sensibility of the compounds to the state of the apparatus. The quantification is however quite accurate with results comprised between 95 and 114% of the actual concentration but variation coefficients are very important (until 32% for 3-hydroxybenzo(a)pyrene; Table 6). After derivatization, the best results are obtained with BSTFA with variation coefficients of response factors for three replicates which do not exceed 5% except for 3-hydroxybenzo(a)pyrene (10%) (Table 5). The accuracy of the quantification is correct with results including between 100 and 103% according to the compound, except for 3-hydroxybenzo(a)pyrene (107%) and standard deviations comprised between 1 and 8% for three replicates (Table 6).

Derivatization with BSTFA allows the most reliable quantification of the studied metabolites. Variation coefficients of response factors towards 1-hydroxypyrene are similar in LC-ESI-MS and in GC/MS after derivatization with BSTFA. However, quantification tests with standard solutions give best results in GC/MS with derivatization than in LC-ESI-MS.

Conclusion

LC-ESI-MS negative and GC/MS without derivatization generally give the lowest detection limits for the studied compounds. However, 9-hydroxyfluorene is not detected in LC-EI-MS. In this way, a special run in positive polarity is needed for this compound. Nevertheless, its quantification with the chosen internal standard (1-hydroxypyrene-d9) is made impossible because of the non detection of this last one in positive polarity. In GC/MS, all the compounds can be detected in the same run, but with detection limits slightly higher than in LC/MS. Moreover, a derivatization step is

needed to obtain a reliable detection inducing a slight loss of sensibility. However, GC/MS with derivatization allows a largely better separation of isomers of hydroxyphenanthrenes and a more reliable quantification than LC-ESI-MS. Moreover, this last method provided an accurate quantification of the different compounds with results generally comprised between 100 and 103% of actual concentrations and standard deviations not exceeding 8%.

Considering these results, GC/MS after derivatization with BSTFA appears to be the best compromise for the quantification of the studied hydroxylated PAHs.

Acknowledgments – This research was supported in part by the Erika program (Monitoring of the ecological and ecotoxicological consequences of the Erika wreckage), the région Aquitaine, the Seine-Aval program and the BEEP (Biological Effects of Environmental Pollution in Marine Coastal Ecosystems) European project n°EVK3-CT2000-00543.

References

1. A.E. McElroy, J.W. Farrington, J.M. Teal, in U. Varanasi (Editor), *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1989, p. 1.
2. U. Varanasi, S.-L. Chan, W.D. MacLeod, J.E. Stein, D.W. Brown, D.G. Burrows, K.L. Tilbury, J.T. Landahl, C.A. Wigren, T. Hom, S.M. Pierce, NOAA Technical Memorandum NMFS F/NWC-191, US Department of Commerce, Seattle, WA, 1990.
3. S.J. McDonald, M.C. Kennicutt, H. Liu, S.H. Safe, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29 (1995) 232.
4. P. Baumard, H. Budzinski, P. Garrigues, J.C. Sorbe, T. Burgeot, J. Bellocq, *Mar. Pollut. Bull.* 36 (1998) 951.
5. H. Nakata, Y. Sakai, T. Miyawaki, A. Takemura, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 3513.

6. J.P. Meador, in P.E.T. Douben (Editor), PAHs: an Ecotoxicological Perspective. Wiley, England, 2003, p. 147.
7. IARC (International Agency for Research on Cancer). Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. IARC, Lyon, France, 1983.
8. R. Pahlman, O. Pelkonen, *Carcinogenesis* 8 (1987) 773.
9. S. De Flora, M. Bagnasco, P. Znacchi, *Mutat. Res.* 258 (1991) 285.
10. M.J. Moore, M.S. Myers, in D.C. Malins, G.K. Ostrander (Editors), *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 1994, p. 327.
11. IPCS (International Programme on Chemical Safety). *Environmental Health Criteria 202*. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1998.
12. National Toxicology Program. The 9th report on carcinogens. US Department of Health and Human Services, Public Health Service National Toxicology Program, Washington, DC, 1999.
13. L.L. Johnson, T.K. Collier, J.E. Stein, *Aquat. Conserv.: Mar. Freshw. Ecosyst.* 12 (2002) 517.
14. M.M. Krahn, M. Myers, D.G. Burrows, D.C. Malins, *Xenobiotica* 14 (1984) 633.
15. M.M. Krahn, L.D. Rhodes, M.S. Myers, L.K. Moore, W.D. MacLeod, D.C. Malins, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 15 (1986) 61.
16. F. Ariese, S.J. Kok, M. Verkaik, C. Gooijer, N.H. Velthorst, J.W. Hofstraat, *Aquat. Toxicol.* 26 (1993) 273.
17. E.L.C. Lin, S.M. Cormier, J.A. Torsella, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35 (1996) 16.
18. J. Beyer, M. Sandvik, K. Hylland, E. Fjeld, E. Egaas, E. Aas, J.U. Skåre, A. Goksøyr, *Aquat. Toxicol.* 36 (1996) 75.
19. U. Varanasi, J.E. Stein, M. Nishimoto, in U. Varanasi (Editor), *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1989, p. 93.

20. G.L. Foureman, in U. Varanasi (Editor), *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1989, p. 185.
21. A.R. Steward, C. Kandaswami, S. Chdambaram, C. Ziper, J.P. Rutkowski, H.C. Sikka, *Environ. Toxicol. Chem.* 9 (1990) 1503.
22. F.C. Law, J.X. Meng, Y.T. He, Y.C. Chui, *Xenobiotica* 24 (1994) 221.
23. J.D. Leonard, J. Hellou, *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (2001) 618.
24. R.F. Lee, R Sauerheber, GH Dobbs, *Mar. Biol.* 17 (1972) 201.
25. C.N. Statham, M.J. Melancon, J.J. Lech, *Science* 193 (1976) 680.
26. U. Varanasi, J.E. Stein, *Environ. Health Perspect.* 90 (1991) 93.
27. L.H. Keith, W.A. Telliard, *Environ. Sci. Technol.* 13 (1979) 416.

Solid phase extraction and purification for the quantification of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in biological fluids

Olivier Mazéas¹ and Hélène Budzinski^{1*}

¹Laboratoire de Physico- et Toxicochimie des Systèmes Naturels, UMR 5472 CNRS, Université Bordeaux I, 351, cours de la libération, 33405 Talence, France.

* Corresponding author

Email: h.budzinski@lptc.u-bordeaux1.fr

Phone : 33 (0)5 40 00 69 98

Fax: 33 (0)5 40 00 69 98

Abstract - An analytical protocol including solid phase extraction and purification is described for the individual quantification of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites (hydroxylated PAHs) in liquid biological matrices such as plasma and bile. The method consists in an enzymatic deconjugation followed by a solid-phase extraction on a C₁₈ cartridge and by a clean-up on a NH₂ cartridge. Extracts are then submitted to a derivatization step before GC/MS analysis. The quantification of PAH metabolites is ensured by adding an internal standard, 1-hydroxypyrene deuterated, at the beginning of the protocol.

Recoveries obtained for the entire protocol were for the major part of the compounds comprised between 96 and 70%. However, recoveries were not so satisfying concerning 2-hydroxybiphenyl and especially 3-hydroxybenzo(a)pyrene, with 62 and 36% respectively. Finally, the protocol was applied to different fish bile samples showing its good applicability to biological fluids. The NH₂ clean-up step has been proved to be a very selective purification step, necessary to remove most of the bile pigments before GC/MS injection. Different PAH metabolites could be detected in those natural samples and their quantification allowed to distinguish different levels of fish exposure.

Keywords : Hydroxylated PAHs, solid-phase extraction, purification, GC/MS, fish bile, metabolites.

Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous contaminants of the environment [1]. The quantification of PAHs in marine organism tissues is usually carried out to evaluate the impact of such a contamination on organisms. However, depending on the ability of organisms to metabolize PAHs, measurement of the bioaccumulated part of the absorbed PAHs can be restrictive and not representative of the contamination [2, 3, 4, 5, 6] due to their transformation into reactive intermediates. Toxicity of PAHs has been put in evidence in different studies concerning fish but also mice and human beings [7, 8, 9, 10, 11, 12, 13]. In this way, the study of PAH fate in marine organisms appears to be necessary in order to access to the bioavailability and the toxicity of those contaminants.

The concentration of PAH metabolites is usually determined semi-quantitatively as global fluorescent aromatic compound equivalents (FACs) [14, 15, 16, 17, 18]. This work presents a solid phase extraction (SPE)-based protocol for the quantitative determination of individual PAH metabolites in biological fluids. This protocol was finally applied to fish bile samples to evaluate the applicability of this method to natural samples. The studied metabolites, monohydroxylated PAHs, are known to be some of the major produced metabolites by fish, present in their free form or more commonly conjugated with glucuronide, sulfate, glutathione groups [19, 20, 21, 22, 23], and extensively excreted into the gall bladder [19, 21, 24, 25,26]. The following compounds were chosen because they are potential metabolites of priority PAHs listed by the US EPA (United-States Environmental Protection Agency) for their interest in environmental surveys [27] : 1- and 2-hydroxynaphthalene (1- and 2-OHN), 9-hydroxyfluorene (9-OHFe), 9-hydroxyphenanthrene (9-OHPhe), 1-hydroxypyrene (1-OHP), 1-hydroxychrysene (1-OHC) and 3-hydroxybenzo(a)pyrene (3-OHBaP) (Fig. 1). 2-hydroxybiphenyl (2-OHBi) was added to this study due to the abundance of biphenyl in the environment.

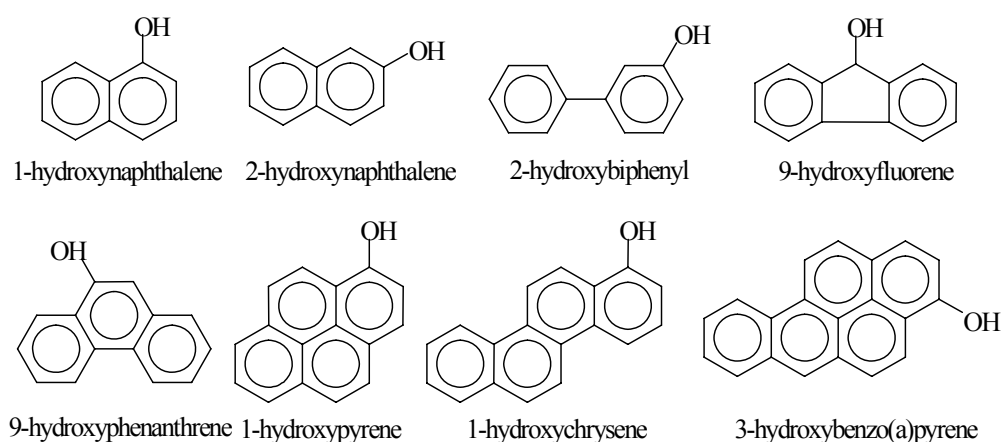


Figure 1 : The studied metabolites.

Material and Methods

Chemicals, solvents and reagents

1- and 2-hydroxynaphthalene were purchased from Lancaster (Bischheim, France), 2-hydroxybiphenyl, 9-hydroxyfluorene and 1-hydroxypyrene from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Falavier, France) and 9-hydroxyphenanthrene, 1-hydroxychrysene and 3-hydroxybenzo(a)pyrene from Promochem (Molsheim, France). 1-hydroxypyrene-d₉ and phenanthrene-d₁₀ were obtained from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA). Ultra Resi-Analysed methylene chloride (Mallinckrodt Baker) and Bakerbond C₁₈ cartridges (500 mg) were provided by Atlantic Labo (Eysines, France), methanol Suprasolv and acetic acid 100% Normapur by VWR (Strasbourg, France), Supelclean LC-NH₂ cartridges (500 mg), sodium acetate trihydrate 99% and β -glucuronidase - aryl-sulfatase mixture, 100000 et 7500 u/ml respectively, by Sigma-Aldrich (Saint Quentin Falavier, France) and water (sterilized water for injection) by laboratory Aguetant (Lyon, France). 2-mercaptoethanol and bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) was purchased from Acros organics (Noisy-Le-Grand, France).

Enzymatic deconjugation and C₁₈ solid phase extraction

In order to perform the recovery tests, spiked water was used to mimic natural liquid sample. To this purpose, a mixture of hydroxylated PAHs was prepared in methanol. Then a dilution was made in buffered water (acetate buffer, pH 5) to obtain spiked water samples. The internal standard (1-hydroxypyrene-d9), 20 μ l of 2-mercaptoethanol, used as an antioxidant, and 20 μ l of β -glucuronidase and aryl-sulfatase mixture were added to the water samples. They were then placed at 37°C in an oven for 20 h. 2-mercaptoethanol was added at the beginning of the protocol to avoid oxidation phenomena occurring otherwise. Glass vials were used for the deconjugation step to avoid adsorption phenomena on inner surfaces.

Spiked water samples were ultra-sonicated and centrifuged (5 min, 5000 rpm, 18°C) after deconjugation and BakerBond C₁₈ cartridges were preconditioned with 2 ml of methanol and 4 ml of water. The supernatants were loaded on cartridges and washed with 2 ml of water and 2 ml of a water/methanol mixture (70:30, v/v). Water traces were then removed by freeze-drying the cartridges. Freeze-drying was performed because of the possible loss of low molecular weight compounds when drying under nitrogen stream at room temperature. Metabolites were then eluted with 6 ml of methanol. Extracts were reduced to dryness under nitrogen stream and re-dissolved in methylene chloride for derivatization and direct injection or in methanol/methylene chloride (20:80, v/v) before NH₂ clean-up.

NH₂ clean-up

The tests were led with methanol spiked solutions prepared by dilution of the concentrated solution previously prepared. Supelclean LC-NH₂ cartridges were used for this purification step. The spiked methanol solutions were first diluted in methylene chloride in order to obtain 1 ml of solution (20:80, v/v). The internal standard and 40 μ l of 2-mercaptoethanol were then added. Before loading the samples, cartridges were first preconditioned with 3 ml of methanol/methylene chloride (20:80, v/v). The elution of the compounds was then performed with 6 ml of the same mixture.

Extracts were finally reduced to dryness under a nitrogen stream and re-dissolved in methylene chloride.

Derivatization

A derivatization step using BSTFA was required for a reliable detection by GC/MS [28]. To this purpose, solutions were kept 30 min in an oven at 65°C after adding 30 µl of BSTFA.

GC/MS analysis

After adding phenanthrene-d10, prepared in methylene chloride, for recovery control, analyses were performed by GC/MS, using an HP GC 6890A gas chromatograph Agilent Technologies coupled to an HP MSD 5973 Network mass selective detector Agilent Technologies both purchased from BIOS Analytique (l'Union, France), in selected ion monitoring (SIM) mode (automated PTV pulsed splitless injection (25 psi, 1.5 min); purge delay: 1.5 min and purge flow: 60 ml/min; injector temperature: 250°C; interface temperature: 280°C; oven temperature: from 70°C (2 min) to 180°C (1 min) at 5°C/min and from 180°C to 290°C (1 min) at 10°C/min; electron impact: 70 eV; voltage: 2000 V; source temperature: 150°C; 1.53 scan/s; dwell time: 50 ms for each ion). The capillary column was an HP5/MS Agilent Technologies (30 m, 0.25 mm; phase: 5% diphenyl-, 95% dimethyl-siloxane) obtained from BIOS Analytique (l'Union, France) and the carrier gas was helium 6.0 from Linde (Toulouse, France).

The compounds were quantified in SIM mode using the ions below : 1- hydroxynaphthalene (m/z=201), 2-hydroxynaphthalene (m/z=216), 2-hydroxybiphenyl (m/z=211), 9-hydroxyfluorene (m/z=165), 9-hydroxyphenanthrene (m/z=266), 1-hydroxypyrene (m/z=290), 1-hydroxychrysene (m/z=316) and 3-hydroxybenzo(a)pyrene (m/z=340) (Mazéas and Budzinski, submitted).

A mixture constituted of the standard metabolites, 1-hydroxypyrene-d9 and phenanthrene-d10 was injected, after derivatization, at the beginning and at the end of each analytical sequence for the

determination of response factors. A manipulation blank was performed together with samples for each manipulation series to control potential contamination. The glassware was washed with detergents and heated overnight at 450°C before use.

Natural samples

European flounders (*Platichthys flesus*) were collected in the Seine Bay (Channel Coast of France) in two locations. One of these locations is the mouth of the Seine Estuary and the other one is Antifer, located in the north of the Bay and carrying important petroleum activities. 4 and 10 flounders were respectively collected. Gall bladders were sampled and stored at -80°C.

Results and discussion

Deconjugation and C₁₈ solid phase extraction

Mean recoveries obtained for enzymatic deconjugation followed by C₁₈ solid phase extraction are indicated in Table 1. Recoveries range between 82 and 110% for the major part of the compounds. However, for the 2-hydroxybiphenyl and the 3-hydroxybenzo(a)pyrene, they are not so satisfying, showing values of 65% and 41% respectively. The recovery obtained for the internal standard, quantified in comparison to phenanthrene-d9 used as syringe standard, is 79 ± 5% (n=3). No increase of recoveries is observed by a simple water rinsing (removing methanol) or by using a higher volume of elution. Moreover, recoveries with and without deconjugation step are similar (Table 1), indicating that the deconjugation step does not induce any significant losses. Those results suggest that 2-hydroxybiphenyl and 3-hydroxybenzo(a)pyrene are partially eluted by water during the rinsing step or too strongly adsorbed on the C₁₈ phase to be eluted with the elution conditions that are used. Increasing the percentage of methanol over 30% during the washing step results in a better purification (removal of more polar compounds) but causes partial elution of the two hydroxynaphthalene isomers and of the 2-hydroxybiphenyl leading to lower recoveries.

The standard deviations obtained are in the range of 3-10% (n=3), except for 3-hydroxybenzo(a)pyrene (11%), showing the good reproducibility of the method.

Table 1 : Enzymatic deconjugation and C₁₈ solid phase extraction mean recoveries and standard deviations for three replicates.

Compounds	Recoveries with deconjugation (%)	Recoveries without deconjugation (%)
1-OHN	95 ± 10	93 ± 9
2-OHN	82 ± 9	84 ± 8
2-OHBi	65 ± 7	65 ± 8
9-OHFe	85 ± 6	87 ± 6
9-OHPhe	110 ± 8	109 ± 7
1-OHP	100 ± 3	100 ± 4
1-OHC	84 ± 8	83 ± 9
3-OHBaP	41 ± 11	43 ± 10

NH₂ clean-up

Mean recoveries obtained for the NH₂ clean-up step are summarized up in Table 2. Recoveries are comprised between 77 and 92%. 2-hydroxybiphenyl and 3-hydroxybenzo(a)pyrene do not exhibit lower recoveries than other compounds for this step. The recovery obtained for the internal standard is 90 ± 3% (n=3).

Standard deviations are in the range of 3-8% (n=3), which is overall slightly better than for the extraction step.

Table 2 : NH₂ purification mean recoveries and standard deviations for three replicates.

Compounds	Recoveries (%)
1-OHN	79 ± 7
2-OHN	77 ± 6
2-OHBi	81 ± 8
9-OHFe	80 ± 8
9-OHPhe	86 ± 4
1-OHP	92 ± 3
1-OHC	90 ± 4
3-OHBaP	85 ± 4

Combined protocol

Spiked waters are then used to test the entire protocol (Fig. 2). Mean recoveries are given in Table 3. They are usually greater than 70% except for 2-hydroxybiphenyl (62%) and 3-hydroxybenzo(a)pyrene (36%) as expected considering the extraction recoveries. The recovery of the internal standard is $74 \pm 4\%$ (n=3).

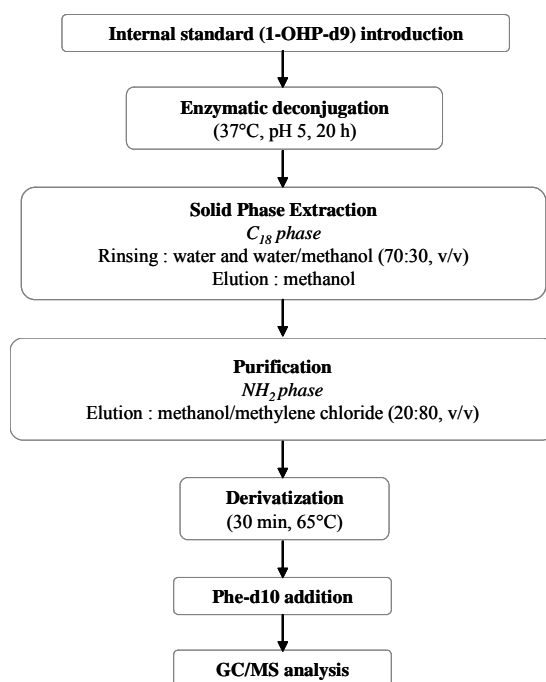


Figure 2 : The entire developed protocol.

Table 3 : Mean recoveries for the entire protocol and standard deviations for three replicates.

Compounds	Recoveries (%)
1-OHN	78 ± 7
2-OHN	70 ± 6
2-OHBi	62 ± 8
9-OHFe	74 ± 8
9-OHPhe	94 ± 4
1-OHP	96 ± 3
1-OHC	70 ± 4
3-OHBaP	36 ± 4

Considering standard deviations, values are in the range of 3-8% (n=3), showing the good reproducibility of the whole protocol. It can be noticed that 1-hydroxypyrene shows the lowest standard deviation of all the studied compounds, underlying the interest of using compounds with similar properties (such as deuterated homologues) for the most accurate quantification.

Fish bile

The entire protocol has then been applied to the bile of flounders collected from the Seine Bay. Bile samples are analyzed in triplicates of approximately 100 μ l. After the sample loading on the C₁₈ cartridge, the rinsing step with water and more particularly with water/methanol has shown the removal of matrix constituents, which has resulted in obtaining a clearer extract and a slower clogging of the GC/MS than with a lone water rinsing. However, the obtained extract has remained strongly concentrated in bile pigments. The NH₂ purification step with methanol/methylene chloride elution (20:80, v/v) has proven to be efficient, ensuring a strongly selective elution of the metabolites with retention of most of the bile pigments in the first millimeters of the phase.

After GC/MS analysis, different metabolites could be detected and quantified into the bile. Thus, 1- and 2-hydroxynaphthalene, 2-hydroxybiphenyl, 9-hydroxyfluorene and 1-hydroxypyrene have been identified as shown in the chromatogram presented in Figure 3. 9-hydroxyphenanthrene has not been detected but three other isomers (1-, 2- and 3-hydroxyphenanthrene) could be quantified. Their identification has been described in a previous study (Mazéas and Budzinski, submitted). 1-hydroxychrysene and 3-hydroxybenzo(a)pyrene have not been detected in any sample either. The average concentrations, standard deviations and coefficients of variation obtained for the two samples are presented in Table 4. The average recovery for 1-hydroxypyrene-d₉ ($76 \pm 5\%$) is not significantly different from the results obtained with spiked water ($74 \pm 4\%$). The obtained results indicate that the variations of concentration are correct, generally comprised between 3 and 14%. The different levels of PAH metabolite concentrations also suggest a stronger exposure of

flounders from the Seine mouth (La Fosse) to PAHs (global concentration of $3432 \pm 149 \text{ ng g}^{-1}$) than flounders from Antifer (global concentration of $545 \pm 33 \text{ ng g}^{-1}$).

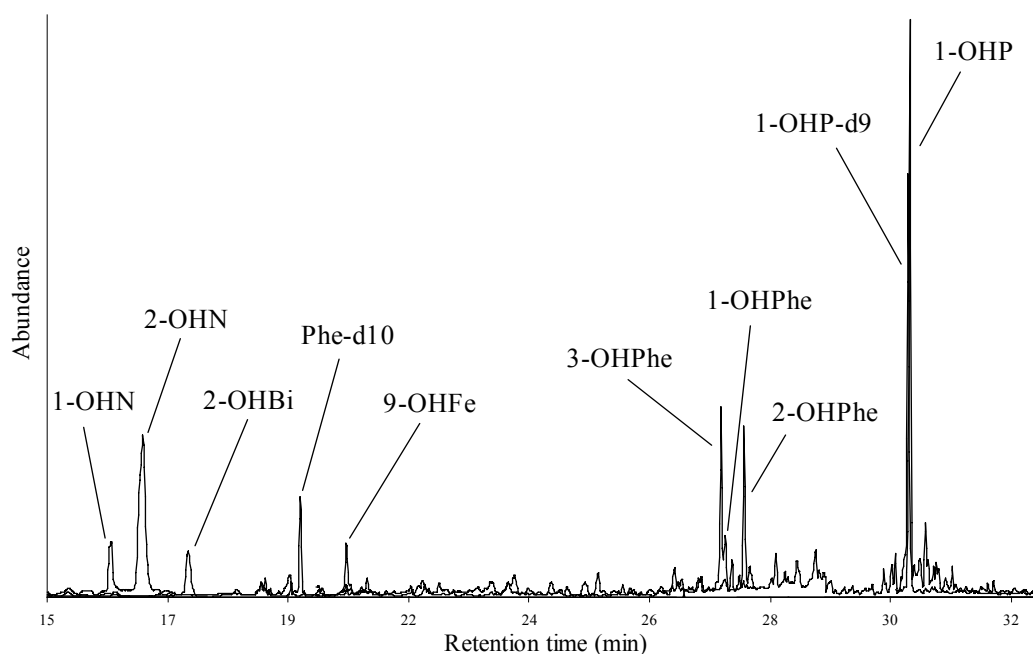


Figure 3 : Obtained chromatogram for a fish bile sample by GC/MS in SIM mode.

Table 4 : Mean concentrations (Conc.) of the different metabolites detected in the bile of European flounders collected from two locations of the Seine Bay (Antifer and La Fosse) for three replicates, standard deviation (S.D.) and coefficients of variation (C.V.).

Compounds	Antifer			La Fosse		
	Conc.	S.D.	C.V.	Conc.	S.D.	C.V.
1-OHN	11	1	8	28	4	13
2-OHN	94	10	10	214	16	7
2-OHBi	29	5	16	74	10	14
9-OHFe	54	5	10	169	24	14
3-OHPhe	20	2	8	48	4	7
1-OHPhe	8	1	8	35	4	12
2-OHPhe	29	3	9	82	6	7
1-OHP	299	16	5	2782	84	3
Sum	545	33	5	3432	149	4

Conclusion

The protocol presented in this study allows the individual quantification of hydroxylated PAHs in liquid matrices such as bile or plasma by GC/MS analysis after deconjugation, extraction and purification steps. Recoveries for the whole protocol are generally greater than 70% with standard deviations lower than 10% (n=3). However, due to the extraction step, 2-hydroxybiphenyl and particularly 3-hydroxybenzo(a)pyrene recoveries are not so satisfying. Conversely, the NH₂ clean-up step has been proved to be essential to remove bile pigments before GC/MS injection. The application of the protocol to bile samples from European flounders collected from the Seine Bay has shown its applicability to biological fluids, allowing a good quantification of the metabolites with a correct reproducibility.

Acknowledgments – This research was supported in part by the Erika program (Monitoring of the ecological and ecotoxicological consequences of the Erika wreckage), the région Aquitaine, the Seine-Aval program and the BEEP (Biological Effects of Environmental Pollution in Marine Coastal Ecosystems) European project n°EVK3-CT2000-00543.

References

1. McElroy AE, Farrington JW, Teal JM (1989) Varanasi U (ed) Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. CRC Press, Boca Raton, FL, 1-40
2. Varanasi U, Chan S-L, MacLeod WD, Stein JE, Brown DW, Burrows DG, Tilbury KL, Landahl JT, Wigren CA, Hom T, Pierce SM (1990) NOAA Technical Memorandum NMFS F/NWC-191. US Department of Commerce, Seattle, WA
3. McDonald SJ, Kennicutt MC, Liu H, Safe SH (1995) Arch Environ Contam Toxicol 29:232-240

4. Baumard P, Budzinski H, Garrigues P, Sorbe JC, Burgeot T, Bellocq J (1998) *Mar Pollut Bull* 36:951-960
5. Nakata H, Sakai Y, Miyawaki T, Takemura A (2003) *Environ Sci Technol* 37:3513-3521
6. Meador JP (2003) Douben PET (ed) PAHs: an ecotoxicological perspective. Wiley, England, 147-172
7. IARC (International Agency for Research on Cancer) (1983) Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. IARC, Lyon, France
8. Pahlman R, Pelkonen O (1987) *Carcinogenesis* 8:773-778
9. De Flora S, Bagnasco M, Zanacchi P (1991) *Mutat Res* 258:285-320
10. Moore MJ, Myers MS (1994) Malins DC, Ostrander GK (eds) *Aquatic toxicology: molecular, biochemical, and cellular perspectives*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 327-386
11. IPCS (1998) Environmental Health Criteria 202. International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, Switzerland
12. National Toxicology Program (1999) The 9th report on carcinogens. US Department of Health and Human Services, Public Health Service National Toxicology Program, Washington, DC
13. Johnson LL, Collier TK, Stein JE (2002) *Aquat Conserv: Mar Freshw Ecosyst* 12:517-538
14. Krahn MM, Myers M, Burrows DG, Malins DC (1984) *Xenobiotica* 14:633-646
15. Krahn MM, Rhodes LD, Myers MS, Moore LK, MacLeod WD, Malins DC (1986) *Arch Environ Contam Toxicol* 15:61-67
16. Ariese F, Kok SJ, Verkaik M, Gooijer C, Velthorst NH, Hofstraat JW (1993) *Aquat Toxicol* 26:273-286
17. Lin ELC, Cormier SM, Torsella JA (1996) *Ecotoxicol Environ Saf* 35:16-23
18. Beyer J, Sandvik M, Hylland K, Fjeld E, Egaas E, Aas E, Skåre JU, Goksøyr A (1996) *Aquat Toxicol* 36:75-98
19. Varanasi U, Stein JE, Nishimoto M (1989) Varanasi U (ed) *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*. CRC Press, Boca Raton, FL, 93-149

20. Foureman GL (1989) Varanasi U (ed) Metabolism of PAH in the aquatic environment. CRC Press, Boca Raton, FL, 185-202
21. Steward AR, Kandaswami C, Chdambaram S, Ziper C, Rutkowski JP, Sikka HC (1990) Environ Toxicol Chem 9:1503-1512
22. Law FC, Meng JX, He YT, Chui YC (1994) Xenobiotica 24:221-229
23. Leonard JD, Hellou J (2001) Environ Toxicol Chem 20:618-623
24. Lee RF, Sauerheber R, Dobbs GH (1972) Mar Biol 17:201-208
25. Statham CN, Melancon MJ, Lech JJ (1976) Science 193:680-681
26. Varanasi U, Stein JE (1991) Environ Health Perspect 90:93-100
27. Keith LH, Telliard WA (1979) Environ Sci Technol 13:416-423
28. Mazéas O, Budzinski H (submitted for publication) J Chromatogr A

Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by flat fish in waterborne laboratory exposures to individual polycyclic aromatic hydrocarbons

Olivier Mazéas^{1,3}, Hélène Budzinski*¹, Guy Claireaux², Jacek Tronczynsky³

¹ Laboratoire de Physico- et Toxicochimie des Systèmes Naturels, UMR 5472 CNRS, Université Bordeaux 1, 351 cours de la libération, 33405 Talence, France

² Centre de Recherche sur les Écosystèmes Marins et Aquacoles (CNRS-IFREMER), 17137 L'Houmeau, France

³ IFREMER, Département des Polluants Chimiques, Rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes cedex 03, France

* Corresponding author

Email: h.budzinski@lptc.u-bordeaux1.fr

Phone : 33 (0)5 40 00 69 98

Fax: 33 (0)5 40 00 69 98

Abstract - Waterborne exposures of soles (*Solea solea*) to individual PAHs, i. e. phenanthrene, fluoranthene, pyrene and benzo(a)pyrene, have been carried out in controlled experiments in order to have a better understanding of the PAH fate in the marine environment and especially of their biotransformation by fish.

The absence of PAH accumulation in sediments and particulate matter but also in fish tissues has first been observed. The efficiency of waterborne PAH biotransformation by soles and the important excretion of the produced metabolites in the gall bladder has been demonstrated by the measurement of high concentrations of monohydroxylated metabolites in the bile of soles by GC/MS. However, no benzo(a)pyrene metabolites could be detected. Moreover, a single monohydroxylated metabolite of pyrene, 1-hydroxypyrene, has been identified into the bile after enzymatic deconjugation. On the other hand, two monohydroxylated metabolites of fluoranthene and five metabolites of phenanthrene have been detected. Evolution differences of metabolite concentrations were also noticed between PAHs.

Keywords : PAH metabolites, GC/MS, Laboratory exposure, Fish

INTRODUCTION

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous contaminants of the environment (McElroy et al., 1989). The marine compartment appears to be an endpoint of those chemicals by the way of terrestrial runoffs, atmospheric deposition and petroleum releases (Neff, 1979; Latimer and Zheng, 2003). To assess the significance of such a contamination on organisms, the quantification of bioaccumulated PAHs in tissues is usually carried out. However, depending on the ability of organisms to metabolize PAHs, measurement of the bioaccumulated part of the absorbed PAHs can be restrictive and not representative of the environmental contamination (Meador, 2003). Moreover, PAHs can be extensively metabolized into more toxic molecules than parent ones (Varanasi et al., 1989). In this way, the study of PAH fate in marine organisms appears to be necessary in order to assess bioavailability and toxicity of those contaminants. Moreover, biliary metabolites of PAHs have been shown to be particularly efficient biomarkers of PAH contamination in the environment (van der Oost et al., 2003).

In order to have a better understanding of the PAH fate in the marine environment and especially of their biotransformation by fish, waterborne exposures of soles (*Solea solea*) to several individual PAHs have been carried out in controlled experiments. PAH concentrations have been monitored in the abiotic compartment (water, sediments) and in biological tissues. Furthermore, transformation products of PAHs have been quantified in the gall bladder. The concentration of PAH metabolites is usually determined semi-quantitatively as global fluorescent aromatic compound equivalents (FACs) in the bile (Krahn et al., 1984 and 1986; Ariese et al., 1993; Lin et al., 1996; Beyer et al., 1996). The present work consists more precisely in the application of an analytical protocol previously described (Mazéas and Budzinski, submitted) in order to quantify monohydroxylated PAHs quantitatively in fish bile. Those compounds are known to be some of the major produced molecules, present in their free form or conjugated by glucuronide or sulfate groups (Varanasi et al., 1989; Foureman, 1989; Steward et al., 1990; Law et al., 1994; Leonard and Hellou,

2001; Luthe et al., 2002). The four studied PAHs, phenanthrene, fluoranthene, pyrene and benzo(a)pyrene, have been chosen for different reasons. Firstly, they are part of the 16 priority PAHs listed by the US-EPA (United-States Environmental Protection Agency) for their interest in environmental surveys (Keith and Telliard, 1979). Secondly, benzo(a)pyrene has been chosen because of its high toxicity (IARC, 1987; Nisbet and Lagoy, 1992; IPCS, 1998), phenanthrene, fluoranthene and pyrene for their high ubiquity in the different compartments of the marine environment. The choice of fluoranthene and pyrene was also motivated by the interest of studying the biotransformation of two PAH isomers.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals, solvents and reagents

Phenanthrene, fluoranthene, pyrene and benzo(a)pyrene were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Falavier, France). Concerning hydroxylated PAHs, 1-, 2-, 3-, 4-, 9-hydroxyphenanthrenes and 3-hydroxybenzo(a)pyrene were provided by Promochem (Molsheim, France) and 1-hydroxypyrene by Sigma-Aldrich (Saint Quentin Falavier, France). 1-hydroxypyrene-d₉ and phenanthrene-d₁₀ were purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA).

Various solvents were used. Ultra Resi-Analysed methylene chloride (Mallinckrodt Baker) was purchased from Atlantic Labo (Eysines, France), Multisolvent ethyl acetate and ethanol (Scharlau) were provided by ICS Nationale (Belin Beliet, France) and sterilized water for injection was purchased from laboratory Aguetant (Lyon, France).

2-mercaptoethanol and bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) were provided by Acros organics (Noisy-Le-Grand, France). Sodium acetate trihydrate 99%, β -glucuronidase - aryl-sulfatase mixture, 100000 et 7500 u/ml respectively, sodium sulphate and Supelclean LC-NH₂ cartridges were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Falavier, France). Bakerbond C₁₈

cartridges were purchased from Atlantic Labo (Eysines, France) and acetic acid 100% Normapur, aluminium oxide (150 basic type T; 0.063-0.2 mm) and silica gel 60 (0.063-0.2 mm) were provided by VWR (Strasbourg, France).

Fish

Soles (*Solea solea*) were trawled in the Bay of Biscay (Pertuis Breton location), off Ré Island, in September 2002. Fish were kept for 4 weeks in large tanks for acclimatization with flow-through seawater pumped from the surrounding marsh before starting the experiments. The water of the marsh is renewed at each tide.

Experimental design and sample collection

Five tanks, located outdoors and covered with a polyethylene film, were filled with 100 l of seawater pumped from the surrounding marsh after covering the bottom of tanks with sand. Tanks were put in closed circuit and the water was oxygenated continuously during the whole experiment. 11 soles (23.2±2.0 cm) were then placed in each tank. A first tank was used as a control. In the four other tanks, a single dose of 100 µg of compound (phenanthrene, fluoranthene, pyrene or benzo(a)pyrene) dissolved in 1 ml of ethanol was added in water to obtain a theoretical concentration of 1 µg/l.

The contamination period lasted 7 days followed by a decontamination period of 7 other days in clean tanks supplied with open circuit seawater. Water temperature varied from 10 to 15°C and salinity from 33.4 to 35.0‰ during the experiment. Fish were not fed during the exposure.

At several times during the experiment, different type of samples (water, sediment, liver, muscle, gall bladder) were collected. 100 ml of water was sampled twice in individual contamination tanks for PAH quantification in duplicate and 500 ml for the control tank. Sediment, liver and muscle were sampled and stored at -20°C for PAH accumulation monitoring, and bile at -

80°C for PAH biotransformation monitoring. Biological matrices were pooled before performing analysis.

The initial state (T0) was characterized in the control tank just before the beginning of the contaminations. Samples were then taken following the sampling framework presented in Table 1 two hours (2H), 3 days (D3) and 7 days (D7) after the beginning of the contamination and after 7 days of decontamination (Dd). Concerning fish, 3 mature individuals were theoretically sampled at each time except for the decontamination one where only 2 individuals were taken. However, because of a few deaths, this number of fish could not be respected for all the exposures and is specified in Table 1.

Table 1 : Sampling framework. The number of fish sampled at each sampling time is indicated between brackets.

Tank exposure	Sampling time		
	Water	Sediment	Gall bladder, liver, muscle
Control	T0, H2, D3, D7	T0, D1, D3, D7	T0 (3), D1 (3), D3 (3), D7 (3), Dd (1)
Phenanthrene	H2, D3, D7	D1, D3, D7	D1 (3), D3 (3), D7 (1), Dd (1)
Fluoranthene	H2, D3, D7	D1, D3, D7	D1 (3), D3 (2), D7 (2), Dd (2)
Pyrene	H2, D3, D7	D1, D3, D7	D1 (3), D3 (3), D7 (2), Dd (2)
Benzo(a)pyrene	H2, D3, D7	D1, D3, D7	D1 (3), D3 (3), D7 (3), Dd (2)

PAH analysis

For the determination of PAHs in the aqueous phase, water was first passed through a 0.7 µm GFF filter (VWR, Strasbourg, France) to separate dissolved PAHs from PAHs adsorbed on particulate matter. Dissolved PAHs were extracted by passing water samples through an octadecyl

speedisk (Baker, Atlantic Labo, Eysines, France) on which PAHs are retained. Analytes were then recovered by successive elutions with methylene chloride and methylene chloride/ethyl acetate (1:1, v/v). Water traces were then removed by passing the extract through sodium sulphate.

PAHs were extracted from freeze-dried and grounded solid matrices (sediment, particulates, liver, muscle) by micro-wave assisted extraction (10 min, 30 W) with methylene chloride followed by filtration on clean glass cotton (Budzinski et al., 1999).

Perdeuterated PAHs used as internal standards were added to the samples prior to the extraction step for PAH quantification (Baumard and Budzinski, 1997).

Extracts of the different matrices were then purified on aluminium oxide (Al_2O_3) and silica (SiO_2) columns (Baumard et al., 1997; Mazéas and Budzinski, 2002) and analysed by GC/MS. In the case of sediments and particulate matter, activated copper was added to the aluminium oxide columns in order to remove sulphur from the extracts.

The glassware was washed with detergents and heated overnight at 450°C before use. Manipulation blanks were performed together with samples for each manipulation series to control potential contamination.

Extracts were analysed by an HP GC 6890A gas chromatograph Agilent Technologies (automated PTV pulsed splitless injection (25 psi, 1 min); purge delay: 1 min and purge flow: 60.6 ml/min; injector temperature: 270°C; interface temperature: 280°C; oven temperature: from 70°C (2 min) to 300°C (5 min) at 2°C/min) coupled to an HP MSD 5973 mass spectrometer (electron impact: 70 eV; voltage: 2000 V; source temperature: 150°C) both purchased from BIOS Analytique (l'Union, France). Analyses were performed in the SIM (selected ion monitoring) mode at 1.3 scan/s (Dwell time: 50 ms for each ion) using the molecular ions of the studied compounds. The capillary column was an HP5/MS Agilent Technologies (30 m x 0.25 mm ID x 0.25 film thickness) provided by BIOS Analytique (l'Union, France) and the carrier gas was helium 6.0 obtained from Linde (Toulouse, France).

Different perdeuterated polycyclic aromatic hydrocarbons were used as internal standards for each class of aromaticity (Baumard and Budzinski, 1997). The response factors of PAHs relatively to perdeuterated PAHs were determined for each GC/MS sequence by injecting a mixture containing a solution of PAHs (SRM 2260, National Institute of Science and Technology, Gaithersburg, MD, USA) and the solution of perdeuterated PAHs used for spiking samples.

Metabolite analysis

The protocol used for the determination of biliary metabolite concentrations has already been described in another study (Mazéas and Budzinski, submitted).

Samples were first treated with 20 μ l of β -glucuronidase - aryl-sulfatase mixture (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Falavier, France), 100000 et 7500 u/ml respectively, for enzymatic deconjugation. To this purpose, samples were buffered to pH 5 (acetate buffer constituted of sodium acetate and acetic acid in water) and 20 μ l of 2-mercaptoethanol, used as an antioxidant, and the internal standard (1-hydroxypyrene-d9) were subsequently added to the samples. They were then placed in an oven at 37°C during 20 h.

After ultra-sonication and centrifugation (5 min, 5000 rpm, 18°C), supernatants were loaded on C₁₈ cartridges previously preconditioned with 2 ml of methanol and 4 ml of water. Cartridges were washed with 2 ml of water and 2 ml water/methanol (70:30, v/v). Water traces were then removed by freeze-drying the cartridges. Freeze-drying was performed because of the possible loss of low molecular weight compounds during nitrogen stream drying at room temperature. Metabolites were then eluted with 6 ml of methanol. Extracts were evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream and re-dissolved in methylene chloride.

NH₂ cartridges were then used for purification. Before loading the sample, the cartridge was first preconditioned with 3 ml methanol/methylene chloride (20:80, v/v). The selective elution of

metabolites was obtained using 6 ml of the mixture of solvents previously used. The final extract was evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream and re-dissolved in methylene chloride.

After derivatization with BSTFA (30 min, 65°C), phenanthrene perdeuterated was added to the samples to check for 1-hydroxypyrene-d9 recovery and analyses were performed by the same type of GC/MS as reported for PAH analysis. However, the GC/MS conditions were different from PAH analysis (automated PTV pulsed splitless injection (25 psi, 1,5 min); purge delay: 1.5 min and purge flow: 60 ml/min; injector temperature: 250°C; interface temperature: 280°C; oven temperature: from 70°C (2 min) to 180°C (1 min) at 5°C/min and from 180°C to 290°C (1 min) at 10°C/min; electron impact: 70 eV; voltage: 2000 V; source temperature: 150°C; 1.53 scan/s; dwell time: 50 ms for each ion). The compounds were quantified in SIM mode using the ions below : hydroxyphenanthrenes ($m/z=266$), 1-hydroxypyrene and hydroxyfluoranthenes ($m/z=290$) and 3-hydroxybenzo(a)pyrene ($m/z=340$).

A mixture constituted of standard metabolites and 1-hydroxypyrene-d9 was injected at the beginning and at the end of each GC/MS sequence for response factor determination and a manipulation blank was performed together with samples to control potential contamination.

RESULTS AND DISCUSSION

PAH exposure in the medium

Two hours after the T0 contamination, actual PAH concentrations measured in the dissolved phase are largely less important than the theoretical nominal levels ($1 \mu\text{g l}^{-1}$). This difference is particularly important for high molecular weight compounds such as benzo(a)pyrene ($66 \pm 1 \text{ ng l}^{-1}$). Phenanthrene, the lower molecular weight compound studied, is the most abundant PAH in the dissolved phase with a concentration representing the half of the theoretical nominal level ($502 \pm 35 \text{ ng l}^{-1}$). Fluoranthene and pyrene concentrations are very similar, which is in good agreement with

their close physicochemical properties ($350 \pm 2 \text{ ng l}^{-1}$ and $367 \pm 14 \text{ ng l}^{-1}$ respectively). Taking into account the fact that no increase of PAH concentrations is observed in particulate matter and sediment at this time, the low concentrations observed in the dissolved phase could be attributed to adsorption on the basin surface, to photochemical degradation or, to a smaller extent, to fish absorption. This result underlies the importance of leading actual measures of contamination in microcosm or mesocosm experiments. A large decrease of dissolved PAH concentrations is observed after 3 days (Fig. 1) but they are still higher than the levels measured in the control tank (Table 2). This important decrease could also be attributed to the same phenomena as the ones cited above because of the unexpected non-adsorption of pyrene on particulates and sediment during the whole experiment. After 7 days, dissolved PAH concentrations are still higher than the ones measured in the control tank, except for benzo(a)pyrene, which is not detected anymore. From D3 to D7, a small increase of dissolved phenanthrene is observed in the corresponding tank while the fluoranthene concentration seems to be stable and a decrease of dissolved pyrene is observed (from 9.60 to 5.15 ng l^{-1}).

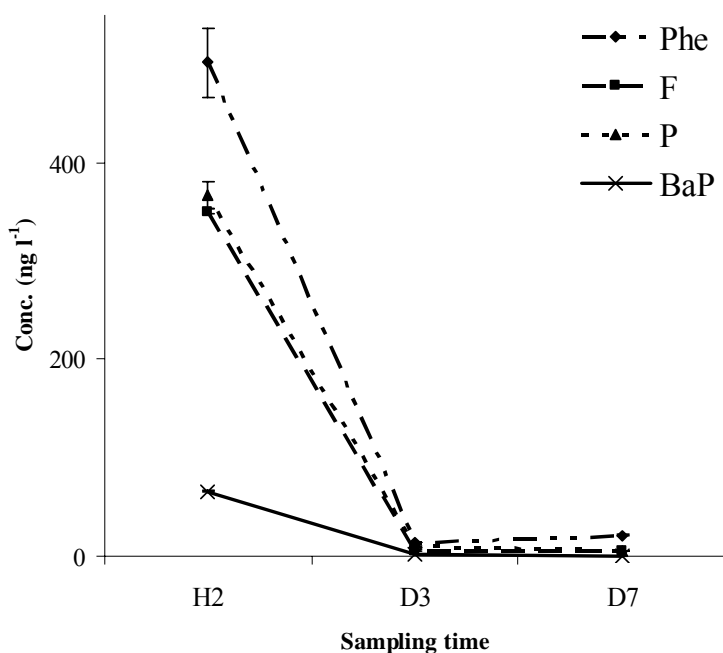


Figure 1 : PAH concentration in the dissolved phase of the four PAH exposure tanks 2 hours (H2), 3 days (D3) and 7 days (D7) after the initial contamination (n=2).

Table 2 : PAH concentrations in the dissolved phase (ng l^{-1}) for the different exposures ($n=2$).
^aConcentrations of the different compounds in the control tank before the contamination (T0) and 7 days after the initial contamination (D7). ^bIndividual concentrations of the compounds added in their respective tanks 2 hours, 3 days and 7 days after the initial contamination. Phe : phenanthrene, F : fluoranthene, P : pyrene, BaP : benzo(a)pyrene.

	Phe	F	P	BaP
Ctrl T0 ^a	$3.33 \pm 0,11$	$1.01 \pm 0,06$	$0.55 \pm 0,03$	<1
Ctrl D7 ^a	4.15 ± 0.13	0.96 ± 0.13	0.72 ± 0.05	<1
H2 ^b	501.58 ± 34.93	350.20 ± 2.04	366.94 ± 13.53	65.81 ± 0.51
D3 ^b	14.35 ± 0.04	5.83 ± 0.40	9.60 ± 0.94	2.27 ± 0.13
D7 ^b	21.18 ± 0.42	5.61 ± 0.22	5.15 ± 0.61	<1

PAH fate in organisms

Firstly, no increase of PAH bioaccumulation is observed in the liver and muscle from exposed fish compared to control ones. Furthermore, a strong increase of metabolite concentrations is measured in the bile of exposed fish after no more than one day of exposure (the first sampling time), except for benzo(a)pyrene metabolites. The lack of benzo(a)pyrene metabolites in the bile all along the experiment can partly be explained by the low exposure of fish to benzo(a)pyrene relatively to other PAHs (Fig. 1). However, the low recovery of 3-hydroxybenzo(a)pyrene obtained with this analytical protocol (36%; Mazéas and Budzinski, submitted) and its relatively high detection limit can also contribute to this lack of detection ($<50 \text{ ng g}^{-1}$ in the bile).

Concerning soles exposed to other PAHs, a single metabolite, 1-hydroxypyrene, is detected in the bile of fish exposed to pyrene after deconjugation, two hydroxylated compounds are detected for the fluoranthene exposure and five for the phenanthrene one. 1-hydroxypyrene was also identified as the single metabolite in the bile after deconjugation in a previous work concerning *Platyichthys flesus* (Luthe et al., 2002). The two isomers of fluoranthene metabolites cannot be

identified because of the lack of standards. The five possible isomers of hydroxyphenanthrenes (1-, 2-, 3-, 4- and 9-) are detected into the bile. However, the isomers 2 and 3 are largely predominant, followed by the isomer 1. Besides, the 4- and 9-hydroxyphenanthrenes are only present at low concentrations. The identification of the isomers is shown in Figure 2. This isomer pattern can explain the non-detection of phenanthrene metabolites observed in studies where the single 9-hydroxyphenanthrene was monitored (Escartín et Porte, 1999a and b). Previous laboratory studies also indicated the predominance of the isomers 1, 2 and 3 in the bile of various fish species, followed by the isomers 4 and 9 (Solbakken et al., 1980; Solbakken et Palmork, 1981; Goksøyr et al., 1986). However, in these studies, 1-hydroxyphenanthrene was generally the main hydroxylated compound into the bile meanwhile 3-hydroxyphenanthrene is the main isomer in the present case. Leonard and Hellou (2001) reported the detection of two hydroxyphenanthrenes into the bile of speckled trouts exposed to phenanthrene orally, which one of them was identified as the isomer 1.

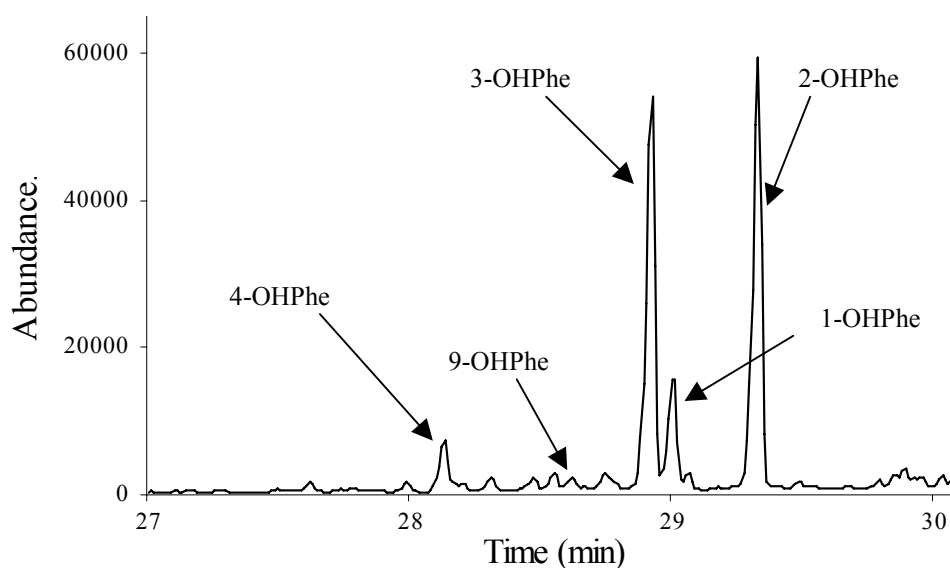


Figure 2 : Identification of the five isomers of hydroxyphenanthrene in the bile of soles exposed to phenanthrene.

Furthermore, the evolution of metabolite concentrations along the experiment is different for each exposure. In the case of pyrene exposure, 1-hydroxypyrene concentration increases rapidly the first day and then more slowly until day 3 to reach what seems to be a kind of plateau (Fig. 3 and

Table 3). This result can be correlated with the concentration of dissolved pyrene measured in water showing a large decrease at day 3. Thus, as soles are not fed during the experiment, bile is not efficiently excreted from the gall bladder, inducing the accumulation of metabolites. After the decontamination period, a significant decrease is measured (from 13765 ± 41 to 8643 ng g^{-1}) but the concentration does not come back to the control level ($321 \pm 11 \text{ ng g}^{-1}$). This result seems to demonstrate the partial excretion of the bile even when fish are not fed.

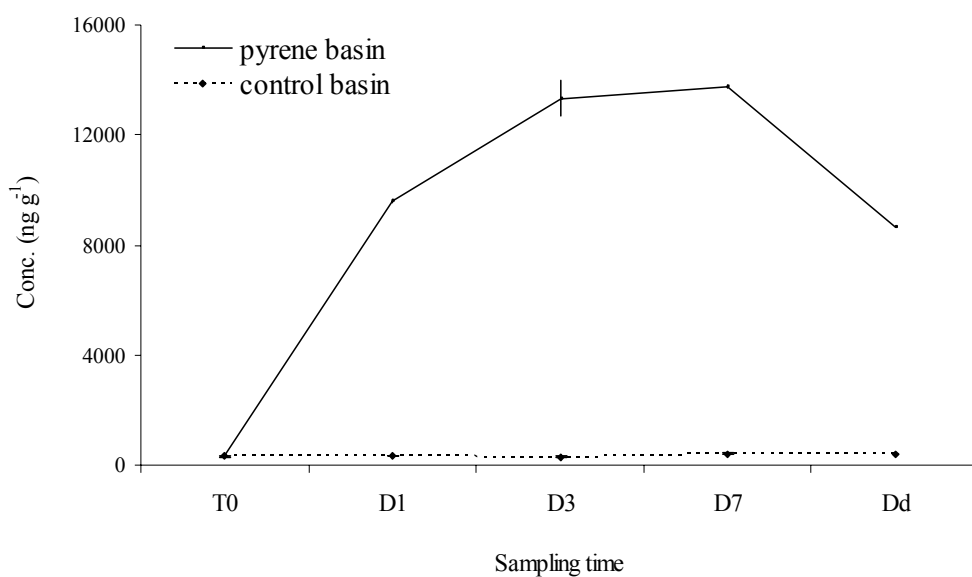


Figure 3 : Evolution of 1-hydroxypyrene concentration in the bile of soles from the control tank and from the pyrene exposure during the experiment.

Concerning the fluoranthene exposure, a strong increase of the two detected metabolites is observed during the first day, followed by a slower one until day 3 (Fig. 4 and Table 3). Nevertheless, the measured concentrations are lower than the ones measured for 1-hydroxypyrene (1893 ng g^{-1} for the sum of fluoranthene metabolites and 9613 ng g^{-1} for 1-hydroxypyrene at day 1 for example) despite the similar exposure concentrations measured in the dissolved phase. Moreover, in contrast to pyrene, a decrease of the metabolite concentrations is then observed at day 7, followed by a weak decrease during the decontamination period. This decrease can be explained by a dominant elimination process of the bile in the intestine relatively to metabolite production or metabolite excretion into the gall bladder. This explanation is supported by the largely lower

concentrations of fluoranthene metabolites measured in the bile compared to pyrene ones (maximum of 2783 ng g⁻¹ for the sum of fluoranthene metabolites and 13765 ng g⁻¹ for 1-hydroxypyrene).

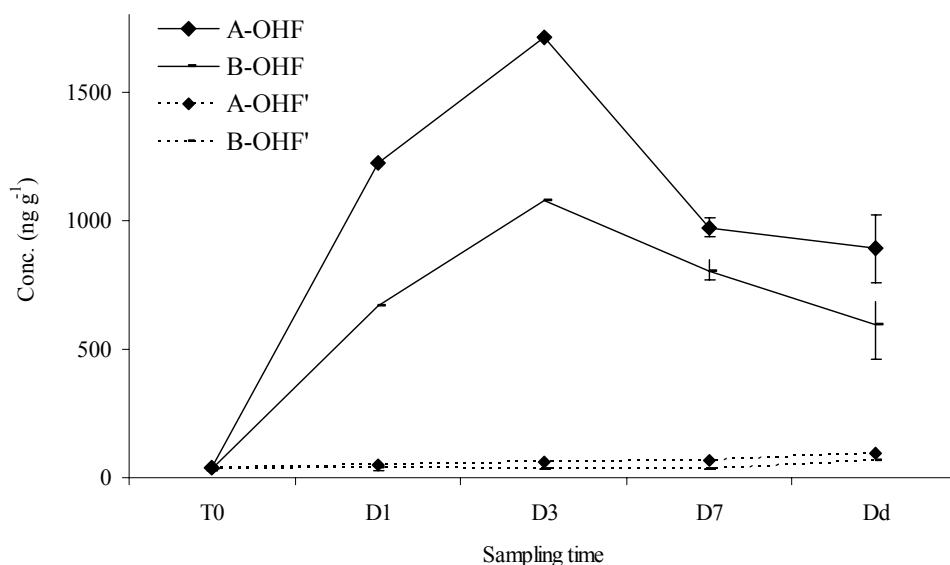


Figure 4 : Evolution of the two hydroxyfluoranthenes concentrations in the bile of soles from the control tank (OHF') and from the fluoranthene exposure (OHF) during the experiment.

Conversely, during the phenanthrene exposure, the metabolite concentrations globally increase all along the experiment conversely to 1-hydroxypyrene and, surprisingly, even during the decontamination period (Fig. 5 and Table 3). Only the isomer 4 concentration is decreasing after the decontamination period. This increase of metabolite concentrations during the decontamination period is difficult to explain. However, this phenomenon is also observed in the bile of soles from the other tanks where phenanthrene metabolite concentrations are increasing significantly, although to a largely smaller extent, after the decontamination period. This increase is thus not due to the occurrence of an exceptional event in the phenanthrene exposure tank. On the other hand, an episode of important precipitations occurred during the decontamination period realized in open circuit. This event could have caused the enrichment of phenanthrene in the water by runoff because of its higher dissolution in water compared to the higher molecular weight compounds studied. This hypothesis is supported by the measurement of an increase of metabolite concentrations of other

low molecular weight PAHs such as naphthalene at the end of the decontamination period. It can be noticed that, in spite of a higher level of exposure in the dissolved phase in the phenanthrene tank than in the pyrene one, metabolite concentrations are much higher in the bile of soles exposed to this last compound (9613 ng g⁻¹ for 1-hydroxypyrene and 980 ng g⁻¹ for the sum of hydroxyphenanthrenes at T1). This observation suggests that phenanthrene (and fluoranthene) could be metabolized in other types of metabolites such as dihydrodiols or diol-epoxides. The presence of dihydrodiols in the bile of fish exposed to phenanthrene has already been observed (Solbakken et al., 1980; Solbakken et Palmork, 1981; Goksøyr et al., 1986; Pangrekar et al., 2003).

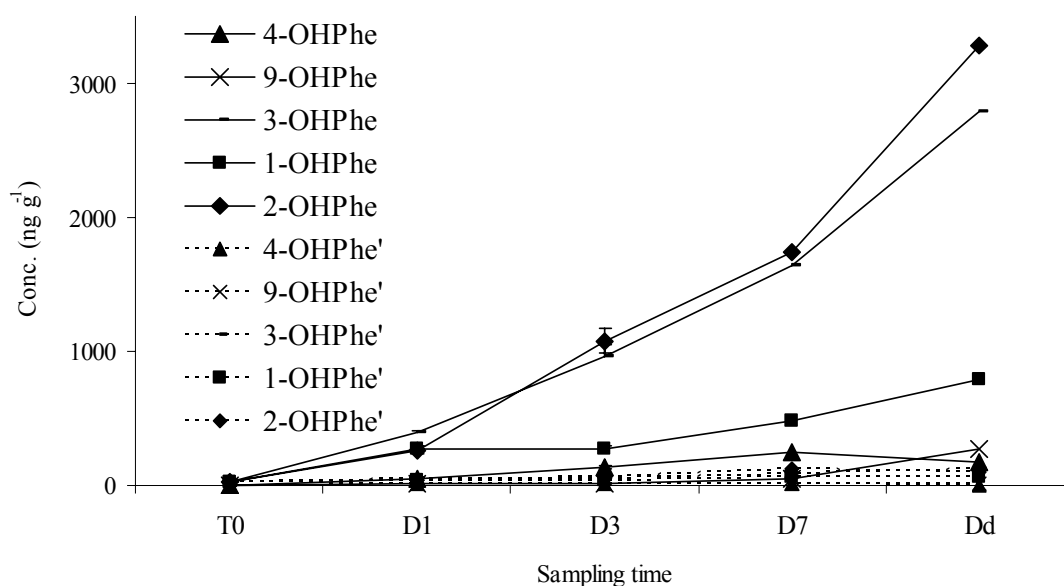


Figure 5 : Evolution of the different hydroxyphenanthrenes concentrations in the bile of soles from the control tank (OHPhe') and from the phenanthrene exposure (OHPhe) during the experiment.

Furthermore, the increase of the different metabolites can be compared. 1-hydroxypyrene and hydroxyfluoranthene A concentrations increase similarly in the first 24 hours (increase of a factor 30) and between the T0 level and the maximum concentration (increase of a factor 42). The increase of hydroxyfluoranthene B is, as for it, slower (increase of a factor 22 and 35 respectively). Moreover, in spite of a higher concentration in the dissolved phase after 2 hours for phenanthrene than for pyrene or fluoranthene, the increase of phenanthrene is lower during the first day (increase 312

of a factor 3 to 19 according to the isomer (the determination of the factor concerning the isomer 4 is not possible due to its non-detection at T0)). However, the maximum increases of the isomer 2 and 3 (increase of a factor 82 and 80 respectively) are approximately twice as important as the ones of 1-hydroxypyrene and hydroxyfluoranthene A.

Table 3 : metabolite concentrations (ng g⁻¹) in the bile of soles from the control tank and from the phenanthrene, fluoranthene and pyrene exposures. When duplicates are realized (n=2), deviation from the mean are indicated; when triplicates are realized (n=3), standard deviations are indicated.

	T0	D1	D3	D7	Dd
Control	n=2	n=3	n=3	n=2	n=1
4-OHPhe	<0,5	8 ± 1	10 ± 3	10 ± 1	6
9-OHPhe	4 ± 0	11 ± 3	10 ± 1	14 ± 1	10
3-OHPhe	20 ± 1	50 ± 11	53 ± 6	88 ± 11	128
1-OHPhe	23 ± 3	41 ± 8	37 ± 4	55 ± 0	67
2-OHPhe	21 ± 0	41 ± 4	64 ± 4	125 ± 15	98
A-OHF	31 ± 1	37 ± 8	33 ± 2	34 ± 0	66
B-OHF	41 ± 3	50 ± 2	59 ± 6	69 ± 2	95
1-OHP	321 ± 11	332 ± 15	304 ± 12	413 ± 15	409
Phenanthrene		n=3	n=3	n=1	n=1
4-OHPhe		48 ± 11	135 ± 14	247	178
9-OHPhe		14 ± 3	14 ± 4	44	266
3-OHPhe		396 ± 17	963 ± 86	1635	2788
1-OHPhe		269 ± 24	274 ± 24	483	795
2-OHPhe		253 ± 14	1076 ± 93	1736	3283
Fluoranthene		n=1	n=1	n=2	n=3
A-OHF		668	1075	803 ± 32	593 ± 91
B-OHF		1225	1708	972 ± 25	889 ± 133
Pyrene		n=3	n=3	n=3	n=1
1-OHP		9613 ± 54	13313 ± 646	13765 ± 41	8643

The strong increase of metabolite concentrations observed in the first 24 hours can explain the absence of bioaccumulation in fish tissues. Thus, the whole absorbed PAHs seems to be efficiently metabolized by detoxification enzymes. This phenomenon could partly be explained by the low level of contamination chosen for this experiment.

CONCLUSION

The study of individual PAH fate during laboratory exposures of fish has demonstrated the efficient biotransformation of waterborne PAHs by soles and the important excretion of the produced metabolites in the gall bladder, except for benzo(a)pyrene for which no biotransformation has been highlighted. The absence of PAH accumulation in fish tissues and in sediments and particulate matter has also been noticed.

A single monohydroxylated metabolite of pyrene, 1-hydroxypyrene, has been identified into the bile after enzymatic deconjugation, indicating the preferential oxidation of pyrene by biotransformation enzymes on the position 1. On the other hand, two monohydroxylated metabolites of fluoranthene and five for phenanthrene have been detected, putting in evidence different possible oxidation positions for those PAHs. Although, all the possible hydroxyphenanthrene isomers (1, 2, 3, 4 and 9) were present into the bile, isomers 2 and 3 were shown to be the two predominant metabolites of phenanthrene.

Moreover, 1-hydroxypyrene has been shown to have the higher concentration into the bile compared to the sum of the fluoranthene or phenanthrene metabolites. This observation suggests that phenanthrene and fluoranthene could be metabolized in other types of metabolites such as dihydrodiols while pyrene is roughly entirely metabolized in 1-hydroxypyrene. The simple biotransformation of 1-hydroxypyrene and its high concentration in the bile could make this compound useful in biomonitoring studies.

Acknowledgments - This study was supported by the Erika program (Monitoring of the ecological and ecotoxicological consequences of the Erika wreckage), the région Aquitaine, the Seine-Aval program and the BEEP (Biological Effects of Environmental Pollution in Marine Coastal Ecosystems) European project n°EVK3-CT2000-00543.

References

- Ariese F, Kok SJ, Verkaik M, Gooijer C, Velthorst NH and Hofstraat JW, 1993. Synchronous fluorescence spectrometry of fish bile: A rapid screening method for the biomonitoring of PAH exposure. *Aquat. Toxicol.*, 26 : 273-286.
- Baumard P and Budzinski H, 1997. Internal standard quantification method and Gas Chromatograph-Mass Spectrometer (GC-MS): a reliable tool for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) quantification in natural matrices. *Analisis*, 25 : 246-252.
- Baumard P, Budzinski H and Garrigues P, 1997. Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues by gas chromatography coupled to mass spectrometry : application to mussels. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 359(6) : 502-509.
- Beyer J, Sandvik M, Hylland K, Fjeld E, Egaas E, Aas E, Skåre JU and Goksøyr A, 1996. Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed by caging to polluted sediments in Sørfjorden, Norway. *Aquat. Toxicol.*, 36 : 75-98.
- Budzinski H, Letellier M, Garrigues P and Le Menach K, 1999. Optimisation of the microwave-assisted extraction in open cell of PAHs from soils and sediments – Study of moisture effect. *J. Chromatogr. A.*, 837 : 187-200.
- Escartín E and Porte C, 1999a. Assessment of PAH pollution in coastal areas from the NW Mediterranean through the analysis of fish bile. *Mar. Poll. Bull.*, 38(12) : 1200-1206.
- Escartín E and Porte C, 1999b. Hydroxylated PAHs in bile of deep-sea fish. Relationship with xenobiotic metabolizing enzymes. *Environ. Sci. Technol.*, 33 : 2710-2714.
- Fouremant GL, 1989. Enzymes involved in metabolism of PAH by fishes and other aquatic animal: hydrolysis and conjugation enzymes (or phase II enzymes). In *Metabolism of PAH in the aquatic environment* (Varanasi U, ed), 185-202. CRC Press, Boca Raton, FL.

- Goksøyr A, Solbakken JE and Klungsoyr J, 1986. Regioselective metabolism of phenanthrene in Atlantic cod (*Gadus morhua*) : studies on the effects of monooxygenase inducers and role of cytochromes *P-450*. *Chem.-Biol. Interactions*, 60 : 247-263.
- IARC, 1987. Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42. Lyon, (IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Supplement 7).
(<http://www.inchem.org/documents/iarc/iarc/iarc740.htm>)
- IPCS, 1998. Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. Environmental Health Criteria 202. International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Keith LH and Telliard WA, 1979. Priority pollutants. I. A perspective view. *Environ. Sci. Technol.*, 13 : 416-423.
- Krahn MM, Myers M, Burrows DG and Malins DC, 1984. Determination of metabolites of xenobiotics in bile of fish from polluted waterways. *Xenobiotica*, 14 : 633-646.
- Krahn MM, Rhodes LD, Myers MS, Moore LK, MacLeod WD and Malins DC, 1986. Associations between metabolites of aromatic compounds in bile and the occurrence of hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 15 : 61-67.
- Latimer JS and Zheng J, 2003. The sources, transport, and fate of PAHs in the marine environment. In (Douben PET ed) PAHs: An ecotoxicological perspective, 9-34. Ecological and Environmental Toxicology Series, Wiley, UK.
- Law FC, Meng JX, He YT and Chui YC, 1994. Urinary and biliary metabolites of pyrene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica*, 24(3) : 221-229.
- Leonard JD and Hellou J, 2001. Separation and characterization of gall bladder bile metabolites from speckled trout, *Salvelinus fontinalis*, exposed to individual polycyclic aromatic compounds. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20(3) : 618-623.

- Lin ELC, Cormier SM and Racine RN, 1994. Synchronous fluorometric measurement of metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in the bile of brown bullhead. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13 : 707–715.
- Luthe G, Stroomberg GJ, Ariese F, Brinkman UAT and van Straalen NM, 2002. Metabolism of 1-fluoropyrene and pyrene in marine flatfish and terrestrial isopods. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 12 : 221-229.
- Mazéas L and Budzinski, 2002. Improved accuracy of GC-MS quantification of aliphatic and aromatic hydrocarbons in marine sediments and petroleums. Validation on reference matrices and application to the Erika oil spill. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 82(3) : 157-173.
- Mazéas O and Budzinski H, *submitted*. Solid phase extraction and purification for individual quantification of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in liquid matrixes. *Anal. Bioanal. Chem.*
- McElroy AE, Farrington JW and Teal JM, 1989. Bioavailability of PAH in the aquatic environment. In *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment* (Varanasi U, ed), 1-40. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Meador JP, 2003. Bioaccumulation of PAHs in marine invertebrates. In (Douben PET ed) *PAHs: An ecotoxicological perspective*, 147-172. *Ecological and Environmental Toxicology Series*, Wiley, UK.
- Neff JM, 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment : sources, fates and biological effects. London, Applied Sciences Publishers.
- Nisbet ICT and LaGoy PK, 1992. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 16 : 290-300.
- Pangrekar J, Kole PL, Honey SA, Kumar S and Sikka HC, 2003. Metabolism of phenanthrene by brown bullhead liver microsomes. *Aquat. Toxicol.*, 64 : 407-418.
- Solbakken JE and Palmork KH, 1981. Metabolism of Phenanthrene in various marine animals. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 70 : 21-26.

- Solbakken JE, Palmork KH, Neppelberg T and Scheline RR, 1980. Urinary and biliary metabolites of phenanthrene in the coalfish (*Pollachius virens*). *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 46 : 127-132.
- Steward AR, Kandaswami C, Chdambaram S, Ziper C, Rutkowski JP and Sikka HC, 1990. Disposition and metabolic fate of benzo[a]pyrene in the brown bullhead. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9 : 1503-1512.
- van der Oost R, Beyer J and Vermeulen NPE, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 13 : 57-149.
- Varanasi U, Stein JE and Nishimoto M, 1989. Biotransformation and disposition of PAH in fish. In *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment* (Varanasi U, ed), 93-149. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons from heavy fuel oil in the marine environment : study of biotransformation by fish in laboratory experiments

Olivier Mazéas^{1,4}, Hélène Budzinski*¹, Guy Claireaux², Yves Désaunay³, Jacek Tronczynsky⁴

¹ Laboratoire de Physico- et Toxicochimie des Systèmes Naturels, UMR 5472 CNRS, Université Bordeaux 1, 351 cours de la libération, 33405 Talence, France

² Centre de Recherche sur les Écosystèmes Marins et Aquacoles (CNRS-IFREMER), 17137 L'Houmeau, France

³ IFREMER, Laboratoire d'Ecologie Halieutique, Rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes cedex 03, France

⁴ IFREMER, Département des Polluants Chimiques, Rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes cedex 03, France

* Corresponding author

Email: h.budzinski@lptc.u-bordeaux1.fr

Phone : 33 (0)5 40 00 69 98

Fax: 33 (0)5 40 00 69 98

Abstract - The fate of polycyclic aromatic hydrocarbons has been monitored in laboratory experiments consisting in the exposure of soles (*Solea solea*) to fuel oil #6 dumped at the surface of tank water. Dissolution in water, bioaccumulation in tissues and excretion of biotransformation products in the gall bladder have been evaluated by the way of quantitative measurement of individual compounds. The influence of temperature, dose of fuel, gender and age of fish on biotransformation as well as depuration during decontamination periods have been particularly investigated.

A modification of PAH fingerprint was observed between the PAH composition of fuel oils, of the water phase and of biological tissues suggesting the different behavior of PAH groups in organisms such as soles. Those experiments highlighted the effect of the temperature on the dissolution of PAHs in water and the effect of the dose of fuel and of the age of fish on their fate in fish. From the whole hydroxylated metabolites of parent PAHs studied, 1-hydroxypyrene appeared to be generally predominant in the bile. Moreover, the hydroxyphenanthrene contribution was superior in the bile of fish exposed to fuel oil compared to non-exposed fish indicating the possible use of their contribution as an indicator of PAH contamination source. Metabolites of relatively high molecular weight PAHs (phenanthrene and pyrene) generally appeared to have higher biotransformation factors than metabolites of low molecular weight parent PAHs, the latest having higher bioconcentration factors in biological tissues.

Key words - PAH metabolites, GC/MS, Laboratory exposure, Fish

INTRODUCTION

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous contaminants of the environment (McElroy et al., 1989). The marine compartment appears to be an endpoint of those chemicals by the way of terrestrial runoffs, atmospheric depositions and petroleum releases (Neff, 1979; Latimer and Zheng, 2003). Petroleum releases in the marine environment are mainly occurring in the case of oil tanker transportation (operational discharges at terminals, deliberate releases of oiled ballast water, wreckage), offshore petroleum exploitation, natural seeps, ... (GESAMP, 1993; U.S. National Academy of Sciences, 2003). To assess the significance of PAH contamination on organisms, the quantification of PAHs in marine organism tissues was usually carried out. However, depending on the ability of organisms to metabolize PAHs, measurement of the bioaccumulated part of the PAHs absorbed can be restrictive and not representative of the environmental contamination (Meador, 2003). Moreover, PAHs can be extensively metabolized into more toxic molecules than parent ones (Varanasi et al., 1989). In this way, the study of PAH biotransformation in marine organisms appears to be necessary in order to access bioavailability and toxicity of those contaminants, more particularly towards fish. To this purpose, biliary metabolites of PAHs have been shown to be particularly efficient biomarkers of fish exposure to PAHs in the environment (van der Oost, 2003).

In order to have a better understanding of PAH fate, present in heavy fuel oils, in the marine environment and especially their bioavailability towards fish, several waterborne exposures of soles (*Solea solea*) to petroleum products have been carried out in laboratory experiments. Transformation products of PAHs have been more especially quantified in the gall bladder. Furthermore, PAH concentrations have been monitored in water, sediment and biological tissues. Different factors possibly influencing the fate of PAHs in fish like temperature, age and sex have been tested.

The concentration of PAH metabolites is usually determined semi-quantitatively as global fluorescent aromatic compound equivalents (FACs) in the bile (Krahn et al., 1984 and 1986; Ariese et al., 1993; Lin et al., 1996; Beyer et al., 1996). The present work consists more precisely in the determination of individual monohydroxylated PAH concentrations quantitatively in fish bile. Those compounds are known to be some of the major molecules produced, present in their free form or conjugated by glucuronide or sulfate groups (Varanasi et al., 1989; Foureman, 1989; Steward et al., 1990; Law et al., 1994; Leonard and Hellou, 2001; Luthe et al., 2002). The following compounds were chosen because they are potential metabolites of priority PAHs listed by the US-EPA (United-States Environmental Protection Agency) for their interest in environmental surveys (Keith and Telliard, 1979) : 1- and 2-hydroxynaphthalene (1- and 2-OHN), 9-hydroxyfluorene (9-OHFe), 1-, 2-, 3-, 4- and 9-hydroxyphenanthrene (1-, 2-, 3-, 4- and 9-OHPhe), 1-hydroxypyrene (1-OHP), 1-hydroxychrysene (1-OHC) and 3-hydroxybenzo(a)pyrene (3-OHBaP). 2-hydroxybiphenyl (2-OHBi) was added to this study due to the abundance of biphenyl in the environment.

The final purpose of this work is to evaluate the potential of the monitoring of individual monohydroxylated PAHs in the bile of fish to determine the exposition of fish to PAHs in the environment after a petroleum contamination. This study was a part of the Erika program. The aim of this program was to evaluate the impact of the Erika oil spill, which spilled 20000 tons of heavy fuel oil #6 in the Bay of Biscay, on the environment along the French Atlantic coast.

MATERIALS AND METHODS

Fish

Soles (*Solea solea*) were trawled in the Bay of Biscay (Pertuis Breton location), off Ré Island. Fish were kept for 4 weeks in large tanks for acclimatization with flow-through seawater pumped from the surrounding marsh before starting the experiments. The water of the marsh is renewed at each tide. The collected fish could belong to different age group. Age group 1 correspond to fish

born around the month of march the year before capture, age group 2 correspond to fish born in march two years before capture and age group 2-3 to fish born in march two or three years before capture.

Experimental design and sample collection

Three experiments were realized, each including three tanks covered with a polyethylene film and containing uncontaminated sand at the bottom. Tanks were filled with 500 l of seawater pumped from the surrounding marsh and put in closed circuit. A first tank was dedicated to the control exposure and the last two ones to different volumes of oil contamination. Tanks were located indoor a small building on the marsh at the outdoor temperature and with a slight oxygenation. Before the beginning of the contaminations, around 40 soles were transferred in each tank (1 m² of surface). Heavy fuel oil #6 provided by the Cedre (Documentation, Research and Experimentation Center of accidental water pollution) was just dumped at the surface of the water. Fish were not fed during the exposures.

After five days of exposure, soles were captured. Blood samples were first collected in the caudal vein thanks to a syringe first rinsed with heparin (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Falavier, France). Plasma was obtained and stored at -80°C after centrifugation of blood samples (10 min; 18°C; 5000 rpm) in microtubes first rinsed with heparin beforehand and containing 2 µl of aprotinin (aprotinin from bovine lung, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Falavier, France). Fish were then killed and the gall bladder and a part of the liver was sampled and stored at -80°C. The other part of the liver and muscle tissues were stored at -20°C, except for the third experiment for which liver samples were stored at -80°C for EROD activity measurement.

The three different experiments are summarized in Table 1. The first experiment consisted in exposing soles to an heavy fuel oil named A at the dilutions of 1/2000 and 1/100 (V_{oil}/V_{water}). The exposure took place at a temperature of 6°C. Males and females were distinguished in this first

experiment to evaluate a possible difference of biotransformation depending on sex. Some fish were consecutively put in decontamination tanks and sampled after 1, 2, 4 and 5 days. The second and the third experiments were carried out at 15°C and at different oil dilutions respectively using the fuel A and another heavy fuel oil #6 named B due to the total use of the fuel A (Table 1). Some fish were then placed in marsh basins, the ones were fed in water and sole food at each tide, and sampled after 3 and 6 months. In the third set of exposure, two different age groups (g1 and g2-3) were distinguished to evaluate a possible difference of uptake, bioaccumulation or biotransformation depending on age.

Table 1 : Framework of the three experiments. m : male, f : female.

Experiment	date	dilution (v/v)	number of fish sampled	length in cm (age group)	temperature	heavy fuel oil
I	03/2002	control	10 (5m and 5f)	20±2 (g2)	6 °C	A
		1/2000	10 (5m and 5f)	19±1 (g2)		
		1/100	10 (5m and 5f)	20±1 (g2)		
II	05/2002	control	10	16±4 (g1)	15 °C	A
		1/1000	10	15±4 (g1)		
		1/200	10	16±3 (g1)		
III	05/2003	control	8	13±1 (g1)	15 °C	B
		1/2000	3	26±1 (g2-3)		
			6	14±1(g1)		
			3	25±1 (g2-3)		
		1/200	4	13±1 (g1)		
3	26±1 (g2-3)					

Chemicals, solvents and reagents

Concerning hydroxylated PAHs, 1- and 2-hydroxynaphthalene were purchased from Lancaster (Strasbourg, France), 2-hydroxybiphenyle, 9-hydroxyfluorene and 1-hydroxypyrene from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Falavier, France), and 1-, 2-, 3-, 4-, 9-hydroxyphenanthrenes, 1-hydroxychrysene and 3-hydroxybenzo(a)pyrene from Promochem (Molsheim, France).

hydroxypyrene-d9 and phenanthrene-d10 were acquired from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA).

Various solvents were used. Ultra Resi-Analysed methylene chloride (Mallinckrodt Baker) was purchased from Atlantic Labo (Eysines, France), Multisolvent ethyl acetate (Scharlau) was provided by ICS Nationale (Belin Beliet, France) and water was purchased from laboratory Aguettant (sterilized water for injection, Lyon, France).

2-mercaptoethanol and bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) were provided by Acros organics (Noisy-Le-Grand, France). Sodium acetate trihydrate 99%, β -glucuronidase - aryl-sulfatase mixture, 100000 et 7500 u/ml respectively, sodium sulphate and Supelclean LC-NH₂ cartridges were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Falavier, France). Bakerbond C₁₈ cartridges was purchased from Atlantic Labo (Eysines, France) and acetic acid (100% Normapur), aluminium oxide (150 basic type T; 0,063-0,2 mm) and silica gel 60 (0,063-0,2 mm) were provided by VWR (Strasbourg, France).

PAH analysis

Heavy fuel oil was analyzed in triplicate according to the protocol described by Mazéas and Budzinski (2002). To this purpose, fuel oil was first dissolved in methylene chloride.

For the determination of PAHs in the aqueous phase, water was first passed through a 0,7 μ m GFF filter (VWR, Strasbourg, France) to separate dissolved PAHs from PAHs adsorbed on particulate matter. Dissolved PAHs were extracted by passing water samples through an octadecyl speedisk (Baker, Atlantic Labo, Eysines, France) on which PAHs are retained. Analytes were then recovered by successive elutions with methylene chloride and methylene chloride/ethyl acetate (1:1, v/v). Water traces were then removed by passing the extract through sodium sulphate.

PAHs were extracted from freeze-dried and grounded solid matrices (sediment, liver, muscle) by micro-wave assisted extraction (10 min, 30 W) with methylene chloride followed by filtration on clean glass cotton (Budzinski et al., 1999).

Several perdeuterated PAHs used as internal standards were added to the samples prior to the extraction step for PAH quantification (Baumard and Budzinski, 1997).

Extracts of the different matrices were then purified on aluminium oxide (Al_2O_3) and silica (SiO_2) columns (Baumard et al., 1997; Mazéas and Budzinski, 2002) and analysed by GC/MS (gas chromatography/mass spectrometry). In the case of sediments, activated copper was added in the aluminium oxide columns in order to remove sulphur from the samples.

Extracts were analysed by an HP GC 6890A gas chromatograph Agilent Technologies (automated PTV pulsed splitless injection (25 psi, 1 min); purge delay: 1 min and purge flow: 60.6 ml/min; injector temperature: 270°C; interface temperature: 280°C; oven temperature: from 70°C (2 min) to 300°C (5 min) at 2°C/min) coupled to an HP MSD 5973 mass spectrometer (electron impact: 70 eV; voltage: 2000 V; source temperature: 150°C) both purchased from BIOS Analytique (l'Union, France). Analyses were performed in the SIM (selected ion monitoring) mode at 1.3 scan/s (Dwell time: 50 ms for each ion) using the molecular ions of the studied compounds. The capillary column was an HP5/MS Agilent Technologies (30 m x 0.25 mm ID x 0.25 film thickness) provided by BIOS Analytique (l'Union, France) and the carrier gas was helium 6.0 obtained from Linde (Toulouse, France).

Different perdeuterated polycyclic aromatic hydrocarbons were used as internal standards for each class of aromaticity (Baumard and Budzinski, 1997). The response factors of PAHs relatively to perdeuterated PAHs were determined for each GC/MS sequence by injecting a mixture containing a solution of PAHs (SRM 2260, National Institute of Science and Technology, Gaithersburg, MD, USA) and the solution of perdeuterated PAHs used for spiking samples.

The monitored PAHs are, in ascending order of molecular weight, naphthalene* (N), methylnaphthalenes (C₁-N), dimethylnaphthalenes (C₂-N), trimethylnaphthalenes (C₃-N), tetramethylnaphthalenes (C₄-N), acenaphthylene* (Ay), biphenyl (Bi), acenaphthene* (Ae), fluorene* (Fe), phenanthrene* (Phe), dibenzothiophene (DBT), methylphenanthrenes+1-methylanthracene (C₁-Phe), methyl dibenzothiophenes (C₁-DBT), dimethylphenanthrenes (C₂-Phe), dimethyldibenzothiophenes (C₂-DBT), fluoranthene* (F), pyrene* (P), benz(a)anthracene* (BaA), chrysene*+triphenylene (C+T), methylchrysenes (C₁-C), benzo(b)fluoranthene*+benzo(j)fluoranthene+benzo(k)fluoranthene* (BbF+BjF+BkF=BF), benzo(a)pyrene* (BaP), indeno(1,2,3-cd)pyrene* (IP), benzo(g,h,i)perylene* (BPer) and dibenz(a,h)anthracene*+dibenz(a,c)anthracene (DB(ah)A+DB(ac)A=DBA). Compounds marked with a "*" are 15 of the 16 PAHs of the US-EPA (the sixteenth one, anthracene, was not taken into account in this study due to the presence of coelutions in some biological matrices). In this study, the sum of those compounds is referred as 18 PAHs because of the coelution of three other PAHs by GC/MS. In biological tissues, the lowest molecular weight compounds (before phenanthrene) were not quantified. Thus, the sum of 14 PAHs is taken into account.

Metabolite analysis

The protocol used for the determination of metabolite concentrations in the bile has previously been described (Mazéas and Budzinski, submitted (a)).

Samples were first treated with 20 µl of β-glucuronidase - aryl-sulfatase mixture (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Falavier, France), 100000 et 7500 u/ml respectively, for enzymatic deconjugation. To this purpose, samples were buffered to pH 5 (acetate buffer constituted of sodium acetate and acetic acid in water) and 20 µl of 2-mercaptoethanol, used as an antioxidant, and the internal standard (1-hydroxypyrene-d9) were subsequently added to the samples. They were then placed in an oven at 37°C during 20 h. In the case of liver tissues, samples were first homogenized

in water buffered to pH 5 (acetate buffer constituted of sodium acetate and acetic acid in water) using an ultra-turrax.

After ultra-sonication and centrifugation (5 min, 5000 rpm, 18°C), supernatants were loaded on C₁₈ cartridges previously preconditioned with 2 ml of methanol and 4 ml of water. In the case of liver tissues, the samples were first extracted by microwave assisted extraction (10 min; 30 W) in a 4/5 (v/v) buffered water/methanol mixture. Cartridges were washed with 2 ml of water and 2 ml of water/methanol mixture (70:30, v/v). Water traces were then removed by freeze-drying the cartridges. Freeze-drying was performed because of the possible loss of low molecular weight compounds during nitrogen stream drying at room temperature. Metabolites were then eluted with 6 ml of methanol. Extracts were evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream and re-dissolved in methylene chloride.

NH₂ cartridges were then used for purification. Before loading the sample, the cartridge was first preconditioned with 3 ml methanol/methylene chloride (20:80, v/v). The selective elution of metabolites was obtained using 6 ml of the mixture of solvents previously used. The final extract was evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream and re-dissolved in methylene chloride.

After derivatization with BSTFA (30 min, 65°C), phenanthrene-d10 was added to the samples for recovery determination and analyses were performed in GC/MS in the SIM mode using an identical apparatus to the one used for PAH analysis. The ions used for quantification in the SIM mode are described in a previous work (Mazéas and Budzinski, submitted (b)). However, the GC/MS conditions were different from PAH analysis (automated PTV pulsed splitless injection (25 psi, 1.5 min); purge delay: 1.5 min and purge flow: 60 ml/min; injector temperature: 250°C; interface temperature: 280°C; oven temperature: from 70°C (2 min) to 180°C (1 min) at 5°C/min and from 180°C to 290°C (1 min) at 10°C/min; electron impact: 70 eV; voltage: 2000 V; source temperature: 150°C; 1.53 scan/s; dwell time: 50 ms for each ion).

A mixture constituted of standard metabolites and 1-hydroxypyrene-d9 was injected at the beginning and at the end of each GC/MS sequence for response factor determination and a manipulation blank was performed together with samples to control potential contamination.

Protein concentrations were determined in the bile and in the liver according to the method of Lowry et al. (1951) in order to evaluate potential differences in bile dilution and to express EROD (Ethoxyresorufin-*O*-deethylase) activity in function of liver protein concentrations.

EROD measurement

The EROD activity was determined in the liver according to the method of Galgani and Payne (1991).

RESULTS AND DISCUSSION

PAH composition of the heavy fuel oils #6

PAH measurements indicated the predominance of low molecular weight compounds in the two heavy fuel oils used and particularly alkylated ones (naphthalenics, phenanthrenics and dibenzothiophenics) (Fig. 1).

Differences of composition were also noticed between the two products. The fuel oil named A appeared to be less concentrated in PAHs than the fuel oil named B (31000 $\mu\text{g g}^{-1}$ and 54000 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectively for the sum of the studied PAHs) and particularly less enriched in the highest molecular weight compounds from alkylated phenanthrenes (following the ascending order of molecular weight). The composition of the fuel oil B appeared to be closer to the oil carried by the Erika tanker than fuel oil A. However, fuel oil B exhibited higher concentrations of alkylated naphthalenes than the Erika one (41000 $\mu\text{g g}^{-1}$ for fuel B, 27000 $\mu\text{g g}^{-1}$ for fuel A and 14000 $\mu\text{g g}^{-1}$ for the Erika). Due to its relatively low level of high molecular weight PAHs, fuel oil A could

exhibit less toxic properties than fuel oil B or than the Erika fuel oil (IARC, 1987; US-EPA, 1993; IPCS, 1998).

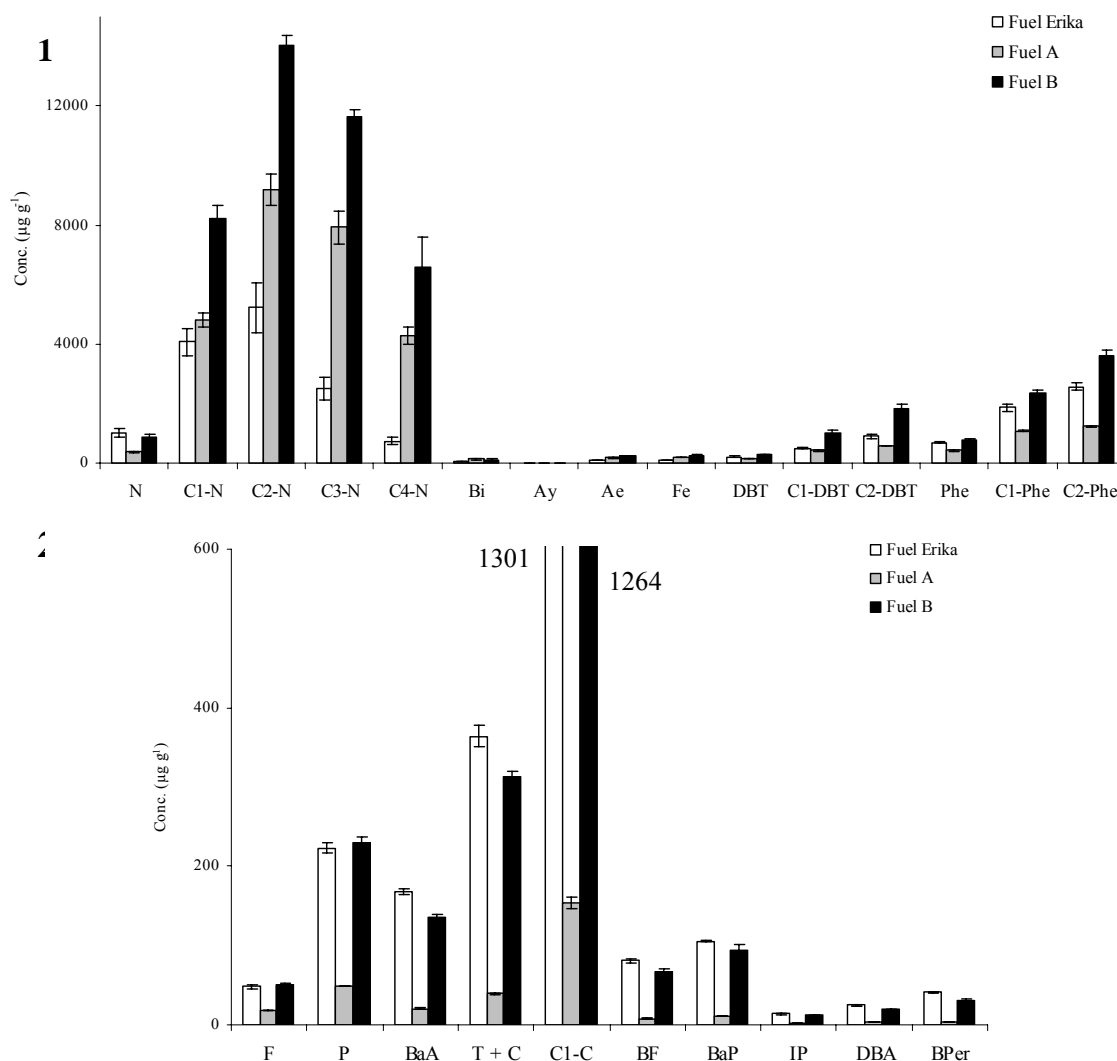


Figure 1 : PAH composition of the two heavy fuel oil #6 used (A and B) and comparison to the Erika fuel oil for the low molecular weight (1) and the high molecular weight compounds (2) (n=3).

PAHs dissolved in water

After the five day exposure, the measurements realized in the dissolved phase revealed extremely high concentrations of PAHs in the third experiment carried out with the fuel B compared to the first two ones (13000-32000 ng l^{-1} with B versus 300-1600 ng l^{-1} with A for the sum of the studied PAHs; Fig. 2). This phenomenon could partly be explained by the higher PAH

concentrations measured in the fuel B but may be also by an easier dissolution of this petroleum product in water.

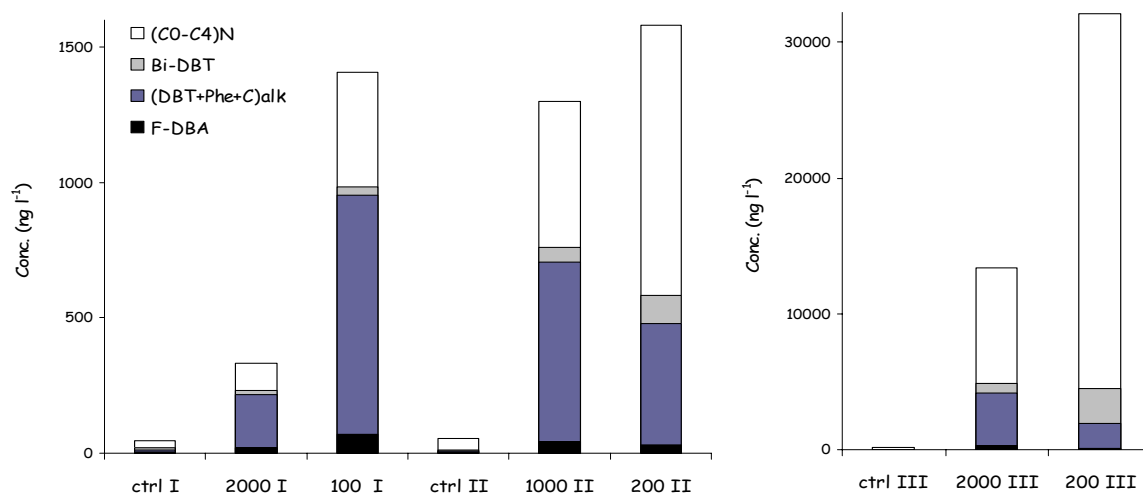


Figure 2 : Concentrations of dissolved PAHs in water for the three experiments. alk : alkylated compounds; ctrl : control exposure.

The PAH distribution was dominated by low molecular weight and alkylated compounds (naphthalenics, phenanthrenics and dibenzothiophenics) for the three experiments, which can be related to the composition of the fuel oils. Naphthalenic compounds were particularly predominant in the third experiment and a higher proportion of high molecular weight compounds was detected in the dissolved phase of the first two experiments using fuel oil A. Those proportions were however inversed in the two fuel oils where the percentages of naphthalenic compounds and high molecular weight compounds were respectively 86% and 0.5% of the whole PAHs in the fuel A, and 78% and 1.8% for the fuel B.

Moreover, at 5°C (experiment I), individual concentrations of PAHs followed the dose of fuel whereas, at 15°C (experiment II and III), with the two different fuel oils, the concentrations of intermediate and high molecular weight compounds (from methylphenanthrenes) were inversely proportional to the fuel dose (Fig. 2). This phenomenon was also observed in sand for the third experiment for which PAHs were quantified. It had the effect of quite similar levels of global PAHs

in the dissolved phase for the second experiment but not for the third one due to the large abundance of naphthalenic compounds at the dose 1/200 (Fig. 2). Furthermore, low molecular weight compounds (from naphthalene to dibenzothiophene) seemed to be more easily dissolved at the higher temperature. Thus, taking into account the 1/100 exposure led at 5°C and the 1/200 exposure led at 15°C, concentrations of low molecular weight compounds were higher at 15°C than at 5°C and, conversely, from methylphenanthrenes, concentrations were higher at 5°C (Fig. 2).

The levels of PAH concentration measured in this study (a minimum of 33 ng l⁻¹ for the sum of the 18 PAHs) were greater than the ones determined in the dissolved phase during the Erika oil spill (4-19 ng l⁻¹ for the sum of the same PAHs plus anthracene) (Tronczynski et al., 2003).

PAH bioaccumulation

After performing the measurements of PAHs bioaccumulated in tissues of soles bioconcentration factors (BCF) were calculated as the ratio of PAH concentration in tissues over concentration in the dissolved phase and expressed in l g⁻¹. Naphthalenic compounds were not quantified in fish tissues due to their partial evaporation during the analytical protocol. Those data indicated the preferential bioconcentration of the highest molecular weight compounds from methylphenanthrenes into the liver while the lowest ones did not exhibited clear tendencies (Table 2 and 3). The general higher bioconcentration observed in the liver is in good agreement with the usual affinity of PAHs for lipidic tissues like the liver (Meador, 2003).

Table 2 : Bioconcentration factors (BCF) in muscle tissues (l g⁻¹). alk : alkylated compounds.

Experiment	I		II		III			
	1/2000	1/100	1/1000	1/200	1/2000 (g1)	1/2000 (g2)	1/200 (g1)	1/200 (g2)
Bi-DBT	1.99	32.76	3.63	3.32	0.16	0.18	0.05	0.08
(DBT+Phe+C)alk	0.08	0.16	0.10	0.11	0.04	0.04	0.10	0.13
F-DBA	0.08	0.14	0.08	0.10	0.04	0.02	0.14	0.06

Table 3 : Bioconcentration factors (BCF) in the liver ($l\ g^{-1}$). alk : alkylated compounds.

Experiment	I		II	
	1/2000	1/100	1/1000	1/200
Bi-DBT	3.86	17.79	4.44	1.46
(DBT+Phe+C)alk	0.26	0.20	0.26	0.20
F-DBA	1.76	0.44	0.93	0.46

Concerning muscles, concentrations were lower in the third experiment than in the first two ones (from 150 to 240 $ng\ g^{-1}$ and from 40 to 1100 $ng\ g^{-1}$ respectively for the sum of the studied PAHs), except from fluoranthene, in spite of largely higher concentrations in the dissolved phase (Fig. 3 and 4). Low bioconcentration factors were thus determined for low molecular weight compounds for the third experiment compared to the first two ones (from 0.05 to 0.18 l/g and from 2 to 33 l/g respectively; Table 2). In this way, the relative contribution of low molecular weight compounds was lower in muscles with the fuel oil B than with the A one (40-45% and 59-87% respectively).

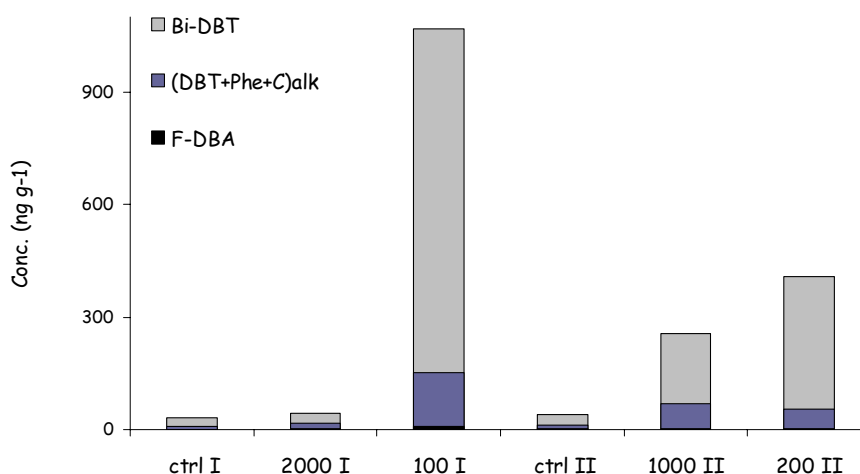


Figure 3 : Concentrations of bioaccumulated PAHs in muscles (expressed in dry weight) for the experiments I and II. alk : alkylated compounds; ctrl : control exposure.

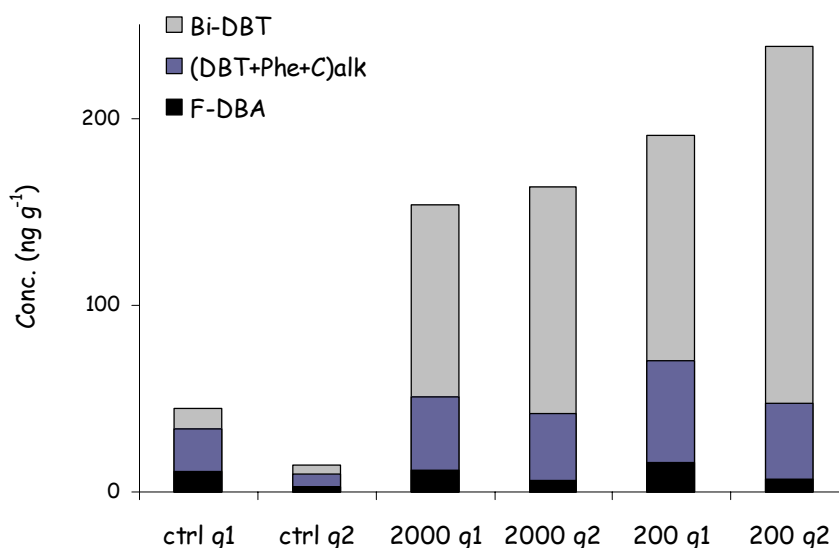


Figure 4 : Concentrations of PAHs in muscles (expressed in dry weight) for the experiment III led at 15°C. alk : alkylated compounds; ctrl : control exposure; g1 and 2 : age group 1 and 2.

Concerning the first two experiments, bioconcentration factors of high molecular weight compounds and alkylated ones were lower than the ones of low molecular weight compounds for both muscle and liver tissues (Table 2 and 3). Those behaviour differences between PAHs had the effect of radically changing the distribution of PAHs in tissues compared to the dissolved phase. Low molecular weight compounds become predominant in tissues whereas alkylated compounds were dominant in the dissolved phase (Fig. 3, 4 and 5). It can also be noticed that the proportion of high molecular weight compounds is more important in the liver than in muscle tissues. Furthermore, in spite of similar concentrations in water, high levels of PAH accumulation were measured in tissues at 5°C for the 1/100 dose compared to the level observed at 15°C for the two doses of the second experiment (Fig. 3 and 5). This high level of concentration at the exposure 1/100 (I) could be attributed to the strong bioaccumulation of low molecular weight compounds (from Bi to DBT) at this dose. Indeed, the bioconcentration factors of those compounds were higher at this exposure than in the second experiment (18 l/g in the liver and 33 l/g in muscles, and 4.4 and 1.5l/g in the liver and 3.6 and 3.3 l/g in muscles for the exposures 1/1000 and 1/200 of the second exposure respectively) whereas bioconcentration factors of other PAHs were similar.

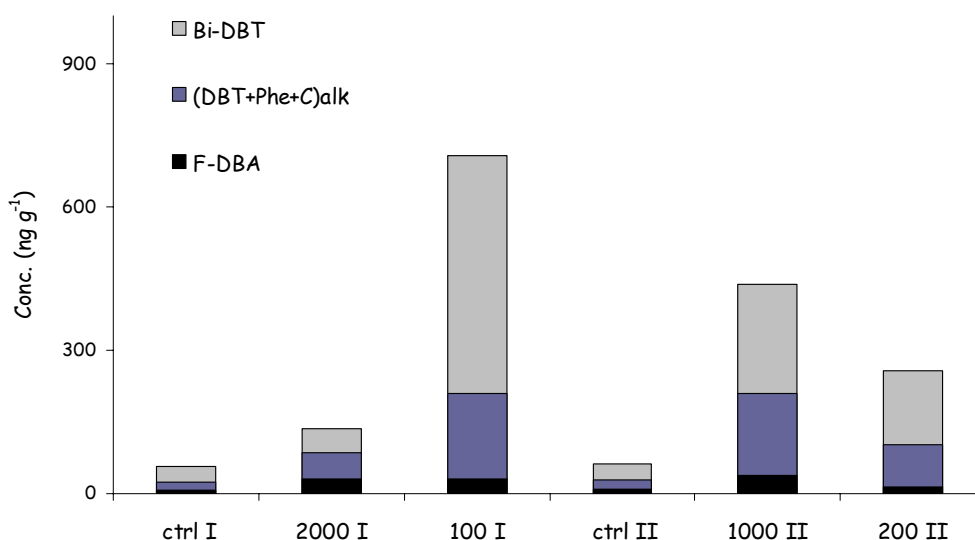


Figure 5 : Concentrations of bioaccumulated PAHs in the liver (expressed in dry weight) for the experiments I and II. alk : alkylated compounds; ctrl : control exposure.

At 5°C, the largely higher accumulation observed in fish tissues at the 1/100 exposure was in good agreement with the levels measured in the water phase for the two exposures. Considering the two exposures of the second experiment (15°C), a global opposition of PAH concentrations can be observed between muscle and liver tissues (Fig. 3 and 5). This opposition, which lead to a globally similar accumulation in fish tissues, could be related to the rather similar levels of PAH concentrations measured in water (Fig. 2). It can be noticed that the higher level of low molecular weight compounds measured at the 1/200 exposure in muscle tissues than at the 1/1000 exposure was due to the high concentrations of those compounds in the water and not to higher bioconcentration factors (3.6 l/g for 1/1000 and 3.3 l/g for 1/200). In the same way, the higher level of alkylated compounds observed in fish exposed to the 1/1000 dose than to the 1/200 dose could directly be related to the concentrations of dissolved PAHs. Conversely, the high concentrations measured in the liver of fish exposed to the 1/1000 dose was due to a higher bioconcentration of PAHs than at the dose 1/200 (Table 3).

Concerning fish from the experiment III, older fish (g2) globally presented higher levels of low molecular weight compounds than younger ones (g1) in muscle tissues and conversely low levels of high molecular weight compounds (Fig. 4). In a global point of view, older fish tended to

accumulate more PAHs than younger ones due to the predominance of low molecular weight compounds.

The concentration levels detected in the liver (100-150 ng g⁻¹ of dry weight for the sum of the 14 PAHs) were similar to the ones measured in some soles during the Erika oil spill (Mazéas et al., submitted (a)).

PAH biotransformation

Measurements realized in the liver and in plasma samples indicated metabolite traces only, inferior to quantification levels. Conversely, high metabolite concentrations were detected in the bile. However, 1-hydroxychrysene and 3-hydroxybenzo(a)pyrene were not detected in any of the bile samples analyzed. Monohydroxylated metabolites of alkylated compounds (mono, di and trimethylnaphthalenes and mono and dimethylphenanthrene) were also identified in the bile but were not quantified in this study. Due to insignificant differences of protein concentration in the bile and in order to avoid the introduction of additive uncertainties of protein concentration measurement, PAH metabolite concentrations were expressed per gram of bile.

In term of metabolite composition, the results obtained in the bile indicated the general predominance of 1-hydroxypyrene (Fig. 6 and 7). Its relative proportion varied between 73 and 81% of the metabolites studied in the bile of fish collected from the control tanks while it varied between 33 and 37% for the fuel A exposures and between 42 and 46% for the fuel B exposures. Thus, this compound could be a good biomarker of exposure. However, for the 1/200 dose of the third experiment, 2-hydroxynaphthalene was preponderant (Fig. 8). This exception can be explained by the particularly high naphthalene/pyrene ratio measured in the water phase for this exposure (11 versus 0.4-2.1 for the other exposures). Other variations of metabolite fingerprint were also observed. Thus, an increase of the proportion of hydroxyphenanthrenes was noticed in the case of petroleum exposures compared to controls. For the 1/100 dose of the experiment I for example,

while 1-hydroxypyrene percentage decreased from 73% to 33%, the one of hydroxyphenanthrenes increased from 19% to 45%. The 1-hydroxypyrene/hydroxyphenanthrenes ratio could thus be a indicator of petroleum contamination and exposure. On the other hand, biotransformation factors (BTF) hardly put in evidence trends of metabolite differences in the bile, partly due to their high variability between the experimentation III and the first two ones. The BTF represent the ratio of the concentration of the considered metabolite in the bile on the concentration of the corresponding PAH in water. They are expressed in $l\ g^{-1}$. However, phenanthrene and pyrene (the higher molecular weight PAHs) metabolites seemed to be more present in the bile than other biotransformation products compared to the concentration of the corresponding PAHs in the water. Furthermore, in the third experiment, the isomers 3 and 2 of hydroxyphenanthrene were predominant on the isomer 1, and 4- and 9-hydroxyphenanthrenes could not be quantified. This predominance of the isomers 2 and 3 on the isomer 1 was also observed in another laboratory study (Mazéas et al., submitted (b)). However, in the first two experiments (using fuel A), the isomers 1, 2 and 3 had equivalent contributions (Fig. 6 and 7). Other works reported the predominance of the isomers 1, 2 and 3 with some variations of proportion (Solbakken et al., 1980; Solbakken et Palmork, 1981; Goksøyr et al., 1986). In the same way, 1- and 2-hydroxynaphthalenes had equivalent levels in the experiments I and II but the isomer 2 was largely predominant in the third one.

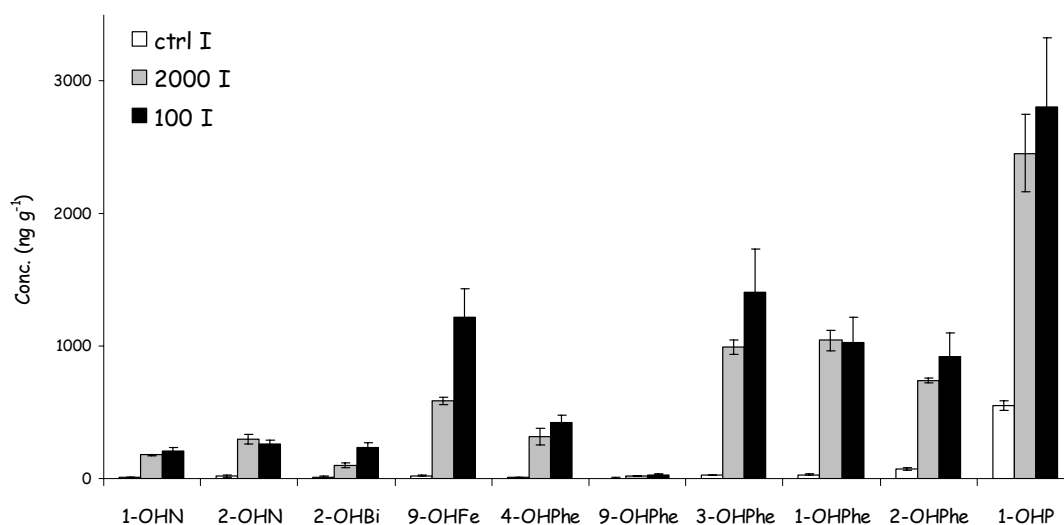


Figure 6 : Metabolite concentrations in the bile for the different exposures of the experiment I led at 5°C with the fuel A : Ctrl (n=3), 1/2000 (n=3), 1/100 (n=5).

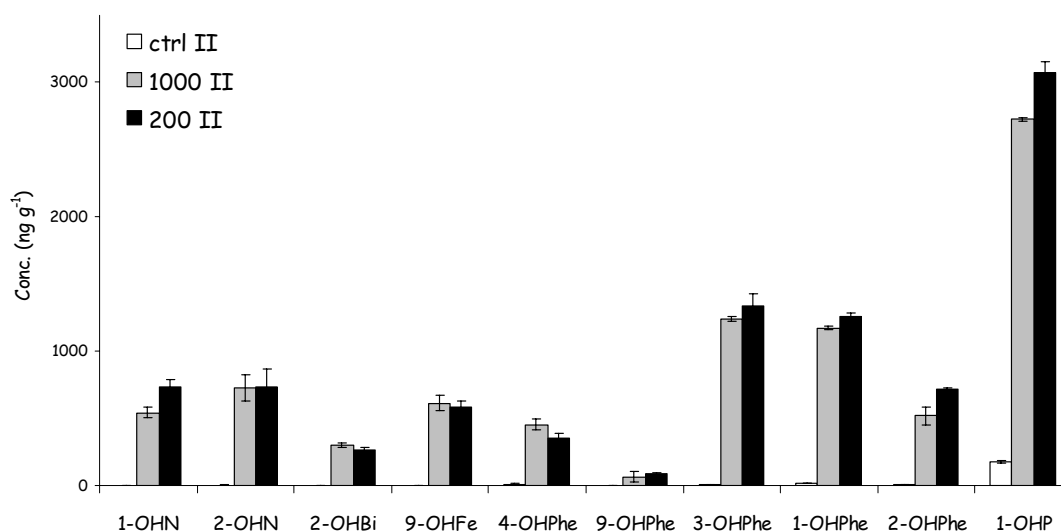


Figure 7 : Metabolite concentrations in the bile for the experiment II led at 15°C with the fuel A : Ctrl (n=3), 1/1000 (n=3), 1/200 (n=3).

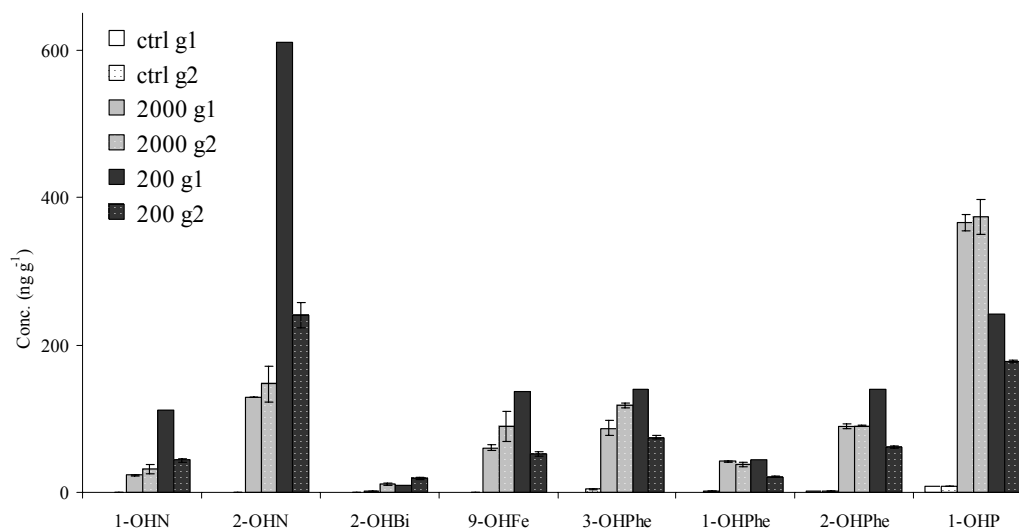


Figure 8 : Metabolite concentrations in the bile for the different exposures of the experiment III led at 15°C with the fuel B. ctrl g1 (n=1), ctrl g2 (n=2), 1/2000 g1 (n=2), 1/2000 g2 (n=3), 1/200 g1 (n=1), 1/200 g2 (n=3). ctrl : control exposure; g1 and 2 : age group 1 and 2.

Males and females were distinguished in the first experiment. Due to the similar results obtained for the two sexes, the results presented here take into account the whole individuals.

When comparing the levels of metabolite concentrations in the bile to PAH concentrations in water, it was first observed global metabolite concentrations largely higher in the third experiment (around 22000 n g⁻¹) than in the first two ones (around 8000 n g⁻¹ for the sum of studied

metabolites). Only 2-hydroxybiphenyl displayed similar levels for the three experiments (around 250 ng g⁻¹). This difference of level generally reflected PAH concentrations measured in the dissolved phase. However, the difference of concentration levels was more marked in the dissolved phase, with global factors comprised between 8 and 33 between the experiment III and the first two ones, that in the bile, with a lower factor of 3 for the sum of the studied metabolites. This relatively low increase of metabolite concentrations in the experiment III was traduced by particularly low biotransformation factors compared to the ones obtained for the first two ones (Table 4). Biotransformation factors were calculated as the ratio of metabolite concentration in the bile over PAH concentration in the dissolved phase and expressed in l g⁻¹. Considering the sum of studied metabolites in the bile and the sum of corresponding PAHs in water (naphthalene, biphenyl, fluorene, phenanthrene et pyrene), biotransformation factors were included between 120 and 280 in the first two experiments and between 10 and 63 for the third one. In this way, a strong bioaccumulation could be expected in fish tissues of the third experiment but, conversely, the measurements led in muscle tissues indicated a weak bioaccumulation (Fig. 4).

Considering the first two experiments, metabolite levels from the 1/2000 exposure led at 5°C were not significantly lower than for the 1/100 exposure of the same experiment (6724 ± 309 ng g⁻¹ and 8532 ± 1576 ng g⁻¹ respectively for the sum of studied metabolites) in spite of particularly low concentrations of dissolved PAHs measured in the 1/2000 exposure (Fig. 2). However, the levels of total metabolite concentrations obtained in the second experiment, led at 15°C, were in better agreement with concentrations of dissolved PAHs with significantly higher levels of metabolites than for the lower exposure led at 5°C (8363 ± 480 ng g⁻¹ for the 1/1000 exposure and 9148 ± 248 ng g⁻¹ for the 1/200 exposure; Table 5). Moreover, biotransformation factors were generally higher for the lower exposure of each experiment (Table 4). On the other hand, no particular trend was observed relatively to exposure concerning bioconcentration factors. Furthermore, the higher dissolution of low molecular weight compounds observed at 15°C was confirmed by the higher

levels of metabolites of low molecular weight PAHs (hydroxynaphthalenes and 2-hydroxybiphenyl) in the bile in the second experiment than in the first one. However, 9-hydroxyfluorene was more present at 5°C than at 15°C. Biotransformation factors were thus higher for this compound at 5°C (289 l g⁻¹ for 1/100 and 429 l g⁻¹ for 1/2000) than at 15°C (22 l g⁻¹ for 1/200 and 40 l g⁻¹ for 1/1000). Bioconcentration factors obtained for low molecular weight compounds were nevertheless particularly high at 5°C for the dose 1/100 (Tables 2 and 3).

Table 4 : Biotransformation factors (BTF) in the bile (l g⁻¹).

Experiment Exposure (and age)	I		II		III			
	1/2000	1/100	1/1000	1/200	1/2000 (g1)	1/2000 (g2)	1/200 (g1)	1/200 (g2)
1-OHN	24	20	74	32	10	11	3.1	1.4
2-OHN	39	25	99	32	58	52	16.7	7.5
OHN	63	45	174	64	69	63	19.8	8.9
2-OHBi	70	122	110	81	4	30	2.1	4.8
9-OHFe	429	289	40	22	16	18	4.7	2.0
4-OHPhe	53	55	47	37	-	-	-	-
9-OHPhe	3	4	7	9	-	-	-	-
3-OHPhe	165	180	127	142	34	34	21	12
1-OHPhe	174	132	120	133	16	11	7	4
2-OHPhe	124	117	53	76	35	26	21	10
OHPhe	519	488	353	397	85	71	48	26
1-OHP	313	100	175	279	93	74	75	62
Sum	279	164	165	124	63	54	18	10

Table 5 : Sum of metabolite concentrations in the bile and sum of the corresponding 5 PAHs in water for the experiments I and II.

Experiment	I		II	
	1/2000	1/100	1/1000	1/200
Sum of the 5 PAHs in water (ng l ⁻¹)	24	52	51	74
Sum of metabolites in the bile (ng g ⁻¹)	6724 ± 309	8532 ± 1576	8363 ± 480	9148 ± 248

For the experiment II, led at 15°C, the sum of studied metabolites was slightly higher at the 1/200 exposure than at the 1/1000 one (9148 ± 248 and 8363 ± 480 ng g⁻¹ respectively), partly reflecting the 1.5 times higher concentration of the corresponding PAHs measured in the dissolved phase for the higher experiment (Table 5). This weak difference of metabolite concentration in the bile was traduced by a global biotransformation factor 1.3 times greater for the lower dose (Table 4).

Consecutively to the first two experiments, soles were placed in different decontamination conditions as described above. The short-term decontamination study realized after the first experiment showed that, after 5 days of decontamination, metabolite levels were two to ten times greater than initial ones (in the case of unfed soles). Concentrations started to decrease at the second day (from 9000 ng g⁻¹ to 5500 ng g⁻¹ between the first and the second day for the sum of studied metabolites). After 5 day, the total concentration reached 3300 ng g⁻¹. Moreover, a variation of the relative contribution of the studied metabolites was noticed during the depuration process. Thus, the 1-hydroxypyrene percentage increased from less than 30% to 50% while hydroxyphenanthrene ones decreased from more than 60% to 40%, indicating the reduction of the petrogenic contamination. Furthermore, the long-term decontamination study realized in marsh after the second experiment showed that, after 3 month (the first sampling time), metabolite concentrations were similar to control levels.

Considering the experiment III, a stronger biotransformation was also observed at the lower dose of fuel. Global biotransformation factors were thus included between 54 and 63 l g⁻¹ for this dose and between 10 and 18 l g⁻¹ for the higher one. Thus, while the global concentration level of dissolved PAHs was 4 times greater at the higher dose, total metabolite concentrations were in the same range (between 20000 and 24000 ng g⁻¹ for the 1/2000 exposure and between 16000 and 30000 ng g⁻¹ for the 1/200 exposure). Those observations suggest a particularly low bioaccumulation of PAHs at the lower dose but the measurements realized in muscle tissues did not show this phenomenon (Fig. 4). Moreover, concentration of low molecular weight metabolites

340

(hydroxynaphthalenes, hydroxybiphenyl) were particularly important at the higher dose with a low proportion of 1-hydroxypyrene and, conversely, a more classical profile was observed at the lower dose with the predominance of 1-hydroxypyrene (Fig. 8). This difference of metabolite profile was in good agreement with PAH concentrations measured in the water. Thus, the concentration of dissolved naphthalene was particularly high at the 1/200 exposure with a pyrene/naphthalene ratio of 0.09 versus 1.8 for the 1/2000 exposure, explaining the predominance of hydroxynaphthalenes in the bile for this exposure. Considering phenanthrene metabolites, similar concentrations were measured for the two exposures in spite of phenanthrene concentration twice as high at the higher dose. Furthermore, the EROD activity measured in the liver of soles indicated a slightly higher level for the 1/2000 exposure (Fig.9), which could explain the high biotransformation factors observed at this dose. Considering age groups, metabolite concentrations were generally slightly higher for younger soles (age group 1) (Fig. 8) with biotransformation factors of 63 and 18 l g⁻¹ for the 1/2000 dose and 54 and 10 l g⁻¹ for the 1/200 dose, respectively for age group 1 and 2; Table 4). Those results could explain the stronger bioaccumulation of high molecular weight compounds and alkylated compounds in muscle tissues of older fish, however low molecular weight compounds were more bioaccumulated in younger fish (Fig. 4). Moreover, the EROD activity measured for this age group appeared to be slightly lower than for older fish (Fig. 9).

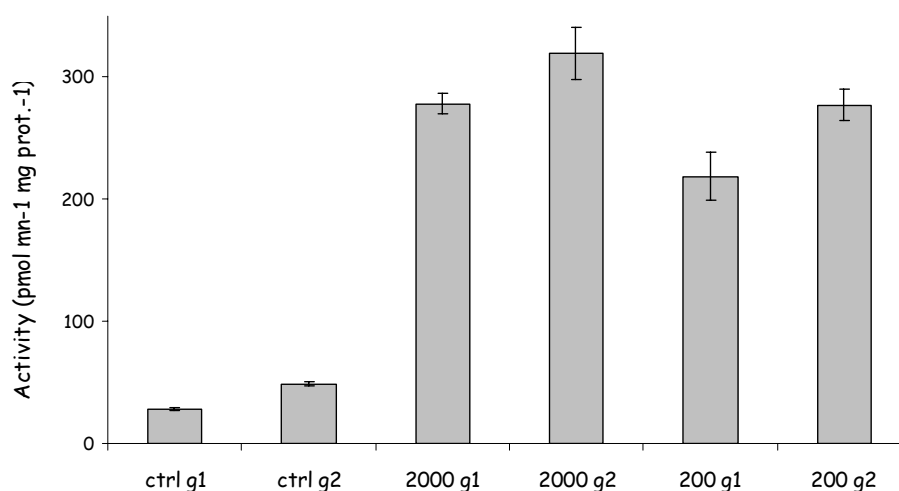


Figure 9 : EROD activity in the liver for the experiment III led at 15°C with the fuel B (n=3). ctrl : control exposure; g1 and 2 : age group 1 and 2.

CONCLUSION

Those experiments first highlight the modification of fingerprint in PAH mixture between fuel, water and tissue compositions. Alkylated compounds were thus predominant in fuel oils and in water while low molecular weight PAHs were predominant in biological tissues.

Moreover, a difference of PAH dissolution of the two heavy fuel oil #6 in water was observed. PAHs were thus largely more dissolved in water when using the heavy fuel oil B than the ones of the heavy fuel A, even taking into account the difference of composition of the two fuel oils. Biotransformation was also more important with fuel B but in a lesser extend than the one expected considering dissolution. On the other hand, bioaccumulation in muscle tissues was not lower with fuel A.

Furthermore, different PAH groups could be distinguished relatively to their fate in the middle and in soles and appeared mainly dependant on the different parameters investigated (temperature, age). Concerning PAH dissolution in the water phase, the distinction made was function of the experimental temperature. Thus, low molecular weight compounds from naphthalene to phenanthrene appeared to be more abundant in water at 15°C than at 5°C and conversely for higher molecular weight compounds. This phenomenon was confirmed by the measurement of higher proportions of low molecular weight PAH metabolites (hydroxynaphthalenes and 2-hydroxybiphenyl) in the bile of fish at 15°C. Moreover, at 15°C, medium and high molecular weight parent compounds (from fluoranthene) and alkylated compounds (of dibenzothiophene, phenanthrene and chrysene) were more abundant in water at the lower exposure than at the higher one. Concerning the accumulation of PAHs in biological tissues, the highest molecular weight compounds (from alkylated phenanthrenes) tended to accumulate more in the liver than in muscles. Furthermore, low molecular weight parent compounds (from biphenyl to dibenzothiophene) were generally accumulated more easily in tissues than higher molecular weight PAHs and alkylated ones. Moreover, younger soles globally tended to accumulate more strongly high molecular weight parent PAHs while older ones accumulated more extensively low molecular weight parent

compounds and alkylated ones. Furthermore, the particularly important dissolution of the lowest molecular weight compounds in water for the 1/2000 exposure of the third experiment was traduced by the predominance of 2-hydroxynaphthalene in the bile of those soles. Finally, from the whole metabolites detected, metabolites of highest molecular weight compounds (phenanthrene and pyrene) globally appeared to be excreted into the gall bladder in more important quantities than low molecular weight ones. Metabolites of the highest molecular weight PAHs studied (chrysene and benzo(a)pyrene) could not be detected.

Moreover, higher biotransformation factors were observed for the lower exposure of each experiment suggesting an alteration of the ability of soles to metabolize PAHs when they are exposed to important concentrations of PAHs. No clear trend was observed for bioconcentration factors.

No difference of metabolization was observed relatively to the gender of fish.

The monitoring of biliary metabolites during depuration periods allowed to follow the kinetic of concentration decrease during the first days of decontamination indicating the relatively rapidity of excretion processes and to observe background levels after several months suggesting no particular memory effect of acute petroleum exposure on metabolite concentration in the gall bladder.

1-hydroxypyrene was identified as the generally predominant metabolite studied (monohydroxylated metabolites of parent compounds). The proportion increase of hydroxyphenanthrene isomers in the bile of soles exposed to fuel oil versus non-exposed ones was also noticed. The use of the 1-hydroxypyrene/hydroxyphenanthrenes ratio could thus be interesting for the determination of PAH contamination sources.

Acknowledgments - This study was supported by the Erika program (Monitoring of the ecological and ecotoxicological consequences of the Erika wreckage), the région Aquitaine, the Seine-Aval program and the BEEP (Biological Effects of Environmental Pollution in Marine Coastal Ecosystems) European project n°EVK3-CT2000-00543.

References

- Ariese F, Kok, SJ, Verkaik M, Gooijer C, Velthorst NH and Hofstraat JW, 1993. Synchronous fluorescence spectrometry of fish bile: A rapid screening method for the biomonitoring of PAH exposure. *Aquat. Toxicol.*, 26 : 273-286.
- Baumard P and Budzinski H, 1997. Internal standard quantification method and Gas Chromatograph-Mass Spectrometer (GC-MS): a reliable tool for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) quantification in natural matrices. *Analisis*, 25 : 246-252.
- Baumard P, Budzinski H and Garrigues P, 1997. Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues by gas chromatography coupled to mass spectrometry : application to mussels. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 359(6) : 502-509.
- Beyer J, Sandvik M, Hylland K, Fjeld E, Egaas E, Aas E, Skåre JU and Goksøyr A, 1996. Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus L.*) and Atlantic cod (*Gadus morhua L.*) exposed by caging to polluted sediments in Sørfjorden, Norway. *Aquat. Toxicol.*, 36 : 75-98.
- Budzinski H, Letellier M, Garrigues P and Le Menach K, 1999. Optimization of the microwave-assisted extraction in open cell of polycyclic aromatic hydrocarbons from soils and sediments : Study of moisture effect. *J. Chrom.*, 837(1-2) : 187-200.
- Fouremant GL, 1989. Enzymes involved in metabolism of PAH by fishes and other aquatic animal: hydrolysis and conjugation enzymes (or phase II enzymes). In (Varanasi U, ed) *Metabolism of PAH in the aquatic environment*, 185-202. CRC, Boca Raton, FL, USA.

- Galgani F and Payne JF, 1991. Biological Effects of contaminants - Microplate method for measurements of ethoxyresorufin o-deethylase (EROD) in fish. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, n°13.
- GESAMP, 1993. Impact of oil and related chemicals and wastes on the marine environment. GESAMP Report 50.
- Goksøyr A, Solbakken JE and Klungsoyr J, 1986. Regioselective metabolism of phenanthrene in Atlantic cod (*Gadus morhua*) : studies on the effects of monooxygenase inducers and role of cytochromes P-450. *Chem.-Biol. Interactions*, 60 : 247-263.
- IARC, 1987. Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42. Lyon, (IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Supplement 7).
- IPCS, 1998. Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. Environmental Health Criteria 202. International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Keith LH and Telliard WA, 1979. Priority pollutants. I. A perspective view., *Environ. Sci. Technol.*, 13 : 416-423.
- Krahn MM, Myers M, Burrows DG and Malins DC, 1984. Determination of metabolites of xenobiotics in bile of fish from polluted waterways. *Xenobiotica*, 14 : 633-646.
- Krahn MM, Rhodes LD, Myers MS, Moore LK, MacLeod WD and Malins DC, 1986. Associations between metabolites of aromatic compounds in bile and the occurrence of hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 15 : 61-67.
- Latimer JS and Zheng J, 2003. The sources, transport, and fate of PAHs in the marine environment. In (Douben PET ed) *PAHs: An ecotoxicological perspective*, 9-34. Ecological and Environmental Toxicology Series, Wiley, UK.

- Law FC, Meng JX, He YT and Chui YC, 1994. Urinary and biliary metabolites of pyrene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica*, 24(3) : 221-229.
- Leonard JD and Hellou J, 2001. Separation and characterization of gall bladder bile metabolites from speckled trout, *Salvelinus fontinalis*, exposed to individual polycyclic aromatic compounds. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20(3) : 618-623.
- Lin ELC, Cormier SM and Torsella JA, 1996. Fish Biliary Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolites Estimated by Fixed-Wavelength Fluorescence: Comparison with HPLC-Fluorescent Detection. *Ecotox. Environ. Saf.*, 35 : 16-23.
- Lowry OH, Rosebrough, NJ, Farr AL and Randall RJ, 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275.
- Luthe G, Stroomberg GJ, Ariese F, Brinkman UAT and van Straalen NM, 2002. Metabolism of 1-fluoropyrene and pyrene in marine flatfish and terrestrial isopods. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 12 : 221-229.
- Mazéas L and Budzinski, 2002. Improved accuracy of GC-MS quantification of aliphatic and aromatic hydrocarbons in marine sediments and petroleums. Validation on reference matrices and application to the Erika oil spill. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 82(3) : 157-173.
- Mazéas O and Budzinski H, submitted (a). Solid phase extraction and purification for individual quantification of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in liquid matrixes. *Anal. Biol. Chem.*
- Mazéas O and Budzinski H, submitted (b). Comparison of analytical methods for the individual detection and quantification of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites. *J. Chromatogr. A.*
- Mazéas O, Budzinski H, Desaunay Y and Tronczynski J, submitted (a). Evaluation of the exposure of bottom fish to the Erika oil spill : biotransformation and bioaccumulation monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.*

- Mazéas O, Budzinski H, Claireaux G and Tronczynski J, *submitted* (b). Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by flat fish in waterborne laboratory exposures to individual polycyclic aromatic hydrocarbons. *Aquat. Toxicol.*
- McElroy AE, Farrington JW and Teal JM, 1989. Bioavailability of PAH in the aquatic environment. In *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment* (Varanasi U, ed), 1-40. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Meador JP, 2003. Bioaccumulation of PAHs in marine invertebrates. In (Douben PET ed) *PAHs: An ecotoxicological perspective*, 147-172. *Ecological and Environmental Toxicology Series*, Wiley, UK.
- Neff JM, 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment : sources, fates and biological effects. London, Applied Sciences Publishers.
- Solbakken JE, Palmork KH, Neppelberg T and Scheline RR, 1980. Urinary and biliary metabolites of phenanthrene in the coalfish (*Pollachius virens*). *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 46 : 127-132.
- Solbakken JE and Palmork KH, 1981. Metabolism of Phenanthrene in various marine animals. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 70 : 21-26.
- Steward AR, Kandaswami C, Chdambaram S, Ziper C, Rutkowski JP and Sikka HC, 1990. Disposition and metabolic fate of benzo[a]pyrene in the brown bullhead. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9 : 1503-1512.
- Tronczynski J (coordination), Munsch C, Boutier B, Averty B, Guiot N, Moisan K, Truquet I and Dugrais L, 2003. Etude comparative de la contamination des sédiments par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) avant et après le naufrage de l'Erika ; Etude et suivi de la contamination de la colonne d'eau (SEDERIKA). In Suivi des conséquences écologiques et écotoxicologiques dues au naufrage de l'Erika ; Volet 1 : Etendues spatiale et temporelle : répartition dans le milieu. Rapport annuel 2003.
- US-EPA, 1993. Provisional guidance for quantitative risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons. EPA/600/R-93/089, US Environmental Protection Agency, Office of Health and

Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office, Cincinnati, Ohio, USA.

U.S. National Academy of Sciences, 2003. Oil in the sea III: inputs, fates, and effects. National Research Council. The National Academies Press.

van der Oost R, Beyer J and Vermeulen NPE, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 13 : 57-149.

Varanasi U, Stein JE and Nishimoto M, 1989. Biotransformation and disposition of PAH in fish. In (Varanasi U, ed) *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*, 93-149. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Exposure of two fish species to dispersed crude oil : determination of individual biliary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons and evaluation of the additive effect of alkylphenols

Olivier Mazéas^{1,2}, Hélène Budzinski*¹, Jacek Tronczynsky²

¹ Laboratoire de Physico- et Toxicochimie des Systèmes Naturels, UMR 5472 CNRS, Université Bordeaux 1, 351 cours de la libération, 33405 Talence, France

² IFREMER, Département des Polluants Chimiques, Rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes cedex 03, France

* Corresponding author

Email: h.budzinski@lptc.u-bordeaux1.fr

Phone : 33 (0)5 40 00 69 98

Fax: 33 (0)5 40 00 69 98

Abstract - Turbots and cods were exposed to dispersed crude oil and dispersed crude oil associated with alkylphenols during 3 weeks. At the end of the experiment, the gall bladder was sampled for the determination of different PAH metabolites in the bile. This experiment was performed to evaluate the profile of PAH metabolites of fish exposed to crude oil by a quantitative analytical method, gas chromatography coupled with mass spectrometry after sample cleanup by solid phase extraction (SPE). Because of increasing release of alkylphenols associated to oil in discharged water from offshore petroleum activities, this work include the study of the effect of alkylphenols associated to crude oil on PAH metabolism.

An important increase in biliary PAH metabolite concentration was particularly observed in cods exposed to contaminants. 9-hydroxyfluorene was the main metabolite among the ones studied. No significant additional effect of alkylphenols on PAH metabolism (or, at least, on metabolite excretion in the gall bladder) was observed. However, an insignificant trend of increase was observed in this case, especially for 9-hydroxyfluorene.

Keywords : PAHs, metabolites, crude oil, fish bile, GC/MS.

INTRODUCTION

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous contaminants of the environment (McElroy et al., 1989). The marine compartment appears to be an endpoint of those chemicals by the way of terrestrial runoffs, atmospheric depositions and petroleum releases (Neff, 1979; GESAMP, 1990). To assess the significance of such a contamination on organisms, the quantification of PAHs in marine organism tissues is usually carried out. However, depending on the ability of organisms to metabolize PAHs, measurement of the bioaccumulated part of the PAHs absorbed can be restrictive and not representative of the environmental contamination due to their transformation into more toxic molecules than parent ones (Varanasi et al., 1989). In this way, the study of PAH fate in marine organisms appears to be more and more necessary in order to access bioavailability and toxicity of those contaminants.

Petrogenic PAHs are introduced in marine environment in the form of oil coming from natural seeps, petroleum transportation (dumping, oil spills, charge and discharge operations) and offshore petroleum extraction (Neff, 1979; National Research Council, 2003). Oil is a mixture formed by the slow maturity of organic matter in the deep sedimentary compartment. Those mixtures are constituted of 25 to 40% of aromatic compounds (Tissot and Welte, 1978).

Biliary metabolites of PAHs have been shown to be particularly efficient biomarkers of PAH exposition (van der Oost, 2003). Metabolites are usually determined semi-quantitatively as global fluorescent aromatic compound equivalents (FACs) in the bile of fish (Krahn et al., 1984 and 1986; Ariese et al., 1993; Lin et al., 1996; Beyer et al., 1996). The present work consists in the application of an analytical protocol previously described (Mazéas and Budzinski, submitted (a)) for the determination of individual metabolites quantitatively in the bile of fish. The studied metabolites are monohydroxylated PAHs, which are known to be some of the major metabolites produced by fish, present in their free form or conjugated with glucuronide, sulfate, glutathione groups... (Varanasi et al., 1989; Foureman, 1989; Steward et al., 1990; Law et al., 1994; Leonard and Hellou, 2001; Luthe 350

et al., 2002), and extensively excreted into the gall bladder (Lee et al., 1972; Statham et al., 1976; Varanasi et al, 1989; Steward et al., 1990; Varanasi and Stein, 1991). The following compounds were chosen because they are potential metabolites of priority PAHs listed by the US-EPA (United-States Environmental Protection Agency) for their interest in environmental surveys (Keith and Telliard, 1979) : 1- and 2-hydroxynaphthalene (1- and 2-OHN), 9-hydroxyfluorene (9-OHFe), 1-, 2-, 3-, 4- and 9-hydroxyphenanthrene (1-, 2-, 3-, 4- and 9-OHPhe), 1-hydroxypyrene (1-OHP), 1-hydroxychrysene (1-OHC) and 3-hydroxybenzo(a)pyrene (3-OHBaP). 2-hydroxybiphenyl (2-OHBi) was added to this study due to the abundance of biphenyl in the environment.

In the present study, we have applied an analytical protocol previously described (Mazéas and Budzinski, submitted (a)) for the determination of hydroxy-metabolites of PAHs in the bile of two fish species, turbot and cod, exposed to dispersed crude oil. The aim of this study was first to determine the PAH metabolite profile for the two studied species. On the other hand, offshore petroleum activities release increasing amounts of alkylphenols in North European sea by the way of discharged water (Meier et al., 2002). Thus, fish have been additionally exposed to dispersed crude oil associated to a mixture of alkylphenols in order to evaluate the potential effect of those endocrine disruptors on PAH metabolism.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals, solvents and reagents

1- and 2-hydroxynaphthalene (1- and 2-OHN) were purchased from Lancaster (Bischheim, France), 2-hydroxybiphenyl (2-OHBi), 9-hydroxyfluorene (9-OHFe) and 1-hydroxypyrene (1-OHP) from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Falavier, France), 1-, 2-, 3-, 4-, 9-hydroxyphenanthrene (1-, 2-, 3-, 4- and 9-OHPhe), 1-hydroxychrysene (1-OHC) and 3-hydroxybenzo(a)pyrene (3-OHBaP) from Promochem (Molsheim, France). 1-hydroxypyrene deuterated (1-OHP-d9) and phenanthrene perdeuterated (Phe-d10) were obtained from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA,

USA). The standard reference material SRM 2260, constituted of about 20 aromatic compounds, was provided by the U.S. National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, MD, USA). Perdeuterated aromatic compounds were purchased from MSD Isotopes (Montreal, CN). The antioxidant agent β -mercaptoethanol and the derivatization agent bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) were from Acros organics (Noisy-Le-Grand, France). β -glucuronidase/aryl sulfatase mixture, 100000 et 7500 u/ml respectively, and Supelclean LC-NH₂ cartridges were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Falavier, France). Bakerbond C₁₈ cartridges and methylene chloride Ultra Resi-Analysed were obtained from Atlantic Labo (Eysines, France). Methanol Suprasolv, acetic acid (100% Normapur), aluminium oxide (150 basic type T; 0.063-0.2 mm) and silica gel 60 (0.063-0.2 mm) were provided by VWR (Strasbourg, France).

Fish

Farmed juvenile Atlantic cods (*Gadus morhua*) and juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) were kept for 2 weeks with running seawater previously passed through a sand filter.

Experimental design

Fish were exposed to a theoretical concentration of 0.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dispersed North Sea crude oil (Statfjord C) (oil) and to the same concentration of dispersed North Sea crude oil spiked with 0.15 $\mu\text{g g}^{-1}$ of a mixture of alkylphenols (AP) (Chiron a/s, Trondheim, Norway) during three weeks. The actual concentration of crude oil was $0.515 \pm 0.218 \mu\text{g g}^{-1}$ for the oil exposure and $0.484 \pm 0.114 \mu\text{g g}^{-1}$ for the oil+AP exposure (n=3). In the same time, alkylphenol concentration globally varied from 0.119 $\mu\text{g g}^{-1}$ to 0.160 $\mu\text{g g}^{-1}$ for all the tanks.

Crude oil was constituted of 1.5% of PAHs and the mixture of alkylphenols contained p-cresol, m-ethylphenol, 3,5-dimethylphenol, 2,4,6-trimethylphenol, 2-(1,1-dimethyl)ethylphenol, 3-

(1,1-dimethyl)ethylphenol, 4-butylphenol and penthylphenol. Acetone was used as solvent carrier for alkylphenols. A control group exposure was also realized.

Fish were exposed to dispersed contaminants by means of a continuous flow system equipped with a high pressure mixing valve (Sanni et al. 1998). High precision peristaltic pumps were used to dose the stock solutions. The temperature of the seawater in the tanks varied from 10°C to 12°C during the experiment and the salinity was 34‰. Fish were fed daily with dried pellets (Felleskjøpet Fiskefor AS, Norway) during the first two weeks.

At the end of the 3 week exposure, fish (5 cods and 10 turbot per exposure) were killed and the gall bladder was sampled and stored in microtubes at -80°C.

Determination of PAH concentration in crude oil

Crude oil was analyzed in triplicate according to the protocol described by Mazéas and Budzinski (2002). Crude oil was dissolved in methylene chloride after the addition of perdeuterated PAHs as internal standards. Samples were then purified on aluminium oxide and silica gel according to a procedure adapted from Behar et al., 1989 (Baumard et al., 1997). The glassware was washed with detergents and pyrolysed (6 h, 450°C) before use. Manipulation blanks were performed to control potential contamination.

Extracts were analysed by an HP GC 6890A gas chromatograph Agilent Technologies (automated PTV pulsed splitless injection; purge delay: 1 min and purge flow: 60.6 ml/min; injector temperature: 270°C; interface temperature: 280°C; oven temperature: from 70°C (2 min) to 300°C (5 min) at 2°C/min) coupled to an HP MSD 5973 Network mass spectrometer Agilent Technologies (electron impact: 70 eV; voltage: 2000 V; source temperature: 150°C), both purchased from BIOS Analytique (l'Union, France). Analyses were performed in the SIM (selected ion monitoring) mode at 1.3 scan/s using the molecular ions of the studied compounds. The capillary column was an

HP5/MS Agilent Technologies (30 m x 0.25 mm ID x 0.25 film thickness) provided by BIOS Analytique (l'Union, France) and the carrier gas was helium 6.0 obtained from Linde (Toulouse, France).

Different perdeuterated polycyclic aromatic hydrocarbons were used as internal standards for each class of aromaticity (Baumard and Budzinski, 1997). The response factors of PAHs relatively to perdeuterated PAHs were determined for each GC/MS sequence by injecting a mixture containing a solution of PAHs (SRM 2260) and the solution of perdeuterated PAHs used for spiking samples.

Determination of metabolites in bile samples

The protocol used for the determination of biliary metabolite concentrations is described by Mazéas and Budzinski (submitted (a)). In a first step, individual bile samples were pooled in order to obtain sufficient volumes of sample. When possible, replicates were performed.

1-hydroxypyrene deuterated, used as internal standard, and β -mercaptoethanol, used as antioxidant, were added to 100 μ l of bile. The sample was treated by β -glucuronidase and aryl-sulfatase for deconjugation (24h, 37°C) in 2 ml of acetate buffer (adjusted to pH=5). Free metabolites were then extracted by solid-phase extraction (SPE) on C₁₈ cartridges and purified on LC-NH₂ cartridges. Extracts were evaporated to dryness under a nitrogen stream and reconstructed in methylene chloride. After derivatization with BSTFA (30 min, 65°C), phenanthrene perdeuterated was added to the samples to check for 1-hydroxypyrene-d₉ recovery and analyses were performed by the same type of GC/MS as reported for PAH analysis (automated PTV pulsed splitless injection (25 psi, 1.5 min); purge delay: 1.5 min and purge flow: 60 ml/min; injector temperature: 250°C; interface temperature: 280°C; oven temperature: from 70°C (2 min) to 180°C (1 min) at 5°C/min and from 180°C to 290°C (1 min) at 10°C/min; electron impact: 70 eV; voltage: 2000 V; source temperature: 150°C; 1.53 scan/s; dwell time: 50 ms for each ion). The capillary

column was an HP5/MS Agilent Technologies (30 m x 0.25 mm ID x 0.25 film thickness; BIOS Analytique, l'Union, France) and the carrier gas was helium 6.0 from Linde (Toulouse, France).

The compounds were quantified in SIM mode using the ions below : 1- hydroxynaphthalene (m/z=201), 2-hydroxynaphthalene (m/z=216), 2-hydroxybiphenyl (m/z=211), 9-hydroxyfluorene (m/z=165), 9-hydroxyphenanthrene (m/z=266), 1-hydroxypyrene (m/z=290), 1-hydroxychrysene (m/z=316) and 3-hydroxybenzo(a)pyrene (m/z=340).

A mixture constituted of standard metabolites and 1-hydroxypyrene-d9 is injected at the beginning and at the end of each GC/MS sequence for response factor determination and a manipulation blank is performed together with samples to control potential contamination.

Biliary protein concentration was determined by the method of Lowry et al. (1951) adapted to microplates in order to take into account potential differences of bile dilution.

RESULTS AND DISCUSSION

Composition of the North Sea crude oil

The PAH profile of the North Sea crude oil was first characterized. The obtained results (Table 1) put in evidence the classical fingerprint of this crude oil, with large amounts of low molecular weight PAHs, in particular naphthalenes (N and C_x-N), a predominance of alkylated compounds (C_x-N, C_x-DBT, C_x-Phe and C₁-C) relatively to parent ones and the presence of high molecular weight PAHs only at trace level. The predominance of phenanthrene relatively to its isomer, anthracene, is also characteristic of crude oil, which is formed at temperatures too low for anthracene production.

Table 1 : PAH composition of the North Sea crude oil in $\mu\text{g g}^{-1}$ (3 replicates).

Compounds	Average concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Standard deviation ($\mu\text{g g}^{-1}$)
N	1204.50	24.50
C ₁ -N	4664.97	85.98
C ₂ -N	6810.63	151.98
C ₃ -N	5091.76	160.85
C ₄ -N	2512.93	131.55
Bi	442.00	29.00
Fe	117.92	0.42
DBT	77.73	1.54
C ₁ -DBT	247.88	2.87
C ₂ -DBT	312.85	5.64
Phe	231.80	9.21
A	7.78	1.65
C ₁ -Phe	555.17	24.74
C ₂ -Phe	636.50	10.15
C ₃ -Phe	433.03	16.64
F	11.05	1.06
P	8.79	0.38
BaA	3.95	0.67
T + C	26.55	0.91
C ₁ -C	58.34	1.23
BbF + BkF+BjF	6.21	0.55
BeP	5.54	0.62
BaP	1.02	0.11
Per	0.82	0.23
IP	0.83	0.21
DB(ah)A + DB(ac)A	1.08	0.05
BPer	2.47	0.21

PAH metabolites

Concentrations are expressed per gram of bile and not per mg of proteins because of insignificant differences in protein concentrations for the different exposures and fish. The average protein concentration is $30 \pm 3 \text{ mg g}^{-1}$ of bile.

Four metabolites are not detected in any of the exposure groups, 2-hydroxybiphenyl ($<1.5 \text{ ng g}^{-1}$), 4-hydroxyphenanthrene ($<1.1 \text{ ng g}^{-1}$), 1-hydroxychrysene ($<1.3 \text{ ng g}^{-1}$) and 3-hydroxybenzo(a)pyrene ($<50 \text{ ng g}^{-1}$). The lack of benzo(a)pyrene (BaP) metabolite detection can be

explain by the presence of BaP at low level in the crude oil used and by its high detection limit. Moreover, 9-hydroxyphenanthrene was not detected in control fish.

Results are presented in Tables 2 and 3. They show a great increase in PAH metabolite concentrations for the two contaminant exposures considering total concentrations (Fig. 1), particularly for cods. A higher increase of total metabolites is noticeable for cods in comparison to turbot (Fig. 2). Moreover, a slightly global trend of higher concentrations for both species in the presence of alkylphenols is observed but this difference is not significant.

Table 2 : PAH metabolite concentration in turbot bile expressed in ng/g of bile (standard deviations on triplicates).

	Control	Oil	Oil+AP
1-OHN	12±4	89±18	62±14
2-OHN	19±1	57±6	69±9
9-OHFe	244±54	2417±301	2630±401
9-OHPhe	<1	78±4	56±2
3-OHPhe	9±4	257±11	236±21
1-OHPhe	<1	689±39	810±44
2-OHPhe	41±3	232±41	255±30
1-OHP	49±2	276±6	288±6

Table 3 : PAH metabolite concentration in cod bile expressed in ng/g of bile (deviation from the mean on duplicates).

	Control	Oil	Oil+AP
1-OHN	<1	59	63±36
2-OHN	22	291	194±80
9-OHFe	90	2869	3876±500
9-OHPhe	<1	92	64±20
3-OHPhe	53	846	650±19
1-OHPhe	4	525	563±22
2-OHPhe	53	1467	1085±37
1-OHP	67	338	341±12

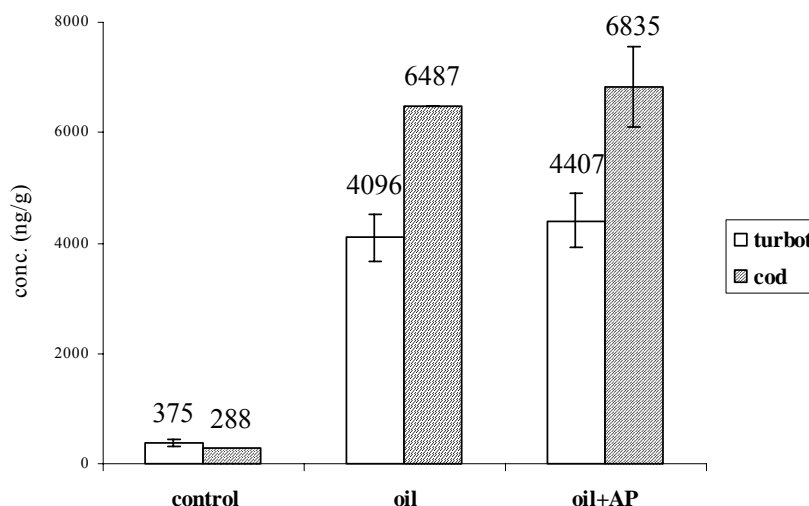


Figure 1 : Total concentration of PAH metabolites in the bile. 3 replicates for turbot and 2 for oil+AP cods.

Individual results highlight the predominance of 9-hydroxyfluorene for both exposures and for both fish, except for the exposition of cod to oil (see Fig. 2) where the sum of hydroxyphenanthrenes is equivalent to 9-hydroxyfluorene. This predominance was quite unexpected with regards to the composition of the oil where phenanthrene and above all naphthalene are far more abundant than fluorene. This result presupposes an easier biotransformation of fluorene or a main conversion in the single 9 position. On this subject, the low rate of biotransformation of naphthalene relatively to other PAHs, especially benzo(a)pyrene, as been put in evidence yet (Schnell et al., 1980 ; Varanasi et Gmur, 1981). The small amounts of hydroxynaphthalenes can also be explained by the volatilization of naphthalene which is very volatile and the direct excretion of a part of the naphthalene absorbed through the gill and the skin without prior metabolization (Varanasi et al., 1978, 1985; Thomas and Rice, 1981 and 1982; Solbakken et al., 1984). Escartín and Porte (1999) showed substantial amounts of 9-hydroxyfluorene in bile of fish, *Mullus barbatus* and *Serranus cabrilla*, from the Mediterranean Sea but this one represented the major metabolite in a single location and for only one specie. In the other sites, 1-hydroxypyrene was generally the major compound, which is in accordance with our

previous results on soles (Mazéas et al., submitted (a), (b) and (c)) and flounders (Mazéas et al., submitted (d)). In the present study, 1-hydroxypyrene is largely less abundant than 9-hydroxyfluorene and even less than some isomers of hydroxyphenanthrene. This low level could be attributed to the small concentration of pyrene in the crude oil ($9 \mu\text{g g}^{-1}$).

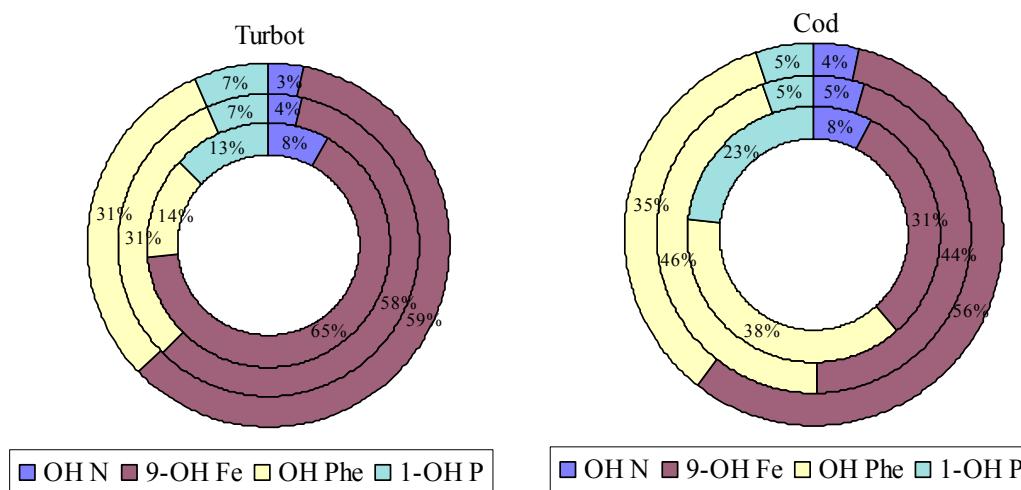


Figure 2 : Percentage of the different classes of compounds in the control group (internal ring), the oil exposure (middle ring) and in the oil+AP exposure (external ring). “OH N” represents the sum of 1- and 2-OH N and “OH Phe” represents the sum of hydroxyphenanthrene isomers.

In term of relative composition (Fig. 2), 9-hydroxyfluorene is predominant relatively to the sum of hydroxyphenanthrene isomers for turbot whereas the two classes are globally equivalents for cods. A relative increase of hydroxyphenanthrenes in comparison to hydroxynaphthalenes and 1-hydroxypyrene is noted for turbot. On the other hand, 9-hydroxyfluorene proportion is relatively constant (from 58 to 65%). No effect of alkylphenols on relative composition is observed. Considering cods, the part of 9-hydroxyfluorene increases from 31% for the control group to 44% for the oil one. 56% is reached in the presence of alkylphenols. At the same time, the sum of hydroxyphenanthrenes is relatively stable for the three experiments (from 35 to 46%). So, as an offset to the increase of 9-hydroxyfluorene, the main decrease affects 1-hydroxypyrene which concentration is approximately divided by 5 for both contaminant exposure (from 23 to 5%).

The relative distribution of the different hydroxyphenanthrene isomers has also been studied. No important effect is observed between the oil group and the oil associated with alkylphenols group. Furthermore, it is interesting to note that the profile of hydroxyphenanthrenes is different between species (Fig. 3). In control fish, 2-hydroxyphenanthrene is the major isomer for turbot whereas 3-hydroxyphenanthrene is nearly as important as 2-hydroxyphenanthrene for cods. Differences of profile are also evident between control fish and contaminated ones. This indicates a modification in phenanthrene biotransformation when fish are exposed to oil or a modification in preferential excretion in the gall bladder. P-450 enzymes seem to oxidize preferentially the position 1 of phenanthrene when fish are exposed to the crude oil. This is correlated with the decrease of the relative amount of 2-hydroxyphenanthrene for turbot and cods. The predominance of isomers 1-, 2- and 3- of hydroxyphenanthrene relatively to the 4- and 9- ones in the bile of fish exposed to phenanthrene was also demonstrated in different studies where analyses were performed by GC/MS (Solbakken et al., 1980; Solbakken and Palmork, 1981; Goksøyr et al., 1986) which allows a good separation of the different isomers contrary to high-pressure liquid chromatography (HPLC; Mazéas and Budzinski, submitted (b)). However, liver microsomes of brown bullhead were shown to produce mainly 4-hydroxyphenanthrene, but this result was obtained by HPLC with coelutions of isomers 2 and 3, 1 and 9 (Pangrekar et al., 2003a). This could also indicate a different way of conjugation of isomers 4 and 9, such as sulfation, which would favour excretion via urine (Pritchard and Bend, 1984). The predominance of non K-region metabolites has also been observed for other PAHs such as BaP and seems to be classical for bony fish, contrary to cartilaginous fish, crustaceans and mammals (Ahokas et al., 1979; Kurelec et al., 1979; Prough et al., 1979; Varanasi and Gmur, 1980a,b; Solbakken and Palmork, 1981; Stegeman et al., 1982; Egaas and Varanasi, 1982; Tan and Melius, 1986; Varanasi et al., 1986; Sikka et al., 1990 and 1991; Zalewski et al., 1991; Yuan et al., 1999; Pangrekar et al., 2003 (a) and (b)).

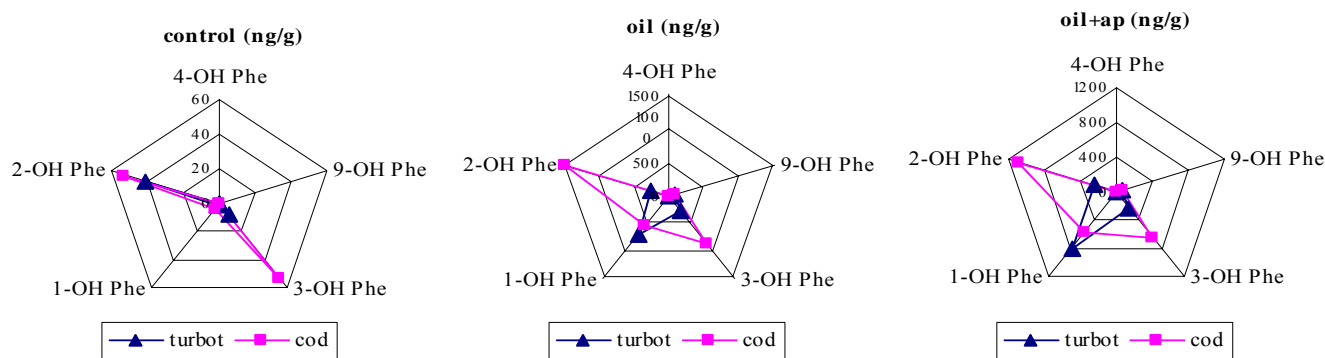


Figure 3 : Representation of the contribution of hydroxyphenanthrene isomers for both fish.

CONCLUSION

An important increase in biliary PAH metabolite concentration was observed when exposing turbot and cods to oil and to oil associated with alkylphenols. However, cods presented higher concentrations than turbot. 9-hydroxyfluorene was the main metabolite (among the one studied) in the bile of those fish. No significant additional effect of alkylphenols on PAH metabolism (or, at least, on metabolite excretion in the gall bladder) was observed. However, an insignificant trend of increase in metabolite level could be noted for both species. When exposed to the mixture of oil and alkylphenols, an increase of the relative abundance of 9-hydroxyfluorene was observed for cods but no significant trend can be discussed because insufficient amounts of bile were available to perform replicates. Furthermore, differences of isomeric hydroxyphenanthrene profiles were also observed between species and between control fish and the ones exposed to contaminants. Moreover, those two bony fish exhibit high amounts of non K-region hydroxyphenanthrenes in their bile in opposition with cartilaginous fish, crustaceans and mammals.

Acknowledgments – This research was supported in part by the région Aquitaine, the Erika program (Monitoring of the ecological and ecotoxicological consequences of the Erika wreckage) and the BEEP (Biological Effects of Environmental Pollution in Marine Coastal Ecosystems) European project n°EVK3-CT2000-00543.

References

- Ahokas JT, Saarni DW, Nebert DW and Pelkonen O, 1979. The in vitro metabolism and covalent binding of benzo[a]pyrene to DNA catalysed by trout liver microcosms. *Chem.-Biol. Interact.*, 25 : 103-111.
- Ariese F, Kok SJ, Verkaik M, Gooijer C, Velthorst NH and Hofstraat JW, 1993. Synchronous fluorescence spectrometry of fish bile: A rapid screening method for the biomonitoring of PAH exposure. *Aquat. Toxicol.*, 26 : 273-286.
- Baumard P and Budzinski H, 1997. Internal standard quantification method and Gas Chromatographe-Mass Spectrometer (GC-MS): a reliable tool for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) quantification in natural matrices. *Analusis*, 25 : 246-252.
- Baumard P, Budzinski H and Garrigues P, 1997. Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues by gas chromatography coupled to mass spectrometry : application to mussels. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 359(6) : 502-509.
- Behar F, Leblond C, Saint Paul C, 1989. Analyse quantitative des effluents de pyrolyse en milieu ouvert et fermé. *Rev. Inst. Français du pétrole*, 44 : 387-509.
- Beyer J, Sandvik M, Hylland K, Fjeld E, Egaas E, Aas E, Skåre JU and Goksøyr A, 1996. Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed by caging to polluted sediments in Sør fjorden, Norway. *Aquat. Toxicol.*, 36 : 75-98.

- Egaas E and Varanasi U, 1982. Effects of polychlorinated biphenyls and environmental temperature on *in vitro* formation of benzo[a]pyrene metabolites by liver of trout (*Salmo gairdneri*). *Biochem Pharm.* 31(4) : 561-566.
- Escartín E and Porte C, 1999. Assessment of PAH pollution in coastal areas from the NW Mediterranean through the analysis of fish bile. *Mar. Poll. Bull.*, 38(12) : 1200-1206.
- Foureman GL, 1989. Enzymes involved in metabolism of PAH by fishes and other aquatic animal: hydrolysis and conjugation enzymes (or phase II enzymes). In *Metabolism of PAH in the aquatic environment* (Varanasi U, ed), 185-202. CRC Press, Boca Raton, FL.
- GESAMP (Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution), 1990. The State of the Marine Environment. IMO/FAO/UNESCO-IOC/WMO/WHO/IAEA/UN/ UNEP, Rep. Stud. GESAMP No. 39, 111pp, London.
- Goksøyr A, Solbakken JE and Klungsøyr J, 1986. Regioselective metabolism of phenanthrene in atlantic cod (*Gadus morhua*) : studies on the effects of monooxygenase inducers and role of cytochromes *P-450*. *Chem.-Biol. Interactions*, 60 : 247-263.
- Keith LH and Telliard WA, 1979. Priority pollutants. I. A perspective view. *Environ. Sci. Technol.*, 13 : 416-423.
- Krahn MM, Myers M, Burrows DG and Malins DC, 1984. Determination of metabolites of xenobiotics in bile of fish from polluted waterways. *Xenobiotica*, 14 : 633-646.
- Krahn MM, Rhodes LD, Myers MS, Moore LK, MacLeod WD and Malins DC, 1986. Associations between metabolites of aromatic compounds in bile and the occurrence of hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 15 : 61-67.
- Kurelec B, Matijasevic Z, Rijavec M, Alacevic M, Britvic S, Muller WEG and Zhan RK, 1979. Induction of benzo(a)pyrene monooxygenase in fish and the Salmonella test as a tool for detecting mutagenic/carcinogenic xenobiotics in the aquatic environment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 21 : 799-807.

- Law FC, Meng JX, He YT and Chui YC, 1994. Urinary and biliary metabolites of pyrene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica*, 24(3) : 221-229.
- Lee RF, Sauerheber R and Dobbs GH, 1972. Uptake, metabolism, and discharge of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine fish. *Mar. Biol.*, 17 : 201-208.
- Leonard JD and Hellou J, 2001. Separation and characterization of gall bladder bile metabolites from speckled trout, *Salvelinus fontinalis*, exposed to individual polycyclic aromatic compounds. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20(3) : 618-623.
- Lin ELC, Cormier SM and Racine RN, 1994. Synchronous fluorometric measurement of metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in the bile of brown bullhead. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13 : 707-715.
- Lowry OH, Rosebrough, NJ, Farr AL and Randall RJ, 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275.
- Luthe G, Stroomberg GJ, Ariese F, Brinkman UAT and van Straalen NM, 2002. Metabolism of 1-fluoropyrene and pyrene in marine flatfish and terrestrial isopods. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 12 : 221-229.
- Mazéas L and Budzinski, 2002. Improved accuracy of GC-MS quantification of aliphatic and aromatic hydrocarbons in marine sediments and petroleums. Validation on reference matrices and application to the Erika oil spill. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 82(3) : 157-173.
- Mazéas O and Budzinski H, *submitted* (a). Solid phase extraction and purification for individual quantification of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in liquid matrixes. *Anal. Biol. Chem.*
- Mazéas O and Budzinski H, *submitted* (b). Comparison of analytical methods for the detection and quantification of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites. *J. Chrom. A*
- Mazéas O, Budzinski H, Claireaux G and Tronczynski J, *submitted* (a). Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by flat fish in waterborne laboratory exposures to individual polycyclic aromatic hydrocarbons. *Aquat. Toxicol.*

- Mazéas O, Budzinski H, Claireaux G, Désaunay Y and Tronczynski J, *submitted* (b). Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons from heavy fuel oil in the marine environment : study of biotransformation by fish in laboratory experiments. *Environ. Toxicol. Chem.*
- Mazéas O, Budzinski H, Désaunay Y and Tronczynski J, *submitted* (c). Evaluation of the exposure of bottom fish to the Erika oil spill : biotransformation and bioaccumulation monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.*
- Mazéas O, Budzinski H and Tronczynski J, *submitted* (d). Evaluation of the exposure of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons in the Seine River mouth through bile metabolites monitoring; comparison with other French Atlantic sites.. *Mar. Pollut. Bull.*
- McElroy AE, Farrington JW and Teal JM, 1989. Bioavailability of PAH in the aquatic environment. In *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment* (Varanasi U, ed), 1-40. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Meier S, Andersen TE, Hasselberg L, Kjesbu OS, Klunsøyr J and Svardal A, 2002. Hormonal effects of C4-C7 alkylphenols on cod (*Gadus morhua*). 1997-2001 project report of the Institute of Marine Research of Norway (<http://www.imr.no>).
- National Research Council, 2003. Oil in the sea III: inputs, fates, and effects. The National Academies Press.
- Neff JM, 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment : sources, fates and biological effects. London, Applied Sciences Publishers.
- Pangrekar J, Kole PL, Honey SA, Kumar S and Sikka HC, 2003a. Metabolism of phenanthrene by brown bullhead liver microcosms. *Aquat. Toxicol.*, 64 : 407-418.
- Pangrekar J, Kole PL, Honey SA, Kumar S and Sikka HC, 2003b. Metabolism of chrysene by brown bullhead liver microcosms. *Toxicol. Sci.*, 71 : 67-73.
- Pritchard JB and Bend JR, 1984. Mechanisms controlling the renal excretion of xenobiotics in fish: Effects of chemical structure. *Drug Metab. Rev.*, 15 : 655-671.

- Prough RA, Patrizi VW, Okita RT, Masters B and Jacobsson SW, 1979. Characteristics of benzo[a]pyrene metabolism in kidney, liver and lung microsomal fractions from rodents and humans. *Cancer Res.*, 39 : 1190-1206.
- Sanni S, Øysæd KB, Høivangli V, Gaudebert B, 1998. A continuous flow system (CFS) for chronic exposure of aquatic organisms. *Mar. Environ. Res.*, 46(1-5) : 97-101.
- Schnell JV, Gruger EH and Malins DC, 1980. Monooxygenase activities of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) liver microcosms using three polycyclic aromatic hydrocarbon substrates. *Xenobiotica*, 10 : 229-234.
- Sikka HC, Rutkowski JP and Kandaswami C, 1990. Comparative metabolism of benzo[a]pyrene by liver microcosms from brown bullhead and carp. *Aquat. Toxicol.*, 16 : 101-112.
- Sikka HC, Steward AR, Kandaswami C, Rutkowski JP, Zaleski J, Kumar S, Earley K and Gupta RC, 1991. Metabolism of benzo[a]pyrene and persistence of DNA adducts in the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 100(1-2) : 25-28.
- Solbakken JE, Palmork KH, Neppelberg T and Scheline RR, 1980. Urinary and biliary metabolites of phenanthrene in the coalfish (*Pollachius virens*). *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 46 : 127-132.
- Solbakken JE and Palmork KH, 1981. Metabolism of Phenanthrene in various marine animals. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 70 : 21-26.
- Solbakken JE, Solberg M and Palmork KH, 1984. A comparative study on the disposition of three aromatic hydrocarbons in flounder (*Platichthys flesus*). *FiskDir. Skr. Ser. Havunders.*, 17 : 473.
- Statham CN, Melancon MJ and Lech JJ, 1976. Bioconcentration of xenobiotics in trout bile: a proposed monitoring aid for some waterborne chemicals. *Science*, 193 : 680-681.
- Stegeman JJ, Skopek T and Thilly W, 1982. Bioactivation of polycyclic aromatic hydrocarbons to cytotoxic and mutagenic products by marine fish. In Symposium: Carcinogenic polynuclear aromatic hydrocarbons in the marine environment (Richards N, ed), 201-211. U. S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

- Steward AR, Kandaswami C, Chdambaram S, Ziper C, Rutkowski JP and Sikka HC, 1990. Disposition and metabolic fate of benzo[a]pyrene in the brown bullhead. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9 : 1503-1512.
- Tan B and Melius P, 1986. Polynuclear aromatic hydrocarbon metabolism in fishes. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 83 : 217-224.
- Thomas RE and Rice SD, 1981. Excretion of aromatic hydrocarbons and their metabolites by freshwater and seawater Dolly Varden char. In *Biological monitoring of marine pollutants* (Vernberg J, Calabrese A, Thurberg FP and Vernberg WB eds), 425. Academic Press, New York.
- Thomas RE and Rice SD, 1982. Metabolism and clearance of phenolic and mono-, di- and polynuclear aromatic hydrocarbons by Dolly Varden char. In *Physiological Mechanisms of Marine Pollutant Toxicity* (Vernberg J, Calabrese A, Thurberg TP and Thurberg WB eds), 161. Academic Press, New York.
- Tissot BP and Welte DH, 1978. Petroleum formation and occurrence. A new approach to oil and gas exploration. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- van der Oost R, Beyer J and Vermeulen NPE, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 13 : 57-149.
- Varanasi U, Uhler M, and Stranahan SI, 1978. Uptake and release of naphthalene and its metabolites in skin and epiderm mucus of salmonids. *Toxicology and applied pharmacology*, 44 : 277-289.
- Varanasi U and Gmur DJ, 1980a. Metabolic activation and covalent binding of benzo[a]pyrene to deoxyribonucleic acid catalysed by liver enzymes of marine fish. *Biochem Pharm*, 29 : 753-761 .
- Varanasi U and Gmur DJ, 1980b. *Fedn Proc.*, 38 : 662.

- Varanasi U and Gmur DJ, 1981. Hydrocarbons and metabolites in English sole (*Parophrys vetulus*) exposed simultaneously to [³H]benzo(a)pyrene and [¹⁴C]naphthalene in oil-contaminated sediment, *Aquatic Toxicology*, 1 : 49-67.
- Varanasi U, Reichert WL, Stein JE, Brown DW and Sanborn HR, 1985. Bioavailability and biotransformation of aromatic hydrocarbons in benthic organisms exposed to sediment from an urban estuary. *Environ. Sci. Technol.*, 19 : 836-841.
- Varanasi U, Nishimoto M, Reichert WL and Eberhart B-TL, 1986. Comparative metabolism of benzo(a)pyrene and covalent binding to hepatic DNA in English sole, starry flounder, and rat. *Cancer Res.*, 46 : 3817-3824.
- Varanasi U, Stein JE and Nishimoto M, 1989. Biotransformation and disposition of PAH in fish. In *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment* (Varanasi U, ed), 93-149. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Varanasi U and Stein JE, 1991. Disposition of xenobiotic chemicals and metabolites in marine organisms. *Environ. Health Perspect.*, 90 : 93-100.
- Yuan Z-X, Honey SA, Kumar S and Sikka HC, 1999. Comparative metabolism of dibenzo[a,l]pyrene by liver microcosms from rainbow trout and rats. *Aquat. Toxicol.*, 45 : 1-8.
- Zaleski J, Steward AR and Sikka HC, 1991. Metabolism of benzo[a]pyrene and (-)-trans-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by freshly isolated hepatocytes from mirror carp. *Carcinogenesis*, 12(2) : 167-174.

Evaluation of the exposure of bottom fish to the Erika oil spill : biotransformation and bioaccumulation monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons

Olivier Mazéas^{1,3}, Hélène Budzinski¹, Yves Désaunay², Jacek Tronczynski³

¹ Laboratoire de Physico- et Toxicologie des Systèmes Naturels, UMR 5472 CNRS, Université Bordeaux 1, 351 cours de la libération, 33405 Talence, France

² IFREMER, Laboratoire d'Ecologie Halieutique, Rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes cedex 03, France

³ IFREMER, Département des Polluants Chimiques, Rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes cedex 03, France

* Corresponding author

Email: h.budzinski@lptc.u-bordeaux1.fr

Phone : 33 (0)5 40 00 69 98

Fax: 33 (0)5 40 00 69 98

Abstract - The exposure of cohorts of soles (*Solea solea*) to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) present in the fuel oil spilled along the Atlantic coast of France after the wreckage of the Erika oil tanker in December 1999 was evaluated in this study. To this purpose, an analytical technique previously set up was used to quantify individual PAH metabolites in the bile of fish. Soles were collected in the main nurseries of the Bay of Biscay at five different periods from February 2000 to September 2002. The potential bioaccumulation of PAH in tissues was also monitored.

The exposure of soles present in nurseries to the oil spilled in the marine environment after the Erika oil tanker wreckage was clearly shown. High levels of metabolites were measured in February 2000 for some of the sites studied compared to the low concentrations appearing afterward. In July, the metabolite concentrations already reached levels as low as the ones obtained in 2002 suggesting the short-term nature of the contamination. Furthermore, the separation of fish in different age groups allowed observing different levels of concentration depending on the age. Thus, much higher concentrations were measured in the youngest individuals. On the other hand, the levels and fingerprints of PAHs accumulated in the liver and muscles did not show clear trends of contamination, underlying the low bioaccumulation of those compounds by high life animals (fish, birds and mammals), extensively metabolizing them during detoxification processes.

Keywords : Oil spill, PAH metabolites, fish bile, GC/MS

INTRODUCTION

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are important constituents of fuel oil in terms of quantity (Tissot and Welte, 1978; Neff, 1979) and toxicity toward marine species (Moore et al. 1989; Baumann, 1989; De Flora et al., 1991). The 12th of December 1999, the Erika oil tanker was wrecked off the south coast of Brittany, France. This event occurred together with a series of particularly strong storms affecting the whole Bay of Biscay. Consecutively to this sinking, around 20000 tons of fuel oil was spilled into the sea. On the 24th of December, the first slicks reached the Atlantic coast of France. The Erika oil spill affected the shoreline from the South headland of Brittany to the North of Oléron Island. The areas particularly impacted by the slicks were located between the Vilaine Bay and the Bourgneuf Bay (Fig. 1).

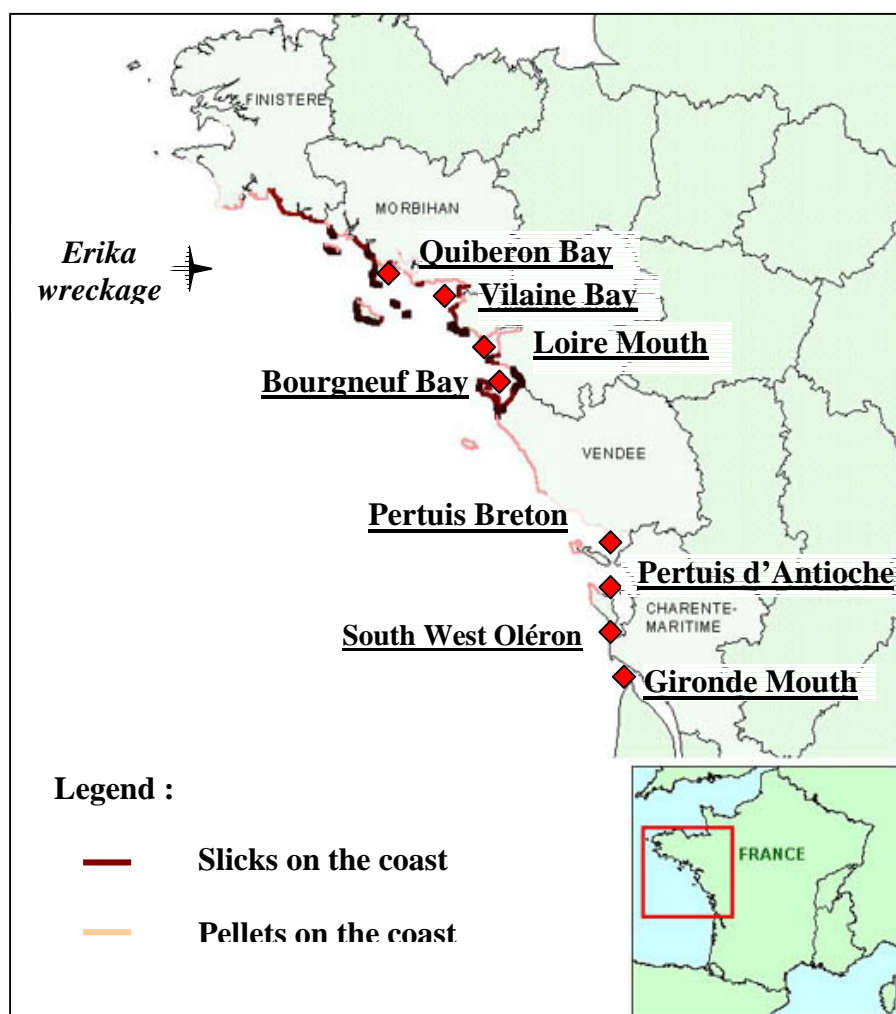


Figure 1 : Location of the eight sampling sites and summary of the stranding of fuel oil on the coast after the Erika oil spill (source : Cedre)

In the months following the wreckage, analyses carried out in water and sediment samples showed an important contamination of localized sites. Thus, some coastal waters exhibited concentrations of alkylated PAHs, compounds characteristic of petroleum pollutions, 5 to 20 times higher than in February 1999 in the dissolved phase (Tronczynski et al., 2003). The highest levels were observed in a site called Le Croisic between the Vilaine Bay and the Loire Estuary (Fig. 1). In this site, the concentrations observed in the sediments were also the highest measured with an increase of alkylated PAHs of a factor 6.5 between before and during the oil spill. A few samples of the Vilaine and the Bourgneuf Bays were also contaminated (Tronczynski et al., 2003). Bivalve accumulation monitoring was shown particularly interesting to evaluate the importance of the contamination. While the mean level of PAH concentration (sum of the US-EPA PAHs) was around 150 ng g^{-1} of dry weight between 1994 and 1999, most of the samples exceeded 500 ng g^{-1} of dry weight a few months after the wreckage of the oil tanker. In some particular sites as le Croisic or Oléron Island (delimiting the South boundary of the Bourgneuf Bay), the concentrations reached levels up to 5000 ng/g of dry weight (Jeanneret et al., 2002). Concentration levels generally decreased rapidly during spring but rose again during the 2000-2001 winter. In some areas, shellfish farming remained forbidden until June 2001 because of PAH contamination.

Moreover, the oil spill was demonstrated to cause the death of some species living in those zones, and more especially diving birds (Bretagnolle et al., 2004). On the intertidal and subtidal areas, benthic organisms also exhibited obvious mortalities (Barillé-Boyer et al., 2004). Likewise, in a campaign realized in February 2000, moribund invertebrates were caught off the coast impacted by oil slicks, on seabed between 5 and 30 m depth. In July, another campaign did not put in evidence any anomaly anymore in invertebrates. The area impacted by the oil spill also shelters some of the larger fish nurseries of the French Atlantic coast. Thus, it was particularly important to investigate the consequences of the pollution on fish cohorts. The campaign leaded in February 2000 showed that the most common fish species were present in

the nurseries and no malformation, necrosis or stain was observed. In July, fish populations displayed expected abundance and distribution pattern and the presence of age group 0 whiting (*Merlangius merlangus*) indicates that reproduction occurred in early 2000. In cruises carried out in September 2000, 2001 and 2002, the number of age group 0 fish was even high on all the sites studied.

In view of those results and observations, one could legitimately consider that fish had not been exposed to contaminants during the oil spill. In order to have a clear idea on this question, the work exposed here presents the results of biomarker and chemical analyses on fish collected in different nurseries along the French Atlantic coast during the five campaigns previously mentioned. The fish specie chosen for this study is the European common sole (*Solea solea*) because of its occurrence in the sites impacted (Koutsikopoulos et al, 1989). During the acute phase of the pollution on the coast (January to March 2000), adults were concentrated off the nurseries for reproduction, at depths comprised from 40 to 100 m; thus juveniles were more susceptible to be exposed to the pollution. Moreover, the sole is the first specie in term of commercial value in the Bay of Biscay but its stock is judged outside of biological stability limits (ICES, 2003).

Because of the extensive metabolism of PAHs by fish (Varanasi et al., 1989), metabolite quantification has been shown to be more appropriate than PAH quantification to evaluate PAH contamination of those organisms (Krahn et al., 1984, 1986a,b; McDonald et al., 1992). Monohydroxylated PAHs are known to be some of the major metabolites excreted in the gall bladder, present in their free form or mainly conjugated by glucuronide, glutathione, sulphate groups, ... (Varanasi et al., 1989; Foureman, 1989; Steward et al., 1990; Law et al., 1994; Leonard and Hellou, 2001; Luthe et al., 2002), and extensively excreted into the gall bladder (Lee et al., 1972; Statham et al., 1976; Varanasi et al, 1989; Steward et al., 1990; Varanasi and Stein, 1991). The following compounds were chosen because they are potential metabolites of

priority PAHs listed by the US-EPA (United-States Environmental Protection Agency) for their interest in environmental surveys (Keith and Telliard, 1979) : 1- and 2-hydroxynaphthalene (1- and 2-OHN), 9-hydroxyfluorene (9-OHFe), 1-, 2-, 3-, 4- and 9-hydroxyphenanthrene (1-, 2-, 3-, 4- and 9-OHPhe), 1-hydroxypyrene (1-OHP), 1-hydroxychrysene (1-OHC) and 3-hydroxybenzo(a)pyrene (3-OHBaP). 2-hydroxybiphenyl (2-OHBi) was added to this study due to the abundance of biphenyl in the environment.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

Five campaigns were carried out to collect soles along the Atlantic coast of France after the 12th December 2000 Erika oil spill, i. e. February, July and September 2000, September 2001 and 2002. Altogether, fish were captured in eight sites (Fig. 1), on seabed between 5 and 30 m depth, as summarized in Table 1. The internal and external parts of the Vilaine Bay were distinguished for the first campaign to evaluate a possible difference of contamination of the two parts, however, no physical discontinuity and fish distribution differences exist between the two parts of the site. In September 2000, samples from the two Pertuis, Breton and Antioche, were not separated. Furthermore, different age groups were distinguished. Age group 1 correspond to soles approximately born in March of the year preceding their capture and starting their benthic juvenile development phase in May (age group 2 correspond to fish born in March two years before their capture...). In this way, we can establish that fish from age group 1 collected during the first three campaigns belong to the same laying period, that they were born before the oil spill and that they lived through it. Fish collected in September 2001 were born a few months after the oil spill.

Table 1 : Summary of the collected samples. The number of fish collected and pooled per age group is indicated between brackets. SW : South West ; ext. : external part of the Bay.

Site	February 2000	July 2000	September 2000	September 2001	September 2002
Quiberon Bay (A)	g2(6), g2-3(4)	-	-	-	-
Vilaine Bay (B)	g2(10), g1 ext. (10), g2 ext. (10)	g1(10)	g1(10)	g1(10), g2(10)	g1(10), g2(10)
Loire Mouth (C)	g1(10), g2(10)	g1(10)	g1(10)	g1(10), g2(8)	g1(10), g2(10)
Bourgneuf Bay (D)	g1(10), g2(10)	g1(10)	g1(10)	g1(8), g2(5)	g0(7), g1(10), g2(10)
Pertuis Breton (E)	g1(10), g2(10)	g1(10)	g1(10)	g2(8)	g2(9)
Pertuis d'Antioche (F)	-	g1(10)	g1(10)	g1(8)	g0(6), g1(10), g2(8)
SW Oléron Island (G)	-	-	-	g1(7)	-
Gironde Mouth (H)	-	-	-	g1(8)	g1(10), g2(7)

In February 2000, fish from age group 1 were dominant, as expected. On 48 hauls realized, 18 contained fuel oil, as represented in Figure 2. The Pertuis Breton was the only site which did not seem to be impacted. In July, a single haul displayed the presence of fuel in the Vilaine Bay (Fig. 2).

Fish were dissected on boat immediately after capture. Gall bladders were sampled and stored at -80°C. Liver and muscle tissues were then collected and stored at -20°C.

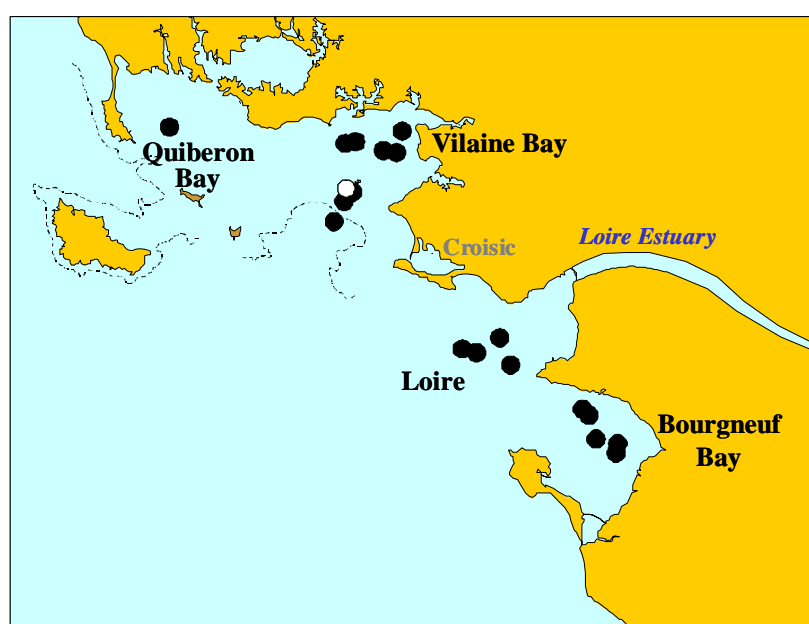


Figure 2 : Location of the hauls containing fuel oil in February 2000 (black round) and July 2000 (white round).

Chemicals, solvents and reagents

1- and 2-hydroxynaphthalene were purchased from Lancaster (Strasbourg, France), 2-hydroxybiphenyl, 9-hydroxyfluorene and 1-hydroxypyrene from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Falavier, France), 1-, 2-, 3-, 4-, 9-hydroxyphenanthrene, 1-hydroxychrysene and 3-hydroxybenzo(a)pyrene from Promochem (Molsheim, France). 1-hydroxypyrene-d9 and phenanthrene-d10 were obtained from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA). The standard reference material SRM 2260, constituted of about 20 aromatic compounds, was provided by the U.S. National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, MD, USA) and perdeuterated aromatic compounds by MSD Isotopes (Montreal, Canada).

2-mercaptoethanol, sodium acetate trihydrate 99% and bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) were purchased from Acros organics (Noisy-Le-Grand, France). β -glucuronidase/aryl sulfatase mixture, 100000 et 7500 u/ml respectively, and Supelclean LC-NH₂ cartridges were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Falavier, France) and water (sterilized water for injection) from laboratory Aguetant (Lyon, France). Bakerbond C₁₈ cartridges and Ultra Resi-Analysed methylene chloride (Mallinckrodt Baker) were obtained from Atlantic Labo (Eysines, France). Methanol Suprasolv, acetic acid (100% Normapur), aluminium oxide (150 basic type T; 0.063-0.2 mm) and silica gel 60 (0.063-0.2 mm) were provided by VWR (Strasbourg, France).

PAH analysis in biological samples

Individual tissues were pooled, freeze-dried and grounded before analyze. The analytical protocol used for analyzing PAHs in biological tissues was described by Baumard et al. (1997). PAHs were extracted from freeze-dried and grounded tissues by micro-wave assisted extraction (10 min, 30 W) with methylene chloride followed by filtration on clean glass cotton (Budzinski et al., 1999). Perdeuterated PAHs used as internal standards were added to the

samples prior to the extraction step for PAH quantification (Baumard and Budzinski, 1997). Extracts of the different matrices were then purified on aluminium oxide (Al₂O₃) and silica (SiO₂) columns (Baumard et al., 1997; Mazéas and Budzinski, 2002) and analysed by GC/MS (gas chromatography/mass spectrometry). HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) fractionation with pentane was performed on samples still exhibiting PAH coelutions in GC-EI-MS chromatograms.

GC/MS analysis of PAHs

Extracts were analysed by an HP GC 6890A gas chromatograph Agilent Technologies (automated PTV pulsed splitless injection (25 psi, 1 min); purge delay: 1 min and purge flow: 60.6 ml/min; injector temperature: 270°C; interface temperature: 280°C; oven temperature: from 70°C (2 min) to 300°C (5 min) at 2°C/min) coupled to an HP MSD 5973 mass spectrometer (electron impact: 70 eV; voltage: 2000 V; source temperature: 150°C) both purchased from BIOS Analytique (l'Union, France). Analyses were performed in the SIM (selected ion monitoring) mode at 1.3 scan/s (Dwell time: 50 ms for each ion) using the molecular ions of the studied compounds. The capillary column was an HP5/MS Agilent Technologies (30 m x 0.25 mm ID x 0.25 film thickness) provided by BIOS Analytique (l'Union, France) and the carrier gas was helium 6.0 obtained from Linde (Toulouse, France).

Different perdeuterated polycyclic aromatic hydrocarbons were used as internal standards for each class of aromaticity (Baumard and Budzinski, 1997). The response factors of PAHs relatively to perdeuterated PAHs were determined for each GC/MS sequence by injecting a mixture containing a solution of PAHs (SRM 2260, National Institute of Science and Technology, Gaithersburg, MD, USA) and the solution of perdeuterated PAHs used for spiking samples.

The monitored PAHs are phenanthrene* (Phe), methylphenanthrenes (C₁Phe), dimethylphenanthrenes (C₂Phe), anthracene* (A), methylanthracene (C₁A) fluoranthene* (F), pyrene* (Pyr), benz(a)anthracene* (BaA), chrysene*+thiophenylene (C+T), methylchrysenes (C₁C), benzo(2,1)naphthothiophene (2,1-BNT), benzo(2,3)naphthothiophene (2,3-BNT), benzo(b)fluoranthene* +benzo(j)fluoranthene+benzo(k)fluoranthene* (BbF+BjF+BkF=BF), benzo(e)pyrene (BeP), benzo(a)pyrene* (BaP), perylene (Per), indeno(1,2,3-cd)pyrene* (IP), dibenz(a,h)anthracene*+dibenz(a,h)anthracene (DBA) and benzo(g,h,i)perylene* (BPer). Compounds marked with a “*” are 12 of the 16 PAHs of the US-EPA. Due to the coelution of three other PAHs with some of those compounds by GC/MS, the sum of those compounds is named “15 PAHs” in this study.

Determination of metabolites

The protocol used for the determination of metabolite concentrations in the bile has previously been described (Mazéas and Budzinski, submitted (a)).

Samples were first treated with 20 µl of β-glucuronidase - aryl-sulfatase mixture (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Falavier, France), 100000 et 7500 u/ml respectively, for enzymatic deconjugation. To this purpose, samples were buffered to pH 5 (acetate buffer constituted of sodium acetate and acetic acid in water) and 20 µl of 2-mercaptoethanol, used as an antioxidant, and the internal standard (1-hydroxypyrene-d9) were subsequently added to the samples. They were then placed in an oven at 37°C during 20 h. In the case of liver tissues, samples were first homogenized in water buffered to pH 5 (acetate buffer constituted of sodium acetate and acetic acid in water) using an ultra-turrax.

After ultra-sonication and centrifugation (5 min, 5000 rpm, 18°C), supernatants were loaded on C₁₈ cartridges previously preconditioned with 2 ml of methanol and 4 ml of water. In the case of liver tissues, the samples were first extracted by microwave assisted extraction (10

min; 30 W) in a 4/5 (v/v) buffered water/methanol mixture. Cartridges were washed with 2 ml of water and 2 ml of water/methanol mixture (70:30, v/v). Water traces were then removed by freeze-drying the cartridges. Freeze-drying was performed because of the possible loss of low molecular weight compounds during nitrogen stream drying at room temperature. Metabolites were then eluted with 6 ml of methanol. Extracts were evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream and re-dissolved in methylene chloride.

NH₂ cartridges were then used for purification. Before loading the sample, the cartridge was first preconditioned with 3 ml methanol/methylene chloride (20:80, v/v). The selective elution of metabolites was obtained using 6 ml of the mixture of solvents previously used. The final extract was evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream and re-dissolved in methylene chloride.

After derivatization with BSTFA (30 min, 65°C), phenanthrene-d10 was added to the samples for recovery determination and analyses were performed in GC/MS in the SIM mode using an identical apparatus to the one used for PAH analysis. The ions used for quantification in the SIM mode are described in a previous work (Mazéas and Budzinski, submitted (b)). However, the GC/MS conditions were different from PAH analysis (automated PTV pulsed splitless injection (25 psi, 1.5 min); purge delay: 1.5 min and purge flow: 60 ml/min; injector temperature: 250°C; interface temperature: 280°C; oven temperature: from 70°C (2 min) to 180°C (1 min) at 5°C/min and from 180°C to 290°C (1 min) at 10°C/min; electron impact: 70 eV; voltage: 2000 V; source temperature: 150°C; 1.53 scan/s; dwell time: 50 ms for each ion).

A mixture constituted of standard metabolites and 1-hydroxypyrene-d9 was injected at the beginning and at the end of each GC/MS sequence for response factor determination and a manipulation blank was performed together with samples to control potential contamination.

The compounds were quantified in SIM mode using the ions below : 1-hydroxynaphthalene ($m/z=201$), 2-hydroxynaphthalene ($m/z=216$), 2-hydroxybiphenyl ($m/z=211$), 9-hydroxyfluorene ($m/z=165$), 9-hydroxyphenanthrene ($m/z=266$), 1-hydroxypyrene ($m/z=290$), 1-hydroxychrysene ($m/z=316$) and 3-hydroxybenzo(a)pyrene ($m/z=340$).

The previously listed metabolites were monitored in the bile of soles captured during the first (February 2000) and the last (September 2002) campaigns by means of GC-EI-MS analyses. Only 1-hydroxypyrene was quantified in the three other fishing periods by means of LC-ESI-MS, the first developed method (Mazéas and Budzinski, submitted (b)).

RESULTS AND DISCUSSION

Detection of metabolites in fish bile

Concentrations measured in the bile are summarized in Table 2 and 1-hydroxypyrene concentrations obtained from the main sites, i.e. Vilaine Estuary, Loire Mouth, Bourgneuf Bay, Pertuis Breton and Pertuis d'Antioche, are represented in Figure 3. The first noticeable results coming from bile monitoring are the non-detection of 1-hydroxychrysene and 3-hydroxybenzo(a)pyrene, the two higher molecular weight compounds, in any of the bile samples and the predominance of 1-hydroxypyrene, the only metabolite detected in all the samples. A study concerning metabolites of PAHs in the bile of European eels, *Anguilla anguilla*, from United Kingdom estuaries also reported 1-hydroxypyrene as the dominant compound (Ruddock et al., 2003). Other studies reported the predominance of 2-hydroxybiphenyle, 9-hydroxyfluorene or 1-hydroxypyrene alternatively depending on the fish specie studied (pelagic or demersal behaviour, diet) (Escartín and Porte, 1999a) or on the contamination source (Fernandes et al., 2002).

Table 2 : Concentration of metabolites in the bile of soles for the 5 campaigns. The number of replicates is indicated between brackets. “*”: coelution.

	1-OHN	2-OHN	2-OHBI	9-OHFe	4-OHPhe	9-OHPhe	3-OHPhe	1-OHPhe	2-OHPhe	1-OHP
February 2000										
Quiberon g2-3 (2)	*	<0,7	<1	<0,7	<0,5	<0,5	13±2	20±3	25±4	150±4
Quiberon g2	*	*	<1	<2	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	133
Vilaine g2 (2)	10±2	21±0	45±15	<2	<0,5	<0,5	7±4	16±6	74±21	287±0
ext. Vilaine g2	6	15	32	<2	<0,5	<0,5	12	34	72	157
ext. Vilaine g1	94	152	469	607	40	94	272	418	595	1298
Loire g2 16/02	<0,7	<0,7	96	29	<0,5	<0,5	<0,5	18	63	244
Loire g2 22/02 (2)	<0,7	<0,7	83±22	34±7	<0,5	<0,5	56±18	50±6	160±30	334±37
Loire g1 22/02	200	216	325	134	105	66	452	350	598	1425
Bourgneuf g2 (3)	<0,7	12±1	35±6	18±3	<0,5	<0,5	20±4	16±2	30±8	175±29
Bourgneuf g1	<0,7	16	45	39	<0,5	14	21	39	54	265
Breton g2 (3)	<0,7	35±4	71±12	68±15	<0,5	<0,5	31±3	35±1	61±5	283±12
Breton g1	92	89	109	128	31	16	107	143	235	730
July 2000										
int. Vilaine g1										73
ext. Vilaine g1 (2)										28±13
Loire g1										65
Bourgneuf g1										82
Breton g1										104
Antioche g1 (2)										42±7
September 2000										
Vilaine g1										42
Loire g1 (2)										55±3
Bourgneuf g1 (2)										62 ±1
Antioche-Breton g1 (2)										47±1
September 2001										
Vilaine g2										28
Vilaine g1										75
Loire g2										21
Loire g1										135
Bourgneuf g2										30
Bourgneuf g1										40
Breton g2										86
Antioche g1										127
Oléron g1										10
Gironde g1										58
September 2002										
Vilaine g2 (2)	<0,7	<0,7	8±0	*	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	28±3
Vilaine g1	<0,7	<0,7	<1	<2	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	36
Loire g2 (2)	<0,7	<0,7	16±4	<2	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	45±5
Loire g1 (2)	*	32±6	24±0	62±18	<0,5	1±2	9±3	14±6	<0,5	50±6
Bourgneuf g2	<0,7	<0,7	<1	<2	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	19
Bourgneuf g1	<0,7	<0,7	*	*	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	64	111
Bourgneuf g0	<0,7	<0,7	*	<2	<0,5	<0,5	<0,5	*	<0,5	209
Breton g2	<0,7	<0,7	10	26	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	35
Antioche g2	<0,7	25	21	47	<0,5	*	6	3	12	60
Antioche g1	18	8	15	22	<0,5	<0,5	3	4	7	49
Antioche g0	<0,7	5	11	18	<0,5	*	2	3	5	55
Gironde g2	<0,7	<0,7	16	6	<0,5	*	<0,5	11	<0,5	19
Gironde g1	4	18	14	45	<0,5	*	<0,5	<0,5	5	74

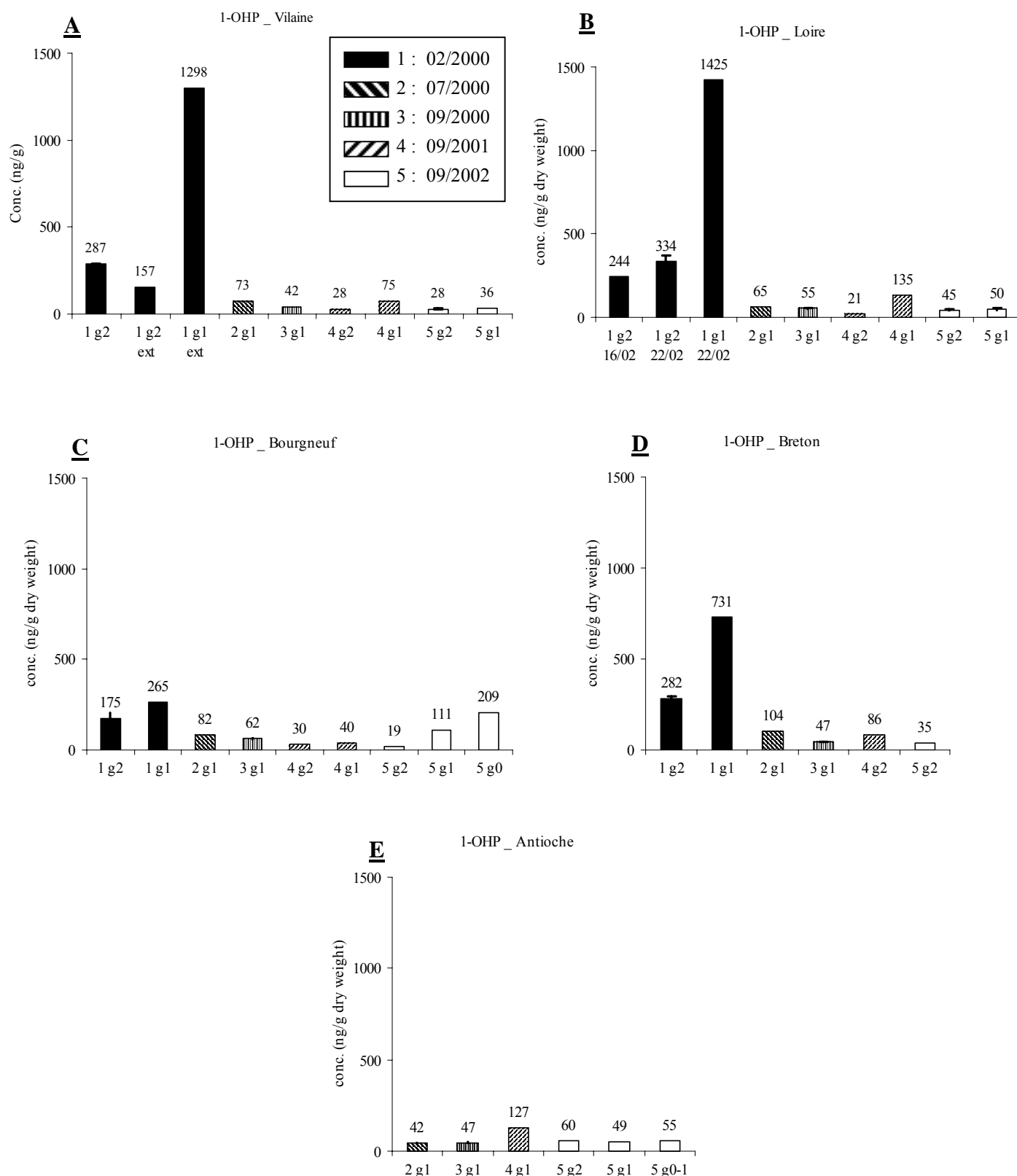


Figure 3 : 1-hydroxypyrene concentration (ng g^{-1}) in the bile of soles from the Vilaine Bay (A), the Loire Estuary (B), the Bourgneuf Bay (C), the Pertuis Breton (D) and the Pertuis d'Antioche (E) for the five campaigns.

Concerning the potential contamination consecutive to the oil spill, particularly high concentrations of metabolites were measured for all the sites sampled in February 2000 compared to the following campaigns. Those results put in evidence the exposure of bottom fish to the oil spill and the bioavailability of PAHs contained in oil towards those organisms. High concentrations were more especially reached in Vilaine and Loire locations with 1-hydroxypyrene values of 1298 and 1425 ng g⁻¹ of bile respectively. In addition to those two sites, Bourgneuf Bay was also expected to be highly contaminated in regard of the slick stranding on the coast (Fig.1). However, concentrations were relatively low in this site (175 and 265 ng g⁻¹ for 1-hydroxypyrene) compared to others and particularly to Pertuis Breton (282 and 731 ng g⁻¹ for 1-hydroxypyrene), which was supposed to be slightly impacted. Concentrations similar to the ones measured in the Vilaine Bay and in the Loire Mouth were also reported in different studies concerning relatively contaminated areas like in the proximity of Barcelona harbour (depth between 30 and 50 m) for *Mullus barbatus* (1240 ng ml⁻¹) (Escartín and Porte, 1999a) or in some Spanish Rivers for *Cyprinus carpio* (Fernandes et al., 2002). However, levels reaching 5500 or 7600 ng ml⁻¹ were detected in the bile of fish caught in some Spanish Rivers (Fernandes et al., 2002) or in United Kingdom Estuaries (Ruddock et al., 2002 and 2003), putting into perspective the contamination measured here consecutively to the Erika oil spill. Besides, analyses carried out on English soles, *Parophrys vetulus*, in Puget Sound (near Seattle, USA) revealed concentrations as high as 300000 ng g⁻¹ of bile for 1-hydroxypyrene and 200000 and 300000 ng g⁻¹ for two hydroxyphenanthrenes (Krahn et al., 1987). The highest concentration of 1-hydroxyphenanthrene measured in February 2000 reached as for it 418 ng g⁻¹ of bile in the Vilaine Bay, which is in the range of values reported by Ruddock et al. (2003) in eels from United Kingdom estuaries (23-2093 ng ml⁻¹).

Conversely, levels as low as the ones measured in the next fishing periods were reached in July 2000 yet, coming back to a mean chronic level, suggesting the short-term nature of the oil

spill contamination towards fish. However, the chosen sampling framework did not allow to evaluate the increase of the PAH bioavailability during the 2000-2001 winter suggested by the increase of PAH bioaccumulation in molluscs (Jeanneret et al., 2002). For comparison, in 1989, following the Exxon Valdez oil spill occurring, different fish exhibited high levels of metabolites in their bile 5 month and 1 year after the oil spill (Krahn et al., 1992). However, concentrations measured in some locations returned to reference levels or decrease in 1990 and 1991 (Varanasi et al., 1993; Krahn et al., 1993; Collier et al., 1993; Armstrong et al., 1995; Marty et al., 2003). Besides, two recent studies evaluating the long-term contamination of this oil spill led to opposite conclusions. On a first hand, Huggett et al. (2003) observed low levels of metabolites in the bile of all the fish studied, captured in the summer of 1999 and 2000 on sites originally impacted by the oil spill. On the other hand, Jewett et al. (2002) observed elevated levels of metabolites in all the fish sampled in the summer of 1999 on sites originally impacted by the oil spill. Nevertheless, the two studies included some sampling site names in common and although they did not work exactly on the same fish species, they both included fish having similar diet and living behaviour (pelagic or demersal).

1-hydroxypyrene was the single compound detected in all the samples caught in September 2002 and metabolite proportions were highly variable though 1-hydroxypyrene was always dominant. The chronic level of contamination observed could be expressed in terms of 1-hydroxypyrene concentration around $50 \pm 30 \text{ ng g}^{-1}$ of bile. When compared to other studies, this guide value demonstrates the general low level of contamination of the French Atlantic Coast. Indeed, similar concentrations were obtained among the lowest ones measured in deep-sea fish, living between 1500 and 1800 m, in the Mediterranean Sea (Escartín and Porte, 1999b) and among the lowest ones measured in fish caught in European high-altitude mountain lakes located far from industrial areas (Escartín and Porte, 1999c). However, comparison of metabolite concentrations between fish species is delicate and must be interpreted with

precautions. Moreover, considering the guide value established above, different events of contamination could be pointed out between July 2000 and September 2002. For example, in July 2000, age group 1 fish from Pertuis Breton exhibited concentrations slightly superior to the mean level (104 ng g^{-1}) as well as age group 1 fish from the Loire Mouth and Pertuis d'Antioche in September 2001 and age group 0 and 1 fish caught in September 2002 in Bourgneuf Bay.

However, this mean level could be moderated considering the age of the fish studied. It is indeed interesting to notice, for a given site, the higher metabolite concentrations in the bile of young individuals than in the older ones. This fact was also observed in the bile of flounders, *Platichthys flesus* (Mazéas et al., submitted (a)). This trend is particularly noticeable in soles from the last campaign in Bourgneuf Bay where age groups 0, 1 and 2 were sampled (Fig. 3.D). The fish captured in Pertuis d'Antioche during this same campaign were the only ones that did not match this rule. In another study that consisted in exposing soles of age group 1 and 2 to fuel oil in tanks, the difference of metabolite concentration relatively to age was not significant even though observable (Mazéas et al., submitted (b)).

In term of metabolite composition, outside the 1-hydroxypyrene predominance, one can notice the global increase of hydroxyphenanthrenes proportion during the contamination period of the oil spill. This element could be attributed to the three times higher proportion of phenanthrene relatively to pyrene in the Erika fuel oil (680 and $223 \mu\text{g g}^{-1}$ of fuel respectively). Concerning the proportion of the different hydroxyphenanthrenes, the 1-, 2- and 3- isomers are mainly present in the bile compared to the 4- and 9- ones as previously reported for other teleosts (Solbakken et al., 1980; Solbakken and Palmork, 1981). This observation can traduce an easier enzymatic oxidation on those first sites as well as an easier elimination of the 4- and 9- isomers through urine or the excretion of those last compounds in the bile after a second oxidation as dihydrodiols. This last hypothesis is however improbable with regard to

preceding results showing the large predominance of the 1,2-dihydrodiol of phenanthrene on the 9,10- and the 3,4- isomers into the bile of teleosts contrary to cartilaginous fish, crustaceans and rodents (Solbakken et al., 1980; Solbakken and Palmork, 1981; Goksøyr et al., 1985 and 1986). The identification of phenanthrene metabolites by the liver prior to the excretion in the bile is uncertain with regard to the results of different studies (Goksøyr et al., 1985, 1986, 1987; Pangrekar et al., 2003). This predominance of the 1-, 2- and 3-hydroxyphenanthrene can explain the slight detection or non-detection of the 9- isomer of hydroxyphenanthrene in studies focusing on this single isomer (Escartín and Porte, 1999a,b,c).

PAH concentrations

PAH concentrations measured in liver and muscle tissues of soles collected in the main sampled sites are summarized in Figure 4 and 5 respectively. The distinction of parent and alkylated PAHs is of particular interest when looking for a potential pollution by petroleum products. Indeed, petroleum products are rich in alkylated compounds while they are unstable during pyrolytic processes. Moreover, the F/P molecular ratio can also give information on the nature of the contamination due to the prevalence of pyrene on fluoranthene in petroleum.

The clearest information deductible from those results is the higher accumulation of PAHs in the liver of soles captured in the Vilaine Bay in February 2000, particularly for fish sampled in the external part of the Bay (Fig. 4.A). One can also notice the higher concentrations in fish from age group 2 relatively to age group 1 in contrary to metabolite concentrations. However, levels higher than the ones obtained in those samples for the sum of the 15 PAHs (52, 125 and 87 ng g⁻¹) were determined in the liver of fish from the Mediterranean Sea, *Serranus scriba*, captured in a site considered as unpolluted, located far from industrialized activities (136 ng g⁻¹ of dry weight) (Baumard et al., 1998). Those results ask the question of the significance of the

bioaccumulation observed in the Vilaine Bay. Nevertheless, the low F/P ratios obtained for those samples (0.4 - 0.5) suggest the reality of a petroleum source of contamination and seem to confirm the observed high level of biliary metabolites. Other molecular indexes like phenanthrene/methylphenanthrenes and phenanthrene/anthracene ratios do not show clear trend and are highly variables. On the contrary, liver of soles captured in February 2000 in the Loire Mouth exhibit levels of PAHs as low as the ones measured during the following sampling periods in spite of the similar high levels of metabolites measured in those fish and Vilaine ones. The concentrations of PAHs accumulated in the liver of soles were generally included between 10 and 30 ng g⁻¹ for the sum of the 15 PAHs. They were in the same range as the ones published by Baumard et al. (1998) for two fish species captured in the Mediterranean coast of France and Spain. The mean levels obtained for sites including common and uncommon ones, also expressed per gram of dry tissue, were 57 ± 45 ng g⁻¹ for *Serranus scriba* and 23 ± 12 ng g⁻¹ for *Mullus barbatus*.

Concerning muscles, no particular bioaccumulation or pattern of petroleum contamination is observed in any of the samples. Varanasi et al. (1990) reported PAH concentrations in the muscles of fish highly contaminated by the Exxon Valdez oil spill (metabolite concentration 25 times greater than reference ones) not higher than in fish unimpacted. Concentrations in muscles, commonly lower than 10 ng/g of dry weight for the 15 PAHs, are less important than the ones reported in the liver (generally included between 10 and 30 ng g⁻¹). This result can be explained in part by the slight hydrosolubility of PAHs, therefore easily accumulated in the important lipid stocks of the liver. Furthermore, no correlation could be observed between pyrene concentration in tissues and 1-hydroxypyrene level in the bile.

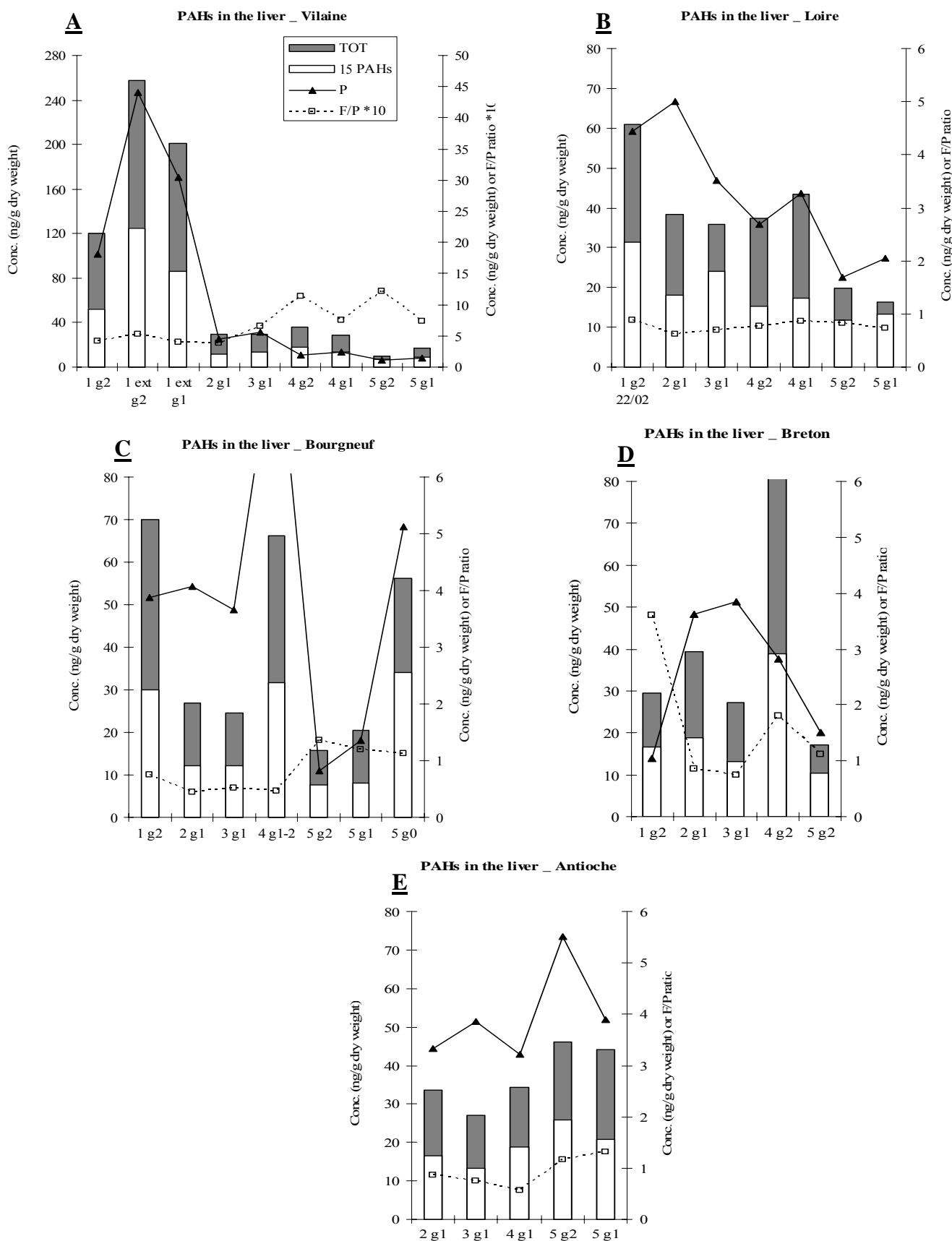


Figure 4 : Sum of the 15 PAHs and sum of the 15 PAHs+alkylated compounds (left axis), pyrene concentration and F/P ratio (right axis) in the liver of soles from the Vilaine Bay (A), the Loire Estuary (B), the Bourgneuf Bay (C), the Pertuis Breton (D) and the Pertuis d'Antioche (E) for the five campaigns.

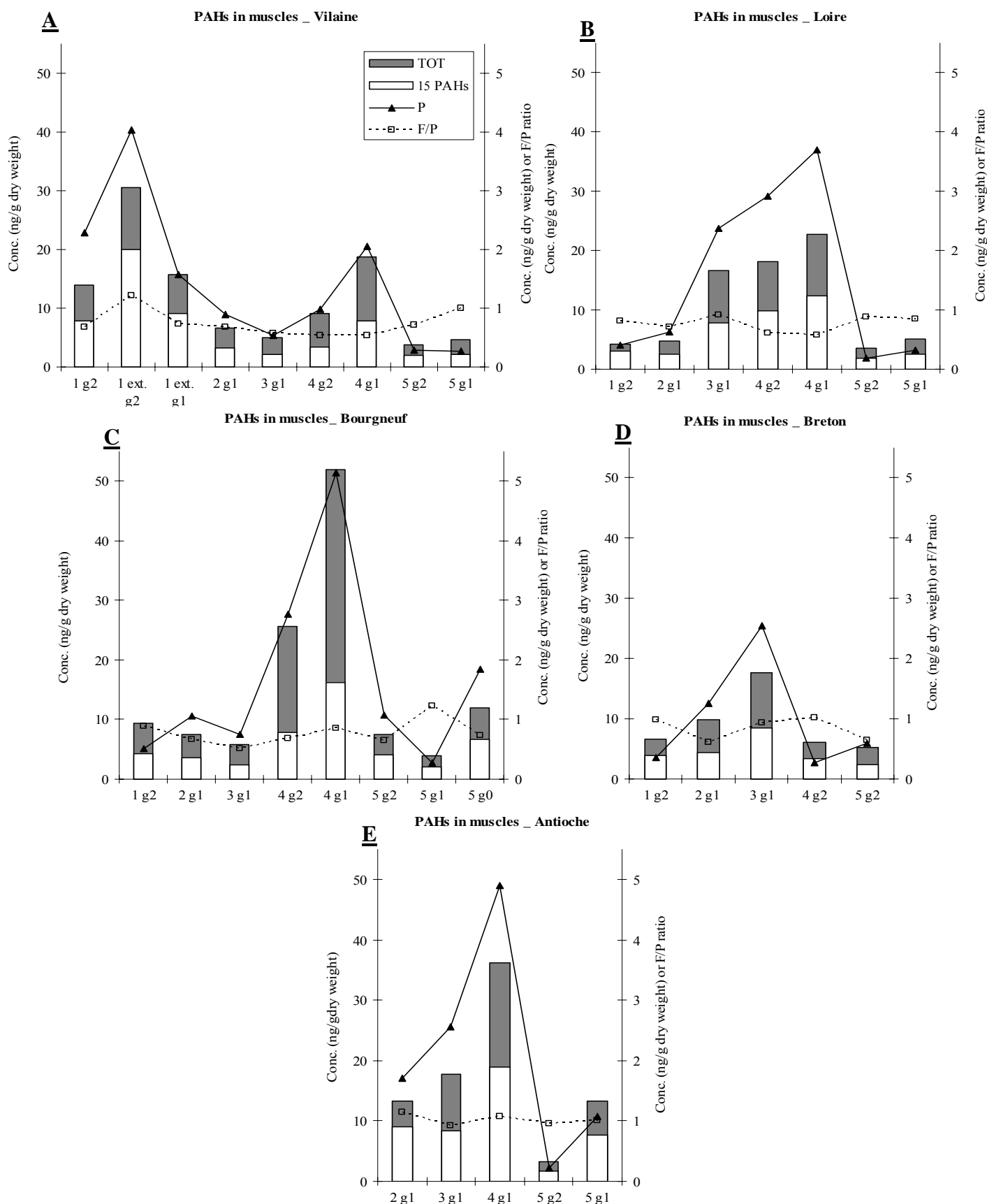


Figure 5 : Sum of the 15 PAHs and sum of the 15 PAHs+alkylated compounds (left axis), pyrene concentration and F/P ratio (right axis) in the muscles of soles from the Vilaine Bay (A), the Loire Estuary (B), the Bourgneuf Bay (C), the Pertuis Breton (D) and the Pertuis d'Antioche (E) for the five campaigns.

CONCLUSION

The monitoring of metabolites of PAHs in the bile of fish was successful put in evidence the exposure of bottom fish present along the Atlantic shoreline of France to the oil spilled in the marine environment following the Erika oil tanker wreckage. High levels of metabolites were measured in February 2000 for some of the sites studied compared to the chronic mean concentration appearing afterward. Besides, the short-term nature of the contamination was suggested by the return to background levels of metabolites as soon as the month of July. The monitoring of 1-hydroxypyrene and hydroxyphenanthrene isomers proved to be particularly useful for this diagnosis. Furthermore, the separation of fish in different age groups allowed observing different levels of concentration depending on the age, with much higher concentrations in the youngest individuals. Conversely, the levels and fingerprints of PAHs accumulated in the liver and muscles of soles did not allow showing clear trends of contamination, except in one of the sites displaying high levels of metabolites, because of extensive metabolism.

Acknowledgments - This study was supported by the Erika program (Monitoring of the ecological and ecotoxicological consequences of the Erika wreckage), the région Aquitaine, the Seine-Aval program and the BEEP (Biological Effects of Environmental Pollution in Marine Coastal Ecosystems) European project n°EVK3-CT2000-00543.

References

Armstrong DA, Dinnel PA, Orensanz JM, Arnstrom JL, McDonald TL, Cusimano RF, Nemeth RS, Landolt ML, Skalski JR, Lee RF and Huggett RJ, 1995. Status of selected bottomfish and crustacean species in Prince William Sound following the Exxon Valdez oil

- spill. In *Exxon Valdez oil spill: fate and effects in Alaskan waters* (Wells PG, Butler JN and Hughes JS, eds), 485–547. Philadelphia: PA: ASTM STP 1219, American Society for Testing and Materials.
- Barillé-Boyer AL, Gruet Y, Barillé L and Harin N, 2004, Temporal changes in community structure of tide pools following the “Erika” oil spill. *Aquat. Living Resour.*, 17 : 323.
- Baumann PC, 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 and Budzinski H, 1997. Internal standard quantification method and Gas Chromatographie-Mass Spectrometer (GC-MS): a reliable tool for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) quantification in natural matrices. *Analisis*, 25 : 246-252.
- Baumard P, Budzinski H and Garrigues P, 1997. Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues by gas chromatography coupled to mass spectrometry : application to mussels. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 359(6) : 502-509.
- Baumard P, Budzinski H, Garrigues P, Sorbe JC, Burgeot T and Bellocq J, 1998. Concentrations of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Mar. Pollut. Bull.*, 36(12) : 951-960.
- Bretagnolle V, Certain G, Houte S and Métais M, 2004, Distribution maps and minimum abundance estimates for wintering auks in the Bay of Biscay, based on aerial surveys. *Aquat. Living. Resour.*, 17 : 353.
- Budzinski H, Letellier M, Garrigues P and Le Menach K, 1999. Optimization of the microwave-assisted extraction in open cell of polycyclic aromatic hydrocarbons from soils and sediments : Study of moisture effect. *J. Chrom.*, 837(1-2) : 187-200.
- Collier TK, Krahn MM, Krone CA, Johnson LL, Myers MS, Chan S-L and Varanasi U, 1993. Oil exposure and effects in subtidal fish following the Exxon Valdez oil spill. In *Proceedings of the 1993 International Oil Spill Conference*, Tampa Bay, FL.

- De Flora S, Bagnasco M and Znacchi P, 1991. Genotoxic, carcinogenic and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. *Mutat. Res.*, 258 : 285–320.
- Escartín E and Porte C, 1999a. Assessment of PAH pollution in coastal areas from the NW Mediterranean through the analysis of fish bile. *Mar. Poll. Bull.*, 38(12) : 1200-1206.
- Escartín E and Porte C, 1999b. Hydroxylated PAHs in bile of deep-sea fish. Relationship with xenobiotic metabolizing enzymes. *Environ. Sci. Technol.*, 33 : 2710-2714.
- Escartín E and Porte C, 1999c. Biomonitoring of PAH pollution in high-altitude mountain lakes through the analysis of fish bile. *Environ. Sci. Technol.*, 33 : 406-409.
- Fernandes D, Potrykus J, Morsiani C, Raldua D, Lavado R and Porte C, 2002. The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality in two low-stream Rivers (NE Spain). *Environ. Res. Section A*, 90 : 169-178.
- Fouremant GL, 1989. Enzymes involved in metabolism of PAH by fishes and other aquatic animal: hydrolysis and conjugation enzymes (or phase II enzymes). In *Metabolism of PAH in the aquatic environment* (Varanasi U, ed), 185-202. CRC, Boca Raton, FL, USA.
- Goksøyr A, Klungsøyr J and Solbakken JE, 1985. Cytochrom P-450 in cod (*Gadus morhua*): Effects of inducers on regiospecificity of phenanthrene metabolism and immunochemical properties. *Mar. Environ. Res.*, 17(2-4) : 87-90.
- Goksøyr A, Solbakken JE and Klungsøyr J, 1986. Regioselective metabolism of phenanthrene in atlantic cod (*Gadus morhua*) : studies on the effects of monooxygenase inducers and role of cytochromes P-450. *Chem.-Biol. Interactions*, 60 : 247-263.
- Goksøyr A, Anderson T, Hansson T, Klungsøyr J, Zhnag U and Forlin L, 1987. Species characteristics of the hepatic xenobiotic and steroid biotransformation systems of two teleost fish, Atlantic cod (*Gadus morhua*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 89 : 347-360.

- Huggett RJ, Stegeman JJ, Page DS, Parker KR, Woodin B, AND Brown JS, 2003. Biomarkers in Fish from Prince William Sound and the Gulf of Alaska: 1999-2000. *Environ. Sci. Technol.*, 37 : 4043-4051.
- ICES, 2003. Report of the working group on the assessment of southern shelf demersal stocks. ICES CM 2003/ACFM 03. 470 pp.
- Jeanneret H, Chantereau S et Ratiskol G, 2002. L'impact environnemental d'une pollution accidentelle des eaux. Les journées du Cedre, Paris, 17 octobre 2002.
- Jewett JC, Dean TA, Woodin BR, Hoberg MK and Stegeman JJ, 2002. Exposure to hydrocarbons 10 years after the Exxon Valdez oil spill : evidence from cytochrome P4501A expression and biliary FACs in nearshore demersal fishes. *Mar. Environ. Res.*, 54 : 21-48.
- Keith LH and Telliard WA, 1979. Priority pollutants. I. A perspective view., *Environ. Sci. Technol.*, 13 : 416-423.
- Koutsikopoulos C, Dorel D, Désaunay Y, Le Cann B and Forest A, 1995. Interactions entre processus physiques et comportement individuel : conséquences sur l'organisation et le fonctionnement du stock de sole (*Solea solea* L.) du golfe de Gascogne. ORSTOM (Ed.) Colloques et Séminaires, Premier Forum Halieumétrique, 49-74.
- Krahn MM, Myers M, Burrows DG and Malins DC, 1984. Determination of metabolites of xenobiotics in bile of fish from polluted waterways. *Xenobiotica*, 14 : 633-646.
- Krahn MM, Rhodes LD, Myers MS, Moore LK, MacLeod WD and Malins DC, 1986a. Associations between metabolites of aromatic compounds in bile and the occurrence of hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 15 : 61-67.
- Krahn MM, Kittle LJ and McLeod WD, 1986 b. Evidence for exposure of fish to oil spilled into the Columbia River. *Mar. Environ. Res.*, 20 : 291-298.

- Krahn MM, Burrows DG, MacLeod WD and Malins DC, 1987. Determination of individual metabolites of aromatic compounds in hydrolysed bile of English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 16 : 511-522.
- Krahn MM, Burrows DG, Ylitalo GM, Brown DW, Wigren CA, Collier TK, Chan S-L and Varanasi, U, 1992. Mass spectrometric analysis for aromatic compounds in bile of fish sampled after the Exxon Valdez oil spill. *Environ. Sci. Technol.*, 26 : 116-126.
- Krahn MM, Ylitalo GM, Buzitis J, Krone CA, Stein JE, Chan S-L and Varanasi U, 1993. In *Proceedings of the 1993 International Oil Spill Conference*, Tampa Bay, FL.
- Law FC, Meng JX, He YT and Chui YC, 1994. Urinary and biliary metabolites of pyrene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica*, 24(3) : 221-229.
- Lee RF, Sauerheber R and Dobbs GH, 1972. Uptake, metabolism, and discharge of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine fish. *Mar. Biol.*, 17 : 201-208.
- Leonard JD and Hellou J, 2001. Separation and characterization of gall bladder bile metabolites from speckled trout, *Salvelinus fontinalis*, exposed to individual polycyclic aromatic compounds. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20(3) : 618-623.
- Luthe G, Stroomberg GJ, Ariese F, Brinkman UAT and van Straalen NM, 2002. Metabolism of 1-fluoropyrene and pyrene in marine flatfish and terrestrial isopods. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 12 : 221-229.
- Marty GD, Hoffmann A, Okihira MS, Hepler K and Hanes D, 2003. Retrospective analysis: bile hydrocarbons and histopathology of demersal rockfish in Prince William Sound, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. *Mar. Environ. Res.*, 56 : 569-584.
- Mazéas L and Budzinski, 2002. Improved accuracy of GC-MS quantification of aliphatic and aromatic hydrocarbons in marine sediments and petroleums. Validation on reference matrices and application to the Erika oil spill. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 82(3) : 157-173.

Mazéas O and Budzinski H, *submitted* (a). Solid phase extraction and purification for individual quantification of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in liquid matrices. *Anal. Biol. Chem.*

Mazéas O and Budzinski H, *submitted* (b). Comparison of analytical methods for the individual detection and quantification of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites. *J. Chromatogr. A.*

Mazéas O, Budzinski H and Tronczynski J, *submitted* (a). Evaluation of the exposure of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons in the Seine River mouth through bile metabolites monitoring; comparison with other French Atlantic sites. *Mar. Pollut. Bull.*

Mazéas O, Budzinski H, Claireaux G, Désaunay Y and Tronczynski J, *submitted* (b). Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons from heavy fuel oil in the marine environment : study of biotransformation by fish in laboratory experiments. *Environ. Toxicol. Chem.*

McDonald SJ, Kennicutt MC and Brooks JM, 1992. Evidence of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure in fish from the Antarctic peninsula. *Mar. Poll. Bull.*, 25(9-12) : 313-317.

Moore MJ, and Myers MS. 1994. Pathobiology of chemical-associated neoplasia in fish. In *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives* (Malins DC, Ostrander GK, eds), 327–386. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.

Neff JM, 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment : sources, fates and biological effects. London, Applied Sciences Publishers.

Pangrekar J, Kole PL, Honey SA, Kumar S and Sikka HC, 2003. Metabolism of phenanthrene by brown bullhead liver microsomes. *Aquat. Toxicol.*, 64 : 407-418.

Ruddock PJ, Bird DJ and McCalley, 2002. Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in three species of fish from the Severn estuary. *Ecotox. Environ. Saf.*, 51 : 97-105.

- Ruddock PJ, Bird DJ, McEvoy J and Peters LD, 2003. Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in European eels *Anguilla anguilla* from United Kingdom estuaries. *Sci. Tot. Environ.*, 301 : 105-117.
- Solbakken JE, Palmork KH, Neppelberg T and Scheline RR, 1980. Urinary and biliary metabolites of phenanthrene in the coalfish (*Pollachius virens*). *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 46 : 127-132.
- Solbakken JE and Palmork KH, 1981. Metabolism of Phenanthrene in various marine animals. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 70 : 21-26.
- Statham CN, Melancon MJ and Lech JJ, 1976. Bioconcentration of xenobiotics in trout bile: a proposed monitoring aid for some waterborne chemicals. *Science*, 193 : 680-681.
- Steward AR, Kandaswami C, Chdambaram S, Ziper C, Rutkowski JP and Sikka HC, 1990. Disposition and metabolic fate of benzo[a]pyrene in the brown bullhead. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9 : 1503-1512.
- Tissot BP and Welte DH, 1978. Petroleum formation and occurrence. A new approach to oil and gas exploration. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Tronczynski J (coordination), Munsch C, Boutier B, Averty B, Guiot N, Moisan K, Truquet I, Dugrais L, 2003. Etude comparative de la contamination des sédiments par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) avant et après le naufrage de l'Erika ; Etude et suivi de la contamination de la colonne d'eau (SEDERIKA). In *Suivi des conséquences écologiques et écotoxicologiques dues au naufrage de l'Erika ; Volet 1 : Etendues spatiale et temporelle : répartition dans le milieu*. Rapport annuel 2003.
- Varanasi U, Stein JE and Nishimoto M, 1989. Biotransformation and disposition of PAH in fish. In (Varanasi U, ed) *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*, 93-149. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Varanasi U, Chan S-L, MacLeod WD, Stein JE, Brown DW, Burrows DG, Tilbury KL, Landahl JT, Wigren CA, Hom T and Pierce SM, 1990. Survey of Subsistence Fish and

Shellfish for exposure to Oil Spill from the Exxon Valdez, First Year : 1989. *NOAA Technical Memorandum NMFS F/NWC-191*, US Department of Commerce, Seattle, WA.

Varanasi U and Stein JE, 1991. Disposition of xenobiotic chemicals and metabolites in marine organisms. *Environ. Health Perspect.*, 90 : 93-100.

Varanasi U, Brown DW, Hom T, Burrows DG, Sloan CA, Jay Field L, Stein JE, Tilbury KL, McCain BB and Chan S-L, 1993. Volume I: Survey of Alaskan subsistence fish, marine mammal, and invertebrate samples collected 1989-91 for exposure to oil spilled from the Exxon Valdez. *NOAA Technical Memorandum NMFS-NWFSC-12*, US Department of Commerce, Seattle, WA.

Link between exposure of fish (*Solea solea*) to PAHs and metabolites: Application to the “Erika” oil spill

Hélène Budzinski^{1,a}, Olivier Mazéas^{1,2}, Jacek Tronczynski², Yves Désaunay³, Gilles Bocquené² and Guy Claireaux⁴

¹ Laboratoire de Physico- et Toxicochimie des Systèmes Naturels, UMR 5472 CNRS, Université Bordeaux 1, 351 cours de la Libération, 33405 Talence, France

² IFREMER, DEL/PC, Centre de Nantes, rue de l’Ile d’Yeu, BP 21105, 44311 Nantes Cedex 3, France

³ IFREMER, Laboratoire d’Ecologie Halieutique, Centre de Nantes, rue de l’Ile d’Yeu, BP 21105, 44311 Nantes Cedex 3, France

⁴ CREMA, Place du Séminaire, BP 5, 17137 L’Houmeau, France

Received 6 January 2004; Accepted 9 September 2004

Abstract – An analytical method consisting in enzymatic deconjugation, solid phase extraction and purification, and gas chromatography/mass spectrometry analysis after derivatization was used in this study to quantify Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) metabolites in the bile of fish. The method has been applied in a laboratory experiment studying the fate of pyrene in basin containing soles. This study has allowed the identification of 1-hydroxypyrene as the single metabolite in bile after enzymatic deconjugation. In a second time, 1-hydroxypyrene has been used as a biomarker of exposure in the case of the “Erika” oil spill. This biomonitoring was successful in demonstrating the exposure of juvenile soles to PAHs present in the “Erika” fuel oil.

Key words: PAH metabolites / Fish / Gas chromatography-mass spectrometry

Résumé – Lien entre l’exposition de la sole (*Solea solea*) aux HAP et leurs métabolites : application à la marée noire de l’« Erika ». Dans cette étude, a été utilisée une méthode analytique, consistant en différentes étapes de déconjugaison enzymatique, d’extraction et de purification de la phase solide, et enfin d’analyse par chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse, après dérivation, pour quantifier les métabolites d’hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) présents dans la bile de poisson. La méthode a été appliquée expérimentalement à l’étude du devenir du pyrène chez des soles maintenues en bassins. Cette étude a permis l’identification du 1-hydroxypyrene comme unique métabolite de la bile après déconjugaison enzymatique. Dans un second temps, le 1-hydroxypyrene a été utilisé chez la sole comme biomarqueur de l’exposition dans le cas de la marée noire de l’« Erika ». Ce bio-suivi a démontré l’exposition des juvéniles de soles aux HAP présents dans le fioul de l’« Erika ».

1 Introduction

The 12th of December 1999, the *Erika* oil tanker broke in two, close to the Atlantic coast of France. Consecutively to its sinking, around 20 000 t of fuel oil were spilled into the sea. On the 24th of December, the first slicks reached the coast. The *Erika* oil spill affected the coast-line from the South headland of Brittany to the North of Oléron Island. This area is of special importance considering fish as it shelters some of the largest nurseries of the French Atlantic coast.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are important constituents of fuel oil in terms of quantity (Tissot and Welte 1978; Neff 1979; Boehm et al. 2001) and toxicity toward marine species (Moore et al. 1989; Baumann 1989; De Flora et al. 1991). Because of extensive metabolism of PAHs by fish

(Varanasi et al. 1989), metabolite quantification is more appropriate than PAH tissue content determination, when evaluating PAH exposure (Krahn et al. 1984, 1986a,b; McDonald et al. 1992; van der Oost 2003; Meador 2003). Metabolite concentrations are usually determined semi-quantitatively as global fluorescent aromatic compound equivalents (FACs) in the bile of fish (Krahn et al. 1984, 1986a; Ariese et al. 1993; Lin et al. 1996; Beyer et al. 1996; Aas et al. 2000). In order to evaluate the potential exposure of fish from nurseries within the area affected by the *Erika* fuel oil, an analytical method has been developed to determine individual PAH metabolite concentrations quantitatively in fish bile. This method has been applied to monitor the fate of pyrene (as a model compound representative of PAHs) in soles exposed to waterborne pyrene in basin. Then, the major metabolite of pyrene, 1-hydroxypyrene, previously demonstrated to be a predominant metabolite in fish bile

^a Corresponding author: h.budzinski@lptc.u-bordeaux1.fr

(Krahn et al. 1987; Ariese et al. 1993), has been monitored in the bile of fish captured in a nursery site from the Atlantic coast of France on five occasions between February 2000 and September 2002.

2 Material and methods

2.1 Chemicals

1-hydroxypyrene (OHPyr) was purchased from Lancaster (Strasbourg, France), and 1-hydroxypyrene-d9 and phenanthrene-d10 from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA).

Various solvents were used. Methanol Lichrosolv was obtained from VWR (Strasbourg, France). Ultra Resi-Analysed methylene chloride (Mallinckrodt Baker) was purchased from Atlantic Labo (Eysines, France), Multisolvant ethyl acetate and ethanol (Scharlau) were provided by ICS Nationale (Belin Beliet, France) and sterilized water for injection was purchased from laboratory Aguettant (Lyon, France).

Acetic acid 100% Normapur was provided by VWR (Strasbourg, France), sodium acetate trihydrate 99% and β -glucuronidase-aryl-sulfatase mixture, 100 000 and 7500 units ml⁻¹ respectively, by Sigma-Aldrich (Saint Quentin Falavier, France). 2-mercaptoethanol and bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) were purchased from Acros organics (Noisy-Le-Grand, France).

The different steps of the protocol are: enzymatic deconjugation, solid phase extraction, purification, and analysis (Fig. 1).

2.2 1-hydroxypyrene analysis

Bile samples (100 μ l) were treated with 20 μ l of β -glucuronidase-aryl-sulfatase mixture (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Falavier, France), 100 000 et 7500 units ml⁻¹ respectively, for enzymatic deconjugation. To this purpose, the bile samples were buffered to pH 5 (acetate buffer constituted of sodium acetate and acetic acid in water). 20 μ l of 2-mercaptoethanol, used as an antioxidant, and the internal standard (1-hydroxypyrene-d9 (OHPyrd9)) were subsequently added to the samples. They were then placed in an oven at 37 °C during 20 h.

After ultra-sonication and centrifugation (5 min, 5000 rpm, 18 °C), supernatants were loaded on Bakerbond C₁₈ cartridges (Atlantic Labo, Eysines, France) previously preconditioned with 2 ml of methanol and 4 ml of water. Cartridges were washed with 2 ml of water and 2 ml water/methanol (70:30, v/v). Water traces were then removed by freeze-drying the cartridges. Freeze-drying was performed because of the possible loss of low molecular weight compounds during nitrogen stream drying at room temperature. Metabolites were then eluted with 6 ml of methanol. Extracts were evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream and re-dissolved in methylene chloride.

Supelclean LC-NH₂ cartridges from Supelco (Saint Quentin Falavier, France) were then used for purification. Before loading the sample, the cartridge was first preconditioned

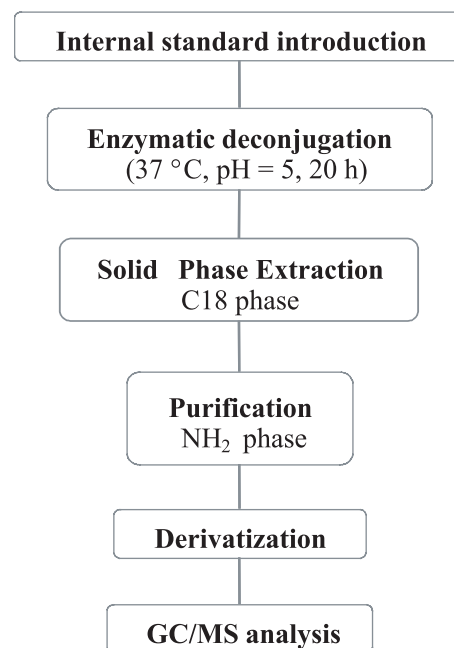


Fig. 1. Analytical protocol for the quantification of the studied PAH metabolites.

with 3 ml methanol/methylene chloride (20:80, v/v). The selective elution of metabolites was obtained using 6 ml of the mixture of solvents previously used. The final extract was evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream and re-dissolved in methylene chloride.

After derivatization with BSTFA (30 min, 65 °C), phenanthrene-d10 (Pd10) was added to the samples for recovery determination and analyses were performed by GC/MS using single ion monitoring mode (SIM; m/z = 188 (Pd10), 290 (OHPyr), 299 (OHPyrd9)) (automated PTV pulsed splitless injection (25 psi, 1.5 min); purge delay: 1.5 min and purge flow: 60 ml min⁻¹; injector temperature: 250 °C; interface temperature: 280 °C; oven temperature: from 70 °C (2 min) to 180 °C (1 min) at 5 °C min⁻¹ and from 180 °C to 290 °C (1 min) at 10 °C min⁻¹, electron impact: 70 eV; voltage: 2000 V; source temperature: 150 °C; 1.53 scan s⁻¹; dwell time: 50 ms). Analyses were performed with a gas chromatograph Agilent Technologies (GC 6890A) equipped with a mass selective detector MSD 5973N. The column was a HP5/MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μ m; phase: 5% diphenyl-, 95% dimethyl-siloxane) and the carrier gas used was helium 6.0 provided by Linde (Toulouse, France). A mixture constituted of 1-hydroxypyrene and 1-hydroxypyrene-d9 was injected at the beginning and at the end of each GC/MS sequence for response factor determination and a manipulation blank was performed together with samples to control potential contamination (an example of a real sample chromatogram is presented Fig. 2). The glassware was washed with detergents and heated 6 h at 450 °C before use.

2.3 PAH analysis

For the determination of PAHs in aqueous phase, water was first passed through a 0.7 μ m GFF filter (VWR,

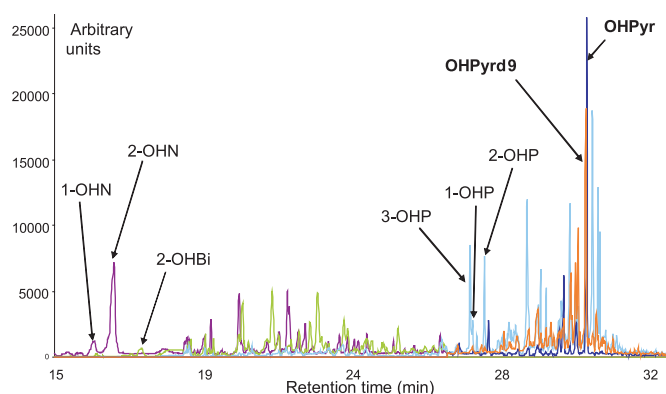


Fig. 2. GC/MS chromatogram (SIM mode) as an example of bile analysis for PAH metabolite determination. (OHN = hydroxy-naphthalene, OHBi = hydroxy-biphenyl, OHP = hydroxyphenanthrene, OHPYr = hydroxy-pyrene)

Strasbourg, France) to separate dissolved PAHs from PAHs adsorbed on particulate matter.

PAHs were extracted from freeze-dried solid matrices (sediment, particulates, liver, muscle) by micro-wave extraction with methylene chloride followed by filtration on clean glass cotton (Budzinski et al. 1999).

Dissolved PAHs were extracted by passing water samples through an octadecyl speedisk (Baker, Atlantic Labo, Eysines, France) on which PAHs are retained. Analytes were then recovered by successive elutions with methylene chloride and methylene chloride/ethyle acetate (1:1, v/v).

Extracts of the different matrices were then purified on alumina (Al_2O_3) and silica (SiO_2) columns and analysed by GC/MS using single ion monitoring mode (SIM; based on molecular ions) (Budzinski et al. 1999). PAHs were quantified by internal standard quantification using perdeuterated PAHs (Baumard and Budzinski 1997).

The glassware was washed with detergents and heated 6 h at 450 °C before use.

2.4 Laboratory study design

Soles (*Solea solea*) were exposed to waterborne pyrene in October 2002. To this purpose, two 500 L basins, placed outdoors, covered with a polyethylene film and containing each one cleaned sand, were filled with 100 L of seawater. 36 fish were introduced into each one and were not fed during the experiment. In one of the basins, a single dose of 100 μg of pyrene dissolved in 1 ml of ethanol was added at T0 (start of the experiment). The other basin was used as a control. The contamination period lasted 7 days followed by a decontamination period (Td) of 7 days in clean basins supplied with open seawater circuit. Water temperature varied from 8.5 to 17.5 °C and salinity from 33‰ to 35‰ during the experiment and depending on the hour of the day. The water was slightly oxygenated during the experiment.

Water was sampled for PAH quantification at T0 and after 3 days (T3) and 7 days (T7) for the control basin (duplicates of 500 ml). Water was sampled two hours after the

Table 1. Sampling framework of the laboratory experiment.

Basin	Sampling schedule		
	Water	Sand	Bile, liver, muscle
Control	T0, T3, T7	T1, T3, T7	T1, T3, T7, Td
Pyrene	H2, T3, T7	T1, T3, T7	T1, T3, T7, Td

Tn time in days; Hn time in hours. Td: decontamination period of 7 days.

contamination (H2) and after 3 days and 7 days for the pyrene contaminated basin (duplicates of 100 ml).

Sand, liver and muscles were also monitored for PAH accumulation meanwhile bile was used for PAH metabolite content determination following the sampling framework presented in Table 1. When it was possible (taken into consideration the amount of bile), bile metabolite determination was undertaken in triplicate. The nine fish collected at each sampling time were quite heterogeneous. Two groups were thus distinguished based on their length. Only one of the two groups (23 ± 2 cm) was analyzed. Analyses of biological matrices were led on pooled samples. Description of the analyzed fish is summarized in Table 2.

2.5 Erika oil spill sample collection

Soles were collected off the Loire River mouth (5–30 m depth), which was particularly impacted by *Erika* fuel, at five occasions following the *Erika* oil tanker wreckage. Age group 1 fish were captured at each sampling time, i.e. February, July and September 2000, September 2001 and 2002. They were dissected on boat just after capture and the organs were pooled before PAH or metabolite analyses (respectively muscle and liver for PAH determination and bile for metabolite determination).

Age group 1 corresponds to soles approximately starting their benthic juvenile development phase in May of the year preceding their capture. In this way, one can establish that fish collected during the first three campaigns belong to the same laying period, that they were born before the oil spill and that they lived through it. Fish collected in September 2001 were born a few months after the oil spill. Description of the pooled fish is summarized in Table 3.

3 Results

3.1 Laboratory study

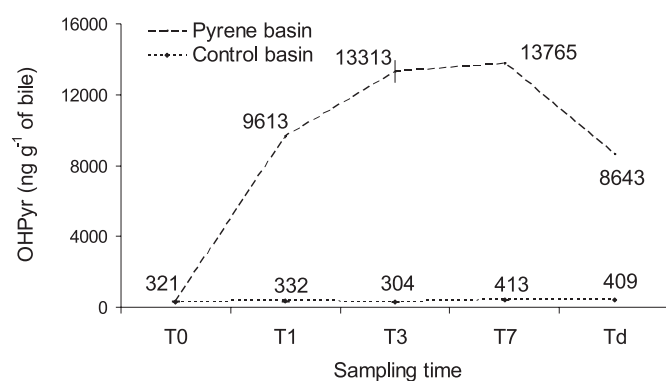
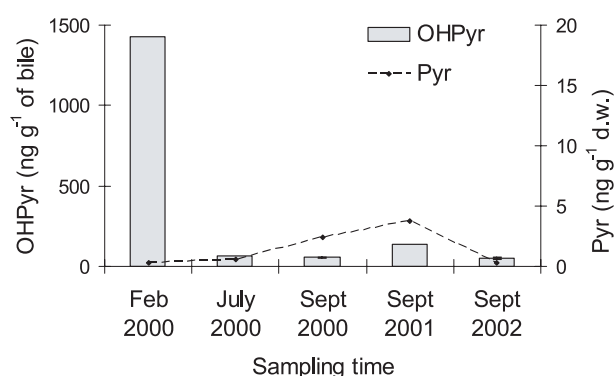
Dissolved pyrene concentration shows a maximum two hours after contamination (367 ± 14 ng L^{-1} , $n = 3$). The concentration at day 3 (9.6 ± 0.9 ng L^{-1} , $n = 3$) and day 7 (5.2 ± 0.6 ng L^{-1} , $n = 3$) shows a strong decrease after three days and a weaker one afterwards. However, this concentration does not return to T0 level (0.6 ± 0.2 ng L^{-1} , $n = 3$). Quantification of pyrene in sediments or particulates does not show any adsorption phenomena to this material at any time of the

Table 2. Description of the analysed pools in the laboratory experiment.

Sampling time	Exposure	Number of fish in the pool	Length (cm)	Number of replicates for bile analyses
T0	control	3	23 ± 1	2
T1	control	3	25 ± 1	3
	pyrene	3	21 ± 1	3
T3	control	3	26 ± 2	3
	pyrene	3	23 ± 1	3
T7	control	3	23 ± 1	2
	pyrene	2	25 ± 1	3
Td	control	1	24	1
	pyrene	2	20 ± 1	1

Table 3. Sampling framework and description of the analysed pools from fish sampled off the Loire Estuary.

Campaign date	Number of fish in the pool	Length (cm)	Number of replicates for bile analyses
Feb. 2000	10	14 ± 1	1
July 2000	10	15 – 20	1
Sept. 2000	10	21 ± 1	2
Sept. 2001	10	20 ± 1	1
Sept. 2002	10	21 ± 2	2

**Fig. 3.** 1-hydroxypyrene (OHPyr) concentration in the bile of soles from the control and pyrene exposures of the experimental study. T0, T1, T3, T7 for sampling days, respectively 0, 1, 3 and 7 days of exposure; Td for sampling after depuration of 7 days.**Fig. 4.** 1-hydroxypyrene (OHPyr) concentration in the bile and pyrene (Pyr) concentration in the muscles of soles sampled from the Loire Mouth. (d.w.: dry weight basis).

experiment. Concerning the fate of pyrene in fish, no bioaccumulation is either detected in liver or muscle. In bile samples, a single metabolite, 1-hydroxypyrene is detected after enzymatic deconjugation compared to control bile. After one day, a large increase of 1-hydroxypyrene concentration is observed (Fig. 3). From T1 to T7, a smaller increase is observed. After the decontamination period, the level of 1-hydroxypyrene decreases under the level of T1 but does not return to T0 level. No dissolved metabolite is detected in water.

3.2 Application to the Erika oil spill

In contrast to pyrene concentrations in muscle, 1-hydroxypyrene concentrations in the bile of fish collected from the Loire Estuary in February 2000 show greater levels than in the bile of the fish collected during the following campaigns (Fig. 4).

4 Discussion

Concerning the laboratory experiment, 1-hydroxypyrene is the only metabolite detected in the bile indicating that pyrene is eliminated as glucuronide or sulphate conjugates, or less probably unconjugated, into the gall bladder under the form

of a single isomer. This result is in good agreement with a previous study concerning the flounder, *Platichthys flesus* (Luthe et al. 2002).

Furthermore, an important difference is observed between theoretical nominal ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) and actual level ($367 \pm 14 \text{ ng L}^{-1}$, $n = 3$) of dissolved pyrene in water two hours after contamination. Taking into account the fact that no increase of pyrene concentration is observed in particulate matter and sediment at this time, this difference can be attributed to adsorption on the basin surface, photochemical degradation or, to a smaller extent, to fish absorption. This result underlies the importance of leading actual measures of contamination in microcosm or mesocosm experiments. The large decrease of dissolved pyrene concentration observed after 3 days can only be attributed to the same phenomena because of the unexpected non-adsorption of pyrene on particulates and sediment. The absence of bioaccumulation of pyrene in the liver and muscle of fish can be explained by the large increase of 1-hydroxypyrene after no more than one day. These results indicate that the pyrene absorbed by fish is efficiently metabolized. This can be explained by the low level of contamination chosen for this experiment. The weaker increase observed at days 3 and 7 can be correlated with the weaker level of dissolved pyrene in water.

At the end of the decontamination period, the level of 1-hydroxypyrene decreases under the level of T1 but does not return to T0 level. This could be due to the non-feeding of fish which prevents from normal elimination of the bile into the intestine.

Concerning the field study, the low levels of pyrene in muscle of fish during the five campaigns (between 10 and 30 ng g^{-1} of dry tissue for the sum of 12 of the 16 PAHs of the US-EPA: phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benz(a)anthracene, chrysene (+triphenyle), benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene (+benzo(j)fluoranthene), benzo(a)pyrene, dibenz(a,h)anthracene (+dibenz(a,c)anthracene), benzo(g,h,i)perylene and indeno(1, 2, 3-cd)pyrene) put in evidence the unfeasibility of using PAH quantification for pollution diagnostic in the case of fish. On the contrary, the high level of 1-hydroxypyrene observed two months after the *Erika* sinking demonstrates the large exposure of juvenile soles to the *Erika* fuel oil and suggests a potential impact of the oil spill on French Atlantic sole nurseries. This is in good agreement with previous studies showing high levels of PAH metabolites in the bile of fish collected after other oil spill events (Krahn et al. 1986b, 1992, 1993; Jewett et al. 2002; Huggett et al. 2003; Marty et al. 2003). The low levels measured in fish from the same generation (which have lived through the oil spill) 4 months later indicates the excretion of the biliary metabolites measured in February and the rapid decrease of the pollution. It could be considered that the system returns to a sort of background level of 1-hydroxypyrene bile content around 50 ng g^{-1} of bile. Nevertheless, due to unknown levels of metabolites before the oil spill, it is impossible to insure that the system has returned to its initial state and to conclude definitively on the non-persistent character of the *Erika* oil spill.

5 Conclusion

The study of pyrene transformation by soles has allowed to identify 1-hydroxypyrene as the single metabolite of pyrene in bile after enzymatic deconjugation. In addition, this study has demonstrated the efficiency of the sole to rapidly metabolize pyrene. Finally, results of field campaigns led in the nursery of the Loire Estuary after the *Erika* oil spill have shown the interest of PAH metabolite monitoring to evaluate the exposure of fish to PAHs. This biomonitoring has allowed to put in evidence the exposure of juvenile soles to PAHs contained in *Erika* fuel oil.

Acknowledgements. The French Ministry “Écologie et Développement Durable” is acknowledged for financial support through the *Erika* program.

References

- Aas E., Beyer J., Goksøyr A., 2000, Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic hydrocarbon exposure in fish: an evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation. *Biomarkers* 5, 9-23.
- Ariese F., Kok S.J., Verkaik M., Gooijer C., Velthorst N.H., Hofstraat J.W., 1993, Synchronous fluorescence spectrometry of fish bile: A rapid screening method for the biomonitoring of PAH exposure. *Aquat. Toxicol.* 26, 273-286.
- Baumann P.C., 1989, PAH, metabolites, and neoplasia in feral fish populations. In: Varanasi U. (Ed.), *Metabolism of PAH in the Aquatic Environment*. CRC, Boca Raton, FL, USA, pp. 269-290.
- Beyer J., Sandvik M., Hylland K., Fjeld E., Egaas E., Aas E., Skåre J.U., Goksøyr A., 1996, Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed by caging to polluted sediments in Sørøfjorden, Norway. *Aquat. Toxicol.* 36, 75-98.
- Boehm P.D., Page D.S., Burns W.A., Bence A.E., Mankiewicz P.J., Brown J.S., 2001, Resolving the origin of the petrogenic hydrocarbon background in Prince William Sound, Alaska. *Environ. Sci. Technol.* 35, 471-479.
- Budzinski H., Letellier M., Garrigues P., Le Menach K., 1999, Optimisation of the microwave-assisted extraction in open cell of PAHs from soils and sediments – Study of moisture effect. *J. Chromatogr. A* 837, 187-200.
- De Flora S., Bagnasco M., Zanicchi P., 1991, Genotoxic, carcinogenic and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. *Mutation Res.* 258, 285-320.
- Huggett R.J., Stegeman J.J., Page D.S., Parker K.R., Woodin B., Brown J.S., 2003, Biomarkers in Fish from Prince William Sound and the Gulf of Alaska: 1999-2000. *Environ. Sci. Technol.* 37, 4043-4051.
- Jewett J.C., Dean T.A., Woodin B.R., Hoberg M.K., Stegeman J.J., 2002, Exposure to hydrocarbons 10 years after the *Exxon Valdez* oil spill: evidence from cytochrome P4501A expression and biliary FACs in nearshore demersal fishes. *Mar. Environ. Res.* 54, 21-48.
- Krahn M.M., Myers M., Burrows D.G., Malins D.C., 1984, Determination of metabolites of xenobiotics in bile of fish from polluted waterways. *Xenobiotica* 14, 633-646.

- Krahn M.M., Rhodes L.D., Myers M.S., Moore L.K., MacLeod W.D., Malins D.C., 1986a, Associations between metabolites of aromatic compounds in bile and the occurrence of hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 15, 61-67.
- Krahn M.M., Kittle L.J., McLeod W.D., 1986b, Evidence for exposure of fish to oil spilled into the Columbia River. Mar. Environ. Res. 20, 291-298.
- Krahn M.M., Burrows D.G., MacLeod W.D., Malins D.C., 1987, Determination of individual metabolites of aromatic compounds in hydrolysed bile of English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 16, 511-522.
- Krahn M.M., Burrows D.G., Ylitalo G.M., Brown D.W., Wigren C.A., Collier T.K., Chan S.-L., Varanasi U., 1992, Mass spectrometric analysis for aromatic compounds in bile of fish sampled after the *Exxon Valdez* oil spill. Environ. Sci. Technol. 26, 116-126.
- Krahn M.M., Ylitalo G.M., Buzitis J., Bolton J.L., Wigren C.A., Chan S.-L., Varanasi U., 1993, Analyses for petroleum-related contaminants in marine fish and sediments following the Gulf oil spill. Mar. Pollut. Bull. 27, 285-292.
- Lin E.L.C., Cormier S.M., Torsella J.A., 1996, Fish biliary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites estimated by fixed-wavelength fluorescence: comparison with HPLC-fluorescent detection. Ecotoxicol. Environ. Saf. 35, 16-23.
- Luthe G., Stroomberg G.J., Ariese F., Brinkman U.A.T., van Straalen N.M., 2002, Metabolism of 1-fluoropyrene and pyrene in marine flatfish and terrestrial isopods. Environ. Toxicol. Pharmacol. 12, 221-229.
- Marty G.D., Hoffmann A., Okihiro M.S., Hepler K., Hanes D., 2003, Retrospective analysis: bile hydrocarbons and histopathology of demersal rockfish in Prince William Sound, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. Mar. Environ. Res. 56, 569-584.
- McDonald S.J., Kennicutt M.C., Brooks J.M., 1992, Evidence of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure in fish from the Antarctic peninsula. Mar. Pollut. Bull. 25, 313-317.
- Meador J.P., 2003, Bioaccumulation of PAHs in marine invertebrates. In: Douben P.E.T. (Ed.), PAHs: An Ecotoxicological Perspective. Wiley, England, pp. 147-172.
- Moore M.N., Livingstone D.R., Widdows J., 1989, Hydrocarbons in marine molluscs: Biological effects and ecological consequences. In: Varanasi U. (Ed.), Metabolism of PAH in the Aquatic Environment. CRC, Boca Raton, FL, USA, pp. 185-202.
- Neff J.M., 1979, Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: sources, fates and biological effects. London, Applied Sciences Publishers.
- Tissot B.P., Welte D.H., 1978, Petroleum formation and occurrence. A new approach to oil and gas exploration. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P.E., 2003, Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13, 57-149.
- Varanasi U., Stein J.E., Nishimoto M., 1989, Biotransformation and disposition of PAH in fish. In: Varanasi U. (Ed.), Metabolism of PAH in the Aquatic Environment. CRC, Boca Raton, FL, USA, pp. 93-149.

Influence of oil exposure on the physiology and ecology of the common sole *Solea solea*: Experimental and field approaches

Guy Claireaux^{1,a}, Yves Désaunay², Farida Akcha², Benoît Aupérin³, Gilles Bocquené², Hélène Budzinski⁴, Jean-Pierre Cravedi⁵, Fariba Davoodi¹, Robert Galois¹, Camille Gilliers², Christelle Goanvec⁶, Daniel Guérault², Nathalie Imbert⁷, Olivier Mazéas⁴, Guy Nonnotte⁶, Liliane Nonnotte⁶, Patrick Prunet³, Philippe Sébert⁸ and Aurélie Vettier⁸

¹ Centre de Recherche sur les Écosystèmes marins et aquacoles (CNRS-IFREMER), 17137 L'Houmeau, France

² IFREMER, Laboratoire d'Écologie halieutique, rue de l'Île d'Yeu, 44311 Nantes Cedex 03, France

³ INRA, Station commune de recherches en ichtyophysiologie, Biodiversité et Environnement, Équipe physiologie de l'adaptation et du stress, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes Cedex, France

⁴ Laboratoire de physico-toxicochimie des systèmes naturels, Université de Bordeaux, 351 cours de la Libération, 33405 Talence Cedex, France

⁵ INRA, Laboratoire des xénobiotiques, UMR 1089, Toulouse, France

⁶ Laboratoire de biologie et de physiologie cellulaire, Université de Bretagne Occidentale, UFR Sciences et Techniques, 6 avenue Le Gorgeu, BP 809, 29285 Brest Cedex, France

⁷ Université de La Rochelle, Laboratoire de biologie et environnement marins, avenue M. Crépeau, La Rochelle, 17042 Cedex 1, France

⁸ Université de Bretagne Occidentale, Laboratoire de physiologie, Unité haute pression et métabolisme EA 3879, UFR Médecine, CS 93837, Brest 29238 Cedex 03, France

Received 11 February 2004; Accepted 2 September 2004

Abstract – Evaluating the ecological impact of an oil spill is a complex issue requiring coherently articulated examination of the sequence of interactions that link the cell, where contaminants exert their effects, to the ecosystem, where interactions with human activities arise. This sequence of interactions traverses the frontiers between scientific disciplines (chemistry, toxicology, physiology, and fisheries ecology). Using the common sole (*Solea solea* L.) as a model species for the coastal habitats polluted by the “Erika” oil spill, our research project attempted to define indices of functional integrity that characterised the consequences of fuel exposure at the different biological levels. The coupling of field observations with experimental laboratory work revealed how functional alterations which are readily observable within individuals and their organs are progressively obscured as investigation progresses towards more complex organisational levels. Some of the approaches and indices are proposed as instruments for evaluating the impact of contamination by hydrocarbons.

Key words: Oil spill / Complex system approach / Common sole / Physiological ecology

Résumé – Influence de l'exposition au fioul sur la physiologie et l'écologie de la sole commune *Solea solea* : approches expérimentales et in situ. L'évaluation des conséquences écologiques d'une marée noire est un problème complexe qui requiert un examen articulé et cohérent de la chaîne d'interactions qui relie l'échelle cellulaire, à laquelle agit le contaminant, à l'échelle écosystémique, où se situent les interactions avec les activités humaines. Cette chaîne d'interactions traverse les frontières des disciplines scientifiques (chimie, toxicologie, physiologie, écologie halieutique). En prenant la sole (*Solea solea* L.) comme espèce cible – espèce caractéristique des habitats côtiers pollués par l'« Erika » – le programme de recherche ECTOPHY est une première tentative de mise en place d'une approche multidisciplinaire visant à définir, valider et mettre en relation des indicateurs d'intégrité fonctionnelle caractérisant les différents niveaux biologiques. Le couplage d'observations in situ avec des expositions en milieu contrôlé a montré que des pertes de fonctionnalité évidentes et durables à l'échelle de l'individu sont masquées à l'échelle de la population. Certaines des approches (in situ ou expérimentale) et certains des indicateurs testés peuvent être proposés comme instruments utilisables dans le cadre d'évaluation d'impact de pollutions par des hydrocarbures.

^a Corresponding author: guy.claireaux@ifremer.fr

1 Introduction

Following the 1999 *Erika* oil spill, bays and estuaries of the Northern Bay of Biscay were exposed to petroleum (Foreword, this issue). A total of 20 000 tons of fuel drifted for several weeks in the open sea and spread along 400 km of coastline, from western Brittany to the northern tips of the islands of Ré and Oléron. These coastal habitats comprise important nurseries for juveniles of numerous fish species, in particular the common sole (Koutsikopoulos et al. 1989). Adult sole spawn during the first three months of the year (with a peak in early March in North Biscay), then pelagic eggs and larvae transform into juvenile benthic fish that concentrate in shallow waters and estuaries in June and July. Juveniles remain in coastal waters for 2 to 3 years until they reach maturity and migrate to deeper waters. From a fisheries point of view, the common sole is a major resource, 1795 tons of sole are harvested yearly in the Bay of Biscay, with a value of 17.7 M€ (Léauté and Caill-Milly 2003). However, since 1993 the spawning biomass of the Bay of Biscay stock has undergone a constant decline and it is currently at risk, with the lowest level of recruitment of the last 20 years recorded for the year class 1999 (Anonymous 2003).

Considering the potential biological and economic consequences of the contamination of coastal nursery areas, we launched a research program that combined experimental and field approaches to investigate how the *Erika* oil spill might have affected the physiological and ecological performance of juvenile sole.

The term “performance” has been used extensively in the literature but, surprisingly, little attention has been given to the interpretation of fish performance at the various levels of biological organisation (Whitfield and Elliott 2002). At a cellular level, performance describes structural integrity and maintenance of biochemical processes. Individual performance relates to the morphological and functional integrity of the whole animal. Population performance describes the sustainability and maintenance of a particular population. At the community and ecosystem levels, performance is described by the assemblage of organisms and by the relationships between species in that assemblage. Evaluating the ecological implications of a particular environmental event requires that all of these levels of biological organisation, and their interactions, be identified and considered (Fig. 1). For instance, the cell is the level where the interactions between a fish and its physico-chemical environment occur, whereas the ecosystem is the level where the interactions with human activities take place. Because environmental impacts propagate across organisational levels, it is essential that any change in performance at one level be properly linked to mechanisms and processes taking place at the level immediately below. It is also important that the relevance of a change at a given level of integration be examined at the organisational level immediately above.

At each level of integration, the changes in performance observed as the result of an environmental event (i.e., “signal”) are measured against a background of variability (i.e., “noise”). This noise has two main sources. At the cellular and individual levels it mainly originates from the inherent inter-individual variability in response traits. At higher organisational levels, this background noise largely results from

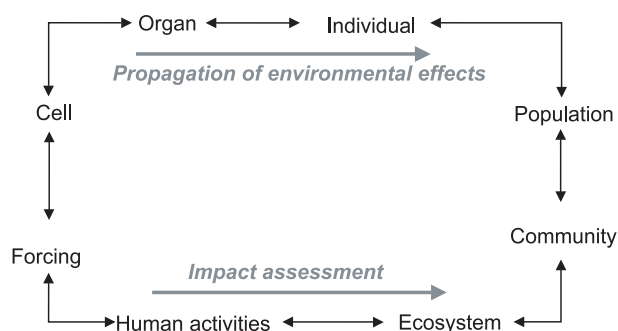


Fig. 1. The cycle of interactions between biological levels.

rapidly increasing numbers of factors that influence a particular performance, each generating a specific pattern of variability. Recruitment in fish stocks is a classical example of an integrated performance with a correspondingly high level of inter-annual variability. In sole, for instance, inter-annual variability in recruitment at the Bay of Vilaine nursery scale is in the range 1 to 10 (Le Pape et al. 2003b), whereas it varies only by a factor 2.5 at the Bay of Biscay stock scale (Anonymous 2003). Following the accident of the “*Exxon Valdez*” in Alaska, Hilborn (1996) conducted a critical analysis of the methods used to evaluate the ecological consequences of oil spills in marine habitats. This analysis underlined the need for states of reference that provided reliable information about natural environmental variability and its potential influence upon the biology of fishes. Carefully conducted and integrated experimental work was recognised as an essential element for disentangling anthropogenic and natural influences (Hilborn 1996). More recently, Peterson et al. (2003) emphasised the need to consider long term consequences of sublethal exposure to pollution and their cascading effects in physically confined systems such as spawning areas and nurseries.

In order to investigate the long-term consequences of exposure of marine nurseries to petroleum, our research project combined three aspects. The first was essentially experimental and aimed at examining, under laboratory conditions, the consequences of oil exposure on the physiological mechanisms involved in environmental adaptation. The second aspect validated the relevance of the laboratory phase by attempting a transition to field conditions using tidal earthen ponds as mesocosms. The last aspect involved fieldwork and research vessel cruises and aimed at authenticating the contamination in natura and at testing the ecological relevance of the experimental stages of our project.

2 Materials and methods

2.1 Contamination protocol

At the time when these experiments were conducted, fuel from the tanker *Erika* was no longer available and so fuel No. 2 was used as an alternative. The polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) composition of these two fuels was comparable when assessed as described by Mazéas and Budzinski (2001), although differences were noticed particularly with regard to

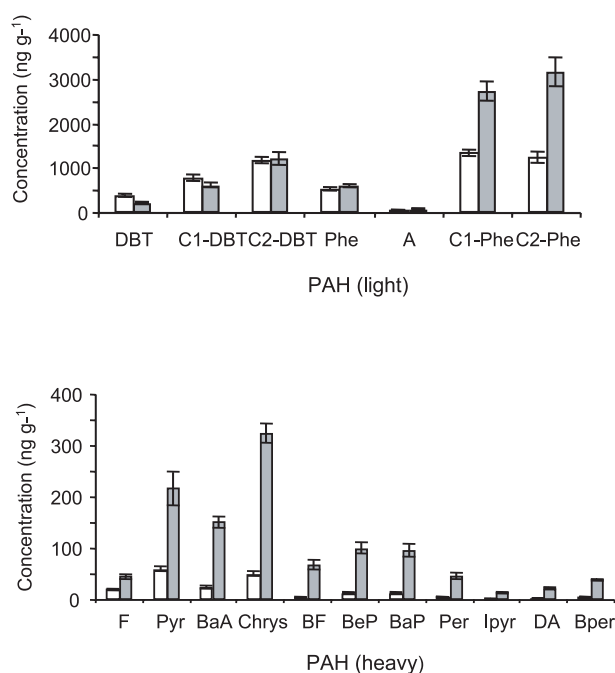


Fig. 2. PAH composition of fuel #2 (white boxes) compared with that of the fuel recovered from *Erika* (grey boxes).

long-chain PAH (Fig. 2). This fuel No. 2 is therefore expected to be less toxic to fish than the true *Erika* fuel.

The *Erika* event was characterised by drifting slicks and weakly contaminated sediments (Tronczynski et al. 2004). In order to mimic these contamination conditions, fish were exposed with fuel that was simply poured onto the surface of the experimental tanks. A gentle air bubbling allowed the aeration of the water and the homogeneity of the soluble phase. We considered that this exposure regime represented an acceptable compromise between realistic contamination conditions and the need to regulate other environmental parameters within reasonable limits. A static exposure protocol was employed because it was not feasible to manage decontamination of the large volumes of water waste that would have been generated by a flow through system (50–200 L h⁻¹). In order to maintain the physico-chemical quality of the water (particularly with regard to pH and ammonia), fish could not be kept in the exposure water for more than a few days. Thus, to compensate for the limitations of the exposure period, relatively high doses of fuel were employed.

2.2 Laboratory experimental phase

Sole (1-group and 2-group; length 15–22 cm) were obtained by trawling at field site 4 (Pertuis Breton, Fig. 3). Upon arrival at the laboratory they were transferred to indoor rearing tanks (2 × 2 m) and submitted to a sanitary antibiotic treatment during 7 days. An additional 4-week acclimation period was allowed during which fish were fed with fresh mussel and oyster flesh. Animals were then randomly attributed to experimental groups of 40 individuals and placed in 500 L rearing tanks covered with a polyethylene lining. The bottom of those tanks was topped with 1 cm of sand.

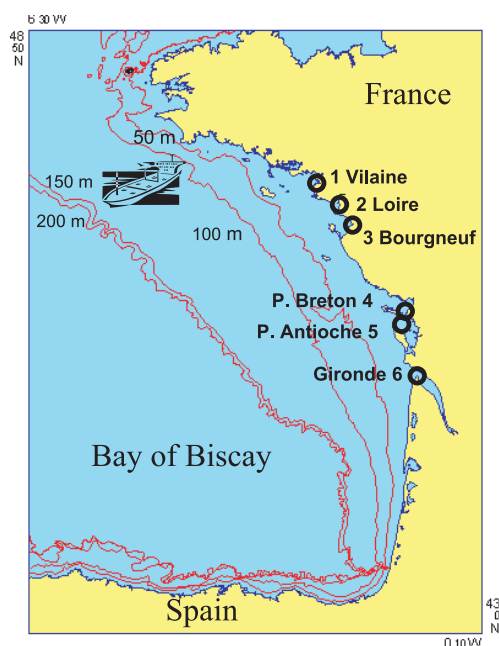


Fig. 3. Location of the *Erika* wreck and surveyed coastal sites. 1: Vilaine Estuary; 2: Loire Estuary; 3: Bourgneuf Bay; 4: Pertuis Breton; 5: Pertuis d'Antioche; 6: Gironde Estuary.

The fuel exposure conditions tested are summarised in Table 1. Fuel to water ratios (1/100, 1/200, 1/1000 or 1/2000 vol/vol) were obtained by directly adding fuel onto the surface of the experimental tanks. There was no direct contact between the fish in the sand and the fuel floating at the surface. Typically fuel exposure lasted 5 days. During that period the water was not renewed and animals were not fed. Following fuel-exposure, fish were transferred into unpolluted tanks where they were left undisturbed for about 2 hours. Each fish was then anaesthetised (0.2 ml L⁻¹ of 2-phenoxyethanol) and its length and weight measured. Blood was sampled via the caudal vein and the fish was killed by a sharp blow in the cervical region before the various tissues (gills, bile, liver, white muscle) were dissected. The whole procedure was completed within 8 h.

Toxicology

Liver ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity was selected as a biomarker of exposure to PAH (Burgeot et al. 1994; Kirby et al. 1999). It was measured as described by Galgani and Payne (1991) from microsomes prepared from homogenised liver according to Monod et al. (1994).

Total PAH in white muscle and liver were measured following the methods described in Budzinski et al. (2004). For the determination of PAH in the aqueous phase, water was first collected in clean glass bottles and then passed through a 0.7 μm GF/F filter (VWR, Strasbourg, France) to separate dissolved PAH from PAH adsorbed on particulate matter. Dissolved PAH were then immediately extracted by passing water sample (1 L) through an octadecyl speedisk on which PAH are retained. Analytes were recovered by successive elutions with dichloromethane and dichloromethane/ethyle

Table 1. Fuel to water ratios and PAH concentrations in water (1 analysis on 1 L of the dissolved phase). The summed PAH are the following: phenanthrene, fluoranthene, pyrene, benz(a)anthracene, chrysene+triphenylene, benzo(b)fluoranthene, benzo(j)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, dibenz(a,h)anthracene + dibenz(a,c)anthracene, benzo(g,h,i)perylene, indeno(1,2,3-cd)pyrene.

	Temperature (°C)	Control	1/2000 (vol/vol)	1/1000 (vol/vol)	1/200 (vol/vol)	1/100 (vol/vol)
PAH in water (ng L ⁻¹)	5	6	24	-	-	78
	15	4	-	50	39	-

acetate (1/1; v/v). Extracts were then purified on alumina (Al₂O₃) and silica (SiO₂) columns and analysed by GC/MS using single ion monitoring mode (Budzinski et al. 1999). PAH were quantified by internal standard quantification using perdeuterated PAH (Baumard and Budzinski 1997).

Biochemistry of cellular bioenergetics

Two parallel approaches were followed. In a global approach, the energetics of the white muscle was examined through the determination of ATP, ADP, AMP and IMP concentration and the calculation of the cellular energy charge (EC) and compensated energy charge (EC'). These measurements were performed using specific HPLC protocols (Cann-Moisson et al. 1989; Vettier and Sébert 2004). In a more specific approach, activity of white muscle cytochrome C oxidase (COX) was determined (Vettier and Sébert 2004). COX is the last enzyme complex of the mitochondrial respiratory chain and since it controls the oxidative phosphorylation process it represents a valid indicator of cellular energetics. COX activity was determined in the heart (ventricle) and white muscle.

Gill histology and gill Na,K-ATPase activity

Gill samples were put in fixative (Bouin) for at least 24 h and were then dehydrated via alcohol bathing (Martoja and Martoja-Pierson 1967). Samples were then embedded in paraffin, sliced (5 µm) and stained with a mixture of hematoxylin-eosin or periodic acid schiff (PAS) according to routine procedures (Martoja and Martoja-Pierson 1967; Vethaak and Wester 1996; Stehr et al. 2003).

Gill Na,K-ATPase plays a major role in osmoregulation and the preservation of the osmotic and ionic characteristics of the extracellular compartment. In vitro Na,K-ATPase activity was assessed via routine biochemical assays. In this case, gill tissue samples were freeze clamped immediately upon dissection and then kept at -80 °C until analysis.

Isometric tension measurements using ventricular muscle strips

The preparation of cardiac tissues for measuring isometric tension has been described elsewhere (Shiels et al. 1998). Briefly, fish (control, *n* = 10; fuel-exposed, *n* = 10) were anaesthetised (0.2 ml L⁻¹ of 2-phenoxyethanol) and killed by

cervical dislocation. The heart was quickly excised and placed in a dish of ice-chilled, oxygenated physiological saline. The ventricle was isolated and cut length-wise to expose the lumen. Two 1 mm-wide pieces of muscle were dissected from each heart with the aid of a dissecting microscope. Each muscle strip was hung in a water-jacketed organ bath between an isometric force transducer (Somedic Medical Ltd, Sweden) and a fixed post. The tissue was immersed in oxygenated saline and temperature was controlled (15 °C). Because adrenaline (AD) is present at nanomolar concentrations in the circulation of resting fish, a tonic level of AD (1 nM) was utilised for the control situation and a AD concentration of 1 µM was tested to provide a maximal level of adrenergic stimulation (Reid et al. 1998; Gamperl et al. 1994). For each force-frequency trial, the pacing frequency was increased from 0.2 Hz to 0.5, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5, 1.8 and 2.0 Hz (or until the preparation became arrhythmic at frequencies >2.0 Hz). A full description of the protocol followed is given in Mercier et al. (2002).

Aerobic metabolism

Oxygen consumption rate (*MO*₂ in mgO₂ kg⁻¹ h⁻¹) of fuel-exposed fish (*n* = 8; 1/200 vol/vol) was compared to that of control fish (*n* = 8). The experimental set up and protocol have been described in detail by Lefrançois and Claireaux (2003). Values of oxygen consumption were standardised to a 100 g-animal using a mass exponent of 0.8 (Van den Thillart et al. 1994).

2.3 Tidal earthen pond mesocosms

This part of the project aimed at considering, from an ecological perspective, the loss in functional and morphological integrity and/or performance that might follow the experimental exposure to fuel. Two series of experiments were performed, the first one with large animals (1- and 2-groups; total length 17–25 cm) from site 4 (Pertuis Breton, Fig. 3), the second with younger animals (0-group; total length 6–10 cm) from site 1 (Vilaine Estuary). In the first case, the fuel to water ratio tested was 1/200 and the duration of the exposure was 5 days at temperature of 16 °C. In the second case, fuel to water ratio and exposure duration were divided by 5 (i.e., 1/1000 and 24 h respectively) and water temperature during fuel exposure was 19 °C.

The earthen tidal ponds (200 m², 1 m depth) are situated at the CREMA-L'Houmeau field site (near site 4; Fig. 3). Preliminary experiments and empirical observations have shown

that the natural fauna present in these tidal ponds provides a carrying capacity corresponding to the nutritional needs of approximately 3 kg of fish. During the experimental period, water temperature in the ponds fluctuated between 15 and 24 °C and salinity between 25 and 29‰. Water oxygenation was maintained using mechanical aerators.

Experiment 1: Growth rate of juvenile sole (17–25 cm) exposed to 1/200 fuel for 5 days

A group of 80 soles captured in May 2002 at site 4 (Fig. 3) was divided in two subgroups. Fish from the first subgroup were weighed, their length was measured and they were tagged subcutaneously with a transponder (pit tag). They were then exposed to fuel (1/200) for 5 days following the same procedure as for the laboratory phase. Fish from the second subgroup were submitted to the same manipulation but were not exposed to fuel. Fish from these two groups were then distributed randomly among two tidal earthen ponds. Three months later, both ponds were drained and fish were individually identified, weighed and their length measured. Fish were then returned to their initial pond for another 3-month period at the end of which the same measurements were performed again. The final observation provided the survival rate and the individual growth rate.

Experiment 2: Growth and condition factor of young of the year sole (6–10 cm) exposed to 1/1000 fuel for 24 hours

A group of 630 juvenile soles (4 to 5 months old) were obtained from site 1 (Fig. 3) in July 2002 and transferred, by road, to the CREMA -L'Houmeau field site (transportation duration: 3 h). Only 15 individuals died during the transfer. Upon arrival, sole were distributed among 2 subgroups of about 300 individuals and placed in 400 L rearing tanks supplied with running seawater (19 °C). Fish were too small to be tagged. One subgroup was exposed to fuel (1/1000, 24 h) and then both control and fuel-exposed subgroups were placed in two identical but distinct tidal ponds (July 8th). Water condition in the ponds was monitored continuously. Sampling took place on September 4th (30 fish per ponds) and finally in October 24th at termination of the trial. Plankton nets (315 µm) were placed around the exit pipe during draining of the ponds to sample the mobile fauna. Benthos (surface: 0.1 m², depth: 20 cm, n: 3 samples per pond) was also sampled. Surviving sole from both ponds were compared in terms of number (survival rate), mean growth (mean body length), recent otolith growth (mean increment width), condition factor *K* and lipid reserves (triacylglycerol/sterol ratio TG/ST, according to Galois et al. 1990). Fulton morphometric condition factor *K* (mg mm⁻³) was calculated as follow:

$$K = 100(W/aL^3) \quad (1)$$

where *W* = wet weight (mg), *L* = standard length (mm), *a* = species specific constant.

2.4 Sea surveys

In situ observations

Monitored nurseries (depth 5 to 30 m) were selected according to their biological importance (Désaunay et al. 1981; Le Pape et al. 2003c) and to their assumed level of exposure to the *Erika* oil spill (Fig. 3). According to Chantereau et al. (2002) and web site <http://www.ifremer.fr/envlit/surveillance/ERIKA.htm>, the most visibly polluted areas were situated between the Morbihan coast and the Island of Noirmoutier, with higher and long-lasting bivalve contamination in the Bay of Vilaine (site 1), Loire estuary (site 2) and Bay of Bourgneuf (site 3). These three sites are major nursery areas for sole in northern Bay of Biscay. Conversely, more southern nursery areas such as Pertuis Breton (site 4), Pertuis d'Antioche (site 5) and Gironde estuary (site 6) were considered as non-oiled sites.

In February 2000, survey cruises were aimed at revealing potential short-term effects on fish condition and distribution as well as at evaluating the associated fauna. In June and July, the goal was to verify the settlement of young of the year on the nursery grounds. In September, the condition on the nurseries (fish and invertebrate communities, demography, abundance, growth per year class) was more specifically examined. This monitoring was repeated in September 2001 and 2002.

Samplings (protocols manual Désaunay and Guérault 2002) were performed with a beam trawl (width: 2.5 m; height: 0.5 m) with a stretched mesh size of 20 mm in the cod end. Each sampling at a speed of 2.7 knots covered 4500 to 5000 m². In 5 cruises a total of 488 hauls were conducted.

The descriptors used to characterise the sole population were occurrence per site, distribution in age and size, abundance (number of individual per ha) with no correction for catchability, presence of necrosis or malformation.

Biological analysis (0-group)

In September 2000, 2001 and 2002 various morphometric and growth-related indices were evaluated on seven month-old animals. For each haul, individuals were immediately frozen at -20 °C (193, 175 and 215 individuals in respective years). Fish size ranged from 6 to 13 cm. Fulton morphometric condition factor *K* (mg mm⁻³) was calculated. Otoliths were examined using the technique described in Gilliers et al. (in prep.) and taking into account the fact that the readable portion at the fringes of the otolith is restricted to the last 10 days (Suthers 1998). The estimation of recent growth *RG* is given by the average increment width (µm), as an indication of the somatic growth (Karakiri et al. 1989; Sogard and Able 1992). Variance analysis and Tukey tests were applied to check for inter sites differences in *K* and *RG* indices.

Ecotoxicology

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)

During the sea surveys carried out in February, July and September 2000, in September 2001 and in September 2002,

Table 2. Fuel to water ratios and PAH concentrations in liver and white muscle (dry tissues; 10 fishes were pooled and 1 analysis performed on each pool). The summed PAH are the following: phenanthrene, fluoranthene, pyrene, benz(a)anthracene, chrysene+triphenylene, benzo(b)fluoranthene, benzo(j)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, dibenz(a,h)anthracene + dibenz(a,c)anthracene, benzo(g,h,i)perylene, indeno(1,2,3-cd)pyrene.

	Temperature (°C)	Control	1/2000 (vol/vol)	1/1000 (vol/vol)	1/200 (vol/vol)	1/100 (vol/vol)
PAH in liver (ng g ⁻¹)	5	22	57	99	225	260
	15	15	-	109	71	-
PAH in white muscle (ng g ⁻¹)	5	7	8	79	171	198
	15	8	-	70	92	-

a piece of white muscle was dissected from 10 fish (1-group, born in March of the previous year) and immediately stored at -80 °C. In the laboratory, samples were lyophilised and ground before extraction. PAH's were extracted from freeze-dried solid matrices by microwave assisted extraction with dichloromethane followed by filtration on clean glass cotton (Budzinski et al. 1995). Extracts were then purified on alumina (Al₂O₃) and silica (SiO₂) columns and analysed by GC/MS using single ion monitoring mode (Budzinski et al. 1999). PAH were quantified by internal standard quantification using perdeuterated PAH (Baumard and Budzinski 1997).

Biomarkers (EROD)

Liver ethoxyresorufine-O-deethylase (EROD) activity was determined as described above (Galgani and Payne 1991). At each of field site 1 to 4, 10 individuals of about the same size (1-group, 18–22 cm) were analysed. Samples were collected during the three 2000 cruises (February, July and September).

DNA adducts

The analytical protocols can be found in Akcha et al. (2003). ³²P-post-labelled DNA adducts were measured from blood samples and separation was achieved by thin-layer chromatography on PEI cellulose plates. Adduct profiles were analysed qualitatively and semi-quantitatively by autoradiography of the plates, using a radioanalytical system of image analysis. DNA adduct levels were expressed as the number of adducts per 10⁹ normal nucleotides. Samples were collected during the three 2000 cruises (February, July and September) at the same sites as EROD analysis.

3 Results

3.1 Laboratory experimental phase

Tissue contamination

Although PAH's are metabolised by fish (Budzinski et al. 2004), PAH concentrations were measured in muscle and liver as an indication of immediate contamination. Table 2 summarises the PAH concentrations in muscle and liver in the various experimental conditions. While tissues PAH

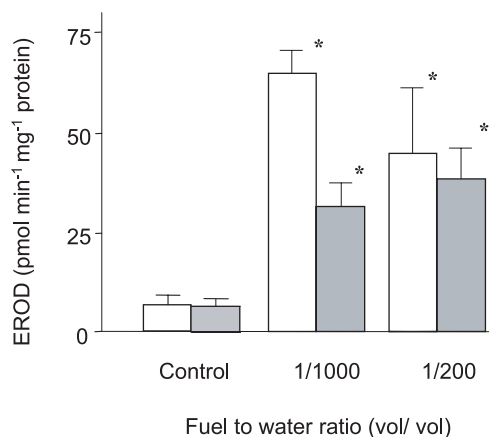


Fig. 4. EROD activity in liver of sole following a 5-day exposure to fuel #2. White boxes: 5 °C; grey boxes: 15 °C. Values are mean ± SD from 3 pools of 2 individuals. Asterisks indicate significant differences from corresponding controls ($p < 0.01$).

concentrations increased with fuel exposure, increasing water temperature resulted in relatively lower tissue levels. This is contradictory to what one might have expected since higher temperature should have meant higher solubility of hydrocarbon compounds. However, in warm conditions, a 1/1000 fuel/water ratio was enough to attain water saturation in soluble compounds and any additional increase in fuel concentration had not further effect on fish contamination levels (Table 1).

EROD activity

When compared to the control group, fuel-exposed sole displayed increased liver EROD activity ($\times 10$; Fig. 4). However, the effect of water temperature on the solubility of hydrocarbon compounds precluded the establishing of a relationship between EROD activity and fuel to water ratio or temperature.

Cellular energy charge

In control fish, white muscle cellular energy charge ($[ATP] + \frac{1}{2}[ADP]/([ATP] + [ADP] + [AMP])$) was approximately 0.90 which suggests that cells were energetically in

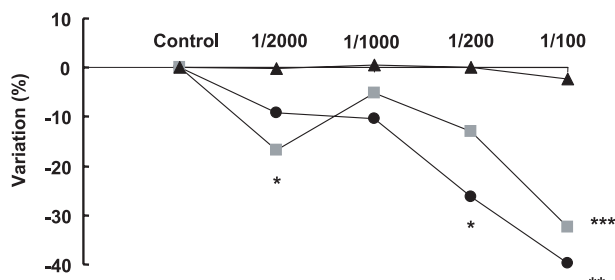


Fig. 5. Effect of a 5-day fuel exposure on cellular energy charge EC (triangles), cellular ATP (circles) and ADP (squares) concentrations. As the absolute values are very different for the 3 variables, results are expressed as variation (%) by comparison with the corresponding control group. Statistical analysis has been performed on absolute values by comparing contaminated and not-contaminated fish. Each point represents 6 animals. Sign under symbol: * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$.

good conditions (Fig. 5). This was confirmed by the observation that experimental temperature did not alter this value, demonstrating the efficiency of the pathways regulating energy metabolism. In contaminated fish, exposure to the lower fuel/water ratio (1/2000) had no effect on white muscle fiber energy metabolism. On the other hand, higher doses were associated with significantly reduced ATP and ADP concentrations ($p < 0.05$) as well as with significantly reduced total adenylates concentration ($p < 0.05$). Although statistically significant, the relevance of these alterations remains difficult to establish since the total energy charge remained within narrow limits, even at the highest fuel dose.

A significant relationship between maximum cytochrome oxidase (COX) activity in white muscle and the severity of fuel exposure was observed. The same trend was also found in the heart although not statistically significant. This increase in maximal COX activity with fuel dose suggests a stimulation of aerobic metabolic pathways, which may reflect the metabolism of contaminants and particularly PAH's (Budzinski et al. 2004).

Gill histology and gill Na,K-ATPase activity

Gill histology

Gill histology did not respond uniformly to fuel exposure and a high degree of inter-individual variability was observed (Fig. 6). At the lower dose (1/2000 and 1/1000), 50% of animals presented lifted epithelium on the secondary lamellae (Fig. 6b) but no alteration of the primary lamellae was observed. At high fuel doses, however, important structural changes were observed resulting in a structural disorganisation of the gills. In these cases (1/200 and 1/100), respectively 83% to 100% of animals presented alterations of the gill epithelium. We also observed that the severity of the pathologies increased and a thinning down of the primary epithelium was found (Figs. 6c and 6d). In some cases, aneurysms were observed in the lamellae (Fig. 6c) and we found that the whole of the respiratory epithelium on the secondary lamellae had disappeared (Fig. 6d).

In comparison to control fish we observed no significant difference in the gill Na,K-ATPase activity of fuel-exposed fish.

Isometric tension of ventricular muscle strips

Isometric tension produced by electrically stimulated ventricular muscle strips was influenced significantly by exposure to fuel (Fig. 7). When compared to control conditions, strip contractility (frequency \times amplitude) was maintained at the two lowest doses but decreased significantly (-20%) at the two higher doses ($p < 0.01$). Moreover, stimulation with adrenaline (10^{-6} M instead of 10^{-9} M) showed that the positive inotropic effect of adrenaline was markedly reduced in severely exposed animals, indicating that the ventricular tissue had lost the ability to respond to adrenergic regulation pathways.

Metabolism

Exposing juvenile sole to fuel (1/200) for five days resulted in a moderate, but significant, reduction in standard metabolic rate and in a more pronounced decrease in active metabolic rate (Fig. 8). The result of these alterations was a 20% drop in the metabolic scope of fuel-exposed sole. In these individuals we also observed a loss of tolerance to hypoxic conditions. The critical oxygen concentration (minimum water oxygenation required to sustain standard metabolic rate) was $3.5 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ in fuel-exposed fish, as opposed to only $2.3 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ in control fish.

3.2 Tidal earthen pond mesocosms

Faunistic inventory of the samples taken at various stages of the experiment in the earthen ponds showed that from July onward, sediments were colonised by polychaetes and bivalves which constitute the preferred prey of juvenile sole. Mobile macrofauna was dominated by the shrimps *Palaemonetes varians* and *Crangon crangon* which, at young stages, may have made a substantial contribution to the soles' diet. A total of 4.9 kg of macrofauna was obtained from each pond with similar species diversity and abundance. In terms of environmental conditions these ponds are very similar to the natural milieu and no food limitation was detected. Moreover, these mesocosms are characterised by the absence of predators (except the crab *Carcinus maenas*) and by sheltered hydrodynamics.

Experiment 1: Growth rate of juvenile sole (17–25 cm) exposed to 1/200 fuel for 5 days

After 3 months in the tidal ponds, the growth of fuel-exposed juvenile sole from 1-group and 2-group was only half that of the control fish (Table 3). When the same fish were examined 6-months' post-contamination, no recovery was recorded and growth rates of contaminated fish were still half that of the control fish.

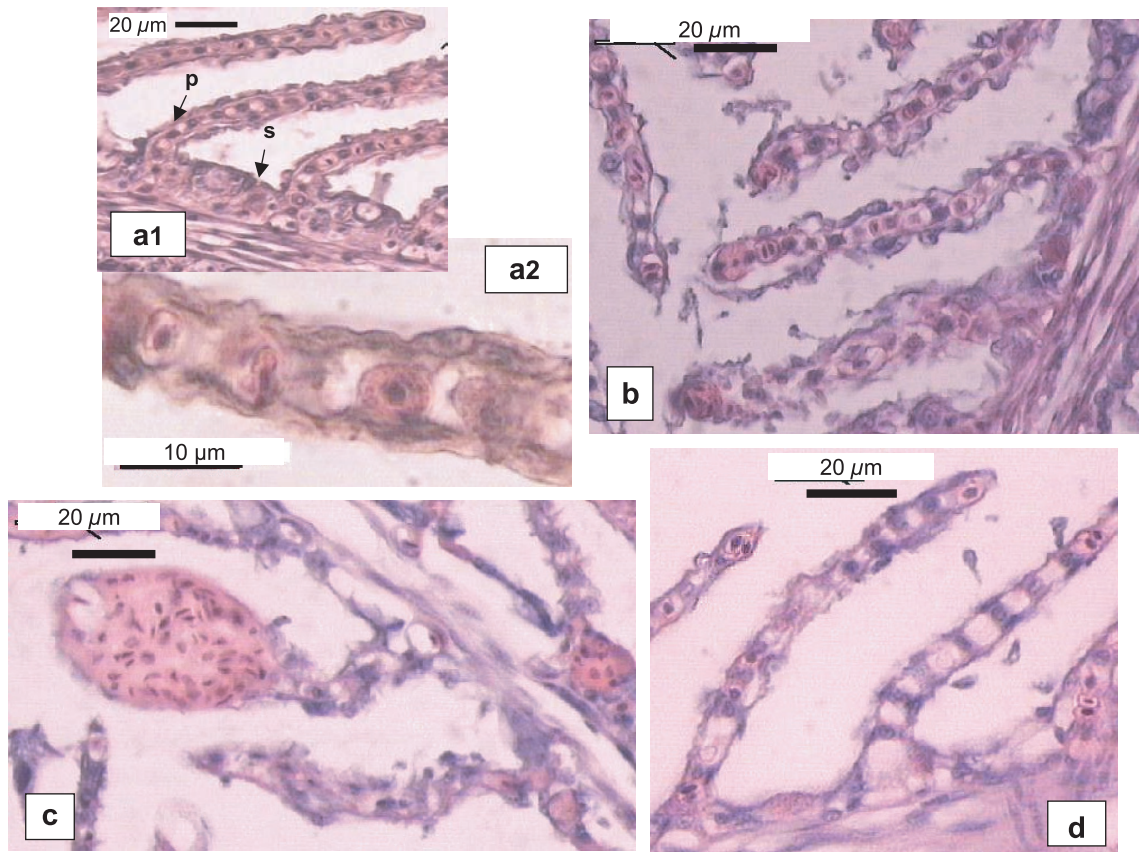


Fig. 6. Effect of a 5-day fuel exposure on gill epithelium. **a1:** control, normal primary (p) and secondary lamellae (s) H & E, obj.40. **a2:** control, H & E, obj. 100. Architecture of secondary lamellae. **b:** 1/1000: Epithelial lifting of secondary lamellae, H & E, obj.40. **c:** 1/200; Aneurysm of secondary epithelia and thinning of primary epithelium, H & E, obj.40. **d:** 1/100 disappearance of the secondary epithelium without inflammatory foci.

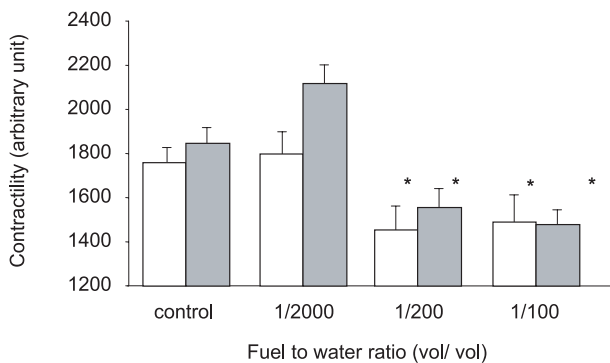


Fig. 7. Pumping capacity (relative isometric tension × response frequency) in stimulated ventricular strips from sole after a 5-day exposure to fuel #2. White boxes: [adrenaline] = 10⁻⁹ M (n = 10); grey boxes: [adrenaline] = 10⁻⁶ M (n = 10). Asterisks indicate significant differences from corresponding controls (p < 0.05).

Experiment 2: Growth and condition factor of juvenile sole (6–10 cm) exposed to 1/1000 fuel for 24 hours

One day after exposure to fuel, 45 fish from the fuel-exposed group died, against 27 control fish. These death rates integrate the delayed effect of capture and manipulation but also possibly indicate an immediate effect (6% additive

mortality) of the contamination by hydrocarbons. At the end of the 3 month period in the mesocosms, survival was 32.9% in the fuel-exposed group and 53.9% in the control group (Table 3). For comparison, Table 3 also reports the growth rate of juvenile sole measured in their habitat of origin (Vilaine estuary) during the same time period. From an initial length of 7.9 ± 0.2 cm, the control group in the ponds reached 12 cm after two months whereas, in the meantime, 0-group sole reached 12.0 ± 0.2 cm on their natural nursery. After two months in the mesocosms, fuel-exposed fish were significantly smaller (10.6 ± 0.5 cm). This difference in growth performance was maintained and in October, the mean length of fuel-exposed sole was 10.8 ± 0.3 cm against 12.3 ± 0.3 cm in the control fish. This negative effect of fuel exposure was confirmed by the condition factor which was significantly lower (1.11 ± 0.23 mg mm⁻³, n = 34) in fuel-exposed fish than in control fish (1.30 ± 0.28 mg mm⁻³, n = 44). Likewise, recent growth rate estimated by otolith examination was less in fuel-exposed individuals than in control animals (4.1 ± 0.7 μm d⁻¹, n = 34 and 6.7 ± 1.0 μm d⁻¹ respectively, n = 44).

The measurements of the level of lipid energy reserves associated (triacylglycerols) revealed further evidence of poor condition in the exposed sole, where the ratio of triacylglycerols to sterols was very low (0.06, cv = 46.6, n = 15) when compared to that of control fish (2.34, cv = 22.1, n = 15).

Table 3. Number, size and growth of control and fuel-exposed sole before and after a 59-day (0-group) or 182-day (1- and 2-groups) residence in the tidal earthen mesocosms. For comparison, data for growth performance of juvenile sole in the Vilaine estuary (site 1; Fig. 3) over the same interval are also shown. Growth values for 0-group were estimated by subtracting mean initial length from mean final length and dividing by time. *N*: number of experimental fish, *n*: sample size.

	0-group			1-2-groups	
	Control	Exposed (1/1000 - 24 h)	Vilaine Estuary	Control	Exposed (1/200 – 5 days)
<i>N</i>	266	253		60	60
Initial Length (cm)		7.9±0.2 <i>n</i> = 115		18.3 ± 0.6	17.9 ± 0.6
Final Length (cm)	12.0 ± 0.4 <i>n</i> = 30	10.6 ± 0.5 <i>n</i> = 30	12.0 ± 0.2 <i>n</i> = 306	25.9 ± 0.7	22.3 ± 0.8
Growth rate (mm d ⁻¹)	0.70	0.45	0.65	0.42 ± 0.04	0.24 ± 0.05

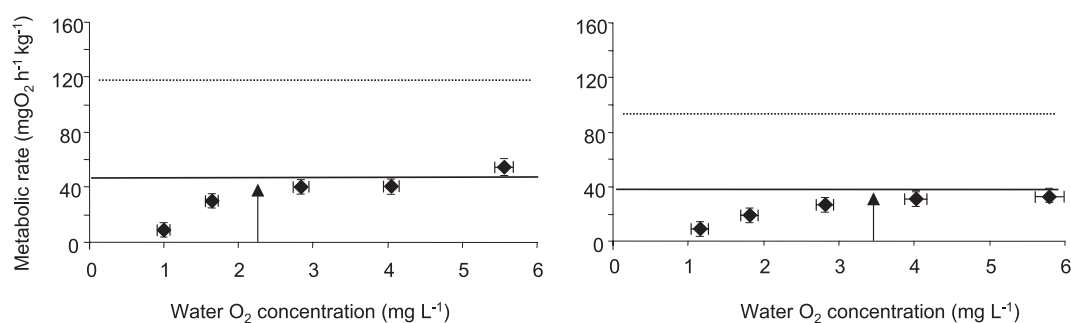


Fig. 8. Effect of a 5-day fuel exposure on metabolism. Left panel; control fish (*n* = 8), right panel, fuel exposed fish (1/200 vol/vol; *n* = 8). Diamonds: routine oxygen consumption; solid lines: standard metabolic rate; dotted lines: active metabolic rate; arrows: critical water oxygen concentration.

This indicates that the exposed animals were in very poor nutritional condition, and presumably had experienced serious bioenergetic limitations in the semi-natural environment provided by the mesocosm.

3.3 Sea surveys

In situ observations

In February 2000, trawl surveys revealed the presence of fuel near the bottom in 18 of the 48 hauls in the Vilaine Estuary (site 1) and Bourgneuf Bay (site 3), with at least one ball of fuel collected in the net or fuel spots staining the net. The presence of moribund endobenthic invertebrates was noticed at the three oiled sites (e.g., self-opening shells of bivalves *Macra stultorum*, *Pharus legumen* and echinoderms *Echinocardium cordatum*, in quantities up to several hundred individuals per haul). Such observations are quite uncommon in trawl catches and they are a symptom of alteration in the benthic community. The most common fish species (*Solea solea*, *Merlangius merlangus*, *Trisopterus luscus*, *Platichthys flesus*, etc.) were found in the hauls and we observed no malformation, necrosis or stain that could be attributed to fuel. As expected, fish from 1-group (hatched during spring 1999) were dominant in the samplings. The distribution of the cohort of sole along the

inshore-offshore gradient was as expected from previous surveys (Dorel et al. 1991). This observation suggests that during their inshore migration, young fish did not avoid polluted areas.

During the June-July 2000 survey, only one haul out of 69 showed the presence of fuel at a depth of 15 m. No anomaly was observed with regard to invertebrates with the exception of the sea urchin *E. cordatum* which remained abundant in trawl catches in the Loire estuary. Fish populations displayed expected abundance and distribution patterns. The first observations of the year class 2000 of sole were made in June-July in the Vilaine Estuary and Bourgneuf Bay (Table 4). The presence of this year class proves that some successful spawning occurred in 2000. The settlement of juveniles on the inshore nursery grounds was viewed as normal.

In September 2000, 2001 and 2002, the occurrences of 0-group fish were high in all sites. Fish densities were variable but within the range of classically reported natural variation. Comparing the mean total length (TL) of 0-group sole near the end of their first growing season was made under the assumption that the contamination of northern Bay of Biscay nurseries by oil altered the growth of juveniles. However, comparisons of the size composition among nurseries revealed a south to north positive gradient. This gradient was also found in September 2003 (Désaunay, pers. com.).

Table 4. Occurrence (% of presence in hauls) and density (number of individuals per hectare) of 0-group sole caught during the 2000, 2001 and 2002 cruises. TL: mean total length (cm), SD: Standard deviation (cm), n: number of individuals. In June-July, the mean length was biased by the mesh size (20 mm), and the standard deviation was not calculated.

Date / site		Vilaine	Loire	Bourgneuf	P. Breton
June-July 2000	Occ%	28.7	0	37.5	11.1
	Density	12.0	0	15.1	0.3
	TL	7.6	-	6.8	6.0
	n	120	0	52	1
September 2000	Occ%	54.5	68.2	71.4	55.6
	Density	61.7	10.6	79.8	137.7
	TL	12.8	11.6	10.0	11.5
	SD	1.4	1.35	1.1	1.2
September 2001	Occ%	65.9	42.1	53.3	50.0
	Density	32.0	17.0	15.0	12.5
	TL	13.0	11.7	10.9	10.7
	SD	1.8	1.1	1.2	1.6
September 2002	Occ%	60.0	58.8	54.5	36.4
	Density	44.5	6.5	47.0	19.9
	TL	12.0	11.6	10.6	10.5
	SD	1.4	2.1	1.5	1.3
	n	306	68	178	76

Table 5. Analysis of variance of condition index K (mg mm^{-1}) and recent otolith growth RG (μm) for the six studied sites over the three years in question.

Year	n	Source	df	SS	F	p-value
2000	193	K	5	0.264	5.782	0
		RG	5	48.176	5.377	0
2001	175	K	5	0.159	1.497	0.19
		RG	5	95.361	28.113	0
2002	215	K	5	0.398	8.268	0
		RG	5	140.809	46.390	0

Biological analysis (0-group)

Significant differences in the condition factor (K) were found among the 6 survey sites (Table 5) in 2000 and 2002 but not in 2001 (Fig. 9). Nevertheless, a posteriori multiple comparison applied to 2000 and 2002 revealed that K in the most southern sites (4, 5, 6) were significantly lower than in the oiled northern sites (1, 2, 3).

Recent growth of juvenile sole varied significantly among the six nurseries (Table 5 and Fig. 10) in accordance with the latitudinal gradient of body size mentioned above. Multiple comparison analysis indicated that the survey sites could be sorted into two batches, which were significantly different. Northern sites (sites 1, 2 and 3) were exposed to the oil and sole growth performances on these sites were similar.

Southern sites (sites 4, 5 and 6) on the other hand displayed lower growth rate and this for all 3 years.

Ecotoxicology

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in fish

The accumulation of PAH in the tissues (white muscle) of sole sampled on the various field site was relatively limited (Fig. 11). PAH are hydrophobic compounds that accumulate in fat and lipid structures such as cellular membranes. However, PAH are also metabolised through specific pathways (Budzinski et al. 2004). The trend displayed by PAH concentration in sole from all sites suggests a chronic exposure to PAH but these data alone do not provide a conclusive link between such contamination and the *Erika* oil spill. On the other hand, the monitoring of bile metabolites did reveal exposure of the fish to *Erika* fuel (Budzinski et al. 2004). Moreover, the distribution and origin of PAH along the French Atlantic coast (Chantereau et al. 2002) suggests an impact of the oil spill on the nurseries, with specific sites (1 and 2) having marked petrogenic characteristics. Nevertheless, the measured concentration of PAH in oiled and non oiled sites are generally low and close to the values observed in the control fish of the experimental phase (8 ng g^{-1}). A slight increase was observed in September 2001 in oiled sites. This could be interpreted as an accumulation linked to longer exposure to a polluted environment (individuals sampled in September 2001 experienced this environment for 18 months, whereas those collected in September 2000 spent only 8 months in this habitat).

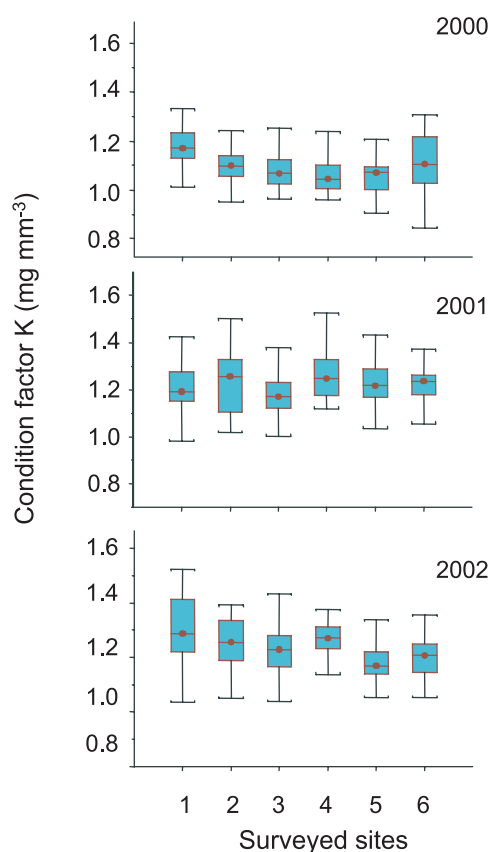


Fig. 9. Index of condition (mg mm^{-3}) of 0-group sole at six sites (see Fig. 3) surveyed in 2000, 2001 and 2002. Median value, upper and lower quartile (box), extreme values (line).

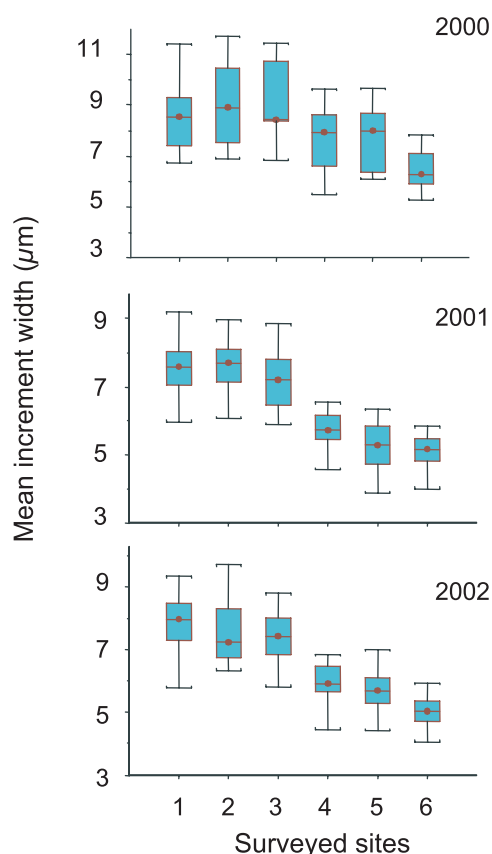


Fig. 10. Index of recent otolith growth (μm) of 0-group sole at six (see Fig. 3) sites surveyed in 2000, 2001 and 2002. Median value, upper and lower quartile (box), extreme values (line).

Biomarkers (EROD)

During the February 2000 survey, the highest liver EROD activities were found in fish from Bourgneuf Bay, Vilaine Estuary and Pertuis Breton (Fig. 12). In July 2000, measured EROD activities were greatly reduced in all of the sites with the exception of the Vilaine Estuary where intense detoxification activities were still found. In September 2000 we found no significant difference between sites.

DNA adducts

The number of adducts was generally higher in February at *Erika* polluted sites. In the Bourgneuf Bay, the number of adducts reached a peak of 70 adducts 10^{-9} nucleotides in July (Fig. 12). In the Loire estuary and the Bay of Vilaine, high values are observed in February (respectively 50 and 30 adducts 10^{-9} nucleotides) but they decreased steeply in July and September. In the Pertuis Breton, the number of adducts remained low, at around 20 adducts 10^{-9} nucleotides. No significant correlation was found between EROD activity and DNA adducts ($R^2 = 0.048$). None of these variables were correlated with PAH levels in the muscle (respectively $R^2 = 0.008$ and 0.028).

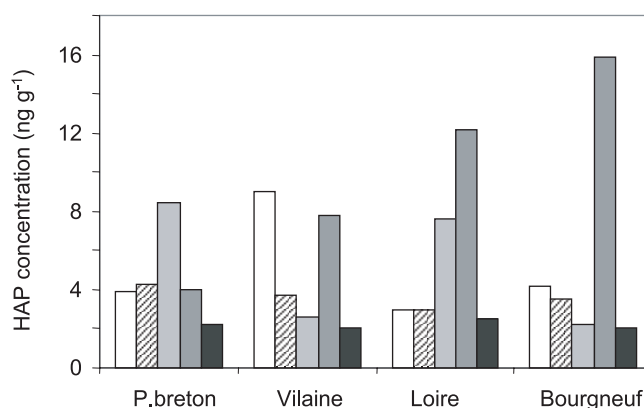


Fig. 11. PAH concentration (sum of 12 of the 16 priority PAH of the EPA, in ng g^{-1} of dry matter) in the white muscle of sole collected at four sites during three cruises: February 2000 (white boxes), August 2000 (stripped box), September 2000 (light grey boxes), September 2001 (dark grey boxes) and September 2002 (black boxes). Each box corresponds to a pool of 10 individuals. The summed PAHs are the following: phenanthrene, fluoranthene, pyrene, benz(a)anthracene, chrysene+triphenylene, benzo(b)fluoranthene, benzo(j)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, dibenz(a,h)anthracene + dibenz(a,c)anthracene, benzo(g,h,i)perylene, indeno(1,2,3-cd)pyrene.

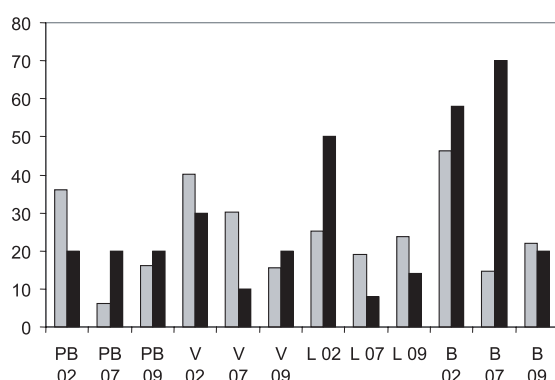


Fig. 12. EROD activity (grey boxes) and DNA adducts (black boxes) in liver from sole collected during three 2000 cruises (02, 07, 09) at four sites: Pertuis Breton (PB), Bay of Vilaine (V), Loire Estuary (L) and Bourgneuf Bay (B).

4 Discussion

Numerous examinations of the ecological consequences of the *Erika* oil spill (this volume) demonstrate an impact at the ecosystem level. Benthos on the intertidal and subtidal zones displayed noticeable mortalities (Barillé-Boyer et al. 2004) and bird species were heavily impacted, particularly diving birds (Bretagnolle et al. 2004). Earlier experimental exposures of fish to PAH essentially examined the effects of contamination through feeding (Carls et al. 1996 in Hilborn 1996) or after contact with oiled sediments (Moles et al. 1994). In the present case, and in order to mimic what were believed to be the conditions of contamination in natura, we focused our investigation on the effects of the soluble phase.

The examination of the consequences of the *Erika* oil spill for sole populations required that the successive stages of the species' early life cycle be considered (Koutsikopoulos et al. 1995). The acute phase of the pollution (January to March 2000) was synchronous with the aggregation of adults on the spawning grounds (depth 40 to 100 m; Koutsikopoulos and Lacroix 1992) and the subsequent pelagic stages, eggs and larvae (Amara et al. 1993). From April to October, the pollution was more diffuse and this phase of the contamination corresponded with the transition from pelagic to benthic life (Amara et al. 2000) and the concentration of juveniles in estuaries and shallow nurseries (Dorel et al. 1991). To make a full description of the context prevailing at the time of the spill, it is also important to mention that it happened together with a series of remarkable storms that affected the whole of the French Atlantic coast from December 26th to 28th 1999. The consequences of the massive arrival of oil slicks in coastal areas summated with these exceptional hydrodynamic conditions, with a tide level 2 m higher than usual.

4.1 Biological integration levels, adaptation and integrative approach

The level of fitness of an animal results from its ability to maintain a dynamic equilibrium between environmental constraints and its specific biological requirements. The triptych morphology-physiology-biochemistry sets the functional

framework within which adaptation can take place. We viewed it as essential, therefore, to examine the effects of hydrocarbons on the main organs and physiological processes involved in adaptation. To ensure that this examination provided the basis for an ecological interpretation of the consequences of the spill, it was also important that the series of interactions linking the various levels of biological organisation be taken into consideration (Fig. 1).

Our study integrated 3 complementary approaches. The first aspect aimed at describing the effects of fuel exposure on the physiological, biochemical and energetic processes involved in adaptation. During that experimental phase of the work, fish contamination was assessed through the examination of the kinetics of absorption, accumulation and metabolism of PAH, as well as via the measure of liver EROD activity and of the number of cytogenetic lesions. Mesocosm experiments allowed testing of the long-term effects of these functional and morphological alterations on fish ecological performance (survival and growth). Finally, field surveys extended our grasp of that complex system by laying the foundation for an ecosystemic interpretation of the consequences of the *Erika* oil spill.

4.2 Experimental phase

Contamination and role of the dissolved phase

The conditions of experimental exposure (fuel concentration and duration) had to be decided before field data on PAH composition and concentration in the water column were available (Tronczynski et al. 2004). Moreover, at that time no information concerning the metabolism of PAH in sole was at hand (Budzinski et al. 2004).

A posteriori information (Tronczynski et al. 2004) provided an estimate of aqueous 16 EPA priority parent PAH concentrations in the coastal waters at sites 1 and 2. During that 2-year survey (2000-2002), in situ water samples displayed values ranging from 8.75 ng L⁻¹ to 20.94 ng L⁻¹. These values are consistent with the EPA-PAH concentrations found in the soluble phase during our experimental fuel exposures. For instance, at 15 °C, a medium dose of exposure (1/1000) yield to a EPA-PAH concentration of 70 ng L⁻¹ (Table 2). This value is 3 to 8 times what was measured in natura several months after the landfall of fuel and it is therefore likely to be representative of the contamination conditions that prevailed during the first weeks following the spill.

It must be underlined that during the experimental laboratory phase of *ECTOPHY*, very few fish died during or immediately after being exposed to fuel (6% in 0-group and less than 0.5% in older sole). During exposure to fuel there was little contact between fish buried in the sand and oil floating on the surface, although less soluble portions of the fuel may have drifted to the bottom and accumulated in the sediment. The functional alterations observed at the end of the various exposures therefore suggest that fuel solubility is an essential element when assessing the level of risk from contamination. This result also support the view that the presence, or absence, of dead fish on beaches is not an adequate means to evaluate the severity of an oil spill, and even more so if the generally

rapid intervention of scavengers is taken into consideration. Because fish were not fed during exposure to fuel, we considered that dietary intake was negligible and that the most likely route of contamination was through dissolved compounds diffusing into the fish across their epithelia.

Our results clearly show a relationship between the level of saturation of the water with PAH and their concentrations in fish tissues. However, when full saturation of the water was reached, increasing the amount of hydrocarbons in the environment had no impact on tissues PAH levels. This observation, together with the fact that PAH are readily metabolised (Budzinski et al. 2004), suggest that tissue PAH levels are not adequate indicators of contamination in fish.

Functional and morphological disruptions

During the experimental phase, the contamination of juvenile sole was revealed by the increased EROD activity and PAH concentrations in liver and white muscle. This contamination was associated with morphological and functional alterations that affected the organs and processes involved in adaptation. A progressive disruption of gill epithelium with fuel dose was also reported by Mallatt (1985). However, the functional consequences of these alterations remain to be established. Despite the fact that reduced metabolic scope and cellular adenylate content suggest possibly impaired oxygen diffusion at the gill, the maintenance of Na,K-ATPase activity suggests that osmoregulatory ability was preserved.

In addition to the reduced cellular adenylate content, two further elements strengthen the hypothesis of disrupted metabolism. First, we observed that increased fuel dose was associated with increased cytochrome C oxidase (COX) activity in the white muscle. COX controls electron transfer along the mitochondrial respiratory chain and hence is a key site for modulation of metabolic energy production by oxidative phosphorylation. An increased activity of this enzyme complex obviously suggests increased metabolic demand most probably in relation with detoxification-related activities. The second element relates to the reduced pumping capacity of the myocardium and its impaired adrenergic regulation pathways. The cardio-vascular system is known to play a critical role in adaptation (for a recent review see Gamperl and Farrell 2004) and the current findings support our view that fuel exposure results in morphological and functional impairments that combine to reduce the ability of fish to respond to environmental perturbations or poor conditions.

Environmental adaptation

It is striking that the functional and morphological disruptions described above were associated with a very significant decrease in aerobic metabolic scope. Metabolic scope is an integrated measure of the energy resources that an animal can mobilise for routine function. The 20% reduction in aerobic metabolic scope measured in fuel-exposed fish must be seen as a loss in the animals' energetic flexibility or versatility. In situations associated with high metabolic demand, these contaminated animals will be faced with energy budgeting conflicts

which are classically solved at the expense of growth or reproduction and, at a later stage, lead to reduced survival (Priede 1977 and 1985; Claireaux and Largardère 1999; Claireaux et al. 2000). In any environmental gradient, contaminated animals are also likely to suffer from a reduction in their potential habitat, areas with suboptimal conditions becoming physiologically beyond reach and so cannot be colonised successfully.

4.3 Mesocosm experiments

Experiments in the tidal earthen ponds established that the various disruptions experienced by juvenile sole following experimental exposure to fuel had long-term consequences for their ecological performance. Reduced survival and growth were observed 3 months after the contamination and no sign of recovery was observed even after 6 months. Moles and Norcross (1998) showed that juvenile flatfish exposed to hydrocarbon-contaminated sediment also displayed reduced growth 1 to 3 months after exposure. More than 4 months after having been exposed to fuel, sole displayed very depressed lipid profiles, with reduced triacylglycerol to sterol ratios, strengthening even further our view that fuel-exposed fish experienced impaired energy metabolism.

4.4 Ecosystem approach

Difficulties identified with the diagnosis

The examination of the abundance of the 2000 year-class (< 1999; Anonymous 2003) and the biological characteristics of the individuals sampled during the various survey cruises revealed no impact of the oil spill on natural sole populations in the Northern Bay of Biscay. The same conclusion also holds for other fish species such as *Pleuronectes platessa*, *Dicologlossa cuneata*, *Merlangius merlangus* and *Mullus surmuletus* (Gilliers, pers. obs.). Following the pollution by the "Sea Empress" the same observation was made with regard to the European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Lancaster et al. 1998).

During the year that followed the spill, EROD activity in the liver of captured soles were high in Bourgneuf Bay (site 3) and in the Vilaine Estuary (site 1). These areas are confined and were among the most exposed to contamination (Chantereau et al. 2002). The relatively low EROD activity measured in the Loire Estuary (site 2) can be ascribed to the high river flow at the time of the accident. This, together with the shape of the estuary, prevented the slicks from moving upstream. The induction of EROD activities in Pertuis Breton is unexpected and could be attributed to the storms that hit Western France simultaneously with the oil spill. These exceptional weather and sea conditions may have contributed to the resuspension of contaminants already present in the sediment.

Any diagnosis based on the mean size of the 0-group of sole is unachievable, the apparent size gradient probably being a signature of each local habitat. It has been shown that, at the scale of the Bay of Biscay, each coastal habitat displays a specific performance in terms of potential growth, in relation with local hydroclimate, prey availability and typology (Le Pape et al. 2003d).

Specificity of the Erika pollution

Environmental conditions at the time and during the first few months after a hydrocarbon discharge are crucial in determining its ecological impact. The *Erika* accident occurred in very specific conditions that quickly moved the oil slicks onto the shores, sometimes very high up onto the beaches. This rapid movement of the pollution reduced the duration of the contamination of the subtidal nurseries and other key areas. Moreover, following this relatively short period of acute contamination, favourable climatic conditions during the first half-year of 2000 in the Northern Bay of Biscay may have resulted in more favourable environments that contributed to the survival of contaminated animals. At the scale of the Bay of Biscay, Le Pape et al. (2003a) established a relationship between river flow during winter and the abundance of juveniles on the nurseries the following spring. From that perspective, years 2000 and 2001 were very close to the historical high reported in 1988. For instance in 2000 and 1988, water flow in the River Vilaine was respectively 188 and 229 m³ s⁻¹. In these years, juvenile sole densities were respectively 99.5 and 85.1 ind.ha⁻¹. Conversely, a draught year such as 1997 (52 m³ s⁻¹ in the winter period) provided a lower density of juvenile sole (15.8 ind.ha⁻¹). This observation suggests that the negative effects of the contamination on sole physiological performance may have been compensated by exceptionally favourable and non-selective conditions that prevailed in 2000 and 2001. That is, those individuals that under normal conditions might not have survived because of impairments to their physiology were able to survive.

5 Conclusion

It is clearly established that hydrocarbons influence, directly or indirectly the physiology (Lee et al. 1978; Kiceniuk and Khan 1987; Fletcher et al. 1981; Hontela et al. 1995), health (Köhler and Hölzel 1980; Solangi and Overstreet 1982; Moore and Stegeman 1994; Vethaak and Wester 1996; Vethaak et al. 1996; Marty et al. 1996; Hose et al. 1996), growth (Byrne and Calder 1977; Linden 1978; Fletcher et al. 1981) and reproduction (Berdugo et al. 1977; Truscott et al. 1992; Kocan et al. 1996) of fish (see also Cravédi 2001). On the other hand, the interpretation of these alterations in ecological terms i.e., fitness, is rarely tackled (Connolly 1991). This deficiency is the main reason for our poor ability to predict the long-term ecological consequences of oil spills (Capuzzo 1980; Peterson 2001).

Investigating a complex system requires a multidisciplinary approach that considers the various levels of biological organisation. According to Hilborn (1996), in situ approaches require that a target species, a biological stage and a contamination-free site be identified before inter-site comparison can be made and conclusions drawn. Above all, an accurate understanding of the sources of hydroclimatic variability, and their effects on biological/ecological processes, is essential. The benthic community structure may provide a diagnosis of habitat disturbance. Developing biological indicators for target species is currently a major concern

(Frid et al. 2000). A long period of trials is needed to validate which indicators are the most useful, manageable and efficient (Dale and Beyeler 2001). Our study suggest that the most relevant and easily implemented biological indicators are the condition factor and somatic or otolith growth.

Experimental approaches provide tests to assess the sensitivity of a target species to a given contaminant, particularly when in situ effects cannot be distinguished from the natural variability. It is then crucial to analyse these experimental results from an ecological perspective in order to assess any relevance of the observed functional or morphological alterations. At this investigation scale, histology, energetics and challenge tests are promising approaches that can give an overall view of the ability of an organism to adapt to its environment, this ability being the prime determinant of fitness. Various attempts have been made to reproduce relevant experimental conditions using caged fishes in restricted fjords (Goksoyr et al. 1994) or in lakes (Soimasuo et al. 1995). From that point of view, the tidal earthen mesocosms at CREMA-Ifremer proved to be exceptionally valuable experimental tools. As ecosystem fluctuation is a multifactorial process, it will remain difficult to assign a natural or anthropogenic cause to a given change. However, from both a scientific and management point of view, it is extremely important to accumulate a knowledge base that will permit distinction between natural and man-made variations in ecosystems (Daan et al. 1996).

Acknowledgements. The authors are grateful to Dr D.J. McKenzie for reviewing various aspects of the manuscript. We are also grateful to A. Hillenweck, D. Leguay, A. Mauffret, E. Perdu, P. Pineau, M. Prineau and C. Valotaire for their invaluable technical assistance. We would also like to thank the crew of the R/V “*Gwen Drez*”, all the colleagues that were involved in the cruises, as well as J.-M. Arruabarrena who kindly collected the fish. The current research was funded by “Ministère Français de l’Écologie et du Développement Durable” as part of the program “Suivi des conséquences écologiques et écotoxicologiques de la marée noire due au naufrage de l’*Erika*”. The help and support of the scientific committee in charge of the program is sincerely acknowledged.

References

- Akcha F., Vincent-Hubert F., Pfhof-Leszkwicz A., 2003, Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 534, 21-32.
- Amara R., Lagardère F., Désaunay Y., 1993, Seasonal distribution and duration of the planktonic stage of Dover sole, *Solea solea*, larvae in the Bay of Biscay: an hypothesis. *J. Fish Biol.* 43, 17-30.
- Amara R., Lagardère F., Désaunay Y., Marchand J., 2000, Metamorphosis and estuarine colonisation in the common sole, *Solea solea* (L.): implications for recruitment regulation. *Oceanol. Acta* 23, 469-484.
- Anonymous, 2003, Report of the Working Group on the Assessment of Southern Shelf Demersal Stocks. ICES CM 2003/ACFM 03.
- Barillé-Boyer A.L., Gruet Y., Barillé L., Harin N., 2004, Temporal changes in community structure of tide pools following the “*Erika*” oil spill. *Aquat. Living Resour.* 17, 323.

- Baumard P., Budzinski H., 1997, Internal standard quantification method and gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS): a reliable tool for PAH quantification in natural matrices. *Analisis* 25, 246-252.
- Berdugo V. Harris R.P. O'Hara S.C., 1977, The effect of petroleum hydrocarbons on reproduction of an estuarine planktonic copepod in laboratory cultures. *Mar. Pollut. Bull.* 8, 138-143.
- Bretagnolle V., Certain G., Houte S., Métais M., 2004, Distribution maps and minimum abundance estimates for wintering auks in the Bay of Biscay, based on aerial surveys. *Aquat. Living Resour.* 17, 353.
- Budzinski H., Mazéas O., Tronczynsky J., Désaunay Y., Bocquené G., Claireaux G., 2004, Link between exposure of fish (*Solea solea*) to PAHs and metabolites: application to the "Erika" oil spill. *Aquat. Living Resour.* 17, 329.
- Budzinski H., Papineau A., Baumard P., Garrigues P., 1995, Extraction assistée par chauffage microondes focalisées (MOF) à pression ambiante des composés organiques dans les matrices naturelles : application à l'analyse des composés aromatiques. *C. R. Acad. Sci. Paris* 321, sér. IIB, 69-76.
- Budzinski H., Letellier M., Garrigues P., Le Menach K., 1999, Optimisation of the microwave-assisted extraction in open cell of PAHs from soils and sediments – Study of moisture effect. *J. Chromatogr. A.* 837, 187-200.
- Burgeot T., Bocquené G., Pingray G., Godefroy D., Legrand J., Dimeet J., Marco F., Vincent F., Henocque Y., Oger Jeanneret H., Galgani F., 1994, Monitoring biological effects of contamination in marine fish along French coasts by measurement of ethoxyresorufin-O-deethylase activity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 29, 131-147.
- Byrne C.J., Calder J.A., 1977, Effect of the water-soluble fractions of crude, refined and waste oils on the embryonic and larval stages of the quahog clam *Mercenaria* sp. *Mar. Biol.* 40, 225-231
- Cann-Moisson C., Caroff J., Sebert P., Barthelemy L., 1989, Determination of nucleotide concentrations with high performance liquid chromatography (HPLC): application to fish. *Aquaculture* 76, 135-143.
- Capuzzo J.M., 1980, Biological effect of petroleum hydrocarbons on marine organisms: integration of experimental results and predictions of impacts. *Mar. Environ. Res.* 17, 272-276.
- Claireaux G., Lagardère J.-P., 1999, Influence of temperature, oxygen and salinity on the metabolism of European sea bass. *J. Sea Res.* 42, 157-168.
- Claireaux G., Webber, D.M., Lagardère J.-P., Kerr, S.R., 2000, Influence of water temperature and oxygenation on the aerobic metabolic scope of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *J. Sea Res.* 44, 257-265.
- Chantereau S., Chiffolleau J.-F., Dufour A., Jeanneret H., 2002, Utilisation des données du RNO dans le cadre du naufrage de l'Erika. In: Travaux du RNO 2002. Surveillance du milieu marin. Ifremer & Ministère de l'Écologie et du Développement Durable, pp. 25-43.
- Connolly J.P., 1991, Application of a food chain model to polychlorinated biphenyl contamination of the lobster and winter flounder food chains in New Bedford harbor. *Environ. Sci. Technol.* 25, 760-770.
- Cravedi J.P., 2001, Métabolisme et bioaccumulation des xénobiotiques chez le poisson. *C.R. Acad. Agric. Fr.* 87, 199-208.
- Daan N., Richardson K., Pope J.G., 1996, Changes in the North Sea ecosystem and their causes: Aarhus 1975 revisited. *ICES J. Mar. Sci.* 53, 87-883.
- Dale V.H., Beyeler S.C., 2001, Challenges in development and use of ecological indicators. *Ecol. Indic.* 1, 3-10.
- Désaunay Y., Pérodou J.B., Beillois P., 1981, Etude des nurseries de poissons du littoral de la Loire Atlantique. *Science et Pêche, Bull. Inst. Scient. Techn. Pêches Marit.* 319, 1-23.
- Désaunay Y., Guérault D., 2002, Manuel des protocoles de campagne halieutique, campagnes Nourriceries Gascogne. IFREMER, Système d'Informations halieutiques, DRV/RH/DT/2002-005, 31.
- Dorel, D., Koutsikopoulos C., Désaunay Y., Marchand J., 1991, Seasonal distribution of young sole *Solea solea* (L.) in the nursery ground of the Bay of Vilaine (northern Bay of Biscay). *Neth. J. Sea Res.* 27, 297-306.
- Fletcher G.L., Kiceniuk J.W., Williams U.P., 1981, Effects of oiled sediments on mortality, feeding and growth of winter flounders *Pseudopleuronectes americanus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 4, 91-96.
- Frid C., Rogers S., Nicholson M., Ellis J., Freeman S., 2000, Using biological characteristics to develop new indices of ecosystem health. Mini-symposium on Defining the role of ICES in supporting biodiversity conservation. *ICES CM 2000/Mini: 02*, 23 p.
- Galgani F., Payne J.F., 1991, Biological effects of contaminants: microplate method for measurement of EROD activity in fish. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences* 13, 12.
- Galois R., Lagardère F., Richard P., 1990, Changes in biochemical composition and otolith microstructure of larval common solea, *Solea solea* (L.). *La Mer* 28, 273-285.
- Gamperl A.K., Farrell A.P., 2004, Cardiac plasticity in fishes: environmental influences and intraspecific differences. *J. Exp. Biol.* 207, 2539-2550.
- Gamperl A.K., Vijayan M.M., Boutilier R.G., 1994, Experimental control of stress hormone levels in fishes: techniques and application. *Rev. Fish Biol. Fish.* 4, 215-255.
- Goksoyr A., Beyer J., Husoy A.M., Larsen H.E., Westheim K., Wilhelmsen S., Klungsoyr J., 1994, Accumulation and effects of aromatic and chlorinated hydrocarbons in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) cages in a polluted fjord (Sorfjorden, Norway). *Aquat. Toxicol.* 29, 21-35.
- Hilborn R., 1996, Detecting population impacts from oil spills: a comparison of methodologies. *Am. Fish. Soc. Symp.* 18, 639-644.
- Hontela A., Dumont P., Duclos D., Fortin R., 1995, Endocrine and metabolic dysfunction in yellow perch, *Perca flavescens*, exposed to organic contaminants and heavy metals in the St Lawrence river. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 725-731.
- Hose J.E., McGurk M.D., Marty G.D., Hinton D.E., Brown E.D., Baker T.T., 1996, Sublethal effects of the "Exxon Valdez" oil spill on herring embryos and larvae: morphological, cytogenetic and histopathological assessments, 1989-1991. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 2355-2365.
- Karakiri M., Berghahn R., Von Westernhagen H., 1989, Growth differences in 0-group plaice *Pleuronectes platessa* as revealed by otolith microstructure analysis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 55, 15-22.
- Kiceniuk J.W., Khan R.A., 1987, Effect of petroleum hydrocarbons on Atlantic cod, *Gadus morhua*, following chronic exposure. *Can. J. Zool.* 65, 490-494.
- Kirby M.F., Neall P., Taylor T., 1999, EROD activity measured in flatfish from the area of the Sea Empress oil spill. *Chemosphere* 38, 2929-2949.
- Kocan R.M., Marty G.D., Okihiro M.S., Brown E.D., Baker T.T., 1996, Reproductive success and histopathology of individual Prince William Sound Pacific herring 3 years after the "Exxon Valdez" oil spill. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 2388-2393.
- Köhler A., Hölzel F., 1980, Investigation on health conditions of flounder and smelt in the Elbe estuary. *Helgol. Meers.* 33, 401-414.

- 350 G. Claireaux et al.: Aquat. Living Resour. 17, 335–351 (2004)
- Koutsikopoulos C., Désaunay Y., Dorel D., Marchand J., 1989, The role of coastal areas in the life history of sole (*Solea solea* L.) in the Bay of Biscay. In: Ros J.D. (Ed.), Topics in Marine Biology. Scient. Mar. 53, 567-575.
- 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. J. Sea Res. 29, 81-91.
- Koutsikopoulos C., Dorel D., Désaunay Y., Le Cann B., Forest A., 1995, Interactions entre processus physiques et comportement individuel : conséquences sur l'organisation et le fonctionnement du stock de sole (*Solea solea* L.) du golfe de Gascogne. ORSTOM (Ed.) Colloques et Séminaires, 1^{er} Forum Halieumétrique, pp. 49-74.
- Lancaster J.E., Pawson M.G., Pickett G.D., Jennings S., 1998, The impact of the Sea Empress oil spill on seabass recruitment. Mar. Pollut. Bull. 36, 677-688.
- Léauté J.P., Caill-Milly N., 2003, Les petites pêches côtières et estuariennes françaises du sud du golfe de Gascogne. Extrait du rapport final du contrat PECOSUDE EC/DG Fish (DG XIV) No. 99/024, Ifremer, DRV/RH/DT/03-01.
- Lee W.Y., Winters K., Nicol J.A.C., 1978, The biological effects of the water-soluble fractions of a No. 2 fuel oil on the planktonic shrimp, *Lucifer faxoni*. Environ. Pollut. 153, 167-183.
- Lefrançois, C., Claireaux, G., 2003, Influence of ambient oxygenation and temperature on metabolic scope and scope for heart rate in the common sole (*Solea solea*). Mar. Ecol. Prog. Ser. 259, 273-284.
- Le Pape O., Désaunay Y., Guérault D., 2003a, Relationship between fluvial discharge and sole (*Solea solea* L.) recruitment in the Bay of Biscay (France). ICES Mar. Sci. Symp. 219, 241-248.
- Le Pape O., Chauvet F., Désaunay Y., Guérault D., 2003b, Relationship between interannual variations of the river plume and the extent of nursery grounds for the common sole (*Solea solea* L.) in Vilaine Bay. Effects on recruitment variability. J. Sea Res. 50, 177-185.
- Le Pape O., Chauvet F., Mahévas S., Lazure P., Guérault D., Désaunay Y., 2003c, Quantitative description of habitat suitability for the juveniles common sole (*Solea solea* L.) in the Bay of Biscay (France) and the contribution of different habitats to the adult population. J. Sea Res. 50, 139-149.
- Le Pape O., Holley J.-F., Guérault D., Désaunay Y., 2003d, Quality of coastal and estuarine essential fish habitats: Estimations based on the size of juvenile common sole (*Solea solea* L.). Estuar. Coast. Shelf Sci. 58, 793-803.
- Linden O., 1978, Biological effects of oil on early development of the Baltic herring *Clupea harengus* membras. Mar. Biol. 45, 273-283.
- Mallatt J., 1985, Fish structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 42, 630-648.
- Martoja, R., Martoja-Pierson, M., 1967, Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson Paris, France.
- Marty G.D., Short J.W., Dambach D.M., Willits N.H., Heintz R.A., Rice S.D., Stegeman J.J., Hinton D.E., 1996, Ascites, premature emergence, increased gonadal cell apoptosis and cytochrome P4501A induction in pink salmon larvae continuously exposed to oil-contaminated gravel during development. Can. J. Zool. 75, 989-1007.
- Mazéas L., Budzinski H., 2001, Improved accuracy of GC-MS quantification of aliphatic and aromatic hydrocarbons in marine sediments and petroleum. Validation on reference matrices and application to the Erika oil spill. Intern. J. Environ. Anal. Chem. 82, 157-173.
- Mercier, C., Axelsson, M., Imbert, N. Claireaux, G., Lefrançois, C., Altimiras, J., Farrell, A.P., 2002, In vitro cardiac performance in triploid brown trout (*Salmo trutta*) at two acclimation temperatures. J. Fish Biol. 60, 117-137.
- Moles A., Rice S., Norcross B.L., 1994, Non-avoidance of hydrocarbon laden sediments by juvenile flatfishes. Neth. J. Sea Res. 32, 361-367.
- Moles A., Norcross B.L., 1998, Effects of oil-laden sediments on growth and health of juvenile flatfishes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 55, 605-610.
- Monod G., Saucier D., Perdu-Durand E., Diallo M., Cravedi J.P., Astic L., 1994, Biotransformation enzyme activities in the olfactory organ of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Immunocytochemical localization of cytochrome P4501 A1 and its induction by β -naphthoflavone. Fish Physiol. Biochem. 13, 433-444.
- Moore M.J., Stegeman J.J., 1994, Hepatic neoplasm in winter flounder *Pleuronectes americanus* from Boston harbor, Massachusetts, USA. Dis. Aquat. Org. 20, 33-48.
- Peterson C.H., 2001, The "Exxon Valdez" oil spill in Alaska: Acute, indirect and chronic effects on the ecosystem. Adv. Mar. Biol. 39, 1-103.
- Peterson C.H., Rice S.D., Short J.W., Esler D., Bodkin J.L., Ballachey B.E., Irons D.B., 2003, Long-term ecosystem response to the "Exxon Valdez" oil spill. Science 302, 2082-2086.
- Priede I.G., 1977, Natural selection for energetic efficiency and relationship between activity level and mortality. Nature 267, 610-612.
- Priede I.G., 1985, Metabolic scope in fish. In: Tyler P., Calow P. (Eds.), Fish energetics: new perspectives. Croom Helm, London, pp. 33-64.
- Reid S.G., Bernier N.J., Perry S.F., 1998, the adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. Comp. Biochem. Physiol. C 120, 1-27
- Shiels H.S., Stevens E.D., Farrell A.P., 1998, Effect of temperature, adrenaline and ryanodine on power production in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* ventricular trabeculae. J. Exp. Biol. 201, 2710-2710.
- Sogard S., Able K.W., 1992, Growth variation of newly settled winter flounder (*Pseudopleurectes americanus*) in New Jersey estuaries as determined by otolith microstructure. Neth. J. Sea Res. 29, 163-172.
- Soimasuo R., Jokinen I., Kukkonen J., Petanen T., Ristola T., Oikari A., 1995, Biomarker responses along a pollution gradient: effects of pulp and paper mill effluents on caged whitefish. Aquat. Toxicol. 31, 329-345.
- Solangi M.A., Overstreet R.M., 1982, Histopathological changes in two estuarine fishes, *Menidia beryllina* (Cope) and *Trinectes maculatus* (Bloch and Schneider) exposed to crude oil and its water-soluble fractions. J. Fish Dis. 5, 13-35.
- Stehr C.M., Myers M.S., Johnson L.L., Spencer S., Stein J.E., 2003, Toxicopathic liver lesions in English sole and chemical contaminant exposure in Vancouver Harbour, Canada. Mar. Environ. Res. 57, 55-74.
- Suthers I.M., 1998, Bigger? Fatter? Or is faster growth better? Considerations on condition in larval and juvenile coral-reef fish. Aust. J. Ecol. 23, 265-273.
- Tronczynski J., Munsch C., Moisan K., Guiot N., Truquet I., Olivier N., Men S., Furaud A., 2004, Contamination of the Bay of Biscay by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) following the T/V "Erika" oil spill. Aquat. Living Resour. 17, 243.

- Truscott B., Idler D.R., Fletcher G.L., 1992, Alteration of reproductive steroids of male winter flounder (*Pleuronectes americanus*) chronically exposed to low levels of crude oil in sediments. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49, 2190-2195.
- Van Den Thillart G., Dalla Via J., Vitali G., Cortesi P., 1994, Influence of long-term hypoxia exposure on the energy metabolism of *Solea solea*. I. Critical O₂ levels for aerobic and anaerobic metabolism. Mar. Ecol. Prog. Ser. 104, 109-117.
- Vethaak A.D., Jol J.G., Meijboom A., Eggens M.L., 1996, Skin and liver diseases in flounder (*Platichthys flesus*) after long-term exposure to contaminated sediments in large scale mesocosms. Environ. Health Perspect. 104, 1218-1229.
- Vethaak A.D., Wester P.W., 1996, Diseases in flounder *Platichthys flesus* in Dutch coastal and estuarine waters, with particular reference to environmental stress factors. II. Liver histopathology. Dis. Aquat. Org. 26, 99-116.
- Vettier A., Sébert P., 2004, Pressure resistance of aerobic metabolism in eels from different water environments. Mitochondrion 3, 347-354.
- Whitfield A.K., Elliott M., 2002, Fishes as indicators of environmental and ecological changes within estuaries: A review progress and some suggestions for the future. J. Fish Biol. 61 (suppl. A), 229-250.

Evaluation of the impact of the Erika oil spill on the traict du Croisic site by the way of mussel caging experiments

Olivier Mazéas¹ and Hélène Budzinski^{1*}

¹Laboratoire de Physico- et Toxicochimie des Systèmes Naturels, UMR 5472 CNRS, Université Bordeaux I, 351, cours de la libération, 33405 Talence, France.

* Corresponding author

Email: h.budzinski@lptc.u-bordeaux1.fr

Phone : 33 (0)5 40 00 69 98

Fax: 33 (0)5 40 00 69 98

Abstract - Four mussel caging experiments of one month were carried out approximately one year and a half after the Erika oil spill in order to assess the medium-term impact of this event in different locations of a particularly impacted site of the French Atlantic coast : the traict du Croisic.

The obtained results indicate a PAH contamination of mussels from the whole traict du Croisic by a petrogenic source close to the Erika fuel oil pattern. However, sediments from the experimental sites located at the bottom of the traict du Croisic do not display a characteristic petrogenic profile, conversely to the entrance of the traict. Moreover, relatively important levels of contamination are measured in the different experimental sites in spite of low levels in some sediments. These observations suggest a main contamination of mussels through the aqueous phase. Furthermore, in spite of intermediate levels of contamination measured in mussels from the entrance of the traict, tissues of those mussels generally exhibit the stronger alterations. Finally, no PAH metabolites could be detected in the digestive gland of caged mussels.

Keywords : Mussel caging , Oil spill, Polycyclic aromatic hydrocarbons

INTRODUCTION

PAHs are ubiquitous contaminants of the environment (McElroy et al., 1989). The marine compartment appears to be a endpoint of those chemicals by the way of terrestrial runoffs, atmospheric deposition and petroleum release (Neff, 1979; GESAMP, 1990). As a result of the oil spill consecutive to the ERIKA oil tanker wreck, which occurred on the 12th of December 1999, fuel oil #6 slicks came ashore the Atlantic coast of France and especially impacted the site of the traict du Croisic, located between the Vilaine and the Loire Estuaries in the Bay of Biscay (Jeanneret et al., 2002; Tronczynski et al., 2003). The traict du Croisic is a country where activities linked to the sea (tourism, fishing, conchyliculture or salt production) play a major economic role.

Mussels are organisms widely used in biomonitoring studies due to their widespread repartition, their ability to accumulate contaminants in highly polluted environments and their important exposure by filtering water (Meador et al., 2003). In order to assess the medium-term impact of the oil spill in the traict du Croisic, mussel caging experiments were carried out approximately one year and a half after the Erika oil tanker wreck. Another goal of this study was to investigate the possibility to use biotransformation products of PAHs as an exposure biomarker of mussels to PAHs.

MATERIAL AND METHODS

Experimental design

Between April and July 2001, mussels (hybrid mussels from *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*), with length included between 3,5 et 4,5 cm, were caught each month on a weakly contaminated site, the Moulleau (Mou), located at the entrance of the Arcachon Bay. Mussel shells were cleaned and some organisms were measured and dissected for control

establishment. Remaining mussels were kept in sea water of the Moulleau site with bulling of air until the next morning in an air-conditioned room. The next day, mussels were brought to the traict du Croisic and caged in three different locations : Pen Bron (Pen), at the entrance of the traict, Plinet (Pli) and Sibéron (Sib), located at the entrance of the saltern marshes in the bottom of the traict (Fig. 1). Due to the forbidden access of the Pen Bron site during the first sampling time, mussels were placed in the Lencly location (Len). After a one month caging, 10 mussels were sampled for PAH analysis (whole body without shell), 10 others for PAH metabolite analysis (digestive gland) and 5 ones for histological analysis in each sampling site from May to August. The sampling framework is summarized in Table 1. At the end of the first experiment, all the mussels from Sibéron (Sib 1) were found dead due to the partial sticking of the cage in the mud. In addition, the second cage left in Plinet (Pli 2) was not recovered.

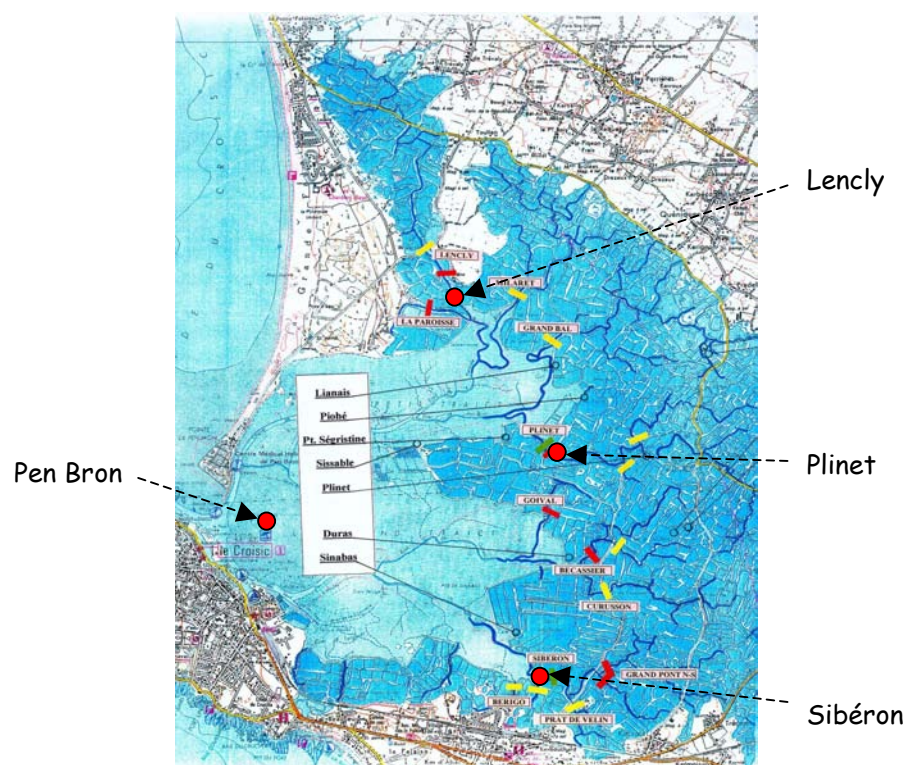


Figure 1 : Caging locations in the traict du Croisic

	Mou	Pli	Sib	Pen	Len
8-9/04/2001	1				
8-9/05/2001	2	1	1 : mortality		1
24-25/06/2001	3	2 : loss	2	2	
23-24/07/2001	4	3	3	3	
20-21/08/2001		4	4	4	

Table 1 : Experiment numbers for the 4 experiments realized from April to August 2001

Chemicals, solvents and reagents

The standard reference material SRM 2260, constituted of about 20 aromatic compounds, was provided by the U.S. National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, MD, USA) and perdeuterated aromatic compounds by MSD Isotopes (Montreal, Canada). 1- and 2-hydroxynaphthalene were purchased from Lancaster (Strasbourg, France), 2-hydroxybiphenyl, 9-hydroxyfluorene and 1-hydroxypyrene from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Falavier, France), 1-, 2-, 3-, 4-, 9-hydroxyphenanthrene, 1-hydroxychrysene and 3-hydroxybenzo(a)pyrene from Promochem (Molsheim, France). 1-hydroxypyrene-d9 and phenanthrene-d10 were obtained from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA).

2-mercaptoethanol, sodium acetate trihydrate 99% and bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) were purchased from Acros organics (Noisy-Le-Grand, France). β -glucuronidase/aryl sulfatase mixture, 100000 et 7500 u/ml respectively, and Supelclean LC-NH₂ cartridges were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Falavier, France) and water (sterilized water for injection) from laboratory Aguettant (Lyon, France). Bakerbond C₁₈ cartridges and Ultra Resi-Analysed methylene chloride (Mallinckrodt Baker) were obtained from Atlantic Labo (Eysines, France). Methanol Suprasolv, acetic acid (100% Normapur), aluminium oxide (150 basic type T; 0.063-0.2 mm) and silica gel 60 (0.063-0.2 mm) were provided by VWR (Strasbourg, France).

Determination of PAH concentration in sediments and mussels

After sampling, sediments and pooled unshelled mussels were kept to -20°C until freeze-drying. Samples were then grounded before analysis. The analytical method used for analyzing PAHs in biological tissues was adapted from Thompson et al. (2002). PAHs were extracted using microwave assisted extraction with a Maxidigest 350 apparatus (Prolabo, France) in presence of methylene chloride and after the addition of perdeuterated PAHs as internal standards (Budzinski et al, 1995, 1996; Letellier et al., 1997, 1999). Extracts were filtered and reduced to 500 μl using a rotary evaporator and then under a nitrogen stream. Samples were then purified on aluminium oxide and silica gel columns according to a procedure adapted from Behar et al., 1989 (Baumard et al., 1997; Mazéas and Budzinski, 2002). In the case of sediments, activated copper was added in the aluminium oxide columns in order to remove sulphur from the extracts. The glassware was washed with detergents and heated 6 h at 450°C before use. Manipulation blanks were performed to control potential contamination.

Extracts were analysed by an HP GC 6890A gas chromatograph Agilent Technologies (automated PTV pulsed splitless injection (25 psi, 1 min); purge delay: 1 min and purge flow: 60.6 ml/min; injector temperature: 270°C ; interface temperature: 280°C ; oven temperature: from 70°C (2 min) to 300°C (5 min) at $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$) coupled to an HP MSD 5973 mass spectrometer (electron impact: 70 eV; voltage: 2000 V; source temperature: 150°C) both purchased from BIOS Analytique (l'Union, France). Analyses were performed in the SIM (selected ion monitoring) mode at 1.3 scan/s (Dwell time: 50 ms for each ion) using the molecular ions of the studied compounds. The capillary column was an HP5/MS Agilent Technologies (30 m x 0.25 mm ID x 0.25 film thickness) provided by BIOS Analytique (l'Union, France) and the carrier gas was helium 6.0 obtained from Linde (Toulouse, France).

Different perdeuterated polycyclic aromatic hydrocarbons were used as internal standards for each class of aromaticity (Baumard and Budzinski, 1997). The response factors of PAHs relatively to perdeuterated PAHs were determined for each GC/MS sequence by injecting a mixture containing a solution of PAHs (SRM 2260, National Institute of Science and Technology, Gaithersburg, MD, USA) and the solution of perdeuterated PAHs used for spiking samples.

The monitored PAHs are, in ascending order of molecular weight, naphthalene*, methylnaphthalenes, dimethylnaphthalenes, trimethylnaphthalenes, tetramethylnaphthalenes, acenaphthylene*, acenaphthene*, fluorene*, phenanthrene* (Phe), anthracene* (A), methylphenanthrenes+1-methylanthracene (C₁-Phe), dimethylphenanthrenes, fluoranthene* (F), pyrene* (P), benz(a)anthracene*, chrysene*+triphenylene (C+T), methylchrysenes (C₁-C), benzo(b)fluoranthene*+benzo(j)fluoranthene+benzo(k)fluoranthene*, benzo(e)pyrene, benzo(a)pyrene*, perylene, indeno(1,2,3-cd)pyrene*, benzo(g,h,i)perylene* and dibenz(a,h)anthracene*+dibenz(a,c)anthracene. Compounds marked with a “*” are the 16 PAHs of the US-EPA. Due to the coelution of 3 other PAHs with some of those compounds by GC/MS, 19 PAHs are actually included in this sum of PAHs. Dibenzothiophene, methyl dibenzothiophenes, dimethyldibenzothiophenes, 1,2-benzonaphthothiophène, 2,3-benzonaphthothiophène were also included in the sum of total PAHs.

Determination of PAH metabolites

The protocol used for the determination of PAH metabolite concentrations is adapted from Mazéas and Budzinski (submitted).

Pooled digestive glands were first homogenized in water buffered to pH 5 (acetate buffer constituted of sodium acetate and acetic acid in water) using an ultra-turrax. 1-

hydroxypyrene deuterated, used as internal standard, and β -mercaptoethanol, used as antioxidant, were added to the homogenized material. The sample was treated by β -glucuronidase and aryl-sulfatase for deconjugation (24h, 37°C). Free metabolites were then extracted by microwave assisted extraction (10 min; 30 W) in a 4/5 (v/v) buffered water/methanol mixture. The extract was then evaporated under a nitrogen stream to remove methanol before solid-phase extraction (SPE) on C₁₈ cartridges and purification on LC-NH₂ cartridges. Extracts were then evaporated to dryness under a nitrogen stream and reconstructed in methylene chloride. After derivatization with BSTFA (30 min, 65°C), phenanthrene perdeuterated was added to the samples to check for 1-hydroxypyrene-d₉ recovery and analyses were performed by the same type of GC/MS as reported for PAH analysis (automated PTV pulsed splitless injection (25 psi, 1.5 min); purge delay: 1.5 min and purge flow: 60 ml/min; injector temperature: 250°C; interface temperature: 280°C; oven temperature: from 70°C (2 min) to 180°C (1 min) at 5°C/min and from 180°C to 290°C (1 min) at 10°C/min; electron impact: 70 eV; voltage: 2000 V; source temperature: 150°C; 1.53 scan/s; dwell time: 50 ms for each ion). The capillary column was an HP5/MS Agilent Technologies (30 m x 0.25 mm ID x 0.25 film thickness; BIOS Analytique, l'Union, France) and the carrier gas was helium 6.0 from Linde (Toulouse, France).

The compounds were quantified in SIM mode using the ions below : 1-hydroxynaphthalene (m/z=201), 2-hydroxynaphthalene (m/z=216), 2-hydroxybiphenyl (m/z=211), 9-hydroxyfluorene (m/z=165), 9-hydroxyphenanthrene (m/z=266), 1-hydroxypyrene (m/z=290), 1-hydroxychrysene (m/z=316) and 3-hydroxybenzo(a)pyrene (m/z=340).

A mixture constituted of standard metabolites and 1-hydroxypyrene-d₉ was injected at the beginning and at the end of each GC/MS sequence for response factor determination and

a manipulation blank was performed together with samples to control potential contamination.

Histological study

Mussels (with shells) were fixed in 10% formol saline immediately after sampling. After ethanol dehydration, samples were cleared in toluene and embedded in paraffin wax (Paraplast plus, Sherwood Medical). 5 µm thickness sections were then stained with Mayer hemalun and next with modified trichrome stain (Masson) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Falavier, France) before microscopical examination. The studied organs were the digestive gland, the gills, the kidney and the stomach.

RESULTS AND DISCUSSION

PAH concentration in sediments

Important differences in PAH contamination levels are observed in sediments from site to site (Fig. 2). Concentrations measured in the sediment from Sibéron and Plinet are largely higher than in the Lencly and Pen Bron ones (mean factor of 29 between the two groups of sediments). This difference of contamination can be explained by the nature of the sediments (Landrum et al., 1992). Thus, sediments from Lencly and Pen Bron consist in sandy particles, with high diameter and low carbon organic percentage. Conversely, sediments from Sibéron and Plinet consist in fine particles enriched in carbon organic, which favours PAH adsorption.

Moreover, a temporal variation of the contamination can be noticed. Concentration levels are generally lower in April, May and June than in July, and intermediate in August. However, in May, Sibéron sediments are particularly contaminated (4248 ng g⁻¹ of dry

weight for the sum of the studied PAHs), especially when compared to the next month concentration (631 ng g^{-1}).

The study of PAH composition put in evidence the similarity of PAH profile between Sibéron and Plinet sediments. They are both exhibiting high proportions of tetra-aromatic PAHs and, in a smaller extend, of penta-aromatics (Fig. 2) and their molecular indices Phe/A, F/P and Phe/C₁Phe are close (Fig. 3). The F/P and Phe/C₁Phe ratios, greater than 1, suggest a pyrolytic source of PAH contamination. However, Plinet sediments exhibit higher C/C₁C ratios than Sibéron indicating a possible petrogenic contribution (Bouloubassi and Saliot, 1993; Budzinski et al., 1997; Yunker et al., 2002). Sediments from Lençol display a different pattern with the equal predominance of tetra and penta-aromatic PAHs and molecular indices suggesting a both petrogenic and pyrolytic source of contamination (Phe/A>10 and F/P>1). On the other hand, Pen Bron sediments exhibit molecular indices close to the ones of the Erika fuel oil (Fig. 3). Moreover, low molecular weight compounds are particularly enriched in those samples compared with high molecular weight ones, which is characteristic of petroleum products.

Thus, sediment analysis highlights a petrogenic contamination at the entrance of the traict du Croisic (Pen Bron). Molecular indices indicate the possibility of a contamination by the Erika fuel oil, more than one year and a half after the Erika oil spill. This persistence was already highlighted in another study (Tronczynski et al., 2003). However, the concentration observed here is very low ($18 \pm 13 \text{ ng g}^{-1}$ for the sum of 19 PAHs) due to the sandy nature of the sediment material. Moreover, sediments from the bottom of the traict do not seem to be impacted by this petrogenic contamination. Locations from the bottom of the traict exhibit pyrolytic or combined pyrolytic and petrogenic pattern of contamination. The levels of contamination (sum of 19 PAHs) measured in Sibéron ($2021 \pm 1060 \text{ ng g}^{-1}$) and Plinet ($1230 \pm 660 \text{ ng g}^{-1}$) indicate that those sites are moderately contaminated.

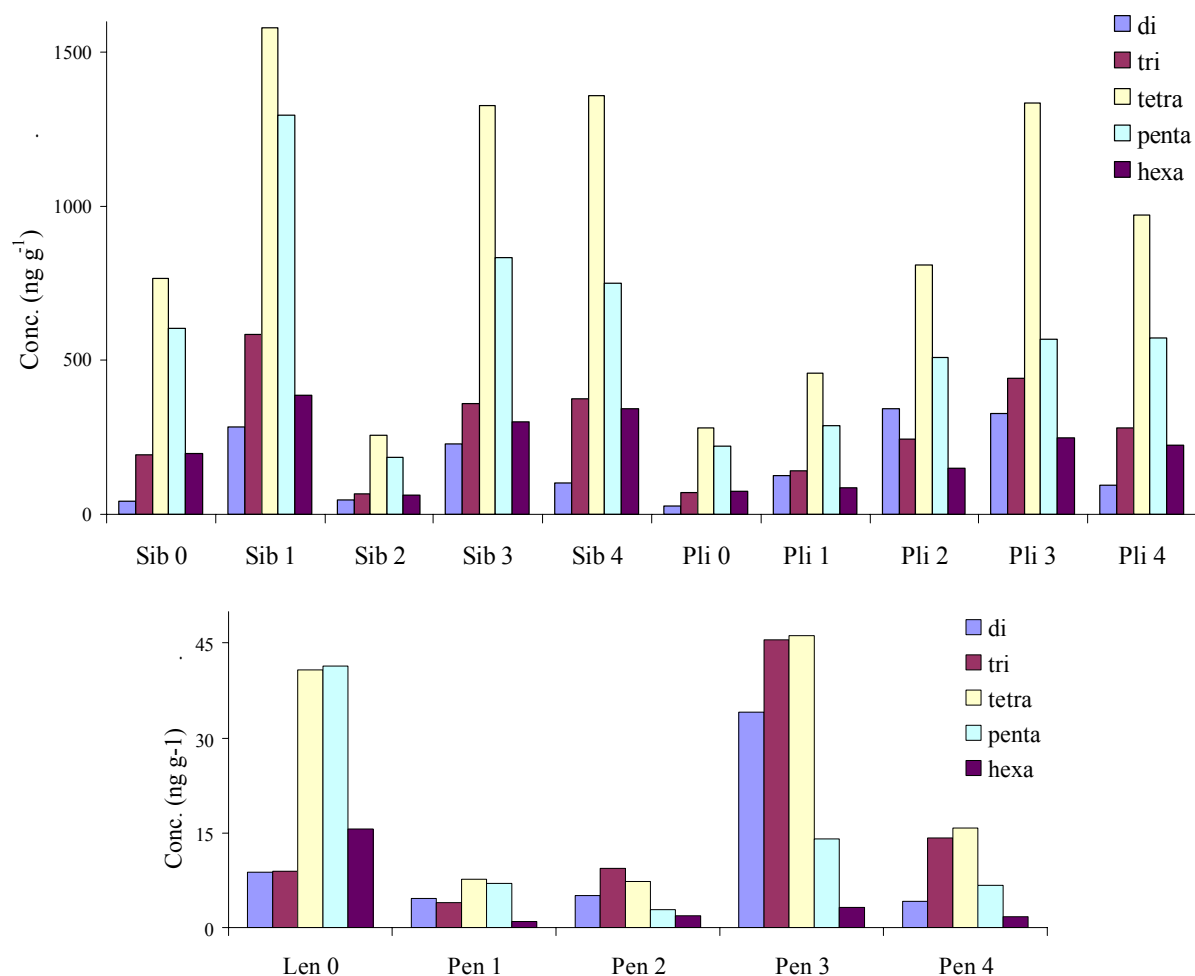


Figure 2 : PAH concentrations in sediments from the traict du Croisic per class of aromaticity (di : di-aromatic ; tri : tri-aromatic ; tetra : tetra-aromatic ; penta : penta-aromatic ; hexa : hexa-aromatic compounds)

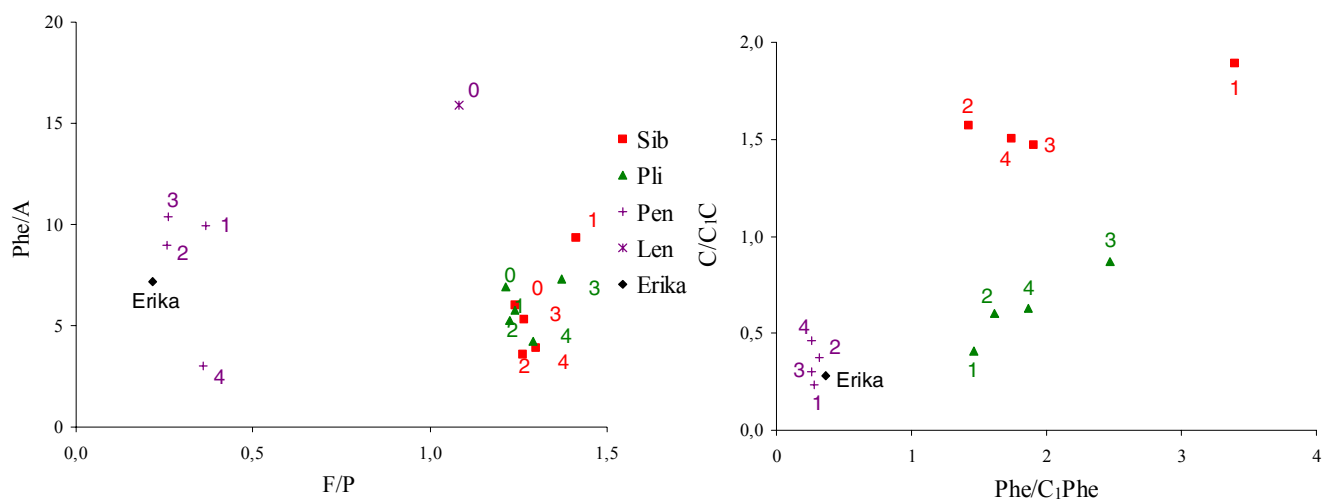


Figure 3 : PAH molecular ratios in the different studied sediments and in the Erika fuel oil (di : di-aromatic ; tri : tri-aromatic ; tetra : tetra-aromatic ; penta : penta-aromatic ; hexa : hexa-aromatic compounds; Sib0, Pli0 and Len0 do not appear on the right figure due to the non quantification of methylchrysenes in those samples)

Measurements in mussels

Concerning PAH concentrations in mussel tissues, a strong accumulation can be observed after one month of caging (Fig. 4). Thus, organisms from The Moulleau exhibit levels of PAHs $107 \pm 27 \text{ ng g}^{-1}$ for the sum of the US-EPA PAHs) lower than the national mean concentration of about 150 ng g^{-1} (RNO, 2000). After one month of caging, PAH levels increased to reach mean concentrations as high as $544 \pm 140 \text{ ng g}^{-1}$ in Plinet and 522 ng/g^{-1} in Lenclay. Levels are intermediate in Sibéron and Pen Bron with mean concentrations of $378 \pm 67 \text{ ng g}^{-1}$ and $287 \pm 35 \text{ ng g}^{-1}$ respectively. Thus, PAH concentrations as high as the ones observed in Sibéron and Plinet are measured in Pen Bron and Lenclay in spite of low levels of PAHs in sediments. This phenomenon could be explained by a main contamination of mussels through the aqueous phase. Moreover, temporal variations are less important than the ones observed in sediments. A small propensity to a PAH concentration decrease can however be noted in the traict du Croisic between the beginning and the end of the study.

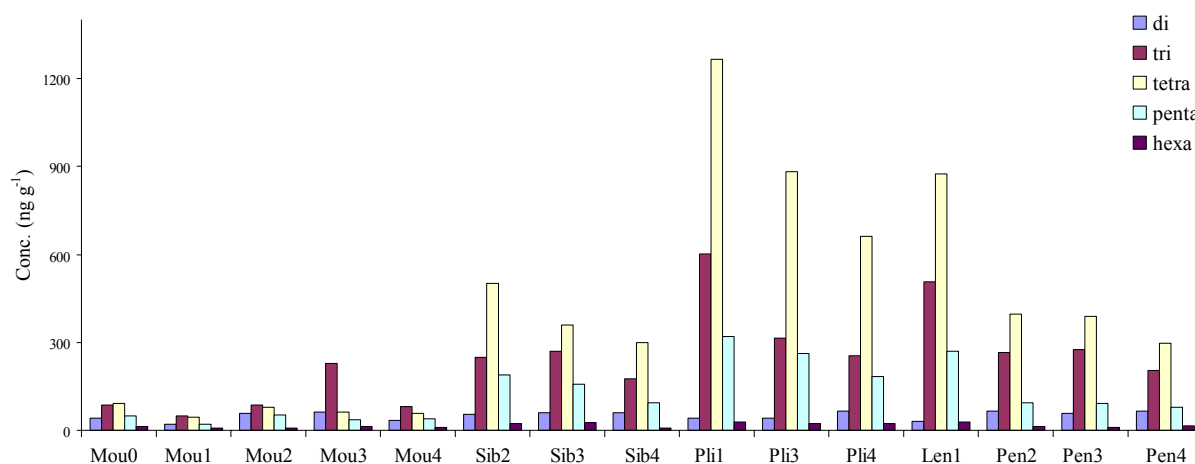


Figure 4 : PAH concentrations in mussels per class of aromaticity (di : di-aromatic ; tri : tri-aromatic ; tetra : tetra-aromatic ; penta : penta-aromatic ; hexa : hexa-aromatic compounds)

Furthermore, when looking at molecular distributions, it can be noticed that mussels from Pen Bron are characterized by a majority of tetra-aromatic compounds (Fig. 4) in opposition to the PAH profile in sediments. However, high molecular weight compounds are usually rare in the aqueous phase and particularly in the case of petrogenic contamination.

The other caged mussels are also characterized by the predominance of tetra-aromatic compounds while they were exhibiting a lesser prevalence of tri- and tetra-aromatic compounds before transplantation (the Moulleau). For this last site, a predominance of tri-aromatic compounds measured in July (Mou3, Fig. 4) due to the high concentrations of alkylphenanthrenes. It can also be noticed that levels of tri-aromatic compounds are greater than penta-aromatic ones in caged mussels in opposition to sediments.

Considering molecular indices, the whole mussels caged in the traict du Croisic display values generally close to the Erika fuel oil (Fig. 5) in opposition to the values obtained before caging, suggesting the contamination of the entire traict du Croisic by the Erika fuel oil. In these conditions, the pyrolytic profile of the sediments located in the bottom of the traict is quite unexpected. However, the installation of protection barrages in the bottom of the traict du Croisic during the Erika oil spill could explain in part this phenomenon.

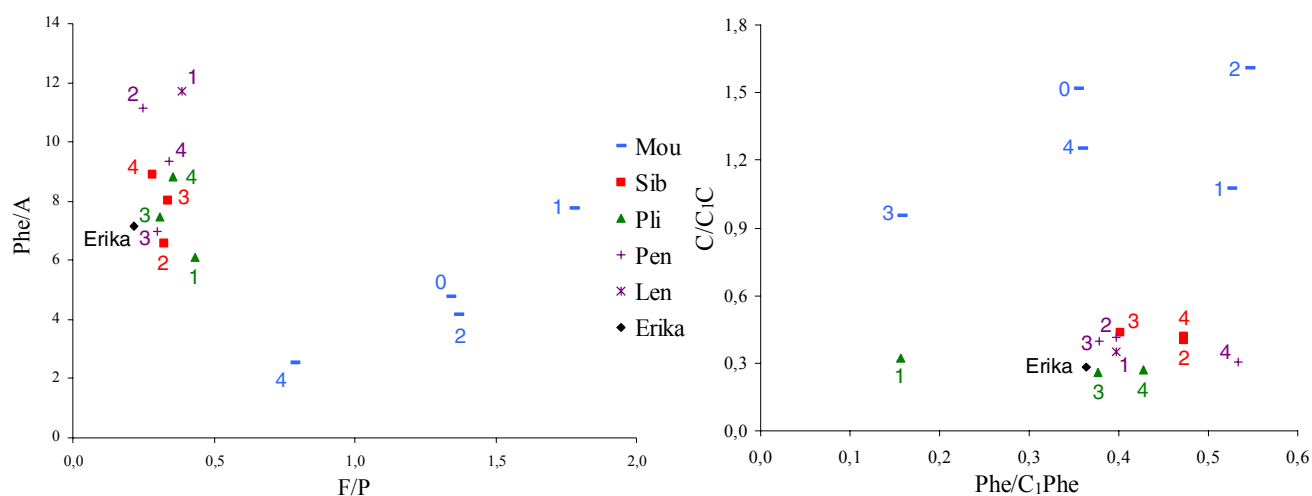


Figure 5 : PAH molecular ratios in the different studied mussels and in the Erika fuel oil (di : di-aromatic ; tri : tri-aromatic ; tetra : tetra-aromatic ; penta : penta-aromatic ; hexa : hexa-aromatic compounds)

On the other hand, no PAH metabolite could be detected in the digestive gland of mussels using the described protocol.

Furthermore, the histological study of mussel tissues indicates that Pen Bron mussels are the most affected organisms and that the digestive gland shows the most significant alterations.

Digestive glands display lipid vacuoles accumulation for all the traict du Croisic sites, except in May. The accumulation of lipid vacuole was previously related to hydrocarbon absorption (Marty et al., 2003). In July, cicatricial signs (cellular fragments) caused by mussel laying are additionally observed. In August, digestive gland from Pen Bron mussels exhibit, in addition to lipid vacuole accumulation, abundant nodules consisted of very small cells with high nucleoplasmic ratio and characteristic of a neoplasia phenomenon. This phenomenon is particularly evident when comparing digestive gland tissues of mussels from Pen Bron to the ones of the Moulleau (Fig. 6). The observed nodules (white arrows) are so abundant in digestive glands of mussels from Pen Bron that it becomes difficult to distinguish the classical cellular types of the digestive tubule. Neoplastic phenomena were previously described in the case of marine organism exposure to PAHs and can be related to the carcinogenic properties of those compounds (Malins et al., 1988 ; Vethaak et Rheinallt, 1992 ; Moore et Myers, 1994 ; Spitsbergen et al., 2000). The particular alteration of Pen Bron mussels is unexpected considering the intermediate PAH concentrations measured in its tissues, especially in August (Fig. 4).

The other organs exhibit less significant perturbations. Nevertheless, the study of the gill allows to observe an important alteration of tissues from Pen Bron mussels too. Weaker perturbations are noticed in gill tissues of mussels from Sibéron, Lencly and Plinet (by decreasing order). The observed perturbations consist in an epithelial cell retraction causing the apparition of intercellular spaces. This phenomenon induces an enlargement of the gaseous exchange barrier in respiratory and ciliated epitheliums. It can thus affect the respiratory system by modifying water circulation and water/haemolymph exchanges. Concerning the kidney, only Pen Bron mussels display a perturbation consisted in a thicker

epithelium. Furthermore, no alteration is observed in the stomach except for Lencly mussels displaying a cilia scarcity in the stomach epithelium, a discontinuity of the cinetosome line and an increased volume of intercellular space.

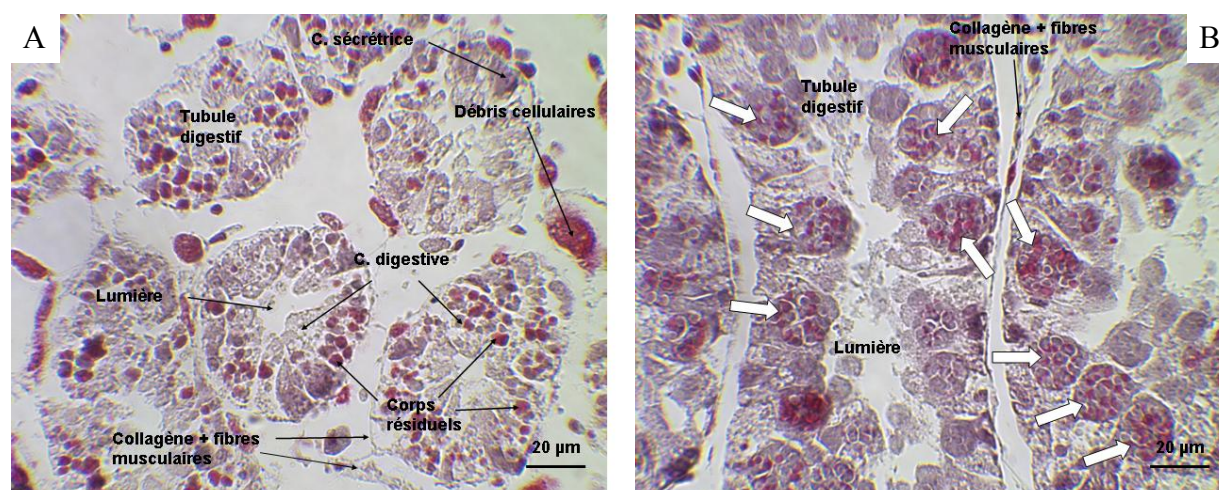


Figure 6 : Microscopical view of digestive glands transversal cuts for mussels from the Moulleau (A) and Pen Bron (B) at the end of August

CONCLUSION

This caging study indicates a PAH contamination of mussels from the whole traict du Croisic by a petrogenic source close to the Erika fuel oil pattern. Thus, the obtained results suggest a persistent contamination of this area by the PAHs introduced in the middle during the Erika oil spill more than one year and a half after the oil spill. However, mussels are characterized by a low level of low molecular weight PAHs in its tissues, nevertheless extensively present in fuel oils. Moreover, in spite of a petrogenic profile of PAH contamination close to the Erika fuel oil composition in the sediments sampled at the entrance of the traict (Pen Bron), sediments from the experimental sites located at the bottom of the traict du Croisic do not display this petrogenic profile. It must be noted that the entrances of the saltern marshes were protected by the installation of barrages during the oil spill, which could partially explain this phenomenon. Besides, the levels of contamination

measured in mussels do not correspond to the ones observed in sediments. These observations indicate a main contamination of mussels through the aqueous phase. Furthermore, in spite of intermediate levels of contamination measured in mussels from Pen Bron, tissues of those mussels generally exhibit the stronger alterations. Finally, no PAH metabolites could be detected in the digestive gland of caged mussels.

Aknowledgments – This research was supported in part by the Liteau-Erika program.

References

- Baumard P and Budzinski H, 1997. Internal standard quantification method and Gas Chromatographe-Mass Spectrometer (GC-MS): a reliable tool for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) quantification in natural matrices. *Analisis*, 25 : 246-252.
- Baumard P, Budzinski H and Garrigues P, 1997. Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues by gas chromatography coupled to mass spectrometry : application to mussels. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 359(6) : 502-509.
- Behar F, Leblond C, Saint Paul C, 1989. Analyse quantitative des effluents de pyrolyse en milieu ouvert et fermé. *Rev. Inst. Français du pétrole*, 44 : 387-509.
- Bouloubassi I and Saliot A, 1993. Investigation of anthropogenic and natural organic inputs in estuarine sediments using hydrocarbon markers. *Oceanologica Acta*, 16(2) : 145-161.
- Budzinski H, Papineaud A, Baumard P et Garrigues P, 1995. Extraction assistée par chauffage micro-ondes focalisées (MOF) à pression ambiante des composés organiques dans les matrices naturelles: application à l'analyse des composés aromatiques. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 321 : 69-76.

- Budzinski H, Baumard P, Papineaud A, Wise S and Garrigues P, 1996. Focused microwave assisted extraction of polycyclic aromatic compounds from standard reference materials, sediments and biological tissues. In *Proceeding of the 15th international symposium on polycyclic aromatic compounds*, Belgirate, Italy, 225-232.
- Budzinski H, Jones I, Bellocq J, Pierard C and Garrigues P, 1997. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Mar. Chem.*, 58 : 85-97.
- GESAMP (Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection), 1993. Impact of oil and related chemicals and wastes on the marine environment. GESAMP Report 50.
- Jeanneret H, Chantereau S et Ratiskol G, 2002. L'impact environnemental d'une pollution accidentelle des eaux. Les journées du Cedre, Paris, 17 octobre 2002.
- Landrum PF, Lee H and Lydy MJ, 1992. Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 11 : 1709-1725
- Letellier M, Budzinski H, Garrigues P and Wise SA, 1997. Focused microwave assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in open cell from reference materials (sediment, soil, air particulate). *Spectroscopy*, 13 : 71-80.
- Letellier M, Budzinski H, Bellocq J and Conan J, 1999. Focused microwave-assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes from sediments and source rocks. *Organic Geochem.*, 30(11) : 1353-1365.
- Malins DC, McCain BB, Landahl JT, Myers MS, Krahn MM, Brown DW, Chan S-L and Roubal WT, 1988. Neoplastic and other diseases in fish in relation to toxic chemicals: an overview. *Aquat. Toxicol.*, 11 : 43-67.
- Marty GD, Hoffmann A, Okihiro MS, Hepler K and Hanes D, 2003. Retrospective analysis: bile hydrocarbons and histopathology of demersal rockfish in Prince William Sound, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. *Mar. Environ. Res.*, 56 : 569-584.

- Mazéas L and Budzinski, 2002. Improved accuracy of GC-MS quantification of aliphatic and aromatic hydrocarbons in marine sediments and petroleums. Validation on reference matrices and application to the Erika oil spill. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 82(3) : 157-173.
- Mazéas O and Budzinski H, submitted. Solid phase extraction and purification for individual quantification of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in liquid matrixes. *Anal. Biol. Chem.*
- McElroy AE, Farrington JW and Teal JM, 1989. Bioavailability of PAH in the aquatic environment. In *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment* (Varanasi U, ed), 1-40. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Meador JP, 2003. Bioaccumulation of PAHs in marine invertebrates. In (Douben PET ed) *PAHs: An ecotoxicological perspective*, 147-172. Ecological and Environmental Toxicology Series, Wiley, UK.
- Moore MJ, and Myers MS. 1994. Pathobiology of chemical-associated neoplasia in fish. In *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives* (Malins DC, Ostrander GK, eds), 327–386. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Neff JM, 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment : sources, fates and biological effects. London, Applied Sciences Publishers.
- Spitsbergen JM, Tsai HW, Reddy A, Miller T, Arbogast D and Hendricks JD, 2000. Neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*) treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene by two exposure routes at different developmental stages. *Toxicol. Pathol.*, 28 : 705-715.
- Thompson S, Budzinski H, Le Menach K, Letellier M and Garrigues P, 2002. Multiresidue analysis of PAHs, PCBs and organochlorine pesticides in marine sediments. *Anal. Bioanal. Chem.*, 372 : 196-204.
- Tronczynski J (coordination), Munsch C, Boutier B, Averty B, Guiot N, Moisan K, Truquet I, Dugrais L, 2003. Etude comparative de la contamination des sédiments par les

hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) avant et après le naufrage de l'Erika ; Etude et suivi de la contamination de la colonne d'eau (SEDERIKA). In *Suivi des conséquences écologiques et écotoxicologiques dues au naufrage de l'Erika ; Volet 1 : Etendues spatiale et temporelle : répartition dans le milieu*. Rapport annuel 2003.

Vethaak AD and Rheinallt T, 1992. Fish disease as a monitor for marine pollution: the case of the North Sea. *Review of Fish Biology and Fisheries*, 2 : 1–32.

Yunker MB, MacDonald RW, Vingarzas R, Mitchell RH, Goyette D and Sylvestre S, 2002. PAHs in the Fraser River basin : a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Org. Geochem*, 33(4) : 489-515.

Evaluation of the exposure of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons in the Seine River mouth through bile metabolites monitoring; comparison with other French Atlantic sites

Olivier Mazéas^{1,2}, Hélène Budzinski^{1*}, Jacek Tronczynski²

¹ Laboratoire de Physico- et Toxicochimie des Systèmes Naturels, UMR 5472 CNRS, Université Bordeaux 1, 351 cours de la libération, 33405 Talence, France

² IFREMER, Département des Polluants Chimiques, Rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes cedex 03, France

* Corresponding author

Email: h.budzinski@lptc.u-bordeaux1.fr

Phone : 33 (0)5 40 00 69 98

Fax: 33 (0)5 40 00 69 98

Abstract - The Seine Estuary is widely contaminated by organic pollutants and especially PAHs. Fish are known to extensively metabolize this class of contaminants. In this way, the exposition of fish to PAHs in the Seine Estuary mouth was assessed by determining PAH metabolite concentrations in the bile of a widespread bottom fish specie, the European flounder *Platichthys flesus*. PAH concentrations were also measured in the liver of fish. Flounders from several locations on the West coastline of France were also collected for comparison.

Flounders from the Seine mouth appeared to be the most impacted fish considering both metabolite concentrations and PAH bioaccumulation. However, important variations were noticed depending on the sampling period. Fish caught in a location off Antifer, located in the north of the Seine Bay, also exhibited high levels of metabolites. Flounders from the sites of Lesconil in south Brittany and from the Gironde mouth, two locations with no high inputs of PAHs, appeared to have been much less exposed to PAHs. In addition, variations of PAH concentrations in the liver of fish caught in the Seine mouth and differences of PAH levels between sites were much less important than metabolite ones in the bile. This best discrimination of exposure made possible by metabolite monitoring can be attributed to the high rate of PAH biotransformation in fish. Furthermore, this study highlights the difference of metabolite concentrations in the bile in function of fish age and thus the importance of comparing PAH metabolite levels of fish from the same group age.

Keywords : PAHs, Seine, contamination, metabolites, bile, GC/MS.

INTRODUCTION

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous contaminants of the environment (McElroy et al., 1989). The marine compartment appears to be an endpoint of those chemicals by the way of terrestrial runoffs, atmospheric depositions and petroleum releases (Neff, 1979; GESAMP, 1990). To assess the significance of such a contamination on organisms, the quantification of PAHs in marine organism tissues is usually carried out. However, depending on the ability of organisms to metabolize PAHs, measurement of the bioaccumulated part of absorbed PAHs can be restrictive and not representative of the environmental contamination. Moreover, PAHs are biotransformed into reactive intermediates (Varanasi et al., 1989; Akcha et al., 2003). In this way, the study of PAH fate in marine organisms appears to be more and more necessary in order to access bioavailability and toxicity of those contaminants in the marine environment.

Biliary metabolites of PAHs have been shown to be particularly efficient biomarkers of PAH exposition (van der Oost, 2003). Metabolites are usually determined semi-quantitatively as global fluorescent aromatic compound equivalents (FACs) in the bile of fish (Krahn et al., 1984 and 1986; Ariese et al., 1993; Lin et al., 1996; Beyer et al., 1996). The present work consists in the application of an analytical protocol previously described (Mazéas and Budzinski, submitted) for the determination of individual metabolites quantitatively in the bile of fish. The studied metabolites are monohydroxylated PAHs, which are known to be some of the major metabolites produced by fish, present in their free form or conjugated with glucuronide, sulfate, glutathione groups... (Varanasi et al., 1989; Foureman, 1989; Steward et al., 1990; Law et al., 1994; Leonard and Hellou, 2001; Luthe et al., 2002), and extensively excreted into the gall bladder (Lee et al., 1972; Statham et al., 1976; Varanasi et al., 1989; Steward et al., 1990; Varanasi and Stein, 1991). The following compounds were chosen because they are potential metabolites of priority PAHs listed by the US-EPA (United-States

Environmental Protection Agency) for their interest in environmental surveys (Keith and Telliard, 1979) : 1- and 2-hydroxynaphthalene (1- and 2-OHN), 9-hydroxyfluorene (9-OHFe), 1-, 2-, 3-, 4- and 9-hydroxyphenanthrene (1-, 2-, 3-, 4- and 9-OHPhe), 1-hydroxypyrene (1-OHP), 1-hydroxychrysene (1-OHC) and 3-hydroxybenzo(a)pyrene (3-OHBaP). 2-hydroxybiphenyl (2-OHBi) was added to this study due to the abundance of biphenyl in the environment.

The Seine Estuary, 170 km long, is at the interface between important basin slopes and the Seine Bay. Its physical characteristics have profoundly been modified during the last 150 years by human activities. 40% of the French economic activity is located on the basin slope of Seine, which represents also 50% of the French fluvial transport. The Seine Estuary is under the influence of important harbors such as Le Havre and Rouen, and industrial site activities such as petroleum plants. Upstream, Paris can not be overlooked as an actor of the Seine River contamination. The River is 776 km long with an average water flow of 410 m³/s at the Poses dam (located at the limit between the River and the Estuary) and an average particular matter flow of 650000 tones per year that brings contaminants in the Estuary (Seine-Aval Booklet 1). The Estuary is known to be highly polluted (Galgani et al., 1991; Jaouen et al., 1999; Abarnou et al., 2000). PAHs have been shown to be some of the major organic contaminants of this Estuary (Claisse, 1989; Tronczynski et al., 1999). The physical modifications of the Estuary combined with the action of contaminants are suspected to be responsible for the degradation of this environment. The Estuary is a site of reproduction and growth for numbers of fish species. However, the Seine-Aval (Seine-Downstream) program highlighted a decrease in fish populations of the Estuary (Seine-Aval Booklet 7). Thus, the assessment of PAH bioavailability towards fish is of particular interest. The aim of the Seine-Aval program, which this study is a part of, is to improve the knowledge of the Seine Estuary evolution.

Hydroxylated PAHs were quantified in the bile of a widespread fish specie, the European flounder, *Platichthys flesus*, to evaluate the bioavailability of PAHs towards fish in the Seine Estuary. Flounders from the mouth of the Estuary (location named “La Fosse”) but also from three sites out of the Estuary were sampled for metabolite level comparison (Fig. 1). Lesconil, placed at the entrance of the Ster River (small River in South Brittany), has been chosen as a control site. The Antifer site as been chosen for its interest as located in the Seine Bay carrying important petroleum activities and the Gironde Estuary for comparison with another important French River, but known to be moderately contaminated by PAHs (Budzinski et al., 1997). PAH concentrations have also been determined in the liver of fish.

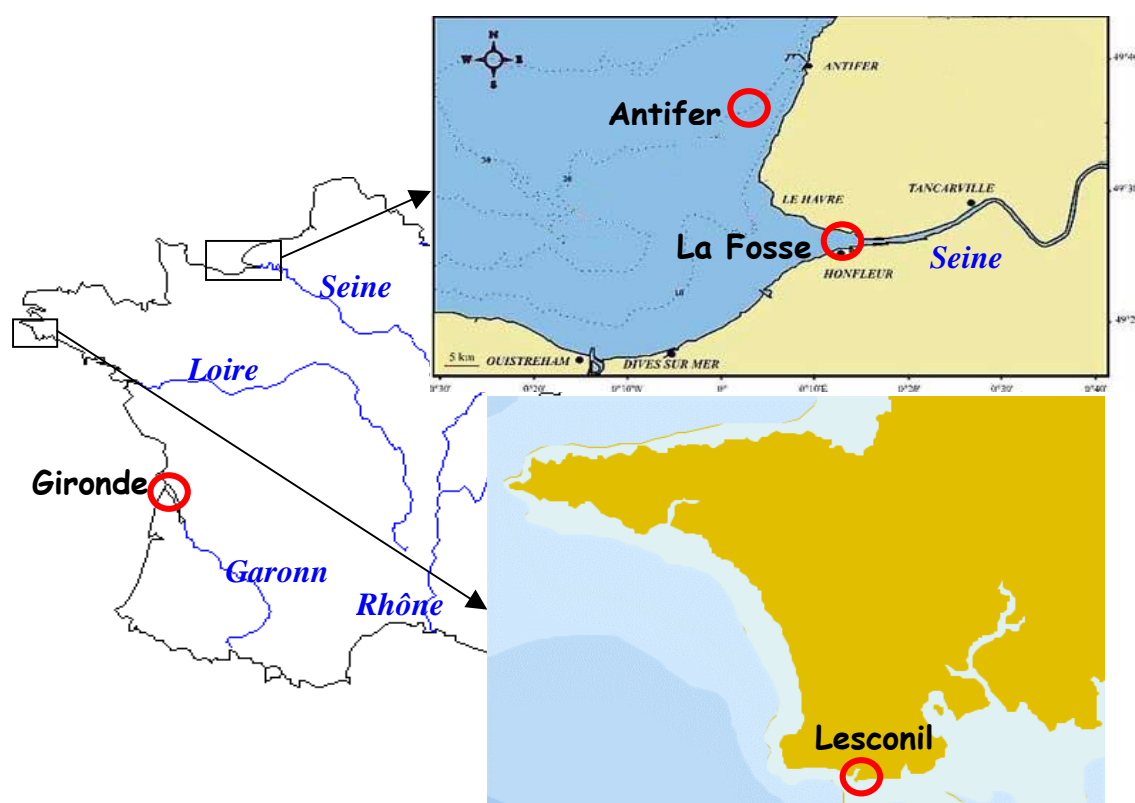


Figure 1 : Location of the different sampling sites.

MATERIALS AND METHODS

Field collection

European flounders (*Platichthys flesus*) were collected in April, June, September 2002 and February 2003 for the site called La Fosse (FOS), in May 2002 and at the end of January

2003 for Lesconil (LES), in November 2002 for Antifer (ANT) and at the end of January 2003 for the Gironde Estuary (GIR). Length of fish was measured before dissection. Gall bladders and livers were sampled and stored at -80°C for gall bladders and -20°C for livers. Morphological data of the fish collected and an overview of the samples analyzed are presented in Table 1. Due to the heterogeneity of fish length concerning the last sampling period of La Fosse and as a consequence of the differences of metabolite levels related with age observed in another study concerning soles (Mazéas et al., submitted (a)), gall bladders were separated in two classes function of length.

Table 1 : Sampling framework and morphological data. ^a younger flounders, ^b older flounders.

Location	Date	Number of fish	Length (cm)
La Fosse (FOS)	5/04/2002	10	30 ± 2
	18/06/2002	10	21 ± 3
	17-18/09/2002	4	29 ± 7
	17-18/02/2003	10 ^a	25 ± 3 ^a
		10 ^b	34 ± 3 ^b
Lesconil (LES)	05/2002	10	21 ± 3
	31/01/2003	10	35 ± 3
Antifer (ANT)	16/11/2002	10	32 ± 2
Gironde (GIR)	31/01/2003	10	25 ± 2

Chemicals, solvents and reagents

1- and 2-hydroxynaphthalene were purchased from Lancaster (Strasbourg, France), 2-hydroxybiphenyl, 9-hydroxyfluorene and 1-hydroxypyrene from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Falavier, France), 1-, 2-, 3-, 4-, 9-hydroxyphenanthrene, 1-hydroxychrysene and 3-hydroxybenzo(a)pyrene from Promochem (Molsheim, France). 1-hydroxypyrene-d9 and phenanthrene-d10 were obtained from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA). The standard reference material SRM 2260, constituted of about 20 aromatic

compounds, was provided by the U.S. National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, MD, USA) and perdeuterated aromatic compounds by MSD Isotopes (Montreal, Canada).

2-mercaptoethanol, sodium acetate trihydrate 99% and bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) were purchased from Acros organics (Noisy-Le-Grand, France). β -glucuronidase/aryl sulfatase mixture, 100000 et 7500 u/ml respectively, and Supelclean LC-NH₂ cartridges were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Falavier, France) and water (sterilized water for injection) from laboratory Aguettant (Lyon, France). Bakerbond C₁₈ cartridges and Ultra Resi-Analysed methylene chloride (Mallinckrodt Baker) were obtained from Atlantic Labo (Eysines, France). Methanol Suprasolv, acetic acid (100% Normapur), aluminium oxide (150 basic type T; 0.063-0.2 mm) and silica gel 60 (0.063-0.2 mm) were provided by VWR (Strasbourg, France).

Determination of metabolites in bile samples

The protocol used for the determination of biliary metabolite concentrations is described by Mazéas and Budzinski (submitted). In a first step, individual bile samples are pooled in order to obtain sufficient volumes of sample (around 100 μ l). When possible, replicates are performed.

1-hydroxypyrene deuterated, used as internal standard, and β -mercaptoethanol, used as antioxidant, are added to 100 μ l of bile then treated by β -glucuronidase and aryl-sulfatase for deconjugation (20 h, 37°C) in 2 ml of acetate buffer (adjusted to pH 5). Free metabolites are then extracted by solid-phase extraction (SPE) on C₁₈ cartridges and purified on LC-NH₂ cartridges. Extracts are evaporated to dryness under a nitrogen stream and reconstructed in methylene chloride. After derivatization with BSTFA (30 min, 65°C), phenanthrene perdeuterated is added to the samples to check for 1-hydroxypyrene-d₉ recovery and analyses are performed by GC/MS, using an HP GC 6890A gas chromatograph Agilent

Technologies coupled to an HP MSD 5973 Network mass selective detector Agilent Technologies both purchased from BIOS Analytique (l'Union, France), in selected ion monitoring (SIM) mode (automated PTV pulsed splitless injection (25 psi, 1.5 min); purge delay: 1.5 min and purge flow: 60 ml/min; injector temperature: 250°C; interface temperature: 280°C; oven temperature: from 70°C (2 min) to 180°C (1 min) at 5°C/min and from 180°C to 290°C (1 min) at 10°C/min; electron impact: 70 eV; voltage: 2000 V; source temperature: 150°C; 1.53 scan/s; dwell time: 50 ms). The capillary column was an HP5/MS Agilent Technologies (30 m x 0.25 mm ID x 0.25 film thickness) provided by BIOS Analytique (l'Union, France) and the carrier gas was helium 6.0 obtained from Linde (Toulouse, France).

The compounds were quantified in SIM mode using the ions below : 1-hydroxynaphthalene ($m/z=201$), 2-hydroxynaphthalene ($m/z=216$), 2-hydroxybiphenyl ($m/z=211$), 9-hydroxyfluorene ($m/z=165$), 9-hydroxyphenanthrene ($m/z=266$), 1-hydroxypyrene ($m/z=290$), 1-hydroxychrysene ($m/z=316$) and 3-hydroxybenzo(a)pyrene ($m/z=340$).

A mixture constituted of standard metabolites and 1-hydroxypyrene-d9 is injected at the beginning and at the end of each GC/MS sequence for response factor determination and a manipulation blank is performed together with samples to control potential contamination.

Biliary protein concentrations are determined by the method of Lowry et al. (1951) in order to take into account potential differences of bile dilution.

Determination of PAH concentration in biological samples

After sampling livers, individual samples are pooled and kept to -20°C until freeze-drying. Samples are then grounded before analysis. The analytical method used for analyzing PAHs in biological tissues is adapted from Thompson et al. (2002). PAHs are extracted using microwave assisted extraction with a Maxidigest 350 apparatus (Prolabo, France) in presence

of methylene chloride and after the addition of perdeuterated PAHs as internal standards (Budzinski et al, 1999). Extracts are filtered and reduced to 500 µl using a rotary evaporator and then under a nitrogen stream. Samples are then purified on aluminium oxide and silica gel according to a procedure adapted from Behar et al., 1989 (Baumard et al., 1997; Mazéas and Budzinski, 2002). The glassware is washed with detergents and heated 6 h at 450°C before use. Manipulation blanks are performed to control potential contamination.

Extracts were analysed by an HP GC 6890A gas chromatograph Agilent Technologies (automated PTV pulsed splitless injection (25 psi, 1 min); purge delay: 1 min and purge flow: 60.6 ml/min; injector temperature: 270°C; interface temperature: 280°C; oven temperature: from 70°C (2 min) to 300°C (5 min) at 2°C/min) coupled to an HP MSD 5973 mass spectrometer (electron impact: 70 eV; voltage: 2000 V; source temperature: 150°C) both purchased from BIOS Analytique (l'Union, France). Analyses were performed in the SIM (selected ion monitoring) mode at 1.3 scan/s (Dwell time: 50 ms for each ion) using the molecular ions of the studied compounds. The capillary column was an HP5/MS Agilent Technologies (30 m x 0.25 mm ID x 0.25 film thickness) provided by BIOS Analytique (l'Union, France) and the carrier gas was helium 6.0 obtained from Linde (Toulouse, France).

Different perdeuterated polycyclic aromatic hydrocarbons were used as internal standards for each class of aromaticity (Baumard and Budzinski, 1997). The response factors of PAHs relatively to perdeuterated PAHs were determined for each GC/MS sequence by injecting a mixture containing a solution of PAHs (SRM 2260, National Institute of Science and Technology, Gaithersburg, MD, USA) and the solution of perdeuterated PAHs used for spiking samples.

RESULTS AND DISCUSSION

Metabolite concentrations

1-hydroxychrysene and 3-hydroxybenzo(a)pyrene are not detected in any of the bile samples. In addition, 1-hydroxypyrene is shown to be the major metabolite in all the samples, representing 55 to 100% of the metabolites. Individual concentrations are presented in Table 2. The distinction made in function of fish length allows to observe a difference of metabolite concentration. Thus, younger fish (25 cm) exhibit a largely higher level of total metabolites ($878 \pm 26 \text{ ng g}^{-1}$, $n=2$) than older ones ($234 \pm 15 \text{ ng g}^{-1}$, $n=2$). This observation confirms several results obtained on soles which show that older individuals present lower levels of metabolites than young ones in their bile (Mazéas et al., submitted (a)). In this last study, total metabolite concentrations could vary from a factor 1 to 10 in favor of younger soles compared to soles born the year before. Moreover, in the present study, no significant variations in bile protein concentrations are measured (average of $21 \pm 1 \text{ mg ml}^{-1}$), showing that the observed differences in metabolite concentration can not be explained by any difference of bile dilution in function of age. Thus, the age of fish must be taken into account when comparing biliary metabolite levels in environmental monitoring studies.

Table 2 : PAH metabolite concentrations in the bile (ng g^{-1}).

	GIR 01/2003 (n=1)	LES 05/2002 (n=2)	LES 01/2003 (n=2)	ANT 11/2002 (n=3)	FOS 05/2002 (n=1)	FOS 06/2002 (n=2)	FOS 09/2002 (n=3)	FOS 02/2003 1 (n=2)	FOS 02/2003 2 (n=2)
1-OHN	<0,7	8±2	7±2	11±1	53	51±4	28±4	4±1	<0,7
2-OHN	<0,1	5±1	5±1	94±10	48	60±3	214±16	6±2	<0,1
2-OHBi	<1,4	6±1	<1,4	29±5	43	41±3	74±10	7±2	5±1
9-OHFe	<3,6	22±5	61±11	54±5	156	56±3	169±24	114±14	13±1
3-OHPhe	<0,3	<0,3	<0,3	20±2	21	<0,3	48±4	36±0	11±3
1-OHPhe	<0,1	<0,1	<0,1	8±1	13	<0,1	35±4	24±2	8±4
2-OHPhe	<0,4	<0,4	<0,4	29±3	28	<0,4	82±6	57±1	15±1
1-OHP	48	51±1	144±12	299±16	758	533±20	2782±84	630±3	183±0
sum	48	91±8	217±24	545±33	1121	740±30	3432±149	878±21	234±7

The obtained results (Fig. 2) confirm the low exposure of flounders to PAHs in the Gironde Estuary which exhibit the lowest level of PAH metabolites (48 ng g^{-1}) in spite of their relative youth (25 cm). Nevertheless, concerning the control site, Lesconil, fish from January 2003 seem to be relatively contaminated ($217 \pm 24 \text{ ng g}^{-1}$, $n=2$; 35 cm) when compared to the level observed in May 2002 ($91 \pm 12 \text{ ng g}^{-1}$, $n=2$; 21 cm) and this despite the higher size of fish from January. Moreover, a higher level of PAH metabolites is measured in the bile of flounders from Antifer ($545 \pm 33 \text{ ng g}^{-1}$, $n=3$; 32 cm) indicating a higher contamination of this site. Concerning La Fosse, metabolite concentrations are globally greater than in Antifer. However, important variations are noticed in La Fosse (Table 2), which can not only be attributed to age differences. The level of metabolites measured in the bile of flounders caught in June 2002 is thus lower than in April or September 2002 in spite of the youth of those first fish (21 cm versus 30 and 29 cm). These temporal variations suggest that the Seine mouth is not constantly contaminated by PAHs all along the year or that PAH bioavailability and/or biotransformation is greatly variable in time. The concentration of 1-hydroxypyrene, the only metabolite present in all the samples, can be compared to the levels obtained for another bottom fish specie, the sole *Solea solea*. The lowest concentration measured in this study (48 ng g^{-1} in Gironde) is similar to the mean level proposed for soles from the French Atlantic coast out of particular contamination events ($50 \pm 30 \text{ ng g}^{-1}$; Mazéas et al., submitted (a)). Conversely, the 1-hydroxypyrene concentrations observed in Antifer and La Fosse, except for the value measured in September 2002, are in the range of the ones obtained for soles exposed to the Erika oil spill.

No clear distinction can be made between sites when looking at relative abundances. However, the contribution of the sum of phenanthrene metabolites is low in all the samples (0-15%) suggesting the main contribution of pyrolytic PAH contamination (Mazéas et al., submitted (a) and (b)). The 4- and 9-hydroxyphenanthrenes are never detected in the

samples. Hydroxynaphthalenes represent from 0% to 19% of all the metabolites, 2-hydroxybiphenyl from 0% to 6% and 9-hydroxyfluorene from 0 to 28%.

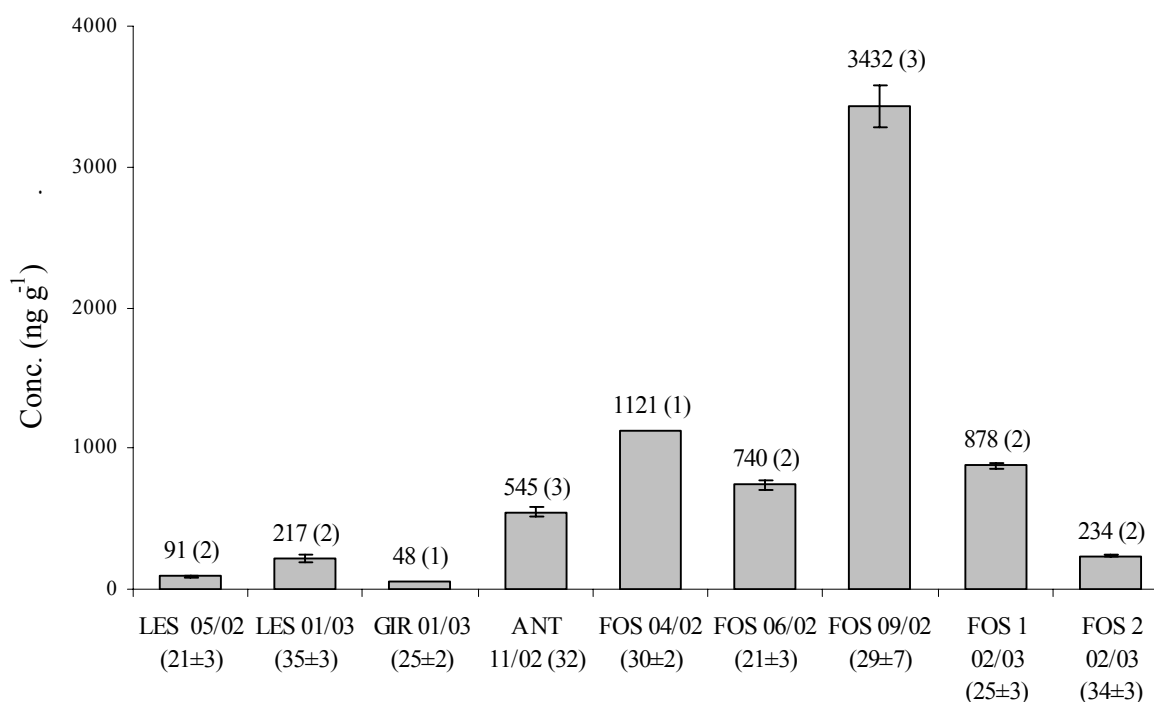


Figure 2 : Sum of concentrations of biliary metabolites expressed in ng g⁻¹ of bile. Figures between brackets next to the concentration values indicate the number of performed analyses. Figures between brackets next to the site name indicate the average length of fish in cm.

Bioaccumulated PAHs

Considering the sum of the PAHs quantified in the liver (phenanthrene (Phe), anthracene (A), fluoranthene (F), pyrene (P), benz(a)anthracene (BaA), chrysene+triphenylene (C+T), benzo(b)fluoranthene+benzo(b)fluoranthene+benzo(k)fluoranthene (BF), benzo(a)pyrene (BaP), dibenz(a,c)anthracene+dibenz(a,h)anthracene (DBA), benzo(g,h,i)perylene (BPer) and indeno(1,2,3-cd)pyrene (IP)), Lesconil is confirmed as the control site (Fig. 3). Furthermore, no significant variation is observed in this site between May 2002 and January 2003 in opposition to metabolite levels, suggesting that the observed increase of metabolite concentrations is due to a recent contamination or that the exposure level is too low to allow

any bioaccumulation of the absorbed PAHs. Besides, the PAH level measured in the liver of flounders caught in the Gironde mouth is as low as the ones measured in Lesconil, confirming the low level of metabolites previously observed. On the other hand, flounders from Antifer and La Fosse show much higher levels of bioaccumulated PAHs in the liver, especially for La Fosse. At this site, temporal variations are also observed but differences are much less important than the ones observed for metabolites and not really significant. Those results underline the interest of PAH metabolite monitoring in fish, which is much more discriminating than the measure of PAH bioaccumulation due to the importance of biotransformation processes in vertebrates (Varanasi et al., 1989; Buhler and Williams, 1989; Altenburger et al., 2003). In the same way as for 1-hydroxypyrene concentrations, PAH concentrations in the liver of flounders from Gironde and La Fosse are in the same range as the ones measured in soles caught along the French Atlantic coast respectively out of and during the Erika oil spill event (Mazéas et al., submitted (a)).

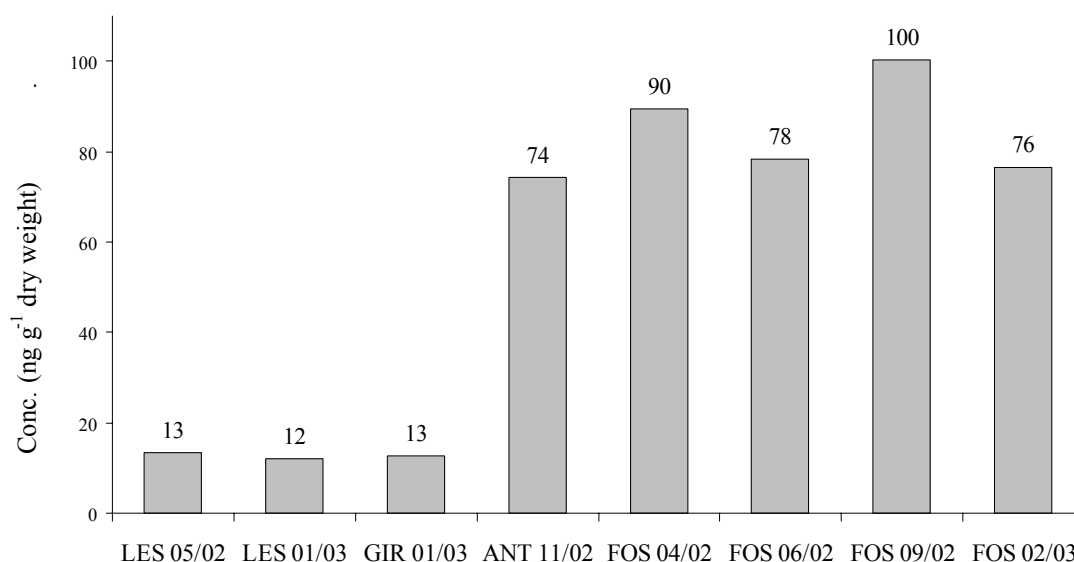


Figure 3 : Sum of 15 PAHs in the liver of flounders expressed in ng g⁻¹ of dry weight.

Relative abundances of PAHs can indicate differences between sites although the importance of biotransformation processes makes their interpretation delicate. An example of relative abundance profile representative of each site is presented in Figure 4. This profile is

globally temporally invariant. The principal information given is the unexpected marked pyrolytic fingerprint in Antifer whereas La Fosse is characterized by a pyrolytic + petrogenic mixed profile (more important contribution of alkylated compounds). Tronczynski et al. (1999) have also put in evidence the petrogenic character of the Seine Estuary by means of dissolved PAHs. Distributions in the liver of fish from Lesconil and Gironde present fingerprints characteristic of a dual contamination, both pyrolytic and petrogenic.

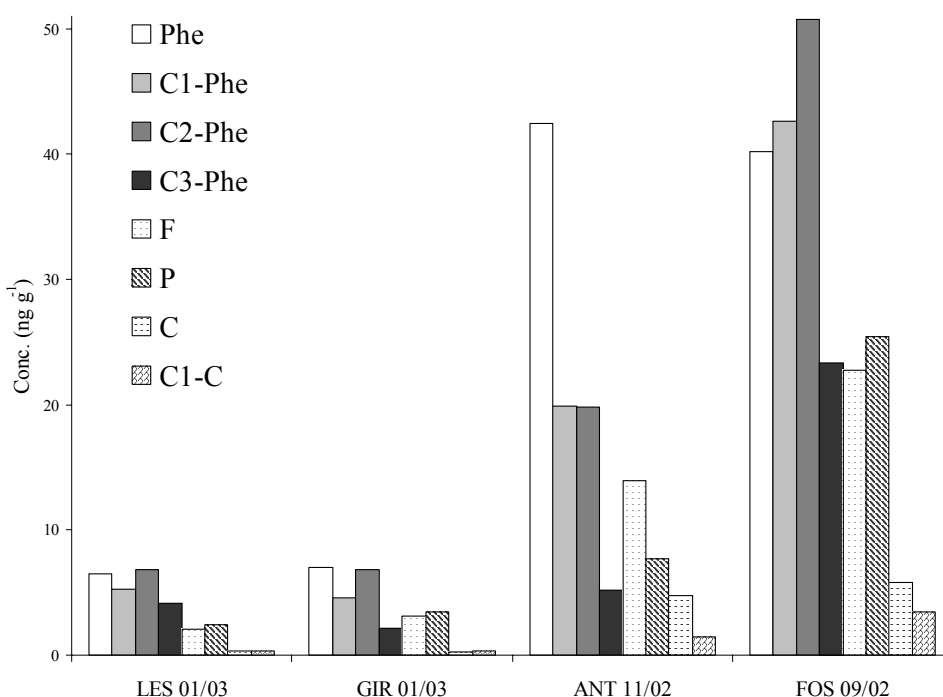


Figure 4 : Concentration of PAHs and alkyl-PAHs in the liver of flounders expressed in ng g^{-1} of dry weight.

CONCLUSION

Flounders from the Seine Estuary mouth were shown to be the most impacted fish considering both biliary metabolite concentrations and PAH bioaccumulation in the liver. However, metabolite concentrations appeared to be highly variable temporally, suggesting a variable contamination of this site or of the bioavailability of PAHs and/or of biotransformation processes. In addition, Flounders from Antifer also exhibited high metabolite levels. Conversely, metabolite concentrations were low in Gironde and Lesconil.

These trends were confirmed by levels of PAHs accumulated in the liver, though differences were less significant due to important biotransformation processes in vertebrates. Levels of 1-hydroxypyrene concentrations measured in the bile of flounders were in the same range as the ones measured in soles from the French Atlantic coast. Levels measured in the bile of flounders caught from the Seine Estuary and Antifer were similar to the ones measured during the Erika oil spill and levels measured in Lesconil and Gironde were similar to the ones measured after the Erika oil spill. Furthermore, this study highlighted the difference of PAH metabolite levels in the bile depending on the age. Thus, younger fish seem to exhibit significantly higher metabolite concentrations than older ones.

Aknowledgements – The authors wish to thank the Seine-Aval program and the région Aquitaine for their financial support.

References

- Abarnou A, Loizeau V, Cugier P, Le Guellec A-M et Ménesguen A, 2000. Modélisation de la bioaccumulation : l'exemple des PCB dans le réseau trophique du bar en estuaire de Seine. Les cahiers du Club CRIN. Modélisation en écologie, Actes Colloque PNETOX, 41-60, Paris, mars 1999.
- Akcha F, Burgeot T, Narbonne JF and Garrigues P, 2003. Metabolic activation of PAHs: role of DNA adduct formation in induced carcinogenesis. In *PAHs: an ecotoxicological perspective* (Douben PET, ed), 65-80. Wiley, England.
- Altenburger R, Segner H and van der Oost R, 2003. In *PAHs: an ecotoxicological perspective* (Douben PET, ed), 297-328. Wiley, England.

- Ariese F, Kok SJ, Verkaik M, Gooijer C, Velthorst NH and Hofstraat JW, 1993. Synchronous fluorescence spectrometry of fish bile: A rapid screening method for the biomonitoring of PAH exposure. *Aquat. Toxicol.*, 26 : 273-286.
- Baumard P and Budzinski H, 1997. Internal standard quantification method and Gas Chromatographe-Mass Spectrometer (GC-MS): a reliable tool for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) quantification in natural matrices. *Analusis*, 25 : 246-252.
- Baumard P, Budzinski H and Garrigues P, 1997. Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues by gas chromatography coupled to mass spectrometry : application to mussels. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 359(6) : 502-509.
- Behar F, Leblond C, Saint Paul C, 1989. Analyse quantitative des effluents de pyrolyse en milieu ouvert et fermé. *Rev. Inst. Français du pétrole*, 44 : 387-509.
- Beyer J, Sandvik M, Hylland K, Fjeld E, Egaas E, Aas E, Skåre JU and Goksøyr A, 1996. Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed by caging to polluted sediments in Sør fjorden, Norway. *Aquat. Toxicol.*, 36 : 75-98.
- Budzinski H, Jones I, , Bellocq J, Pierard C and Garrigues P, 1997. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Mar. Chem.*, 58 : 85-97.
- Budzinski H, Letellier M, Garrigues P and Le Menach K, 1999. Optimization of the microwave-assisted extraction in open cell of polycyclic aromatic hydrocarbons from soils and sediments : Study of moisture effect. *J. Chrom.*, 837(1-2) : 187-200.
- Buhler DR and Williams DE, 1989. Enzymes involved in metabolism of PAH by fishes and other aquatic animal: oxidative enzymes (or phase I enzymes). In *Metabolism of PAH in the aquatic environment* (Varanasi U, ed), 151-184. CRC, Boca Raton, FL, USA.
- Claisse D, 1989. Chemical contamination of French coasts. The results of a ten years mussel watch. *Mar. Pollut. Bull.*, 20(10) : 523-528.

- Foureman GL, 1989. Enzymes involved in metabolism of PAH by fishes and other aquatic animal: hydrolysis and conjugation enzymes (or phase II enzymes). In *Metabolism of PAH in the aquatic environment* (Varanasi U, ed), 185-202. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Galgani F, Bocquene G, Lucon M, Grzebyk D, Letrouit F and Claisse D, 1991. EROD measurements in fish from the Northwest part of France. *Mar. Pollut. Bull.*, 22(10) : 494-500.
- GESAMP (Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection), 1993. Impact of oil and related chemicals and wastes on the marine environment. GESAMP Report 50.
- Jaouen A, Abarnou A, Loizeau V, Le Guellec A-M, Le Boulanger F and Minier C, 1999. Non ortho and ortho PCBs and PAHs in food webs from the Seine estuary. 9th Annual meeting of SETAC-EUROPE, Leipzig, 25-29 mai. Oral communication and poster.
- Keith LH and Telliard WA, 1979. Priority pollutants. I. A perspective view. *Environ. Sci. Technol.*, 13 : 416-423.
- Krahn MM, Myers M, Burrows DG and Malins DC, 1984. Determination of metabolites of xenobiotics in bile of fish from polluted waterways. *Xenobiotica*, 14 : 633-646.
- Krahn MM, Rhodes LD, Myers MS, Moore LK, MacLeod WD and Malins DC, 1986. Associations between metabolites of aromatic compounds in bile and the occurrence of hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 15 : 61-67.
- Law FC, Meng JX, He YT and Chui YC, 1994. Urinary and biliary metabolites of pyrene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica*, 24(3) : 221-229.
- Lee RF, Sauerheber R and Dobbs GH, 1972. Uptake, metabolism, and discharge of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine fish. *Mar. Biol.*, 17 : 201-208.

- Leonard JD and Hellou J, 2001. Separation and characterization of gall bladder bile metabolites from speckled trout, *Salvelinus fontinalis*, exposed to individual polycyclic aromatic compounds. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20(3) : 618-623.
- Lin ELC, Cormier SM and Racine RN, 1994. Synchronous fluorometric measurement of metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in the bile of brown bullhead. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13 : 707-715.
- Lowry OH, Rosebrough, NJ, Farr AL and Randall RJ, 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275.
- Luthe G, Stroomberg GJ, Ariese F, Brinkman UAT and van Straalen NM, 2002. Metabolism of 1-fluoropyrene and pyrene in marine flatfish and terrestrial isopods. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 12 : 221-229.
- Mazéas O, Budzinski H, Desaunay Y and Tronczynski J, submitted (a). Evaluation of the exposure of bottom fish to the Erika oil spill : biotransformation and bioaccumulation monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons.
- Mazéas O, Budzinski H, Claireaux G, Désaunay Y and Tronczynski J, submitted (b). Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons from heavy fuel oil in the marine environment : study of biotransformation by fish in laboratory experiments.
- Mazéas L and Budzinski, 2002. Improved accuracy of GC-MS quantification of aliphatic and aromatic hydrocarbons in marine sediments and petroleums. Validation on reference matrices and application to the Erika oil spill. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 82(3) : 157-173.
- Mazéas O and Budzinski H, *submitted*. Solid phase extraction and purification for individual quantification of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in liquid matrixes. *Anal. Biol. Chem.*

- McElroy AE, Farrington JW and Teal JM, 1989. Bioavailability of PAH in the aquatic environment. In *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment* (Varanasi U, ed), 1-40. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Neff JM, 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment : sources, fates and biological effects. London, Applied Sciences Publishers.
- Seine-Aval Booklet 1. Seine Aval : un estuaire et ses problèmes. Fascicule n°1 du programme Seine-Aval (Coord. : L Guézennec).
- Seine-Aval Booklet 7. Patrimoine biologique et chaînes alimentaires. Fascicule n°7 du programme Seine-Aval (Coord. : J-C Dauvin).
- Statham CN, Melancon MJ and Lech JJ, 1976. Bioconcentration of xenobiotics in trout bile: a proposed monitoring aid for some waterborne chemicals. *Science*, 193 : 680-681.
- Steward AR, Kandaswami C, Chdambaram S, Ziper C, Rutkowski JP and Sikka HC, 1990. Disposition and metabolic fate of benzo[a]pyrene in the brown bullhead. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9 : 1503-1512.
- Thompson S, Budzinski H, Le Menach K, Letellier M and Garrigues P, 2002. Multiresidue analysis of PAHs, PCBs and organochlorine pesticides in marine sediments. *Anal. Bioanal. Chem.*, 372 : 196-204.
- Tronczynski J, Munsch C et Moisan C, 1999. « Des contaminants organiques qui laissent des traces : sources, transport, devenir ». Fascicule Seine-Aval n°12.
- van der Oost R, Beyer J and Vermeulen NPE, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 13 : 57-149.
- Varanasi U, Stein JE and Nishimoto M, 1989. Biotransformation and disposition of PAH in fish. In (Varanasi U, ed) *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*, 93-149. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Varanasi U and Stein JE, 1991. Disposition of xenobiotic chemicals and metabolites in marine organisms. *Environ. Health Perspect.*, 90 : 93-100.

Résumé :

Afin d'étudier la santé d'un écosystème marin et le potentiel toxique d'une contamination telle que celle liée à la présence d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), il est nécessaire, outre de connaître les niveaux de contamination du milieu, de pouvoir accéder à la fraction à laquelle les organismes aquatiques ont été exposés et de connaître les effets toxiques des contaminants incriminés (effets toxiques qui peuvent être reliés aux phénomènes de biotransformation des contaminants). L'exposition et la contamination des organismes aquatiques aux HAP ont généralement été évaluées par le dosage des HAP bioaccumulés dans les tissus. Or, cette approche est critiquable si l'on tient compte des capacités de biotransformation des organismes, notamment des vertébrés, et des propriétés toxiques des produits de transformation formés. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse est d'évaluer le potentiel des métabolites de HAP dans le but d'étudier l'exposition et la contamination des organismes aux HAP dans l'environnement marin.

Une méthode de dosage des métabolites de HAP dans les matrices biologiques a tout d'abord été mise au point. Ensuite, cet outil analytique a été appliqué lors d'expositions de poissons à des HAP individuels et à différents produits pétroliers en milieu contrôlé qui ont permis de mieux appréhender les phénomènes de biotransformation des HAP. Enfin, des études de terrain ont été réalisées, notamment dans le cadre du suivi de la marée noire Erika et de l'étude de la contamination de la baie de Seine, montrant l'applicabilité du dosage des métabolites de HAP afin d'évaluer l'exposition et la contamination des organismes aux HAP en milieu naturel dans des contextes de pollution de nature différente.

Mots-clés : HAP, milieu marin, contamination, biotransformation, métabolites, chimie analytique, GC/MS.

Abstract :

In order to study the health of a marine ecosystem and the toxic potential of a contamination such as the one related to the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), it is necessary, in addition to the determination of environmental contamination levels, to have access to the fraction aquatic organisms have been exposed to and to identify the toxic effects of the contaminants (toxic effects which can be related to biotransformation phenomena of contaminants). The exposure and contamination of aquatic organisms to PAHs have generally been evaluated by the quantification of bioaccumulated PAHs in tissues. However, this approach is open to criticism when taking into account the biotransformation capabilities of organisms such as vertebrates and the toxic properties of biotransformation products. In this way, the aim of this study is to evaluate the potential of PAH metabolites in order to study the exposure and contamination of organisms to PAHs in the marine environment.

An analytical technique to quantify PAH metabolites in biological matrices has first been set up. Then, this analytical tool has been applied to the study of fish exposures to individual PAHs and to different petroleum products in controlled conditions which has allowed to get a better understanding of PAH biotransformation phenomena. Finally, field studies have been led, notably to study the Erika oil spill and the contamination of the Seine bay, demonstrating the applicability of the quantification of PAH metabolites to evaluate the exposure and the contamination of organisms to PAHs in natural environment and for pollution events of different nature.

Keywords : PAHs, marine environment, contamination, biotransformation, metabolites, analytical chemistry, GC/MS.