HAL
open science

Toxicocinétique et effets métaboliques du benzo[a]pyrène seul ou en mélange avec le benzo[b]fluoranthène chez la grenouille verte

Sylvie Veyrenc

To cite this version:

Sylvie Veyrenc. Toxicocinétique et effets métaboliques du benzo[a]pyrène seul ou en mélange avec le benzo[b]fluoranthène chez la grenouille verte. Ecotoxicologie. 2018. hal-01690091

HAL Id: hal-01690091

https://ephe.hal.science/hal-01690091v1

Submitted on 22 Jan 2018

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

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

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE
Présenté par
Sylvie VEYRENC

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Toxicocinétique et effets métaboliques du benzo[a]pyrène seul ou en mélange avec le benzo[b]fluoranthène chez la grenouille verte

Soutenu le 10 janvier 2018 devant le jury suivant :

M. Claude MIAUD – **Président**
M. Stéphane REYNAUD – **Tuteur scientifique**
Mme Véronique FRACHET – **Tuteur pédagogique**
M. Alain DEVAUX – **Rapporteur**
Mme Anne-laure BULTEAU – **Examinateur**

Mémoire préparé sous la direction de :
M. Stéphane REYNAUD
Intitulé de la structure d'accueil : Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA)
Directeur : *M. François POMPANON*
et de
Mme Véronique FRACHET
Intitulé de la structure d'accueil EPHE : Institute for Advanced Biosciences (IAB), Grenoble
Directeur : *M. HAINAUT pierre*
EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)
Groupe de Recherche et d'Enseignement Thématiques de l'EPHE : *Génomes, Cancers et Thérapies.*

« La science a-t-elle promis le bonheur ? Je ne le crois pas. Elle a promis la vérité, et la question est de savoir si l'on fera du bonheur avec de la vérité. »

Emile Zola (1840-1902)

Table des matières

I. Introduction générale 1
1. Les Amphibiens 1
2. Les anoures (Fisher Von Waldheim 1843) : caractéristiques communes 2
3. Les « grenouilles vertes » du genre Pelophylax (Fitzingzer, 1843) 2
A. Les caractéristiques générales communes des grenouilles vertes 2
B. Cycle de vie des grenouilles vertes 3
C. Régime alimentaire 3
1. Larves 3
2. Adultes 3
D. Les grenouilles du genre Pelophylax du paléarctique occidental 4
1. Les différentes espèces parentes 4
a) Leur phylogénie simplifiée 5
b) Leur répartition géographique 7
2. Les complexes de grenouilles vertes 8
a) L'hybridation : définition 8
b) L' hybridogenèse et les hybrides 8
c) La répartition des espèces hybrides et les espèces parentes associées 9
d) Le complexe Pelophylax esculentus 9
(1) Le système L-E 10
(2) Le système R-E (Europe de l'Est) 10
(3) Le système E pur ou E-E (Graf & Polls Pelaz, 1989) 11
E. Identification des différentes espèces 13
1. Clés de Détermination 13
2. Les chants vocaux 14
3. Habitats 14
4. Les Marqueurs Moléculaires 15
a) Marqueurs protéiques : allozymes 15
b) Marqueurs ADN 16
(1) Mitochondrial 16
(2) Nucléaire 17
(a) Marqueurs Microsatellites ou STR (Short tandem Repeats) 17
(b) Espaceur interne transcrit 2 de l'ADN ribosomique : ITS2 18
(c) Intron 1 du gène de l'albumine sérique (SAI-1) 19
4. Déclin des amphibiens et pollution 20
A. La sixième extinction massive 20
1. A l'échelle du vivant 20
2. A l'échelle des amphibiens 21

B. Les Polluants Organiques Persistants (POP) 22
1. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) 23
a) Caractéristiques générales 23
b) Origine des HAP 24
(1) Les Pétrogéniques 24
(2) Les Pyrogéniques ou pyrolytiques : 24
(3) Les Biogéniques 24
c) Emission des HAP 24
(1) Du point de vue mondial 24
(2) Du point de vue Français 25
d) Transfert des HAP dans les zones humides 26
2. Biotransformation des HAP 26
a) Enzymes de phase I : fonctionnalisation 27
(1) Les cytochromes P450 27
(a) Caractéristiques générales 27
(b) Nomenclature 27
(2) P450/NADPH-cytochrome P450 réductase 28
(3) Les Epoxyde Hydrolases (Microsomale EC 3.3.2.9 ; soluble EC 3.3.2.10) 29
b) Enzymes de phase II : conjugaison 29
(1) Les Sulfotransférases (SULT : EC 2.8.2) 29
(2) L'UDP-glucoronyltransférase (UGT : Ec2.4.1.17) 30
(3) Les Glutathion-S-transférases (GST : EC 2.5.1.18) 30
(4) Induction Enzymatique via le récepteur AhR 31
c) Enzymes de phase III : élimination 32
3. Biotransformation du BaP 32
4. HAP de l'étude : Benzo[a]pyrène et Benzo[b]fluoranthène 33
a) Caractéristiques générales 33
b) BaP et BbF dans l'environnement 34
c) Ecotoxicité sur les amphibiens 35
C. Métabolisme et homéostasie glucidique 39
1. Généralités 39
2. Les voies de production d'énergie sous forme d'ATP via le glucose 40
a) La glycolyse : voie de d'Emben-Meyeroff-Parnas 40
b) Le cycle de Krebs ou cycle de l'acide citrique 40
c) La néoglucogenèse 41
(1) La PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase PEPCK 43
(2) PPARGC1a ou PGC-1α un régulateur clé du métabolisme énergétique 43
(a) Généralités 43

(b) PGC-1α et métabolisme glucidique 44
(3) PEPCK, PGC-1α et amphibiens....44
D. Objectifs....45
II. Matériel et méthodes....47
1. Les grenouilles vertes....47
A. Les grenouilles sauvages 47
B. Les Grenouilles d'élevage RIVAN 92 48
2. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques 49
A. Le benzo[a]pyrène BaP 49
B. Le benzo[a]pyrene marqué au carbone 14....49
C. Le Benzo[b]fluoranthène BbF....49
3. Facteurs de BioConcentration (BCF) 50
A. Expositions....50
B. Extraction du BaP et des métabolites lipophiles 50
1. La solution d'exposition et évaluation du pourcentage de BaP....50
a) Extraction 50
b) Chromatographie sur couche mince (CCM) 51
2. Le sang....51
3. Les organes....51
C. Mesure du BaP et ses métabolites radiomarqués au ^{14}C....52
4. Mesure de l'induction des Cytochromes P450 (activité EROD)....52
A. Expositions des grenouilles....52
B. Préparation des échantillons 52
C. Extraction des microsomes de foie....52
D. Dosage protéique des microsomes 53
E. Activité EROD (7-EthoxyRésorufine-O-Dééthylase)....53
5. Métabolisme du Glucose ou homéostasie du glucose....54
A. Expositions des grenouilles....54
B. Test de Tolérance intra péritonéal au Glucose : ipGTT 54
C. Test de tolérance intra péritonéal au Pyruvate : ipPTT....55
D. Test de Tolérance à l'Insuline : ITT 55
E. Extraction et quantification par RT-qPCR des transcrits hépatiques 56
1. Extraction ARN 56
2. Qualification et quantification des ARN....56
3. Synthèse de l'ADN complémentaire....56
a) Digestion ADN génomique....56
b) Rétrotranscription de l'ARN 56
c) Digestion des ARN 57
4. PCR quantitative ou en temps réel (qPCR) sur les cDNA....57
a) Gène de ménage 57

b) Design d'amorces PEPCK pour la PCR quantitative 58
(1) Détermination des amorces du gène PEPCK 58
(2) PCR PEPCK1 sur grenouilles vertes 59
(3) Séquençage amplicons PEPCK1 60
(4) Alignement des séquences PEPCK1 60
(5) PCR PEPCK-rana sur grenouilles vertes 61
(6) Alignements des séquences PEPCK-rana 62
c) PPARGC1a ou PGC-1α 62
d) Conditions techniques de la qPCR 63
6. Génotypage 63
A. Extraction ADN (Kit QIAGEN: DNeasy® Blood & Tissue) 63
B. Qualification et quantification de l'ADN 63
C. Détermination des espèces de Grenouilles vertes du complexe esculentus 64
1. Amplification de l'intron-1 du gène de l'albumine sérique par PCR 64
2. Séquençage des produits PCR 65
3. Reconstruction de l'intron 1 du gène de l'albumine sérique SAI-1 65
4. Construction de l'arbre phylogénétique 65
D. Analyses statistiques 65
III. Résultats 66
1. Absorption du BaP 66
A. Cinétique d'absorption du BaP seul ou en mélange 66
1. Vérification de l'absorption du BaP 66
2. Vérification de la métabolisation 67
B. Facteurs de bioconcentration 68
1. Dans le sérum 68
2. Organes impliqués dans la détoxication, l'excrétion, le stockage et la digestion 69
a) Organes impliqués dans la détoxication et la digestion : 69
b) Organes de stockage : les corps jaunes 73
3. Autres organes 74
2. Enzyme de détoxication : Mesure de l'activité EROD 76
3. Glycémie 77
A. Glycémie initiale à jeun 77
1. Grenouilles sauvages 77
2. Rivan92 77
3. Comparaison grenouilles sauvages et grenouilles Rivan92 en fonction de leur masse et de leur glycémie 78
B. Test de Tolérance intra péritonéal au Glucose : ipGTT 78
1. Grenouilles sauvages 78
2. Grenouilles Rivan92 80
C. Test de Tolérance intra péritonéal au Pyruvate (ipPTT) : grenouilles sauvages 82

D. L'insulino-résistance chez les grenouilles....84
1. Comparaison de l'insulino-résistance entre les grenouilles non exposées sauvages et Rivan92 84
2. Comparaison de l'insulino-résistance entre les grenouilles sauvages non exposées et exposées et les grenouilles non exposées Rivan92....85
E. Taux de transcription de PEPCK dans le foie....86
F. Taux de transcription du co-activateur PPARGC1a ou PGC-1α dans le foie....87
4. Génotypage....87
A. PCR de l'intron-1 du gène de l'albumine sérique SAI-1....87
B. Séquençage des produits PCR obtenus....89
IV. Discussion....92
1. Toxicocinétique....92
2. Métabolisme glucidique....95
V. Conclusion....100
VI. Références bibliographiques....102

Remerciements

Je tiens particulièrement à remercier Stéphane Reynaud, mon tuteur scientifique pour avoir adhéré sans hésitation à ce projet de diplôme EPHE et qui a su convaincre la direction du laboratoire. Je suis heureuse d'avoir pu confronter mes connaissances en physiologie avec toi et d'avoir été initiée à l'écotoxicologie. En effet, mes compétences scientifiques en 2008 étaient bien éloignées de l'écologie et, avoir une vision globale et intégrative n'a pas été toujours facile. Je te félicite pour ta patience tant sur la rédaction du manuscrit que sur nos échanges scientifiques, techniques mais aussi sur nos points de vue sur le fonctionnement du laboratoire, ô combien nombreux et divergents !
Bien au-delà du diplôme EPHE, je suis ravie d'avoir pu travailler avec toi et je n'ai aucun regret sur mon choix de travailler avec l'équipe P3E ou devrais-je dire PEX (nom en vigueur en 2008). À défaut de continuer à travailler ensemble (nouveau « challenge » 2018, je crois !), j'espère que nos échanges amicaux se poursuivront dans les années futures. Je suis toujours partante pour déguster un bon verre de vin et écouter tes blagues ou anecdotes improbables en Isère ou en Limousin !
Un grand merci pour ton soutien professionnel et personnel tout au long de ces années passées au Laboratoire d'ECologie Alpine.

Je remercie également Véronique Frachet pour avoir accepté de poursuivre le tutorat pédagogique de Xavier Ronot après son départ à la retraite. Merci également pour les lectures et les remarques constructives faites sur le manuscrit.

Je remercie vivement les membres de mon jury, Alain Devaux, pour avoir accepté de rapporter ce manuscrit de diplôme EPHE, ainsi qu'Anne-laure Bulteau pour avoir accepté de l'examiner et de l'évaluer. Merci également à Claude Miaud pour avoir accepté d'être président du jury.

Un énorme merci à Christophe Regnault, avec qui j'ai partagé ses années de master et de thèse. Nos longues discussions philosophiques et nos questionnements sur la vie ont été forts enrichissants. J'ai adoré nos échanges techniques et scientifiques sur la thématique amphibien. Les années passées à partager le bureau ont été 5 années intenses, drôles, inoubliables, vraies, amicales… et bien plus encore, enfin je ne sais pas tout !
Et également un grand merci pour la relecture finale du manuscrit en un temps record.

Merci à Sophie Sroda pour nos discussions, réflexions et réorganisations du plateau technique Biome, puis Memobio. Nous avons été et sommes sur la même longueur d'onde et nous avons pu vérifier ensemble ce vieil adage : les meilleures choses ont une fin !

Merci à Marie Usal qui a su ces derniers mois m'encourager et me motiver pour finaliser ce diplôme. Je te souhaite plein de belles choses pour ta thèse, surtout plein de beaux résultats pour approfondir et comprendre le rôle des perturbateurs endocriniens dans le déclin des amphibiens et particulièrement sur les effets transgénérationnels. J'ai pleinement confiance en toi et les têtards aussi !

Merci à Guillaume Vial et Karine Couturier du Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée (LBFA) pour nos nombreux échanges sur le métabolisme glucidique et ses perturbations.

Un grand merci également à Lucile Sage, mon sponsor, qui m'a permis de partir, de suivre et valider mes modules théoriques en toute sérénité.

Et un merci à toutes les personnes que j'ai pu croiser tout au long de mon parcours professionnel et également aux personnes croisées lors des modules EPHE avec lesquelles, nous avons pu échanger sur nos différentes expériences tant du point de vue scientifique que technique, qu'administratif ou tout simplement personnel.

À ma sœur qui a eu le courage et pris le temps de relire le manuscrit pour corriger les éventuelles fautes d'orthographes. Un grand merci, la tâche était ardue !

Plein de merci à mes enfants pour être tout simplement là, à mes côtés.
À Eloïse, soulagée et heureuse de savoir que j'ai pu mettre le mot fin à ce manuscrit. Une lourde page de notre vie s'est enfin tournée… Je te souhaite de belles réussites scolaires et personnelles. Je te fais entièrement confiance pour mener à bien tes propres projets et t'encourage vivement à croire à ton envie d'aller à Paris pour intégrer l'école Boulle et devenir architecte.
À Louis, qui n'a pas compris au début de l'aventure que sa maman retournait à l'école ! Et qui a fait peut-être ce dur constat : l'école ne s'arrête donc JAMAIS. Ça y est Louis, tu n'entendras plus ces 4 lettres EPHE ! Et nous allons pouvoir passer plus de temps ensemble.

Liste des figures

Introduction générale

Figure 1 : Pelophylax kl. esculentus....1
Figure 2 : Salamandra....1
Figure 3 : Caecilia-orientalis....1
Figure 4 : Squelette d'anoure....2
Figure 5 : Grenouille verte....2
Figure 6 : Cycle de vie de la Grenouille verte. Stades décrits selon Gösner (Gösner, 1960)....3
Figure 7 : Phylogénie schématisée des espèces du genre Pelophylax dans le paléarctique occidental. 6
Figure 8 : Aire de répartition (non exhaustive) des grenouilles genre Pelophylax du Paléarctique occidental d'après les données de l'IUCN Red List 2015-3 7
Figure 9 : Aire de répartition (non exhaustive) des espèces hybrides de l'Europe occidentale et des espèces parentes données IUCN Red List 2015-3. 9
Figure 10 : Hybridogenèse schématique du complexe P.kl. esculentus....12
Figure 11 : Exemple de paramètres d'observation des clés de détermination des espèces de grenouilles...13
Figure 12 : A : ilium B : les différentes mesures (Blain et al, 2015)....14
Figure 13 : Transformée de Fourier des chants vocaux de P. lessonae et de P. ridibundus....14
Figure 14 : Représentation schématique de la molécule d'ADN du génome mitochondrial....16
Figure 15 : Représentation schématique de l'ADN ribosomique 19
Figure 16 : Représentation schématique de l'intron-1 de l'albumine sérique des Grenouilles du paléarctique occidental....19
Figure 17 : D'après IUCN red list 2007, le pourcentage des espèces suivant la classification suivante : En danger critique, en danger et vulnérable dans différents groupes d'animaux....21
Figure 18 : Comparaison des pourcentages d'espèces affectées suivant les différents paramètres chez les mammifères, les amphibiens et les oiseaux....22
Figure 19 : Liste des 16 HAP prioritaires pour l'agence de protection de l'environnement Américaine US-EPA 23
Figure 20 : Distribution spatiale des émissions globales en HAP en 2007....25
Figure 21 : Transport des HAP ou cycle géochimique des HAP....26
Figure 22 : Processus généraux dans la formation, activation et la conjugaison des sulfates chez les mammifères....29
Figure 23 : Vue d'ensemble non exhaustive schématisée des réactions intervenant dans la biotransformation des xénobiotiques type HAP....31
Figure 24 : Représentation schématique de l'induction des cytochromes P450 via le récepteur AhR 32
Figure 25 : Métabolisation du BaP....33
Figure 26 : Représentation schématique de la Glycolyse, du cycle de Krebs et de néoglucogenèse et son induction via FOXO1....42

Objectifs

Figure 27 : Résumé des différentes manipulations mises en place : Bioconcentration – métabolisation, Glycémie et Génotypage. 45

Matériel et méthodes

Figure 28 : A : Exposition des grenouilles vertes au BaP. B : au mélange....50
Figure 29 : Schéma de la conversion de la 7-Ethoxyrésorufine en Résorufine par le cytochrome P450 CYP1A 53
Figure 30 : Le pyruvate dans la voie de la néoglucogénèse (PEPCK : PhophoEnolPyruvate CarboxyKinase) 55
Figure 31 : Alignement du gène PEPCK (CLUSTAL) 59
Figure 32 : Exemple de profil de séquence envoyée par cogenics issu du séquençage de Sanger....60
Figure 33 : PriFi : alignement multiple de séquences et "design" couples d'amorces PEPCK 61
Figure 34 : Alignement PEPCK et couple amorce PEPCK pour la PCR quantitative....62

Figure 35 : image d'un gel d'après (Hauswaldt *et al.*, 2012) montrant les produits PCR des différents individus composant le complexe esculentus 64

Résultats

Figure 36 : Cinétique d'absorption du BaP chez les grenouilles exposées au BaP et les grenouilles exposées au BaPBbF. 66
Figure 37 : Cinétique d'apparition des métabolites polaires dans l'eau de trempage des grenouilles exposées au BaP et les grenouilles exposées au mélange. 67
Figure 38 : Facteurs de bioconcentration du sérum chez les grenouilles exposées au BaP seul et celles exposées au mélange 68
Figure 39 : Facteurs de bioconcentration dans le foie chez les grenouilles exposées au BaP seul et celles exposées au mélange. 69
Figure 40 : Facteurs de bioconcentration dans la vésicule biliaire chez les grenouilles exposées au BaP seul et celles exposées au mélange. 70
Figure 41 : Facteurs de Bioconcentration dans l'intestin chez les grenouilles exposées au BaP seul et celles exposées au mélange. 71
Figure 42 : Facteurs de Bioconcentration dans les reins chez les grenouilles exposées au BaP seul et celles exposées au mélange. 72
Figure 43 : Facteurs de Bioconcentration dans les corps jaunes chez les grenouilles exposées au BaP seul et celles exposées au mélange. 73
Figure 44 : Bilan de la distribution du BaP 7-^{14}C-BaP par rapport au Facteurs de BioConcentration (BCF) calculés dans les organes intervenant dans la détoxication (foie, reins et intestin), la digestion (vésicule biliaire et intestin), l'excrétion (les reins), le stockage (corps jaunes) et dans la circulation sanguine.. 75
Figure 45 : Activités EROD hépatiques des grenouilles témoins, exposées au BaP et au BaPBbF.....76
Figure 46 : Glycémies des grenouilles mâles sauvages à jeun 77
Figure 47 : Glycémies des grenouilles mâles Rivan92 à jeun 77
Figure 48 : A/ Masses des grenouilles sauvages et des grenouilles Rivan92. B/Glycémies des grenouilles sauvages (témoin et total) et des grenouilles Rivan92 (témoin) 78
Figure 49 : Test de tolérance au glucose (ipGTT) des grenouilles sauvages 78
Figure 50 : Boxplot des aires sous les courbes obtenues lors du test ipGTT. 79
Figure 51 : Test de tolérance au glucose (ipGTT) des grenouilles d'élevage Rivan92 80
Figure 52 : Boxplot des aires sous les courbes obtenues lors du test ipGTT. 81
Figure 53 : Test de tolérance au pyruvate (ipPTT) : mise en évidence de la perturbation de la voie de la néoglucogenèse chez les grenouilles sauvages 82
Figure 54 : Boxplot des aires sous les courbes obtenues lors du test ipPTT. 83
Figure 55 : Ratio du taux de glucose dans le sang des grenouilles sauvages et des grenouilles Rivan 92. ...84
Figure 56 : Ratio du taux de glucose dans le sang chez les grenouilles sauvages témoins et exposées au BaP, au BbF et au mélange et chez les grenouilles témoins Rivan92.....85
Figure 57 : Ratio d'expression normalisé de PEPCK dans le foie. A/ grenouilles sauvages non exposées et exposées aux HAP seuls ou en mélange. B/ grenouilles Rivan92 non exposées 86
Figure 58 : Ratio d'expression normalisé de PPARGC1a dans le foie chez les grenouilles sauvages non exposées , exposées pendant 18 h au BaP, BbF , BaPBbF et les grenouilles Rivan92 non exposées. 87
Figure 59 : Génotypage des grenouilles sauvages 88
Figure 60 : Genotypage grenouilles Rivan 92 : produits PCR de l'intron-1 de l'albumine sérique.....88
Figure 61 : Arbre phylogénétique des grenouilles sauvages et Rivan92 90

Discussion

Figure 62 : Boxplot des aires sous les courbes obtenues lors du test ipGTT des grenouilles sauvages exposées au fipronil, TCS, BPA et ibuprofène.....98
Figure 63 : Boxplot des aires sous les courbes obtenues lors du test ipPTT des grenouilles sauvages exposées au fipronil, TCS, BPA et ibuprofène.....99

Liste des tableaux

Introduction générale

Tableau 1 : Liste des grenouilles du genre Pelophylax présentes sur le bassin méditerranéen et états de menace des populations selon IUCN.....5
Tableau 2 : Liste des hybrides du genre Pelophylax présents sur le bassin méditerranéen et états de menace des populations selon IUCN 8
Tableau 3 : Hybridogenèse schématisée des systèmes L-E et R-E.....11
Tableau 4 : Hybridogenèse schématisée du système E pur 12
Tableau 5 : Oscillogrammes de chants de grenouille verte.....14
Tableau 6 : Exemple de microsatellites développés dans le complexe Esculentus au niveau de l'Europe Centrale. 18
Tableau 7 : Les voies d'exposition impliquées dans l'exposition aux contaminants chez les amphibiens et leur contribution relative et le degré de connaissance d'après (Smith et al, 2007).....22
Tableau 8 : Caractéristiques physico-chimiques du Benzo[a]pyrène et Benzo[b]fluoranthène.....34
Tableau 9 : Concentrations en BaP, BbF et plusieurs HaP dans les eaux douces naturelles 35
Tableau 10 : Effets écotoxicologiques du BaP et BbF sur les amphibiens.....37

Matériel et méthodes

Tableau 11 : Statuts législatifs et degré de menace chez les cinq espèces de grenouilles vertes en France .47
Tableau 12 : Volume final d'éthanol ajouté pour l'extraction pour chaque organe 51

Résultats

Tableau 13 : Récapitulatifs des facteurs de bioconcentration dans les différents organes chez les grenouilles exposées au BaP seul et au mélange.....74
Tableau 14 : Insulino-résistance : Pourcentage des grenouilles à avoir atteint un taux de glucose dans le sang inférieur à 10 $mg.dl^{-1}$ après injection d'insuline bovine.....84

Liste des sigles et abréviations

ADN	Acide déoxyribonucléique
AhR	Récepteur aux hydrocarbures aromatiqueq
ARN	Acide ribonucléique
BaP	Benzo[a]pyrène
BbF	Benzo[b]fluoranthène
BCF	Facteur de bioconcentration
CCM	Chromatographie sur couche mince
CITEPA	Centre interprofessionnel technique d'études de la pollution atmosphérique
CMR	Agent chimique cancérogène, mutagène et reprotoxique
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer
CYP1A	Cytochrome P450 classe 1 sous-classe A
EROD	7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase
HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
ipGTT	Test de tolérance intra péritonéal au glucose
ipPTT	Test de tolérance intra pérotonéal au pyruvate
IUCN	Union internationale pour la conservation de la nature
ITT	Test de tolérance à l'insuline
K_{oc}	Coefficient de partage carbone organique/eau
K_{ow}	Coefficient de partage octanol/eau
OMS	Organisation mondiale de la santé
ORO	*Oil red O* – coloration à l'huile rouge
PCR	Réaction de polymérisation en chaine
POP	Polluant organique persistant
PEPCK (PCK-1)	Phosphoénolpyruvate carboxykinase

PPARGC1a (PCG-1α)	*peroxisome proliferator activator receptor γ coactivator-1α*
NALFD	Stéato-hépatite non alcoolique
RT-qPCR	*Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction*
Rivan92	Souche de grenouille verte d'élevage
SAI-1	intron 1 du gène de l'albumine sérique
SE	Erreur type
TCDD	2,3,7,8-Tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine
US-EPA	Agence de protection environnementale américaine

Avant-propos

Des études récentes suggèrent que la sixième extinction de masse est en cours. Cette dernière est caractérisée par la perte et le déclin des populations de vertébrés (Barnosky *et al*, 2011). En effet, une étude de juillet 2017 (Ceballos *et al*, 2017) tire la sonnette d'alarme en montrant que la biodiversité recule partout dans le monde, avec des réactions en chaine sur ***l'ensemble des écosystèmes.*** Ainsi 32 % des vertébrés ***déclinent en termes de population et d'étendue*** et les ***amphibiens*** n'échappent pas à ce phénomène. Les causes sont multiples, en interrelations et clairement établies : dégradation et fragmentation de l'habitat sous l'effet de l'urbanisation et de l'exploitation agricole, surexploitation des espèces, ***pollution au sens large***, espèces invasives et maladies (Hayes *et al*, 2010).

Cette étude réalisée au ***Laboratoire d'ECologie Alpine***, sur les grenouilles vertes mâles d'Europe s'inscrit dans la continuité d'une étude réalisée sur les femelles (Reynaud, et al., 2012). L'étude de 2012 a montré la forte capacité de ces animaux à métaboliser des xénobiotiques, couplée à une faible induction des enzymes de détoxication. La présente étude s'inscrit également dans un projet plus global étudiant l'impact des polluants ***seuls*** ou ***en mélange*** sur le déclin des populations d'amphibiens, en interagissant tout particulièrement avec un travail de thèse mettant en évidence des désordres métaboliques et les conséquences multigénérationnelles liés à l'exposition aux perturbateurs endocriniens chez : *Xenopus tropicalis* (Regnault, 2016).

Notre double compétence **espèce modèle et espèce de terrain** permet de faire le lien entre le laboratoire et l'environnement. En effet, les conditions rigoureuses de l'élevage en laboratoire et le génome séquencé et annoté de l'espèce *Xenopus tropicalis* ont permis d'identifier précisément des gènes et ainsi des voies métaboliques impactés par les différentes cinétiques d'expositions (Regnault, et al., 2014). La grenouille verte représente une espèce ou un **ensemble d'espèces** plus réaliste d'un point de vue environnemental et permet ainsi de valider les différents résultats obtenus sur *Xenopus tropicalis* (Regnault *et al*, 2014; Regnault *et al*, 2016; Regnault *et al,* 2017, *in prep*). Identifier clairement les mécanismes moléculaires, biochimiques reste parfois difficile, mais les **réponses globales** mises en évidence par des méthodes utilisées couramment sur mammifères (ipGTT, ipPTT et de test de sensibilité à l'insuline) se sont révélées très intéressantes et ont mis en évidence des désordres métaboliques observées sur l'espèce modèle *Xenopus tropicalis*.

I. Introduction générale

1. Les Amphibiens

Les amphibiens Linnaeus 1758, (du grec *amphi* : double et *bios* : vie), autrefois appelés Batraciens (du grec *batrakhos* : la grenouille qui s'emploie pour désigner également les crapauds et les salamandres) forment une classe de vertébrés tétrapodes, anamniotes et poïkilothermes. Il y a environ 400 millions d'années, les amphibiens sont les premiers vertébrés à avoir colonisé le milieu terrestre.

Bien diversifiés autrefois, les amphibiens ne comptent plus qu'une seule sous-classe encore représentée, les Lissamphibiens (Haeckel, 1866). Malgré leur grande variété de formes, cette dernière partage plusieurs caractères spécialisés que nous ne retrouvons chez aucun autre groupe de vertébrés et qui témoignent de leur ascendance commune : les dents pédicellées et bicuspides (munis de 2 pointes), le mode d'accommodation visuelle, les glandes pluricellulaires de la peau (séreuses et muqueuses) et quelques spécialisations de l'oreille interne avec présence d'un deuxième osselet (l'opercule).

La sous-classe des Lissamphibiens regroupe 7454 espèces (AMPHIBIAWEB, 2015; Haeckel, 1866) et se divise en **trois ordres** :

Figure 1 : Pelophylax kl. esculentus

Les anoures Fisher Von Waldheim 1843 (du grec *a* : sans et *uros* : queue), ordre représentant le plus grand nombre d'espèces (6569 (AMPHIBIAWEB, 2015) ont une queue qui régresse après la métamorphose jusqu'à sa disparition complète. Ce groupe est composé notamment des grenouilles, des crapauds et des rainettes.

Figure 2 : Salamandra

Les urodèles Latreille 1825 (du grec *uros* : queue et *deilos* : visible) gardent leur queue une fois le stade larvaire terminé, tels les salamandres et les tritons. Cet ordre regroupe 680 espèces (AMPHIBIAWEB, 2015).

Figure 3 : Caecilia-orientalis

Les gymnophiones Müller, 1832 (du grec *gymnos* : nu et *ophis*: serpent), ou **apodes** (du latin an- : sans et du grec poda : pattes), regroupant les cécilies aux pattes atrophiées, ne représentent que 205 espèces (AMPHIBIAWEB, 2015).

Dans cette étude, nous nous intéressons particulièrement aux ***grenouilles vertes d'Europe*** qui représentent pour notre étude un modèle d'amphibien de terrain.

En Europe et tout autour du bassin méditerranéen la classe des amphibiens est représentée uniquement par deux ordres : les anoures et les urodèles comptant 106 espèces, dont 42 appartenant à l'ordre des urodèles et 64 à l'ordre des anoures. La plus grande diversité d'espèces est observée au niveau de l'Europe et des Balkans (Cox *et al*, 2006).

2. Les anoures (Fisher Von Waldheim 1843) : caractéristiques communes

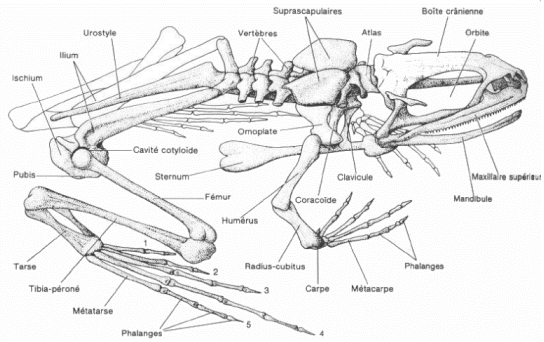


Figure 4 : Squelette d'anoure

Les grenouilles et les crapauds montrent des caractéristiques morphologiques bien distinctes par rapport aux autres vertébrés dont les plus importantes sont : un corps court (entre 5 et 9 vertèbres suivant les espèces), les vertèbres post-sacrées se transforment en une baguette rigide pour former l'urostyle, des grandes pattes postérieures adaptées aux sauts (les deux os du tarse s'allongent et forment un segment supplémentaire dans la patte postérieure) et une tête avec des yeux saillants. Les dents sont pédicellées et absentes de la mandibule (Figure 4).

Les anoures représentent une classe très diversifiée morphologiquement et occupent une grande variété d'habitats. En effet, ils occupent aussi bien des étangs que des cours d'eau (plus ouverts), sont présents aussi bien au niveau de prairies que de forêts tropicales, en altitude ou également au niveau des déserts chauds. Les anoures peuvent être aquatiques et/ou terrestres ou spécialisés dans la vie exclusivement terrestre ou arboricole (Wells, 1992).

Au sein de cet ordre, la famille des ranidés (Rafinesque, 1814), appelée la famille des grenouilles vraies, représente 380 espèces réparties en 23 genres dans le monde (AMPHIBIAWEB, 2015). Notre attention portera particulièrement sur le genre *Pelophylax* (Fitzingzer, 1843) qui regroupe les grenouilles vertes.

3. Les « grenouilles vertes » du genre *Pelophylax* (Fitzingzer, 1843)

A. Les caractéristiques générales communes des grenouilles vertes

Figure 5 : Grenouille verte

La tête des grenouilles vertes est allongée avec des yeux rapprochés. Leurs tailles varient de 9 à 15 cm environ et leur couleur n'est pas obligatoirement verte. La zone tympanique est de même couleur que la tête. Le dos varie entre les tons clairs ou vifs de vert, exceptionnellement bleu ainsi que brunâtre tacheté de noir. Il est marqué d'une ligne vertébrale claire. Le ventre et la gorge sont blanc crème unis ou tachetés de brun sombre. Il existe un dimorphisme sexuel : les mâles sont plus petits que les femelles, avec des membres plus longs et plus robustes. Ils possèdent de grands sacs vocaux situés de part et d'autre des commissures labiales. Des callosités nuptiales se développent à la base du pouce. Au niveau de la reproduction, l'accouplement est axillaire. La femelle pond de 2000 à 10 000 œufs (ovocytes II) marqués d'un pôle brun (pôle animal) et d'un pôle blanc (pôle végétal) (Arnold et Ovenden, 2014). Moins de 1 % de ces œufs fécondés arriveront au stade adulte car tout au long du développement, les larves sont sujettes à des maladies, des parasites et possèdent de multiples prédateurs.

B. Cycle de vie des grenouilles vertes

Le cycle de vie des anoures et plus précisément des « grenouilles vertes » comporte deux phases bien distinctes : une phase larvaire aquatique et une phase adulte terrestre (Figure 6). En effet malgré la sortie de l'eau au stade adulte, la reproduction reste exclusivement aquatique. Cela signifie que le développement complet de l'animal implique un changement radical d'habitat et une métamorphose à l'issue de laquelle toutes les fonctions de l'organisme sont profondément modifiées pour permettre l'adaptation au nouvel environnement.

Une fois la maturité sexuelle atteinte (3 à 4 ans), les mâles attirent les femelles matures par leur chant, après l'hivernation, dès que les conditions environnementales sont favorables (vers avril). L'amplexus est axillaire. Le mâle fertilise les ovocytes au fur et à mesure que la femelle les expulse. Le développement embryonnaire dure environ une semaine et le développement des têtards est plus ou moins long suivant la saison d'éclosion. Ils peuvent hiverner également et poursuivre leur métamorphose au printemps suivant.

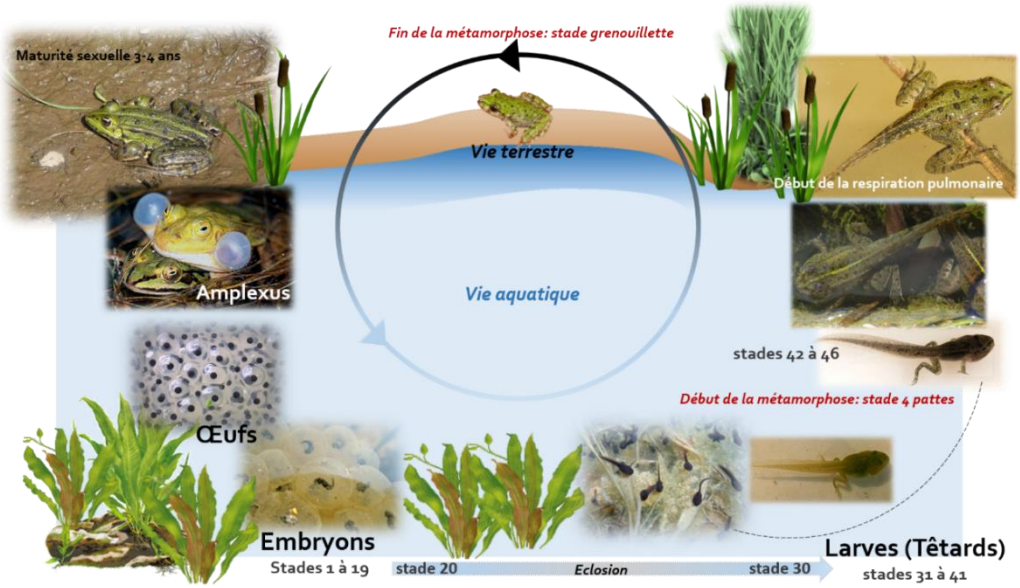


Figure 6 : Cycle de vie de la Grenouille verte. Stades décrits selon Gösner (Gösner, 1960)

C. Régime alimentaire

1. Larves

Elles se nourrissent très rapidement après l'éclosion (2- 3 jours) de détritus végétaux et d'algues vertes mais aussi de zooplancton, notamment de protozoaires.

2. Adultes

Les grenouilles vertes adultes sont carnivores. Elles chassent à l'affût, à la surface de l'eau ou à terre. Les invertébrés terrestres ou aquatiques constituent leur alimentation principale. Les analyses de contenus stomacaux montrent une forte présence de coléoptères divers, gastéropodes, diptères, araignées et hyménoptères, des chenilles de lépidoptères, des libellules et des criquets ont été trouvés en moindre abondance (Günther, 1997 ; Paunovic, 2010). Divers auteurs citent fréquemment des proies aquatiques, telles que les notonectes, nèpes, têtards et même des carpes de 3 à 7 cm. Cette consommation de poissons est confirmée par Guyétant (Guyétant, 1986), qui précise toutefois qu'elle reste marginale par rapport aux autres proies. A terre, la grenouille verte peut consommer de grandes quantités de grenouilles rousses justes métamorphosées.

D. Les grenouilles du genre Pelophylax du paléarctique occidental

Le premier inventaire du vivant a été réalisé au XVIIIème siècle par Carl Von Linnaeus qui ne reconnait à cette époque qu'une seule espèce de grenouille verte dans toute l'Europe (*Pelophylax (Rana) esculenta* Linnaeus 1758). Puis au XXème siècle, Schreiber distingue selon des critères morphologiques deux espèces de grenouilles vertes : la grenouille rieuse *Pelophylax (Rana) ridibunda* (Pallas, 1771) et la grenouille verte *Pelophylax (Rana) esculenta* (Linnaeus, 1758). Par la suite, les critères caractérisant l'espèce se précisent et les travaux de croisement sur les grenouilles vertes (Berger L. , 1968) permettent de conclure à l'existence d'une troisième espèce qui est la grenouille de Lessona (*Pelophylax (Rana) lessonae* Camerano, 1882). Puis, les différents travaux de Dubois (Dubois & Ohler, 1997 ; Dubois, 1998) distinguent neuf espèces de grenouilles vertes et trois hybrides en Europe de l'Ouest.
D'après Cox *et al* (Cox *et al*, 2006), 27 espèces de ranidés sont retrouvées sur le bassin méditerranéen dont environ 15 espèces de « grenouilles vertes » du genre *Pelophylax* (Tableau 1).

1. Les différentes espèces parentes

Dans le Tableau 1 sont regroupées les différentes espèces de grenouilles vertes du paléarctiques occidental (12 espèces parentes), leur classement et l'état de leur population selon l'union internationale pour la conservation de la nature (IUCN), ainsi que leur caractère endémique à ce bassin.
Sur les douze espèces mentionnées, trois populations *: P. cretensis*, *P. shqipericus* et *P. cerigensis* sont classées en danger (EN) par l'IUCN. Ce sont des populations endémiques, occupant une zone géographique limitée et restreinte souvent associée à une île. *P.epeiroticus* est classée en vulnérable (VU), son aire de répartition est limitée à la Grèce occidentale et le sud de l'Albanie. Il semble probable que les populations de cette espèce soient fragmentées car il y a de vastes zones d'habitats impropres à son installation. Il n'existe qu'un seul hybride *P. kl grafi* classé en quasi menacé (NT) car son aire de répartition est limitée au Nord de l'Espagne et au Sud de la France ce qui pourrait refléter le simple fait de l'absence de l'espèce parente *P. ridibundus* en Espagne (quelques cas d'introductions anthropiques existent cependant) (Araño *et al*, 1995). Les autres espèces sont classées en préoccupation mineure (LC). Cependant, pour la majorité des espèces il a été observé une décroissance des populations. Trois espèces : *P. hispanicus*, *P. saharicus* et l'hybride *P. kl perezi* présentent des populations stables. Par contre, *P. ridibundus* est caractérisé par une population croissante, ce qui est expliqué par ses introductions nombreuses et également par ses fortes capacités d'adaptation et d'invasion (Pagano *et al*, 2003 ; Zeisset et Beebee, 2003).

Tableau 1 : Liste des grenouilles du genre* Pelophylax *présentes sur le bassin méditerranéen et états de menace des populations selon IUCN

Espèces	IUCN Red list catégories	Endémique au bassin méditerranéen	Etat de la population Selon IUCN Red list *
Bedriagae Camerano 1882	Préoccupation mineure (LC)	Oui	décroissance
Bergeri Günther in Engelmann, Fritzsche, Günther and Obst, 1986	Préoccupation mineure (LC)	Oui	décroissance
Caralitanus Arikan, 1988	Quasi menacée (NT)	Oui	décroissance
Cerigensis Beerli, Hotz, Tunner, Heppich and Uzzell 1994	En danger (EN)	Oui	décroissance
Cretensis Beerli, Hotz, Tunner, Heppich and Uzzell, 1994	En danger (EN)	Oui	décroissance
Epeiroticus Schneider, Sofianidou and Kyriakopoulou-Sklavounou, 1984	Vulnérable (VU)	Oui	décroissance
Kurtmuelleri Gayda 1940	Préoccupation mineure (LC)	Oui	décroissance
Lessonae Camerano 1882	Préoccupation mineure (LC)	Non	décroissance
Perezi López-Seoane 1885	Préoccupation mineure (LC)	Oui	stable
Ridibundus Pallas 1771	Préoccupation mineure (LC)	Non	croissance
Saharicus Boulenger in Hartert 1913	Préoccupation mineure (LC)	Non	stable
Shqipericus Hotz, Uzzell, Guenther, Tunner & Heppich 1987	En danger (EN)	Oui	décroissance

*The IUCN Red List of threatened Species™ 2015-3

a) *Leur phylogénie simplifiée*

La Figure 7 représente la phylogénie simplifiée du genre *Pelophylax* du paléarctique occidental. Le groupe des grenouilles du paléarctique occidental provient de trois lignées majeures. Leur divergence date du Miocène supérieur (environ -12 à -7 millions d'années) (Figure 7). En effet, les mouvements des plaques tectoniques africaines et eurasiatiques (environ -10 millions d'années), la crise messinienne (asséchement de la mer méditerranée au miocène), l'apparition des iles méditerranéennes (environ -6 à -5 millions d'années) et les différentes glaciations ont abouti à un processus

de spéciation. Le genre *Pelophylax* compte plus d'une vingtaine d'espèces dont une douzaine (Tableau 1) distribuée au niveau du paléarctique occidental avec un nombre important entre les Balkans, les îles Grecques et le Proche-Orient (Grimal, 2014).

✓ ***La lignée Perezi*** où *P. perezi* et *P. saharicus* forment un groupe sœur au sein de l'arbre phylogénique, clairement séparé des autres espèces européennes. La diversification de cette lignée s'est produite autour du miocène supérieur (-8 millions d'années).

Les autres espèces de grenouilles du paléarctique occidental se retrouvent regroupées au sein de deux lignées :

✓ ***La lignée de Lessonae*** : Il apparait que *P. lessonae* a eu un refuge adriatico-méditerranéen lors de période glaciaire (Günther, 1997) et que des individus de cette espèce ont migré marginalement vers les Balkans pour donner une espèce distincte *: P. shqipericus*. Elle regroupe également les espèces *P. lessonae* et *P.bergeri* qui est considérée actuellement comme une sous espèce de *P.lessonae*.

✓ ***La lignée Bedriagae-Ridibundus*** qui rassemble les espèces *P. cretensis, P. epeiroticus, P. bedriagae, P. cerigensis, P. kurtmuelleri et P. ridibundus*. A l'intérieur de cette lignée, *P. ridibundus* et *P. kurtmuelleri* sont des espèces sœurs et forment un groupe sœur avec *P. bedriagae* et *P. cerigensi*s (Lymberakis *et al*, 2007). Cette lignée s'est diversifiée à la fin du miocène et début du pliocène coïncidant avec la fin de la crise de salinité messinienne et un changement du climat qui devient plus froid et aride en méditerranée. Cette lignée présente de nombreuses diversifications et sa phylogénie est en constante évolution du fait d'un grand nombre d'études scientifiques pour comprendre son origine.

Les données moléculaires semblent montrer que les grenouilles vertes de Turquie au sens large et de Chypre ne sont pas conspécifiques avec les *P. ridibundus* d'Europe (Akın *et al*, 2010) bien que très proche génétiquement.

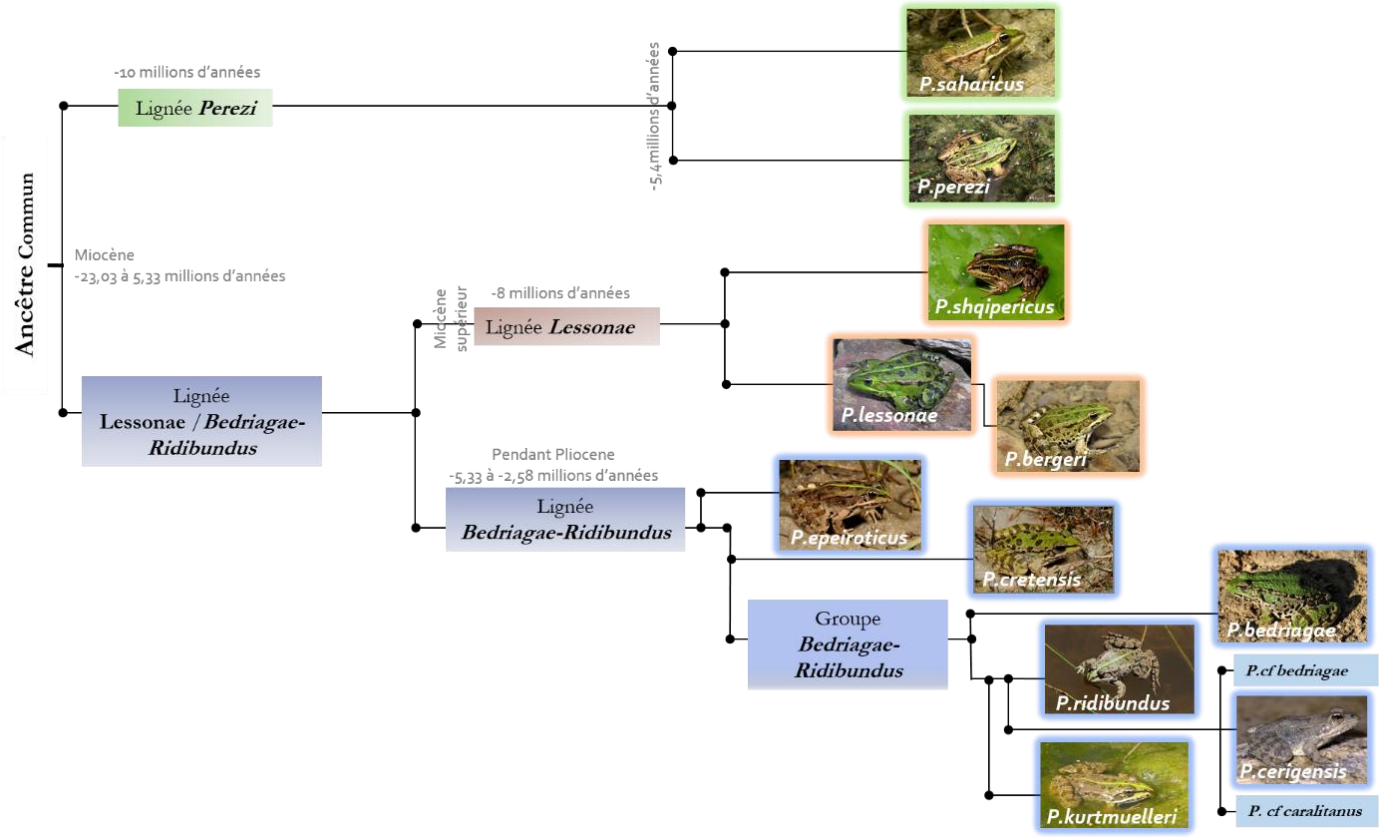


Figure 7 : Phylogénie schématisée des espèces du genre Pelophylax ***dans le paléarctique occidental (les distances ne sont pas respectées) d'après (Lymberakis*** et al***, 2007 ; Akın*** et al***, 2010).***

b) *Leur répartition géographique*

La lignée *Perezi* représentée par l'espèce *P. perezi* (en violet sur la carte : Figure 8) est présente dans toute la péninsule ibérique (Espagne et Portugal), en France vers le nord-ouest, dans une bande longeant l'Atlantique jusqu'en Vendée et vers le sud-est le long de la Méditerranée jusque dans le Gard (introduite aux Açores, à Madères, aux Baléares, aux Canaries et en Grande-Bretagne). L'autre espèce de cette lignée, *P. saharicus* (en rouge sur la carte Figure 8), est présente en Afrique du Nord (Sahara occidental, Maroc, Tunisie, Algérie, le Nord de la Libye et le Nord-Ouest de l'Egypte). Elle a également été introduite aux îles Canaries.

La lignée *Lessonae* représentée majoritairement par l'espèce *P. lessonae* (en bleu sur la carte Figure 8) est présente en Europe de la France (moitié Nord) au bassin de la Volga en Russie. *P. bergeri* est présente dans la péninsule italienne, en Sicile et sur l'Île d'Elbe, elle a été introduite en Sardaigne et en France (continent et Corse). *P. shqipericus* occupe une zone restreinte qui s'étend de l'Ouest de l'Albanie au Sud du Montenegro.

La lignée *Ridibundus/Bedriagae* représente la lignée la plus diversifiée. L'espèce *P. ridibundus* (en rose sur la carte Figure 8) est largement distribuée en Europe occidentale, centrale et orientale. De nombreux individus ont été introduits dans le Sud du Royaume Uni, Suisse, Belgique (Wallonie), en Espagne, en Sibérie et Nord-Ouest du Xinjiang en Chine. Cette espèce est présente en Turquie, Syrie, dans une grande partie de l'Iran, l'Iraq et l'Afghanistan. En Arabie Saoudite, il existe plusieurs populations isolées. De nombreuses introductions ont élargi l'aire de répartition en Sibérie. En Asie centrale, il est souvent difficile de faire la distinction entre la périphérie de l'aire naturelle et les zones occupées après les introductions et leurs dispersions. Son aire de répartition en Europe chevauche largement l'aire de répartition de l'espèce *P. lessonae*. Pour les autres espèces de cette lignée, les aires de répartition se situent à l'Est du pourtour du bassin méditerranéen : en Grèce, Turquie, Syrie et Egypte. Certaines espèces sont très endémiques et se situent sur des zones restreintes comme *P. shqipericus* présente que sur un petit territoire de l'Albanie et notamment sur des îles de la mer méditerranée comme par exemple *P. cerigensis* qui n'est présente que sur l'ile Karpathos et *P. cretensis* présente sur l'île de Crête.

Figure 8 : Aire de répartition (non exhaustive) des grenouilles genre* Pelophylax *du Paléarctique occidental d'après les données de l'IUCN Red List 2015-3 (*P. cerengensis *n'est pas représentée zone trop petite limité à l'île Karpathos).

2. Les complexes de grenouilles vertes

Les hybrides décrits sont issues du croisement de *Pelophylax ridibundus* (Pallas 1771) avec certaines espèces de grenouille verte du genre *Pelophylax* avec qui elles cohabitent et qui présentent un chevauchement partiel ou total de la période de reproduction. Cette « première » hybridation entre les espèces donnent trois hybrides référencés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Liste des hybrides du genre* Pelophylax *présents sur le bassin méditerranéen et états de menace des populations selon IUCN

Croisement *P. ridibundus* ×	Espèces hybrides *klepton*	IUCN Red list catégories	Endémique au bassin méditerranéen	Etat de la population Selon IUCN Red list *
Pelophylax lessonae Camerano 1882	*esculentus* Linnaeus 1758	Préoccupation mineure (LC)	Non	décroissance
perezi López-Seoane 1885	*grafi* Crochet, Dubois, Ohler & Tunner 1995	Quasi menacée (NT)	Oui	Pas de données
bergeri Günther in Engelmann, Fritzsche, Günther and Obst, 1986	*hispanicus* Bonaparte 1839	Préoccupation mineure (LC)	Oui	stable

*The IUCN Red List of threatened Species™ 2015-3

a) *L'hybridation : définition*

L'hybridation dans le règne aussi bien animal que végétal a un rôle majeur dans l'apparition instantanée d'individus possédant un matériel génétique nouveau leur conférant un avantage en terme d'évolution. L'hybridation aboutit fréquemment à la polyploïdie car la combinaison de deux génomes différents perturbe la méïose et engendre des gamètes diploïdes (Christiansen, 2009). L'apparition d'hyperploïdie associée à la multiplication du génome est considérée comme un mécanisme important dans la diversité génotypique et phénotypique qui aboutit à la sélection naturelle (Hoffmann *et al*, 2015). Les animaux hybrides échappent souvent à la stérilité par la reproduction clonale (Christiansen et Reyer, 2009).

b) *L' hybridogenèse et les hybrides*

L'hybridogenèse est un phénomène complexe de mélange de génomes entre des êtres vivants d'un même groupe d'espèces. Les espèces hybrides issues de ces mélanges d'espèces « pures » présentent la particularité de ne transmettre les gènes que d'une seule espèce parente et dépendent donc de l'autre espèce parente. C'est pourquoi leur nom latin comporte le mot *klepton* (*kl.*), qui signifie voler ou dérober en grec.

Il existe toutefois une exception à cette règle : les hybrides dits triploïdes, qui possèdent trois génomes, dont deux d'une seule des espèces parentes. Ce triple génome leur permet de se reproduire entre eux en l'absence d'espèces « pures ».

Les hybrides issus de l'hybridogenèse transmettent de façon clonale le génome complet d'une espèce parente à leur progéniture. Le génome de l'autre espèce parente est perdu dans les lignées germinales lors de la première phase de multiplication des gonies. On parle alors de reproduction hémi-clonale. Ce moyen de reproduction a été observé au sein de différentes espèces dans le règne animal (Schmeller, 2004). En effet, cette hybridogenèse a été mise en évidence initialement chez des poissons actinoptérygiens du groupe des *Poeciliopsis* (Schultz, 1969), puis chez d'autres familles de poissons tels que les Cyprinidés (Carmona *et al*, 1997), et également chez des phasmes (*Bacilius*

rossius-grandii) (Mantovani et Scali, 1992), et bien évidemment chez les grenouilles du genre *Pelophylax* (Rana) (Berger, 1973).

L'hybridogenèse impliquant les grenouilles vertes repose sur plusieurs caractéristiques : les hybrides sont viables, fertiles et des deux sexes (Graf et Polls Pelaz, 1989).

c) *La répartition des espèces hybrides et les espèces parentes associées*

L'aire de répartition de l'hybride *P. kl. esculentus* (en violet clair sur la carte : Figure 9) se situe surtout au niveau de l'Europe occidentale, centrale et orientale. Ces populations suivent les aires de répartition des espèces parentes puisqu'elles vivent en sympatrie. Cet hybride est également présent au Danemark et au sud de la Suède. L'origine de ces populations suédoises est mal connue. En effet ces populations sont soit des reliques de populations soit des introductions plus récentes.
En Italie, il n'est présent avec certitude que dans la plaine du Pô. Il a été introduit en Grande-Bretagne et en Espagne.
L'hybride *P. kl. hispanicus* (en vert sur la carte : Figure 9) est présent sur l'île de la Sicile (Italie) et sur le continent italien et au sud d'une ligne de Gênes à Rimini. Il est également présent sur les îles italiennes d'Elbe et de Giglio. Ces populations suivent la population parente *P. perezi* à l'exception de la Corse où l'hybride n'est pas retrouvé.
L'hybride *P. kl. grafi* est situé au Nord de l'Espagne et au Sud de la France.

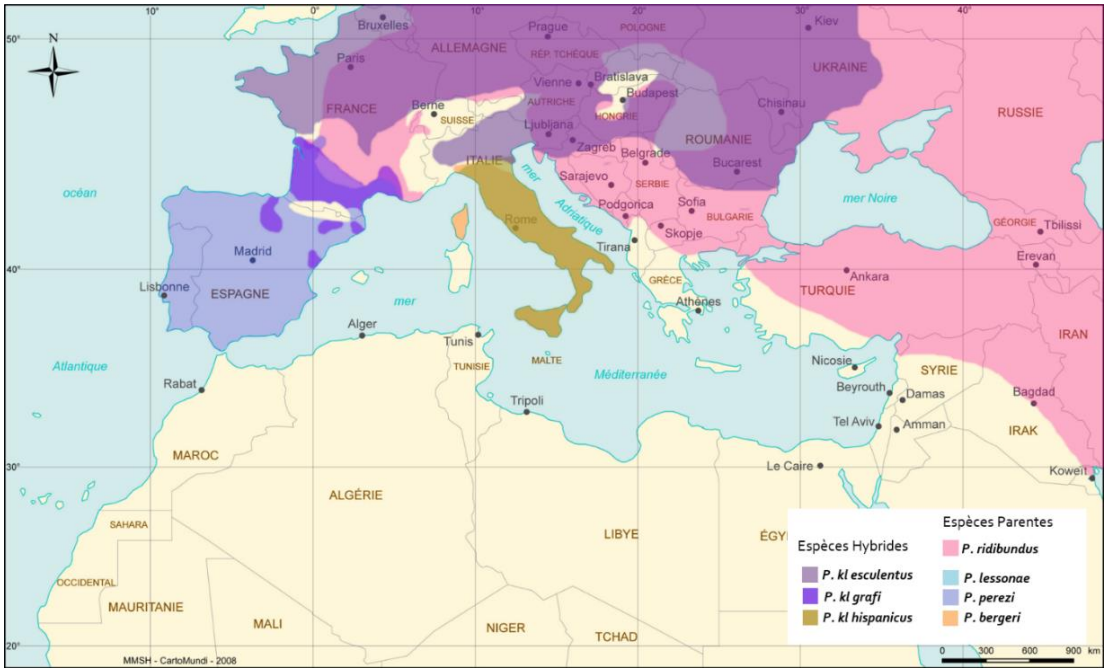


Figure 9 : Aire de répartition (non exhaustive) des espèces hybrides de l'Europe occidentale et des espèces parentes données IUCN Red List 2015-3.

d) *Le complexe Pelophylax esculentus*

Le complexe *Pelophylax kl. esculentus* est le plus **répandu en Europe** (Berger L. , 1988 ; Graf et Polls Pelaz, 1989 ; Pagano *et al*, 2001; Frost *et al.*, 2006). Ce complexe implique les deux espèces parentes *P. ridibundus* de génotype RR et *P. lessonae* de génotype LL, ainsi que l'hybride *P.kl. esculentus* de génotypes RL, qui est issu du croisement des deux espèces parentes (Berger, 1973 ; Heppich, 1978) et les hybrides de génomes LLR et RRL. Les hybrides de ce complexe ont un mode de reproduction particulier nommé l'hybridogenèse (Schultz, 1969). De nombreuses études ont observé ce mécanisme de reproduction chez *P. kl. esculentus* et l'ont mis en évidence grâce à des élevages

expérimentaux (Berger, 1973 ; Uzzell et Hotz, 1979), des caryotypages ainsi que par des analyses allozymiques (Uzzell *et al*, 1980).

Ce complexe montre des particularités en fonction des zones géographiques étudiées.
Le système d'hybridogenèse peut être classé en trois catégories majeures (Graf et Polls Pelaz, 1989) (Holsbeek et Jooris, 2010) :

- le système L-E (croisement entre *P. lessonae* et *P. kl. esculentus*)
- le système R-E (croisement *P. ridibundus* et *P.kl. esculentus*)
- le système E pur ou E-E (croisement des hybrides *P.kl. esculentus* entre eux)

Ces systèmes présentent tous des caractéristiques particulières.

(1) *Le système L-E*

Le système L-E est le système le plus répandu. Il est observé surtout en Europe de l'Ouest et est celui qui a été le plus étudié et le plus représenté. Dans ce système, l'hybride de génome RL, issu d'une hybridation primaire entre *P. ridibundus* de génome RR et *P. lessonae* de génome LL, vit en sympatrie avec une ou les deux espèces parentales. C'est le génome de l'espèce *P.lessonae* qui est exclu des cellules germinales au cours de la gamétogenèse pendant la phase de prolifération des ovogonies. Le génome *ridibundus* ainsi conservé subit une endoréplication, processus par lequel le matériel génétique est dupliqué mais non divisé, avant la méiose. Ensuite, le déroulement de la méiose est classique, ce qui aboutit à la formation de gamètes haploïdes qui contiennent uniquement le génome *ridibundus* clonal non recombiné (Tunner et Heppich, 1981; Holsbeek et Jooris, 2010). Cette exclusion du génome *P. lessonae* pourrait être la conséquence soit de l'inactivation de ce dernier par celui de *ridibundus* (Uzzell *et al*, 1980) qui semble être graduelle au cours des mitoses successives, (Holsbeek et Jooris, 2010) soit celle d'une dégradation enzymatique de la chromatine qui serait rejetée hors du noyau sous forme de « nucleus-like-bodies » (Vinogradov et Chubinishvili, 1999 ; Holsbeek et Jooris, 2010). Cette transmission clonale du génome *ridibundus* nécessite un croisement avec l'espèce parente *P. lessonae*. En effet la descendance issue du croisement des *P.kl esculentus* de génome RL issu du système L-E n'est pas viable à 97 % (Graf et Polls Pelaz, 1989) du fait de l'accumulation de mutations récessives délétères stochastiques (processus appelé « Muller's Rachet »). Cependant des individus *P. ridibundus* néoformés viables peuvent exister car les génomes R portés par les deux hybrides n'ont pas forcement la même origine parentale, et ainsi ne portent pas les mêmes mutations délétères (Guex *et al*, 2002 ; Vorburger et Reyer, 2003).

(2) *Le système R-E (Europe de l'Est)*

Le système R-E est l'inverse du système L-E. Certains hybrides réalisent une hybridogenèse imparfaite et produisent une minorité de gamètes R (élimination de trois gamètes R pour un gamète L) (Holsbeek et Jooris, 2010) et une majorité de gamètes L. La distribution des descendants est composée à la fois des *P. ridibundus* néoformés en minorité et des hybrides *P.kl. esculentus* majoritaire (Holsbeek et Jooris, 2010 ; Patrelle, 2010). Lorsque les hybrides *P.kl. esculentus* transmettent le génome *ridibundus* dans leurs gamètes, les descendants sont toutes des femelles *P. ridibundus*, néanmoins si le génome *lessonae* est transmis alors la descendance est constituée de mâles *P. kl. esculentus*. Ce phénomène est exclusivement retrouvé dans ce système R-E et porte le nom « hybrid amphispermy » (Vinogradov *et al*, 1991).

Tableau 3 : Hybridogenèse schématisée des systèmes L-E et R-E

Système **L**essonae-**E**sculentus				Système **R**idibundus-**E**sculentus		
		Gamètes			Gamètes	
	RL / LL	R	L Exclusion	RL / RR	R Elimination	L Partielle
Gamètes	L	RL	✗	R	RR	RL
	L	RL	✗	R	RR	RL
	100% RL Exclusion du génome *lessonae* de l'hybride *P. kl. esculentus*.			**75% RL** **25% RR** Elimination partielle de **3 gamètes R** pour **1 gamète L : « Hybrid amphispermy »**		
	RL / RL	† **Mortalité à 97%**				

(3) *Le système E pur ou E-E (Graf & Polls Pelaz, 1989)*

Le système E pur ou E-E correspond au croisement des hybrides *P. kl. esculentus* entre eux avec comme particularité la coexistence d'individus *esculentus* des deux sexes qui peuvent être diploïdes (génome RL) ou triploïdes (génomes : RRL, LLR). Ce système représente la seconde stratégie la plus rencontrée.

Dans la population pure de *P. kl. esculentus*, la coexistence d'individus diploïdes et triploïdes est stable puisque le succès de reproduction dépend du croisement d'individus de ploïdies différentes. Ces populations hémiclonales possèdent la même diversité génétique que des espèces sexuées similaires en raison d'un taux constant et élevé de recombinaison dans un des génomes parentaux et un taux de mutations réduit dans l'autre. Ainsi la population de *P. kl. esculentus* diploïde et triploïde est devenue une unité autonome dans l'évolution ayant un potentiel pour la formation de nouvelles espèces (Som et Reyer, 2006).

En général, les individus triploïdes sont issus d'individus et notamment de femelles capables de donner des œufs diploïdes (non reduits au niveau du génome) fertilisés par des gamètes mâles haploïdes. Ceci a été observé en condition naturelle et lors de croisements artificiels (Uzzell *et al*, 1975a ; Christiansen et Reyer, 2009 ; Christiansen, 2009 ; Hoffmann *et al*, 2015). Le mécanisme capable de donner des gamétes diploïdes, principalement des gamètes femelles, pendant la gamétogenèse n'est pas connu (Hoffmann *et al*, 2015).

Cette production de gamètes diploïdes varie selon les espèces, le sexe, les populations et les individus. Ce mécanisme peut être contrôlé par des facteurs génétiques (observé uniquement chez des espèces hybrides) mais aussi par des facteurs environnementaux. Ces facteurs tels que les températures extrêmes, les substances toxiques, les deficits en nutriments, les parasites et de nombreux autres stress (Beukeboom et Vrijenhoeck, 1998 ; Otto et Whitton, 2000) sont capables de perturber la ségregation des chromosomes lors de la méïose, ce qui aboutit à la formation de gamètes diploïdes. Il apparait possible que la première apparition de gamète diploïde se soit faite durant les périodes glacières ou post glacières et offre une explication plausible quant à l'observation d'une forte proportion d'organismes polyploïdes à des latitudes et altitudes élevées (Mason et Pires, 2015 ; Hoffmann *et al*, 2015).

Une étude en Slovaquie de l'Ouest (Mikulicek *et al*, 2014) montre que des populations mâles triploïdes RLL de *P.kl. esculentus* possédent deux génomes différents de *lessonae* et qu'ils produisent (sans méiose) uniquement des gamètes diploïdes de même génome que les cellules somatiques LL (Mikulicek *et al*, 2014).
Ceci contraste avec les individus hybrides mâles et femelles de génome RLL de l'Europe du Nord qui ne produisent que des gamètes haploïdes de génome L (Günther *et al*, 1979 ; Christiansen, 2009 ; Mikulicek *et al*, 2014). Les lignées triploïdes RLL du Nord de l'Europe et du Centre ont une origine monophylétique alors on peut penser que des processus alternatifs d'hybridogenèse ont engendré des gamètes mâles haploïdes et diploïdes, ce qui serait à l'origine de la diversification des lignées (Mikulicek *et al*, 2014). Cette population de mâles triploïdes a également été observée dans le Nord-Est de la Hongrie. Elle vit en sympatrie avec des individus hybrides diploïdes et des individus *P. ridibundus* (Tunner et Heppich-Tunner, 1992).

En général, les individus triploïdes engendrent des gamètes haploïdes contenant la recombinaison du génome qu'ils possèdent en double (Christiansen et Reyer, 2009 ; Christiansen, 2009 ; Pruvost *et al*, 2013). Par exemple, les individus hybrides LLR produisent des gamètes haploïdes de génome L recombiné entre les deux allèles L présents. De même, les individus hybrides RRL engendrent des gamètes haploïdes de génome R recombiné.

Les populations mixtes en ploïdie dominent le Nord-Est de l'Europe et semblent décroitre en allant vers le Centre de l'Europe, sans investir le Sud de l'Europe car les Carpates jouent un rôle de barrière naturelle.

Tableau 4 : Hybridogenèse schématisée du système E pur

Systèmes Esculentus						
	LLR / RL	Gamètes		RRL / RL	Gamètes	
		R Exclusion	L		R	L Exclusion
Gamètes	R	✗	RL	R Elimination partielle	RR	✗
	RL	✗	LLR	RL	RRL	✗
	L Exclusion	✗	✗	L Elimination partielle	RL	✗
	Exclusion du génome *ridibundus* chez l'individu *esculentus* triploïde et du genome *lessonae* chez l'individu *P. kl. esculentus* diploïde			Exclusion du génome *lessonae* chez l'individu *P. kl. esculentus* triploïde. Elimination partielle de **3 gamètes R** pour **1 gamète L**		

RR	individu Pelophylax ridibundus (espèce parente)
LL	individu Pelophylax Lessonae (espèce parente)
RL	individu Pelophylax kl.esculentus diploïde (espèce hybride)
LLR	individus Pelophylax kl.esculentus triploïdes (espèce hybride)
RRL	individus Pelophylax kl.esculentus triploïdes (espèce hybride)

***Figure 10 : Hybridogenèse schématique du complexe* P.kl. esculentus**

Ce complexe *esculentus* regroupe donc des systèmes très variés et il n'est pas réparti uniformément sur le territoire européen. En effet, la diversité génomique des hybrides et des espèces parentes se fait selon des critères géographiques comme la latitude et la longitude et des caractères plus biologiques comme la présence ou l'absence d'espèces parentes (et non des hybrides). La plus grande diversité génétique a été observée dans le Centre et l'Est de l'Europe. Tandis qu'au Nord de l'Europe, se trouve la plus faible diversité génétique (Hoffmann *et al*, 2015). De plus, la coexistence et la stabilité des populations des grenouilles vertes sont variables. En effet, il apparait que la composition génétique ainsi que le ratio en taxons changent dans le temps au sein de mêmes localités sans pour autant qu'on ait observé des modifications d'habitats (Mikulicek *et al*, 2014).
De plus, les individus *P. ridibundus* contribuent à la dynamique de population dans le système *esculentus-ridibundus-lessonae*. En théorie, la première hybridation entre les espèces parentes permet de produire des lignées d'hybridogenèse nouvelles en accroissant la diversité des hémiclones de la population hybride *P. kl. esculentus* et aussi la persistance de ces populations en remplaçant les vieilles lignées par les nouvelles (Mikulicek *et al*, 2014).

E. Identification des différentes espèces

L'identification des différents taxons de grenouilles vertes existants reposent sur une grande variété de critères issus d'observations morphologiques et de paramètres morphométriques ou acoustiques réalisés tout au long de leur cycle de vie.

1. Clés de Détermination

Il existe des clés de détermination décrivant précisément les différents stades de vie spécifiques de chaque espèce. Ces clés sont basées sur l'observation *in natura* des caractéristiques de pontes (ponte dans ou hors de l'eau, œufs isolés ou en amas gélatineux…) (Miaud et Muratet, 2004), de traits morphologiques pour les larves et les têtards (Miaud et Muratet, 2004) mais également pour les individus jeunes et adultes (Thirion et Grillet, 2008). Par exemple, les critères observés pour ces derniers sont entre autres la coloration de l'intérieur des cuisses, la taille et le profil du tubercule métatarsal, la coloration des sacs vocaux, la coloration des callosités, la taille de l'animal adulte du museau au cloaque, la forme et la taille des dents vomériennes, la coloration de l'iris, la palmure des pattes postérieures et la coloration du corps (Figure 11)…

Figure 11 : Exemple de paramètres d'observation des clés de détermination des espèces de grenouilles.

L'utilisation de ces clés nécessite une longue observation et une connaissance importante des milieux de vie.

Une étude (Blain *et al*, 2015) faite sur l'ilion (en orange dans la Figure 12A), particulièrement adaptée aux études fossiles, a permis de faire la distinction entre les deux espèces parentes *P. ridibundus*, *P. lessonae* et leur hybride *P. kl. esculentus*. Cette étude a montré que deux critères (mesures : 2 et 8 Figure 12B) sont significativement indépendants de la taille des individus et peuvent être utilisés pour distinguer la population étudiée appartenant plutôt au système *Ridibundus-Esculentus* R-E ou au système *Lessonae-Esculentus* L-E.

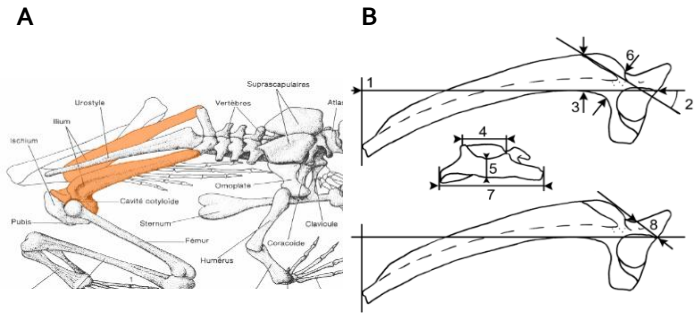


Figure 12 : Etude de l'ilion A : ilium B : les différentes mesures (Blain* et al*, 2015) *(1 : longueur de l'ilium, 2 : angle entre les axes d'orientations du tubercule et de l'ilium, 3 : hauteur de la crête dorsale, 4 : diamètre du cotyle, 5 : épaisseur du corps au centre de la cavité cotyloïde, 6 : cou iliaque, 7 : largeur maximale de la jonction ilium-ischium, 8 : largeur de la partie ascendante)*

2. Les chants vocaux

L'écoute classique *in natura* ou par enregistrement permet de différencier certaines espèces (Tableau 5). Les « accents régionaux » peuvent être des indicateurs phylogéographiques afin de comprendre l'historique de la distribution des différents individus (Wycherley *et al*, 2002).

Tableau 5 : Oscillogrammes de chants de grenouille verte

Espèces	oscillogrammes	Caractéristiques
Pelophylax lessonae		trille monotone et rapide de 19 à 22 notes, motif long et crescendo avec un final progressif.
Pelophylax kl. esculentus		trille monotone et rapide de 14 à 16 notes, motif crescendo et final abrupte.
Pelophylax perezi		trille monotone et assez rapide de 9 à 13 notes, motif abrupte au départ et au final, fort en énergie
Pelophylax ridibundus		rire saccadé et long en durée 6 à 9 notes, motifs fort en énergie.

En effet, les chants sont caractéristiques d'espèces et peuvent aider à l'identification, notamment en utilisant la Transformée de Fourier qui permet de caractériser un signal (sous unité de chant) non périodique par son spectre de fréquence. Cette fonction permet de mettre en évidence des variations nettes entre les chants de différentes espèces (Figure 13) (Wycherley *et al*, 2002).

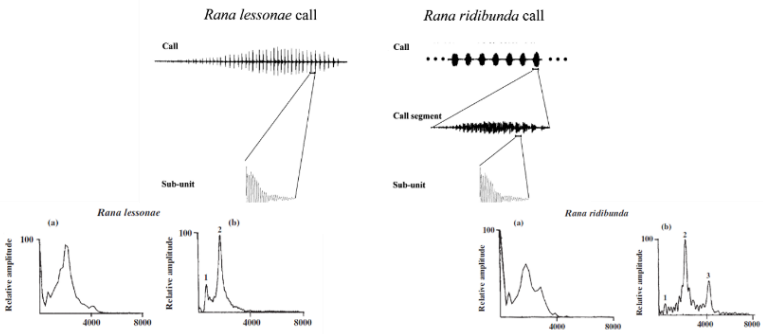


Figure 13 : Transformée de Fourier des chants vocaux de Pelophylax (Rana) lessonae et de Pelophylax (Rana) ridibundus (Wycherley* et al*, 2002)

Cette détermination est abordée au niveau des complexes d'hybridation et notamment dans le cadre de différenciation du complexe *esculentus* mais ce paramètre aide également à la différenciation des grenouilles vertes dans le groupe *ridibundus* (*P. ridibundus* versus *P. kurtmuelleri*) (Lukanov *et al*, 2013)

3. Habitats

Les grenouilles vertes sont des espèces très aquatiques. Elles sont retrouvées dans une grande variété de points d'eau permanents ensoleillés : petits et grands étangs, mares, gravières, fossés, canaux, rivières et bras morts. Les différentes espèces de grenouilles vertes occupent les milieux les plus adaptés à leur mode de vie et en fonction également de leur capacité d'adaptation (Pagano *et al*, 2001). En effet, il apparait que *P. kl. esculentus* occupe probablement des habitats intermédiaires

à ceux utilisés par les espèces parentales (*P. lessonae* et *P. ridibundus*). L'adaptabilité au milieu de vie de cette espèce est très forte (Pagano *et al*, 2001).
La comparaison des peuplements de grenouilles vertes entre l'habitat prairial et l'habitat forestier montre des différences significatives à l'echelle globale. En effet, les prairies sont plus peuplées en *P. ridibundus*, moins en hybride et en *P. lessonae* que les forêts (Patrelle, 2010).
De plus, *P. ridibundus* préfère les habitats en relation avec une rivière (rivière, bras morts d'une rivière et gravières) alors que *Pelophylax lessonae* est rarement présente, voir absente de ce type d'habitat. L'hybride *Pelophylax. kl. esculentus* se retrouve plutôt au sein du même habitat que l'espèce parente *Pelophylax lessonae*, c'est-à-dire dans les marais. *Pelophylax. kl. grafi,* et plus particulièrement *Pelophylax perezi*, sont souvent retrouvées au niveau des rivières et des bras morts. Pour *Pelophylax. kl. grafi*, sa distribution au niveau habitat est un peu plus large puisqu' elle occupe des rivières, des bras morts et également des marais (Pagano *et al*, 2001).
Il apparait certain que l'habitat occupé par les espèces informe ou oriente sur la détermination des différents taxons.

Établir des cartes d'identification d'espèces de grenouilles vertes reste assez complexe. La grande diversité de paramètres morphologiques, morphométriques, acoustiques et d'habitat (Pagano *et al*, 2001) pris en compte ne suffisent parfois pas à différencier les espèces entre elles. En effet, leur grande ressemblance au sein des différents taxons, ainsi que les multiples variations observables au sein d'un même taxon et de leur grande capacité à s'hybrider (Wycherley *et al*, 2002) montrent qu'il est parfois difficile voire impossible de distinguer deux espèces entre elles qui se révèlent extrêmement proches comme par exemple *P. ridibundus* et *P. bedriagae* (Holsbeek *et al*, 2009). C'est pourquoi, ces méthodes ont été fortement remises en question (Pagano et Joly, 1999 ; Lodé et Pagano, 2000 ; Plötner et Ohst, 2001). En outre, dans l'Ouest de l'Europe, ces méthodes d'identification sont d'autant plus inefficaces que l'existence d'hybridations importantes entre grenouilles autochtones et allochtones a été notée conduisant à toute une mosaïque de caractères (Pagano *et al*, 2003 ; Vorburger et Reyer, 2003 ; Holsbeek *et al*, 2008 ; Pagano *et al*, 2008; Plötner *et al*, 2008).

4. Les Marqueurs Moléculaires

Depuis les années 1980, des méthodes génétiques plus fiables ont été développées afin d'améliorer l'affiliation taxonomique des individus des populations de « grenouilles vertes » du genre *Pelophylax* du paléarctique occidental.

a) *Marqueurs protéiques : allozymes*

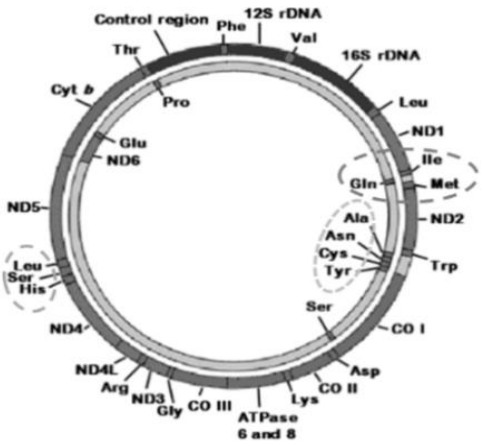
Les allozymes ou alloenzymes sont des variants d'une même enzyme qui sont codés par différents allèles d'un même locus.
Les enzymes utilisées sont très conservées au sein des différents organismes, elles sont utilisées par les phylogénéticiens comme marqueurs moléculaires pour appréhender l'histoire évolutives et les relations entre les différentes espèces car elles mettent en évidence le polymorphisme allélique. En effet, les modifications de séquence en acides aminés (modification du poids moléculaire et de charges révélés par électrophorèse) reflètent le changement dans la séquence ADN du locus.
Les enzymes utilisées pour les « grenouilles vertes » du genre *Pelophylax* sont des enzymes du métabolisme. Ce sont des enzymes Type I (coding) c'est-à-dire qui sont associées à des gènes dont on connait la fonction. Les différences entre absence/présence et la fréquence relative des allèles sont utilisées pour quantifier les variations génétiques et distinguer ainsi l'unité génétique caractéristique des populations ou des espèces étudiées.
Cette méthode d'affiliation très utilisée est invasive car elle requiert une quantité et qualité importante de tissus. Il faut noter également que certains changements dans la séquence nucléotidique n'engendrent pas de changement au niveau de la séquence en acides aminés (substitutions silencieuses), et certaines modifications de séquence en acides aminés n'engendrent pas de variation dans la mobilité électrophorétique.

Les enzymes les plus utilisées afin de déterminer les différentes espèces de *Pelophylax* sont : l' Aspartate Aminotransferase (sAAT et mAAT, EC 2.6.1.1), l'ACOnitate hydratase (sACO and mACO, EC 4.2.1.3), l'Adenosine DeAminase (ADA, EC 3.5.4.4), l'Adenylate Kinase (AK-2, EC 2.7.4.3), l'Albumin (ALB), Créatine Kinase (CK-A, EC 2.7.3.2), le Fructose-1,6-BiPhosphatase (FBP-1 et FBP-2, EC 3.1.3.11), le GlycerAldehyde-3-Phosphate DesHydrogénase (GAPDH, EC 1.2.1.12), l' α-Glycerophosphate DesHydrogenase (αGDH, EC 1.1.1.8), le Glucose-6-Phosphate Isomerase (GPI, EC 5.3.1.9), l'Isocitrate DesHydrogenase (mIDH and sIDH, EC 1.1.1.42), l-Lactate DesHydrogenase (LDH-A and LDH-B, EC 1.1.1.27), le Malate DesHydrogénase (mMDH and sMDH, EC 1.1.1.37), le Mannose-6-Phosphate Isomerase (MPI, EC 5.3.1.8), le 6-Phosphog-Gluconate DesHydrogenase (PGDH, EC 1.1.1.44), le PhosphoGlucoMutase (PGM-2, EC 5.4.2.2, formerly 2.7.5.1), le SuperOxide Dismutase (sSOD, EC 1.15.1.1) (Uzzell et Berger, 1975b; Lodé et Pagano, 2000; Hotz *et al*, 2014).

b) *Marqueurs ADN*

(1) *Mitochondrial*

L'ADN mitochondrial animal contient trente-six ou trente-sept gènes (Figure 14) ; deux pour les ARN ribosomaux (un pour la petite sous-unité 12S rDNA et un pour la large sous-unité 16S rDNA), vingt-deux pour les ARN de transfert et douze ou treize sous unités de protéines multimériques propres à la membrane mitochondriale. Il existe également une région non codante de contrôle variable (CR) qui joue un rôle dans la réplication et la transcription des gènes mitochondriaux. Les exons dans l'ADN mitochondrial circulaire sont compactés, sans introns et sans histones.



Gènes codants les protéines mitochondriales :
Cyt b: cytochrome b;
CO I, CO II, CO III: sous unités I, II, III du cytochrome oxydase;
ND 1-6 : sous unités de 1 à 6 du NADH déshydrogénase ou cytochrome c réductase.
Les ARN de transfert (tRNA) sont représentés par les trois premières lettres de leur acide aminé correspondant.
Certains d'entre eux sont regroupés au niveau de trois régions (**IQM** : isoleucine (I), glutamate (Q) et méthionine (M) ; **WANCY** : tryptophane (W), alanine (A), acide aspartique (N), cystéine (C) et tyrosine (Y) ; **HSL** : histidine (H), sérine (S) et leucine (L)), les autres sont répartis de façon isolée sur l'ADN mitochondrial.

Figure 14 : Représentation schématique de la molécule d'ADN du génome mitochondrial « conservé » des vertébrés (Peirera, 2000).

Les gènes codant pour les protéines mitochondriales évoluent plus rapidement et sont des marqueurs puissants dans l'histoire évolutive des familles, des genres et des espèces (Wan *et al*, 2004). Comme la plupart des vertébrés, l'ADN mitochondrial chez les grenouilles est transmis uniquement par la mère (Plötner *et al*, 2008). Ce mode de transmission non mendélien permet d'assimiler cette molécule d'ADN mitochondrial à un seul locus.
Plusieurs gènes sont cités dans la littérature pour mesurer la variabilité interspécifique des grenouilles vertes : Le *cytochrome b,* décrit par Moritz en 1992 (Moritz *et al*, 1992), a été utilisé afin de déterminer notamment la phylogéographie de *Pelophylax lessonae* en Italie (Canaestrelli et Nascetti, 2008), ainsi qu'en Suisse afin de déterminer les multiples origines des grenouilles dans ce pays

(Dubey *et al*, 2014), les sous unités de la NADH déshydrogénase, particulièrement ND2 et ND3 sont utilisées également (Plötner *et al*, 2008 ; Akın *et al*, 2010 ; Dubey *et al*, 2014 ; Mikulicek *et al*, 2014; Hotz *et al*, 2014).

(2) *Nucléaire*

(a) *Marqueurs Microsatellites ou STR (Short tandem Repeats)*

L'ADN nucléaire est constitué d'environ 95% de régions non codantes : les introns et les régions inter-géniques. Au niveau de ces parties non codantes, les segments d'ADN sont caractérisés parfois par **la répétition en tandem** d'unités de base adjacentes composées de deux ou plusieurs nucléotides. La taille de ces fragments, ou **allèles**, est variable en nombre de répétitions.

L'intérêt principal des microsatellites est leur capacité à être de bons marqueurs génétiques. En effet, ils sont abondants dans le génome, neutres, co-dominants et surtout hypervariables en taille. Le polymorphisme ainsi détecté est un polymorphisme de longueur (un allèle donné correspondra le plus souvent à un nombre de répétition (en théorie) déduit de la taille de l'amplification (en pratique). Ils sont facilement mis en évidence par PCR par des amorces spécifiques situées dans les séquences uniques flanquant la séquence du microsatellite.
L'étude des microsatellites est surtout utilisée dans le complexe *esculentus* afin de mesurer la diversité génétique des différents taxons (*ridibundus, lessonae* et hybride *esculentus* et leur origine (Hoffmann *et al*, 2015) et de mesurer l'invasion du génome *P. ridibundus* dans les populations hybrides *esculentus* natives (Leuenberger *et al*, 2014). Les analyses de diversité génétique s'effectuent sur plusieurs dizaines de microsatellites. Le Tableau 6 expose un éventaire non exhaustif des microsatellites développés dans la littérature.

Tableau 6 : Exemple de microsatellites développés dans le complexe* Esculentus *(Hoffmann* et al*, 2015) au niveau de l'Europe Centrale.

Marqueurs	Motif répété	Références	GenBank ID	Génome spécificité
RICA 1b6	(TG)n	(Arioli *et al*, 2010)	EF121548	*Lessonae et Ridibundus*
RICA 1b5	(CA)n	(Garner *et al*, 2000)	AF286388	*Lessonae et Ridibundus*
Gala19 redesigned	(CT)n	(Christiansen, 2009) (Arioli *et al*, 2010)	EF121547	*Lessonae et Ridibundus*
Res16	(CA)n	(Zeisset *et al*, 2000)	AF195843	*Lessonae et Ridibundus*
Rrid064A	(GT)n…(TA)n(GT)n	(Christiansen et Reyer, 2009)	EU445524	*Ridibundus*
Re2Caga3	$(CAGA)_6TTA(GATA)_1(GACA)_1(GATA)_{20}(GACA)_1$	(Arioli *et al*, 2010)	EF121550	*Ridibundus*
Res22	(CA)n	(Zeisset *et al*, 2000)	AF195846	*Ridibundus*
Rrid013A	(ACT)n	(Hotz *et al.*, 2001)	FJ024047	*Ridibundus*
Rrid059A redesigned	(CA)n	(Hotz *et al.*, 2001; Christiansen et Reyer, 2009)	FJ024048	*Ridibundus*
Rrid135A	(CA)n(TA)n	(Christiansen et Reyer, 2009)	EU445526	*Ridibundus*
RICA2a34	(GT)n	(Christiansen et Reyer, 2009)	EU445521	*Lessonae*
Gala23	(GA)n	(Christiansen et Reyer, 2009)	EU445523	*Lessonae*
Ca1A27	(CA)n	(Christiansen et Reyer, 2009)	EU445522	*Lessonae*
RICA18	(CA)n	(Garner *et al*, 2000)	AF86386	*Lessonae*
RICA5	(CA)n	(Garner *et al*, 2000)	AF286385	*Lessonae*

(b) *Espaceur interne transcrit 2 de l'ADN ribosomique : ITS2*

L'ADN ribosomique chez les eucaryotes possède des répétitions de séquence en tandem (Figure 15 : NTS : espaceur non transcrit et TU : unité de transcription). Ces unités de transcription contiennent les séquences conservées des gènes ribosomiques (18S, 5.8S et 28S) et des séquences possédant une variabilité élevée inter et intra-spécifique (Schultz *et al*, 2005 ; Müller *et al*, 2007) que sont les espaceurs internes ITS (Internal Transcribed Spacer : ITS1 et ITS2) et les espaceurs transcrits externes ETS (External Transcribed Spacer : 5'ETS et 3' ETS) (Figure 15) (Patrelle, 2010).

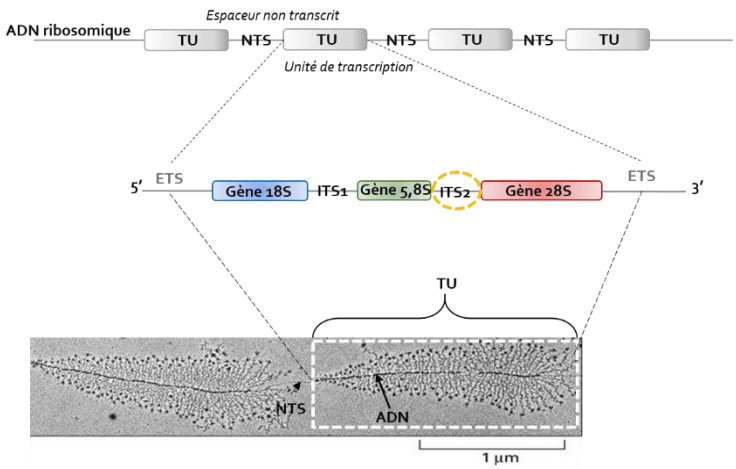


Figure 15 : Représentation schématique de l'ADN ribosomique :
ITS : espaceurs internes transcrits 1 et 2
ETS : espaceurs externes transcrits

L'espaceur interne transcrit 2 (ITS 2) est utilisé comme marqueur phylogénétique depuis les années 1990. Il est intéressant pour expliquer les relations entre espèces ayant récemment divergées, ainsi que pour l'identification d'espèces morphologiquement similaires (Joseph *et al*, 1999) et notamment dans le cas de complexes d'hybridation (Auvray *et al*, 2009). ITS 2 est présent en de nombreuses copies dans l'ADN et est porté par plusieurs chromosomes (autosomes et sexuels). La séquence ITS 2 montre des variations de longueurs importantes parmi les vertébrés, mais sa taille reste relativement homogène au sein de chaque groupe d'espèces (Joseph *et al*, 1999). C'est pourquoi cette région est utilisée pour identifier les différentes espèces de « grenouilles vertes » de l'Europe Occidentale.
La méthode d'analyse utilisant le polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP) a été développée par Patrelle (Patrelle *et al*, 2011). La région ITS 2 a été amplifiée par les amorces développées par Ohst en 2008 sur une série d'individu. Elle a sélectionné une région du domaine plus restrictive d'ITS2 conservée (271 bp) et après amplification par PCR, une digestion enzymatique a été réalisée sur chaque amplifiat. Ainsi la longueur des différentes séquences ITS2 varient de 233 à 244 bases. Ces différences sont le résultat de délétions et/ou d'insertions de nucléotides au cours de l'histoire évolutive des populations. Cette méthode permet de faire le *distingo* entre les *P. ridibundus*, les *P. lessonae* et les hybrides *P. kl. esculentus,* par contre cette méthode ne permet pas de faire de différence entre les *P. rididbundus* et les autres espèces du groupe *ridibundus* (Patrelle, 2010).

(c) *Intron 1 du gène de l'albumine sérique (SAI-1)*

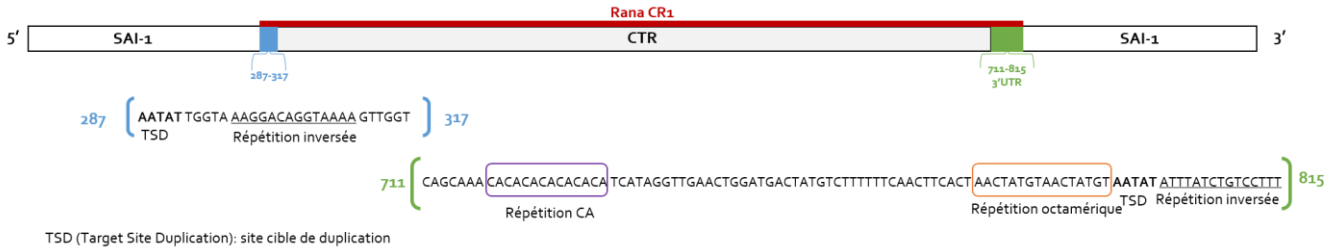


Figure 16 : Représentation schématique de l'intron-1 de l'albumine sérique des Grenouilles du paléarctique occidental (Plötner* et al*, 2009)

L'intron 1 du gène de l'albumine sérique (SAI-1) a été décrit et comparé chez les grenouilles du paléarctique occidental (Plötner, et al., 2009). Cet intron montre un polymorphisme de longueur important suivant les espèces du genre *Pelophylax*. Cette variabilité de longueur est due à la présence d'un élément transposable de type rétrotransposon non LTR (Long Terminal Repeat). Ce rétrotransposon Rana CR1 appartient à la famille des « Chicken Repeat » (CR) et à la sous classe des

« LINEs » (long INterspersed Elements) qui possèdent tout le matériel génétique nécessaire à la synthèse de leurs enzymes de rétrotranscription. Il est présent chez toutes les grenouilles vertes du paléarctique occidental. La particularité de ce Rana CR1 est que la région 3' UTR (UnTranslated Region) contient un microsatellite (répétition en tandem (CA)) en amont d'une séquence octamérique répétitive (Figure 16) (Plötner *et al*, 2008).
Le polymorphisme de cet intron 1 du génome de l'albumine sérique a été utilisé également afin de déterminer par une PCR classique les espèces de grenouilles du complexe *esculentus* (*P. lessonae, ridibundus* et *kl. esculentus*) mais aussi déterminer la ploïdie des individus et le type des hybrides : RL, LLR ou RRL (Hauswaldt *et al*, 2012) .

4. Déclin des amphibiens et pollution

A. La sixième extinction massive

En paléontologie, l'extinction de masse est caractérisée par la perte des trois-quarts des espèces terrestres animales ou végétales existantes lors d'évènements brefs à l'échelle géologique. Il est admis que la Terre a traversé cinq grandes extinctions appelées aussi crises biologiques (Barnosky, et al., 2011).

1. A l'échelle du vivant

La première période d'extinction massive s'est produite entre l'Ordovicien et le Silurien (-440 Millions d'années) où 85 % de la vie marine s'est éteinte à la suite de grandes fluctuations des niveaux des océans dues à des périodes de glaciations suivies de réchauffement planétaire (Wake et Vredenburg, 2008). La deuxième extinction, au Dévonien supérieur (-360 Millions d'années), marque la disparition de 70 % des espèces animales. Au cours de cette période, de multiples glaciations associées à une anoxie des océans en seraient responsables. A noter que les amphibiens, premiers vertébrés terrestres, apparaissent à cette période et ont survécu à cet évènement (Wake et Vredenburg, 2008). La troisième période, au Permien-Trias (-251 Millions d'années), est la plus importante, marquée par la disparition de plus de 90 % des espèces terrestres et aquatiques. Les causes sont multiples et discutées mais la plus retenue est l'activité volcanique intense qui a engendré des modifications climatiques importantes. Il faut retenir que les anoures, les urodèles et les apodes font partie des rares vertébrées à avoir survécu.
La quatrième extinction, durant le Trias (-200 Millions d'années), a vu disparaitre 20 % des espèces marines, la plupart des reptiles et des oiseaux et les derniers grands amphibiens (au total, la moitié de la diversité biologique sur terre a disparu). En revanche, des représentants des trois ordres d'amphibiens actuels ont survécu. La forte activité volcanique avec un déversement massif de lave dans les océans et un réchauffement climatique global sont les causes les plus évoquées. La cinquième et dernière crise achevée (-65 Millions d'années) est la crise du Crétacé-Tertiaire, la plus connue car elle marque la fin des dinosaures où six à huit espèces sur dix disparurent (75 % des espèces). Les causes sont encore discutées à ce jour. Il pourrait s'agir d'une association entre une importante activité volcanique et l'impact d'une météorite qui auraient eu pour conséquence une chute rapide des températures atmosphériques et une augmentation des températures des eaux profondes. La grande majorité des familles d'amphibiens de l'époque ont survécu à cela (Wake et Vredenburg, 2008).
Au total, sur les 4 milliards d'espèces estimées comme ayant évolué sur la Terre durant les 3,5 milliards d'années derniers, environ 99 % auraient disparu (Barnosky *et al*, 2011). La liste des espèces disparues est toujours en augmentation puisque de nombreuses études récentes confirment que la Terre vit sa sixième extinction de masse, l'extinction de l'Holocène amorcée depuis une dizaine de milliers d'années (Wake et Vredenburg, 2008 ; Ceballos *et al*, 2010 ; Barnosky *et al*, 2011; Pievani, 2014). Actuellement, nous assistons à des changements environnementaux et à une perte de biodiversité qui sont plus rapides qu'à aucune autre période de l'histoire. Certaines populations animales et végétales sont en déclin. En effet, l'activité humaine a accéléré le rythme d'extinction

d'au moins 100 fois comparé au rythme naturel d'extinction. L'extinction actuelle provoquée par l'activité humaine est comparable à une crise biologique majeure puisque d'ici 2050, 25 à 50 % des espèces auront disparu. En effet, presque partout où les sociétés humaines se sont installées et ont prospéré, les grands animaux ont été massacrés, les écosystèmes durablement pollués et les habitats des autres espèces détruits. C'est pourquoi certains scientifiques désignent notre époque géologique comme la période de l'Anthropocène.
Or, plusieurs millions d'années sont nécessaires pour recouvrir une diversité biologique suite à une extinction massive. (Wake et Vredenburg, 2008 ; Ceballos *et al*, 2010 ; Pievani, 2014) (https://youtube/WfGMYdalClU : MAN – Steeve Cutts).

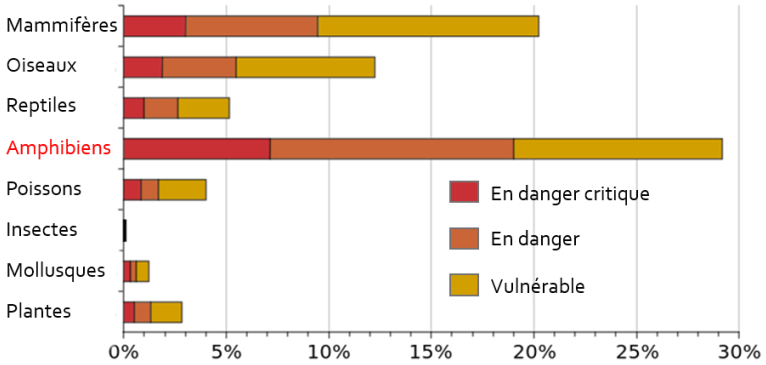


Figure 17 : D'après IUCN red list 2007, le pourcentage des espèces suivant la classification suivante : En danger critique, en danger et vulnérable dans différents groupes d'animaux.

Cette sixième extinction touche tous les organismes mais les amphibiens occupent la première place en termes d'espèces menacées (Figure 17).

2. A l'échelle des amphibiens

Depuis le début des années 1950, il a été observé une diminution des populations d'amphibiens en Amérique Centrale, du Sud et en Australie. Lors du premier congrès d'herpétologie en 1989, la communauté scientifique internationale a pris conscience de ce déclin massif des populations d'amphibiens. En effet, l'extinction de masse est particulièrement visible chez les amphibiens car le rythme d'extinction est 200 fois plus élevé que son rythme naturel (Roelants *et al*, 2007). Il apparait que 32 % des amphibiens sont menacés d'extinction, 43 % sont en déclin et 22 % pour lesquels les données sont insuffisantes ou manquantes (Stuart *et al*, 2004 ; Chanson *et al*, 2008 ; Hayes *et al* , 2010). De plus, la modélisation prédictive du déclin des amphibiens faite en 1997 (Pounds *et al*, 1997) s'avère aujourd'hui erronée car trop optimiste par rapport à ce que nous pouvons mesurer sur la disparition d'espèces.
Les différentes causes évoquées sont générées soit directement soit indirectement par les activités humaines. Elles incluent les modifications de l'habitat (destruction et/ou fragmentation), l'introduction d'espèces invasives, l'augmentation des radiations UV, l'acidification des milieux, l'émergence de maladies infectieuses et bien évidemment la multipollution reconnue de leurs habitats (Alfords et Richards, 1999) (Figure 18) car les zones humides sont des zones tampons qui accumulent une grande variété de polluants. D'après l'IUCN, la pollution chez les amphibiens est le deuxième facteur le plus important après la dégradation ou la perte d'habitat (Figure 18).

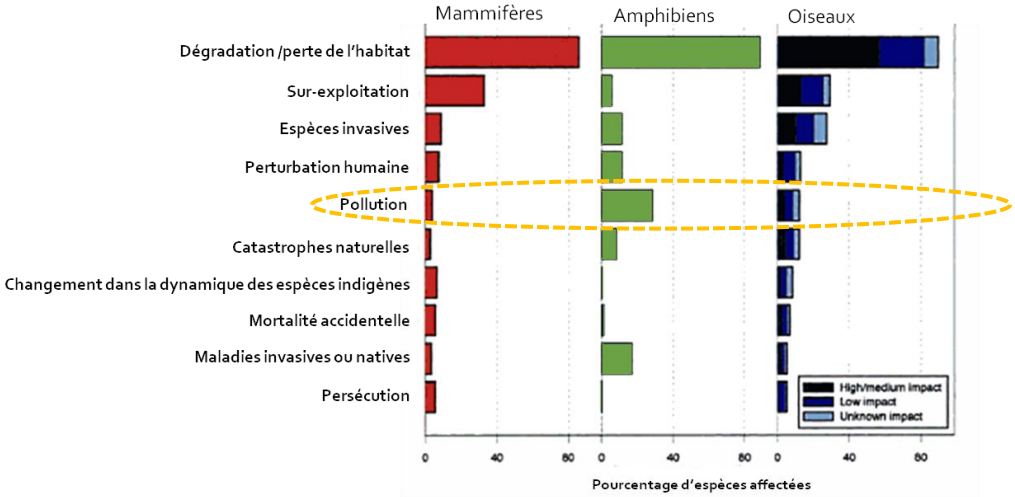


Figure 18 : Comparaison des pourcentages d'espèces affectées suivant les différents paramètres chez les mammifères, les amphibiens et les oiseaux d'après (Baillie* et al*, 2004)

Leur sensibilité et leur dépendance à deux habitats (terrestre et aquatique) font que les amphibiens sont considérés comme des indicateurs pour la santé environnementale (Bishop *et al*, 2012).
La peau des amphibiens est caractérisée par une forte perméabilité car elle joue un rôle physiologique dans la respiration (échange d'O_2 : environ 50 % peau/poumon, CO_2 : 75 %/25 % peau/poumon chez *Rana pipiens* à 15°C) et dans la régulation interne des concentrations en eau et en ions (sodium, chlore et potassium). La diffusion des xénobiotiques à travers la peau des amphibiens est jusqu'à deux fois plus importante que chez les mammifères. Cette perméabilité dépend de l'épaisseur de l'épithélium de la peau et notamment de la couche la plus extérieure (couche cornée). Celle des amphibiens est 10 fois plus fine que celle des mammifères ce qui constitue une barrière moins efficace (Hayes *et al*, 2006 ; Quaranta *et al*, 2009).
La peau semble être la voie majeure d'exposition aux contaminants (Tableau 7) mais les différentes autres voies semblent être importantes durant les différents stades de vie. Cependant, peu d'études s'intéressent à la compréhension de ces mécanismes (Smith *et al*, 2007).

Tableau 7 : Les voies d'exposition impliquées dans l'exposition aux contaminants chez les amphibiens et leur contribution relative et le degré de connaissance d'après (Smith* et al*, 2007).

Voie d'exposition	Classe d'âge/stades de vie	Contribution de l'exposition	Connaissance de la voie d'exposition
Ingestion	Toute	Elevée	Faible/moyen
Cutanée	Toute	Elevée	Faible
Pulmonaire	Larves	Elevée	Faible/moyen
Pulmonaire	Juvénile/Adulte	Faible	Faible

B. Les Polluants Organiques Persistants (POP)

Les POP sont devenus des produits chimiques préoccupants au cours des dernières décennies en raison de : (a) leurs ***effets toxiques*** sur le système nerveux, endocrinien et immunitaire, leur cancérogénicité, et leur mutagénicité (Hayes *et al*, 2011 ; Nadal *et al*, 2015), (b) leur potentiel à être ***bioaccumulés*** et ***bioamplifiés*** dans les réseaux trophiques aquatiques et terrestres à des niveaux qui peuvent engendrer des effets néfastes (Van Ael *et al*, 2012 ; Hung *et al*, 2013 ; Sun *et al*, 2014), (c) leur considérable ***résistance à la dégradation*** et (d) leur capacité à être ***transportés*** sur de

longue distance par les courants atmosphériques (Long Range Atmospheric Transport (LRAT)) et les courants marins. Ainsi, ces molécules peuvent se déposer loin des lieux d'émission, typiquement des milieux chauds (à forte activité humaine) vers les milieux froids (en particulier les pôles) (Bizzotto *et al*, 2009 ; Jakobi *et al*, 2015).

1. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)

a) *Caractéristiques générales*

Les HAP sont des composés organiques neutres et apolaires constitués d'au moins deux cycles aromatiques condensés contenant exclusivement des atomes de carbone et d'hydrogène, à l'intérieur desquels les électrons sont délocalisés. Ces cycles sont fusionnés par des arrangements linéaires (les moins stables) ou angulaires (les plus stables).
Les HAP ont une faible solubilité dans l'eau de l'ordre de 30 $mg.l^{-1}$ à 1 $mg.l^{-1}$ pour les composés légers (< 4 cycles) et de quelques $mg.l^{-1}$ à moins de 1 $\mu g.l^{-1}$ pour les composés lourds (≥ 4 cycles). Ils montrent une volatilité variable dépendante de leur nombre de cycles aromatiques. Plus le nombre de cycles aromatiques est grand, moins les HAP sont volatiles, ce qui est caractérisé par une constante de Henry inférieure à 1 $Pa.m^3.mol^{-1}$.
La demi-vie des HAP est dépendante du nombre de cycles qui les compose. En général, plus ils ont de cycles aromatiques, plus ils sont stables et persistants (Mackay *et al*, 2006), (http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/).
Les HAP de faible poids moléculaire non substitués, comportant 2 à 3 cycles, montrent une toxicité aiguë et de multiples effets sur les organismes mais ne sont pas carcinogènes. En outre, les HAP de hauts poids moléculaires comportant de 4 à 7 cycles se révèlent moins toxiques mais ils sont en revanche carcinogènes, mutagènes et tératogènes pour une grande variété d'organismes comme les poissons, les amphibiens, les oiseaux et les mammifères (Eisler, 1987).

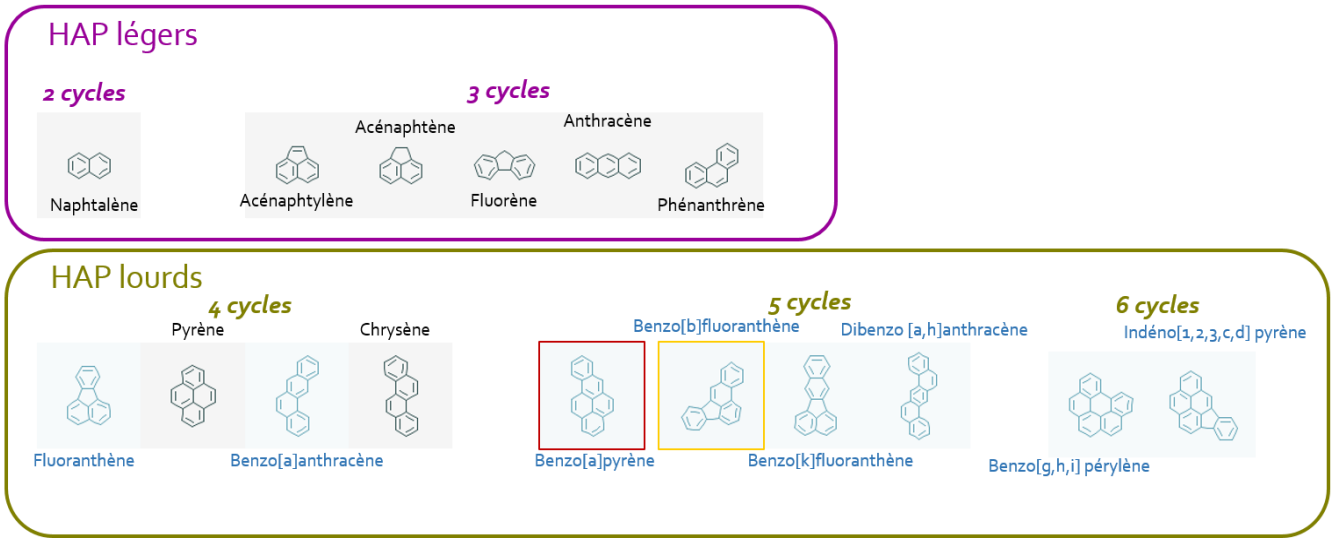


Figure 19 : Liste des 16 HAP prioritaires pour l'agence de protection de l'environnement Américaine US-EPA

Une liste de 16 HAP (Figure 19) est particulièrement considérée pour leurs impacts environnementaux et humains du fait de leur toxicité. Ce sont les polluants qui ont été retenus comme prioritaires par l'agence de protection environnementale américaine (US-EPA : Environment Protection Agency) dès 1976 (Wilson et Jones, 1993). Désormais, ils font également partie des listes de l'organisation mondiale de la santé (OMS) et de la communauté européenne relative à la qualité des eaux (JOCE 1998). Les HAP sont également inscrits sur la liste des substances dangereuses prioritaires de la Directive Cadre sur l'Eau (Directive 2000/60/CE).

En France, selon l'**Arrêté du 2 février 1998** relatif aux prélèvements et à la consommation d'eau ainsi qu'aux émissions de toute nature des installations classées pour la protection de l'environnement soumises à autorisation, les HAP mesurés au niveau de l'air et de l'eau sont au nombre de huit dont la structure chimique est représentée en bleu dans la Figure 19**.**

b) *Origine des HAP*

Selon leur origine, les HAP sont regroupés en trois catégories :

(1) *Les Pétrogéniques*

Les pétrogéniques correspondent aux hydrocarbures présents dans les bruts pétroliers (les HAP représentent 20 à 40 % en poids des pétroles bruts) d'origine naturelle ou des dérivés des produits pétroliers. Ils proviennent des matières fossiles des sous-sols tels que le gaz, le pétrole et le charbon. Ils sont formés à basse température (< 200°C) et à haute pression. Cette source est responsable d'émissions plus localisées chroniques (activité portuaire, raffinerie, lessivage des infrastructures routières) ou accidentelle (marée noire).
Les HAP pétrogéniques sont principalement composés d'HAP légers et de dérivés alkylés. Ils sont généralement plus hydrophobes et biodisponibles dans le milieu que les HAP pyrogéniques, car ils s'adsorbent moins sur les matières en suspension.

(2) *Les Pyrogéniques ou pyrolytiques :*

Les pyrogéniques ou pyrolytiques sont formés par la combustion incomplète de matière organique à haute température (> 500°C) d'origine naturelle (feux ou volcanisme) ou anthropique (activité domestique ou industrielle).
Ils sont émis lors de la combustion de bois, de tourbe, de charbon (feux naturels, chauffage domestique, procédés industriels), de carburant diesel ou essence, lors de la production et d'utilisation de goudron (distillation de houille), de bitume (distillation de pétrole brut), de créosote (distillation de goudron), de coke (combustion en haut fourneau de houille) et lors d'incinération de déchets.
Cette source est responsable de la majorité des émissions de HAP dans l'atmosphère.
Ils entrent dans le milieu aquatique en s'adsorbant sur des particules et la matière en suspension, ce qui réduit leur biodisponibilité. Ils sont généralement constitués de molécules à forts poids moléculaires et présentent peu de dérivés alkylés.

(3) *Les Biogéniques*

Les HAP biogéniques sont produits par les organismes (Hylland, 2006). Certaines plantes comme les conifères peuvent créer, par exemple, du phénanthrène ou du chrysène présent dans la résine.

Les origines pyrogéniques et pétrogéniques constituent les deux sources majeures d'émission de HAP dans l'environnement.

c) *Emission des HAP*

(1) *Du point de vue mondial*

L'émission des HAP est un phénomène global (Figure 20). L'émission des 16 HAP en 2004 est de 520 000 T/an dont 55 % sont émis par l'Inde et la Chine alors que l'**Europe** contribue à 9,5 % (Zhang et Tao, 2009).
Les HAP sont majoritairement issus d'émissions anthropiques représentant 90 % des émissions totales en HAP (Ravindra *et al*, 2008).

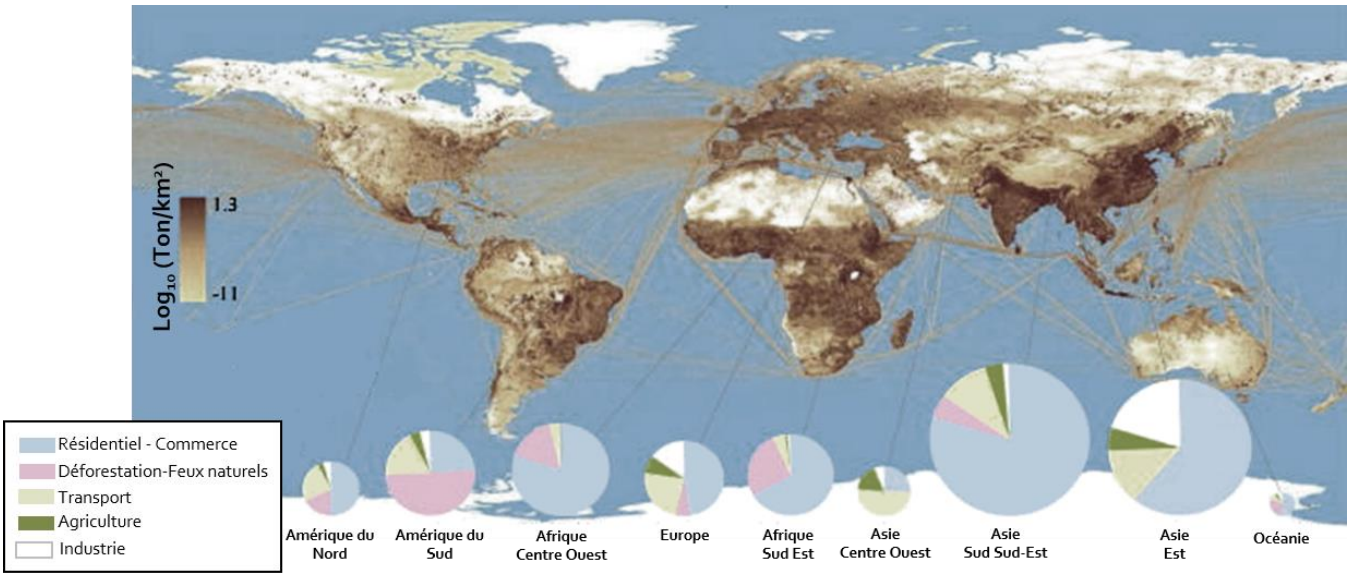


Figure 20 : Distribution spatiale des émissions globales en HAP en 2007 et proportion des différentes sources majeures d'après (Shen* et al*, 2013).

A l'échelle mondiale, près des deux tiers (63,4 %) des émissions totales de HAP sont produits par les secteurs résidentiel et commercial. Cela est particulièrement vrai pour les pays en développement de l'Afrique et l'Asie, principalement en raison de l'utilisation intensive de biocombustibles pour la cuisson et le chauffage. L'ensemble des pays asiatiques ont contribué à 53,5 % (270 000 T) des émissions en HAP total au niveau mondial ces dernières années. Dans ce contexte, la Chine et l'Inde ont émis respectivement 106 000 T et 67 000 T de HAP en 2007. L'Amérique du Sud (notamment le Brésil) a contribué à 50,8 % des émissions de HAP dont la source principale était les feux de forêt (déforestation). Les émissions de HAP provenant du transport ont contribué seulement à 12,8 % du total mondial, mais elles étaient relativement importantes en Asie occidentale et centrale (50,3 %), en Amérique du Nord (24,6 %) et en **Europe** (23,8 %). Bien que les sources industrielles aient contribué à 6,7 % des émissions totales de HAP mondiaux, elles étaient importantes en Asie de l'Est (20,4 %) et en **Europe** (15,1 %). Les principales sources industrielles étaient respectivement la production de coke (13,3 %), de fer et d'acier (2,6 %) et les chaudières industrielles (2,3 %) en Asie de l'Est. La production de coke (6,2 %), d'aluminium primaire (4,5 %) et de fer et l'industrie sidérurgique (2,9 %) étaient les sources majoritaires en **Europe** (Shen *et al*, 2013).

(2) *Du point de vue Français*

Les émissions des 8 HAP de la réglementation française s'élèvent à 76 T en 2013 contre 154 T en 1990 (CITEPA, 2016). On remarque une nette réduction des émissions de l'ordre de 50 % en 23 ans. Malgré ces efforts consentis, les HAP sont des substances ubiquistes dans les milieux aquatiques. En effet, les rapports annuels de l'agence de l'eau sur les bilans de la qualité des eaux de surface ou le travail de bilan national 2007-2009 du commissariat général au développement durable mettent en évidence la présence des HAP dans ces milieux de façon importante (Dubois et Lacouture, 2011; Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse, 2013).

En France, cinq sources majoritaires d'émissions de HAP sont identifiées par le CITEPA (Centre Interprofessionnel Techniques d'Etudes sur la Pollution Atmosphérique) qui sont : le transport routier, l'agriculture/sylviculture, le résidentiel/tertiaire, l'industrie manufacturière et la transformation d'énergie. La source d'HAP prépondérante correspond aux émissions résidentielles qui représentaient 52,4 % des émissions totales en 2011 et 61,1 % en 2013. Il s'agit principalement des émissions issues du chauffage. Le secteur des transports routiers représente 36,8 % des émissions

en 2011 et 24,3 % en 2013 (un apport important dû aux véhicules diesel). Les autres secteurs contribuent plus faiblement aux émissions tels que l'industrie qui représente seulement 4,9 % des émissions et l'agriculture représentant 3,4 %.

d) *Transfert des HAP dans les zones humides*

Les HAP au niveau des zones humides proviennent de dépôts atmosphériques humides (précipitations) et sec (particules en suspension) (Figure 21) (Bodnar *et al*, 2004). Les sols peuvent également désorber les HAP dans l'eau souterraine, l'eau de surface et l'air par des phénomènes d'érosion, de lessivage des particules du sol et de dispersion par le vent (Joner *et al*, 2002). Dans le milieu aquatique, la plupart des HAP se trouvent adsorbés sur les sédiments et la phase particulaire de la colonne d'eau (Figure 21). En effet, les HAP en phase dissoute sont en général en plus faible concentration qu'en phase particulaire (Fernandez *et al*, 1997). Le transport des HAP dans la colonne d'eau est influencé par les liaisons possibles entre le carbone organique et les HAP et déterminent ainsi le devenir de ces derniers (Bouloubassi *et al*, 2006).
Les sédiments jouent un rôle majeur dans la biodisponibilité des HAP dans l'environnement aquatique. En effet, **les zones humides, par l'intermédiaire des sédiments, agissent comme des zones puits mais aussi comme des sources permanentes de contamination aux HAP** à cause des phénomènes de resuspension et de bioturbation (Le Dû Lacoste, 2008).

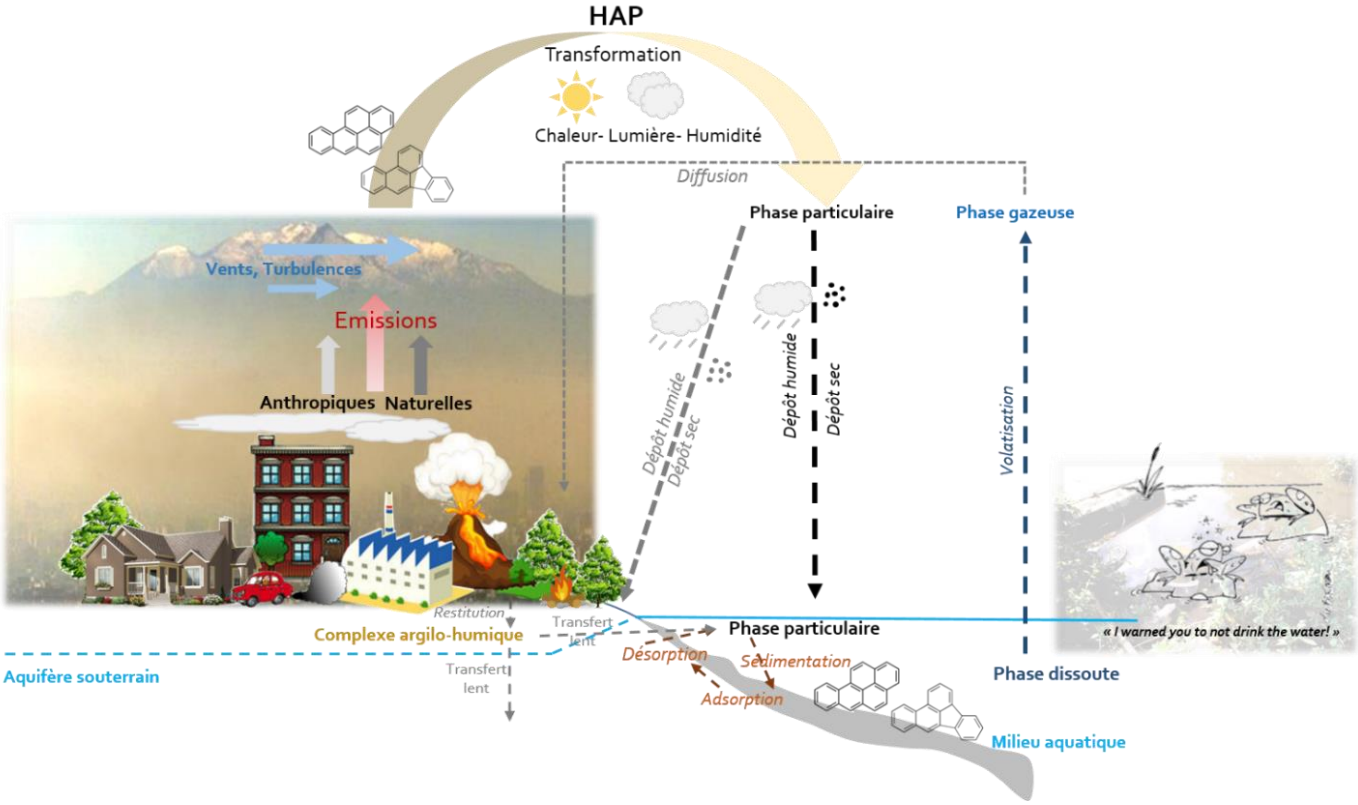


Figure 21 : Transport des HAP ou cycle géochimique des HAP

2. Biotransformation des HAP

A l'inverse de certains polluants organiques persistants (POP) comme les polychlorobiphényles (PCB) ou les polybromodiphénylethers (PBDE), les HAP sont généralement peu bioaccumulés dans les tissus des vertébrés malgré des logarithmes de coefficients de partage eau-octanol ($\log K_{ow}$) pouvant être élevés ($\log K_{ow}$ compris entre 3,3 pour le naphtalène (2 cycles) et 6,58 pour l'indénol[1,2,3,c,d]pyrène (6 cycles)). Une fois absorbés par les organismes, ils sont biotransformés par différentes réactions métaboliques impliquant l'action d'enzymes visant à rendre ces molécules plus hydrophiles afin de pouvoir être excrétées ensuite par les voies fécale et urinaire (Van der Oost

et al, 2003). Parfois ces molécules sont biotransformées en métabolites très réactifs sous l'action des enzymes de détoxication (composés électrophiles) et peuvent interagir avec l'ADN (carcinogène) (Gelboin, 1980; Shimada, 2006).
Ce processus de détoxication se déroule en trois phases qui font intervenir différentes enzymes de biotransformation : les enzymes de phase I comme les cytochromes à P450 pour lesquels les HAP à haut poids moléculaire ont une affinité plus importante que les HAP à faible poids moléculaire (Martins *et al*, 2015), les époxydes hydrolases (EH), les enzymes de phase II telles que la glutathrion-S-transférase (GST), l'UDP-glucoronyltransférase (UGT), la sulfotransférase (SULT), la NAD(P)H quinone oxidoréductase 1, et l'aldo-keto réductase (AKR) (Shimada, 2006) et des enzymes impliquées dans l'élimination (phase III) (Amiard et Amiard-Triquet, 2008).

a) *Enzymes de phase I : fonctionnalisation*

Les enzymes de phase I permettent la libération ou l'introduction d'une fonction chimique polaire par des réactions d'oxydation (les plus fréquentes), de réduction ou d'hydrolyse.
Ces réactions d'oxydation sont les premières à intervenir dans le système de détoxication. L'activité de ces réactions de mono-oxygénation est plus faible chez les amphibiens que chez les mammifères (Ertl et Winston, 1998),

(1) *Les cytochromes P450*

(a) *Caractéristiques générales*

Le terme général de cytochrome P450 regroupe une super famille multigénique de protéines enzymatiques dite « hémo-thiolate » à propriété redox. La grande diversité des réactions catalysées par les P450 est basée exclusivement sur deux propriétés : 1) la possibilité du fer à exister sous différents états d'oxydation avec des réactivités intrinsèques et 2) l'accessibilité du site catalytique à une grande variété de substrats aussi bien endogènes comme les stéroïdes, les acides gras, les acides biliaires qu'exogènes afin de les éliminer (Mansuy, 1998).
Les cytochromes P450 ont été mis en évidence en 1958 par Klingenberg (Klingenberg, 1958) dans une fraction microsomale de foie de rat grâce à leur pigmentation jaune-orange. Leur dénomination de P450 donné en 1962 par Omura et Sato (Omura et Sato, 1964) est donc issue de leur première caractérisation en Pigment (P) et 450 du fait de leur spectre d'absorption maximal à 450 nm à l'état réduit et complexé au monoxyde de carbone. Ils sont constitués d'une chaîne polypeptidique simple et d'un groupement prosthétique constitué d'un noyau tétrapyrolique (protoporphyrine IX) associé à un atome de fer constituant un noyau héminique. Cet atome de fer est capable de subir des réactions d'oxydation et de réduction. Le fer, lié aux quatre atomes d'azote de l'hème, possède une cinquième liaison thiolate avec une cystéine très conservée dans la partie C terminale. En l'absence de substrat, l'atome de fer est à l'état ferrique Fe^{3+}.
Les cytochromes P450 ont la capacité d'activer les molécules de dioxygène (O_2) en des entités réactives de l'oxygène et d'insérer ensuite l'oxygène moléculaire sur un nombre important et varié de substrat X-H tant au niveau d'un atome de carbone, que d'azote ou de soufre (X : -C, -N, -S). De façon concomitante, la réduction de l'autre atome d'oxygène conduit à la formation d'une molécule d'eau (Mansuy, 1998; Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000 ; Hannemann *et al*, 2007).

(b) *Nomenclature*

Il existe depuis 1989 une nomenclature spécifique pour les P450 (Nelson *et al*, 1993) (Nelson *et al*, 1996). Cette appellation utilise le symbole CYP comme abréviation pour le terme de cytochrome P450 aussi bien pour les ADNc, les ARNm que les protéines. Le même symbole est utilisé pour le gène mais noté en italique (*CYP)*. Les CYP sont classés en fonction de leur degré de similitude dans leur <u>séquence primaire en acides aminés.</u> Il existe des exceptions notamment sur les CYP intervenant dans le métabolisme des stéroïdes où l'ancienne nomenclature persiste. Le nombre juste après

le CYP correspond alors au numéro de l'atome du substrat où s'effectue la réaction de monooxygénation (exemple CYP 19).
Les familles des CYP sont désignées par un chiffre arabe écrit juste derrière CYP. Les CYP appartenant à la même famille montrent un degré de similitude supérieur à 40 % dans leur séquence protéique (exemple : CYP**1**, CYP**2**…)
Ces familles sont divisées en sous familles qui sont notées par une lettre majuscule. Ils appartiennent à la même sous famille si le degré de similitude de la séquence protéique est supérieur à 55 % (exemple CYP1**A**, CYP1**B**…).
Dans ces sous familles, il existe différentes isoformes notées par un chiffre arabe après la lettre de la sous famille (exemple : CYP1A**1**, CYP1A**2**…).

Dans le cadre du métabolisme des xénobiotiques et spécifiquement des HAP, il a été montré que ce sont les CYP appartenant à la famille 1 qui interviennent chez les mammifères et d'autres vertébrés comme les poissons (Reynaud *et al*, 2008), les reptiles et les amphibiens (Ertl et Winston, 1998) (Venturino et Pechen de D'Angelo, 2005) et qui sont induits via le récepteur aux hydrocarbures aromatiques AhR (Figure 23) (Whitlock, 1999), (Jönsson *et al*, 2011). En revanche, il existe des différences d'affinité entre le récepteur AhR des amphibiens et les différents HAP existants. Ceci influence la capacité de résilience des amphibiens à l'exposition des HAP (Ball et Truskewycz, 2013).

(2) *P450/NADPH-cytochrome P450 réductase*

La biotransformation des nombreux composés endogènes ou exogènes nécessite des processus oxydatifs. Le système enzymatique principal catalysant ces réactions chez les Eucaryotes est le système cytochrome P450/NADPH-cytochrome P450 réductase catalysant la réaction décrite en Figure 23 (Hannemann *et al*, 2007).
Ils sont impliqués dans des réactions aussi diverses que par exemple des hydroxylations, des N-, O-, S- désalkylations, des sulfoxydations, des époxydations, des désaminations, des désulfurations, des déshalogénations (Bernhardt, 2006).

Les mono-oxygénases liées au cytochrome P450 chez les eucaryotes sont composées d'une protéine ancrée dans la membrane du réticulum endoplasmique par une courte séquence hydrophobe transmembranaire constituée de 20 à 30 acides aminés en N-terminale (Cytochrome P450) et de la NADPH P450 réductase contenant deux groupes prosthétiques FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) et FMN (Flavine MonoNucléotide). Ces deux groupements sont des coenzymes qui permettent le transfert d'électrons.
Chez les vertébrés, il existe plusieurs gènes *CYP1* qui engendre différentes sous classes : CYP1A, CYP1B, CYP1C et CYP1D. Chez les mammifères, le gène *CYP1C* est perdu et il existe deux gènes *CYP1A* paralogues (duplication du gène commun) : *CYP1A1, CYP1A2*. Chez le poulet, il existe deux gènes *CYP1A* qui sont *CYP1A4 et CYP1A5* et qui sont orthologues (divergence due à la spéciation) de ceux des mammifères.
Chez les amphibiens, particulièrement chez le xenope *laevis*, on retrouve deux gènes *CYP1A* qui sont *CYP1A6* et *CYP1A7* (Fujita *et al*, 1999) ainsi qu'un gène *CYP 1B* et *1C* (Iwamoto *et al*, 2012) alors que chez le xenope *tropicalis*, Jönsson *et al* (Jönsson *et al*, 2011) ont identifié quatre gènes *CYP1A, CYP1B1, CYP1C1* et *CYP1D1*. Ces quatre gènes se retrouvent chez les poissons également et sont inductibles de la même façon. En effet, *CYP1A* est plus inductible que *CYP1B1* et que *CYP1C1* par des agonistes du récepteur aux hydrocarbures aromatiques (PCB126, indigo et Beta naphtoflavone), mais le *CYP1D1* n'est pas induit chez les têtards. Des études faites sur différentes espèces de grenouilles appartenant à l'ordre des anoures au Japon montrent des identités de fragments du *CYP1A* de l'ordre de 91-94 %. Néanmoins, entre ces anoures et le xénope *laevis*, l'homologie est faible, ainsi qu'entre l'ordre des anoures et des urodèles (Nakayama *et al*, 2009).

(3) *Les Epoxyde Hydrolases (Microsomale* EC 3.3.2.9 *; soluble* EC 3.3.2.10*)*

Les Epoxyde hydrolases sont une classe d'enzymes importante intervenant aussi bien dans les processus de détoxication des composés génotoxiques que dans le contrôle physiologique. Ce sont des enzymes qui convertissent les époxydes en trans-dihydrodiols qui peuvent être conjugués et excrétés de l'organisme. Elles sont à l'interface des phases I et des phases II de détoxication. On peut effectivement considérer que l'hydrolyse des époxydes correspond à une conjugaison avec l'eau sans fractionner la molécule époxyde. Elles peuvent être microsomiales ou cytosoliques (Arand *et al*, 2005 ; Iyanagi, 2007).

b) *Enzymes de phase II : conjugaison*

Les réactions de conjugaison possibles, soit directement sur la molécule parente si celle-ci possède les motifs structuraux appropriés, soit sur les métabolites issus de la phase I d'oxydation ayant libéré ou introduit des groupes fonctionnels, augmentent la masse molaire du substrat et sa solubilité dans l'eau en ajoutant une charge négative. Ces changements des propriétés physico-chimiques confèrent à ces conjugués une faible perméabilité membranaire et donc la nécessité d'être pris en charge par des systèmes de transport spécifiques les amenant soit vers l'excrétion biliaire soit vers l'excrétion urinaire via le sang (Zamek-Gliszczynski *et al* , 2006).

(1) *Les Sulfotransférases (SULT : EC 2.8.2)*

La sulfatation hépatique des xénobiotiques est une réaction importante de la phase II de détoxication. Elle se fait dans le cytoplasme et nécessite la présence d'un cofacteur l'adénosine 3'-phosphate-5'sulphatophosphate (PAPS) issu de la conjugaison de l'adénosine monophosphate avec le sulfate inorganique et de la phosphorylation de ce composé (Figure 23). Cette réaction de sulfatation peut se résumer par la réaction suivante (encadré gris : Figure 22). Elles ont comme substrat des phénols ou des diols.

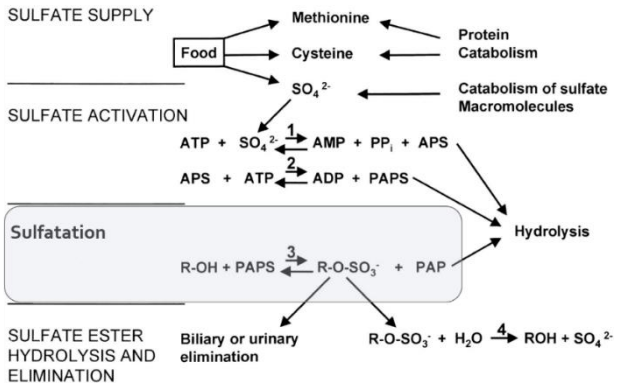


Figure 22 : Processus généraux dans la formation, activation et la conjugaison des sulfates chez les mammifères d'après (Markovitch, 2001). *1, ATP-sulfurylase; 2, APS kinase; 3, sulfotransferases; 4, sulfatases. APS, adenosine 5'-phosphosulfate ; PAPS, adenosine 3'-phosphate 5'-sulfatophosphate*

La synthèse du PAPS est rapide mais limitée par la concentration hépatique en sulfate. Cette concentration hépatique est directement liée à l'apport fait via le sang au niveau du foie. Dans la majorité des cas, c'est le cofacteur qui limite la réaction de sulfatation. Cette réaction prédomine lorsque le substrat est en faible concentration. Dès lors que le substrat est en forte concentration, la sulfatation est saturée et les UDP-glucuronyltransférases sont activées (Zamek-Gliszczynski *et al*, 2006).

Il existe plusieurs familles (1 à 4) et celle plus impliquée dans la détoxication des HAP correspond à SULT 1 correspondant à la famille des phénol-sulfotransférases (PST). Cette famille est également subdivisée en sous famille (A-B-C-D-E) avec SULT1A spécifique des xénobiotiques type phénol chez les mammifères (Zamek-Gliszczynski *et al* , 2006).
L'étude de (Ueda *et al*, 2011) montre que les amphibiens conjuguent principalement les métabolites du pyrène (HAP à 4 cycles) avec un sulfate, ce qui n'est pas décrit pour les autres vertébrés (conjugaison avec l'acide glucuronique). Au sein de cette classe, les anoures (grenouilles) et les urodèles

(tritons et salamandres) montrent des profils de conjugaison des métabolites du pyrène différents. Chez les grenouilles, il est retrouvé une forte proportion de sulfoconjugués et une faible proportion de conjugaison avec l'acide glucuronique et une absence de conjugaison au glucose, alors que chez les urodèles, il est observé une conjugaison avec le glucose.

(2) *L'UDP-glucoronyltransférase (UGT : Ec2.4.1.17)*

La glucuronidation est la forme la plus répandue de « conjugaison » dans le métabolisme des mammifères. Cette réaction de glucurono-conjugaison est catalysée par la famille multigénique des Uridine DiPhosphate (UDP) glucuronosyl transférases (UGT). Ces enzymes membranaires (ancrées dans la membrane par la partie C-terminale) sont localisées au niveau du réticulum endoplasmique des cellules de la grande majorité des tissus de l'organisme. Elles catalysent le transfert d'un groupement glucuronide provenant du cofacteur : l'acide Uridine-5'-DiPhospho-α-D-glucuronique (UDP-GA) sur différentes molécules endogènes ou exogènes possédant un groupement hydroxyle, carboxyle, amine ou thiol (Figure 23). La molécule issue de cette réaction est généralement inactive, hydrosoluble, moins toxique. Cette réaction se fait dans le lumen du réticulum endoplasmique (Figure 23).
Le cofacteur est synthétisé dans le cytoplasme à partir du Glucose-1-Phosphate (G1P) en subissant dans un premier temps une conjugaison à l'Uridine DiPhosphate (UDP) pour donner l'UDP-Glucose qui est dans un second temps oxydé en UDP-GA.
Il existe deux familles d'UGT notées UGT1 et UGT2 qui contiennent une région C-terminale bien conservée qui est responsable de la fixation de l'UDPGA et également de l'attachement à la membrane du réticulum endoplasmique. Il existe également des sous familles qui montrent des spécificités à certains substrats. Par exemple, UGT1A intervient dans la détoxication du foie notamment pour la dégradation de la bilirubine dans le foie (UGT1A1) et leur induction a été observée lors d'exposition aux HAP (Zamek-Gliszczynski *et al* , 2006).
Il a été également observé une conjugaison avec le glucose par l'intermédiaire de l'Uridine-5'-DiPhospho-α-D-Glucose (UDP-Glucose) (Figure 23) chez les amphibiens urodèles (Ueda *et al*, 2011). Chez les anoures, la conjugaison à l'acide glucuronique ou le glucose est peu rencontrée (Ueda *et al*, 2011).

(3) *Les Glutathion-S-transférases (GST : EC 2.5.1.18)*

Les Glutathion-S-transférases sont des enzymes appartenant à une super famille de protéines dimériques qui interviennent dans les processus de détoxication en catalysant la conjugaison du glutathion GSH avec une grande variété de substrats électrophiles.
Ces enzymes ainsi que le glutathion sont présents en forte concentration dans de nombreux organes et notamment dans le foie. Le glutathion a une concentration de 10 mM dans le foie (mammifère) et cette concentration intracellulaire ne s'épuise quasiment jamais (sauf pathologie). Le glutathion est le cofacteur stable formé par trois acides aminés (Acide Glutamique- Cystéine-Glycine).
Les Glutathion-S-transférases sont situés à plus de 95 % dans le cytoplasme (Parkinson, 2001) et il existe de faibles activités dans le réticulum endoplasmique (Zamek-Gliszczynski *et al*, 2006).
La conjugaison du glutathion peut se réaliser spontanément mais cette conjugaison est plus efficace lorsque les réactions sont activées par les GST. Ces réactions de conjugaison utilisent comme substrat des composés fortement électrophiles, où le glutathion sous sa forme réduite (GSH) va se fixer en formant un pont thioéther (Figure 23)
La structure et les fonctions des GST de mammifères ont été largement étudiées. Elles ont été regroupées en 12 classes différentes nommées par des lettres grecques : Alpha, Beta, Delta, Kappa, Mu, Omega, Phi, Pi, Sigma, Tau, Thêta and Zeta en fonction de leur homologie et de leurs propriétés. Chez les amphibiens peu d'études ont été menées. Certains auteurs montrent l'existence de GST Pi chez le crapaud commun *Bufo Bufo* (Amicarelli *et al*, 2001; Bucciarelli *et al*, 2002) avec une expression différente des isoenzymes trouvées chez les embryons et dans le foie des individus adultes. De plus, chez le xenope *laevis*, il a été mis en évidence trois isoformes : alpha, mu et sigma

présentes aussi bien chez l'embryon que dans le foie des individus adultes mais dans des proportions différentes (Angelucci *et al*, 2002). L'évolution des vertébrés permettant la transition du milieu aquatique au milieu terrestre caractérisée par une concentration élevée en oxygène et accompagnée par une expression des gènes GST spécifiques, ceci étant montré par des études comparées entre le stade embryonnaire aquatique et le stade adulte terrestre du crapaud (Carletti *et al*, 2003).

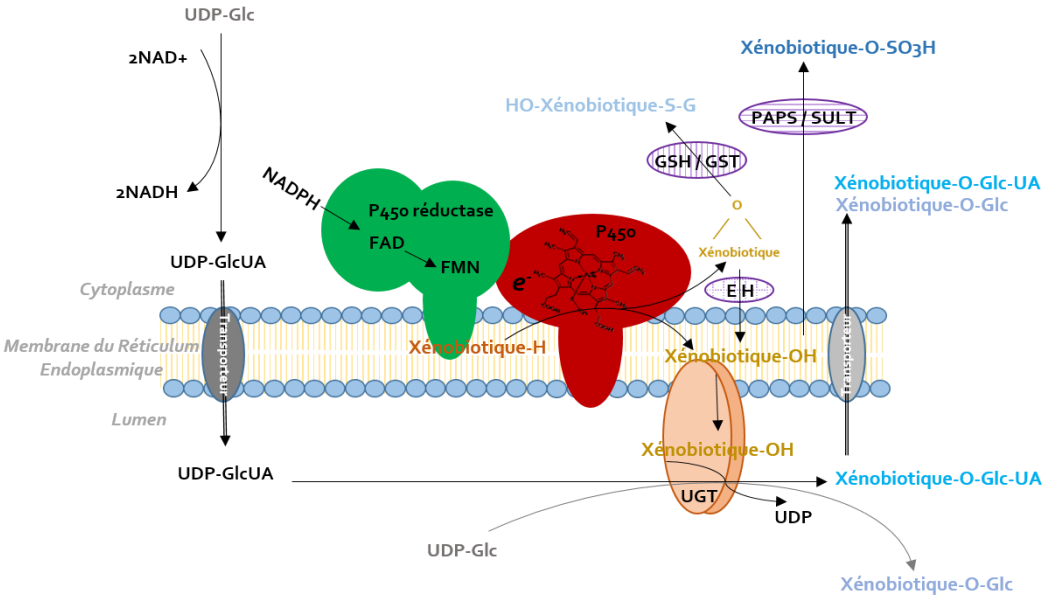


Figure 23 : Vue d'ensemble non exhaustive schématisée des réactions intervenant dans la biotransformation des xénobiotiques type HAP : topologie des cytochromes P450 chez les eucaryotes *(Hannemann* et al*, 2007)****, des UGT (représenté sous forme de dimère) d'après*** *(Iyanagi, 2007).*

Phase I :

Cytochrome P450 représenté par la NAPH P450 réductase (en vert) et le cytochrome P450 (en rouge).

Phase II :

PAPS/SULT : adenosine 3'-phosphate 5'-sulfatophosphate/Sulfotransférase

UDP-Glc : Uridine DiPhosphate-Glucose précurseur de l'UDP-GA : L'Acide Uridine-5'-DiPhospho-α-D-glucuronique. UGT : L'UDP-glucoronyltransférase.

GSH/GST : Glutathion/ Glutathion-S-transférase

(4) *Induction Enzymatique via le récepteur AhR*

La présence des HAP dans le cytoplasme entraine une induction spécifique de certaines enzymes de détoxication métabolisant les xénobiotiques comme les Cytochromes P450, les UGT et les GST. En effet, un récepteur aux hydrocarbures aromatiques cytoplasmique très spécifique des HAP, l'Aryl hydrocarbon Receptor (AhR), est lié à divers facteurs cytoplasmiques tels que les heat shoch protein 90 (hsp90) et les AhR Interacting Protein (AIP). L'association entre l'AhR, les 2 hsp90 et l'AIP confère au récepteur cytoplasmique une spécificité optimale vis-à-vis des HAP. Dès sa pénétration dans la cellule, le HAP se lie spécifiquement à l'AhR. Cette liaison récepteur / ligand induit un changement de conformation du récepteur se traduisant par la dissociation de l'AhR avec les autres facteurs (les hsp90 et l'AIP). Cette dissociation entraine la translocation de l'AhR couplé au HAP dans le noyau. Ce complexe (AhR-HAP) se lie spécifiquement à une protéine nucléaire l'Ah receptor nuclear translocator (Arnt) pour constituer un hétérodimère considéré comme un facteur de transcription crucial dans l'induction de l'expression de plusieurs gènes. Ce dernier va se fixer sur l'élément de réponse aux xénobiotiques XRE situé au niveau du promoteur du gène à transcrire (Figure 24). Ainsi les HAP sont capables d'induire l'expression génique du *CYP 1A* et des *GST alpha*. En revanche, l'induction par les HAP via le récepteur AhR a été faiblement observée pour les SULT et les UGT (augmentation du taux d'enzymes de 2 à 3 fois seulement) (Zamek-Gliszczynski *et al*, 2006). L'impact des HAP sur les amphibiens tend à être différent suivant l'espèce

et le stade de vie. En effet, plusieurs espèces d'amphibiens, comme les têtards de *Xenopus laevis*, montrent une plus forte tolérance aux HAP due à une plus faible affinité entre le récepteur à AhR et les HAP. Cette résilience aux effets toxiques du 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) et du BaP a été montré par des études faites sur des souris dont le gène du récepteur Ah a été inactivé ou des poissons dont le gène *CYP1A* était peu inductible (Fernandez-Salguero, Hilbert, Rudikoff, Ward, & Gonzales, 1996) (Bello *et al*, 2001; Shimizu *et al*, 2000). Cela semble suggérer que la diminution de la fonction du AhR protège des effets délétères des HAP (Elskus, 2005) en limitant leur bioactivation.

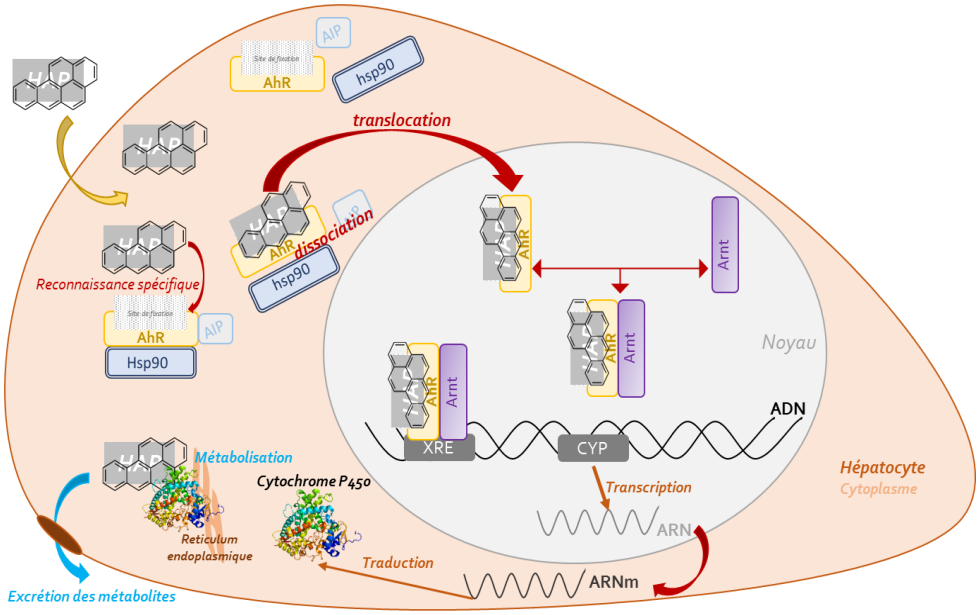


Figure 24 : Représentation schématique de l'induction des cytochromes P450 via le récepteur AhR
HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques ; AhR : l'Aryl hydrocarbon Receptor : récepteur aux hydrocarbures aromatiques ; hsp 90 : heat shoch protein 90 (protéine du choc thermique) ; AIP : AhR Interacting Protein (protéine interagissant avec le récepteur aux hydrocarbures aromatiques) ; Arnt : l'Ah receptor nuclear translocator (Arnt) ; XRE : xenobiotic response element (élément de réponse aux xénobiotiques qui est une séquence spécifique dans le promoteur des gènes à transcrire) (Whitlock, 1999) (Whyte et al, 2000)

c) *Enzymes de phase III : élimination*

En général, les métabolites ainsi créés lors des différentes étapes de biotransformation sont très hydrophiles. Ils ne peuvent donc pas diffuser à travers la membrane, notamment de manière passive, au niveau des canaux biliaires et du sang sinusoïdal (excrétion basolatérale). Il existe donc des transporteurs membranaires spécifiques qui se situent soit au pôle apical soit au pôle basolatéral de la cellule afin d'éliminer les métabolites au niveau de la bile ou du sang.
Ces transporteurs de phase III sont des systèmes de transport actif utilisant l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP pour transporter les substrats à travers les membranes biologiques. C'est pourquoi on les appelle les ABC-transporteurs, pour ATP-Binding Cassette. Il s'agit d'une grande superfamille de protéines transmembranaires dont font partie les Multidrug resistance-associated proteins (MRP) (Omiecinski *et al*, 2011).

3. Biotransformation du BaP

La métabolisation du BaP (Figure 25) met en jeu des enzymes de phase 1, notamment les cytochromes P450 et les époxydes hydrolases (EH). Les cytochromes P450 jouent un rôle important dans son activation (Figure 25-P450). En effet, à la suite de cette phase, certains métabolites seront conjugués mais d'autres particulièrement réactifs, notamment les époxydes en région baie (dihydrodiol époxyde) peuvent réagir avec l'ADN pour donner des adduits. Il existe deux autres voies

d'activation du BaP que sont la voie du radical cation et la voie des quinones (Zhang *et al*, 2012 ; Ball et Truskewycz, 2013 ; Ifegwu et Anyakora, 2015)

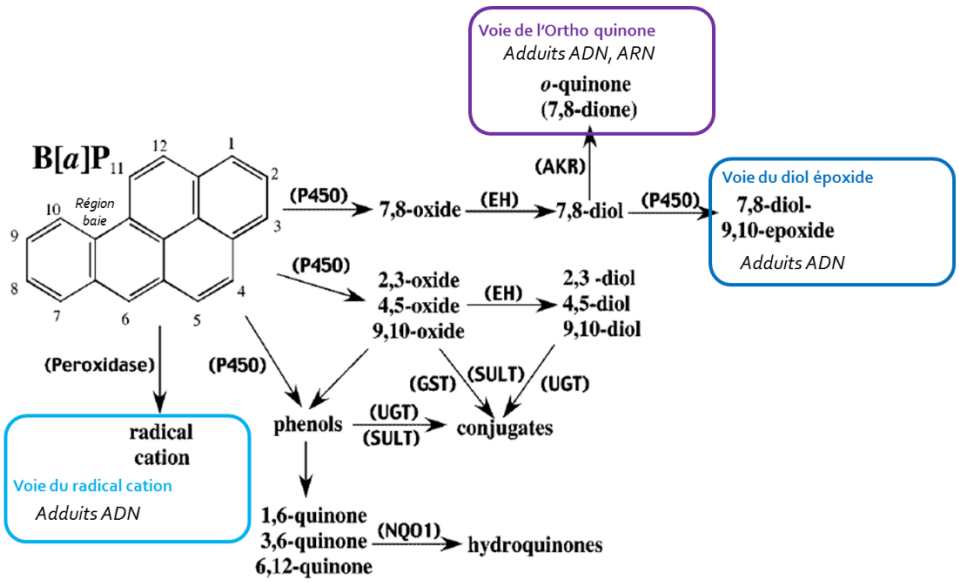


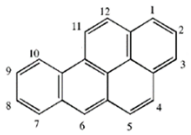
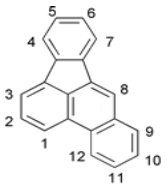
Figure 25 : Métabolisation du BaP : P450 : cytochrome P450 ; EH : époxyde hydrolase ; GST : glutathion transférase ; UGT : UDP-glucuronyltransférase ; SULT : sulfotransférase ; NAD(P)H quinone oxydoréductase 1 ; AKR : aldo-kéto réductase d'après *(Shimada, 2006)* ***et les différentes voies d'activation du BaP d'après*** *(Ifegwu et Anyakora, 2015)*

4. HAP de l'étude : Benzo[a]pyrène et Benzo[b]fluoranthène

a) *Caractéristiques générales*

Le Benzo[a]pyrène (BaP) ainsi que le Benzo[b]fluoranthène (BbF) sont d'origines pyrolitiques, le volcanisme et les feux de forêt constituant les sources naturelles de production de ces deux molécules. Mais les principales sources de contamination dans l'environnement sont liées aux activités humaines, tels que les gaz d'échappements des moteurs thermiques, le chauffage industriel (combustion de fioul, charbon, bois et gaz) (INERIS, 2005 ; INERIS, 2006 ; Srogi, 2007), (https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F-14.pdf). Ils sont ainsi émis en grande quantité dans l'atmosphère (Figure 20) où ils sont majoritairement liés à la phase particulaire de l'air. Le BaP et le BbF peuvent ainsi être transportés sur de longues distances et contaminer les sols et l'eau de surface via les dépôts atmosphériques secs ou humides (Figure 21). Dans les milieux aquatiques, le BaP est stable avec une demi-vie allant de 57 jours à 1,5 an (INERIS, 2006), ainsi que le BbF, avec une demi-vie allant de 360 jours à 1,7 an (INERIS, 2005).

Tableau 8 : Caractéristiques physico-chimiques du Benzo[a]pyrène et Benzo[b]fluoranthène

Caractéristiques physico-chimiques		
Nom IUCPA	**Benzo[a]pyrène**	**Benzo[b]fluo-ranthène**
Numéro CAS	50-32-8	205-99-2
Formule Brute	$C_{20}H_{12}$	$C_{20}H_{12}$
Formule topologique		
Masse molaire ($g.mol^{-1}$)	252,31	252,31
Solubilité dans l'eau à 25°C ($mg.l^{-1}$)	$3,8.10^{-3}$	$1,2.10^{-3}$
Coefficient de partage octanol/eau (log K_{ow})	6,06	6.45
Coefficient de partage carbone organique/eau (K_{oc})	$5,07.10^{6}$	$6,3.10^{5}$
Pression de vapeur à 25°C (Pa)	$7,3.10^{-7}$	$6,67.10^{-5}$
Constante de henry ($Pa.m^{3}.mol^{-1}$)	0,04	0,051

https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F-14.pdf,
http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/,
(Mackay *et al*, 2006; INERIS, 2005; INERIS, 2006)

Le BaP est classé cancérogène groupe 1 par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC). Il est également classé par l'union européenne CMR de catégorie 1B (Substance à effet supposé pour l'Homme) pour toutes les catégories cancérogènes, mutagène et reprotoxique. De même, le BbF est classé par l'union européenne CMR de catégorie 1B et est classé 2B cancérogène probable par le CIRC. Ce classement est effectué en rapport avec les effets observables et/ou observés sur l'Homme mais des impacts génotoxiques, reprotoxiques, immunotoxiques et métaboliques ont également été observés chez des vertébrés aquatiques (Reynaud et Dechaux, 2006 ; Reynaud *et al*, 2008 ; Corrales *et al*, 2014 ; Regnault *et al*, 2014 ; Regnault *et al*, 2016).

b) *BaP et BbF dans l'environnement*

Le BaP et le BbF sont faiblement sujets à la mobilité dans les sols car ils ont une grande affinité pour la matière organique comme le suggère leur coefficient d'adsorption élevé (K_{oc}=$5,07.10^{6}$ pour le BaP et K_{oc}=$1,5.10^{6}$ à $6,3.10^{5}$ pour le BbF) (INERIS, 2005; INERIS, 2006). Leur faible pression de vapeur ainsi que leur constante de Henry inférieure à un indiquent qu'ils sont peu volatilisables depuis les sols secs ou humides.

La contamination des eaux de surface par le BaP et BbF survient principalement par les dépôts atmosphériques, les eaux de ruissellement urbaines, les effluents industriels, municipaux ou encore les déversements accidentels ou non de pétrole.

Le BaP est une molécule hydrophobe (LogK_{ow} = 6,06) peu soluble dans l'eau ($3,8.10^{-3}$ mg. l^{-1}), tout comme le BbF (LogK_{ow} = 6,45 ; solubilité dans l'eau= $1,2.10^{-3}$ $mg.l^{-1}$) qui présente les mêmes caractéristiques que le BaP.

Leur comportement dans les milieux aquatiques se caractérise par une adsorption forte sur les matières organiques et les sédiments. Ainsi, les matières organiques et les sédiments sont des compartiments d'accumulation de ces molécules qui peuvent sous certaines conditions hydrodynamiques ou en présence de bioturbation devenir à nouveau biodisponibles par dissolution et/ou resuspen-

sion (Figure 21) (Le Dû Lacoste, 2008 ; Katayama *et al*, 2010). L'évaluation globale de la concentration de ces molécules dans les eaux de surface reste problématique car elle présente une forte variabilité géographique et temporelle (Patrolecco *et al*, 2010).

Tableau 9 : Concentrations en BaP, BbF et plusieurs HaP dans les eaux douces naturelles

Site étudié	Type d'échantillon	Concentrations max mesurées en $ng.l^{-1}$			N*	Référence
		BbF	BaP	ΣHAP		
Rivière Mithi, Inde	Eau de surface	15 910	12 020	257 330	*17*	*(Singare, 2016)*
Rivière Cauca, Colombie	Eau de surface	16,4	ND	2 378	*12*	*(Sarria-Villa* et al *, 2016)*
Tibre, Italie	Eau de surface	13,5	25,4	72	*6*	*(Patrolecco* et al*, 2010)*
Seine, paris	Eau de surface	240	270	5 440	*16*	*(Gasperi* et al*, 2009)*
Mississipi, USA	Eau de surface	11,3	20.5	144,7	*16*	*(Zhang* et al*, 2007)*
Rivière des Perles, Chine	Eau de surface	0,12	0.02	2579,5	*16*	*(Luo* et al*, 2004)*
Baie De Daya, Chine	Eau de surface	680	4 799	29 325	*16*	*(Zhou et Maskaoui, 2003)*
Macédoine, Grèce	Eau de surface	3,1	1,7	856	*16*	*(Manoli* et al*, 2000)*
Elbe, Allemagne	Eau de surface	28	16	-	-	*(Götz, Bauer* et al*, 1998)*
Alsace, France	Eau de pluie	9,2	205,9	3 259,9	*17*	*(Delhomme* et al*, 2008)*
Macédoine, Grèce	Eau de pluie	7,2	4,4	672	*16*	*(Manoli* et al *, 2000)*

**/N : représente le nombre de HAP dont les concentrations sont mesurées dans l'étude*

Les études de contamination des milieux aquatiques d'eau douce se concentrent pour la plupart sur les concentrations individuelles en HAP adsorbés dans les sédiments ou sur le dosage des HAP totaux dans les eaux de surface (souvent les 16 HAP prioritaires dont le BaP et BbF font partis, (Figure 19) (Yunker et al, 2002 ; Tobiszewski et Namiesnik, 2012 ; Liu *et al*, 2016 ; Feng *et al*, 2016). Peu d'études ont mesuré les concentrations de BaP et de BbF dans l'eau car les pollutions aux HAP sont des contaminations contenant des cocktails de molécules. Néanmoins, les concentrations en BaP et BbF dans les eaux de surface atteignent respectivement 270 et 240 $ng.l^{-1}$ en Europe (Gasperi *et al*, 2009) et peuvent atteindre plus de 10 $\mu g.l^{-1}$ en Inde au niveau de la mégapole Mumbai (Singare, 2016).

c) *Ecotoxicité sur les amphibiens*

Le caractère lipophile du BaP (log K_{ow} = 6,06) et du BbF (log K_{ow} = 6,45) pourrait engendrer une bioconcentration dans les organismes vivants à partir d'ingestion d'eau, de sédiments ou de nourriture mais également de pénétration transcutanée ou d'inhalation (Srogi, 2007 ; Smith *et al*, 2007). La bioconcentration liée au BaP et au BbF a été évaluée chez plusieurs espèces d'amphibiens comme chez les grenouilles vertes (Vojinovic-Miloradov *et al*, 1996 ; Reynaud *et al*, 2012). Cette bioconcentration semble être transitoire, le BaP semble être métabolisé rapidement. Le caractère génotoxique, reprotoxique et immunotoxique lié aux HAP ainsi que les voies de détoxication sont assez peu étudiées chez les amphibiens. De plus, la majorité de ces travaux concernent les effets du BaP seul et sont résumés dans le Tableau 10. L'évaluation de l'écotoxicité du BbF chez les amphibiens est quasi inéxistante, seule une étude porte sur la mesure de la concentration du benzofluoranthène (Tableau 10 : ligne écrite en bleu) dans le foie de grenouilles vertes (*P. ridibundus*) sans spécifier si cette mesure prend en compte un seul isomère ou la totalité des isomères existants du Benzofluoranthène (Vojinovic-Miloradov *et al*, 1996). Les études portent particulièrement sur

la détection de cet HAP dans les aliments (Gutiérrez-Valencia et de Llasera, 2017) et dans les sédiments car il est l'un des 16 HAP classés prioritaires. Peu d'études sont concernées par de l'exposition contrôlée au BbF afin d'évaluer ses effets directs (Vondráček *et al*, 2017 ; Kim, *et al*, 2011).
En ce qui concerne l'exposition au mélange des HAP, les données actuelles montrent des effets variés dépendant du matériel biologique, des paramètres mesurés et des concentrations testées. Ils peuvent être additifs lorsque l'effet combiné est égal à la somme des effets de chaque polluant, synergiques lorsque l'effet observé est plus grand que la somme des effets attendus s'ils avaient opéré indépendamment, ou antagonistes si l'effet combiné est moins important que les effets observés pour chaque autre polluant. Pour les mélanges en concentration égale de BaP et de BbF, des études faites sur cultures de cellules de foie humain (HepG2) montrent des effets additifs pour l'expression de gènes, en particulier pour *CYP1A1*, de l'apoptose (Staal *et al*, 2007) et des effets synergiques pour la formation d'adduits à l'ADN (Staal *et al*, 2007 ; Tarantini *et al*, 2011). D'autres études faites sur des coupes de foie de rat montrent également des effets antagonistes sur l'activité EROD qui permet de mesurer l'induction du cytochrome P450 1A et sur la transcription des gènes *CYP1A* et *CYP1B1* (Pushparajah *et al*, 2016) et démontrent un potentiel de carcinogenèse diminué (Staal *et al*, 2008).

Les études concernant les amphibiens et les HAP se concentrent particulièrement sur un HAP modèle, le BaP, et l'espèce modèle, le *Xenopus laevis* (Höhn-Bentz *et al*, 1983 ; Fort *et al*, 1989; Sadinski *et al*, 1995 ; Morse *et al*, 1996 ; Propst *et al*, 1997 ; Camatini *et al*, 1998; Colombo *et al*, 2003 ; Saka, 2004 ; Mouchet *et al*, 2005 ; Martini *et al*, 2012). De plus, la plupart des études sur les amphibiens sont focalisées sur le stade têtard plutôt qu'adulte (Tableau 10) et sur les effets génotoxiques. La génotoxicité du BaP provient de sa biotransformation en métabolites électrophiles sous l'action de différentes enzymes de détoxication (voir le paragraphe I.4.B.3) capables de se lier aux sites nucléophiles de l'ADN (adduits à l'ADN). Son effet clastogène a été largement montré par le test des micronoyaux effectué sur têtards ou larves d'urodèles à des concentrations de BaP inférieures à la dizaine de microgramme par litre (Fernandez et L'Haridon, 1994 ; Djomo *et al*, 1995 ; Sadinski *et al*, 1995 ; Mouchet *et al*, 2005 ; Marquis et al, 2009).
Néanmoins, des études récentes sur le modèle *Xenopus tropicalis* montrent des perturbations sur le métabolisme hépatique notamment sur les voies de la glycolyse/néoglucogenèse, de la synthèse du cholestérol, ainsi que sur la mise en évidence d'une stéatose hépatique à une dose d'exposition de dix microgrammes par litre sur des temps d'exposition courts (Regnault *et al*, 2014 ; Regnault *et al*, 2016).
Outre les effets bien connus de génotoxicité, reprotoxicité et immunotoxicité des HAP et particulièrement du BaP, des perturbations du métabolisme glucidique et lipidique sont mis aujourd'hui en évidence. Ceci ouvre de nouvelles perspectives d'études et peut-être de nouvelles réponses permettant de comprendre quel(s) rôle(s) les HAP jouent dans le déclin des amphibiens.

Tableau 10 : Effets écotoxicologiques du BaP et BbF sur les amphibiens

Référence	**Espèce**	*Ordre*	**Stade**	**Concentration BaP**	**Durée**		**Organe**	**CONCLUSION**
(Anderson et al *, 1982)*	*Salamandre : Ambystoma tigrinum*	*Urodela*	Adulte	-	-	-	Microsome de foie	Test de Ames ↑ Résistance carcinogénèse Peu d'efficacité des monooxygénations p/r aux mammifères
(Höhn-Bentz et al*, 1983)*	*Xenopus laevis*	*Anura*	Jeune grenouille	10-125 $\mu g.g^{-1}$	1h 8 et 14 jours	Injection intra-péritonéale	Foie	↑Induction des monooxygénases (**MFO**) ↑Dommage à l'ADN dès 8 jours.
(Jaylet et al*, 1986)*	*Axolotl : Ambystoma mexicanum*	*Urodela*	Têtard	0.025 ppm-0.1 ppm	8 et 14 jours	Milieu	Sang	↑Micronoyaux
(Marty et al*, 1989)*	*Triton : Pleurodèles Waltl*	*Urodela*	Têtard, Adulte	0,2 $\mu g.ml^{-1}$ et 0,5 $mg.l^{-1}$ 100 µg/têtard 100 $mg.kg^{-1}$	48 h	Milieu et injection intrapéritonéale	Milieu et microsome de foie	↑ Métabolites hydroxylés du BaP = mammifères et espèces aquatiques., Conjugaison. ↑ Effets clastogènes.
(Fort et al*, 1989)*	*Xenopus laevis*	*Anura*	FETAX	>2,5 $\mu g\ ml^{-1}$ >7,5 $\mu g\ ml^{-1}$	96 h	Milieu	Embryon	↑Malformations intestin et bouche
(Fernandez et L'Haridon, 1992)	*Triton : pleurodèle de Waltl*	*Anura*	Têtard	50 $\mu g.l^{-1}$	5 jours		Embryon	↑Mortalité
(Fernandez & L'Haridon, 1994)	*Triton : pleurodèle de Waltl*	*Urodela*	Têtard (2 mois après la ponte)	12,5-25- 50 -500 $\mu g.l^{-1}$	8 jours	Milieu	Sang	↑Composés toxiques dans les têtards et non dans le milieu. ↑ Micronoyaux érythrocytaires
(Sadinski et al*, 1995)*	*Xenopus laevis*	*Anura*	Têtard	0-31-62-124-248-496 nM	16 jours	Milieu	Embryon, sang et foie	↑ Durée avant métamorphose ↑Micronoyaux érythrocytaires ↑ Adduits à l'ADN
(*Djomo* et al*, 1995)*	*Triton : Pleurodèle de Waltl*	*Urodela*	Têtard	-	12 jours	Milieu	Sang	↑ Micronoyaux érythrocytaires
(*Morse* et al*, 1996*)	*Xenopus laevis*	*Anura*	Larve-Têtard	0,01- 0,05 - 0,1 $mg.l^{-1}$	1 jour	Milieu	Embryon et têtard	↑ Adduits à l'ADN
(*Vojinovic-Miloradov* et al, 1996)	*Rana ridibunda, Rana dalmatica, Bombina variega*	*Anura*	Adulte sauvage	Pollution aquatique	-	Milieu	Graisse dans le Foie	[BaP]= 1,62 à $20,23.10^{-3}$µg/g de foie [Benzofluoranthène]= 4,16 à $52.5.10^{-3}$µg/g de foie
(Propst et al*, 1997)*	*Xenopus laevis*	*Anura*	FETAX		96 h	Milieu	Embryon	↑ Induction CYP1A ↑ Epoxyde Hydrolase ↑GST

(Camatini et al*, 1998)*	*Xenopus laevis femelle*	*Anura*	Adulte Embryon	100 mg.kg^{-1} BaP tritié 32 µg.kg^{-1} 10µg.l^{-1}	24-48-72 h	2 injections 1 injection Milieu	Microsome foie Poumons, Organes Embryon	↑Protéines P450 ↑ [BaP] vésicule biliiare, foie et corps jaunes et poumons ↑ Adduits à l'ADN foie, poumons, ovaires et embryon
(Colombo et al*, 2003)*	*Xenopus laevis femelle*	*Anura*	Adulte	100 mg.kg^{-1}	72-120-168 h	Injection dans les sacs lymphatiques	Foie et Intestin	↑ Protéine P450 dans le foie → Protéine MDR (Pgp) intestin
(Saka, 2004)	*Xenopus laevis*	*Anura*	FETAX	13,2 µM	4 jours	Milieu	Embryons	↓ inhibition de croissance
(Rankouri et al*, 2005)*	*Rana esculenta mâle et femelle*	*Anura*	Adulte sauvage	0,1-1000 nM	2 jours	Milieu	Culture primaire hépatocytes	↑ Activité EROD
(Mouchet et al*, 2005)*	*Xenopus laevis*	*Anura*	Têtard	0,05 %	1 jour à 12 jours	Milieu	Embryon	↑ Micronoyaux
(*Marquis* et al, *2009*)	*Rana Temporaria*	*Anura*	Têtard	50 -250-500 µg.l^{-1}	6 jours	Milieu	Sang	↑ Micronoyaux érythrocytaires
(Reynaud et al, *2012)*	*Grenouille verte femelle*	*Anura*	Adulte sauvage	10 µg.l^{-1} 7-14C-BaP	1 jour à 8 jours	Milieu	Microsome Foie Organes	↑Activité ECOD et GST Métabolisation +++
(Martini et al*, 2012)*	*Xenopus laevis*	*Anura*	Têtard	8,36 -14,64 -89,06-309,47 µg.l^{-1}	9 jours	Milieu	Embryon	↑ Transcription HSP70 et IL-1β
(*Regnault* et al, *2014*)	*Xenopus tropicalis femelle*	*Anura*	Adulte	BaP 10 µg.l^{-1}	1 jour à 8 jours	Milieu	Foie	↑Biosynthèse des stéroïdes, des voies de l'insuline, des adipocytokines et des MAPkinases, de la glycolyse/gluconéogenèse. ↓Biosynthèse du cholestérol, des jonctions serrées.
(Regnault et al*, 2016)*	*Xenopus tropicalis mâle*	*Anura*	Adulte	BaP 10 µg.l^{-1}	12 -18-24 h	Milieu	Foie,Sang,Vésicule biliaire	Métabolisation+++ ↑Stéatose hépatique, ALAT, voies de la glycolyse/néoglucogenèse, capacité phagocytaire ↓Jonctions serrées

FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus*) ; ECOD:Ethoxy Coumarin O-Dééthylase ; GST : glutathion S-Transférase ; ALAT : ALAnine Transférase.

C. Métabolisme et homéostasie glucidique

1. Généralités

Le métabolisme du glucose permet de produire l'énergie nécessaire aux réactions métaboliques sous forme d'ATP (adénosine triphosphate : molécule libérant de l'énergie lorsqu'elle est hydrolysée) permettant ainsi aux cellules de l'organisme d'assurer leur survie et leur(s) fonction(s). Le glucose est la molécule énergétique la plus utilisée chez les organismes car sa disponibilité est immédiate.

Dans les périodes postprandiales, c'est-à-dire au cours de l'élévation de la glycémie suivant une prise alimentaire, des processus biochimiques permettent le stockage du glucose sous diverses formes en vue de son utilisation ultérieure (glycogène, lipides). Enfin, dans le cas d'un jeûne, l'ensemble des stocks auparavant créés vont être mobilisés et utilisés. Si ce jeûne se poursuit, l'organisme est alors capable de mettre en jeu des mécanismes permettant d'utiliser d'autres substrats afin de produire *de novo* du glucose et ainsi palier aux carences (néoglucogénèse).

Le foie joue un rôle central dans ces processus. En effet, il est le premier organe rencontré par le glucose issu de la digestion (de l'intestin via le système porte sanguin). Il est capable de mettre en réserve le glucose sous forme de glycogène (effet tampon) sous l'action de la glycogène synthase (glycogénosynthèse). Il permet aussi le processus inverse qui consiste à dégrader le glycogène pour donner du glucose phosphorylé (Glucose-1P puis Glucose-6P) afin de répondre aux besoins cellulaires (glycogénolyse). Seul le foie possède cette enzyme, la glucose-6 phosphatase, capable de donner du glucose pouvant repasser dans la circulation sanguine et ainsi fournir du glucose aux tissus périphériques. Il est également capable de faire de la néoglucogenèse c'est-à-dire de produire du glucose à partir de précurseurs non glucidiques. A noter que le foie des amphibiens des milieux tempérés stocke plus de glycogène et de lipides à l'automne, afin de garantir des réserves énergétiques pendant l'hivernation.

L'homéostasie du glucose chez les amphibiens est influencée par le même système endocrinien que les mammifères. Des études montrent des changements du taux de glucose dans le sang et de teneur en glycogène dans le foie et le muscle après injection d'hormones hypoglycémiantes ou hyperglycémiantes. Il y a principalement trois systèmes de régulation du métabolisme du glucose chez les amphibiens : les hormones pancréatiques (insuline et glucagon), l'ACTH (Hormone AdrenoCorticoTrophine), les corticoïdes (cortisol), le TSH (Hormone ThyréoStimuline) et les hormones du système thyroïdien (Hanke et Neumann, 1972), les moins documentées. Comme chez les mammifères, il existe une seule hormone hypoglycémiante chez les amphibiens, l'insuline, hormone sécrétée par le pancréas.
A l'inverse des mammifères, les amphibiens ne sont pas sensibles à l'hypoglycémie. En effet, il a été observé des concentrations de glucose dans le sang pratiquement indétectables ($< 5 mg.dl^{-1}$). Ils sont également insensibles à l'hyperglycémie. Il a été mesuré des concentrations de glucose dans le sang pouvant atteindre 9000 $mg.dl^{-1}$ (Dziewulska-Szwajkowska *et al*, 1997). Certains auteurs expliquent ces insensibilités (hypoglycémie et hyperglycémie) par le fait que les amphibiens possèdent des acides gras non estérifiés et que le système nerveux central peut utiliser comme source d'énergie les corps cétoniques issus de l'oxydation des acides gras (Dziewulska-Szwajkowska *et al*, 1997).
Malgré cette forte tolérance aux fluctuations extrêmes des concentrations de glucose dans le sang, les mesures du taux de glucose effectuées dans le sang sont pour la plupart **constantes**. En effet, chez l'espèce modèle *Xenopus laevis*, il a été observé une concentration constante en glucose dans le sang durant les quatre premiers mois lors de période de jeûne et une baisse de la concentration de

glucose dans le sang a été observée après une période de jeûne de dix mois chez une espèce de grenouilles vertes *P. kl. esculentus*, (Dziewulska-Szwajkowska et Dżugaj, 1999).
Le métabolisme des glucides (stockage, transformation) chez les amphibiens (ranidés) n'est pas influencé par les saisons mais par le changement de température (Petersen et Gleeson, 2011). Il existe également des espèces d'amphibiens notamment des grenouilles du continent Nord-Américain (*Rana sylvatica*) vivant au nord du cercle polaire qui ont développé une stratégie de survie permettant de résister à la congélation des fluides de l'organisme pendant l'hibernation. En effet, ces grenouilles montrent une accumulation de glucose dans le sang (3500 à 9000 $mg.dl^{-1}$) provenant des réserves de glycogène du foie (Conlon *et al*, 1998). En revanche, chez les grenouilles vertes (*P. ridibundus*), il n'est pas observé de système de cryopréservation. Elles sont donc sensibles aux températures inférieures à zéro (Voituron *et al*, 2003 ; Voituron *et al*, 2005).

2. Les voies de production d'énergie sous forme d'ATP via le glucose

a) *La glycolyse : voie de d'Emben-Meyeroff-Parnas*

Le but de la glycolyse est de transférer et de produire de l'énergie pour la cellule.
Elle consiste en l'oxydation progressive d'une molécule de glucose (6 carbones) en deux molécules de pyruvate à trois carbones avec transfert et production d'énergie sous forme ATP et de métabolites intermédiaires qui peuvent intervenir dans d'autres voies métaboliques. Elle se déroule entièrement dans le cytosol.
La glycolyse aérobie conduit *in fine* à la formation de deux molécules d'ATP, deux molécules de NADH, H^+ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide : cofacteur intervenant dans le transport d'hydrogène lors des réactions d'oxydo-réductions) et deux molécules de pyruvate (substrat du cycle de Krebs).
La glycolyse est une voie préparatoire au catabolisme aérobie des glucides. Elle est principalement régulée par trois enzymes : la glucokinase (EC 2.7.1.2), la phosphofructokinase 1 (EC 2.7.1.11) et la pyruvate kinase (EC 2.7.1.40) marquées en orange dans la Figure 26.
Chez les amphibiens, la glycolyse anaérobie est une adaptation métabolique importante pour pouvoir survivre à des conditions extrêmes naturelles comme la sécheresse pour les grenouilles africaines (*Xenopus laevis*) qui induit un stress hypoxique (Brooks *et al*, 2005) et comme l'hypothermie et l'hypoxie/anoxie rencontrées lors de l'hivernation chez les grenouilles de la famille des ranidés (*Rana pipiens*) (Federow *et al*, 1998).
Cette glycolyse anaérobie permet de produire de l'énergie très rapidement en transformant le pyruvate en lactate grâce à la lactate déshydrogénase (réaction réversible).

b) *Le cycle de Krebs ou cycle de l'acide citrique*

Le cycle de Krebs est une plateforme commune au catabolisme des substrats énergétiques (glucide, acides gras et protéines). Il se déroule dans les mitochondries car il comporte sept enzymes solubles et une fixée dans la membrane interne de la mitochondrie. A l'issu des huit réactions, le bilan énergétique aboutit à la formation de 12 ATP.

Les amphibiens ont un plus faible métabolisme au repos et de plus faibles besoins énergétiques que tous les autres vertébrés terrestres. Ces faibles besoins énergétiques sont décrits comme représentant un handicap pour la colonisation de niches écologiques terrestres. Plusieurs amphibiens font appel au métabolisme anaérobie pour répondre à des activités intenses et courtes comme fuir devant un prédateur ou attraper une proie. Le métabolisme anaérobie est moins impacté par les températures environnementales que le métabolisme aérobie. De plus, le métabolisme anaérobie fournit plus rapidement de l'énergie utilisable sous forme d'ATP mais peut conduire à une utilisation inefficace des substrats énergétiques. Le métabolisme énergétique des anoures est très variable

d'une espèce à l'autre. En effet, le comportement reproducteur (saison, chant…) induit des besoins énergétiques spécifiques. Les espèces qui ont une grande période d'activité soutenue présentent en général une production d'énergie en aérobiose et dépendent ainsi moins du métabolisme anaérobie (Wells, 1992).

c) *La néoglucogenèse*

La néoglucogenèse est **la formation de glucose à partir de précurseurs non glucidiques** tels que le pyruvate, le lactate, le glycérol et la plupart des acides aminés. Chez les animaux supérieurs, elle se produit essentiellement dans le foie et à un moindre degré au niveau des reins. La néoglucogenèse hépatique est la voie la plus importante pour maintenir un taux de glucose « normal » circulant durant une longue période de jeûne. La voie centrale de la néoglucogenèse permet à partir du pyruvate de générer du glucose en utilisant les réactions réversibles de la glycolyse (au nombre de sept). Cependant, les trois réactions irréversibles de la glycolyse (Figure 26 flèches rouges) doivent être remplacées dans la néoglucogenèse afin que la synthèse du glucose soit thermodynamiquement favorable. En effet, le contournement de ses trois réactions irréversibles de la glycolyse nécessite quatre autres enzymes (Figure 26) : **la pyruvate carboxylase** EC 6.4.1.1 qui permet de transformer le pyruvate en oxaloacétate (substrat du cycle de Krebs), la **PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase PEPCK** EC 4.1.1.32 qui permet de convertir l'oxaloacétate en phosphoénolpyruvate dans le cytosol, **la Fructose-1.6 biPhosphatase** EC 3.1.3.11 donnant le fructose 6 phosphate et enfin la **Glucose-6 Phosphatase** EC 3.1.3.9 permettant d'obtenir le glucose qui lui va pouvoir être distribuer aux organes périphériques via la circulation sanguine au niveau du foie (Jitrapakdee, 2012).

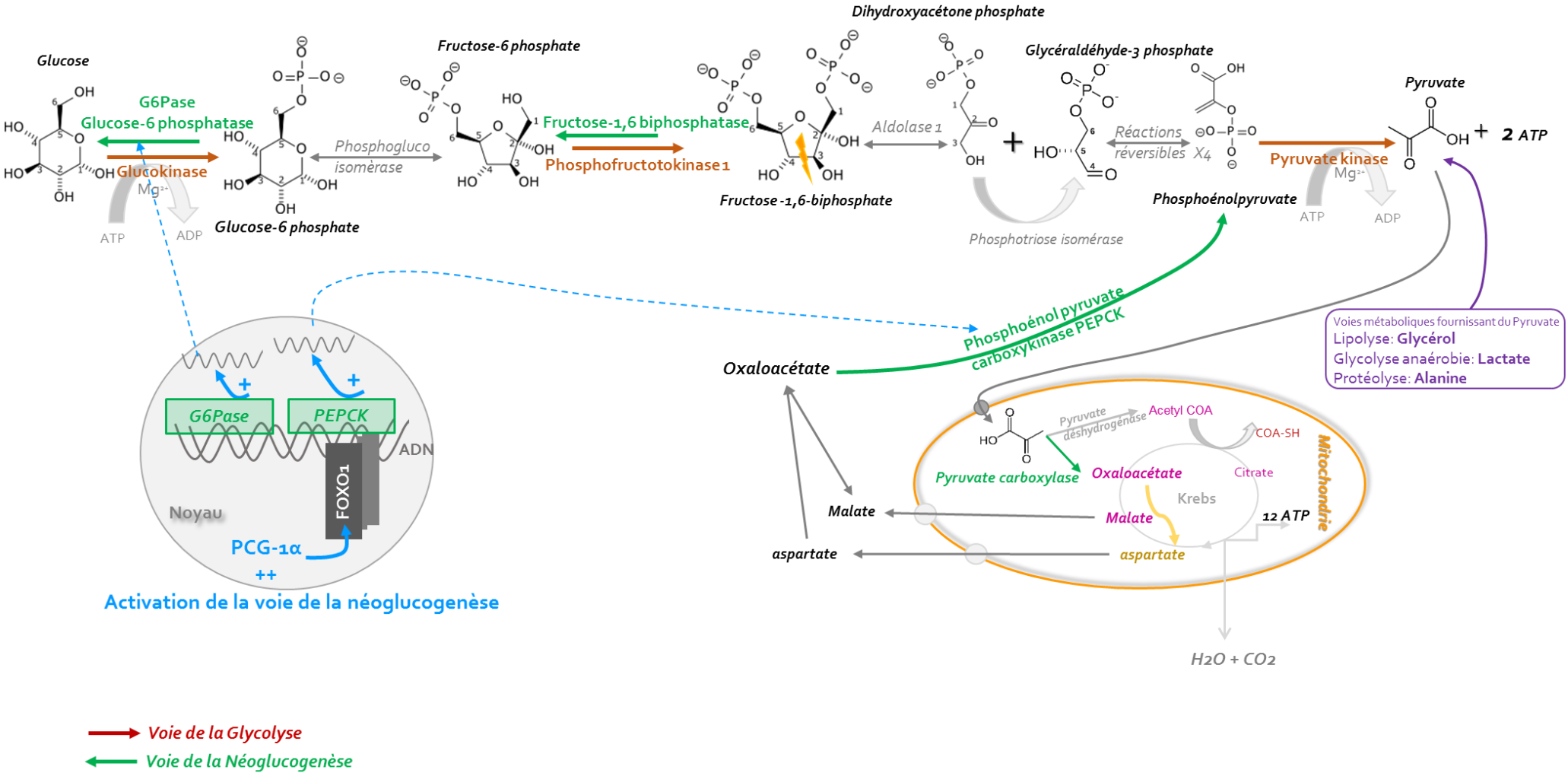


Figure 26 : Représentation schématique (simplifiée) de la Glycolyse, du cycle de Krebs et de néoglucogenèse et son induction via FOXO1

La régulation de ces enzymes spécifiques de la néoglucogenèse (Figure 26 : flèches vertes) peut se faire à plusieurs niveaux d'intégration : modification de l'expression du gène, modification post traductionnelle de l'enzyme ou par un effecteur moléculaire de l'enzyme. La phosphoénol pyruvate carboxyKinase (PEPCK) et la glucose-6 phosphatase (G6Pase) sont des enzymes régulées par des modifications de l'expression de leur gène. La fructo-1,6 biphosphatase n'est pas régulée seulement par l'expression génique mais aussi par des effecteurs moléculaires comme le fructo 2,6- diphosphate (produit par l'enzyme : phosphofructokinase 2) qui l'inhibe allostériquement (Dziewulska-Szwajkowska *et al*, 1997 ; Jitrapakdee, 2012). La Pyruvate Carboxylase n'intervient pas uniquement dans la néoglucogenèse. Par exemple, chez le rat, l'activation de son promoteur est observée lors de conditions de néoglucogenèse et de lipogenèse rencontrées respectivement dans le foie et les adipocytes (Jitrapakdee, 2012).

(1) *La PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase PEPCK*

La réaction enzymatique liée à la PEPCK est généralement considérée comme la première étape de la néoglucogenèse. En effet, PEPCK catalyse la conversion GTP dépendante de l'oxaloacétate en phosphoénolpyruvate. L'oxaloacétate généré dans la mitochondrie par la pyruvate carboxylase peut être converti en phophoénolpyruvate via la PEPCK mitochondriale (PEPCK-M). Alternativement, l'oxaloacétate est converti en malate dans la mitochondrie, puis est transporté dans le cytosol pour être oxydé par la malate déshydrogénase NAD dépendante en oxaloacétate qui pourra être converti en phosphoénolpyruvate par la PEPCK cytosolique (Figure 26). Les deux isoformes de la PEPCK sont codées par des gènes différents. Elles ont des propriétés cinétiques similaires et approximativement le même poids moléculaire (Hanson et Reshef, 1997 ; Jitrapakdee, 2012). Contrairement aux enzymes du métabolisme, PEPCK ne dépend pas d'une régulation allostérique ou de modifications post-traductionnelles. Son activité est dépendante du niveau d'expression de l'enzyme donc des niveaux de transcription du gène de PEPCK. Cette régulation du gène dépend de la présence sur son promoteur de différents éléments de réponse : à l'insuline, à l'AMPcyclique (second messager dans l'action des hormones), du récepteur aux hormones corticoïdes et des hormones thyroïdiennes. Les systèmes de régulation de la transcription de PEPCK mitochondriale sont mal connus (Jitrapakdee, 2012). Il est proposé que PEPCK mitochondriale serait impliquée dans la néoglucogenèse provenant de la dégradation du lactate alors que PEPCK cytosolique serait impliqué dans la néoglucogenèse issus de la dégradation des acides aminés et ainsi des protéines (Hanson et Reshef, 1997).

(2) *PPARGC1a ou PGC-1α un régulateur clé du métabolisme énergétique*

(a) *Généralités*

PPARGC1a (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) ou PGC-1α est un co-activateur de transcription qui interagit avec un grand nombre de facteurs de transcription qui interviennent dans des réponses biologiques variées comme l'adaptation à la température, la biogenèse mitochondriale, le métabolisme glucidique et lipidique, la conversion des fibres musculaires de type II rapides glycolytiques en fibres de type I lentes oxydatives dans le muscle squelettique et dans le développement du cœur. Un co-activateur est défini comme une protéine ou un complexe de protéine qui augmente la probabilité qu'un gène soit transcrit en interagissant avec des facteurs de transcription sans se lier lui-même à une séquence spécifique de l'ADN (Puigserver et Spiegelman, 2003). PCG-1α est localisé dans le noyau. Il est exprimé à de fort niveau dans les tissus riches en mitochondries et où le métabolisme oxydatif est important comme le cœur et le muscle squelettique. Néanmoins, les niveaux d'expression de PGC-1α sont faibles dans le foie (Puigserver *et al*, 1998).

(b) *PGC-1α et métabolisme glucidique*

Dans des conditions normales d'alimentation, PGC-1α est exprimé à des niveaux faibles dans les cellules du foie. En revanche, lors de jeûne ou de développement de diabète, l'expression de PGC-1α augmente fortement stimulant la néoglucogenèse hépatique et le métabolisme oxydatif des acides gras (Yoon *et al*, 2001 ; Herzig *et al*, 2001). Pendant le jeûne, l'expression de PCG-1α est activée par le glucagon et les catécholamines (adrénaline) via la stimulation de la voie de l'AMP cyclique et du facteur de transcription CREB (C-AMP Response Element-binding protein). PGC-1α co-active alors des facteurs de transcription dont FOXO1 (Forkhead box, facteurs de class O). Ces facteurs de transcription se lient au promoteur des gènes codant pour des enzymes clés de la néoglucogenèse telles que la PEPCK et la G6Pase (glucose-6 Phosphatase) (Liang et Ward, 2006) (Figure 26).

De plus, il a été montré que le niveau d'expression de PGC-1α dans le foie est augmenté chez des animaux modèles présentant une déficience en insuline (Yoon *et al*, 2001). L'activation de la voie de l'insuline conduit à la phosphorylation du facteur de transcription FOXO1 qui inhibe sa translocation dans le noyau et favorise sa dégradation (Liang et Ward, 2006). Ainsi la voie de la néoglucogenèse est inhibée.

(3) *PEPCK, PGC-1α et amphibiens*

Deux études récentes (Regnault *et al*, 2014 ; Regnault *et al*, 2016) montrent des modifications de transcription du gène PEPCKc au niveau du foie chez un amphibien modèle *Xenopus tropicalis*, après avoir été exposés au BaP. En effet, il a été mis en évidence des perturbations du métabolisme glucidique après une exposition à 10 $\mu g.l^{-1}$ de BaP suivant une cinétique de 6, 12, 18 et 24 heures. Une sur-transcription du gène PEPCKc a notamment été montrée dès 6 heures d'exposition chez des individus femelles et dès 24 h chez les individus mâles. Ceci traduit une activation de la voie de la néoglucogenèse lors d'exposition à des xénobiotiques en l'occurrence du BaP.

En revanche, l'expression de PGC-1α était diminuée chez ces amphibiens (*Xenopus tropicalis*) exposés au BaP à 10 $\mu g.l^{-1}$ à partir de 12 heures d'exposition. Cette diminution d'expression de ce co-facteur est reliée à une augmentation de la lipogenèse dans le foie et à l'apparition d'une stéatose hépatique (Regnault *et al*, 2016). Ceci est également montré dans des études reliant le polymorphisme de ce gène PGC-1α rencontré dans la population humaine et la susceptibilité à développer une stéato-hépatite non alcoolique NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Desease). Une faible expression des ARN messager de PGC-1α est un facteur important dans le développement de cette maladie (Yoneda *et al*, 2008).

La normalisation du taux de glucose dans le sang dépend d'une réponse métabolique complexe impliquant la sécrétion d'insuline par le pancréas (stimulée par le glucose), la production de glucose par le foie (glycogénolyse, néoglucogenèse) et la captation périphérique après stimulation par l'insuline (sensibilité à l'insuline).

L'homéostasie du glucose chez les amphibiens, et notamment chez les grenouilles, est un phénomène particulier (Dziewulska-Szwajkowska *et al*, 1997) car il existe une régulation pour maintenir un taux constant, mais sont *a priori* insensibles à l'hypoglycémie et l'hyperglycémie. Il semble certain que des modifications du métabolisme glucidique soient observées dans des conditions particulières d'exposition à des polluants.

D. Objectifs

Les HAP sont des polluants ubiquistes retrouvés dans les zones humides de tous les continents. Dans ces milieux aquatiques, les populations d'amphibiens sont de ce fait continuellement exposées à ces polluants à tous les stades de leur vie. Ce travail d'EPHE fait suite à une étude portant sur la métabolisation du BaP par les grenouilles vertes femelles qui montrait leur forte capacité de métabolisation et d'excrétion de ce composé avec une induction des enzymes de détoxication après une exposition de 1 à 2 jours (P450 et GST) (Reynaud *et al*, 2012). En parallèle de ce travail, une autre étude du laboratoire portant sur une espèce modèle d'amphibien (*Xenopus tropicalis*) exposée au BaP à 10 $\mu g.l^{-1}$, a mis en évidence des désordres métaboliques hépatiques caractérisés par l'apparition d'une stéatose hépatique, d'une modification de la glycémie et par des modifications de transcription de gènes impliqués dans le métabolisme glucidique (Regnault *et al*, 2014). Ces travaux ont permis de démontrer que malgré la forte capacité des amphibiens à métaboliser les HAP comme le BaP, ces derniers peuvent entrainer des effets délétères sur les organismes exposés.
Les HAP ayant la particularité d'être émis sous forme de mélange complexe puisque issus de la combustion incomplète de la matière organique, ce travail d'EPHE a été orienté sur l'impact d'un autre HAP, le benzo[b]fluoranthène (BbF) sur la métabolisation et les effets métaboliques du BaP chez les grenouilles vertes males.

Les ***objectifs*** de ce travail ont donc été :

- D'évaluer la toxico-cinétique du BaP chez les grenouilles vertes mâles en exposition aiguë et de déterminer si cette toxicocinétique est modifiée par la présence d'un autre HAP en l'occurrence le BbF.
- De savoir si le BaP induit les enzymes spécifiques des voies de détoxication et si cette induction est modifiée en présence de BbF.
- De déterminer quels sont les effets métaboliques de l'exposition au BaP, au BbF et au mélange sur les grenouilles vertes ?

Afin de répondre à ces différentes questions, notre approche a été divisée en ***trois parties*** :

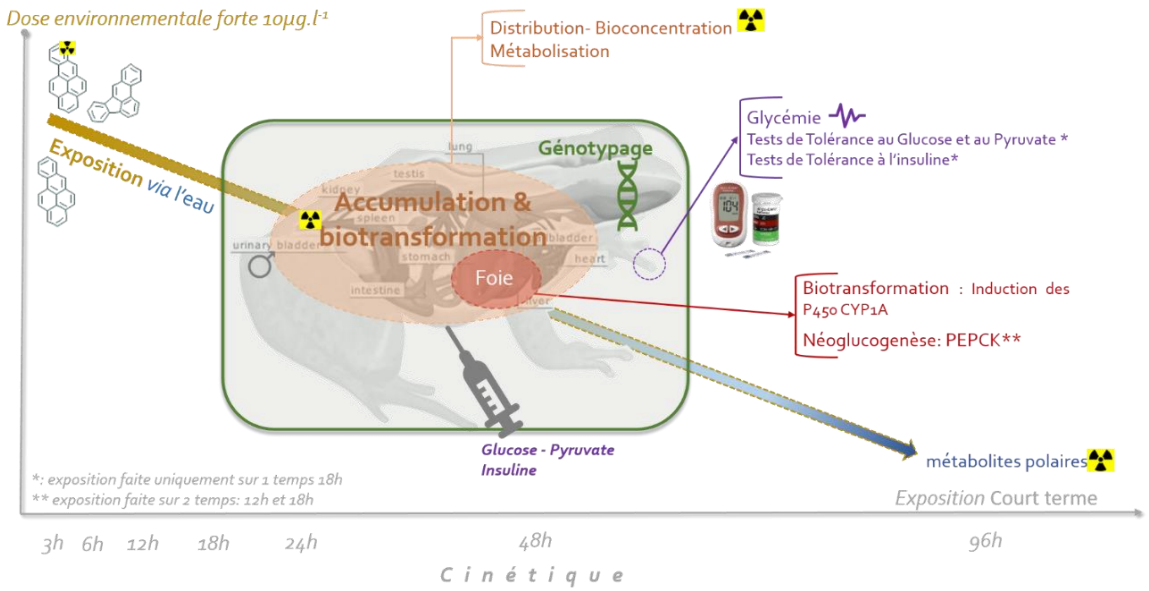


Figure 27 : Résumé des différentes manipulations mises en place : Bioconcentration – métabolisation, Glycémie et Génotypage.

- Dans la première partie de l'étude, nous nous sommes intéressés à l'absorption, la métabolisation, la bioconcentration et/ou l'excrétion du BaP par les grenouilles vertes sauvages mâles. Les individus ont été exposés au BaP seul ou en mélange avec le BbF à une dose environnementale forte (10 $\mu g.l^{-1}$) durant de 3, 6, 12, 24, 48 et 96 heures. La toxicocinétique du BaP a été réalisée en suivant le 7-^{14}C BaP radiomarquée. (Figure 27 : Accumulation et Biotransformation en orange). De plus nous avons suivi l'impact de ces expositions sur les enzymes de biotransformation notamment sur les cytochromes P450 CYP1A dans le foie.

- Dans la seconde partie, nous avons mesuré l'impact de l'exposition au BaP, BbF et au mélange pendant 18 heures à la même concentration sur le métabolisme hépatique. Plus particulièrement le métabolisme glucidique a été étudié par des tests de tolérance au glucose, puis par des expérimentations qui permettent de mettre en évidence des perturbations de la voie de la néoglucogenèse (test au pyruvate) et de la sensibilité à l'insuline (test à l'insuline) (Figure 27 : glycémie : violet). Les modifications de la voie de la néoglucogenèse ont également été étudiées en mesurant les niveaux de transcription de gènes clés de ce processus (*PEPCK* et le coactivateur *PCG-1a*). De plus, s'intéressant au métabolisme hépatique, il nous est apparu important de contrôler le niveau nutritionnel de nos populations de grenouilles vertes. De ce fait, nous nous sommes intéressés à l'existence d'élevage de grenouilles vertes en France et nous nous sommes ainsi focalisés sur l'élevage développé par l'INRA de Rennes. Ces grenouilles vertes Rivan92 ont la capacité d'accepter comme alimentation des granules inertes, ce qui permet un apport nutritionnel plus contrôlé. De plus la traçabilité de ces grenouilles est donc facilitée et les animaux ont connus les mêmes conditions d'élevage.

- Du fait d'une grande variabilité des réponses observées sur les grenouilles vertes sauvages expédiées sous le nom de *Pelophylax kl. esculentus* et des grenouilles d'élevage, nous nous sommes également intéressés à leurs caractéristiques génétiques. Dans la troisième partie, nous avons essayé de caractériser nos populations de grenouilles sauvages et nos populations de grenouilles d'élevage Rivan92 par séquençage de l'intron 1 du gène de l'albumine sérique.

II. Matériel et méthodes

1. Les grenouilles vertes

A. Les grenouilles sauvages

Il existe sur le territoire Français trois espèces de « grenouilles vertes » autochtones : *P. ridibundus*, *P. lessonae* et *P. perezi* et deux hybrides *: P. kl. esculentus* et *P. kl. grafi*. **Elles sont toutes protégées sur le territoire français.**

Cette protection des grenouilles vertes en France est en lien direct avec la liste rouge des espèces menacées publiée par l'IUCN. Quatre espèces de grenouilles vertes sur cinq sont classées en quasi menacée (NT) et les populations de grenouilles vertes sont en décroissances, excepté l'espèce largement importée : *P. ridibundus* (Tableau 11).

La convention de Berne 1982 (convention relative à la conservation de la vie sauvage et du milieu naturel de l'Europe) permet d'avoir un outil juridique protégeant la faune (Annexe III).
La directive habitat de 1992 classe trois espèces (*P. ridibundus, P. perezi* et *P. kl. esculentus*) en annexe V (espèces animales ou végétales dont l'exploitation doit faire l'objet de mesures de gestion) et une *P. lessonae* en annexe IV (espèces animales et végétales à protéger strictement).

L'arrêté du 19 Novembre 2007classe *P. kl. esculentus* dans l'article 5 le moins restrictif qui stipule l'interdiction de mutiler, ainsi que de détenir, transporter, de naturaliser, de colporter de vendre et d'acheter ces animaux. Les trois espèces de grenouilles vertes (*P. ridibundus*, *P. perezi* et *P. kl. grafi* sont régies par l'article 3 qui ajoute l'interdiction de détruire ou d'enlever (les adultes, les œufs et les nids), de capturer et de perturber intentionnelle les animaux dans le milieu naturel.

P. lessonae est protégée par l'article 2, le plus restrictif, qui interdit en plus de perturber intentionnellement les animaux, de détruire, d'altérer ou dégrader les sites de reproduction et les aires de repos.

Tableau 11 : Statuts législatifs et degré de menace chez les cinq espèces de grenouilles vertes en France

		Listes et textes législatifs			
	Taxons	Liste rouge des vertébrés de France 2015	Convention de Berne (1982)	Directive habitat 1992	Arrêté du 19 nov 2007
Espèces parentes	*Pelophylax ridibundus*	LC Tendance de la pop. inconnue	Annexe III	Annexe V	Article 3
	Pelophylax lessonae	NT Tendance de la population : diminution	Annexe III	Annexe IV	Article 2
	Pelophylax perezi	NT Tendance de la population : diminution	Annexe III	Annexe V	Article 3
Espèces hybrides	*Pelophylax kl. esculentus*	NT Tendance de la population : diminution	Annexe III	Annexe V	Article 5
	Pelophylax kl. grafi	NT Tendance de la population : diminution	Annexe III	Pas de données	Article 3

Inventaire national du patrimoine naturel INPN http://inpn.mnhn.fr
(MNHN et SHF, 2015)

NT : Quasi menacée (espèce proche du seuil des espèces menacées ou qui pourrait être menacée si des mesures de conservation spécifiques n'étaient pas prises).
LC : Préoccupation mineure (espèce pour laquelle le risque de disparition de France métropolitaine est faible).

Compte tenu du statut de protection en France, leur capture est interdite. Il faut une autorisation préfectorale pour pouvoir les manipuler.

Pour notre étude, nous n'avons pas utilisé des grenouilles autochtones. Mais nous voulions garder une espèce présente sur notre territoire. Nous avons choisi de travailler sur le modèle *Pelophylax kl. esculentus* et nos individus sont des mâles.

Les animaux proviennent du Centre d'Ardenay (http://www.elevagedardenay.com/), ce sont des grenouilles sauvages qui ont été pêchées dans leurs pays d'origine : la Grèce, la Turquie et l'Afrique du Nord puis importées en France. Elles appartiennent vraisemblablement à la lignée *ridibundus-bedriagae* vendues sous le nom de *Pelophylax esculentus*.
Dans notre laboratoire, nous les maintenons en eau courante dans des conteneurs (densité 100 grenouilles/m^2) à une température ambiante de 22°C. Elles sont soumises à une photopériode 12 h de jour et 12 h de nuit. Elles sont nourries avec des larves de diptères à une fréquence d'une fois par jour *ad libidum*.
Lors de l'arrivage, les grenouilles sont traitées au bleu de méthylène de 12 h à 24 h (2 mg par litre (Clément, 2005)). Les expérimentations sont réalisées après une période de stabulation/épuration d'au moins 3 semaines dans notre laboratoire.

B. Les Grenouilles d'élevage RIVAN 92

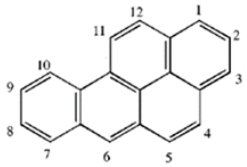
Afin d'éviter les problématiques liées aux importations d'animaux vivants telles que le stress, l'absence de traçabilité de ces animaux tant sur l'origine que sur leur état sanitaire, et pour garantir une alimentation équilibrée nous avons cherché à obtenir des animaux issus d'élevage.

Se posait alors la question de l'existence d'un élevage de « grenouilles vertes » en France.

Notre attention s'est portée sur les travaux d'André Neveu qui a développé au sein de l'INRA de Rennes un élevage de « grenouilles vertes » à des fins commerciales et alimentaires. En effet au regard d'une consommation croissante induisant une augmentation de l'importation de ces grenouilles depuis les années 1960 et de la diminution des populations sur notre territoire depuis la Seconde Guerre mondiale, A. Neveu a travaillé sur la possibilité de sélectionner, élever des grenouilles dans des conditions d'hygiène et de rentabilité acceptables pour obtenir un élevage viable commercialement.
Les premiers essais d'élevage ont été réalisés en 1980 en prélevant des « grenouilles vertes » dans la nature autour de Rennes (Bretagne). Ces « grenouilles vertes » prélevées dans l'environnement appartenaient au complexe *esculentus* et après 10 ans, A. Neveu a sélectionné des grenouilles capables d'avoir de l'appétence pour de la nourriture inerte type granules à poisson. D'après lui, les grenouilles ainsi échantillonnées appartiennent à l'espèce *P. ridibundus* (Neveu, 2009; Neveu, 2011). En 2006, une licence sur savoir-faire (J.O du 11 Août 2006) a été déposée pour l'élevage de ces animaux sélectionnés en partenariat avec l'unité expérimentale d'écologie et d'écotoxicologie aquatique de l'INRA U3E. La première souche de grenouille domestique sélectionnée est née : RIVAN 92.
En 2013, nous avons eu l'autorisation par l'INRA transfert d'acheter des grenouilles RIVAN 92 vivantes au seul éleveur de « grenouilles vertes » en France la SARL François Production (Pierrelatte Drôme).

2. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

A. Le benzo[a]pyrène B*a*P



Une solution mère de B*a*P (pureté ≥ 96 %, Sigma-Aldrich) a été préparée à une concentration de 500 mg.l^{-1}dans de l'éthanol absolu HPLC grade et a été conservée à l'abri de la lumière à 4 °C.

N°CAS 50-32-8

Irritant GHS07

Toxique (chronique) GSH08

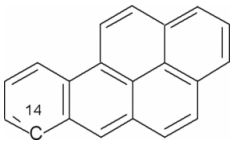
Nuit à l'environnement GHS09

Danger:

H317 - Peut provoquer une allergie cutanée
H340 – Peut induire des anomalies génétiques
H350 – Peut provoquer le cancer
H360FD – Peut nuire à la fertilité. Peut nuire au développement
H410 – Très toxique pour les organismes aquatiques, entraine des effets néfastes à long terme.

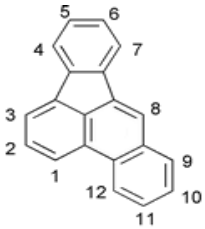
http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F-14.pdf (IARC, Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds, 1973) (IARC, 1983) (IARC, 2010)

B. Le benzo[a]pyrene marqué au carbone 14



La solution mère (source) de 7-C^{14} BaP contenant 50 µCi (Sigma Aldrich, France) a été préparée en ajoutant 500 µl d'éthanol absolu HPLC grade. Ensuite le nombre de dpm par microlitre a été vérifié en réalisant un comptage de radioactivité en milieu liquide à l'aide d'un compteur à scintillation 1414 Wallac counter (Winspectral EG & G® Wallac).

C. Le Benzo[b]fluoranthène B*b*F



Une solution mère de BbF (pureté à 98 %, Sigma-Aldrich) a été préparée à une concentration de 500 mg.l^{-1}dans éthanol absolu HPLC grade et a été conservée à l'abri de la lumière à 4 °C.

N°CAS 205-99-2

Toxique (chronique) GSH08

Nuit à l'environnement GHS09

Danger:

H340 – Peut induire des anomalies génétiques
H410 – Très toxique pour les organismes aquatiques, entraine des effets néfastes à long terme

Avant toute utilisation, les solutions mères (excepté le 7-C^{14} BaP) sont vortexées et passées au bain à ultra-sons pendant 2 min.

3. Facteurs de BioConcentration (BCF)

A. Expositions

Les animaux ont été exposés individuellement dans des aquariums contenant 200 ml d'eau du robinet à laquelle ont été ajoutés les polluants à une concentration de 10 $\mu g.l^{-1}$ chacun et enrichi au BaP radiomarqué (10^6 dpm soit 85 $mBq.ml^{-1}$). Les aquariums ont été maintenus à une température de 22 °C. L'exposition a été faite suivant un rythme jour/nuit de 12 h/12 h, exactement comme leur acclimatation et leur maintien. Les animaux n'ont pas été nourris pendant la durée de l'exposition afin de mesurer l'impact des polluants via la voie transcutanée uniquement.
Les durées d'exposition ont été faites suivant une cinétique de 3, 6, 12, 24, 48 et 96 heures (Figure 28). Afin de limiter les effets du rythme circadien, les mêmes temps d'exposition ont été réalisés ensemble le même jour et débutés à la même heure.

A

B

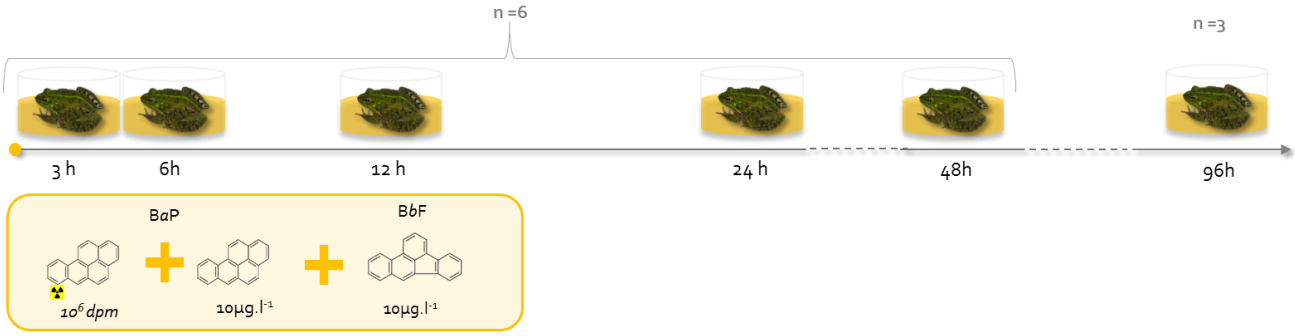


Figure 28 : A : Exposition des grenouilles vertes au BaP (BaP + 7-^{14}C BaP) et B : au mélange BaP-BbF (BaP + BbF +7-^{14}C BaP)

B. Extraction du BaP et des métabolites lipophiles

1. La solution d'exposition et évaluation du pourcentage de BaP

a) *Extraction*

50 ml de la solution d'exposition ont été placés dans une ampoule à décanter. Le tube de stockage de la solution a été vortexé pendant 1 min avec 30 ml de n-hexane afin de récupérer la totalité du BaP et de ses métabolites. Les 30 ml de n-hexane avec 5 ml d'acétone (améliore la miscibilité de l'eau et du n-hexane) ont été ajouté à la solution d'exposition. L'ampoule à décanter a été retournée, agitée et dégazée. La phase de n-hexane a été récupérée, conservée dans un erlenmeyer et la phase aqueuse a été récupérée pour être à nouveau extraite de la même façon (cette opération a été répétée au total 3 fois pour permettre l'extraction totale du BaP et des métabolites lipophiles). 2,5 g de sulfite de sodium Na_2SO_3 (Sigma Aldrich, France) ont été ajoutés à la phase de n-hexane totale (3

x 30 ml) afin de piéger l'eau résiduelle, puis elle a été filtrée sur papier filtre et verre fritté sous vide pour être concentrée à l'évaporateur rotatif à une température de 40°C. 150 µl d'éthanol absolu HPLC grade ont été ajoutés aux extraits secs. Puis les extraits ont été vortexés et passés au bain à ultra-sons pendant 2 min avant le dosage. Les solutions aqueuses ont été conservées pour le dosage des métabolites polaires.

b) *Chromatographie sur couche mince (CCM)*

Le principe de la CCM est de séparer les différents composants d'un échantillon par affinité différentielle entre une phase stationnaire (couche mince de matériel absorbant) et une phase mobile (mélange de solvant).

Un dépôt de 50 à 100 µl de chaque extrait a été réalisé à 2 cm du bas de la plaque de gel de silice (Macherey-Nagel G-25) qui représente la phase stationnaire et l'éluant utilisé était un mélange de solvant toluène-isopropanol (4 : 1, v/v). Les composés radiomarqués au ^{14}C séparés sur la plaque de silice ont été révélés par exposition pendant 24 heures sur un écran au phosphore (radioluminescent) et par leur lecture à l'aide du phosphoimager-cyclone (PerkinElmer, France). Puis les images ainsi obtenues ont été analysées avec le logiciel OptiQuant™ Image Analysis (PerkinElmer, France) afin de déterminer les facteurs de rétention (Rf) des différents produits et le pourcentage de représentativité des composés par rapport à la totalité des produits.

2. Le sang

Le sérum a été récupéré après avoir laissé coaguler le sang 30 à 60 min à température ambiante et l'avoir centrifugé à 1000g pendant 15 min. 100 µl de sérum ont été dosés.

3. Les organes

La vésicule biliaire est percée et 1ml d'éthanol 95° a été ajouté à la bile.
La carcasse a été broyée dans un broyeur à couteau avec 5 ml d'acétone et 17,5 ml d'éthanol 95° pendant 5 min (5 x 1 min). Le broyat a été récupéré, le broyeur a été rincé avec 10 ml d'éthanol 95° (volume total d'extraction a été de 32,5 ml d'éthanol). Le tout a été centrifugé à 3 000 rpm pendant 5 min à 4 °C.
Les organes ont été congelés à l'azote liquide et broyés dans un mortier. Un ml d'acétone a été ajouté aux échantillons réduits en poudre, ainsi qu'un volume d'éthanol (Tableau 12). Après homogénéisation au pilon, les mélanges ont été centrifugés à 3 000 rpm pendant 5 min à 4 °C.
Les différents surnageants ont été stockés à -20 °C.

Tableau 12 : Volume final d'éthanol ajouté pour l'extraction pour chaque organe

Organes	Volume final d'éthanol 95°
Foie	5 ml
Intestin	4 ml
Estomac	4 ml
Cœur	1 ml
Poumons	1 ml
Rate	1 ml
Corps jaunes	1 ml
Muscle	4 ml
Peau	4 ml

L'absence de résidus radioactifs dans le culot a été systématiquement vérifiée en réalisant une deuxième extraction.

C. Mesure du BaP et ses métabolites radiomarqués au ^{14}C

Le principe de ce comptage de radioactivité en milieu liquide consiste à quantifier le nombre de photons émis par les composants fluorescents du liquide à scintillation excités par les radiations ionisantes (particule à émission β : composés radiomarqués au ^{14}C). Ce nombre de photons est proportionnel au nombre de désintégrations. Il est exprimé en désintégration par minute (dpm)

5 ml d'extraits d'échantillon ont été ajoutés à 10 ml de liquide scintillant universel (Rotiszint® eco plus ; Carl Roth, France). Un blanc a été réalisé en remplaçant l'extrait par le solvant d'extraction. Une double lecture des échantillons a été réalisée à l'aide du compteur 1414 Wallac counter (Winspectral EG & G® Wallac). La valeur retenue de dpm a été la moyenne des 2 lectures.

Les comptages effectués sur les différents organes et sur la solution de trempage permettent de calculer le facteur de bioconcentration du BaP et de ses métabolites en calculant le ratio de la quantité de dpm dans l'organe sur la quantité de dpm dans la solution de trempage.

4. Mesure de l'induction des Cytochromes P450 (activité EROD)

A. Expositions des grenouilles

Les animaux ont été exposés individuellement dans des aquariums contenant 200 ml d'eau du robinet à laquelle ont été ajoutés les polluants à une concentration de 10 $\mu g.l^{-1}$ chacun. Pour les témoins, à l'eau a été ajouté un volume d'éthanol absolu HPLC grade correspondant au volume de solvant apporté avec les polluants soit 0,002 %. Les aquariums ont été maintenus à une température de 22 °C. L'exposition a été faite suivant un rythme jour/nuit de 12 h/12 h, exactement comme leur acclimatation et leur maintien. Les animaux n'ont pas été nourris pendant la durée de l'exposition afin de mesurer l'impact des polluants via la voie transcutanée.
Les durées d'exposition ont été faites suivant une cinétique de 6, 12, 24 heures et 48 heures.

B. Préparation des échantillons

A l'issu de chaque exposition, les animaux ont été sacrifiés par commotion cérébrale afin d'éviter l'utilisation d'anesthésiant chimique pouvant impacter les réponses physiologiques de l'animal.
Le foie a été récupéré immédiatement, les différents lobes ont été identifiés. La vésicule biliaire, les reins, les testicules ont également été prélevés. Les différents organes ont été congelés immédiatement dans l'azote liquide et conservés à -80 °C.

C. Extraction des microsomes de foie

De 0,2 g à 0,4 g de foie ont été rincés dans une solution de chlorure de potassium à +4°C (KCl, 0,15M) puis broyés dans un tampon d'homogénéisation (sucrose, 250 mM ; HEPES, 10 mM ; EDTA, 1 mM ; PMSF; DTT, 1 mM ; pH 7,4) à l'aide d'un homogénéiseur Ultra Turax (IKA LaborTechnik) dans la glace. Les microsomes ont été obtenus après différentes centrifugation réalisées sur ultracentrifugeuse Beckman L8-70M-rotor 50.4Ti. Les homogénats ont été centrifugés à 12 000 rpm pendant 20 minutes à 4 °C afin d'éliminer les noyaux, les mitochondries, les lysosomes et les débris cellulaires. Les surnageants (fractions S9) ont été transférés et ultracentrifugés à 25 000 rpm pendant 1 heure à 4 °C. Les culots contenant les microsomes ont été re suspendus dans le tampon d'homogénéisation additionné de 20 % de glycérol (v/v) sur glace.

D. Dosage protéique des microsomes

Le dosage protéique se fait selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976) dont le principe repose sur la formation d'un complexe entre le bleu de coomassie (Blue Brillant G250) et les protéines en solution particulièrement avec les acides aminés basiques (arginine, histidine et lysine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents. Ce complexe entraine un déplacement du pic d'absorption du bleu de coomassie d'une longueur d'onde de 465 nm (dans le rouge) à 595 nm (dans le bleu). Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant ainsi la quantité de protéine. L'albumine sérique bovine a été choisie pour réaliser la gamme étalon (de 0 à 1,4 $mg.ml^{-1}$). Le dosage des différents échantillons, ainsi que les différents points de la gamme ont été réalisés en dupliquas dans une plaque de 96 puits (NUNC fond transparent). Chaque puit contient 5 µl d'échantillon et 250 µl de réactif de Bradford prêt à l'emploi (Sigma-Aldrich) selon les recommandations du fournisseur. Le mélange a été incubé pendant 20 min à température ambiante à l'abri de la lumière. La mesure de l'absorption a été faite par un lecteur de plaque VarioskanFlash (Thermo Scientific) à la longueur d'onde de 595 nm.

E. Activité EROD (7-EthoxyRésorufine-O-Dééthylase)

L'activité 7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase ou activité EROD permet de mesurer l'induction du cytochrome P450 1A. Cette réponse est fortement étudiée pour son potentiel en tant que biomarqueur de l'environnement notamment vis-à-vis des HAP. De plus l'activité EROD apparait fortement inductible chez de nombreux vertébrés incluant les poissons, les amphibiens, les reptiles et les mammifères (Burke et Mayer, 1974; Ertl et Winston, 1998; Reynaud *et al*, 2002; Reynaud *et al*, 2008).

Le principe consiste à mesurer la vitesse de dééthylation médiée par le CYP1A du substrat 7-éthoxyrésorufine pour former le produit résorufine excitable à une longueur d'onde de 537 nm, pour réémettre à la longueur d'onde de 583 nm (Figure 29).

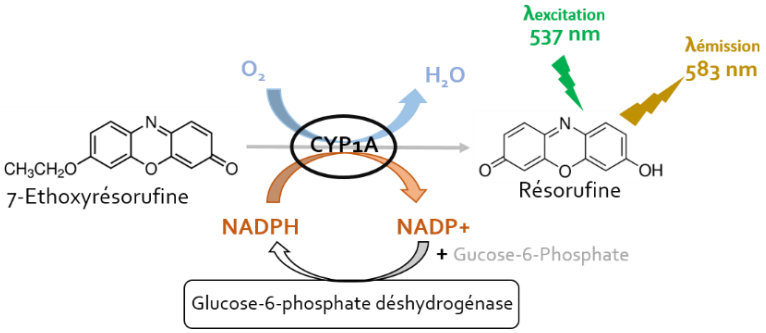


Figure 29 : Schéma de la conversion de la 7-Ethoxyrésorufine en Résorufine par le cytochrome P450 CYP1A

A 50 µg de microsomes de foie ont été ajoutés 150 µl de 7-éthoxyrésorufine à 3,5 µM, 10 µl de Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH, Sigma Aldrich, France) à 0,25 mM, 7,8 µl de Glucose 6 Phosphate (G6P, Sigma Aldrich, France) à 100 mM, 0,5 µl de Glucose-6-Phosphate DesHydrogénase (G6P-DH, Sigma Aldrich, France) à $1 mg.ml^{-1}$et la quantité suffisante de tampon phosphate (200 mM Na_2HPO_4, 50 mM KH_2PO_4, pH 7,4) pour un volume final de 260 µl. La réaction a été faite à une température de 30 °C à l'abri de la lumière dans des plaques 96 puits noires (NUNC). Le suivi de la cinétique de formation de la résorufine s'est fait pendant 1 heure avec une mesure d'émission de fluorescence toutes les minutes à la longueur d'onde de 583 nm à l'aide du lecteur Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific). Un blanc a été réalisé pour chaque échantillon

en chauffant à 95 °C pendant 10 minutes 50 µg de microsomes. Une gamme étalon a été réalisée avec de la résorufine (de 0 à 195 pmol). L'activité EROD a été exprimée en pmol de résorufine formée par minute par mg de protéine.

5. Métabolisme du Glucose ou homéostasie du glucose

Afin de mesurer des perturbations de la régulation du glucose, nous avons réalisé des tests permettant dans un premier temps d'évaluer la capacité de l'organisme à faire diminuer le glucose plasmatique après une charge en glucose. Puis nous avons testé la voie de la néoglucogenèse hépatique qui permet la génération de glucose à partir de substrats non glucidiques comme le pyruvate. Enfin, nous avons voulu évaluer la sensibilité à l'insuline (hormone sécrétée par le pancréas qui régule la captation périphérique du glucose).

A. Expositions des grenouilles

Avant exposition, les animaux ont été mis à jeûner pendant 72 heures. Les grenouilles ont été pesées et exposées individuellement dans des aquariums contenant 200 ml d'eau du robinet à laquelle ont été ajoutés les polluants à une concentration de 10 $\mu g.l^{-1}$chacun pendant une durée de 18 heures. Pour les témoins, à l'eau a été ajouté un volume d'éthanol absolu HPLC grade correspondant au volume de solvant apporté par les polluants soit 0,002 %. Les aquariums ont été maintenus à une température de 22 °C. L'exposition a été faite suivant un rythme jour/nuit de 12 h/12 h, exactement comme leur acclimatation et leur maintien.

B. Test de Tolérance intra péritonéal au Glucose : ipGTT

L'ipGTT (intraperitoneal Glucose Tolerance Test ou hyperglycémie provoquée par l'injection intra péritonéale) est un test simple qui permet d'évaluer la capacité de l'organisme à normaliser la glycémie après une charge en glucose.

La glycémie initiale (avant injection) a été mesurée au doigt (prise de sang digitale) sur grenouilles vigiles par l'utilisation de bandelettes réactives (Accu-Chek®, Roche). Le principe de la mesure repose sur une enzyme la quinoprotéine glucose déshydrogénase présente sur la bandelette, qui convertit le glucose en glucunolactone. Cette réaction crée un faible courant électrique proportionnel au taux de glucose sanguin. Le glucomètre l'interprète pour évaluer la teneur en glucose. Un mg de glucose (solution hypertonique de glucose à 20 %, B.Braun) par gramme de masse fraiche de grenouille a été injecté en intrapéritonéal. Un suivi de la glycémie a été effectué toutes les 15 minutes pendant la première heure et ensuite toutes les heures pendant 6 heures. Après chaque mesure, les grenouilles ont été maintenues dans leur aquarium contenant de l'eau sans ajout de polluant. L'eau est systématiquement changée après chaque mesure.
Afin de vérifier que le volume d'injection et l'hypertonicité de la solution ne sont pas responsables *per se* de l'hyperglycémie, une solution isotonique de NaCl (chlorure de sodium 0,9 %, B.Braun) a été injectée en intrapéritonéal chez les grenouilles.
Les différentes expositions ont été faites en plusieurs réplicats (expositions différentes (témoin, BaP, BbF et mélange) le même jour, et différents jours d'exposition)

Les aires sous la courbes réalisés pour les tests ipGTT ont été calculées avec le logiciel AIRE.BAT 1992 sous MS-DOS.

C. Test de tolérance intra péritonéal au Pyruvate : ipPTT

Le Test de Tolérance intra péritonéal au Pyruvate est une variante du test ipGTT, dans lequel 1 mg de pyruvate (Sigma-Aldrich, France) par gramme de masse fraiche de grenouille a été injecté à la place du glucose.
Le pyruvate étant un substrat du cycle de Krebs, permet à la cellule de générer du glucose par la voie de la néoglucogenèse (Figure 30). Ainsi ce bolus de pyruvate injecté provoque une excursion glycémique reflétant la néoglucogenèse hépatique

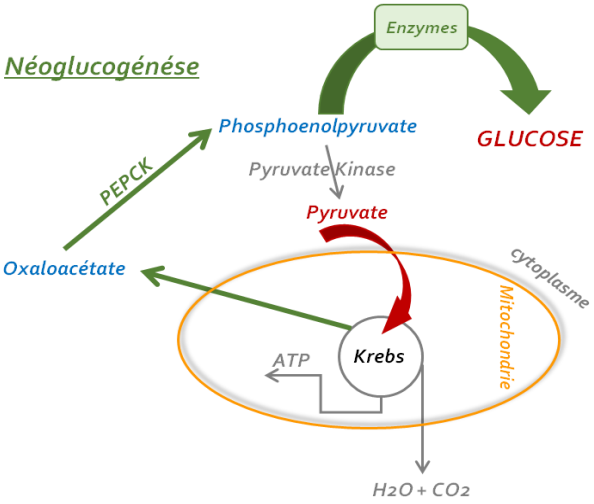


Figure 30 : Le pyruvate dans la voie de la néoglucogénèse (PEPCK : PhophoEnolPyruvate CarboxyKinase)

Le suivi de la glycémie a été faite toutes les 30 minutes pendant les 2 premières heures, puis toutes les heures pendant 6 heures à l'aide de bandelettes réactives Accu-Chek® de la même façon que dans le test ipGTT. Après chaque mesure, les grenouilles ont été maintenues dans leur aquarium contenant de l'eau sans ajout de polluant. L'eau est systématiquement changée après chaque mesure.

Les aires sous la courbes réalisés pour les tests ipPTT ont été calculées avec le logiciel AIRE.BAT 1992 sous MS-DOS.

D. Test de Tolérance à l'Insuline : ITT

Le Test de Tolérance à l'Insuline permet de mettre en évidence un défaut de sensibilité à l'insuline. Ce test est facile à mettre en œuvre mais présente des inconvénients avec en particulier un risque d'hypoglycémie susceptible d'induire une contre régulation hormonale, responsable elle-même d'une diminution de la sensibilité à l'insuline.
Le test consiste à injecter de l'insuline bovine (Sigma, France) à une concentration de 17 mU (milliUnité Internationale) par masse fraiche de grenouille dans les sacs lymphatiques dorsaux. De la même façon que les deux tests précédents, le suivi de la glycémie a été réalisé à l'aide de bandelettes réactives Accu-Chek®.
Deux tests distincts ont été réalisés. Un premier test a été réalisé pour comparer les grenouilles sauvages (n = 9) et les grenouilles d'élevage Rivan92 (n = 8) non exposées. Le suivi de la glycémie a été réalisé au temps t0 avant injection puis à 90, 180, et 240 minutes après injection. Et un deuxième test ITT a été également réalisé en modifiant la cinétique du suivi de glycémie. Ce dernier a été réalisé sur 360 minutes, avec des temps de suivi de glycémie toutes les 30 minutes les premières 90 minutes (afin de mieux estimer le temps nécessaire pour que l'insuline entraine une diminution du taux de glucose dans le sang), des contrôles à 180, 240 et 360 minutes après injection d'insuline. Ce test a été réalisé sur des effectifs petits (n = 2) et sur grenouilles sauvages non exposées et exposées, ainsi que sur grenouilles Rivan92 non exposées.

E. Extraction et quantification par RT-qPCR des transcrits hépatiques

1. Extraction ARN

Vingt-cinq mg de foie ont été broyés sur glace dans 1 ml de Trizol (solution monophasique de phénol et d'isothianate de guanidine- Ambion life technologies) à l'aide d'un broyeur à tissus (ARGOS Technologies). Les broyats ont été homogénéisés en inversant les tubes 5 à 6 fois. Puis ils ont été centrifugés à 12 000 rpm pendant 10 minutes à 4 °C (centrifugeuse HITACHI Koki Himac CT15RE) afin de précipiter les débris cellulaires. Les surnageants ont été récupérés et laissés 5 minutes à température ambiante pour permettre la dissociation des complexes nucléoprotéiques. 200 µl de chloroforme (Carl Roth) ont été ajoutés. Le mélange surnageant/chloroforme a été vigoureusement vortexé pendant 30 secondes puis laissé 3 minutes à température ambiante et centrifugé à 12 000 rpm pendant 15 minutes à 4 °C afin d'obtenir un mélange biphasique (1 phase incolore aqueuse supérieure contenant les ARN et 1 phase coloré organique contenant le phénol-chloroforme et à l'interface, l'ADN). La phase aqueuse contenant les ARN a été récupérée et 500µl d'isopropanol (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés afin de les précipiter. Le mélange a été vigoureusement agité à la main pendant 15 secondes puis centrifugé à 12 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C pour culoter la totalité des ARN. Le culot a été lavé avec 1 ml d'éthanol (VWR) à 75 % pendant 5 minutes puis il a été centrifugé à 7 500 rpm pendant 5 minutes à 4 °C. Cette opération de lavage a été renouvelée 2 fois. Le culot exempt d'éthanol a été resuspendu dans 50 µl d'eau distillée ultrapure™ traitée contre les RNases (ThermoFischer Scientific, France)

.

2. Qualification et quantification des ARN

Les dosages des ARN extraits ont été réalisés sur un spectrophotomètre type Nano Drop 1000 (Thermo-Fisher) à une longueur d'onde de 260 nm (absorption des acides nucléiques). Ils ont été mesurés à l'aide de 2 µl d'ARN pur. La concentration est donnée par l'équation de la loi de Beer Lambert (**$c=A*\varepsilon)/\lambda$** où **c** est la concentration en acide nucléique en $ng.\mu l^{-1,}$ **A** l'absorbance (grandeur sans unité), **ε** est le coefficient d'extinction molaire modifié dépendant de la longueur d'onde exprimé en $ng\text{-}cm.ml^{-1}$: sa valeur pour l'ARN est de 40 $ng\text{-}cm.\mu l^{-1}$ et **λ** est la longueur du trajet en cm). La pureté de l'ARN a été vérifiée par le ratio de l'absorbance à 260 nm sur l'absorbance à 280 nm (longueur d'onde d'absorption des protéines, du phénol…) qui doit être très proche de 2, ainsi que la symétrie du pic à la longueur d'onde de 260 nm.

3. Synthèse de l'ADN complémentaire

a) *Digestion ADN génomique*

Avant de synthétiser l'ADN complémentaire, les extraits d'ARN ont été digérés par une Déoxyribonucléase afin d'éliminer toute contamination par de l'ADN génomique.

A 2 µg d'ARN, ont été ajoutés 1 µl de tampon 10X (200 mM Tris-HCL pH 8,4 ; 20 mM $MgCl_2$; 500 mM KCl), 1 µl de désoxyribonucléase DNase I à 1 $U.\mu l^{-1}$(Invitrogen™–ThermoFisher Scientific) et un volume d'eau distillée ultrapure™ exempte de DNase/RNase (Invitrogen™–ThermoFisher Scientific) pour un volume réactionnel final de 10 µl. Après une incubation de 15 minutes à température ambiante, la DNase I a été inactivée par l'ajout de 1 µl d'EDTA (Ethylène Diamine TétraAcétique) à 25 mM et par l'incubation à 65 °C pendant 10 minutes (Thermocycleur Eppendorf MasterCylcer®).

b) *Rétrotranscription de l'ARN*

Le système de synthèse monocaténaire SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen™–ThermoFisher Scientific) pour la rétrotranscription est optimisé pour synthétiser l'ADNc monocaténaire à partir d'ARN total.

Aux 10 µl de la solution d'ARN dépourvus d'ADN génomique précédente, ont été ajoutés 1 µl d'amorce poly-thymine oligo $dT_{(20)}$, qui s'hybride spécifiquement aux queues poly-adénine des ARN messager et 1 µl de mélange désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP : dATP, dTTP, dCTP, dGTP, à 10 mM chacun, Invitrogen™–ThermoFisher Scientific). Une étape de dénaturation de l'ARN a été effectuée par une incubation à 65 °C pendant 5 minutes puis les ARN ont été maintenus sur la glace pendant 1 minute. La rétrotranscription a été réalisée à 50 °C pendant 1 heure après ajout de 2 µl de tampon RT 10X (200mMTris-HCl pH 8,4, 500mM KCl), 4 µl de chlorure de magnésium ($MgCl_2$ 25 mM), 2 µl de dithiothréitol (DTT 0,1 M), 1 µl de RNaseOUT à 40 $U.\mu l^{-1}$ et 1 µl d'enzyme SuperScript III (200 $U.\mu l^{-1}$). La réaction a été inactivée en chauffant à 70 °C pendant 15 minutes.

c) *Digestion des ARN*

Dans chaque échantillon, est ajouté 1 µl de Rnase H (2 $U.\mu l^{-1}$) et la digestion s'effectue à 37 °C pendant 20 minutes.

4. PCR quantitative ou en temps réel (qPCR) sur les cDNA

L'objectif est de mettre en évidence des différences potentielles de transcription de gènes entre des animaux exposés ou non aux xénobiotiques.
La PCR quantitative est une application de la PCR classique. Elle permet la quantification du nombre de copies d'ADN cible dans l'échantillon par détection et mesure d'un signal fluorescent dont l'intensité d'émission est proportionnelle à la quantité d'amplicons produits pendant la réaction. Le fluophore utilisé est le SYBR® Green (Longueur d'onde d'excitation λ_{ex}=497 nm / longueur d'onde d'émission λ_{em}=520 nm). Le matériel utilisé est un thermocycleur couplé à un spectrofluorimètre du type iCylcer iQ™5 (Biorad™, USA).
L'analyse des données est réalisée selon la méthode de double normalisation ΔΔCt, présentée dans l'équation (1), qui tient compte de l'efficacité E de la qPCR (Pfaffl, 2001). Le Ct, pour Cycle threshold (calculé à l'aide du logiciel iQ5, BioRad), correspond au cycle PCR où la fluorescence augmente significativement par rapport au bruit de fond. La double normalisation permet de quantifier l'expression du gène chez les individus exposés par rapport aux individus témoins (ΔCt étant la différence de Ct entre témoins et exposés) tout en normalisant l'expression des gènes d'intérêts par un gène dit « de ménage ».

Equation (1) :
$$\Delta\Delta Ct = (E^{\Delta Ct})gène\ cible/(E^{\Delta Ct})gène\ de\ ménage$$

a) *Gène de ménage*

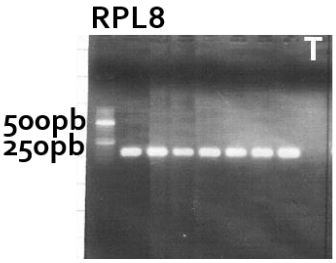
Le gène de ménage est un gène qui possède une expression ubiquitaire, stable entre les différents tissus, entre les individus et quelles que soient les conditions expérimentales.
Le gène choisi est un gène codant pour une Protéine Ribosomale L8 (RPL8) qui code pour une protéine cytoplasmique de la sous-unité (Large) 60S du ribosome.

Amorces RPL8 Tm : 56°C
RPL8-Sens (22 bases) : 5'-GCCACCGTTATCTCCCACAATC -3'
RPL8-Anti-sens (20 bases) : 5'-GACCACCACCAGCAACAACC -3'

Le couple d'amorces a été déterminé sur la séquence du gène de xénope (*Xenopus tropicalis* : ENSXETG00000015483). Nous avons vérifié l'obtention d'une amplification et l'homogénéité des produits amplifiés sur nos cDNA de « grenouilles vertes » en réalisant une PCR classique selon les conditions suivantes :

Etapes		Températures	Temps
Dénaturation initiale		95 °C	10 minutes
40 cycles PCR	Dénaturation	95 °C	30 secondes
	Hybridation	56 °C	30 secondes
	Élongation	72 °C	30 secondes
Elongation finale		72 °C	7 minutes

Les réactions PCR ont été réalisées dans un volume final de 50 µl en présence de 1 µl d'ADNc, 2U d'ADN polymérase AmpliTaq Gold® (applied biosystems-life technologies), du tampon spécifique de l'enzyme (Tampon10X Buffer II contenant 100 mM Tris-HCl, pH 8,3 et 500 mM KCl), de 2,5 mM de chlorure de magnésium $MgCl_2$, de 0,2 $\mu g.\mu l^{-1}$ d'albumine sérique bovine BSA (Roche Diagnostic), de 0,2 mM de dNTP et de 0,25 µM d'amorces (**RLP8-S** et **RPL8-AS : Eurogentec**). Les réactions d'amplification ont été faites à l'aide d'un thermocycleur Applied 2720 (Thermo Fisher Scientific).



5 µl de produits PCR ont été déposés sur un gel 1,5 % d'agarose /TBE (Tris-Borate 0,89 M, 20 mM EDTA, pH 8,3) contenant 5 µl de GelRed™ (Biotium-VWR). La migration a été faite à 120 V pendant 20 minutes. La visualisation a été faite à l'aide d'un transilluminateur UV 302/312 nm. Un marqueur de taille (50-750 pb) a été également déposé (Marqueur de poids moléculaires XIII-Roche Diagnostics). T représente le témoin négatif de PCR où l'échantillon a été remplacé par de l'eau exempte de DNAse.

b) *Design d'amorces PEPCK pour la PCR quantitative*

Le génome des « grenouilles vertes » n'est pas séquencé, par conséquent il a fallu mettre en place une stratégie afin de déterminer des amorces spécifiques capables d'amplifier le gène cible.

(1) *Détermination des amorces du gène PEPCK*

L'objectif est de déterminer un couple d'amorces capable d'amplifier spécifiquement le gène PEPCK chez un grand nombre d'espèces afin de garantir un recouvrement avec le gène PEPCK des grenouilles vertes.

Dans un premier temps, nous avons cherché les séquences connues du gène de la PEPCK chez d'autres organismes dans la base de données NCBI (National Center for Biotechnology Information : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Nous avons choisi les séquences de 4 espèces modèles : 2 espèces de xénopes (NM_001079568.1 | *Xenopus (Silurana) tropicalis* phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble) (pck1), mRNA et NM_001086477.1 | *Xenopus laevis* phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble) (pck1), mRNA), une espèce de poisson (NM_214751.1 | *Danio rerio* phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble) (pck1), mRNA) et 1 espèce de mammifère (NM_011044.2 | *Mus musculus* phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, cytosolic (Pck1), mRNA . Nous avons aligné ces 4 séquences à l'aide du logiciel d'alignement de séquence multiple MUSCLE 3.8 (**MU**ltiple **S**equence **C**omparison by **L**og- **E**xpectation : http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/) (Edgar, 2004). Ceci nous a permis de sélectionner un couple d'amorces permettant d'obtenir un amplicon de 1060 paires de bases. Ces amorces se situent dans des régions conservées du gène au sein des 4 espèces testées (Figure 31).

```
.../...
amorce                                  ------------------------------------------------------------
gi|118601165|ref|NM_001079568.1|   ...  CCTGTCCAAGATCGGGATTGAGTTGACGGACTCCCCGTATGTGGTGGCCAGCATGAGAAT
gi|148234125|ref|NM_001086477.1|   ...  GCTGTCCAAGATTGGGATTGAGTTGACTGATTCCCCATATGTGGTGGCCAGCATGAGAAT
gi|47550784|ref|NM_214751.1|       ...  GCTCTCCAAGATAGGGGTGGAGCTGACGGACTCGCCGTATGTGGTGGCCAGCATGCGGAT
gi|118130217|ref|NM_011044.2|      ...  GCTGGCCAAGATTGGTATTGAACTGACAGACTCGCCCTATGTGGTGGCCAGCATGCGGAT
amorce                                  ------------------------------------TATGTGGTGGCCAGCATG-------

amorce                                  ------------------------------------------------------------
gi|118601165|ref|NM_001079568.1|        CATGACTCGGATGGGCACGGCCGTACTGGAGACTCTGGGAGACGGGGAATTTGTCAAGTG
gi|148234125|ref|NM_001086477.1|        CATGACTCGGATAGGAACGGCTGTCCTGGAGACTCTGGGGGATGGAGAATTTGTGAAGTG
gi|47550784|ref|NM_214751.1|            CATGACGCGGATGGGGAAAACTGTGCTGAGCGCGCTGGGAAACGGAGAGTTCGTCCGGTG
gi|118130217|ref|NM_011044.2|           CATGACTCGGATGGGCATATCTGTGCTGGAGGCCCTGGGAGATGGGGAGTTCATCAAGTG
amorce                                  ------------------------------------------------------------
.../...                                                  ... 780 bases...
amorce                                  ------------------------------------------------------------
gi|118601165|ref|NM_001079568.1|        TGGTGTTTTTGTCGGATCTGCAATGAGGTCCGAAGCAACAGCGGCAGCTGAACATAAAGG
gi|148234125|ref|NM_001086477.1|        TGGTGTTTTTGTTGGATCTGCAATGAGGTCTGAAGCAACGGCGGCAGCTGAACATAAAGG
gi|47550784|ref|NM_214751.1|            CGGAGTGTTTGTAGGGGCGTCCATGAGGTCAGAGGCCACGGCGGCTGCTGAACACAAAGG
gi|118130217|ref|NM_011044.2|           TGGGGTGTTTGTAGGAGCAGCCATGAGATCTGAGGCCACAGCTGCTGCAGAACACAAGGG
amorce                                  ------------------------------------------------------------

amorce                                  ------------------------------------------------------------
gi|118601165|ref|NM_001079568.1|        CAAGGTTATCATGCACGATCCTTTTGCAATGAGACCTTTCTTTGGTTACAACTTCGGGAA
gi|148234125|ref|NM_001086477.1|        CAAGGTTATCATGCATGATCCATTTGCCATGAGACCTTTCTTTGGTTACAACTTTGGGAA
gi|47550784|ref|NM_214751.1|            TAAAGTGATCATGCATGACCCGTTCGCCATGCGTCCGTTCTTCGGCTATAACTTCGGTCA
gi|118130217|ref|NM_011044.2|           CAAGATCATCATGCACGACCCCTTTGCCATGCGACCCTTCTTCGGCTACAACTTCGGCAA
amorce                                  ------------------------------------------------------------

amorce                                  ------------------------------------------------------------TCTT
gi|118601165|ref|NM_001079568.1|        ATACCTTGCTCACTGGCTCAGCATGGAACACCTTCCCTCCACCAAGATGCCAAAGATCTT
gi|148234125|ref|NM_001086477.1|        ATACCTTGCTCACTGGCTCAGCATGGAACACTATCCATCCACCAAGCTGCCAAAGATCTT
gi|47550784|ref|NM_214751.1|            GTATCTCTCCCACTGGCTGAGCATGGAGCAGCGGCCCGGCGCTAAGCTGCCCAAAATCTT
gi|118130217|ref|NM_011044.2|           ATACCTGGCCCACTGGCTGAGCATGGCCCACCGCCCAGCAGCCAAGTTGCCCAAGATCTT
amorce                                  ------------------------------------------------------------

amorce                                  CCAYGTCAACTGGTTC-----------------------------------------
gi|118601165|ref|NM_001079568.1|        CCACGTCAACTGGTTCCGCAAAGACAAAGAAAGCAACTTCCTGTGGCCAGGCTACGGGGA   ...
gi|148234125|ref|NM_001086477.1|        CCACGTCAACTGGTTCCGTAAAGACAAAGAAGGCAACTTCCTGTGGCCAGGCTATGGGGA   ...
gi|47550784|ref|NM_214751.1|            CCACGTCAACTGGTTCGGCAGGAGCTCCTCGGGGCGCTTCCTGTGGCCGGGCTTTGGGGA   ...
gi|118130217|ref|NM_011044.2|           CCATGTCAACTGGTTCCGGAAGGACAAAGATGGCAAGTTCCTCTGGCCAGGCTTTGGCGA   ...
amorce                                  ------------------------------------------------------------
.../...
```

Figure 31 : Alignement du gène PEPCK CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8)

Amorces PEPCK1 Tm : 56 °C
PEPCK1-Sens (18 bases) : 5'-TATGTGGTGGCCAGCATG-3'
PEPCK1-Anti-sens (20 bases) : 5'-GAACCAGTTGACRTGGAAGA-3'

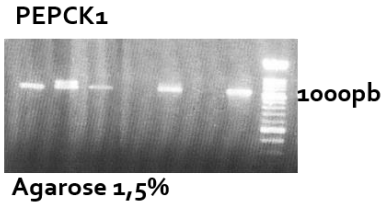
A noter que l'amorce anti-sens est dégénérée : R correspond aux bases Adénine (A) ou Guanine (G).

(2) PCR PEPCK1 sur grenouilles vertes

Les réactions PCR ont été réalisées dans un volume final de 50 µl en présence de 1µl d'ADNc, 2U d'ADN polymérase AmpliTaq Gold® (applied biosystems-life technologies), du tampon spécifique de l'enzyme (Tampon10X Buffer II contenant 100 mM Tris-HCl ; pH 8,3 et 500 mM KCl), de 2,5 mM chlorure de magnésium $MgCl_2$, de 0,2 $\mu g.\mu l^{-1}$ d'albumine sérique bovine BSA (Roche Diagnostic), de 0,2 mM de dNTP et de 0,25 µM d'amorces (**PEPCK1-S** et **PEPCK1-AS : Eurogentec**). Les réactions d'amplification ont été faites à l'aide d'un thermocycleur Applied 2720 (Thermo fisher Scientific) selon les conditions suivantes :

Etapes		Températures	Temps
Dénaturation initiale		95 °C	10 minutes
40 cycles PCR	Dénaturation	95 °C	30 secondes
	Hybridation	56 °C	30 secondes
	Élongation	72 °C	100 secondes
Elongation finale		72 °C	7 minutes

Cette étape d'amplification a été réalisée sur une dizaine d'individus de grenouilles vertes provenant d'arrivages différents.
5 µl de produits PCR ont été déposés sur un gel 1,5 % d'agarose /TBE (Tris-Borate 0,89 M ; 20 mM EDTA ; pH 8,3) contenant 5 µl de GelRed™ (Biotium-VWR). La migration a été faite à 120V pendant 20 minutes. La visualisation a été faite à l'aide d'un transilluminateur UV 302/312 nm. Un marqueur de taille (400-1500 pb) a été également déposé (Marqueur de poids moléculaires XIV-Roche Diagnostics).



A l'issu de la vérification, nous avons sélectionné 6 individus montrant une amplification correcte du gène de PEPCK.
Ces 6 amplicons ont été envoyés à séquencer.

(3) *Séquençage amplicons PEPCK1*

Le séquençage a été réalisé par la société Beckman Coulter Genomics selon la technique de séquençage Sanger (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1977).
Les produits d'amplification de PCR ont été alors envoyés selon les recommandations de préparations des échantillons indiquées sur le portail web cogenics online (https://www.cogenicsonline.com/COL/uwa.maya.engine.MayaEngine?siteid=col&mapid=home).
Le principe de séquençage Sanger repose sur la duplication d'un brin matrice d'ADN grâce à la présence d'une amorce, d'un ADN polymérase, de désoxynucléotide (dNTP) et en plus faible proportion de didésoxynucléotides (ddNTP) qui sont couplés à des fluorophores spécifiques permettant l'arrêt de la duplication. Les différents fragments ainsi dupliqués migrent sur un gel et des détecteurs permettent de déterminer le dernier nucléotide fixé et donc l'ordre d'assemblage (Figure 32).

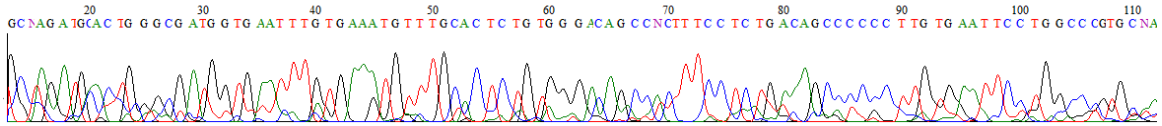


Figure 32 : Exemple de profil de séquence envoyée par cogenics issu du séquençage de Sanger

Les produits PCR ont été séquencés dans un seul sens (PEPCK1-S).

(4) *Alignement des séquences PEPCK1*

Nous avons récupéré 5 séquences exploitables sur 6 envoyées. Le programme en ligne PriFi (Fredslund *et al*, 2005) (http://cgi-www.cs.au.dk/cgi-chili/PriFi/main) nous a permis de réaliser un alignement de plusieurs séquences (format fasta) *via* Clustal (programme d'alignement de séquences multiples), puis a déterminé des paires d'amorces.
Un couple d'amorces dégénérées de 19 et 20 bases donnant un amplicon de 141 paires de bases spécifiques de ces 5 séquences (Figure 33) a été ainsi déterminé.

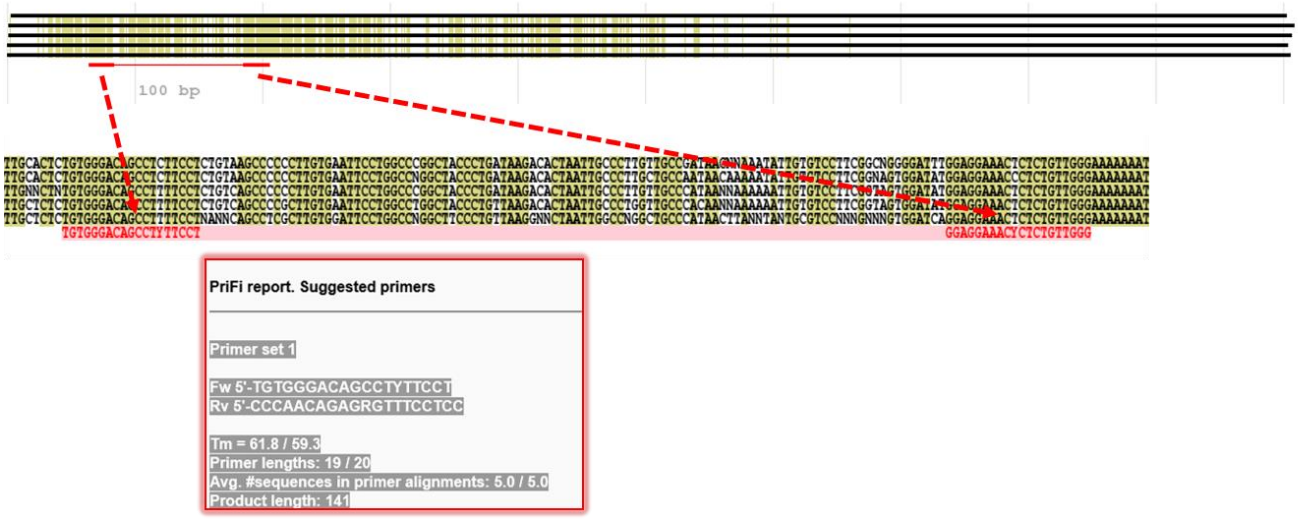


Figure 33 : PriFi : alignement multiple de séquences et "design" couples d'amorces PEPCK

Amorces PEPCK-rana Tm : 60°C
PEPCK-rana-Sens (19 bases) : 5'-TGTGGGACAGCCTYTTCCT-3'
PEPCK-rana-Anti-sens (20 bases) : 5'-CCCAACAGAGRGTTTCCTGC-3'

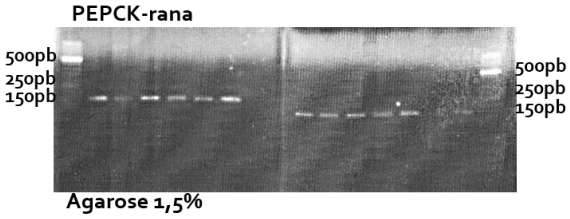
Y correspond aux bases Cytosine (C) ou Thymine (T) et R correspond aux bases Adénine (A) ou Guanine (G).

(5) PCR PEPCK-rana sur grenouilles vertes

Les réactions PCR ont été réalisées dans un volume final de 50 µl en présence de 1 µl d'ADNc, 2U d'ADN polymérase AmpliTaq Gold® (applied biosystems-life technologies), du tampon spécifique de l'enzyme (Tampon10X Buffer II contenant 100 mM Tris-HCl, pH 8,3 et 500 mM KCl), de 2,5 mM chlorure de magnésium $MgCl_2$, de 0,2 $\mu g.\mu l^{-1}$ d'albumine sérique bovine BSA (Roche Diagnostic) ; de 0,2 mM de dNTP et de 0,25 µM d'amorces (**PEPCK-rana-S** et **PEPCK-rana-AS : Eurogentec**). Les réactions d'amplification se fond à l'aide d'un thermocycleur Applied 2720 (Thermo fisher Scientific) selon les conditions suivantes :

Etapes		Températures	Temps
Dénaturation initiale		95 °C	10 minutes
35 cycles PCR	Dénaturation	95 °C	30 secondes
	Hybridation	60 °C	30 secondes
	Élongation	72 °C	60 secondes
Elongation finale		72 °C	7 minutes

Cette étape d'amplification a été réalisée sur 14 grenouilles vertes provenant d'arrivages différents. 5 µl de produits PCR ont été déposés sur un gel 1,5 % d'agarose /TBE (Tris-Borate 0,89 M ; 20 mM EDTA ; pH 8,3) contenant 5 µl de GelRed™ (Biotium-VWR). La migration a été faite à 120V pendant 20 minutes. La visualisation a été faite à l'aide d'un transilluminateur UV 302/312 nm. Un marqueur de taille (50-750 pb) est également déposé (Marqueur de poids moléculaires XIII-Roche Diagnostics).



A l'issu de la vérification, nous avons sélectionné 12 individus montrant une amplification correcte du gène de PEPCK.
Ces 12 amplicons ont été envoyés à séquencer.

(6) *Alignements des séquences PEPCK-rana*

De la même façon que précédemment, les 12 produits PCR PEPCK-rana ont été envoyés à séquencer par la méthode Sanger chez Beckman Coulter Genomics (https://www.cogenicsonline.com/COL/uwa.maya.engine.MayaEngine?siteid=col&mapid=home) selon leurs recommandations.

Les produits PCR ont été séquencés dans les 2 sens (PEPCK-rana-S, PEPCK-rana-AS). Au final 10 séquences ont été exploitables pour reconstruire les fragments de 141 bases. Les 10 séquences ont été reconstruites à l'aide du logiciel BioEdit (Biological sequence alignment editor : Tom Hall, CA), puis une séquence consensus des 10 séquences a été déterminée à l'aide de ce même logiciel :

```
>Séquence consensus PEPCK
TGGGACAGCCACTTCCTCTGAAAGCCCCCCTTGTGAATTCCTGGCCCTGCAACCCTGAAAAGACACTAATTGCCCATGTTCCTGATAACCGTGAAATTGTGTCCTTCGGTAGTGGATATGGAGGAAACTCTCTGTTGGGA
```

Ensuite nous avons déterminé un couple d'amorces spécifique de cette séquence consensus à l'aide du logiciel Beacon Designer™ permettant le « design » d'amorces spécifiques pour leur utilisation en PCR quantitative utilisant la technologie du SYBR® Green.

```
CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

PEPCK-Rana-F      ------GCCACTTCCTCTGAAAGC----------------------------------
Séquence          TGGGACAGCCACTTCCTCTGAAAGCCCCCCTTGTGAATTCCTGGCCCTGCAACCCTGAAA
PEPCK-Rana-R      ------------------------------------------------------------

PEPCK-Rana-F      ------------------------------------------------------------
Séquence          AGACACTAATTGCCCATGTTCCTGATAACCGTGAAATTGTGTCCTTCGGTAGTGGATATG
PEPCK-Rana-R      ---------------------------------------------CGGTAGTGGATATG

PEPCK-Rana-F      --------------------
Séquence          GAGGAAACTCTCTGTTGGGA
PEPCK-Rana-R      GAGGA--------------
```

Figure 34 : Alignement PEPCK et couple amorce PEPCK pour la PCR quantitative

Amorces PEPCK-rana pour PCR quantitative Tm : 58 °C
qPCR PEPCK-rana-Sens (18 bases) : 5'-GCCACTTCCTCTGAAAGC-3'
qPCR PEPCK-rana-Anti-Sens (19 bases) : 5'-TCCTCCATATCCACTACCG-3'

L'amplicon formé avec ce couple d'amorces contient 65pb.

c) *PPARGC1α ou PGC-1α*

Nous avons utilisé les amorces décrites par (Regnault *et al*, 2016). Le « design » de ces amorces a été fait sur les différents transcrits des deux espèces de xénopes (*Xenopus laevis et Xenopus tropicalis*). La spécificité des amorces a été contrôlée par la courbe de fusion et la courbe des pics de fusion qui donne un seul pic au Tm des amplicons.

Amorces PPARGC1a ou PGC-1α pour PCR quantitative Tm : 5 °C
qPCR PGC-1α sens (20 bases) : 5'- GCACGATCACGGTCAAGGTC -3'
qPCR PGC-1α Anti-Sens (20 bases) : 5'- CGGTACTCCTCCCTCTTCAGC -3'

L'amplicon formé avec ce couple d'amorces contient 94 pb.

d) *Conditions techniques de la qPCR*

Afin de réaliser la qPCR, les échantillons d'ADNc ont été dilués au 10^{-2} dans de l'eau ultrapure libre de DNases et de RNases (ThermoFisher Scientific). La réaction a été réalisée en double pour chaque échantillon. Le volume réactionnel de 25 µl se décompose en 5 µl de chaque échantillon d'ADNc dilué, 12,5 µl de qPCR Master Mix contenant les dNTP, une enzyme thermophile de réplication de l'ADN (la Taq polymerase) et le SYBR® Green (kit iQ™ SYBR® Green Supermix, BIORAD, France), 0,75 µl de chaque amorce spécifique du gène à étudier (0,3 µM) et 6 µl d'eau ultra pure libre de toutes DNases et RNases. Pour chaque gène étudié, une gamme étalon d'un mélange homogène d'ADNc de chaque échantillon dilué au 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} ,10^{-4} et 10^{-5} a été réalisée pour déterminer l'efficacité de la qPCR.

6. Génotypage

A. Extraction ADN (Kit QIAGEN: DNeasy® Blood & Tissue)

Le principe est d'isoler et de purifier de l'ADN contenu dans un lysat cellulaire à l'aide d'une membrane à base de silice incorporée dans une colonne centrifugeable.

Vingt coupes de foie de 20 µm d'épaisseur ont été prélevées et mises dans un microtube de 2 ml. Un volume de 180 µl de tampon ATL (tampon de lyse cellulaire) a été ajouté, puis 20 µl de protéinase K (EC 3.4.21.64 : enzyme appartenant à la famille des protéases à sérine à 600 mAU/ml) afin de digérer les protéines. Les tubes ont été vortexés (10 s) et incubés à 56 °C pendant une nuit sous agitation permettant ainsi une lyse optimale des cellules. Le lendemain les tubes ont été vortexés (15 s) et un volume de 200 µl de tampon AL a été ajouté aux lysats. Les tubes ont été vortexés (10 s) et 200 µl d'éthanol absolu ont été ajoutés (afin de précipiter l'ADN). Les tubes ont été à nouveau vortexés (10 s). Les homogénats ont été récupérés, placés dans des mini-colonnes DNeasy (colonne à base de silice) puis centrifugés à 8 000 rpm pendant 1 min à température ambiante. L'ADN retenu sur les mini-colonnes DNeasy a été lavé avec tout d'abord 500 µl de tampon AW1 (centrifugation à 8 000 rpm pendant 1 min à température ambiante), puis avec 500 µl de tampon AW2 (centrifugation à 14 000 rpm pendant 3 min) afin d'éliminer les sels et sécher les colonnes. Les DNeasy mini-colonnes ont été placées dans des microtubes de 1,5 ml et 2 x 100 µl de tampon AE (10 mM Tris·HCl ; 0,5 mM EDTA ; pH 9,0) ont été directement ajoutés sur la colonne pour l'élution finale. Les mini-colonnes ont été centrifugées à 8 000 rpm pendant 1min à température ambiante. Les ADN ont été conservés à -20 °C.

B. Qualification et quantification de l'ADN

Les dosages des ADN extraits ont été réalisés sur un spectrophotomètre type Nano Drop 1000 (Thermo-Fisher) à une longueur d'onde de 260 nm (absorption des acides nucléiques). Ils ont été mesurés à l'aide de 2 µl d'ADN pur. La concentration est donnée par l'équation de la loi de Beer

Lambert (**c=A*ε)/λ** où **c** est la concentration en acide nucléique en ng.µl$^{-1,}$ **A** l'absorbance (grandeur sans unité), **ε** est le coefficient d'extinction molaire modifié dépendant de la longueur d'onde exprimé en ng-cm.ml^{-1} : sa valeur pour de l'ADN double brin est de 50 ng-cm.µl^{-1} et **λ** est la longueur du trajet en cm). La pureté de l'ADN a été vérifiée par le ratio de l'absorbance à 260 nm sur l'absorbance à 280 nm (longueur d'onde d'absorption des protéines) qui doit être compris entre 1,7 et 1,9, ainsi que la symétrie du pic à la longueur d'onde de 260 nm.

C. Détermination des espèces de Grenouilles vertes du complexe *esculentus*

1. Amplification de l'intron-1 du gène de l'albumine sérique par PCR

Le principe est d'amplifier une portion de l'intron 1 du gène de l'albumine sérique à l'aide d'amorces spécifiques développées par (Hauswaldt *et al*, 2012) montrant du polymorphisme de taille au niveau du rétrotransposon *rana*CR1(Figure 35) chez les grenouilles du complexe *esculentus*.

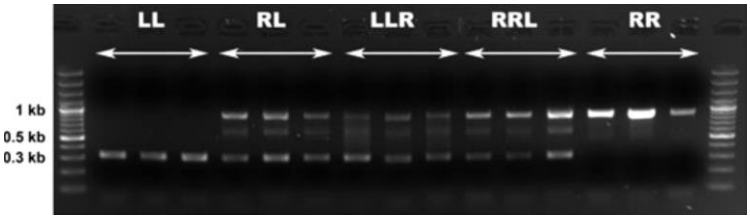


Figure 35 : Image d'un gel d'après (Hauswaldt* et al*, 2012) montrant les produits PCR de différents individus composant le complexe esculentus :

LL : *P. lessonae* (bande < 350 pb, RR : *P. ridibundus* (bande > 650pb), RL, LLR et RRL : *P. kl. esculentus* (les hybrides : 1 bande < 350 pb, 1 bande > 650 pb et une bande faible autour de 600 pb)

Les conditions expérimentales de cette réaction de polymérisation en chaine ont été décrites par (Hauswaldt *et al*, 2012). Les réactions PCR ont été réalisées dans un volume final de 50 µl en présence de 2 µl (60 ng) d'ADN, 2 U d'ADN polymérase AmpliTaq Gold® (applied biosystems-life technologies), du tampon spécifique de l'enzyme (Tampon10X Buffer II contenant 100 mM Tris-HCl ; pH 8,3 et 500 mM KCl), de 2,5 mM chlorure de magnésium $MgCl_2$), de 0,2 µg.µl^{-1} d'albumine sérique bovine BSA (Roche Diagnostic), de 0,2 mM de dNTP et de 0,25 µM d'amorces (**Pel-SA-F1** : 5'- TCCATACAAATGTGCTAAGTAGGTT-3' et **Pel-SA-R2** : 5'- GACGGTAAGGGGACATAATTCA-3'). Les réactions d'amplification ont été faites à l'aide d'un thermocycleur Applied 2720 (Thermo fisher Scientific) selon les conditions suivantes :

Etapes		Températures	Temps
Dénaturation initiale		95 °C	10 minutes
35 cycles PCR	Dénaturation	95 °C	30 secondes
	Hybridation	59 °C	40 secondes
	Élongation	72 °C	100 secondes
Elongation finale		72 °C	7 minutes

6 µl de produits PCR ont été déposés sur un gel 1.5 % d'agarose /TBE (Tris-Borate 0,89 M, 20 mM EDTA, pH 8,3) contenant 5 µl de GelRed™ (Biotium-VWR). La migration a été faite à 150 V pendant 20 minutes. La visualisation a été faite à l'aide d'un transilluminateur UV 302/312 nm. Un marqueur de taille (400-1500 pb) a été également déposé (Marqueur de poids moléculaires XIV-Roche Diagnostics).

2. Séquençage des produits PCR

Le séquençage a été réalisé par la société Beckman Coulter Genomics selon la technique de séquençage Sanger (Sanger *et al*, 1977).
Les produits d'amplification de PCR ont alors été envoyés selon les recommandations de préparation des échantillons indiquées sur le portail web cogenics online (https://www.cogenicsonline.com/COL/uwa.maya.engine.MayaEngine?siteid=col&mapid=home).
Les produits PCR ont été séquencés dans les 2 sens afin de reconstruire cette portion de gène d'une longueur comprise entre 300 et 900 pb.

3. Reconstruction de l'intron 1 du gène de l'albumine sérique SAI-1

Les séquences ont été reconstruites à l'aide du logiciel BioEdit (Biological sequence alignment Editor : Tom Hall, CA). Une séquence consensus a été déterminée pour chaque individu.

4. Construction de l'arbre phylogénétique

Cette construction nous a permis d'affilier nos différents individus par taxons et d'intégrer les séquences connues des différentes grenouilles vertes du paléarctiques susceptibles d'être recueillies sur les sites de pêche appartenant à la lignée *bedriagae/ridibundus*. En effet, nous avons récupéré les séquences du SAI-1 des différentes grenouilles vertes du paléarctique dans la base de données NCBI ((National Center for Biotechnology Information : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) afin de comparer nos séquences aux séquences types. Les espèces servant de modèle sont *P. (Rana) cf bedriagae* de Turquie, *P. (Rana) cf bedriagae* de Grèce, *P. (Rana) ridibundus* du Kazakhstan, *P. (Rana) epeiroticus* de grèce, *P. (Rana) bedriagae* de Syrie, *P. (Rana) ridibundus* (Pologne et Allemagne), *P (Rana). kl. esculentus* et *P. (Rana) kurtmuelleri* de Grèce soit 11 espèces permettant de faire des regroupements taxonomiques au sein de la population de grenouilles vertes sauvages que nous avons reçues.
Nous avons réalisé cette analyse phylogénétique sur le site Phylogeny.fr (http://www.phylogeny.fr/) (Derreper *et al*, 2008) (Derreper *et al*, 2010) qui permet de faire un alignement multiple de séquences homologues avec MUSCLE (Edgar, 2004). Cependant dans les alignements tous les résidus ne sont pas alignés de manière non ambiguë. C'est pourquoi il est nécessaire d'éliminer ces régions à l'aide de Gblocks (Castresana, 2000) et de réaliser un arbre phylogénétique basé sur la méthode statistique du maximum de vraisemblance par PhyML (Guindon et Gascuel, 2003) (Anisimova et Gascuel, 2006) (Chevenet *et al*, 2006) puis d'utiliser un éditeur graphique TreeDyn. Ensuite l'arbre est enregistré sous le format Newick afin de pouvoir le visualiser sur l'application NjPlot.

D. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées sous R-stat version 3.3.2. Nos variables analysées sont des variables continues non appariées. Dans un premier temps, nous avons réalisé un test de normalité par un ***test de shapiro-wilk*** afin de vérifier la normalité de la distribution des différentes variables. Dans ce test l'hypothèse nulle est : la distribution de la variable suit une loi normale. Si la valeur de p est inférieure à 0,05, alors l'hypothèse nulle est rejetée, la distribution de la variable ne suit pas une loi normale.
Dans le cas où nos échantillons ne sont pas distribués selon la loi normale ou si nos échantillons comportent un petit effectif, pour les comparer, nous avons réalisé un test non paramétrique qui nous permet de comparer plusieurs échantillons non appariés par un test H de ***Kruskal-Wallis.*** Si $p < 0.05$ (i.e. au moins une des k médianes comparées est différentes des k-1 autres,), les échantillons proviennent de populations différentes. Afin de déterminer quel échantillon est différent des autres nous avons réalisé des tests de 2 à 2 (***test de wilcoxon*** : Test W). La distribution des 2 échantillons est significativement différente si la valeur de p est inférieure à 0,05.
Nous noterons une ***** pour une valeur de p inférieure ou égale à 0,05, ****** pour une valeur de p inférieure ou égale à 0,01 et ******* pour une valeur de p inférieure ou égale à 0,001.

III. Résultats

1. Absorption du BaP

Vérification de l'absorption, métabolisation et bioconcentration du BaP chez les grenouilles vertes mâles suivant une cinétique d'exposition 3, 6, 12, 24 et 48 heures

A. Cinétique d'absorption du BaP seul ou en mélange

1. Vérification de l'absorption du BaP

L'objectif est de vérifier la pénétration du BaP en mesurant sa disparition dans le milieu de trempage pour les deux conditions d'exposition et d'observer l'impact du BbF sur cette disparition.

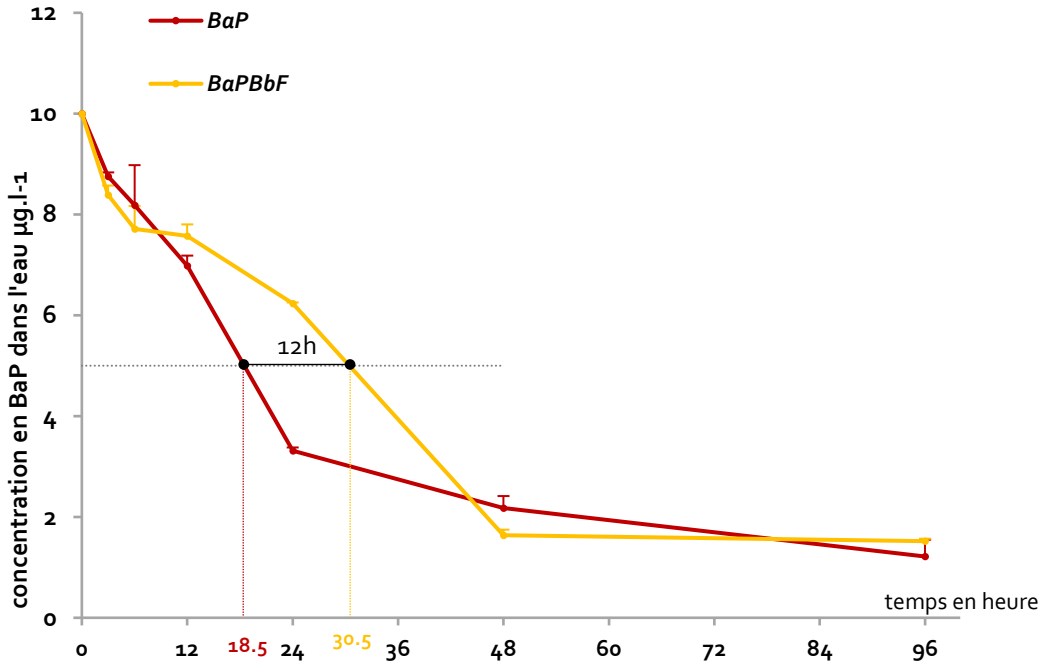


Figure 36 : Cinétique d'absorption du BaP chez les grenouilles exposées au BaP et les grenouilles exposées au BaPBbF. Les données sont des données moyennes (n = 3) ± SE.

L'absorption de 50 % du BaP présent dans la solution de trempage des grenouilles exposées au BaP seul s'est faite en 18,5 heures alors que pour les grenouilles exposées au mélange, elle s'est faite en 30,5 heures, ce qui correspond à un décalage de 12 heures. Il apparait que l'absorption du BaP a tendance à être plus lente sur les premières 48 heures pour les grenouilles exposées au mélange. Les vitesses d'absorption du BaP chez les grenouilles exposées au BaP et celles exposées au mélange entre 0 et 6 heures sont semblables et rapides (0,30 $\mu g.l^{-1}.h^{-1}$ pour les grenouilles exposées au BaP seul et 0.38 $\mu g.l^{-1}.h^{-1}$ pour les grenouilles exposées au mélange), par contre entre 6 et 12 heures, nous observons une vitesse d'absorption du BaP 8,5 fois plus importante pour les grenouilles exposées au BaP seul (0,20 $\mu g.l^{-1}.h^{-1}$) que pour les grenouilles exposées au mélange (0,024 $\mu g.l^{-1}.h^{-1}$). Cette vitesse est restée plus élevée de 2 fois entre 12 et 24 heures pour les grenouilles exposées au BaP seul (0,306 $\mu g.l^{-1}.h^{-1}$) comparativement aux grenouilles exposées au mélange (0,112 $\mu g.l^{-1}.h^{-1}$). Par contre entre 24 et 48 heures la tendance s'est inversée et la vitesse d'absorption du BaP a été plus grande (x4) pour les grenouilles exposées au mélange (0,192 $\mu g.l^{-1}.h^{-1}$) comparativement aux grenouilles exposées au BaP seul (0,047 $\mu g.l^{-1}.h^{-1}$). A 48 h d'exposition le milieu de trempage a eu

une concentration en BaP respectivement de 2,2 µg.l^{-1} et de 1,6 µg.l^{-1} pour les grenouilles exposées au BaP seul et celles exposées au mélange, pour arriver au bout de 96 heures à 1,2 µg.l^{-1} pour les grenouilles exposées au BaP seul et de 1,5 µg.l^{-1} pour les grenouilles exposées au mélange. *In fine*, il apparait que la différence d'absorption du BaP pour les deux conditions d'expositions se situe dans l'intervalle 12-48 heures (Figure 36).

2. Vérification de la métabolisation

L'objectif est de vérifier la métabolisation du BaP par le rejet de métabolites polaires dans le milieu de trempage et l'impact du BbF sur cette métabolisation.

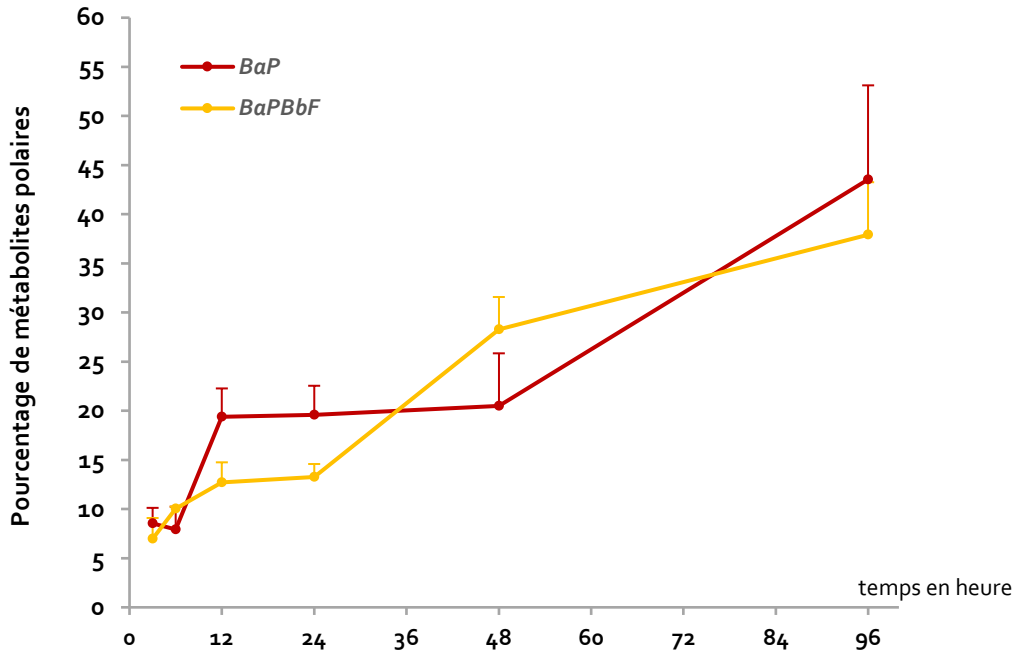


Figure 37 : Cinétique d'apparition des métabolites polaires dans l'eau de trempage des grenouilles exposées au BaP et les grenouilles exposées au mélange. Les données sont les données moyennes (n = 3) ± SE.

L'augmentation du pourcentage de métabolites polaires du BaP dans l'eau de trempage a témoigné d'une métabolisation du BaP chez les grenouilles vertes exposées aux différents traitements. Par contre il apparait que ces cinétiques ont tendance à être différentes suivant les conditions d'exposition (Figure 37). Le taux d'apparition des métabolites polaires dans le milieu de trempage a été deux fois plus rapide pour les grenouilles exposées au BaP seul que pour les grenouilles exposées au mélange entre 3 et 12 heures d'exposition. Entre 12 et 24 heures, le pourcentage de métabolites polaires dans le milieu de trempage a augmenté faiblement pour les deux conditions, puis cette augmentation est restée très faible pour les grenouilles exposées au BaP seul. Pour les grenouilles exposées au mélange le taux d'élimination des métabolites polaires est trois fois plus important entre 12 et 24 heures et dix-sept fois plus important entre 24 et 48 heures que celui observé pour les grenouilles exposées au BaP seul. Puis entre 48 et 96 heures, le taux d'élimination des polaires a été environ deux fois supérieur pour les grenouilles exposées au BaP que pour les grenouilles exposées au mélange. Au bout de 96 heures, la quantité de métabolites polaires excrétés n'a pas été significativement différente entre les grenouilles exposées au BaP seul (43,5 ± 9,6 %) et les grenouilles exposées au mélange (37,9 ± 5,3 %).

B. Facteurs de bioconcentration

Le suivi des facteurs de bioconcentration en fonction d'une cinétique d'exposition permet de suivre la distribution du BaP et/ou ses métabolites dans l'organisme et de mettre en évidence la bioconcentration des composés (métabolites et/ou molécules mères)

1. Dans le sérum

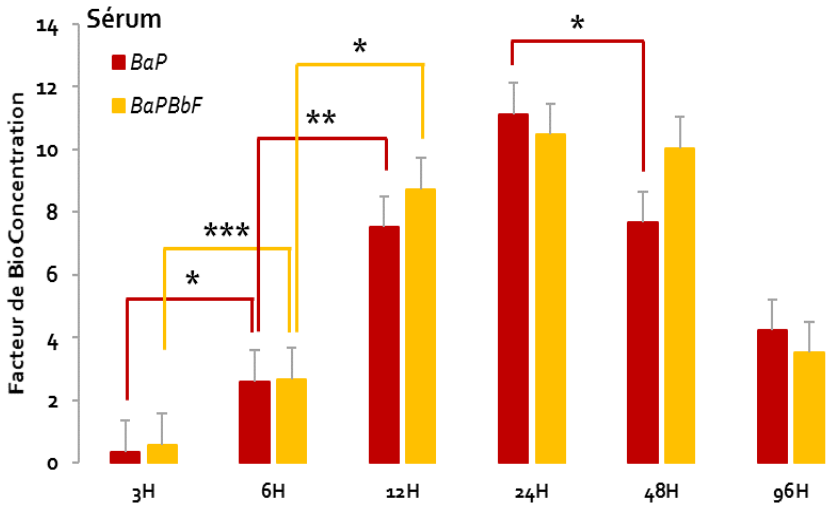


Figure 38 : Facteurs de bioconcentration moyens ± SE du sérum chez les grenouilles exposées au BaP seul et celles exposées au mélange. Le nombre de répliquats biologiques est n = 6 sauf pour le temps 96 h où n = 3.

Les mesures des BCF dans le sérum pour les deux conditions d'expositions n'ont pas montré de différences significatives entre elles. Par contre, le test de Kruskal Wallis a montré un effet temps sur les mesures de BCF pour les grenouilles exposées au BaP seul (p = 0,02), ainsi que pour les BCF des grenouilles exposées au mélange (p = 0,018) (Figure 38). Pour les grenouilles exposées au BaP seul, les valeurs moyennes de BCF augmentaient rapidement dès les premières 12 h (BCF : 0,35 ± 0,05 à 3 h, 2,6 ± 0,7 à 6 h, 7,50 ± 1,07 à 12 h) avec des différences significatives entre 3 h et 6 h, puis 6 h et 12 h. A 24 h d'exposition, la valeur moyenne du BCF a été de 11,10 ± 2,02 correspondant à sa valeur maximale. Entre 24H et 48H, une diminution significative des valeurs de BCF a été observée (BCF de 4,2 ± 2 à 96 h) et s'est poursuivie à 96 h sans significativité (n = 3 pour le temps 96 h).

Pour les grenouilles exposées au mélange, l'augmentation en fonction du temps des BCF mesurés a été similaire à celle observée pour les grenouilles exposées au BaP seul, avec des différences significatives entre les valeurs de BCF de 3 h et 6 h, ainsi que celles de 6 h et 12 h (BCF : 0,6 ± 0,1 à 3 h ; 2,7 ± 0,4 à 6 h ; 8,7 ± 2,1 à 12 h). Chez ces grenouilles, la valeur maximale du BCF est observée à 24 h avec une valeur de 10,5 ± 1,6 et se maintient jusqu'à 48 h (10 ± 2) contrairement aux grenouilles exposées au BaP seul pour lesquelles la valeur de BCF a diminué dès 48 h (7,7 ± 1,2). La décroissance des BCF se poursuit à 96 h, atteignant une valeur de 3,50 ± 1,65.

2. Organes impliqués dans la détoxication, l'excrétion, le stockage et la digestion

a) *Organes impliqués dans la détoxication et la digestion :*

Le foie, organe majeur impliqué dans la détoxication

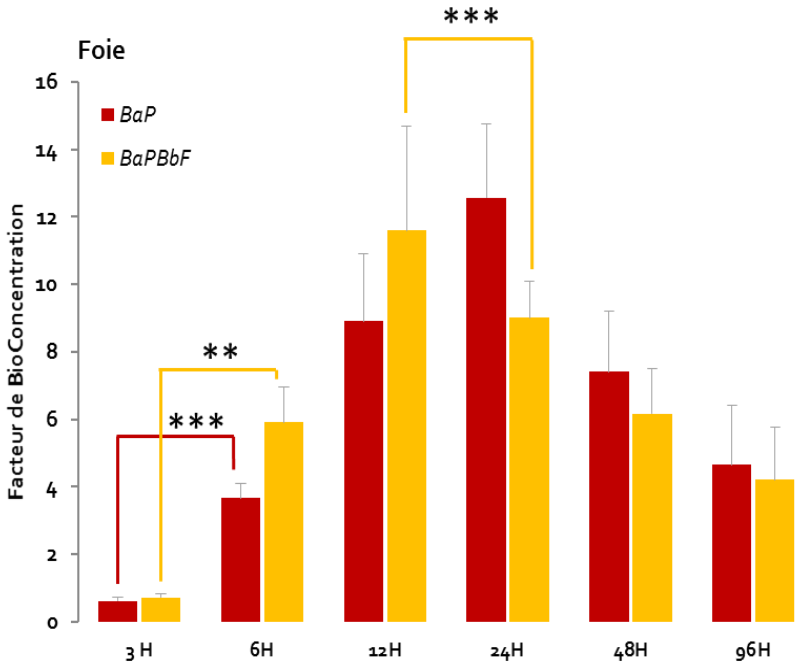


Figure 39 : Facteurs de bioconcentration moyens ± SE dans le foie chez les grenouilles exposées au BaP seul et celles exposées au mélange.

La bioconcentration du BaP et/ou ses métabolites dans le foie (Figure 39) n'a pas été influencée par les conditions d'expositions et notamment par la présence du BbF. Par contre des effets temps ont été mis en évidence par le test de Kruskal-Wallis pour les grenouilles exposées au BaP seul ($p = 9{,}6.10^{-5}$), et pour les grenouilles exposées au mélange ($p = 3{,}4.10^{-5}$)
Pour les grenouilles exposées au BaP seul, une augmentation des BCF a été observée jusqu'à une valeur maximale correspondant à la durée d'exposition de 24 h (BCF = 12,6 ± 2,2). Entre 3 h (BCF = 0,6 ± 0,1) et 6 h (BCF = 3,7 ± 0,4) d'exposition, les valeurs des BCF ont été significativement différentes. Au-delà de 24 h d'exposition, malgré l'absence de résultats significatifs, les valeurs du BCF ont diminué progressivement jusqu'à une valeur de 4,7 ± 1,7 au temps 96 h.
Pour les grenouilles exposées au mélange, les BCF mesurés ont montré une valeur maximale (BCF = 11,6 ± 1,0) à 12 h d'exposition. Puis les BCF moyens calculés ont diminué significativement au temps 24 h (BCF = 9,0 ± 1,1). Cette diminution s'est poursuivie progressivement jusqu'à 96 h d'exposition sans significativité.

La vésicule biliaire

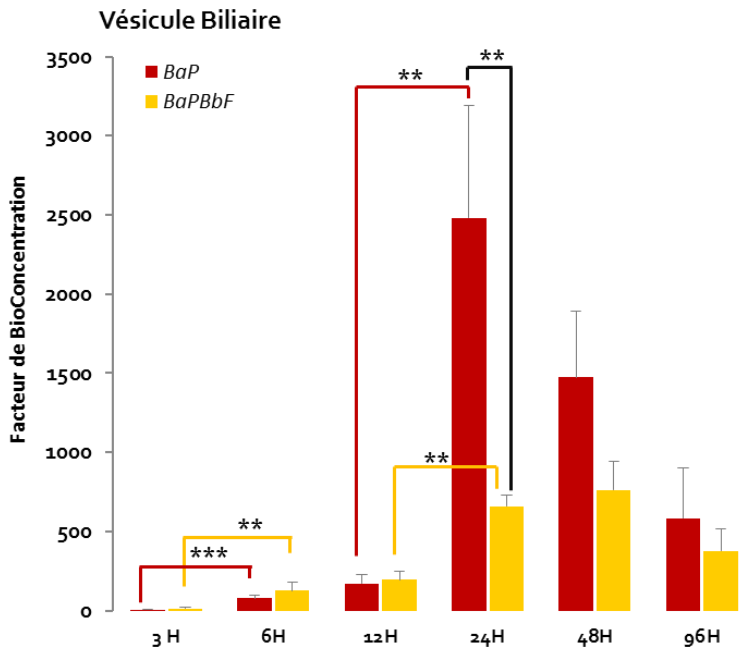


Figure 40 : Facteurs de bioconcentration moyens ± SE dans la vésicule biliaire chez les grenouilles exposées au BaP seul et celles exposées au mélange.

Une différence significative entre les BCF mesurés dans la vésicule biliaire des grenouilles exposées au BaP seul et celles exposées au mélange a été observé à 24 h. En effet pour ce temps d'exposition, le BCF des grenouilles exposées correspond à une valeur maximale (BCF = 2480 ± 708), alors que pour les grenouilles exposées au mélange, la bioconcentration maximale (BCF = 763 ± 181) correspond au temps d'exposition de 48 h (Figure 40).
Sachant que la vésicule biliaire est un réservoir qui permet le stockage de la bile élaborée par le foie, cela traduit un retard de métabolisation du BaP chez les grenouilles exposées au mélange par rapport aux grenouilles exposées au BaP seul.
En outre les valeurs de BCF ont montré des différences significatives en fonction du temps pour les grenouilles exposées au BaP ($p = 9{,}6.10^{-5}$) et les grenouilles exposées au mélange ($p = 3{,}4.10^{-5}$) (Figure 40).
Pour les grenouilles exposées au BaP seul, les valeurs des BCF ont montré des différences significatives entre les temps d'exposition de 3 h (BCF = 4,30 ± 1,42) et 6 h (BCF = 78,0 ± 16.5), puis entre 12 h (BCF = 170 ± 60) et 24 h (BCF = 2480 ± 708). Au-delà de 24 h, les valeurs de BCF ont tendance à diminuer progressivement jusqu'au temps d'exposition 96 h pour atteindre une valeur moyenne de 583 ± 320.
Pour les grenouilles exposées au mélange, les valeurs mesurées de BCF ont présenté la même cinétique que les grenouilles exposées au BaP seul malgré des valeurs inférieures. En effet les différences significatives que nous avons observées entre les temps d'exposition 3 h (BCF = 13 ± 7.9) et 6 h (BCF = 125,0 ± 54,7) étaient comparables à celles trouvées pour les grenouilles exposées au BaP seul, ainsi que la différence entre les temps d'exposition de 12 h (BCF = 194 ± 52) et 24H (BCF = 658 ± 71.6. Par contre la valeur de BCF a été maximale au temps d'exposition de 48 h (BCF = 763 ± 181).
Enfin les valeurs de BCF ont été similaires pour les deux expositions au temps 96 h (BCF_{BaP}= 583 ± 320 et BCF $_{BaPBbF}$=376 ± 137).

L'intestin impliqué dans la détoxication et la digestion

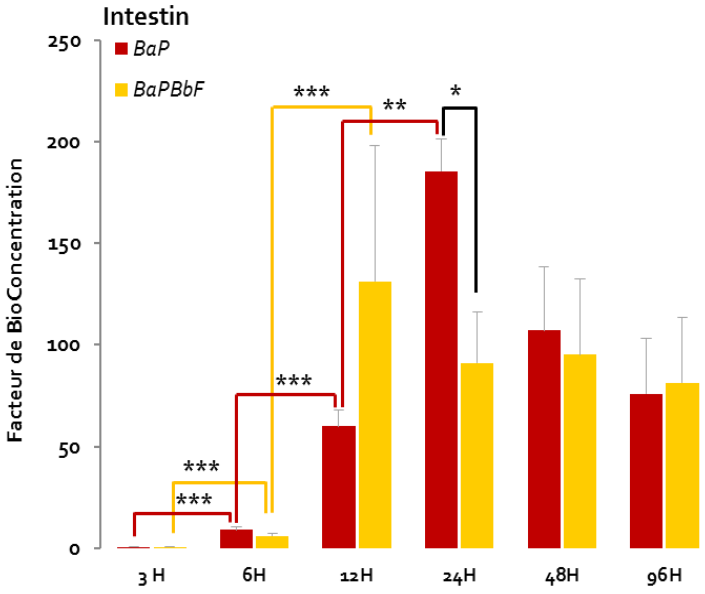


Figure 41 : Facteurs de Bioconcentration moyens ± SE dans l'intestin chez les grenouilles exposées au BaP seul et celles exposées au mélange.

Au temps 24 h, la valeur moyenne du BCF de l'intestin des grenouilles exposées au BaP a été significativement différente de celle des grenouilles exposées au mélange (Figure 41).

De plus pour les grenouilles exposées au BaP, ce temps correspondait au maximum de bioconcentration du BaP et/ou ses métabolites dans l'intestin avec une valeur de BCF de 185 ± 16. Cette différence de bioconcentration du BaP et/ou ses métabolites chez les grenouilles exposées au BaP seul ou au mélange semble intimement liée à la différence observée pour les valeurs de BCF de la vésicule biliaire au même temps (Figure 40).

Des différences significatives des valeurs de BCF de l'intestin en fonction du temps ont été observées pour les grenouilles exposées au BaP seul ($p = 5{,}8.10^{-6}$) et pour les grenouilles exposées au mélange ($p = 1{,}4.10^{-5}$).

Pour les grenouilles exposées au BaP seul, les valeurs moyennes de BCF ont augmenté significativement entre 3 h (BCF = 0,6 ± 0.1) et 6 h (BCF = 9), entre 6 h et 12 h (BCF = 60 ± 8) et entre 12 h et 24 h représentant le temps d'exposition où la valeur de BCF est maximale (185 ± 16). A partir de 48 h d'exposition, la valeur de BCF a diminué légèrement pour atteindre une valeur moyenne de 107 ± 31 et enfin de 76 ± 27 à 96 h.

Pour les grenouilles exposées au mélange, les valeurs de BCF ont augmenté significativement entre 3 h (BCF = 0,5 ± 0,1) et 6 h (BCF = 6,1 ± 1,8), puis entre 6 h et 12 h avec une valeur moyenne maximale de 131 ± 7. Enfin, durant les dernières 48 heures, les valeurs de BCF se sont maintenues autour d'une valeur de 90 jusqu'au temps d'exposition de 96 h.

Les reins, organes impliqués dans la détoxication et l'excrétion

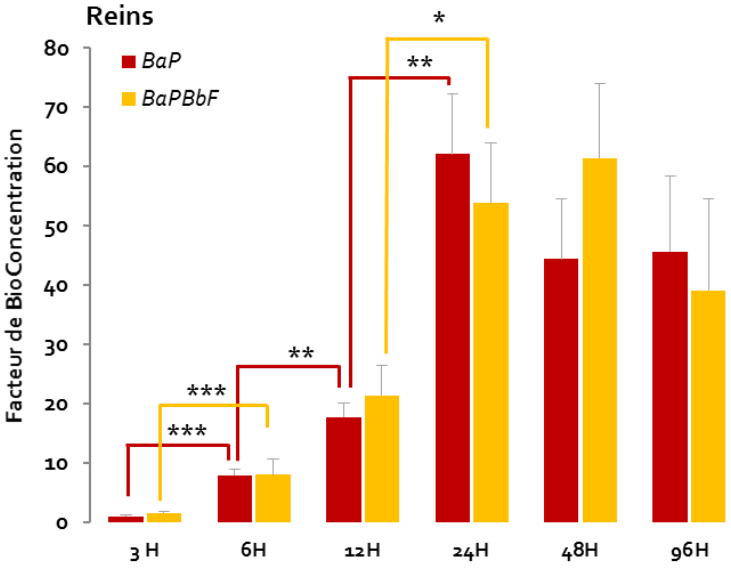


Figure 42 : Facteurs de Bioconcentration moyens ± SE dans les reins chez les grenouilles exposées au BaP seul et celles exposées au mélange.

Les valeurs moyennes des BCF dans les reins n'ont pas montré de différences entre les deux conditions d'exposition. De ce fait le BbF ne semble pas impacter la bioconcentration du BaP et/ou ses métabolites au niveau des reins. Par contre pour les deux types d'expositions, les valeurs de BCF ont montré des différences en fonction du temps sur les premières 24 heures d'exposition (Figure 42). En effet le test de Kruskal-Wallis a montré des différences significatives pour les valeurs de BCF en fonction de la durée d'exposition pour les grenouilles exposées au BaP seul ($p= 5{,}5.10^{-6}$) et les grenouilles exposées au mélange ($p = 1{,}1.10^{-5}$).
Pour les grenouilles exposées au BaP seul, les valeurs de BCF ont augmenté significativement entre 3 h et 6 h, entre 6 h et 12 h, et 12 h et 24 h. La valeur moyenne maximale de BCF (62,1 ± 12,8) a été mesurée pour un temps d'exposition de 24 h, puis les valeurs de BCF ont eu tendance à diminuer légèrement pour atteindre une valeur moyenne de 45,6 ± 9,0 à 96 h d'exposition (Figure 42).
Pour les grenouilles exposées au mélange, les valeurs moyennes de BCF ont augmenté significativement entre 3 h (BCF = 1,6 ± 0,25) et 6 h (BCF = 8,0 ± 2,6), puis entre 12 h (BCF = 21,4±5,0) et 24 h (BCF = 53,8 ± 10,1). Le maximum de bioconcentration du BaP et/ou ses métabolites a été observé au temps d'exposition de 48 h pour atteindre une valeur de 61,5 ± 12,6. A 96 h, la valeur moyenne de BCF a eu tendance à diminuer pour atteindre une valeur de 39,1 ± 15,5 (Figure 42).

b) *Organes de stockage : les corps jaunes*

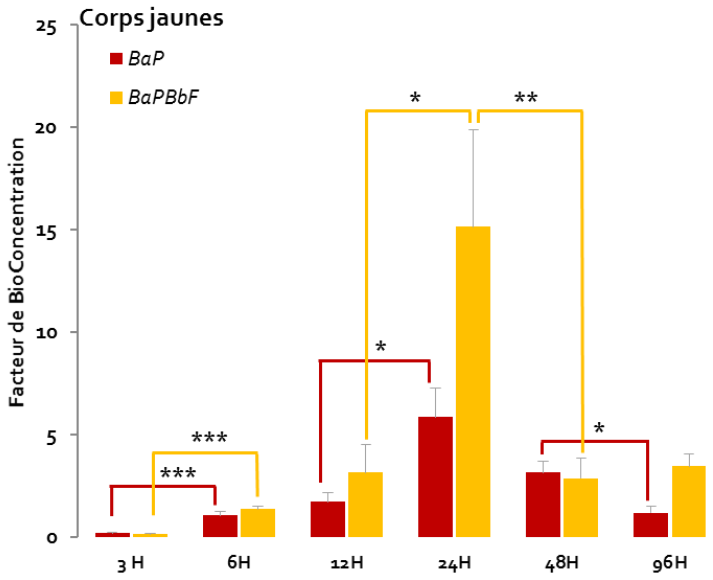


Figure 43 : Facteurs de Bioconcentration moyens ± SE dans les corps jaunes chez les grenouilles exposées au BaP seul et celles exposées au mélange.

Les valeurs moyennes des BCF dans les corps jaunes n'ont pas montré de différences entre les deux conditions d'exposition (Figure 43). De ce fait le BbF ne semble pas impacter la bioconcentration du BaP et/ou ses métabolites au niveau des corps jaunes. En revanche les valeurs moyennes de BCF des corps jaunes ont montré des différences en fonction du temps pour les grenouilles exposées au BaP seul ($p = 6{,}3.10^{-3}$), ainsi que les grenouilles exposées au mélange ($p = 6{,}7.10^{-3}$).
En effet pour les grenouilles exposées au BaP seul, les valeurs de BCF ont augmenté jusqu'à une valeur moyenne maximale de 5,8 ± 1,4 au temps d'exposition 12 h (x29 entre 3 h et 12 h) avec notamment des augmentations significatives des valeurs de BCF entre 3 h (0,20 ± 0,05) et 6 h (1,1±0,2), entre 12 h (1,7 ± 0,4) et 24 h (5,84 ± 1,41). Puis les valeurs de BCF ont diminué significativement entre 48 h et 96 h pour atteindre une valeur moyenne de 1,2 ± 0,3.
Pour les grenouilles exposées au mélange, les valeurs de BCF ont suivi la même cinétique que celles des grenouilles exposées au BaP seul. Par contre la valeur moyenne maximale de BCF a également été observée pour le temps 24 h, avec une valeur plus élevée sans différence significative de 15 ± 5. Dès 48 h d'exposition, les valeurs de BCF (2,9 ± 1,0) ont diminué significativement pour rester constantes à 96 h d'exposition.

3. Autres organes

Tableau 13 : Récapitulatifs des facteurs de bioconcentration moyens ± SE dans les différents organes chez les grenouilles exposées au BaP seul et au mélange

		Peau	Muscle	Carcasse	Cœur	Poumons	Rate	Estomac	Testicules
3 h	BaP	6,41 ±1,37	0,04 ±0,01	0,50 ±0,19	0,25 ±0,05	0,22 ±0,05	0,17 ±0,04	1,19 ±0,89	0,06 ±0,02
	BaPBbF	7,32 ±0,94	0,05 ±0,01	0,59 ±0,05	0,25 ±0,05	0,28 ±0,06	0,33 ±0,07	0,39 ±0,06	0,10 ±0,03
6 h	BaP	6,03 ±0,95	0,18 ±0,02	0,60 ±0,10	0,66 ±0,17	0,90 ±0,19	0,66 ±0,16	1,08 ±0,31	0,37 ±0,10
	BaPBbF	4,59 ±0,36	0,17 ±0,05	0,84 ±0,36	1,24 ±0,26	0,91 ±0,15	0,85 ±0,22	1,13 ±0,24	0,38 ±0,06
12 h	BaP	6,83 ±0,82	0,41 ±0,10	1,38 ±0,18	2,33 ±0,48	2,07 ±0,38	1,22 ±0,25	5,37 ±3,00	0,75 ±0,16
	BaPBbF	7,75 ±1,96	0,56 ±0,15	2,20 ±0,37	2,39 ±0,50	1,78 ±0,37	1,03 ±0,23	3,11 ±0,65	0,89 ±0,30
24 h	BaP	5,40 ±1,34	0,89 ±0,12	1,78 ±0,43	3,30 ±0,57	3,86 ±0,88	1,93 ±0,51	3,55 ±0,75	1,14 ±0,21
	BaPBbF	5,29 ±0,95	0,56 ±0,08	1,13 ±0,13	3,74 ±0,82	3,08 ±0,52	3,35 ±1,04	2,95 ±0,56	1,50 ±0,32
48 h	BaP	4,59 ±1,26	0,56 ±0,21	1,55 ±0,38	5,67 ±2,09	2,82 ±0,55	1,13 ±0,20	2,75 ±0,89	1,41 ±0,39
	BaPBbF	4,11 ±0,76	0,50 ±0,12	1,16 ±0,21	4,38 ±1,29	2,69 ±0,59	3,59 ±1,26	3,90 ±1,68	1,63 ±0,34
96 h	BaP	2,66 ±0,29	0,36 ±0,11	0,46 ±0,08	3,65 ±1,28	2,32 ±0,96	0,67 ±0,11	3,44 ±0,70	1,45 ±0,63
	BaPBbF	2,85 ±0,96	0,34 ±0,14	0,51 ±0,19	2,61 ±1,17	1,81 ±1,06	0,84 ±0,31	1,71 ±0,76	1,48 ±0,55

Aucune différence significative de bioconcentration du BaP et/ou ses métabolites n'a été mise en évidence entre les grenouilles exposées au BaP seul et celles exposées au mélange pour les différents organes du Tableau 13.

Au niveau de la peau, les mesures des BCF ont montré des valeurs constantes et similaires au temps d'exposition 3, 6, 12 et 24 heures quelles que soient les conditions expérimentales. A 48 h, les valeurs des BCF ont eu tendance à diminuer pour atteindre à 96 h d'exposition 2,66 ± 0,29 pour les grenouilles exposées au BaP et de 2,85 ± 0,96 pour les grenouilles exposées au mélange.

Pour le cœur, les valeurs des BCF ont été maximales après 48 h d'exposition pour les grenouilles exposées au BaP seul (5,67 ± 2,09) et celles exposées au mélange (4,38 ± 1,29). Les cinétiques des valeurs de BCF sont apparues identiques pour les deux conditions. De la même façon les BCF mesurés dans les poumons étaient similaires pour les deux expositions avec des valeurs maximales à 24 h de 3,86 ± 0 ,88 pour les grenouilles exposées au BaP seul et de 3,08 ± 0,52 pour les grenouilles exposées au mélange. Au niveau de l'estomac, les BCF mesurés sont faibles pour 3 h et 6 h d'exposition quelles que soient les expositions. A 12 h d'exposition, les valeurs des BCF ont eu tendance à augmenter pour atteindre des valeurs moyennes de 5,37 ± 3,00 pour les grenouilles exposées au BaP et de 3,11 ± 0,65 pour les grenouilles exposées au mélange. Les valeurs des BCF

mesurés sont restées similaires pour les temps 24 h et 48 h d'exposition. Une légère baisse non significative a été observée pour la valeur moyenne de BCF à 96 h pour les grenouilles exposées au mélange.
Au niveau de la rate, les valeurs des BCF moyens mesurés ont tendance à être 1,7 fois plus élevé à 24 h et 3,2 fois plus élevées pour les grenouilles exposées au mélange que pour les grenouilles exposées au BaP seul. Pour le muscle, aucune différence de bioconcentration n'a été mesurée quels que soient les expositions, de même pour les BCF mesurés au niveau des testicules et de la carcasse.

Bilan

Le BaP a pénétré dans l'organisme via la peau sans différence à 4 jours pour les deux expositions, avec toutefois une différence de cinétique d'absorption du BaP. En effet l'absorption de 50 % du BaP a été plus rapide pour les animaux exposés au BaP seul (en 18,5 heures) alors que pour les animaux exposés au mélange, cette absorption s'est faite en 30,5 heures soit 12 heures de plus. Ce décalage d'absorption a influencé la cinétique d'excrétion des métabolites polaires. En effet l'apparition des métabolites polaires dans l'eau de trempage a tendance à être plus tardif pour les animaux doublement exposés. En revanche, au bout de 4 jours le taux de métabolite polaire a été similaire pour les deux expositions. La distribution du BaP et/ou des métabolites dans l'organisme s'est faite via le sérum avec une durée plus importante pour les animaux exposées au mélange (Figure 44).
Pour les facteurs de bioconcentration, ils restent relativement semblables pour les 2 expositions hormis pour la vésicule biliaire qui a accumulé plus de BaP et/ou ses métabolites pour les grenouilles exposées au BaP seul, et l'accumulation dans l'intestin du BaP et/ou métabolites a été plus précoce pour les grenouilles exposées au mélange (dès 12 h). Au niveau du foie les BCF sont restés identiques indiquant une concentration similaire du BaP et/ou ses métabolites pour les deux expositions en remarquant un temps d'accumulation plus important pour les grenouilles exposées au BaP seul (12-24 h). En revanche, il semblerait que des molécules lipophiles (BaP et/ou métabolites) s'accumulent davantage dans les graisses pour les animaux exposés au mélange (Figure 44).

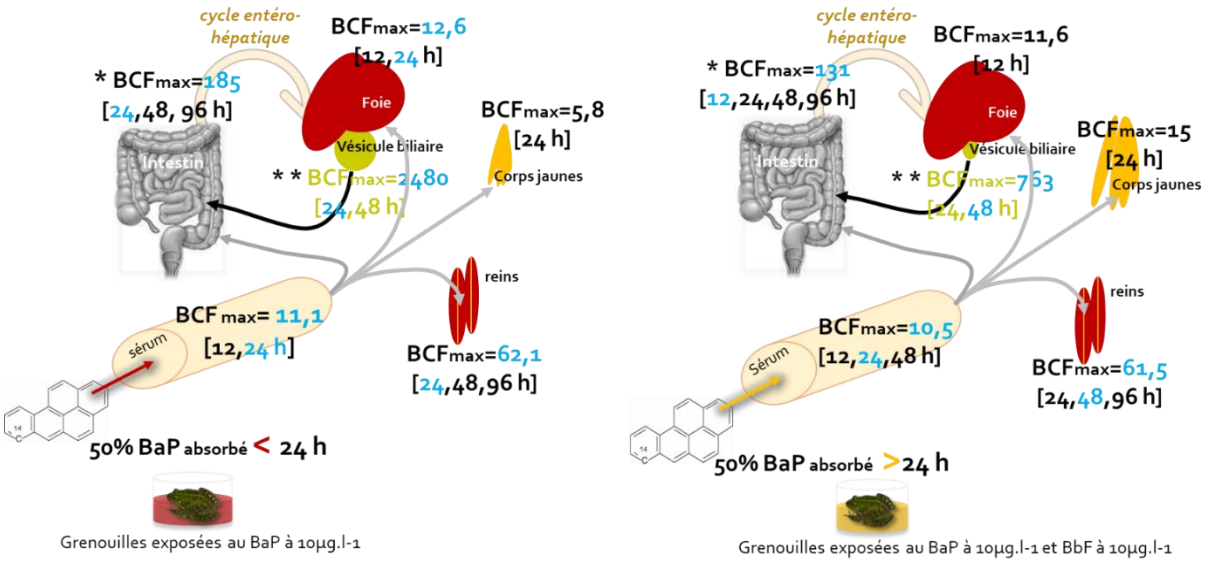


Figure 44 : Bilan de la distribution du BaP 7-^{14}C-BaP par rapport au Facteurs de BioConcentration (BCF) calculés dans les organes intervenant dans la détoxication (foie, reins et intestin), la digestion (vésicule biliaire et intestin), l'excrétion (les reins), le stockage (corps jaunes) et dans la circulation sanguine. *Les BCF maximaux sont indiqués, ainsi que le temps d'exposition correspondant. Lorsqu'il y a plusieurs temps d'exposition, cela témoigne d'une constance dans la valeur des BCF et le BCF max est écrit en bleu ainsi que le temps d'exposition correspondant. Les astérisques présents aux niveaux de l'intestin et de la vésicule témoignent de la différence significative entre les 2 expositions.*

2. Enzyme de détoxication : Mesure de l'activité EROD

Cette mesure permet de mettre en évidence l'induction des enzymes de détoxication dans le foie et particulièrement des cytochromes P450-1A. Cette induction est un bio indicateur fortement utilisé dans les milieux aquatiques.

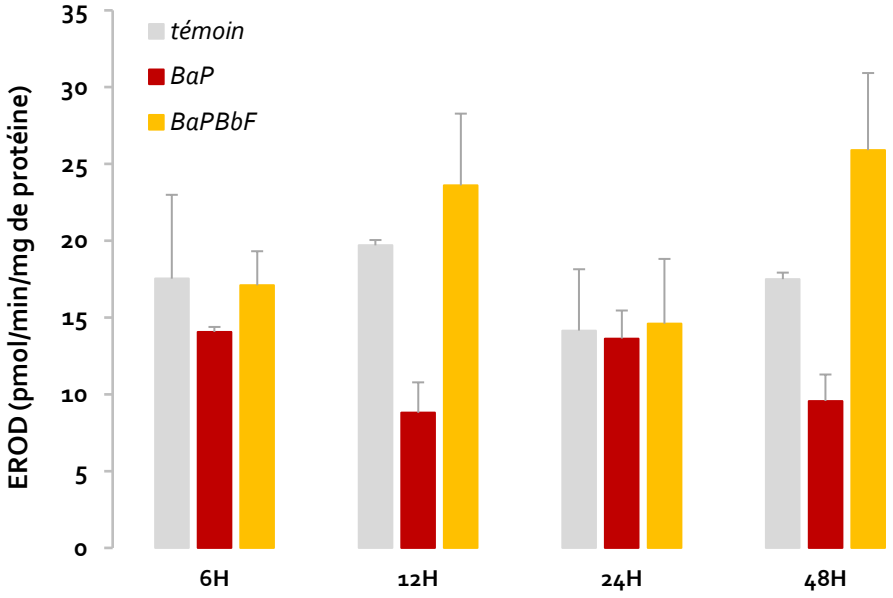


Figure 45 : Activités EROD hépatiques moyennes (pmol/min/mg de protéine) ± SE des grenouilles témoins, exposées au BaP et au BaPBbF selon une cinétique 6 h, 12 h, 24 h et 48 h.

Les activités EROD n'ont pas montré de différences significatives entre les différents temps d'exposition (Figure 45).

Les grenouilles exposées au BaP et au mélange ont montré des activités EROD similaires de celles des grenouilles témoins à 6 h et 24 h. En revanche, bien que les résultats ne soient pas significatifs, les grenouilles exposées au BaP ont montré une inhibition de l'activité EROD au temps 12 h (/2,2) et au temps 48 h (/1,8) traduisant une sous-transcription de l'enzyme de détoxication P450 CYP1A ou sa dégradation. Les grenouilles exposées au mélange ont eu tendance à montrer une faible augmentation de l'activité EROD au temps 12 h (x1,2) et au temps 48H (x1,5) témoignant d'une activation de transcription de l'enzyme de détoxication CYP1A (Figure 45).

3. Glycémie

A. Glycémie initiale à jeun

1. Grenouilles sauvages

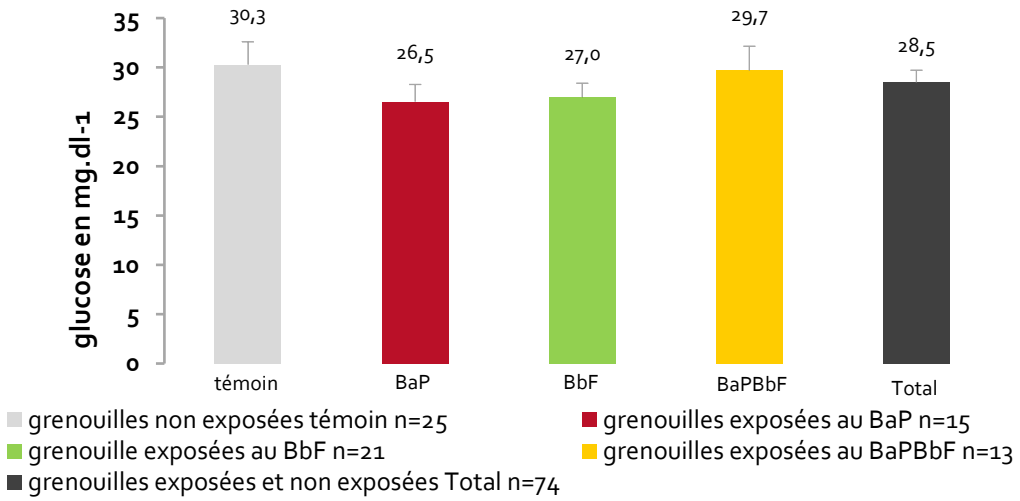


Figure 46 : Glycémies moyennes ± SE des grenouilles mâles sauvages à jeun

Les glycémies moyennes à jeun n'ont pas montré de différences entre les grenouilles sauvages non exposées et exposées entre elles. La glycémie moyenne des grenouilles mâles sauvages mesurée a été de l'ordre de 30 mg.dl^{-1} (28,5 ± 1,2 mg.dl^{-1}).

2. Rivan92

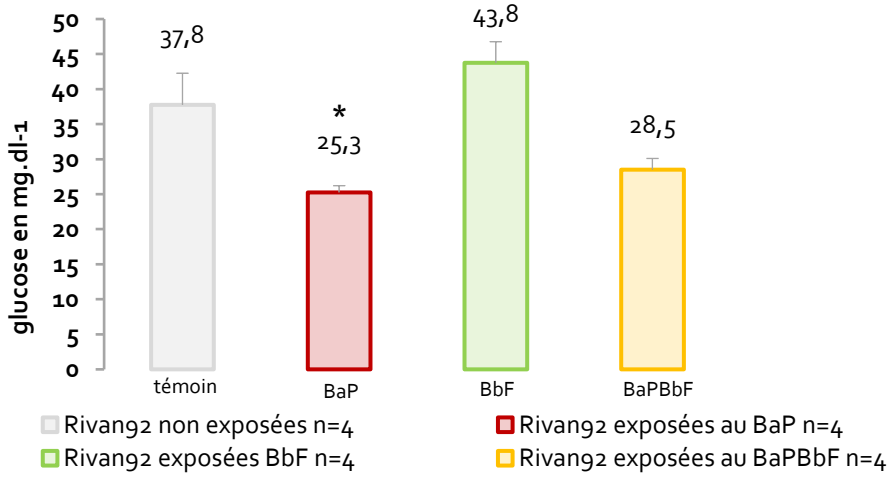


Figure 47 : Glycémies moyennes ± SE des grenouilles mâles Rivan92 à jeun

Les grenouilles exposées au BaP ont eu un taux de glucose dans le sang significativement plus faible (25,3 ± 1,0 mg.dl^{-1}) que les témoins (37,8 ± 4,5 mg.dl^{-1}). L'exposition aux xénobiotiques semble jouer un rôle sur le taux de glucose dans le sang chez les grenouilles d'élevage Rivan92. Les grenouilles d'élevage ont montré une plus grande variabilité du taux de glucose dans le sang en fonction des expositions (de 25,3 ± 1,0 mg.dl^{-1} à 43, 8 ± 3,0 mg.dl^{-1}) que les grenouilles sauvages.

3. Comparaison grenouilles sauvages et grenouilles Rivan92 en fonction de leur masse et de leur glycémie

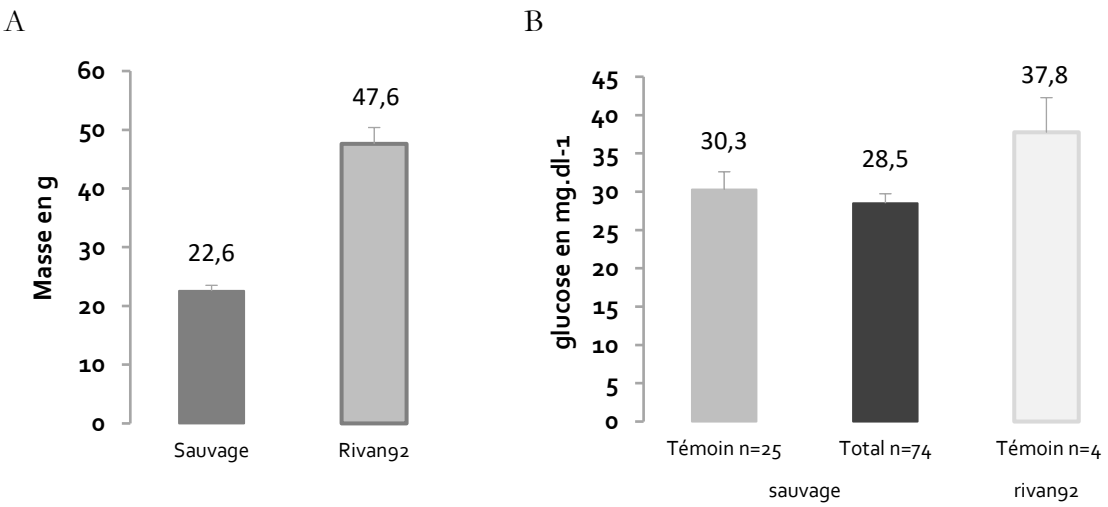


Figure 48 : A/ Masses moyennes ± SE des grenouilles sauvages et des grenouilles Rivan92. B/Glycémies moyennes ± SE des grenouilles sauvages (témoin et total) et des grenouilles Rivan92 (témoin)

Les grenouilles sauvages ont eu une masse moyenne plus faible (22 ,6 ± 0,9 g) que les grenouilles d'élevage Rivan92 (47,6 ± 2,8 g) (Figure 48 A). Cette différence de masse corporelle n'a pas influencé le taux de glucose circulant dans le sang pour les grenouilles non exposées. En effet, le taux moyen de glucose circulant n'a pas été significativement différent entre les grenouilles témoins sauvages et les grenouilles d'élevage Rivan92 témoins (30,3 ± 2,3 $mg.dl^{-1}$ / 37,8 ± 4,5 $mg.dl^{-1}$) (Figure 48 B).

B. Test de Tolérance intra péritonéal au Glucose : ipGTT

1. Grenouilles sauvages

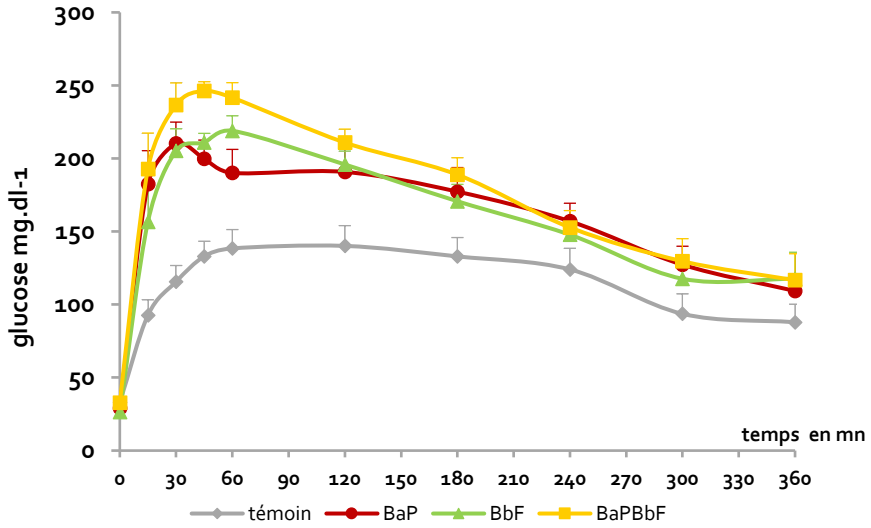


Figure 49 : Test de tolérance au glucose (ipGTT) : Mise en évidence de la perturbation de l'homéostasie du glucose : s*uivi de la glycémie après injection à t = 0, de glucose à 1 mg par g. Grenouilles témoins n = 16, grenouilles exposées au BaP n = 9, grenouilles exposées au BbF n = 15 et pour les grenouilles exposées aux BaPBbF n = 8. Les données représentent les valeurs moyennes ± SE.*

Chez les grenouilles sauvages non exposées, le bolus de glucose en injection intrapéritonéale entraine une augmentation progressive de la concentration en glucose dans le sang jusqu'à une valeur maximale à 60 minutes qui n'a pas excédé 150 mg.dl^{-1}. Le taux de glucose dans le sang a commencé à diminuer au bout de 240 minutes (124 ± 15 mg.dl^{-1}) pour atteindre 88 ± 13 mg.dl^{-1} 360 minutes après l'injection (Figure 49).
Pour les grenouilles sauvages exposées aux HAP, les valeurs du taux de glucose ont montré des différences significatives par rapport aux grenouilles témoins mettant en évidence un défaut du maintien de l'homéostasie glucidique. Dès 15 minutes après injection, les valeurs moyennes du taux de glucose ont montré des différences entre les grenouilles témoins (93 ± 11 mg.dl^{-1}) et les grenouilles exposées au BaP (182 ± 23 mg.dl^{-1} , $p = 0,006$), au BbF (157 ± 14 mg.dl^{-1} , $p = 0,001$) et au mélange (193 ± 25 mg.dl^{-1} , $p = 0,006$). Pour l'ensemble des traitements, le taux de glucose circulant a augmenté de manière significative de 30 à 45 minutes après l'injection ($p < 0,001$) par rapport aux grenouilles témoins. Au bout de 60 minutes, les concentrations en glucose mesurées dans le sang des grenouilles exposées au BaP (190 ± 15 mg.dl^{-1}, $p = 0,03$), au BbF (219 ± 8 mg.dl^{-1}, $p < 0,001$) et au mélange (242 ± 10 mg.dl^{-1}, $p < 0,001$) étaient toujours significativement différentes de celle des grenouilles témoins (138 ± 13 mg.dl^{-1}) (Figure 49).
Pour les grenouilles exposées au BaP, la valeur maximale du taux de glucose mesurée était de 210 ± 15 mg.dl^{-1} au bout de 30 minutes, pour les grenouilles exposées au BbF, cette valeur était de 219 ± 8 mg.dl^{-1} 1 heure après injection et pour les grenouilles exposées au mélange, elle était de 246 ± 6 mg.dl^{-1} au bout de 45 minutes. Par contre au temps 120 minutes après injection, nous n'avons constaté aucune différence significative entre le taux de glucose circulant des grenouilles témoins et des grenouilles exposées au BaP mettant en évidence un retour à une régulation glycémique proche de celle des grenouilles non exposées Des différences significatives ont persisté entre le taux de glucose des grenouilles témoins et celles exposées au BbF ($p < 0,001$) et au mélange ($p < 0,001$) jusqu'à 120 minutes après l'injection. Enfin au temps de 240, 300 et 360 minutes après injection du glucose, le taux de glucose circulant n'a pas été différent entre les différentes conditions expérimentales (Figure 49).

- Aire sous la courbe correspondant à la Figure 49

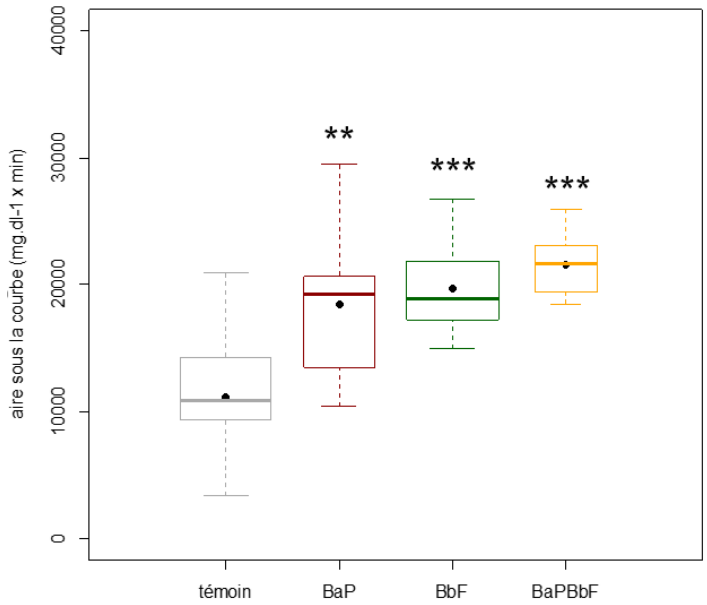


Figure 50 : Boxplot des aires sous les courbes obtenues lors du test ipGTT. Les points noirs représentent les moyennes.

Chez les grenouilles sauvages les aires sous la courbe donnant un taux de glucose dans le sang par unité de temps issu de la Figure 49 ont montré des différences significatives entre les grenouilles témoins et les grenouilles exposées aux différentes conditions expérimentales (Figure 50).
L'homéostasie du glucose a été altérée chez les grenouilles exposées pendant 18 heures quel que soit le polluant seul ou en mélange. Par contre, cette altération n'a pas été différente pour les 3 expositions entre elles. En effet les valeurs moyennes des aires sous les courbes étaient de 11 197 ± 1258 mg.dl^{-1}.min pour les grenouilles témoins, 18 466 ± 1844 mg.dl^{-1}.min pour les grenouilles exposées au BaP, 19 668 ± 823 mg.dl^{-1}.min pour les grenouilles exposées au BbF et de 21 825 ± 885 mg.dl^{-1}.min pour celles exposées au mélange.

2. Grenouilles Rivan92

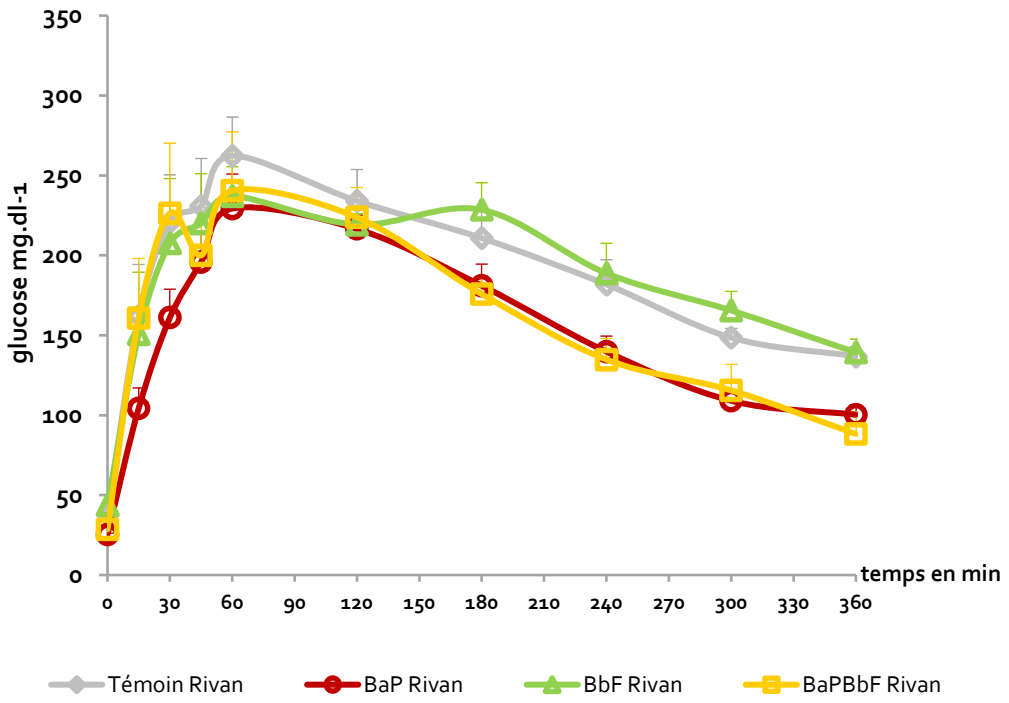


Figure 51 : Test de tolérance au glucose (ipGTT) : Mise en évidence de la perturbation de l'homéostasie du Glucose : suivi de la glycémie après injection à t=0 de glucose à 1 mg par g. Grenouilles Rivan92 n=4 pour toutes les conditions d'exposition. Les données représentent les valeurs moyennes ± SE.

Chez les grenouilles d'élevage Rivan92 non exposées aux HAP, le bolus de glucose en injection intra péritonéale a entrainé une très forte augmentation de la concentration en glucose dans le sang pour aboutir à une concentration maximale à 60 minutes après injection de 262 ± 24 mg.dl^{-1}. La même augmentation du taux de glucose circulant a été observée chez les grenouilles exposées aux différents polluants atteignant une concentration de glucose maximale au bout de 60 minutes. Les concentrations moyennes de glucose atteintes dans le sang sont 229 ± 22 mg. dl^{-1} pour les grenouilles exposées au BaP, 237 ± 18 mg.dl^{-1} pour les grenouilles exposées au BbF et 241 ± 37 mg.dl^{-1} pour celles exposées au mélange (Figure 51). Aucune différence du taux de glucose circulant n'a été mise en évidence chez les grenouilles d'élevage Rivan92 quels que soient les traitements. La régulation de l'homéostasie du glucose a été montrée perturbée chez toutes les grenouilles Rivan92, particulièrement chez les grenouilles Rivan92 témoins présentant une concentration moyenne

maximale de 262 ± 24 mg.dl^{-1} (Figure 51), alors que la concentration moyenne maximale a été de 140 ± 14 mg.dl^{-1} (Figure 49) chez les grenouilles témoins sauvages.

- Aire sous la courbe correspondant à la Figure 51

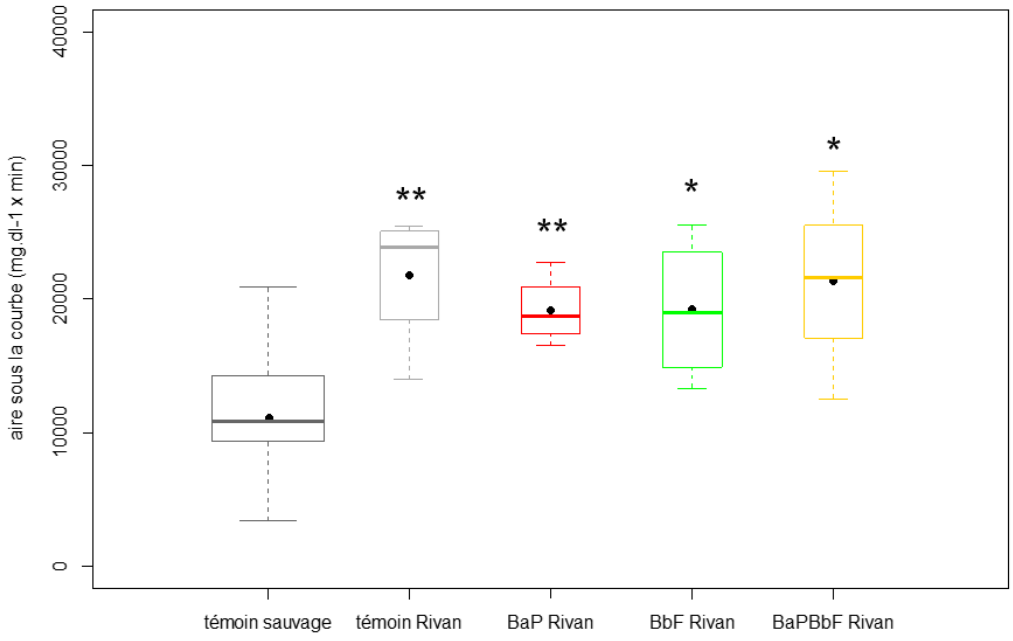


Figure 52 : Boxplot des aires sous les courbes obtenues lors du test ipGTT.

Chez les grenouilles d'élevage Rivan92, les aires sous la courbe donnant un taux de glucose dans le sang par unité de temps issu de la Figure 51 n'ont montré aucune différence entre les grenouilles Rivan92 témoins (21 810 ± 2282 mg.dl^{-1}.min) et les grenouilles Rivan92 exposées au BaP (19 166 ± 1122 mg.dl^{-1}.min), au BbF (19 217 ± 2338 mg.dl^{-1}.min) et au mélange (21 330 ± 2992 mg.dl^{-1}.min) (Figure 52).
En revanche, l'aire sous la courbe des grenouilles Rivan92 témoin (21 810 ± 2282 mg.dl^{-1}.min) a été montrée significativement différente de l'aire sous la courbe des grenouilles sauvages témoins (11 197 ± 1258 mg.dl^{-1}.min). Cette différence a renforcé le fait que les grenouilles Rivan92 non exposées présentent un défaut de régulation glycémique. L'exposition aux polluants de grenouilles Rivan n'a entrainé aucune modification supplémentaire de leur glycémie Figure 52.

C. Test de Tolérance intra péritonéal au Pyruvate (ipPTT) : grenouilles sauvages

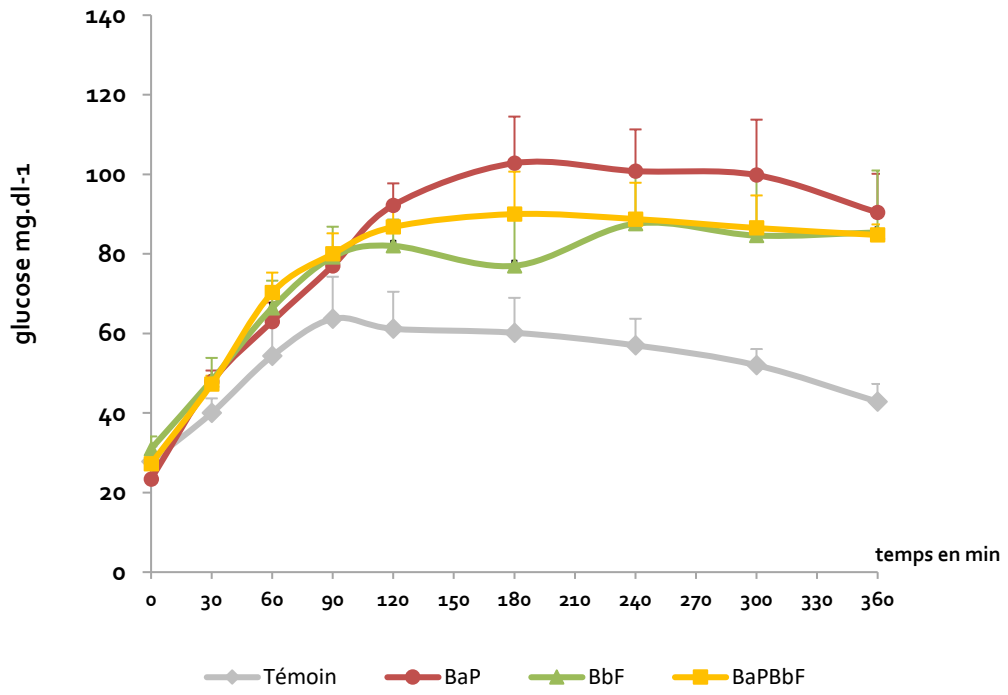


Figure 53 : Test de tolérance au pyruvate ipPTT : mise en évidence de la perturbation de la voie de la néoglucogenèse **: suivi de la glycémie après injection à t=0 de pyruvate à 1mg par g chez les grenouilles sauvages témoins (n = 6), et exposées au BaP (n = 5), BbF (n = 5), BapBbF (n = 5). Les valeurs exprimées sont les moyennes *± SE.***

L'injection de pyruvate nous permet de mettre en évidence des perturbations de la voie de la néoglucogenèse hépatique. En effet, le pyruvate est transformé en glucose par cette voie. De plus le foie est le seul organe capable de secréter du glucose dans la circulation sanguine via la G6Pase pour alimenter les organes périphériques (muscles, cerveau).
Les concentrations en glucose retrouvées dans le sang ont été significativement différentes pour les temps 300 et 360 minutes après injection de pyruvate (Kruskal-Wallis $p < 0,05$) (Figure 53). A 300 minutes après injection, le taux de glucose était différent entre les grenouilles sauvages témoins et les grenouilles exposées au BaP et au BbF ($p < 0.05$). Au temps 360 minutes après injection, les grenouilles témoins présentaient une concentration en glucose plus faible que les grenouilles exposées au BaP uniquement ($p < 0,01$). Aucune différence de glycémie n'a été observée entre les différents traitements.

- Aire sous la courbe correspondant à la Figure 53

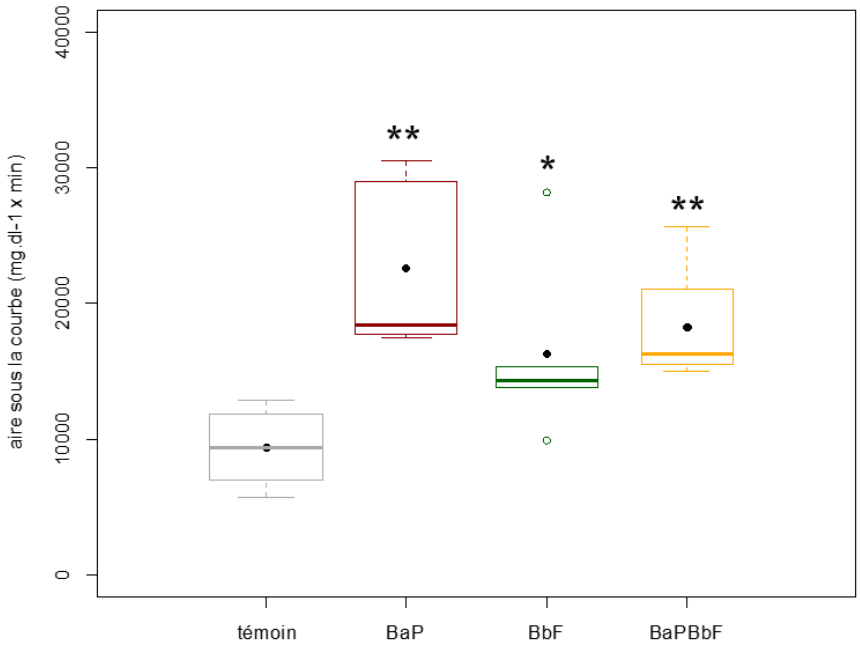


Figure 54 : Boxplot des aires sous les courbes obtenues lors du test ipPTT. Les données représentent les valeurs moyennes ± SE. L'analyse statistique est réalisée en utilisant le test de Wilcoxon (test non paramétriques).

Chez les grenouilles sauvages les aires sous la courbe donnant un taux de glucose dans le sang par unité de temps issu de la Figure 53 ont montré une différence entre les grenouilles témoins (9365 ± 1022 mg.dl^{-1}.min), les grenouilles sauvages exposées au BaP (22 628 ± 2609 mg.dl^{-1}.min), au BbF (16 323± 2781 mg.dl^{-1}.min) et au mélange (18292 ± 1920 mg.dl^{-1}.min) ($p = 0{,}003$) Figure 54.
La voie de la néoglucogenèse est apparue impactée pour les grenouilles exposées par rapport aux grenouilles témoins.

D. L'insulino-résistance chez les grenouilles

1. Comparaison de l'insulino-résistance entre les grenouilles non exposées sauvages et Rivan92

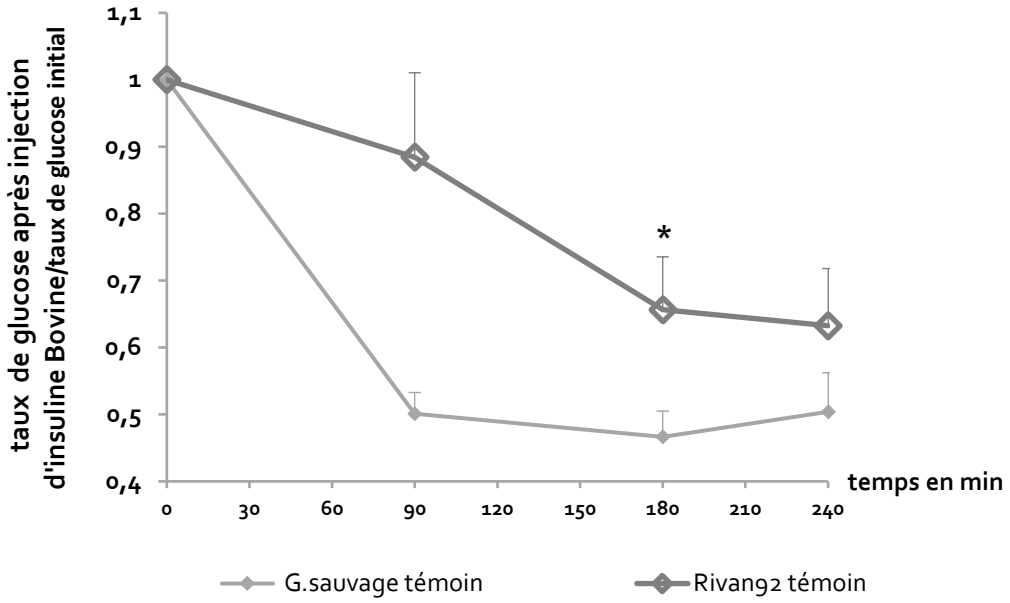


Figure 55: Ratio du taux de glucose dans le sang des grenouilles sauvages (gris clair) et des grenouilles Rivan 92 (gris foncé) après injection à t0 d'insuline bovine à 17 mUI.g^{-1}. Les données représentent les moyennes ± SE (n = 9).

Le ratio du taux de glucose a été montré significativement différent entre les grenouilles témoins sauvages et Rivan92 ($p < 0.05$) au temps 180 minutes après injection. Le taux de glucose dans le sang des grenouilles sauvages a diminué progressivement après injection d'insuline bovine. Après 180 minutes, ce taux a été plus faible chez les grenouilles sauvages que chez les grenouilles Rivan92. Les grenouilles d'élevage Rivan92 ont montré peu de sensibilité à l'insuline bovine. En effet peu de grenouilles (22 %) Rivan92 ont atteint la valeur seuil (10 mg.dl^{-1}) de l'appareil de mesure, alors que les grenouilles sauvages ont atteint progressivement cette valeur (Tableau 14).

Tableau 14 : Insulino-résistance : Pourcentage des grenouilles à avoir atteint un taux de glucose dans le sang inférieur à 10 mg.dl^{-1} après injection d'insuline bovine.

Pourcentage de grenouilles dont le taux de glucose est < 10 mg.dl^{-1}		
Temps après injection de l'insuline Bovine	**Grenouilles Sauvage**	**Grenouilles Rivan 92**
90	33	22
180	89	22
240	89	22
300	100	22

Dès 180 minutes après injection de l'insuline, 89 % des grenouilles sauvages non exposées ont eu un taux de glucose inférieur à 10 mg.dl^{-1}, alors que 22 % des grenouilles Rivan92 ont atteint ce seuil. De plus au bout de 300 minutes après injection, 100 % des grenouilles sauvages présentaient

un taux de glucose inférieur à ce seuil, alors que le pourcentage de grenouilles Rivan92 reste constant (22 %) tout au long de la cinétique de mesure et jusqu'au dernier temps de mesure (360 minutes).

2. Comparaison de l'insulino-résistance entre les grenouilles sauvages non exposées et exposées et les grenouilles non exposées Rivan92

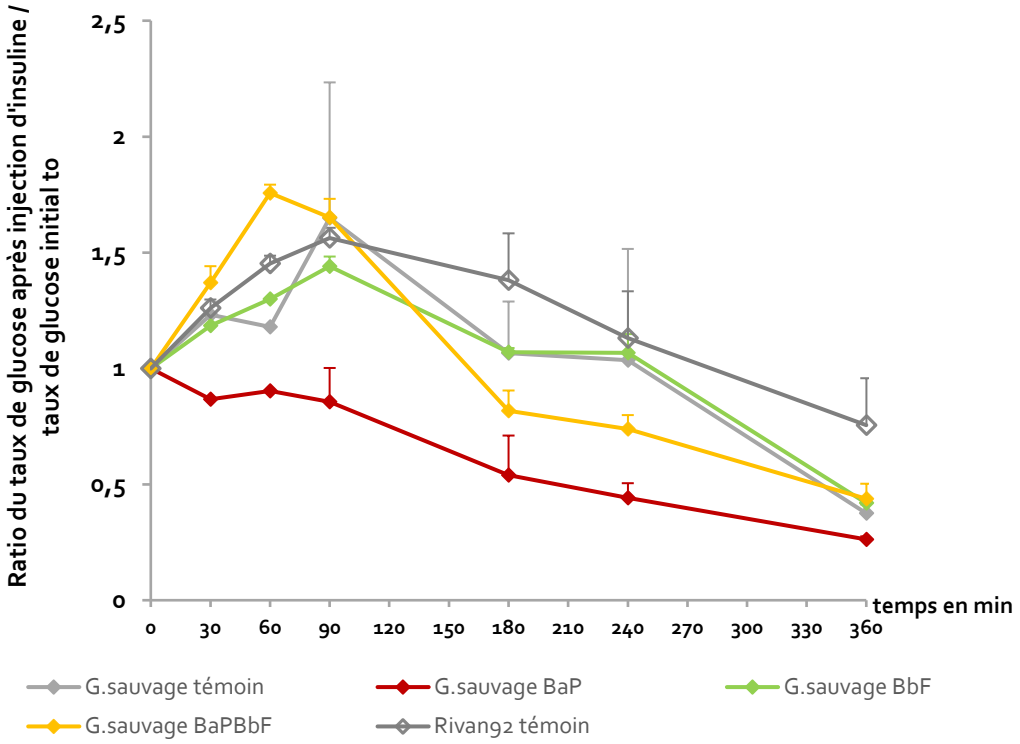


Figure 56 : Ratio du taux de glucose dans le sang chez les grenouilles sauvages témoins et exposées au BaP, au BbF et au mélange et chez les grenouilles témoins Rivan92 après injection à t0 d'insuline bovine à 17 mUI.g^{-1}. Les données représentent les valeurs moyennes ± SE (n = 2 pour toutes les conditions)

Après avoir mis en évidence l'insensibilité des grenouilles Rivan92 à l'insuline bovine (Figure 55), nous voulions savoir si les grenouilles exposées pendant 18 heures aux polluants développaient une insensibilité à l'insuline. Dans ce test les grenouilles Rivan92 représentaient le témoin positif permettant de mettre en évidence l'insensibilité ou la résistance à l'insuline. Afin de mieux caractériser l'effet de l'insuline sur les 90 premières minutes, nous avons réalisé des prises de sang digitales toutes les 30 minutes. Malheureusement, ces prises de sang ont engendré beaucoup de stress pour les différents individus, ce qui a eu comme conséquence une élévation et une forte fluctuation des taux de glucose dans le sang pour les différentes grenouilles testées. Au bout de 90 minutes après injection d'insuline, les prises de sang ont été réalisées à 180, 240, 300 et 360 minutes. Cette cinétique (Figure 56) a donc été différente de la Figure 55. Le temps de 360 minutes après injection d'insuline a été nécessaire pour arriver à des seuils non détectables de glycémie, alors que nous avions mesuré ces faibles valeurs de glycémie dès 240 minutes après injection au 1er test (Figure 55).

A partir du temps 90 minutes après injection, le taux de glucose dans le sang des grenouilles sauvages a diminué pour atteindre la valeur seuil (< 10mg.dL^{-1}) de l'appareil de mesure quel que soit le traitement témoignant d'une efficacité de l'insuline sur la régulation du taux glucose circulant. Les grenouilles sauvages n'ont pas développé *a priori* une résistance à l'insuline. Pour les grenouilles

Rivan92, les taux de glucose sanguin ont été similaires à ceux du test précédent (Figure 55) avec une cinétique décalée dans le temps.

Il semble que l'exposition aux différents HAP pendant 18 heures n'ait pas affecté la sensibilité à l'insuline chez les grenouilles sauvages.
Ces résultats doivent être poursuivis sur un nombre d'individus plus grand afin de valider ces tendances.

E. Taux de transcription de PEPCK dans le foie

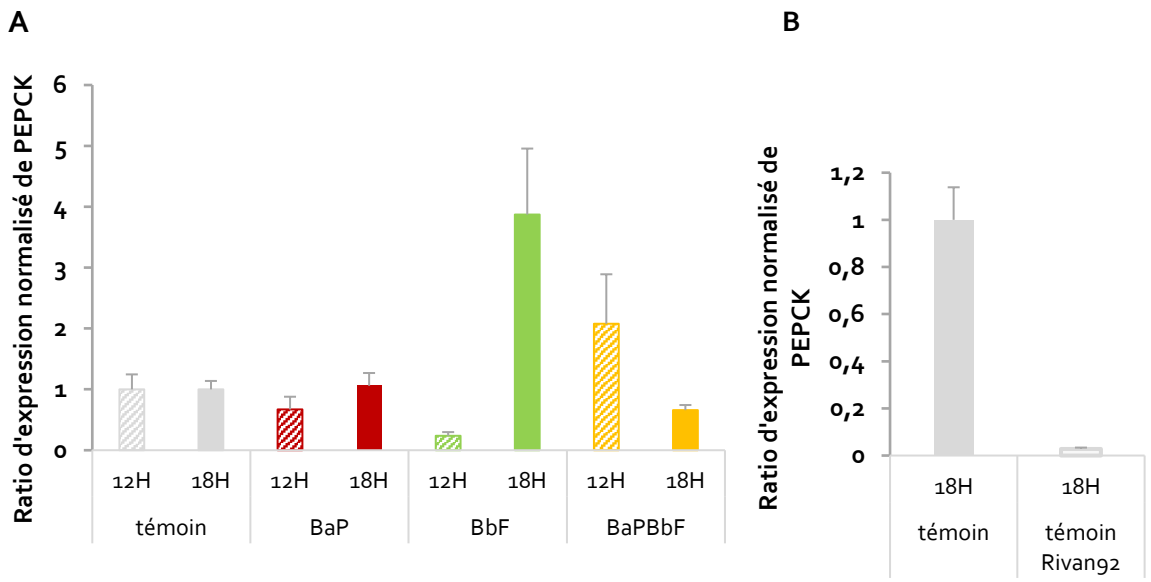


Figure 57 : Evaluation de la néoglucogenèse : Ratio d'expression normalisé de PEPCK dans le foie. A/ grenouilles sauvages non exposées et exposées pendant 12 h et 18 h aux HAP seuls ou en mélange. Les données représentent les moyennes ± SE. **Les effectifs à 18 h sont de 6 pour toutes les conditions et à 12 h, n = 3 pour les grenouilles témoins et exposées au BaP, n = 4 pour les grenouilles exposées au BbF et n = 6 pour les grenouilles exposées au BaP et BbF.**
B/ grenouilles sauvages et grenouilles Rivan92 non exposées. Les données représentent les moyennes ± SE ; Pour les grenouilles sauvages n = 6 et pour les grenouilles Rivan92 n = 2.

Les grenouilles exposées au BaP ont présenté des valeurs de transcription de PEPCK proches de celle des grenouilles témoins à 12 h et 18 h. En revanche, bien que les résultats ne soient pas significatifs, les grenouilles exposées au BbF ont montré une sous-transcription du gène de la PEPCK à 12 h (/4), suivi par une sur-transcription de ce dernier à 18 h (x4). Pour les grenouilles exposées au mélange, une tendance à la sur-transcription de PEPCK (x2) a été observée à 12 h (Figure 57A). Il a été observé une grande variabilité des niveaux transcriptionnels de l'enzyme PEPCK au sein de la population de grenouille verte.

La comparaison du taux de transcription de PEPCK chez les grenouilles sauvages et les grenouilles d'élevage Rivan92 non exposées, a montré une tendance à la sous-transcription de cette enzyme chez les grenouilles Rivan92 (0,030 ± 0,005). Tout comme pour les grenouilles sauvages, une forte variabilité des niveaux de transcription a été observée pour les grenouilles d'élevage (Figure 57B).

F. Taux de transcription du co-activateur PPARGC1a ou PGC-1α dans le foie

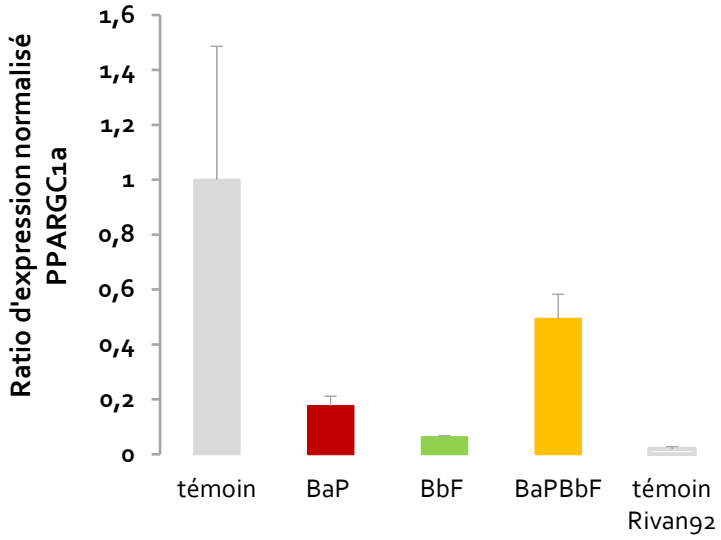


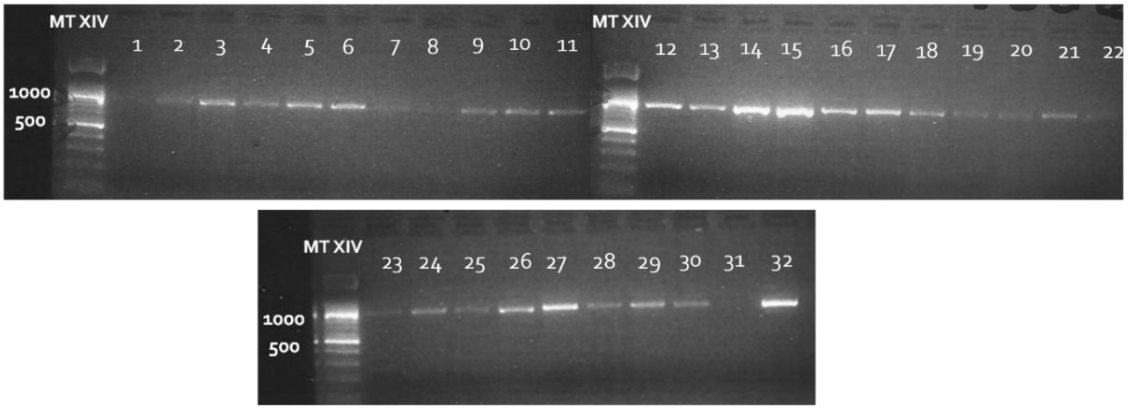
Figure 58 : Ratio d'expression normalisé de PPARGC1a dans le foie chez les grenouilles sauvages non exposées (n = 5), exposées pendant 18 h au BaP (n = 6), BbF (n = 4), BaPBbF (n = 4) et les grenouilles Rivan92 non exposées (n = 2). Les données représentent les valeurs moyennes ± SE.

Bien que les résultats ne soient pas significatifs, les grenouilles sauvages exposées aux différents traitements ont montré des sous-transcriptions à 18H du gène du co-activateur PPARGC1a. Cette sous-transcription a été de 5 fois pour les grenouilles sauvages exposées au BaP, de 16 fois pour les grenouilles sauvages exposées au BbF et de 2 fois pour celles exposées au mélange (Figure 58). Quant aux grenouilles d'élevage Rivan92, leur taux de transcription a été très inférieur à celui des grenouilles sauvages témoins. Ce taux a mis en évidence une sous-transcription de ce gène (/50) par rapport aux grenouilles sauvages non exposées (Figure 58).

4. Génotypage

A. PCR de l'intron-1 du gène de l'albumine sérique SAI-1

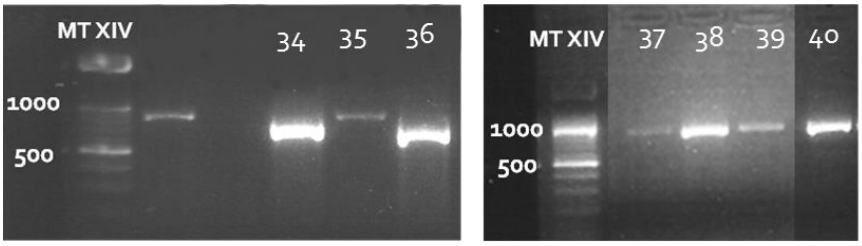
- Les grenouilles sauvages



1	12H Control D	12	18H Control D	23	18H BbF C	31	18H Mix E
2	12H Control E	13	18H Control E	24	18H BbF D	43	WF 2014 A1
3	12H BaP D	14	18H Control F	25	18H BbF E	44	WF 2014 A2
4	12HBaP E	15	18H BaP A	26	18H BbF F	45	WF 2014 A3
5	12HBBF A	16	18H BaP B	27	18H Mix A		
6	12H BBF B	17	18H BaP C	28	18H Mix B		
7	12H Mix D	18	18H BaP D	29	18H Mix C		
8	12H Mix E	19	18H BaP E	30	18H Mix D	N°	***Montré sur gel***
9	18H Control A	20	18H BaP F	32	18H Mix F	N°	***Non montré sur gel***
10	18H Control B	21	18H BbF A				
11	18H Control C	22	18H BbF B				

Figure 59 : Génotypage Grenouilles sauvage : produits PCR de l'intron-1 du gène de l'albumine sérique. Les cases noires représentent les individus séquencés dont le produit PCR est montré sur le gel. Les cases bleues représentent les individus envoyés au séquençage dont le produit PCR est non montré.

- Les Grenouilles Rivan92



34	Rivan C2	37	Rivan BbF1	42	Rivan 34
35	Rivan C3	38	Rivan BbF2		
36	Rivan C4	39	Rivan BbF3	N°	**Montré sur gel**
		40	Rivan BbF4	N°	***Non montré sur gel***

Figure 60 : Genotypage grenouilles Rivan 92 : produits PCR de l'intron-1 de l'albumine sérique. Les cases noires représentent les individus séquencés dont le produit PCR est montré sur le gel. Les cases bleues représentent les individus séquencés dont le produit PCR est non montré.

La taille des amplicons obtenus après amplification par PCR de la portion du gène de l'albumine sérique était de 1000 pb pour l'ensemble des grenouilles sauvages testées. Pour les grenouilles d'élevage Rivan92, les produits obtenus après PCR ont montré des tailles de 1000 pb également, avec cependant des produits PCR plus courts autour des 800 pb pour deux individus (34 et 36). Ces tailles de produits PCR (800 à 1000 pb) retrouvées chez les individus sauvages et d'élevage ne correspondaient pas à la taille de l'amplicon observé chez *P. lessonae* (< 350pb) ni aux différents amplicons retrouvés chez les hybrides. Nos populations de grenouilles vertes sauvages et Rivan92 n'ont pas regroupé d'individus appartenant à l'espèce *P. lessonae* et à l'espèce hybride *P. kl. esculentus*. Il semblerait que nos populations de grenouilles vertes sauvages et Rivan92 regroupent des individus appartenant à la lignée *bedriagae/ridibundus* donnant une grande diversité d'espèces.

B. Séquençage des produits PCR obtenus

Les différentes séquences obtenues par le séquençage Sanger dans les 2 sens des différents amplicons ont permis de reconstruire la partie du gène de l'albumine sérique correspondant à l'intron-1 (SAI-1) à l'aide du logiciel BioEdit. Cette portion du gène a été reconstruite pour 28 grenouilles sauvages (35 amplicons séquencés) et 8 grenouilles d'élevage Rivan92 (8 amplicons séquencés).
L'analyse de ce séquençage a montré du polymorphisme pour les grenouilles sauvages alors que les grenouilles d'élevage Rivan92 en ont montré moins. Les séquences consensus pour cette portion de gène ont montré moins d'ambiguïté pour les grenouilles Rivan92.

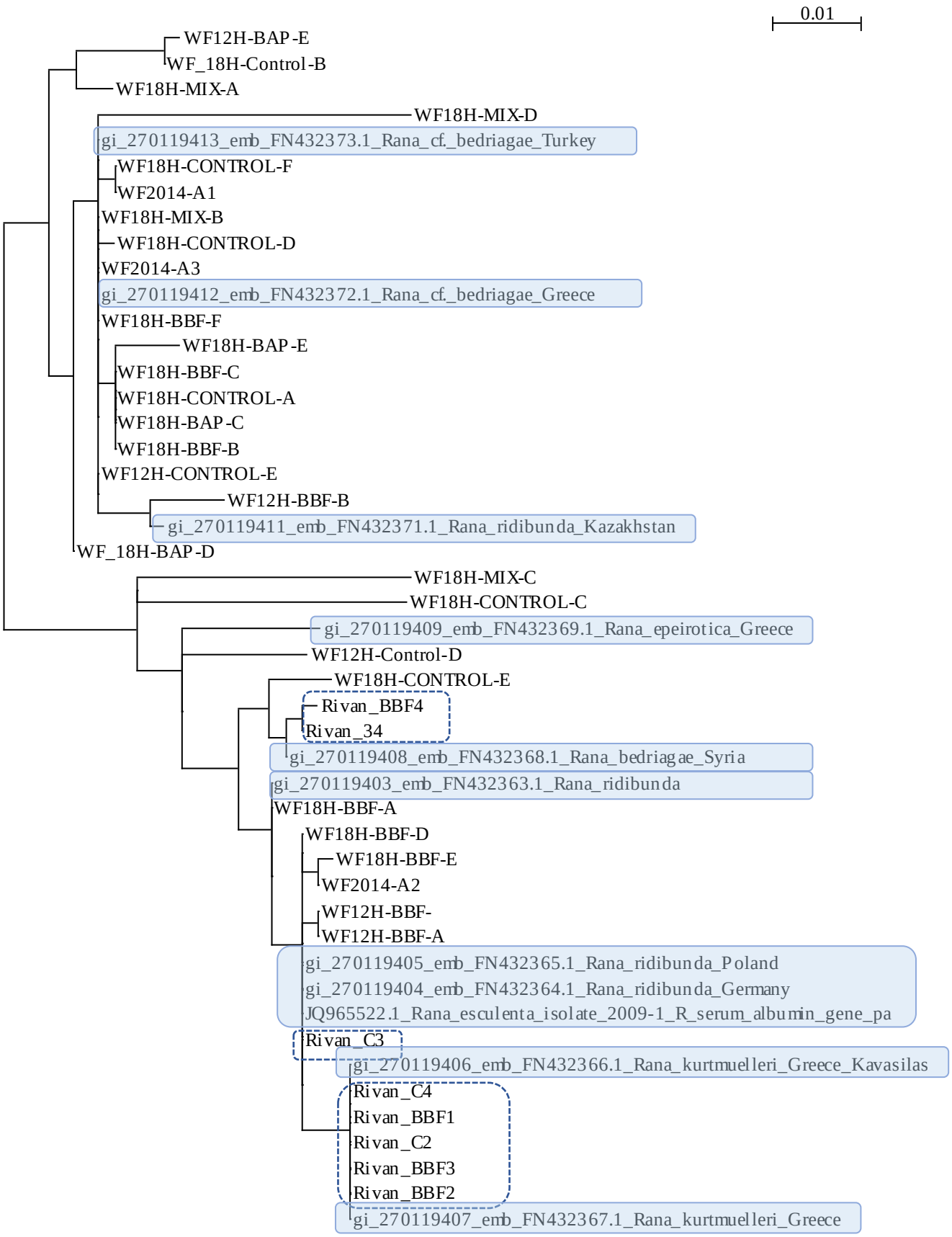


Figure 61 : Arbre phylogénétique des grenouilles sauvages et Rivan92 par rapport à l'intron-1 du gène de l'albumine sérique. Les noms des grenouilles correspondants aux séquences SAI-1 référentes sont encadrés et coloriés en bleu. Les grenouilles Rivan92 sont encadrées en bleu.

Notre volonté en construisant cet arbre phylogénétique n'a pas été de déterminer les liens de parenté entre les différentes grenouilles ou les différents taxons mais d'essayer de regrouper nos différentes grenouilles avec les grenouilles du paléarctique occidental connues (séquence de l'intron-1 du gène de l'albumine sérique déterminée) dans le but d'identifier les différentes espèces que nous avons eues dans nos populations de grenouilles vertes.
Les grenouilles d'élevages Rivan92 se sont regroupées en 3 taxons (Figure 61). Un taxon composé de 5 individus (Rivan_C4, Rivan_BBF1, Rivan_C2, Rivan_BBF3, Rivan_BBF2) qui s'est regroupé avec l'espèce *P. kurtmuelleri* (Grèce), puis une autre regroupant 2 individus (Rivan_BBF4 et Rivan_34) qui s'est rapproché de l'espèce *P. bedriagae* de Syrie. Le dernier représenté par un seul individu (Rivan_C3) a été affilié à un groupe comportant l'espèce *P. ridibundus* de Pologne et d'Allemagne ainsi que l'espèce hybride *P. kl. esculenta.*
L'ensemble des grenouilles sauvages s'est réparti au niveau des différents groupes représentant les différentes espèces du paléarctique occidental, à l'exception de deux groupes représentés par l'espèce *P. kurtmueller* et *P. bedriagae (*Syrie). Nos populations de grenouilles vertes appartiennent à la lignée ridibundus/bedriagae en se regroupant majoritairement au niveau des espèces *P. cf bedriagae, P. epeiroticus, P. ridibundus*. Ces différentes espèces sont retrouvées sur les sites de pêches réalisées en Turquie et en Grèce.

En conclusion, nos populations de grenouilles vertes ne sont pas composées d'individus hybrides appartenant au complexe *esculentus*. Nos populations appartiennent à la lignée *ridibundus/bedriagae* qui se compose de plusieurs espèces présentes autour du bassin méditerranéen notamment en Turquie et en Grèce où nos grenouilles sauvages sont pêchées.

IV. Discussion

1. Toxicocinétique

Les amphibiens sont considérés comme sensibles aux polluants, du fait de leur peau fine et perméable, de leur cycle de vie (terrestre et aquatique) qui maximise leurs expositions, de leur régime alimentaire dépendant du stade de vie (plantes ou animaux) (Hayes *et al*, 2010). Les études portant sur la pollution aux HAP et sur les amphibiens restent limités à souvent une espèce et un HAP. Dans le cadre d'expositions multiples au sens large ou plus particulièrement aux HAP en mélange, les expositions sont faites *in natura*, et ainsi ne sont pas contrôlées. Il est clairement établi que les amphibiens sont capables de métaboliser les HAP et particulièrement le BaP (Marthy *et al*, 1995 ; Leney *et al*, 2006 ; Reynaud *et al*, 2012 ; Regnault *et al*, 2014). Certains auteurs confirment la possibilité d'utiliser les grenouilles comme bioindicateurs pour les polluants organiques persistants à l'image des bivalves *(Mytilus edulis)* car ils montrent des taux d'élimination des HAP similaires et plus lents que ceux observés chez d'autres vertébrés comme les poissons (Leney *et al*, 2006). A ce jour, rien n'a été montré concernant l'influence d'un HAP sur un autre au niveau de la distribution, la métabolisation chez les amphibiens. Comme déjà décrit chez les grenouilles vertes femelles (Reynaud *et al*, 2012) l'absorption du BaP chez les grenouilles vertes mâles est également rapide. En effet l'absorption de la moitié du BaP se fait en moins de 24 h et au bout de 4 jours la quasi-totalité du BaP est absorbée (84 %). De plus les anoures ne boivent pas, ce qui implique que la voie majoritaire de pénétration des xénobiotiques se fait uniquement *via* la peau (Ogushi *et al*, 2010). Pour les grenouilles vertes exposées au mélange, la vitesse d'absorption du BaP est impactée par la présence du BbF. En effet l'absorption de la moitié du BaP nécessite 12 heures de plus que pour les animaux exposés au BaP seul. Cependant après 96 h d'exposition le taux de BaP absorbé est de 88 %, taux similaire au taux retrouvé chez les grenouilles exposées au BaP seul (84 %).
Cette différence de vitesse d'absorption du BaP ne semble pas être la conséquence d'une différence d'adsorption et d'absorption de la molécule au niveau de la peau. En effet le passage des xénobiotiques à travers la peau reste rapide et relativement constant durant les 2 types d'exposition (maximum de concentration entre 12 et 24 h puis diminution observée à partir de 4 jours d'exposition). La peau des amphibiens est très perméable du fait de son rôle important dans les échanges d'oxygène et de dioxyde de carbone intervenant dans la respiration, ainsi que dans la régulation interne de l'eau et des ions sodium, chlore et potassium (Hayes *et al*, 2006 ; Quaranta *et al*, 2009). Il a été montré que la pénétration des HAP lourds par voie transcutanée chez le cochon d'inde s'accompagne d'une métabolisation importante de ces composés et notamment du BaP avec la présence dans le milieu de 30 % de métabolites. Cette biotransformation des HAP fortement lipophile au niveau de l'épiderme déséquilibre le gradient de concentration pour la diffusion passive et favorise une absorption en plus grande quantité (Ng *et al*, 1992). De même les études de toxicocinétique faites sur grenouilles vertes femelles montrent la présence de métabolites plus polaires que le BaP au niveau de la peau (Reynaud *et al*, 2012). Cette présence de métabolites plus polaires que le BaP témoigne de l'existence d'une cohorte d'enzymes de détoxication et notamment de monoxygénases à cytochrome P450. Il a été clairement montré par immunohistochimie la présence de cytochromes P450 (CYP1A) au niveau de la peau de grenouilles léopard (*Rana pipiens*). Ces enzymes se trouvent sur les cellules épithéliales des glandes à mucus et séreuses (*stratum spongiosum*), ainsi que dans les cellules endothéliales du derme (Huang *et al*, 2001). Toutefois la peau des amphibiens est beaucoup plus fine que la peau des mammifères, notamment au niveau de l'épiderme (*stratum corneum*) composé d'une seule couche de cellules kératinisées permettant ainsi une meilleure perméabilité des gaz et des fluides sans consommation d'énergie (Walker *et al*, 1998 ; Haslam *et al*, 2014). Cette caractéristique vitale pour les amphibiens constitue un préjudice de vulnérabilité important quant à la présence de xénobiotiques de plus en plus nombreux dans les zones humides (Hayes *et al*, 2006 ; Quaranta *et al*, 2009). En effet les polluants vont être transportés plus rapidement dans la circulation

centrale via la veine cutanée, puis ensuite amenés au cœur pour enfin être distribués aux différents organes.
La distribution via le sérum tend à être différente entre les deux expositions. En effet il semble que le BaP et/ou ses métabolites restent plus longtemps dans le sérum des grenouilles exposées aux deux polluants (Figure 44) sans pour autant observer de différence au niveau du cœur. Les organes fortement perfusés comme le muscle rouge, le cœur, les branchies… peuvent accumuler certains HAP ou dérivés contrairement au muscle blanc peu vascularisé (Valdez Domingos *et al*, 2011).
Il a été montré que les xénobiotiques lipophiles sont transportés par les lipoprotéines et peuvent également s'associer à l'albumine présente dans le sérum (Panin *et al*, 1991 ; Polyakov *et al*, 1996 : Jandacek et Tso, 2001). En effet, peu de BaP radiomarqué se retrouve dans la fraction contenant les globules rouges (de 2 à 7 %). Cette tendance à l'accumulation du BaP et/ou ses métabolites plus longue dans le sérum pour les grenouilles exposées au mélange semble impacter sa bioconcentration et sa distribution à différents niveaux (réserve, assimilation et métabolisation). En effet, même si nous ne pouvons parler que de tendance les corps jaunes qui sont des tissus de réserve accumulent transitoirement plus de BaP et/ou ses métabolites (Reynaud, et al., 2012) chez les grenouilles exposées au mélange que celles exposées au BaP seul. Il est reconnu que les tissus graisseux accumulent les molécules lipophiles (Müllerova et Kopecky, 2007).
Cette double exposition impacte la distribution dans l'organisme du BaP et donc sa métabolisation par les enzymes de détoxication présentes particulièrement au niveau du foie et des reins.
Cette métabolisation du BaP chez les grenouilles vertes mâles engendre dans le milieu de trempage une excrétion des métabolites polaires de 10 à 20 % dès 12 h pour atteindre environ 40 % de métabolites polaires au bout de quatre jours pour les deux expositions. Même si cette excrétion semble similaire au bout de quatre jours, la cinétique d'apparition de ces métabolites semble être différente pour les deux expositions indiquant que le BbF agit sur la cinétique de métabolisation du BaP. Une des voies d'élimination correspond à l'excrétion urinaire. Cette voie d'excrétion des métabolites polaires *via* les reins (Jandacek et Tso, 2001 ; Reynaud *et al*, 2012) semble identique en termes de bioaccumulation de métabolites polaires du BaP pour les deux expositions qui montrent un maximum d'accumulation se maintenant de 24 h à 96 h.
Les facteurs de bioaccumulation élevés retrouvés dans le foie, la vésicule et l'intestin montrent que le système hépatobiliaire (foie – vésicule biliaire – intestin) joue un rôle important dans la métabolisation du BaP et dans l'excrétion des métabolites (Marty *et al*, 1995 ; Leney *et al*, 2006). En revanche, cette voie n'est pas impactée de la même façon par les expositions, notamment au niveau de la vésicule biliaire et de l'intestin. En effet la bioaccumulation hépatique des molécules radiomarquées n'est pas différente pour les grenouilles exposées au BaP et au mélange. Les vésicules biliaires des grenouilles exposées au mélange bioaccumulent 3 fois moins de molécules radiomarquées au temps 24 h (BaP et/ou métabolites issus des enzymes hépatiques de détoxication (Reynaud *et al*, 2012) sans pour autant observer de différence significative au niveau du foie de ces grenouilles. Certains xénobiotiques ont été montrés capables d'induire une cholestase c'est-à-dire un blocage total ou partiel des canaux biliaires hépatiques (Levine, 1978 ; Sturgill et Lambert, 1997). Mais les masses moyennes des vésicules biliaires des grenouilles des différentes expositions sont similaires et nous n'avons pas observé de modification de couleur du foie témoignant de déversement de la bile dans celui-ci. Lors des expérimentations, les animaux ne sont pas nourris afin d'évaluer uniquement l'impact des polluants via leur pénétration à travers la peau, ainsi la vidange de la vésicule biliaire dans l'intestin est limitée à environ 20 % de son contenu en synchronisation avec le Complexe Moteur Migrant de l'intestin pour tous les animaux expérimentés (http://physiologie.envt.fr/spip/IMG/pdf/Phys_digest_16.pdf). Apparemment le foie assure son rôle de détoxication en mettant en jeu ses enzymes sans induction sur ces temps d'exposition de 6 h à 48 h (Figure *45*). Néanmoins la cinétique de bioaccumulation dans le foie semble être différente car 12 h d'exposition est le temps où l'accumulation est maximale pour le foie des grenouilles exposées au mélange alors que pour les grenouilles exposées seulement au BaP, l'accumulation de BaP, méta-

bolites et/ou de conjugués semble se situer à 24 h d'exposition. Cette différence pourrait être expliquée par l'activité des monooxygénases à cytochromes P450 (CYP1A) du foie qui présentent pour les grenouilles exposées au BaP une diminution sans significativité de leur activité pour les temps 12 h et 48 h par rapport aux grenouilles non exposées (niveau de base de l'activité CYP1A) et aux grenouilles exposées au mélange. Par contre ces dernières montrent des activités de CYP1A qui ont tendance à être supérieures à celles des témoins (x 1,2 à 1,5) et à celles exposées au BaP (x 2,7), à ces mêmes temps d'exposition. Il est connu que les HAP et particulièrement le BaP induisent les enzymes de détoxication hépatiques chez de nombreux organismes aquatiques et terrestres et particulièrement les cytochromes P450 (Reynaud *et al*, 2002 ; Reynaud *et al*, 2012). Par contre chez un modèle d'amphibien *Xenopus tropicalis* exposé au BaP dans les mêmes conditions que notre étude, la sur-transcription des enzymes de détoxication notamment des monooxygénases à cytochromes P450 n'a pas été montrée (Regnault *et al*, 2014). Il est également décrit dans la littérature que l'induction des P450 ou plus généralement des MFO (oxydases à fonction mixte) chez les amphibiens se fait huit à douze jours après exposition (Venturino et Pechen de D'Angelo, 2005; Ertl et Winston, 1998). De plus ces enzymes sont induites via le récepteur Ah qui présente chez les amphibiens une certaine insensibilité à des inducteurs reconnus comme le 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin (TCDD) (Elskus, 2005; Lavine *et al*, 2005). Cette faible réponse observée vis-à-vis de TCDD chez les amphibiens correspond aux réponses retrouvées chez certaines populations de poissons résistants au TCDD, ainsi que certaines souches de souris et certains oiseaux (Zhou *et al*, 2010 ; Shoots *et al*, 2015). En effet cette faible affinité du récepteur Ah pour certains ligands comme le BaP et le BbF engendre une faible induction du cytochrome CYP1A responsable de l'activation de ces molécules les rendant génotoxiques (Fernandez-Salguero *et al*, 1996; Shimizu *et al*, 2000 ; Bello *et al*, 2001). Il semblerait que les amphibiens montrent une certaine résilience à l'exposition au BaP. En revanche, l'exposition au mélange semble activer cette voie de métabolisation (CYP1A) montrant une tendance à avoir un effet additif ou synergique pour les temps d'exposition 12 h et 48 h. Dans la littérature, les effets mesurés des mélanges binaires montrent une forte variabilité en fonction des doses utilisées et du modèle testé (Staal et *al*, 2007 : Staal *et al,* 2008 ; Pushparajah *et al*, 2016 ; Gaskill et Bruce, 2016). Sur une lignée hépatocytaire humaine le mélange de BaP/BbF a un effet additif sur l'expression du gène *CYP1A* (Staal *et al*, 2007). Cependant, sur des coupes de foie de rat, il a été observé une diminution de l'activité du CYP1A (Staal *et al*, 2008), démontrant un effet antagoniste également observé sur l'activité EROD (Pushparajah *et al*, 2016) et traduisant un potentiel de carcinogenèse diminué. Pour autant des tests d'inhibition de l'activité EROD mettant en compétition le substrat (éthoxyrésorufine) et les polluants permettent de mettre en évidence que le BaP et le BbF ont une forte affinité avec le site catalytique des P450 des microsomes de foie de grenouilles vertes. L'inhibition de cette activité pourrait être expliquée par le stress oxydant. En effet certains auteurs décrivent une régulation de la transcription du gène des CYP1 par des boucles de rétrocontrôle par les espèces réactives de l'oxygène (H_2O_2) ou la diminution de glutathion qui réprimerait l'activité du promoteur de ce gène (Barouki et Borel, 2001 ; Zangar *et al*, 2004). Cette différence d'activité des cytochromes P450 et notamment des CYP1A au temps 12 h et 48 h pourrait expliquer le taux constant de métabolites polaires retrouvés dans le milieu des grenouilles exposées au BaP seul de 12 à 48 h. De plus cette voie d'élimination hépatobiliaire montre des différences au niveau de l'intestin. Les grenouilles exposées au mélange montrent une accumulation plus précoce de BaP et/ou ses métabolites dans l'intestin (dès 12 h), témoignant du passage direct de ces composés du sang vers l'intestin (stagnation plus importante dans le sérum, moins d'accumulation dans la vésicule biliaire). Au contraire l'intestin des grenouilles exposées au BaP seul accumule également du BaP et/ou ses métabolites avec un décalage de 12 h (accumulation importante dans la vésicule biliaire). Il semblerait que l'accumulation de ces composés dans l'intestin soit le reflet de l'accumulation observée dans la vésicule biliaire à 24 h d'exposition chez ces grenouilles exposées au BaP seul (Roberts *et al*, 2002). De plus il existe une réabsorption passive et active de composés endogènes comme les sels biliaires ou exogènes comme les xénobiotiques de l'intestin

vers le foie qui se fait par le sang. Ce cycle entéro-hépatique influence donc la dynamique de métabolisation et d'élimination des xénobiotiques et ainsi augmente la durée d'exposition de l'intestin et du foie aux polluants engendrant une augmentation de vulnérabilité cellulaire (Roberts *et al*, 2002). Les individus exposés au mélange auraient donc peut-être une amplification de ce cycle entéro-hépatique qui aurait pour conséquence une concentration en BaP et/ou métabolites qui se retrouvent plus longtemps dans le sérum (de 12 h à 48 h). En effet la circulation entéro-hépatique concerne autant les composés dont l'origine est biliaire que non biliaire (Jandacek et Tso, 2001). De plus la présence dans l'intestin d'enzymes présentes dans la muqueuse et de microflore spécifique à chaque individu peut impacter la métabolisation des polluants et leur réabsorption. L'importance de cette microflore est de plus en plus mise en exergue dans le maintien du métabolisme au sens large et elle est impactée par l'exposition aux différents polluants (Landman et Quevrain, 2016). En 2015, une étude sur souris suivant un régime alimentaire contaminé par un POP montre des altérations de la micro flore intestinale avec des effets sur le métabolisme des acides biliaires et des impacts sur la lipogenèse, la néoglucogenèse et la glycogénolyse via le récepteur AhR (Zhang *et al*, 2015).

2. Métabolisme glucidique

L'impact des polluants sur les organismes aquatiques est souvent mesuré par rapport à leur capacité à les métaboliser et les excréter et particulièrement par les inductions des enzymes de détoxication qui sont décrites comme des marqueurs d'expositions. Des études récentes s'intéressent aux perturbations du métabolisme chez différents organismes aquatiques exposés aux POP. Chez le poisson *Danio rerio*, des modifications des gènes impliqués dans la régulation de la masse et dans la voie de signalisation de l'insuline ont été montré (Lyche *et al*, 2011). De la même façon, des études chez les amphibiens exposés à des perturbateurs endocriniens montrent des impacts des voies métaboliques glucidique et lipidique avec apparition d'une stéatose hépatique et d'une intolérance au glucose (Regnault *et al*, 2014 ; Regnault *et al*, 2016). Ces différentes études font écho aux données épidémiologiques mettant en évidence des corrélations entre les niveaux de POP dans l'organisme et des altérations de l'homéostasie du glucose (Ropero *et al*, 2008 ; Neel et Sargis, 2011), l'obésité et le développement du diabète de type 2 (Taylor *et al*, 2013 ; Lee *et al*, 2014 ; Jaacks et Staimez, 2015). De plus, il est clairement montré dans la littérature que de nombreux xénobiotiques ont des effets diabétogènes chez les mammifères et la courbe de prévalence du diabète au États-Unis corrèle avec la production de composés chimiques (Neel et Sargis, 2011)
En s'appuyant sur l'étude du transcriptome hépatique faite sur *Xenopus tropicalis* exposé au BaP et montrant clairement des perturbations du métabolisme glucidique avec une sur-transcription de la voie de la néoglucogenèse et de la voie de signalisation de l'insuline (Regnault *et al*, 2014), nous nous sommes intéressés au taux de glucose circulant et à la capacité à réguler ce taux de glucose chez les grenouilles vertes exposées. Au contraire de ce qui est décrit chez *Xenopus tropicalis*, les grenouilles sauvages ne montrent pas de fluctuations du taux de glucose sanguin après exposition aux HAP. Leur glycémie moyenne est de 28,5 ± 1,2 $mg.dl^{-1}$, ce qui correspond à une valeur faible comparée à celle retrouvée chez *Xenopus tropicalis* (autour de 60 $mg.dl^{-1}$). En revanche cette valeur moyenne retrouvée chez *Pelophylax kl. esculentus* exposées ou non aux HAP est similaire à la valeur moyenne mesurée chez *Pelophylax ridibundus* pêchée en milieu naturel (22.7 ± 0.6 $mg.dl^{-1}$). Ces grenouilles montrent une diminution de leur glycémie après exposition à l'herbicide Roundup (Păunescu et Ponepal, 2011; Păunescu *et al*, 2013). Il est clairement établi que les amphibiens ne sont ni sensibles à l'hypoglycémie (<5$mg.dl^{-1}$) ni à l'hyperglycémie (9000 $mg.dl^{-1}$) (Dziewulska-Szwajkowska *et al*, 1997). Cependant, les grenouilles exposées au BaP, au BbF et au mélange montrent un défaut de régulation de la glycémie montré par les tests ipGTT, ce qui témoigne d'un

impact des différents polluants sur les voies de régulation de l'homéostasie du glucose sanguin. Ces perturbations peuvent avoir plusieurs origines. En effet soit la voie de la néoglucogenèse hépatique est stimulée soit la voie de la captation du glucose par les tissus périphériques après stimulation à l'insuline est absente ou insuffisante. La voie de la néoglucogenèse hépatique est impactée par le BaP, le BbF et le mélange. En effet, l'injection intrapéritonéale d'un bolus de pyruvate permet de mettre en évidence chez les grenouilles exposées aux différents polluants une augmentation de la glycémie. Sachant que le pyruvate est le substrat de la voie centrale de la néoglucogenèse puisque la lipolyse, la protéolyse et la glycolyse anaérobie fournissent toutes cet élément pour *in fine* fournir du glucose hépatique. De plus, le foie est le seul organe capable de libérer du glucose dans la circulation sanguine. Cette augmentation de la glycémie plus importante chez les grenouilles exposées que chez les grenouilles témoins après injection de pyruvate reflète une activation de la voie de la néoglucogenèse. Dans cette voie, une des enzymes clé régulée de façon transcriptionnelle est la PEPCK qui permet de convertir l'oxaloacétate issu du pyruvate en phosphoénolpyruvate dans le cytosol. Chez nos différents lots de grenouilles, l'expression hépatique de *PEPCK* s'est révélée extrêmement variable. Pour les grenouilles exposées au BaP, le taux de transcription de *PEPCK* n'est pas modifié après une exposition de 12 h et 18 h, malgré une activation de la voie de la néoglucogenèse. Au contraire une étude faite sur des femelles *Xenopus tropicalis* exposées durant 6 h, 12 h, 18 h et 24 h au BaP confirme la sur-transcription de cette enzyme (Regnault *et al*, 2014). En revanche, chez les mâles *Xenopus tropicalis* exposés au BaP, une sur-transcription de *PEPCK* a été mise en évidence à partir de 24 h d'exposition (Regnault *et al*, 2016). Pour les grenouilles exposées au BbF qui présentent la même réponse au test de tolérance au pyruvate que les grenouilles exposées au BaP, la transcription du gène *PEPCK* est augmentée (x4) à 18 h d'exposition. De la même façon le taux de transcription est doublé pour les grenouilles exposées au mélange pendant 12 h. De plus l'étude de la transcription de *PGC-1*α, le co-activateur de transcription de *PEPCK* via *FOXO* montre une forte variabilité interindividuelle avec une tendance à la sous-transcription. Cette sous-transcription a été montrée également chez *Xenopus tropicalis* à partir de 12 h d'exposition au BaP reflétant une augmentation de la lipogenèse dans le foie engendrant une stéatose hépatique (Regnault *et al*, 2016). De même, dans la population humaine, le polymorphisme du gène *PGC-1*α et son expression plus faible constituent une contribution génétique importante dans le développement d'une stéato-hépatite non alcoolique NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Desease) (Yoneda, et al., 2008). En revanche, le foie des grenouilles vertes exposées ne montre pas de stéatose (coloration ORO : Oil RedO).

Les fortes variabilités des réponses observées nous ont fait réfléchir sur la question de nourrissage des animaux. En effet, les contraintes liées au mode alimentaire des grenouilles vertes (proies vivantes non supplées en vitamines et non diversifiés) posent des questions sur l'équilibre nutritionnel de ces animaux. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés aux grenouilles d'élevage Rivan 92 afin de garantir une alimentation plus contrôlée et équilibrée pour mettre en évidence les perturbations du métabolisme glucidique liées à l'exposition aux HAP. Ces grenouilles Rivan92 présentent une masse 2 fois plus importante que les grenouilles sauvages sans pour autant avoir une glycémie à jeun significativement différente (37,8 $\pm$ 4,5 $mg.dl^{-1}$). En outre, ces grenouilles d'élevage ont montré des différences significatives de glycémie à jeun induites par les polluants particulièrement avec le BaP induisant une hypoglycémie par rapport aux grenouilles Rivan 92 non exposées. Au contraire, l'exposition au BaP de *Xenopus tropicalis* engendre une hyperglycémie (Regnault *et al*, 2014), comme nous avons tendance à l'observer chez les grenouilles Rivan 92 exposées au BbF. Il a été montré que des rats chez qui un diabète de type II a été induit présentent une inhibition de la voie de la néoglucogenèse, particulièrement de PEPCK après injection de forte dose de TCDD, diminuant ainsi le taux de glucose circulant (Fried *et al*, 2010).

Un défaut de régulation de l'homéostasie du glucose a été révélé par les tests de tolérance au glucose même pour les grenouilles Rivan 92 non exposées. En effet, le métabolisme glucidique de ces grenouilles semble être impacté par leur régime alimentaire. Chez des souris suivant un régime enrichi en graisse, il a également été montré une augmentation de masse sans modification de la glycémie

à jeun et une intolérance au glucose mettant en évidence un défaut de maintien de l'homéostasie glucidique (Gonzales *et al*, 2013). Il semblerait que les grenouilles Rivan 92 suivent un régime trop gras engendrant un syndrome métabolique (Kassi *et al*, 2011 ; Aguilar *et al*, 2015 ; Melvin *et al*, 2017), caractérisé par une obésité, un défaut de régulation du taux de glucose sanguin et une insulino-résistance. En effet contrairement aux grenouilles sauvages, l'injection d'insuline bovine ne se traduit pas par une baisse notoire du taux de glucose circulant. En effet, seulement 22 % des grenouilles Rivan92 atteignent une valeur inférieure à 10 $mg.dl^{-1}$au bout de 5 heures après l'injection d'insuline contre 100 % des grenouilles sauvages. Les grenouilles sauvages exposées montrent donc une sensibilité à l'insuline témoignant d'un désordre métabolique glucidique non lié à la captation du glucose par les tissus périphériques que sont les muscles squelettiques et le tissu adipeux. En effet comme chez les mammifères, l'insuline est un régulateur majeur du métabolisme chez les amphibiens en accroissant l'entrée du glucose particulièrement dans le muscle squelettique par l'intermédiaire des récepteurs spécifiques et son stockage sous forme de glycogène (Petersen et Gleeson, 2011). Nous pouvons donc suggérer que le défaut de régulation du glucose observé après exposition aux différents polluants chez les grenouilles sauvages reflète un déficit ou une absence de synthèse d'insuline par le pancréas ou bien que l'insuline sécrétée ne serait peu ou pas fonctionnelle dans la mesure où l'injection d'insuline bovine entraine une baisse du taux de glucose sanguin chez les individus sauvages non exposés et exposés. Chez *Xenopus tropicalis* femelle exposés au BaP à 50 $ng.l^{-1}$ pendant 12 mois, l'immunomarquage de l'insuline sur des coupes de pancréas montrent une hypersécrétion avec une intolérance au glucose. Chez des animaux exposés au BaP suivant les mêmes conditions, puis non exposés pendant 1 an, la sécrétion d'insuline est diminuée (Regnault *et al*, 2017, *in prep*) par rapport aux témoins montrant ainsi un épuisement de la sécrétion de l'insuline des cellules β des ilots de Langerhans du pancréas. Le déficit de régulation du glucose dans le sang suggère des perturbations de stockage du glucose chez les grenouilles vertes exposées pendant la période d'activité. En effet, les grenouilles vertes sont des vertébrés poïkilothermes montrant des variations d'activité physiologiques saisonnières induites par les conditions environnementales. Ces variations engendrent donc des utilisations différentes d'énergie suivant les saisons, notamment l'utilisation des réserves de glycogène hépatique se fait pendant l'hiver lors de l'hibernation pour fournir l'énergie maintenant le métabolisme basal nécessaire aux fonctions vitales des animaux (Byrne et White, 1975 ; Bruscalupi *et al*, 1989 ; Feng *et al*, 2007). Ce défaut de maintien d'homéostasie glucidique pourrait être à l'origine de perturbations de la mise en réserve de glucose sous forme de glycogène notamment hépatique et ainsi générer un ralentissant du métabolisme entrainant la mortalité des populations de grenouilles vertes pendant l'hibernation ou à la sortie de celle-ci. De plus les grenouilles du genre *Pelophylax* montrent des périodes de réveil lors de l'hibernation et des déplacements afin de trouver des conditions plus favorables pour la poursuite de l'hibernation (particulièrement des conditions hydriques favorables) (Holenweg et Reyer, 2000) se traduisant par des besoins en énergie conséquents. A défaut de mettre en évidence des marqueurs d'exposition classiques en écotoxicologie, des perturbations du métabolisme glucidique sont mis en évidence de façon simple par des tests de tolérance au glucose. L'impact des HAP lourds sur le métabolisme glucidique des grenouilles vertes est clairement établi. De ce fait, il nous est apparu important de tester d'autres polluants retrouvés dans les zones humides afin de vérifier leur impact sur ce métabolisme. Nous avons donc exposé pendant 18 h des grenouilles vertes à un insecticide de la famille des phénylpyrazoles : le fipronil (interdiction juillet 2013 par la commission européenne), un composé pharmaceutique de la classe des anti inflammatoires non stéroïdiens, employé en médecine humaine pour ses propriétés analgésiques : l'ibuprofène, un composé organique utilisé comme matière première dans la fabrication des plastiques de type polycarbonate et des résines époxydes ainsi comme révélateur dans la fabrication des papiers thermiques, le bisphénol A (2015 la loi interdisant son utilisation pour les contenants alimentaires) et un agent antimicrobien organochloré le triclosan présent dans une grande variété de produits de consommation : savons, déodorants, cosmétiques et dentifrices. Les tests de gluco tolérance mettent en évidence des perturbations du métabolisme

du glucose pour le fipronil, le triclosan et l'ibuprofène. En revanche, le Bisphenol A ne semble pas altérer cette voie (Figure 62).

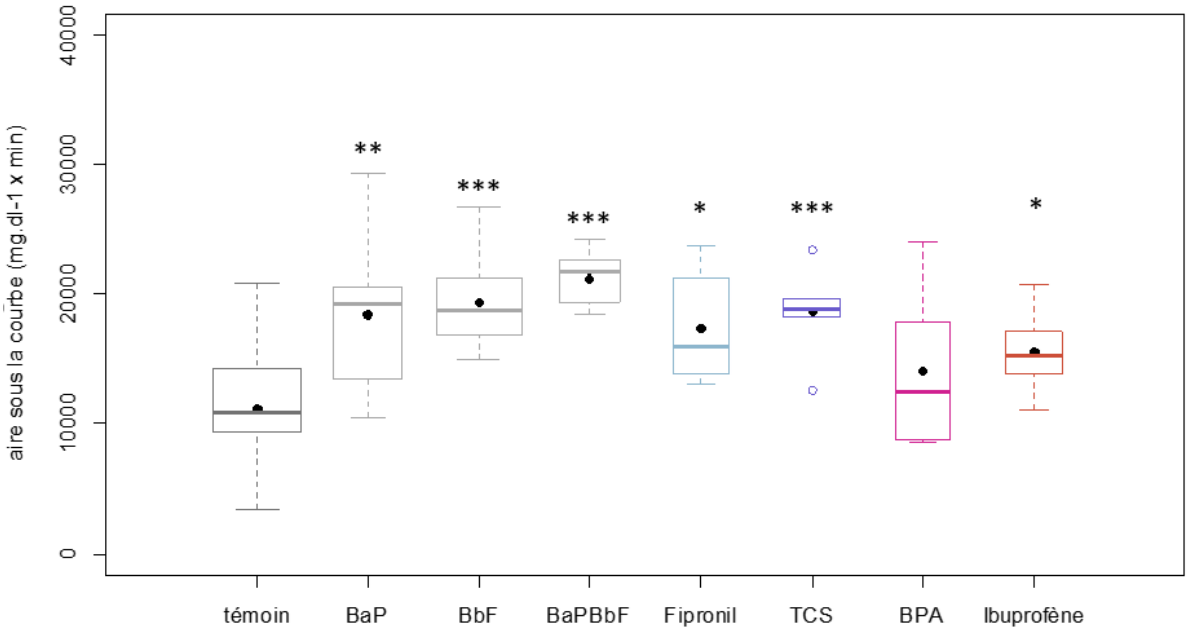


Figure 62 : Boxplot des aires sous les courbes obtenues lors du test ipGTT. Les données représentent les valeurs moyennes ± SE (n = 6). L'analyse statistique est réalisée en utilisant le test de* Wilcoxon (test non paramétrique*).

Ce défaut de régulation du glucose a été retrouvé chez une autre espèce d'amphibien *Xenopus tropicalis* femelle exposée depuis le stade têtard jusqu'au stade adulte mature à 50 ng.l^{-1} de triclosan ou de BaP (Regnault *et al* , 2017*, in prep*). De façon plus générale, il a été mis en évidence un syndrome métabolique chez ces animaux caractérisé entre autres par le syndrome de résistance au glucose, une stéatose hépatique, des dysfonctionnements des mitochondries hépatiques et une hypersécrétion pancréatique de l'insuline typique du stade prédiabétique… Ce défaut de régulation de glucose mis en évidence par les tests ipGTT témoigne-t-il, comme pour l'exposition des HAP, d'une activation de la voie de la néoglucogenèse ?

Les tests ipPTT montrent une forte variabilité de réponses qui ne permettent pas de mettre en évidence statistiquement une activation de la voie de la néoglucogenèse pour les différentes classes de polluants Figure 63. En outre, il semblerait que les animaux exposés à l'ibuprofène présentent une intolérance au glucose avec une tendance pour la stimulation de la voie de la néoglucogenèse comme les grenouilles exposées aux HAP. Il apparait que l'exposition à de nombreuses classes de xénobiotiques engendrent des désordres métaboliques notamment au niveau du maintien de l'homéostasie du glucose mais avec des origines différentes qui restent à élucider en fonction des différentes familles de polluants.

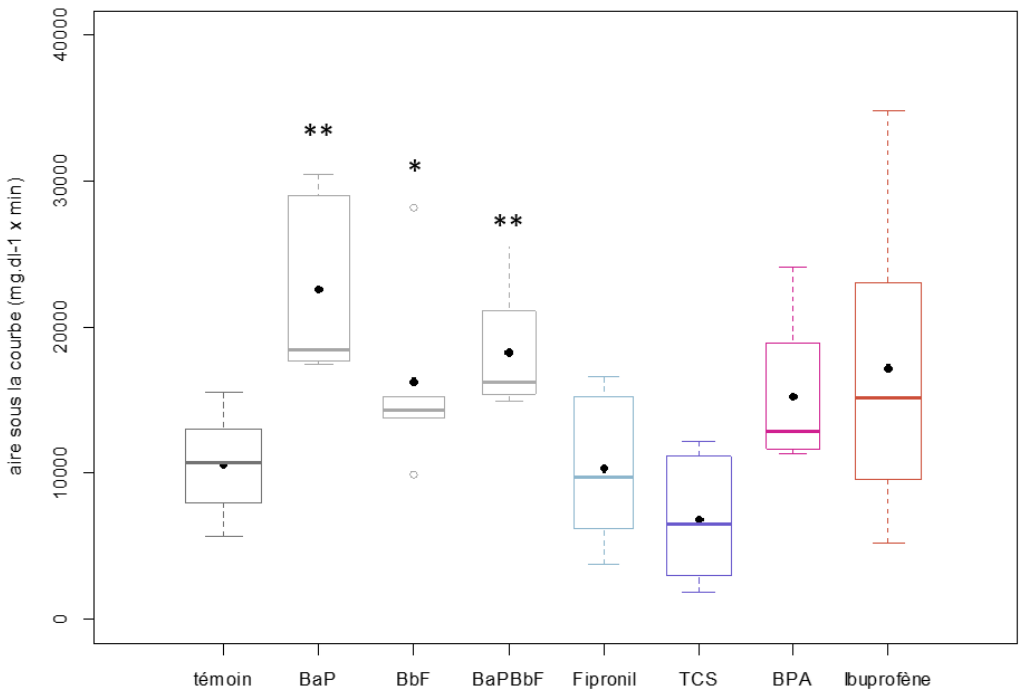


Figure 63 : Boxplot des aires sous les courbes obtenues lors du test ipPTT. Les données représentent les valeurs moyennes ± SE (n = 6).

V. Conclusion

Nos expérimentations confortées par la littérature mettent en évidence une pénétration via la peau, une métabolisation et une excrétion du BaP métabolisé relativement rapides. Cette métabolisation importante du BaP chez les grenouilles vertes se fait sans mettre en évidence un biomarqueur d'exposition couramment utilisé en milieu aquatique qui est l'induction des cytochromes P450. Cette absence ou faible induction observée des cytochromes P450 fait que les amphibiens et plus particulièrement les grenouilles vertes montrent une certaine résilience au BaP, ou plus généralement aux HAP. En effet les enzymes de phase I notamment les cytochromes P450 jouent un rôle majeur dans l'activation des HAP en les rendant génotoxiques (Figure 25). Par contre, l'impact du BbF sur la pénétration, la métabolisation et l'élimination du BaP a été observé sur les temps d'exposition courts particulièrement entre 12 et 48 heures. En effet, son influence a été mesurée dès la phase d'absorption, en montrant un temps d'absorption augmenté de 12 heures pour les grenouilles exposées au mélange. De plus la distribution du BaP au sein de l'organisme est également impactée puisqu'il a tendance à rester plus longtemps dans le sérum, se bioconcentrer de façon plus importante dans les corps jaunes et être plus précocement distribué dans l'intestin engendrant un temps d'exposition plus long dans cet organe et une recirculation du BaP et/ou ses métabolites dans l'organisme via le cycle entéro hépatique. *In fine*, au bout de 4 jours d'exposition, l'influence du BbF est peu observable puisque la concentration en métabolites polaires excrétés est similaire pour les 2 expositions avec une distribution du BaP et/ou ses métabolites semblables chez les grenouilles. La différence majeure dans le processus métabolique se situe au niveau de l'activité des P450 hépatique qui a tendance à être plus importante pour les grenouilles doublement exposées alors qu'elle est inhibée chez les grenouilles exposées seulement au BaP. Cette tendance à l'augmentation pourrait être due à un effet synergique ou additif des 2 HAP du mélange, avec une tendance à un effet inducteur du BbF sur les P450 hépatique. Par contre il est plus compliqué de comprendre la tendance à l'inhibition de l'activité P450 (exposition 12 et 48 heures) pour le BaP. L'impact du BbF doit être éclairci en essayant de mesurer sa pénétration, sa distribution ainsi que sa métabolisation chez des grenouilles exposées à cette seule molécule. De plus, il semble essentiel afin de comprendre les impacts de ses molécules d'identifier pour chaque exposition les différents métabolites engendrés et leur vitesse d'apparition.

L'impact hépatique ne se résume pas effectivement qu'aux enzymes de détoxication et il est de plus en plus montré qu'il existe un lien direct entre l'exposition aux polluants et l'impact sur le métabolisme au sens large. De façon simple, par la mise en place de test de gluco tolérance, nous avons montré des perturbations du métabolisme glucidique chez les individus sauvages exposés aux HAP que ce soit pour le BaP, le BbF et le mélange binaire sans pour autant montrer de différence entre les différentes expositions. De plus ce désordre métabolique observé est lié à une activation de la voie de la néoglucogenèse pour les différentes expositions montrée par les tests ipPTT. Les réponses métaboliques physiologiques globales (ipGTT, ipPTT) ont permis de mettre en évidence des désordres du métabolisme glucidique chez les grenouilles sauvages (homéostasie glucidique et néoglucogenèse) sans montrer de modifications de sensibilité à l'insuline. En revanche essayer de comprendre les mécanismes mis en jeu dans ces désordres a été fastidieux. Notamment, l'analyse des transcrits en qPCR a révélé de fortes variabilités interindividuelles. Connaître les espèces et les hybrides de ce complexe nous est apparu essentiel. En effet, le complexe *esculentus* est composé d'espèces parentes *P. ridibundus* de génotype RR et *P. lessonae* de génotype LL et de l'hybride qui peut être diploïde de génotype RL et triploïde de génotypes RRL et RLL. Nous nous sommes appuyés sur des études (Plötner *et al*, 2009 ; Hauswaldt *et al*, 2012) portant sur le polymorphisme de l'intron-1 du gène de l'albumine sérique des grenouilles vertes du paléarctique occidental. De plus l'analyse par PCR classique du polymorphisme de cet intron permet d'identifier clairement les espèces parentes et le type d'hybrides du complexe *esculentus*. (Hauswaldt *et al*, 2012). L'analyse des produits PCR nous a clairement montré que nous n'avions pas d'hybrides de génotypes RL, RRL

et RLL mais que nos individus appartenaient exclusivement à la lignée *bedriagae/ridibundus* (amplicons de 800-900 pb). Cette lignée regroupe une grande variété d'espèces. Le séquençage de ces différents amplicons a montré une diversité d'espèces présentes sur le bassin méditerranéen, ainsi que beaucoup de polymorphismes. En effet d'après l'analyse du gène de l'intron-1 de l'albumine sérique, les populations de grenouilles vertes sauvages que nous recevons semblent appartenir majoritairement à 3 espèces présentes sur les sites de pêche Turcs et Grecs : *P. cf bedriagae, P. epeiroticus, P. ridibundus* (Figure 61). Cette variabilité de réponse est étroitement liée au fait qu'au sein de nos différents arrivages, nous avons reçu différentes espèces appartenant à cette lignée *ridibundus* qui présente en plus du polymorphisme. Etudier par des méthodes de quantification précise, la transcription de gènes sur des espèces différentes semble compromis sans au préalable génotyper nos individus. De plus la plasticité phénotypique des populations de grenouilles est largement décrite afin de garantir une adaptation optimale aux conditions de l'habitat engendrant en plus une variabilité des réponses chez les individus de même espèce prélevés sur des sites différents (Laugen, et al., 2005) (Muir *et al*, 2014).

En parallèle, nous nous sommes intéressés particulièrement à un élevage de grenouilles vertes de l'INRA de Rennes afin de garantir la traçabilité des individus, de limiter les différents stress liés à l'importation, de limiter les variations génétiques et de contrôler l'alimentation. Ces populations de grenouilles d'élevage Rivan92 se sont regroupées en 3 taxons (Figure 61). Un taxon majoritaire composé de 5 individus (Rivan_C4, Rivan_BBF1, Rivan_C2, Rivan_BBF3, Rivan_BBF2) qui s'est regroupé avec l'espèce P. *kurtmuelleri* (Grèce). Ces populations de grenouilles Rivan92 présentent donc une variabilité génétique plus faible et des conditions d'élevage similaires (même pression de sélection). Cependant les réponses métaboliques nous montrent que ces grenouilles suivent un régime alimentaire trop enrichi en graisse ce qui impacte leur profil métabolique et masque les réponses qui pourraient être liées aux expositions de polluants. Ces grenouilles d'élevage ne présentent donc aucun avantage pour notre étude mettant en évidence des désordres métaboliques liés à l'exposition. En effet, elles sont intolérantes au glucose, présentent une activation de la voie de la néoglucogenèse et une résistance à l'insuline de façon constitutive.

L'observation d'une réponse globale sur des populations de grenouilles vertes sauvages avec des tests relativement simples (ipGTT, ipPTT et test à l'insuline) permettent de mettre en évidence des désordres métaboliques liés à l'exposition aux contaminants de l'environnement. L'exposition des grenouilles sauvages à différentes classes de xénobiotiques montre toute un défaut de régulation du glucose, excepté pour le plastifiant BPA. En revanche la voie de la néoglucogenèse ne semble pas être impactée par le TCS (antimicrobien) et le fipronil (insecticide) mais une tendance se dessine pour le BPA (plastifiant) et l'ibuprofène (anti inflammatoire).

Les tests doivent être poursuivis pour confirmer les tendances sur les populations de grenouilles vertes mâles, de même il serait intéressant de tester les populations de grenouilles vertes femelles.

Ces perturbations du métabolisme hépatique chez les grenouilles exposées remettent en question leur capacité de résilience vis-à-vis des HAP. En effet ces troubles observés, notamment de mise en réserve du glucose sous forme de glycogène pourraient impacter directement le métabolisme basal lors de l'hibernation et ainsi mettre en danger ces populations durant l'hiver, mais aussi les réserves dans les cellules germinales (spermatocytes et ovocytes) pouvant engendrer des perturbations au niveau de la reproduction.

VI. Références bibliographiques

Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse. (2013). *L'état des eaux des bassins Rhône-Méditerranée et de Corse : situation 2011*. rapport agence de l'eau RMC.

Aguilar, M., Bhuket, T., Torres, S., Liu, B., & Wong, R. (2015). Prevalence of the metabolic syndrome in the United States, 2003-2012. *Jama. Vol 313*, 1973-1974.

Akın , C., Bilgin, C., Beerli, P., Westaway, R., Ohst, T., Litvinchuk, S., . . . Plötner, J. (2010). Phylogeographic patterns of genetic diversity in eastern Mediterranean waterfrogs were determined by geological processes and climate change in the Late Cenozoic. *Journal of Biogeography. Vol 37*, 2111-2124.

Alfords, R., & Richards, S. (1999). Global Amphibian Declines: A Problem in Applied Ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics. Vol 30*, 133-165.

Amiard, J., & Amiard-Triquet, C. (2008). *Les Biomarqueuers dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques*. Paris: éditions TEC & DOC.

Amicarelli, F., Ragnelli, A., Aimola, P., Cattani, F., Bonfigli, A., Zarivi, O., & Di Ilio, C. (2001). Developmental expression and distribution of amphibian glutathione transferases. *Biochemica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. Vol 1526*, 77-85.

AMPHIBIAWEB. (2015, sept.). Récupéré sur amphibian species lists: http://amphibiaweb.org/

Anderson, S., Döös, J., & Rose, F. (1982). Differential ability of Ambystoma tigrinum hepatic microsome to produce mutagenic metabolites from polycyclic aromatic hydrocarbons and aromatic amines. *Cancer letters. Vol 16*, 33-41.

Angelucci, S., Sacchetta, P., De Luca, A., Moio, P., Amicarelli, F., & Di Ilio, C. (2002). Glutathione transferase isoenzymes from frog (Xenopus laevis) liver and embryo. *Biochemica et biophysica Acta. Vol 1569*, 81-85.

Anisimova, M., & Gascuel, O. (2006). Approximate likelihood ratio test for branch: A fast, accurate and powerful alternative. *Systematic biology. Vol 55*, 539-552.

Arand, M., Cronin, A., Adamska, M., & Oesch, F. (2005). Epoxide Hydrolases: Structure, Function, Mechanism and Assay. *Methods in Enzymology. Vol 400*, 569-588.

Araño, B., Llorente, G., Garcia-Paris, M., & Herrero, P. (1995). Species translocation menaces Iberian waterfrogs. *Conservation Biology*, 196-198.

Arioli, M., Jakob, C., & Reyer, H. (2010). Genetic diversity in water frog hybrids (pelophylax esculentus) varies with population structure and geographic location. *Molecular Ecology. Vol 19*, 1814-1828.

Arnold, N., & Ovenden, D. (2014). *Le guide herpéto : 228 amphibiens et reptiles d'Europe*. Delachaux et Niestlé.

Auvray, G., Kapusta, G., Malécot, V., & Macquaire-Le-Pocreau, N. (2009). Polymorphic ITS as a tool to identify hybrids and their parents in cultivated genisteae (fabaceae). *in XXIII International Eucarpia Symposium, section Ornementals: Colourful Breeding an Genetics 836*, 91-96.

Baillie, J., Hilton-Taylor, C., & Stuart, S. (2004). *2004 IUCN Red List of Threatened Species: Aglobal Species Assessment*. Cambridge: The IUCN Species Survival Commission.

Ball, A., & Truskewycz, A. (2013). Polyaromatic hydrocarbon exposure: an ecological impact ambiguity. *Environmental Sciences pollution Res. Vol 20*, 4311-4326.

Barber, J., Thomas, G., Kerstiens, G., & Jones, K. (2004). Current issues and incertainties in the measurement and modelling of air-vegetation exchange and within-plant processing of POPs. *Environmental Pollution. Vol 128*, 99-138.

Barnosky, A., Matzke, N., Tomiya, S., Wogan, G., Swartz, B., Quental, T., . . . Ferrer, E. (2011). Has the Earth's sixth mass extinction already arrived ? *Nature. Vol 471*, 51-57.

Barouki, R., & Borel, Y. (2001). Represssion of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications. *Biochemical Pharmacology. Vol 61*, 511-516.

Bello, S., Franks, D., Stegeman, J., & Hahn, M. (2001). Acquired resistance to Ah receptor agonists in a population of Atlantic killifish (fundulus heteroclitus) inhabiting a marine superfund site: in vivo an in vitro studies on the inducibility of xenobiotic metabolizing enzymes. *Toxicological Sciences. Vol 60*, 77-91.

Berger, L. (1968). Morphology of the F1 generation of various crosses within Rana esculenta-complex. *Acta Zoologica Cracoviensia 13*, 301–324.

Berger, L. (1973). Systematics and hybridization in European green frogs of rana esculenta complex. *Journal of Herpetology*, 1-10.

Berger, L. (1988). Principles of studies of European w. *Acta. Zool. Cracov.Vol 31*, 563-580.

Bernhardt, R. (2006). Cytochromes P450 a versatile biocatalysts. *Journal of Biotechnology. Vol 124*, 128-145.

Beukeboom, L., & Vrijenhoeck, R. (1998). Evolutionary genetics and ecology of sperm-dependent parthenogenesis. *Journal of Evolutionary Biology. Vol 11*, 755-782.

Bishop, P., Angulo, A., Lewis, J., Moore, R., Rabb, G., & Garcia Moreno, J. (2012). The Amphibian Extinction Crisis-What will it take to put the action into the Amphibian Conservation Action Plan. *IUCN Commissions. Vol 5 n°2*, 97-110.

Bizzotto, E., Villa, S., & Vighi, M. (2009). POP bioaccumulation in macroinvertebrates of alpine freshwater systems. *Environmental pollution. Vol 157*, 3192-3198.

Blain, H., Lozano-Fernandez, I., & Böhme, G. (2015). Variation in the ilium of central European water frog (Amphibia, Ranidae) and its implications for species-level identification of fragmentary anuran fossils. *Zoological Studies*.

Bodnar, E., & Hlavay, J. (2005). Atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons on the lake Balaton. *Microchemical Journal. Vol 79*, 213-220.

Bodnar, E., Hlavay, J., & Abonyi, J. (2004). Distribution of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediment of lake Balaton, Hungary. *Polycyclic Aromatic Compounds. Vol 4*, 797-803.

Bouloubassi, I., Méjanelle, L., Pete, R., Fillaux, J., Lorre, A., & Point, V. (2006). PAH transport by sinking particles in the open Mediterranean Sera: A 1 year sediment trap study. *Marine Pollution Bulletin. Vol 52*, 560-571.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical biochemistry. Vol 72*, 248-254.

Brooks, G., Baldwin, K., & Fahey, T. (2005). Glycogenolysis and glycolysis in muscle: the cellular degradation of sugar and carbohydrate to pyruvate and lactate. *Exercise Physiology: Human Bioenergetics and its Applications*, 59-93.

Bruscalupi, G., Castellano, F., Scapin, S., & Trentalance, A. (1989). Cholesterol metabolism in frog (Rana esculenta) liver : seasonal and sex-related variations. *Lipids. Vol 24*, 105-108.

Bucciarelli, T., Sacchetta, P., Amicarelli, F., Petruzzelli, R., Melino, S., Rotilio, D., & Di Ilio, C. (2002). Amino acid of the major form of toad liver gluthatione transferase. *The international journal of biochelmistry and cell biology. Vol 34*, 1286-1290.

Burke, M., & Mayer, R. (1974). Ethoxyresorufin direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metabolism and Disposition. Vol 2*, 583-588.

Byrne, J., & White, R. (1975). Cyclic changes in liver and muscle glycogen tissue lipid and blood glucose in a naturally occurring population of Rana castesbeiana. Comparative Biochemistry and physiology. Part A. *Physiology. Vol 50*, 709-715.

Camatini, M., Bonfanti, P., Colombo, A., & Urani, C. (1998). Cellular and Molecular Targets of Benzo [a] pyrene and Metal Toxicity in Xenopus laevis Embryos and in Hep G2 Cells. *Alternatives to laboratory animals: ATLA,. Vol 27*, 325-337.

Canaestrelli, D., & Nascetti, G. (2008). Phylogeography of the pool frog Rana (Pelophylax) lessonae in the Italian peninsula and sicily: multiple refugia, glacial expansions and nuclear-mitochondrial discordance. *Journal of Biogeography. Vol 35*, 1923-1936.

Carletti, E., De Luca, A., Urbani, A., Sacchetta, P., & Di Ilio, C. (2003). sigma-class glutathione transferase from Xenopus laevis: molecular cloning, expression, and site-directed mutagenesis. *Archives of biochemistry and biophysics. Vol 419*, 214-221.

Carmona, J., Sanjur, O., Doadrio, I., Machordom, A., & Vrijenhoeck, R. (1997). Hybridogenetic reproduction and maternal ancestry of polyploid Iberian fish: the Tropidophoxinellus alburnoides complex. *Genetics. Vol 146*, 983-993.

Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their usi in phylogenetic analysis. *Molecular biology and evolution. Vol 17*, 540-552.

Ceballos, G., Ehrlich, P., & Dirzo, R. (2017). Biological annhilation via the ongoing sixth mass extinction signaled by vertebrate population losses and declines. *Proceedings of the National Academy of sciences. Vol 114*, E6089-E6096.

Ceballos, G., Garcia, A., & Ehrlich, P. (2010). The Sixth Extinction Crisis Loss of Animal Populations and Species. *Journal of cosmology. Vol 8*.

Chanson, J., Hoffmann, M., Cox, N., & Stuart, S. (2008). The state of the world's amphibians. *Threatened amphibians of the world*, 33-52.

Chefetz, B., Deshmukh, A., Hatcher, P., & Guthrie, E. (2000). Pyrene sorption by natural organic matter. *Environmental Science & Technology. Vol 34*, 2925-2930.

Chevenet, F., Brun, C., Banuls, A., Jacq, B., & Christen, R. (2006). TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC bioinformatics. Vol 7*, 439.

Christiansen, D. (2009a). Gamete types, sex determination and stable equilibria of all-hybrid populations of diploid and triploid edible frogs Pelophylax. *BMC Evolutionary Biology.Vol 9*, 135.

Christiansen, D., & Reyer, H. (2009b). From clonal to sexual hybrids : genetic recombination via triploids in all-hybrids populations of water frogs. *Evolution*, 1754-1768.

CITEPA. (2016, janvier). *http://www.citepa.org/fr/air-et-climat/polluants/polluant-organiques-persistants/hydrocarbures-aromatiques-polycycliques*. Récupéré sur CITEPA Centre Interprofessionnel Techniques d'Etudes sur la Pollution Atmosphérique: http://www.citepa.org/fr

Clément, M. (2005). *Les maladies infectieuses et parasitaires des amphibiens.* Faculté de médecine de Créteil.

Colombo, A., Bonfanti, P., & Camatini, M. (2003). Differential modulation of cytochrome P-450 1A and P-glycoprotein expression by aryl hy-drocarbon receptor agonists and thyroid hormone in Xenopus laevis liver and intestine. . *Aquatic toxicology, Vol 63*, 173-186.

Conlon, J., Yano, K., Vaudry, H., & Storey, K. (1998). Freeze tolerance in the wood frog Rana Sylvatical is associated with unusual structural features in insulin not in glucagon. *Journal Of molecular Endocrinology. Vol 21*, 153-159.

Corrales, J., Thornton, C., White, M., & Willett, K. (2014). Multigenerational effects of benzo [a] pyrene exposure on survival and developmental deformities in zebrafish larvae. *Aquatic toxicology. Vol148*, 16-26.

Cox, N., Chanson, J., & Stuart, S. (2006). *The Status and Distribution of Reptiles and Amphibians of the Mediterranean Basin.* Switzerland and Cambridge, UK: world Conservation Union (IUCN), Gland.

Crawshaw, G., & Weinkle, T. (2000). Clinical and dpathological aspects of the amphibian liver. *In Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine. Vol9.WB Saunders*, 165-173.

Delhomme, O., Rieb, E., & Millet, M. (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbons analyzed in rain water collected on two sites in east of France (Strasbourg and Erstein). *Polycyclic aromatic compounds. Vol 28*, 472-485.

Derreper, A., Audic, S., Claverie, J., & Blanc, G. (2010). BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC Evolutionary Biology. Vol 10*, 8.

Derreper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., . . . Gascuel, O. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic acids research. Vol 36*, 465-469.

Djomo, J., Ferrier, V., Gauthier, L., Zoll-Moreux, C., & Marty, J. (1995). Amphibian micronucleus test in vivo: evaluation of the genotoxicity of some major polycyclic aromatic hydrocarbons found in a crude oil. *Mutagenesis. Vol 10*, 223-226.

Dubey, S., Leuenberger, J., & Perrin, N. (2014). Multiple origins of invasive and 'native' water frogs (Pelophylax spp.) in Switzerland. *Biological Journal of the Linnean Society. Vol 112*, 442-449.

Dubois, A. (1998). Lists of European species of amphibians and reptiles: will we soon be reaching "stability"? *Amphibia-Reptilia Vol 19, Issue 1*, 1 – 28.

Dubois, A., & Lacouture, L. (2011). Bilan de Présence de Micropolluants dans les milieux aquatiques Continentaux: Période 2007-2009.Rapport n°54. *Etude & Documents du Commissariat général du développement durable*, 56p.

Dubois, A., & Ohler, A. (1997). Early scientific names of amphibia Anura. I Introduction. *Bulletin of the Museum natural History Vol 18*, 320-397.

Dziewulska-Szwajkowska, d., Łozińska-Gabska, M., & Dżugaj, A. (1997). Rana esculenta L. Liver Fru-1, 6-P2ase and G-6-Pase activity and Fru-2, 6-P2 concentration after ac-climation at 5 and 25 °C. . *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology.Vol 118*, 745-751.

Dziewulska-Szwajkowska, D., & Dżugaj, A. (1999). Regulatory properties of Rana esculenta liver D-fructose-1, 6-bisphosphate 1-phosphohydrolase and their comparison with properties of other vertebrate liver isoenzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and molecular Biology. Vol 122*, 241-251.

Edgar, R. (2004). MUSCLE: multiple alignment with hifh accuracy and high throughput. *Nucleic acids research. Vol 32*, 1792-1797.

Eisler, R. (1987). Polycycyclic aromatic hydrocarbon hazardds to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. *Us fish and wildlife service biological report. Vol 85*, 81.

Elskus, A. (2005). The implications of low-affinity AhR for TCDD insensitivity in frogs. *Toxicological Sciences. Vol 88*, 1-3.

Ertl, R., & Winston, G. (1998). The microsomal mixed function oxidase system of amphibians and reptiles: components, activities and induction. *Comparative Biochemistry and Physiology. Vol 121*, 85-105.

Federow, C., Churchill, T., & Kneteman, N. (1998). Effects of hypothermic hypoxia on anaerobic energy metabolism in isolated anuran livers. *Journal of Comparative Physiology B. Vol 168*, 555-561.

Feng, J., Hu, P., Li, X., Liu, S., & Sun, J. (2016). Ecological and Health isk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Surface Waters from Middle and lower Reaches of the Yellow River. *Polycyclic Aromatic Compounds. Vol 36*, 656-670.

Feng, Z., Ji, L., Shi, W., & Xia, X. (2007). Seasonal changes of the glycogen content in Bufo gargarizans. *Acta Zool Sline*, 1048-1053.

Fernandez, M., & L'Haridon, J. (1992). Influence of lightning condi-tions on toxicity and genotoxicity of various PAH in the newt in vivo. *Mutation Research/Genetic Toxicology. Vol 298*, 31-41.

Fernandez, M., & L'Haridon, J. (1994). Effects of light on the cytotoxicity and genotoxicity of benzo (a) pyrene and an oil refinery effluent in the newt. *Environmental and molecular mutagenesis. Vol 24*, 124-136.

Fernandez, M., Sicre, M., Boireau, A., & Tronczynski, J. (1997). Polyaromatic hydrocarbon (PAH) distributions in the Seine River and its estuary. *marine Pollution Bulletin. Vol 34*, 857-867.

Fernandez-Salguero, P., Hilbert, D., Rudikoff, S., Ward, J., & Gonzales, F. (1996). Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicology and applied pharmacology. Vol 140*, 173-179.

Fitzpatrick, L. (1976). Life history patterns of storage and utilization of lipids for energy in amphibians. *American Zoologist. Vol 16*, 725-732.

Fort, D., James, B., & Bantle, J. (1989). Evaluation of the developmental toxicity of five compounds with the frog embryo terato-genesis assay: Xenopus (FETAX) and a metabolic activation system. *Journal of applied toxi-cology.Vol 9.*, 377-388.

Fredslund, J., Schausser, L., Madsen, L., Sandal, N., & Strougaard, J. (2005). PriFi: using a multiple alignement of related sequences to find primers for amplification of homologs. *Nucleic acids research. Vol 33 (suppl 2)*, 516-520.

Fried, K., Guo, G., Esterly, N., Kong, B., & Rozman, K. (2010). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) reverses hyperglycemia in a type II diabetes mellitus rat model by a mechanism unrelated to PPAR . *Drug and Chemical Toxicology. Vol 33*, 261-268.

Frost, D., Grant, T., Faivovitch, J., Brain, R., Haas, A., Haddad, C., . . . Wheeler, W. (2006). The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History 297*, 8-370.

Fujita, Y., Ohi, H., Murayama, N., Saguchi, K., & Higuchi, S. (1999). Molecular cloning ans sequence analysis of cDNAs coding or 3-methylcholanthrene-inductible cytiochrome P450 in Xenopus laevis liver. *Archives of biochemistry and biophysics. Vol 371*, 24-28.

Garner, T., Gautschi, B., Röthlisberger, S., & Reyer, H. (2000). A set of CA repeat microsatellite markers derived from the pool frog, Rana lessonae. *Molecular Ecology. Vol 9*, 2173-2175.

Gaskill, S., & Bruce, E. (2016). Binary mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons display nonadditive mixture interactions in an in vitro liver cell model. *Risk analysis. Vol 36*, 968-991.

Gasperi, J., Garnaud, S., Rocher, V., & Moilleron, R. (2009). Priority pollutants in surface waters and settleable particles within a densely urbanised area: Case study of Paris (France). *Science of the Total Environment. Vol 407*, 2900-2908.

Gelboin, H. (1980). Benzo [alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed_function oxidases and related enzymes. *Physiological reviews. Vol 60*, 1107-1166.

Gonzales, A., Merino, B., Marroqui, L., Neco, P., Alonso-Magdalena, P., Caballero-Garrido, E., . . . Quesada, I. (2013). IInsulin hypersecretion in islets from diet-induced hyperinsulinemic obese female mice is associated with several functional adaptations in individual β-cells. *Endocrinology. Vol 154*, 3515-3524.

Gösner, K. (1960). A simplified Table Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. *Herpetologica, Vol 16, No. 3*, 183-190.

Götz, R., Bauer, O., Friesel, P., & Roch, K. (1998). Organic trace compounds in the water of the River Elbe near Hamburg part II. *Chemosphere. Vol 36*, 2103-2118.

Graf, J., & Polls Pelaz, M. (1989). Evolutionary genetics of Rana esculenta complex. *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates* , 289-302.

Grimal, F. (2014). Statut du complexe des grenouilles vertes Pelophylax sp. sur l'Étang de Berre (Bouches-du-Rhône). *LPO PACA, Faune-PACA publication n°48*, 1-39.

Guex, G., Hotz, H., & Semlitsch, R. (2002). Deleterious alleles and différential viability in progeny of natural hemiclonal frogs. *Evolution. Vol 56*, 1036-1044.

Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology. Vol 52*, 696-703.

Günther, R. (1997). *Rana lessonae Camerano,1882 : Atlas of amphibians and reptiles in Europe.* paris, Societas Europaea Herpetologica and Museum National d'Histoire Naturelle: Gasc, J.-P., A. Cabela, J. Crnobrnja-Isailovic, D. Dolmen, K. Grossenbacher, P. Haffner, J. Lescure, H. Martens, J. P. Martínez Rica, H. Maurin, M. E. Oliveira, T. S. Sofianidou, M. Veith, and A. Zuiderwijk eds.

Günther, R., Uzzell, T., & Berger, L. (1979). Inheritance pattern in triploid "Rana Esculenta" (Amphibia Salientia). *Akad-Vert*, 35-57.

Gutiérrez-Valencia, T., & de Llasera, M. (2017). On-linr MSPD-SPE-HPLC/FLD analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in bovine tissues. *Food Chemistry. Vol 223*, 82-88.

Guyétant, R. (1986). Les amphibiens de France. *revue française d'aquariologie.*

Hanke, W., & Neumann, U. (1972). Carbohydrate Metabolism in Amphibia. *General ans comparative endocrinology supplement. Vol3*, 198-208.

Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K., & Bernhardt, R. (2007). Cytochrome P450 systems - biological variations of electron transport chains. *Biochemica et Biophysica Acta. Vol 1770*, 330-344.

Hanson, R., & Reshef, L. (1997). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annual review of biochemistry. Vol 66*, 581-611.

Haslam, I., Roubos, E., Mangoni, M., Yoshizato, K., Vaudry, H., Kloepper, J., . . . Paus, R. (2014). From frog integument to human skin: dermatological perspectives from frog skin biology. *Biological Reviews. Vol89*, 618-655.

Hauswaldt, J., Höer, M., Ogielska, M., Christiansen, D., Dziewulska-szwajkowska, D., Czernicka, E., & Vences, M. (2012). A simplified molecular method for distinguishing among species and ploidy in European water frogs (Pelophylax). *Molecular Ecology Resources. Vol 12*, 797-805.

Hayes, T., Anderson, L., Beasley, V., De Solla, S., Iguchi, T., Ingraham, H., & Luque, E. (2011). Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: consistent effcts across vertebrate classes. *The Journal of Streroid biochemistry. Vol 127*, 34-73.

Hayes, T., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., . . . Tsui, M. (2006). Pesticides mixture, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact. *Enviroment Health perspectives. Vol 114*, 40-50.

Hayes, T., Falso, P., Gallipeau, S., & Stice, M. (2010). The cause of global declines: a developmental endocrinologist's perspective. *The Journal of Experimental Biology. Vol 213*, 921-933.

Heppich, S. (1978). Hybridogenesis in Rana esculenta: C-band karyotypes of Rana ridibunda, Rana lessonae and Rana esculenta. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research.Vol 16*, 27-39.

Herzig, S., Long, F., Jhala, U., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., & Spielgelman, B. (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature.Vol 413*, 179-183.

Hoffmann, A., Plötner, J., Pruvost, N., Christiansen, D., Röthlisberger, S., Choleva, L., . . . Reyer, H. (2015). Genetic diversity and distribution patterns of diploid and polyploid hybrid water frog populations (pelophylax esculentus complex) across Europe. *Molecular Ecology*, 4371-4391.

Höhn-Bentz, J., Kurelec, B., & Zahn, R. (1983). Fast ephemeral DNA damage upon BβP injection. *Science of the total environment.Vol 32*, 13-27.

Holenweg, A., & Reyer, H. (2000). Hibernation behavior of Rana lessonae and R.esculenta in their natural habitat. *Oecologia. Vol 123*, 41-47.

Holsbeek, G., & Jooris, R. (2010). Potential impact of genome exclusion by alien species in the hybridogenetic water frogs (pelophylax esculentus complex). *Biol Invasions. Vol 12*, 1-13.

Holsbeek, G., Maes, G., De Meester, L., & Volckaert, F. (2009). Blackwell Publishing Ltd Conservation of the introgressed European water frog. *Molecular Ecology.Vol 18*, 1071-1087.

Holsbeek, G., Mergeay, J., Hotz, H., Plötner, J., Volckaert, F., & De Meester, L. (2008). A cryptic invasion within an invasion and widespread introgression in the European water frog complex: consequences of uncontrolled commercial trade and weak international legislation. *Molecular Ecology. Vol 17*, 5023-5035.

Hotz, H., Beerli, P., Uzzell, T., Guex, G., Pruvost, N., Schreiber, R., & Plötner, J. (2014). Balancing a cline by influx of migrants: A genetic transition in water frogs of Eastern Greece. *Journal of heredity. Vol 20*, 57-70.

Hotz, H., Uzzell, T., Guex, G., Alpers, D., Semlitsch, R., & Beerli, P. (2001). Microsatellites: a tool for evolutionary genetic studies of western Palearctic watre frogs. *Mitteilungen aus dem museum für Naturkunde in Berlin. Vol 77*, 43-50.

Huang, Y., Stegeman, J., Woodin, B., & Karasov, W. (2001). Immunohistochemical localization of cytochrome P450A1 induced by 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) in multiple organs of northern leopard frogs, rana pipiens. *Environmental Toxicology and Chemistry. Vol 20*, 191-197.

Hung, H., MacLeod, M., Guardans, R., Scheringer, M., Barra, R., Harner, T., & Zhang, G. (2013). Toward the next generation of air quality monitoring: Persistent organic polutants. *Atmospheric Environment. Vol 80*, 591-598.

Hylland, k. (2006). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems. *Journal of Toxicology, Part A. Vol 69*, 109-123.

IARC. (1973). *Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds.* Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans. *Vol 3,* 1-271.

IARC. (1983). *Polynuclear aromatic compounds, Part 1, chemical, environmental and experimental data.* Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans. *Vol 32*, 1-453.

IARC. (2010). *Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures.* Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans. *Vol 92*, 1-853.

Ifegwu, O., & Anyakora, C. (2015). Chapter Six - Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: PartI. Exposure. *Advances in clinical chemistry. Vol 72*, 277-304.

INERIS. (2005). *Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques: le Benzo|b]fluoranthène.* INERIS.

INERIS. (2006). *Fiche de données toxicologiques et envrironnementales des substances chimiques: le benzo[a]pyrène.* INERIS.

Iwamoto, D., Kurylo, C., Schorling, K., & Powell, W. (2012). Induction of cytochrome P450 family mRNAs and activities in a cell line from the frog Xenopus laevis. *Aquatic Toxicology. Vol 114-115*, 165-1172.

Iyanagi, T. (2007). Molecular mechanism of Phase I and Phase II Drug Metabolizing Enzymes: Implications for Detoxification. *International review of cytology. Vol 260*, 35-112.

Jaacks, L., & Staimez, L. (2015). Association of persistent organic pollutants and non-persistent pesticides with diabetes and diabetes-releted health outcomes in Asia: a systelic review. *Environment international. Vol 76*, 57-70.

Jakobi, G., Kirchner, M., Henkelmann, B., Körner, W., Offenthaler, I., Moche, W., & Schramm, K. (2015). Atmospheric bulk deposition measurements of organochlorine pesticides at three alpine summits. *Atmospheric Environment. Vol 101*, 158-165.

Jandacek, R., & Tso, P. (2001). Factors affecting the storage and excretion of toxic lipophilic xenobiotics. *lipids.Vol 36*, 1289.

Jaylet, A., Deparis, P., & Gaschignard, D. (1986). Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of axolotl larvae following in vivo expo-sure to mutagenic agents. *Mutagenesis. Vol 1.*, 211-215.

Jitrapakdee, S. (2012). Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology. Vol 44*, 33-45.

Joner, E., Corgie, S., Amellal, N., & Leyval, C. (2002). Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry. Vol 34*, 859-864.

Jönsson, M., Berg, C., Goldstone, J., & Stegeman, J. (2011). New CYP1 in the frog Xenopus (silurana) tropicalis: induction patterns and effects of AHR agonists during development. *Toxicology and Applied Pharmacology. Vol 250*, 170-183.

Joseph, N., Krauskopf, E., Vera, M., & Michot, B. (1999). Ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) exhibits a common core of secondary structure in vertebrates and yeast. *Nucleic Acids research. Vol 27*, 4533-4540.

Kassi, E., Pervanidou, P., Kaltsas, G., & Chrousos, G. (2011). Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC medicine. Vol 9*, 48.

Katayama, A., Bhula, R., Burns, G., Carazo, E., Felsot, A., Hamilton, D., & Linders, J. (2010). *Bioavailability of xenobiotics in the soil environmnt. In reviewq of environmental contamination and toxicology.* New York: Springer.

Kim, A., Park, M., Yoon, T., Lee, W., Ko, J., & Bae, J. (2011). Maternal exposure to benzo [b] fluoranthene disturbs reproductive performance in male offspring mice. *Toxicology letters. Vol203*, 54-61.

Klingenberg, M. (1958). Pigments of rat liver micrososmes. *Archives of biochemistry and biophysics. Vol 75*, 376-386.

Landman, C., & Quevrain, E. (2016). Le microbiote intestinal: description, rôle et implication physiopathologique. *la revue de Médecine Interne. Vol 37*, 418-423.

Laugen, A., Kruuk, L., Laurila, A., Räsänen, K., Stone, J., & Merilä, J. (2005). Quantitative genetics of larval life-history traits in Rana temporaria in differnt environmental conditions. *Genetics Research.*161-170.

Lavine, J., Rowatt, A., Klimova, T., Whitington, A., Dengler, E., Beck, C., & Powell, W. (2005). Aryl Hydrocarbon Receptors in the frog Xenopus Laevis: Two AhR1 paralogs exhibit low affinity for 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD°. *Toxicological Sciences. Vol 88*, 60-72.

Le Dû Lacoste, M. (2008). *Etude des phénomènes de biotransformation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) par les organismes aquatiques (poissons): relation exposition-génotoxicité.* Bordeaux I: Doctoral Dissertation.

Lee, D., Porta, M., Jacobs Jr, D., & Vanderberg, L. (2014). Chlorinated persistent organic pollutants obesity, and type 2 diabetes. *Endocrine reviews. Vol 35*, 557-601.

Leney, J., Balkwill, K., Drouillard, K., & Haffner, G. (2006). Detremination of polychlorinated biphenyl and polycyclic aromatic hydrocarbon elimination rates in adult green and leopard frogs. *Environmental toxicology and chemistry. Vol 25*, 1627-1634.

Leuenberger, J., Gander, A., Schmidt, B., & Perrin, N. (2014). Are invasive marsh frogs (Pelophylax ridibundus) replacing the native P.lessonae/P.esculentus hybridogenetic complex in Wester Europe? Genetic evidence from field study. *Conservation Genetics. Vol 15*, 869-878.

Levine, W. (1978). Biliary excretion of drugs an other xenobiotics. *Annual Reviews Pharmacology Toxicology. Vol 18*, 81-96.

Liang, H., & Ward, W. (2006). PCG-1α: a key regulator of energy metabolism. *Advances in Physiology Education. Vol 30*, 145-151.

Liu, S., Liu, X., Liu, M., Yang, B., Cheng, L., Li, Y., & Qadeer, A. (2016). Levels, sources and risk assessment of PAHs in multi-phases from urbanized river network system in Shanghai. *Environmental Pollution. Vol 219*, 555-567.

Lodé, T., & Pagano, A. (2000). Variations in call and morphology in male water frogs: taxonomic and evolutionary implications. *Life Sciences.Vol 323*, 995-1001.

Lukanov, S., Tzankov, N., & Simeonovska-Nikolova, D. (2013). A comparative study of the mating call of Pelophylax Ridibunda and Pelophylax Kurtmuelleri from syntopic and allotopic population. *Journal of Natural History. Vol 49.*, 257-272.

Luo, X., Mai, B., Yang, Q., Fu, J., Sheng, G., & Wang, Z. (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organochlorine pesticides in water columns from the Pearl River and the Macao harbor in the Pearl River Delta in south China. *Marine Pollution Bulletin. Vol 48*, 1102-1115.

Lyche, J., Nourizadeh-Lilladi, R., Karlsoson, C., Stavik, B., Berg, V., Skåre, J., & Ropstad, E. (2011). Natural mixture of POPs affected body weight and induced transcription of genes involved in weight regulation and insulin signaling. *Aquatic Toxicology. Vol 102*, 197-204.

Lymberakis, P., Poulakakis, N., Manthalou, G., Tsigenopoulos, C., Magoulas, A., & Mylonas, M. (2007). Mitochondrial phylogeography of Rana (Pelophylax) populations in the Eastern Mediterranean region. *molecular Phylogenetics Evolution. Vol 44*, 115-125.

Mackay, D., Shiu, W., Ma, K., & Lee, S. (2006). *second Edition: Handbook Physical-chemical properties and Environmental fate for organic chemicals.* Boca Raton (Floride) US: CRC press.

Manoli, E., Samara, C., Konstantinou, L., & Albanis, T. (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the bulk precipitation and surface waters of Northern Greece. *Chemosphere. Vol 41*, 1845-1855.

Mansuy, D. (1998). The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Pharmacology, Toxicology and Endocrinology. Vol 121*, 5-14.

Mantovani, B., & Scali, V. (1992). Hybridogenesis and androgenesis in the stick_insect Bacillus rossius-grandii benazzii (Insecta, Phasmatodea). *Evolution*, 783-796.

Markovitch, D. (2001). Physiological roles and regulation of mammalian sulfate transporters. *Physiological reviews. Vol 81*, 1499-1533.

Marquis, O., Miaud, C., Ficetola, G., Bocher, A., Moucher, F., Guittonneau, S., & Devaus, A. (2009). Variation in genotoxic stress tolerance among frog populations exposed to UV and pollutant gradients. *Aquatic Toxicology. Vol 95*, 152-161.

Martini, F., Fernandez, C., Tarazona, J., & Pablos, M. (2012). Gene expression of heat shock protein 70, interleukin-1β and tumor necrosis factor α as tools to identify immunotoxic effects on Xenopus laevis: A dose–response study with benzo [a] pyrene and its degradation products. *Environmental pollution. Vol 160*, 28-33.

Martins, M., Santos, J., Diniz, M., Ferreira, A., Costa, M., & Costa, P. (2015). Effects of carcinogenic versus non-carcinogenis AHR-active PAHs and their mixtures: lessons from ecological relevance. *Environmental Research. Vol 138*, 101-111.

Marty, J., Lesca, P., Jaylet, A., Ardourel, C., & Riviere, J. (1989). In vivo and in vitro metabolism of benzo (a) pyrene by the larva of the newt, Peurodeles waltl. Comparative Biochemistry and Physiology Part C:. *Comparative Pharmacology. Vol 93.*, 213-219.

Marty, J., Michel, X., Narbonne, J., & Ferrier, V. (1995). In vivo metabolism of benzo (a) pyrene in a lower vertebrate, the newt Pleurodeles walt. *Ecotoxicology and environmental safety. Vol 32*, 51-57.

Mason, A., & Pires, J. (2015). Unreduced gametes: meiotic mishap or evolutionary mechanism? *Trends in Genetics. Vol 31*, 5-10.

Melvin, S., Habener, L., Leush, F., & Caroll, A. (2017). 1H NMR-based metabolomlics reveals sub-lethal toxicity of a mixture of diabetic and lipid-regulating pharmaceuticals on amphibian larvae. *Aquatic Toxicology. Vol 184*, 123-132.

Miaud, C., & Muratet, J. (2004). *Identifier les oeufs et les larves des amphibiens de France.* Paris: INRA.

Mikulicek, P., Kautman, M., Demovic, B., & Janko, K. (2014). When a clonal genome finds its way back to a sexual species: evidence from ongoing but rare introgression in the hybridogenetic water frog complex. *Journal of Evolutionary Biology. Vol 27*, 628-642.

Mikulicek, P., Kautman, M., Kautman, J., & Pruvost, N. (2014). Mode of hybridigenesis and habitat preferences influence population composition of water frogs (Pelophylax esculentus complex, Anura: Ranidae) in a region of sympatric occurence (western Slovakia). *Journal Zoological Systematics Evolutionary Research.*

MNHN, & SHF. (2015). *La liste rouge des espèces menacées en France. Chapitre Reptiles et Amphibiens de France métropolitaine.* Paris: UICN France.

Moritz, C., Schneider, C., & Wake. (1992). Evolutionary relationships within Ensatina eschscholtzi complex confirm the ring species interpretation. *Systematic Biology. Vol 41*, 273-291.

Morse, H., Jones, N., Peltonen, K., Harvey, R., & Waters, R. (1996). The identification and repair of DNA adducts induced by waterborne benzo [a] pyrene in developing Xenopus laevis larvae. *Mutagenesi. Vol 11.*, 101-109.

Mouchet, F., Gauthier, L., Mailhes, C., Ferrier, V., & Devaux, A. (2005). Comparative study of the comet assay and micronucleus test in amphibian larvae (xenopus laevis) using benzo (a) pyrene, ethyl methanesulfonate, and methyl methanesulfonate: establishment of a positive control in the amphibian comet assay. *Environmental toxicology. Vol 20*, 74-84.

Muir, A., Biek, L., Thomas, R., & Mable, B. (2014). Local adaptation with high gene flow: temperature parameters drive adaptation to altitude in the common frog (Rana temporaria). *Molecular ecology. Vol 23*, 561-574.

Müller, T., Philippi, N., Dandekar, T., Schultz, J., & Wolf, M. (2007). Distinguishing species. *RNA.Vol 13*, 1469-1472.

Müllerova, D., & Kopecky, J. (2007). White adypose tissue: storage and effector site for environmental pollutants. *Physiological research. Vol 56.*, 375.

Nadal, M., Marquès, M., Mari, M., & Domingo, J. (2015). Climate change and environmental concentrations of POPs: A review. *Environmental Research*, 177-185.

Nakayama, S., Tanaka-Ueno, T., Sakamoto, K., Fujita, S., & Ishizuka, M. (2009). Molecular Cloning of Novel Cytochrome P450 1A Genes from nine Japanese Amphibian species. *The Journal of Veterinary Medical Science. Vol 7*, 1407-1411.

Neel, B., & Sargis, R. (2011). The paradox of progress: environmental disruption of metabolism and the diabetes epidemic. *Diabetes. Vol 60*, 1838-1849.

Nelson, D., Kamataki, T., Waxman, D., Guengerich, F., Estabrook, R., Feyereisen, R., & Okuda, K. (1993). The p450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA and cell biology. Vol 12*, 1-5.

Nelson, D., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J., Feyereisen, R., Waxman, D., & Gunsalus, I. (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics and genomics. Vol 6*, 1-42.

Neveu, A. (2009). Suitability of European green frogs for intensive culture: Comparison between different phenotypes of the esculenta hybridogenetic complex. *Aquaculture*, 30-37.

Neveu, A. (2011). Influence of genotype of froglets belonging to the Rana esculenta hybridogenetic complex in relation to learning capacity to eat pellets. *Aquaculture*, 343-349.

Ng, K., Chu, I., Bronaugh, R., Franklin, C., & Somers, D. (1992). Percutaneaous absorption and metabolism of pyrene, benzo[a]pyrene, and di(2-ethylhexyl)phthalate: comparison of in vitro and in vivo results in the hairless guinea pig. *Toxicology and apllied pharmacology. Vol 115*, 216-223.

Omiecinski, C., Heuvel, J., & Peters, J. (2011). Xenobiotics metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicological Sciences. Vol 120 (suppl 1)*, S49-S75.

Omura, T., & Sato, R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes.I.Evidence for its hemoprotein nature. *Journal of Biological Chemistry. Vol 239*, 2370-2378.

Otto, S., & Whitton, J. (2000). Polyploid incidence and evolution . *Annual Review of Genetics. Vol 34*, 401-437.

Pagano, A., & Joly, P. (1999). limits of the morphometric method for field identification of water frogs. *Alytes. Vol 16*, 130-138.

Pagano, A., Crochet, P., Graf, J., Joly, P., & Lodé, T. (2001). Distribution and habitat use of water frog hybrid complexes. *Global Ecology & Biogeography, Vol 10*, 433-441.

Pagano, A., Dubois, A., Lesbarrères, D., & Lodé, T. (2003). Frog alien species: A way for genetic invasion? *Comptes Rendus-Biologies*, 85-92.

Pagano, A., Lesbarrères, D., & Crivelli, A. (2008). Geographical and ecological distributions of frogs hemiclones suggest occurence of both "general purpose genotype" and "frozen niche variation" clones. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. Vol 46*, 162-168.

Panin, L., Chasovskikh, M., & Polakov, L. (1991). Characteristics of binding and transport of benzo(a)pyrene by blood serum lipoproteins. *Biulleten'eksperimental'noi biologii i meditsiny. Vol 111*, 31-33.

Parkinson, A. (2001). *Biotransformation of xenobiotics (p133-224).* New York : McGraw-Hill.

Patrelle, C. (2010). *Les complexes d'hybridation chez les grenouilles vertes: identification génétique, exigences écologiques et capacités d'acclimatation.* université d'Angers: Animal Biology.

Patrelle, C., Ohst, T., Picard, D., Pagano, A., Sourice, S., Dallay, M., & Plötner, J. (2011). A new PCR-RFLP-based method for an easier systematic affiliation of European water frogs. *Molecular Ecology Ressources. Vol 11*, 200-205.

Patrolecco, L., Ademollo, N., Capri, S., Pagnotta, R., & Polesello, S. (2010). Occurence of priority hazardous PAHs in water, suspended particulate matter, sediment and common eels (Anguilla anguilla) in the urban stretch of the river Tiber (Itly). *Chemosphere. Vol 11*, 1386-1392.

Păunescu, A., & Ponepal, C. (2011). Effect of Roundup herbivcide on physiological indices in marsh frog Pelophylax ridibundus. *Scientific Papers UASVM Bucharest. Series A. Vol 54*, 269-274.

Păunescu, A., Dima, R., Ponepal, M., Brinzea, G., Iosub, I., Soare, L., . . . Dinu-Pirvu, C. (2013). The protective role of malvidin on the hematological parameters of marsh frog (Pelophylax ridibundus)exposed to sublethal doses of Roundup. *Farmacia. Vol 61*, 439-447.

Paunovic A, B.-C. O. (2010). The diet of water frog (pelophylax esculentus "complex") from the Petrovaradinski rit marsh (serbia). *Arch. Biol. Sci. Vol 62*, 797-804.

Peirera, S. (2000). Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. *Genetics and molecular Biology. Vol 23*, 745-752.

Petersen, A., & Gleeson, T. (2011). Acclimation temperature affects the metabolic response of amphibian skeletal muscle to insulin. *Compararitve Biochemistry and Physiology, Part A. Vol 160*, 72-80.

Pfaffl, M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research. Vol 9*, 45.

Pievani, T. (2014). The sixth mass extinction: Anthropocene and the human impact on biodiversity. *Rend.Fis.Acc.Lincei. Vol 25*, 85-93.

Plötner, J., & Ohst, T. (2001). New hypotheses on the systematics of the western Palearctic water frog complex (Anura, Ranidae). *Mitteilungen aus dem Museum für Naturkunde in Berlin. Zoologische Reihe*, 5-21.

Plötner, J., Köhler, F., Uzzell, T., Beerli, P., Schreiber, R., Guex, G., & Hotz, H. (2009). Evolution of serum albumin intron-1 is shaped by a 5'truncated non-long terminal repeat retrotransposon in western Palearctic water frogs (Neobatrachia). *Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol 53*, 784-791.

Plötner, J., Uzzell, T., & Beerli, P. (2008). Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: A case in western Palearctic watre frogs. *Journal of Evolutionary Biology. Vol 21*, 668-681.

Polyakov, L., Chasovskikh, M., & Panin, L. (1996). Binding and transport of benzo[a]pyrene by blood plasma lipoproteins: the possible role of apolipoprotein B in this process. *Bioconjugate chemistry. Vol 7*, 396-400.

Pounds, J., Fogden, M., Savage, J., & Gorman, G. (1997). Tests of null models for amphibian declines on tropical mountain. *Conservation Biology.Vol 11*, 1307-13022.

Priemer, D., & Diamond, M. (2002). Application of the multimedia urban model to compare the fate of SOCs in an urban and forested watershed. *Environmental Science& Technology. Vol 36*, 1004-1013.

Propst, T., Fort, D., Stower, E., & Bantle, J. (1997). Evaluation of the developmental toxicity of benzo [α] pyrene and 2-acetylaminofluorene using Xenopus: Modes of biotransformation. *Drug and chemical toxicology. Vol 20*, 45-61.

Pruvost, N., Hoffman, A., & Reyer, H. (2013). Gamete production patterns, ploidy, and population genetics reveal evolutionary significant units in hybrid water frogs (Pelophylax esculentus). *Ecology and evolution. Vol 3*, 2933-2946.

Puigserver, P., & Spiegelman, B. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1α (PGC-1α): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine review. Vol 24*, 78-90.

Puigserver, P., Wu, Z., Park, C., Graves, R., Wright, M., & Spiegelman, B. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell. Vol 92*, 829-839.

Pushparajah, D., Plant, K., & Ioannides, C. (2016). Synergistic and antagonistic Interactions of binary mixtures of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the upregulation of CYP1 activity and mRNA levels in Precision-Cut rat liver slices. *Environmental Toxicology*.

Quaranta, A., Bellantuono, V., Cassano, G., & Lippe, C. (2009). Why amphibians are more sensitive than mammals to xenobiotics. *PloSOne. Vol 4*.e7699

Rankouri, T., Koomen, B., Sanderson, J., Bosveld, A., Seinen, W., & Van Den Berg, M. (2005). Induction of ethoxy-resorufin-O-deethylase activity by halogenated aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons in primary hepatocytes of the green frog (Rana esculenta). *Environmental toxicology and chemistry. Vol 24*, 1428-1435.

Ravindra, K., Sokhi, R., & Van Grieken, R. (2008). Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment. Vol 42*, 2895-2921.

Regnault, C. (2016). Désordres métaboliques et conséquences multi-générationnelles liés à l'exposition aux perturbateurs endocriniens chez un modèle d'amphibien (Xenopus tropicalis). France : Université Grenoble Alpes.

Regnault, C., Willlison, S., Veyrenc, S., Airieau, A., Méresse, P., Fortier, M., . . . Reynaud, S. (2016). Metabolic and immune impairments induced by the endocrine disruptors benzo|a]pyrene and triclosan in Xenopus tropicalis. *Chemosphere. Vol 155*, 519-527.

Regnault, C., Worms, I., Oger-Desfeux, C., Veyrenc, S., Bayle, M., Combourieu, B., . . . Reynaud, S. (2014). Impaired liver function in Xenopus tropicalis exposed to benzo [a] pyrene: transcriptomic and metabolic evidence. *BMC genomics. Vol 15*, 666.

Reynaud, S., & Dechaux, P. (2006). The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: a review. *Aquatic Toxicology. Vol 77*, 229-238.

Reynaud, S., Marionnet, D., Taysse, L., Duchiron, C., & Deschaux, P. (2002). The effects of 3-methylcholanthrene on macrophage respiratory burst and biotransformation activities in the common carp (Cyprinus carpio L.). *Fish and shellfish immunology (12)*, 17-34.

Reynaud, S., Raveton, M., & Ravanel, P. (2008). Interactions between immune and biotransformation systems in fish: A review. *Aquatic Toxicology. Vol 87*, 139-145.

Reynaud, S., Raveton, M., & Ravanel, P. (2008). Interactions between immune and biotransformation systems in fish: A review. *Aquatic Toxicology (87)*, 139-145.

Reynaud, S., Worms, I., Veyrenc, S., Portier, J., Maitre, A., Miaud, C., & Raveton, M. (2012). Toxicokinetic of benzo[a]pyrene and fipronil in female green frogs (Pelophylax kl.esculentus). *environmental pollution. Vol 161*, 206-214.

Roberts, M., Magnusson, B., Burczynski, F., & Weiss, M. (2002). Enterohepatic circulation. *Clinical pharmacokinetics. Vol 41*, 751-790.

Rockne, K., Shor, L., Young, L., Taghon, G., & Kosson, D. (2002). Distributed sequestration and release of PAHs in the weathered sediment: the role of sediment structure and organic carbon properties. *Envrironmental Science & Technology. Vol 36*, 2636-2644.

Roelants, K., Gower, D., Wikinson, M., Loader, S., Biju, S., Guillaume, K., . . . Bossuyt, F. (2007). Global patterns of diversification in the history of modern amphibians. *PNAS. Vol 104*, 887-892.

Ropero, A., Alonso-Magdalena, P., Garcia-Garcia, E., Ripoll, C., Fuentes, E., & Nadal, A. (2008). Bisphenol-A disruption of the endocrine pancreas and blood glucose homeostasis. *International journal of andrology. Vol 31*, 194-200.

Sadinski, W., Levay, G., Wilson, M., Hoffman, J., Bodell, W., & Anderson, S. (1995). Relationships among DNA adducts, micronuclei, and fitness parameters in Xenopus laevis exposed to benzo [a] pyrene. *Aquatic toxicology. Vol 32*, 333-352.

Saka, M. (2004). Developmental toxicity of p, p'-dichlorodiphenyltrichloroethane, 2, 4, 6-trinitrotoluene, their metabolites, and benzo [a] pyrene in Xenopus laevis embryos. *Environmental toxico-logy and chemistry. Vol 23*, 1065-1073.

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Poceedings of the National Academy of Sciences. Vol 74*, 5463-5467.

Sarria-Villa, R., Campo-Duque, W., Paez, M., & Schuhmacher, M. (2016). Presence of PAHs in water and sediments of the Colombian Cauca River during heavy rain episodes, and implications for risk assessment. *Science of the Total Environment. Vol 540*, 455-465.

Schlichting, I., Berendzen, J., Chu, K., Stock, A., Maves, S., Benson, D., . . . Sligar, S. (2000). The catalytic Pathway of Cytochrome P450cam at atomic Resolution. *Science. Vol 287*, 1615-1622.

Schmeller, D. (2004). Tying ecology and genetics of hemiclonally reproducing waterfrogs (Rana: Anura). *Annales Zoologici Fennici.Vol 41*, 681-987.

Schultz, J., Maisel, S., Gerlach, D., Müller, T., & Wolf, M. (2005). A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota. *RNA. Vol 11*, 361-364.

Schultz, R. (1969). Hybridization unisexuality, and polyploidyin the teleost Poleciliopsis (Paoeciliidae) and other vertebrates. *The American Naturalist , Vol 103*, 605-609.

Shen, H., Wang, R., Zhu, D., Li, W., Shen, G., Wang, B., . . . Liu, J. (2013). *Global atmospheric emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons from 1960 to 2008 and future predictions.* Environmental science and technology. *Vol 47*, 6415-6424.

Sheridan, M. (1994). Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Compararitve Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry. Vol 107*, 494-508.

Shimada, T. (2006). Xenobiotic metabolozing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics. Vol 21*, 257-276.

Shimizu, Y., Nakatsuru, Y., Ichinose, M., Takahashi, Y., Kume, H., Mimura, J., & Ishikawa, T. (2000). Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proceedings of the national Academy of Sciences. Vol 97*, 779-782.

Shoots, J., Fraccalvieri, D., Franks, D., Denison, M., Hahn, M., Boanti, L., & Powell, W. (2015). An Aryl Hydrocarbon Receptor from the Salamander Ambystoma mexicanum exhibits low sensitivity to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Environmental science and Technology.Vol 49*, 6993-7001.

Singare, P. (2016). Carcinogenic and endocrine-disrupting PAHs in the aquatic ecosystem of India. *Environmental monitoring and assessment. Vol 188*, 599.

Smith, P., Cobb, G., Godard-Codding, C., Hoff, D., McMurry, S., Rainwater, T., & Reynolds, K. (2007). Contaminant exposure in terrestrial vertebrates. *Environmental Pollution. Vol 150*, 41-64.

Som, C., & Reyer, H. (2006). Demography and evolution of pure hybridogenetic frog (Rana esculenta) populations. *Evolutionary Ecology Research. Vol 8*, 1235-1248.

Srogi, K. (2007). Monitoring of environmental exposure to polycyclic hydrocarbons: e review. *Environmental Chemistry Letters. Vol 5*, 169-195.

Staal, Y., Hebels, D., van Herwijnen, M., Gottschalk, R., van Schooten, F., & van Delft, J. (2007). Binary PAH mixtures cause additive or antagonistic effects on gene expression but synergistic ef-fects on DNA adduct formation. *Carcinogenesis. Vol 28*, 2632-2640.

Staal, Y., Pushparajah, D., Van Herwijnen, M., Gottschalk, R., Maas, L., Ionnides, C., . . . Van Delft, J. (2008). Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures: effects on gene expression and DNA adduct formation in precision-cut rat liver slices. *Mutagenesis. Vol 23*, 491-499.

Stuart, S., Chanson, J., Cox, N., Young, B., Rodrigues , A., Fischman, D., & Walker, R. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science. Vol 306*, 1783-1786.

Sturgill, M., & Lambert, G. (1997). Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function. *Clinical chemistry. Vol 43*, 1512-1526.

Sun, Y., Hao, Q., Xu, X., Luo, X., Wang, S., Zhang, Z., & Mai, B. (2014). Persistent organic pollutants in marine fish from Yongxing Island, South China Sea: Levels, composition profiles and human dietary exposure assessment. *Chemosphere. Vol 98*, 84-90.

Tarantini, A., Maître, A., Lefèbvre, E., Marques, M., Rajhi, A., & Douki, T. (2011). Polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures modulate the efficiency of benzo[a]pyrene to form DNA adducts in human cells. *Toxicology. Vol 279*, 36-44.

Taylor, K., Novak, R., Anderson, H., Birnbaum, L., Blystone, C., DeVito, M., . . . Lind, L. (2013). Evaluation of the association between persistent organic pollutants (POPs) and diabetes in epidemiological studies: A national toxicology program workshop review. *Environmental health perspectives. Vol 121*, 774.

Thirion, J., & Grillet, P. (2008). *Clés de détermination des Amphibiens et Reptiles du Centre-Ouest de la France.*

Tobiszewski, M., & Namiesnik, J. (2012). PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources. *Environmental pollution. Vol 33*, 110-119.

Tunner, H., & Heppich-Tunner, S. (1992). A new population system of water frogs discovered in Hungary. *In Proceedings of the Sixth Ordinary General Meeting of the Societas Europaea Herpetologica*, 453-460.

Tunner, H., & Heppich, S. (1981). Premeiotic genome exclusion during oogenesis in the common edible frog, Rana esculenta. *Naturwissenschaften. Vol 68*, 207-208.

Ueda, H., Ikenaka, Y., Nakayama, S., Tanaka-Ueno, T., & Ischizuka, M. (2011). Phase-II conjugation ability for PAH metabolism in amphibians: Characteristics and inter-species differences. *Aquatic toxicology. Vol 105*, 337-343.

Uzzell, T., Berger, L., & Günther, R. (1975a). Diploid and triploid progeny from a diploid female of Rana esculenta (Amphibia Salienta). *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia. Vol 127*, 81-91.

Uzzell, T., & Berger, L. (1975b). Electrophoretic phenotypes of Rana ridibunda, Rana lessonae and their hybridogenetic associate, Rana esculenta. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia.*, 13-24.

Uzzell, T., & Hotz, H. (1979). Electrophoretic and morphological evidence for two forms of green frogs (Rana esculenta complex) in peninsular Italy (Amphibia, Salientia). *Mitt. Zool. Mus. Berlin. Vol 55*, 13-27.

Uzzell, T., H. H., & Berger, L. (1980). Genome exclusion in gametogenesis by an interspecific Rana hybrid: Evidence from electrophoresis of individual oocytes. *Journal of Experimental Zoology. Vol 214*, 251–259.

Valdez Domingos, F., Oliveira Ribeiro, C., Pelletier, E., & Rouleau, C. (2011). Tissue distribution and depuration kinetics of waterborne 14C-labeled lignt PAHs in mummichog (Fundulus heteroclitus). *Environmental science & technology. Vol 45*, 2684-2690.

Van Ael, E., Covaci, A., Blust, R., & Bervoets, L. (2012). Persistent organic pollutants in the Scheldt estuary: envrironmental distribution and bioaccumulation. *Environmental international. Vol 48*, 17-27.

Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology. Vol 13*, 57-149.

Venturino, A., & Pechen de D'Angelo, A. (2005). Biochemical targets of xenobiotics: biomarkers in amphibian ecotoxicology. *Applied Herpetology. Vol 2*, 335-353.

Vinogradov, A., & Chubinishvili, A. (1999). Genome reduction in a hemiclonal frog Rana esculenta from radioactively contaminated areas. *Genetics. Vol 151*, 1123-1125.

Vinogradov, A., Borkin, L., Günther, R., & Rosanov, J. (1991). Two germ cell lineages with genomes of different species in one and the same animal. *Hereditas.Vol 114*, 245-251.

Vitt, L., & Caldwell, J. (2014). *Herpetology Introductory Biology of Amphibians and Reptiles Fourth edition.* Amsterdam.Boston.Heidelberg.London.New York.Oxford.Paris.San Diego. San Francisco. Sydney. Tokyo: Academic Press.

Voituron, Y., Eugene, M., & Barré, H. (2003). Survival and metabolic responses to freezing by the water frog (rana ridibunda). *journal of experimental Zoology part A: Ecological Genetics and physiology. Vol 299*, 118-126.

Voituron, Y., Joly, P., Eugene, M., & Barré, H. (2005). Freezing tolerance of the European water frogs: the good, the bad, and the ugly. *American journal of physiology-Regulatory, Integrative and Comparative physiology. Vol 288*, R1563-R1570.

Vojinovic-Miloradov, M., Buzarov, D., Adamov, J., Simic, S., & Popovic, E. (1996). Determination of polychlorinated biphenyls and polyaromatic hydrocarbons in frog liver. *Water Science and Technology. Vol 34*, 153-156.

Vondráček, J., Pěnčíková, K., Neča, J., Ciganek, M., Grycová, A., Dvořák, Z., & Machala, M. (2017). Assessment of the aryl hydrocarbon receptor-mediated activities of polycyclic aromatic hydrocarbons in a human cell-based reporter gene assay. *Environmental Pollution. Vol 220*, 307-316.

Vorburger, C., & Reyer, H. (2003). A genetic mechanism of species replacement in European waterfrogs? *Conservation Genetics. Vol 4*, 141-155.

Wake, D., & Vredenburg, V. (2008). Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view friom the world of amphibians. *PNAS. Vol 105*, 11466-11473.

Walker, S., Taylor, D., & Oris, J. (1998). Behavioral and histopathological effects of fluoranthene on Bullfrog larvae (Rana Castesbeiana). *Environmental Toxicology and chemistry. Vol 17*, 734-739.

Wan, G., Wu, H., Fujihara, T., & Fang, S. (2004). Which genetic marker for which conservation genetics issu? *Electrophoresis. Vol 25*, 2165-2176.

Wells, K. (1992). *The Ecology and Behavior of Amphibians.* Chicago and London: The University of Chicago Press.

Werck-Reichhart, D., & Feyereisen, R. (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology*, 3003.1-3003.9.

Whitlock, J. (1999). Induction of cytochrome P450A1. *Annual Review Pharmacology Toxicology. Vol39*, 103-125.

Whyte, J., Jung, R., Schmitt, C., & Tillitt, D. (2000). Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical reviews in toxicology. Vol30*, 347-570.

Wilson, S., & Jones, K. (1993). Bioremediation of soil contamined with polynuclear aromatic hydrocarbons(PAHs): a review. *Environmental Pollution. Vol 81*, 229-249.

Wu, S., Tao, S., Dawson, R., Lan, T., Li, B., & Cao, J. (2005a). Polycyclic aromatic hydrocarbons in dustfall in Tianjin, China. *Science of the Total environment. Vol 345*, 115-126.

Wu, S., Taos, Zhang, Z., Lan, T., & Zuo, Q. (2005b). Distribution of particle-phase hydrocarbons, PAHs and OCPs in Tianjin, China. *Atmospheric Environment. Vol 39*, 7420-7432.

Wycherley, J., Doran, S., & Beebee, T. (2002). Frog calls echo microsatellite phylogeography in the European pool frog (Rana lessonae). *Journal of Zoology, Vol 258*, 479-484.

Wycherley, J., Doran, S., & Beebee, T. (2002). Male advertisement call characters as phylogeographical indicators in Europea water frogs. *Biological Journal of the Linnean Society, Vol 77*, 355-365.

Yoneda, M., Hotta, K., Nozaki, Y., Endo, H., Uchiyama, T., Mawatari, H., . . . Nakajima, A. (2008). Association bet (NAFLD).ween PPARGC1A polymorphisms and the occurence of nonalcoholic fatty liver desease. *BMC gastroenterology. Vol 8*, 27.

Yoon, J., Puigserver, P., Chen, G., Donovan, J., Wu, Z., Rhee, J., & Newgard, C. (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *nature. Vol 413*, 131-138.

Yunker, M., Macdonald, R., Vingarzan, R., Mitchell, R., Goyette, D., & Sylvestre, S. (2002). PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Organic geochemistry. Vol 33*, 489-515.

Zamek-Gliszczynski, M., Hoffmaster, K., Nezasa, K., Tallman, M., & Brouwer, K. (2006). Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: Mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. *European Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol 27*, 447-486.

Zangar, R., Davydov, D., & Verma, S. (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxycology and applied Pharmocology. Vol 199*, 316-331.

Zeisset, I., & Beebee, T. (2003). Population genetics of a successful invader: the marsh frog Rana ridunda in Britain. *molecular Ecology. Vol 12*, 639-646.

Zeisset, I., Rowe, G., & Beebee, T. (2000). Polymerase chain reaction primers for microsatellite loci in the north European water g=frogs Rana ridibunda and Rana lessonae. *Molecular Ecology. Vol 9*, 1173-1174.

Zhang, L., Jin, Y., Huang, M., & Penning, T. (2012). The role of human aldo-keto reductases in the metabolic activation and detoxication of polycyclic aromatic hydrocarbons: interconversion of PAH catechols and PAH o-quinones. *Frontiers in pharmacologfy. Vol 3*, 193.

Zhang, L., Nichols, R., Correll, J., Murray, I., Tanaka, N., & Smith, P. (2015). Persistent organic pollutants modify gut microbiota-host metabolic homeostasis in mice through aryl hydrocarbon receptor activation. *Environmental health perspectives. Vol 123*, 679.

Zhang, S., Zhang, Q., Darisaw, S., Ehie, O., & Wang, G. (2007). Silmultaneous quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls(PCBs), and pharmaceuticals and

personal care products (PPCPs) in Mississippi river water, in New Orleans, louisiana,USA. *Chemosphere. Vol 66*, 1057-1069.

Zhang, Y., & Tao, S. (2009). Global atmospheric emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004. *Atmospheric Environment. Vol 43*, 812-819.

Zhou, H., Qu, Y., Wu, H., Liao, C., Zheng, J., Diao, X., & Xue, Q. (2010). Molecular phylogenies and evolutionary behavior of AhR (aryl hydrocarbon receptor) pathway genes in aquatic animals: Implications for the toxicology mechanism of some persistent organic pollutants (POPs). *Chemosphere. Vol 78*, 193-205.

Zhou, J., & Maskaoui, K. (2003). Distribution of polycyclic aromtic hydrocarbons in water and surface sedimentsfrom Daya bay, China. *Environmental pollution. Vol 121*, 269-281.

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Toxicocinétique et effets métaboliques du benzo[a]pyrène seul ou en mélange avec le benzo[b]fluoranthène chez la grenouille verte

Veyrenc Sylvie
10 janvier 2018

RÉSUMÉ

Dans les zones humides, un déclin dramatique des populations d'amphibiens a été observé au niveau mondial depuis les années 80. Malgré de nombreuses études suggérant que les amphibiens sont très sensibles aux pressions anthropiques cumulées, le rôle joué par les polluants organiques persistants (POP) reste mal connu sur le stade adulte. Les zones humides représentent des zones puits pour une grande variété de POP et particulièrement pour les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP) qui ont la caractéristique d'être retrouvés en mélange dans les écosystèmes. Le Benzo[a]pyrène (BaP) et le Benzo[b]fluoranthène (BbF) sont des HAP lourds appartenant à la liste des 16 HAP classés prioritaires qui présentent des caractéristiques physico chimiques similaires. Cette étude porte sur la toxicocinétique et les effets métaboliques du BaP seul ou en mélange avec le BbF chez les grenouilles vertes *P. kl. esculentus*. Par des méthodes classiques de suivi du ^{14}C-BaP, nous avons confirmé la tolérance des grenouilles vertes mâles à de forte concentration environnementale (10 $\mu g.l^{-1}$) de BaP, se caractérisant par une capacité d'absorption, de métabolisation de ce composé et d'excrétion. Néanmoins ces capacités sont modifiées par la présence du BbF sur les temps courts (de 12 h à 48 h), engendrant des différences de bioconcentration. Une tendance à l'induction hépatique des cytochromes P450 pour les individus exclusivement exposés au mélange a été également mise en évidence. De plus, l'étude du métabolisme glucidique par des tests de tolérance au glucose et au pyruvate a permis de mettre en évidence des désordres métaboliques notamment par l'activation de la voie de la néoglucogenèse sans modification de la sensibilité à l'insuline chez tous les individus sauvages exposés. Ces résultats nous ont permis de démontrer par des méthodes simples et globales que les HAP, bien que rapidement métabolisés par les grenouilles vertes, entrainent des désordres métaboliques importants. Ces effets apparaissent généralisés au modèle amphibien puisqu'ils confirment des résultats antérieurs obtenus chez le xénope *tropicalis* et qu'ils ne sont pas influencés par la complexité génétique des grenouilles vertes.

Mots-clés : amphibiens, grenouilles vertes, HAP, Benzo[a]pyrène, Benzo[b]fluoranthène, toxicocinétique, métabolisme glucidique.